



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAS DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL MAR FERNÁNDEZ ARJONA

**PAPEL DE LA MICROGLÍA
EN LA NEUROINFLAMACIÓN
GENERADA MEDIANTE NEURAMINIDASA**

DIRECTORES:

MARÍA DOLORES LÓPEZ ÁVALOS

JESÚS MATEOS GRONDONA


MÁLAGA, 2017





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María del Mar Fernández Arjona

 <http://orcid.org/0000-0001-5673-9806>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La Doctora **María Dolores López Ávalos**,
profesora titular del Área de Fisiología
en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA

que María del Mar Fernández Arjona ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "*Papel de la microglía en la neuroinflamación generada mediante neuraminidasa*". Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autoriza su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado
en Málaga, 2017.

Fdo.: María Dolores López Ávalos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El Doctor **Jesús Mateos Grondona**,
catedrático del Área de Fisiología en el
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA

que María del Mar Fernández Arjona ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "*Papel de la microglía en la neuroinflamación generada mediante neuraminidasa*". Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autoriza su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado

en Málaga, 2017.

Fdo.: Jesús Mateos Grondona



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El Doctor Manuel Cifuentes Rueda,
catedrático del Área de Fisiología y Director del
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA

que María del Mar Fernández Arjona ha realizado en los laboratorios de este
departamento el trabajo experimental que ha permitido la elaboración de la
presente

Memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firma el presente certificado
en Málaga, 2017.

Fdo.: Manuel Cifuentes Rueda

Yo, **María del Mar Fernández Arjona**, declaro ser el autor del presente trabajo de investigación realizado en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, bajo la dirección de la

Dra. María Dolores López Ávalos y del Dr. Jesús Mateos Grondona.

Y para que así conste, firmo el presente documento

en Málaga, 2017.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a surname, all enclosed within a large, sweeping oval stroke.

Fdo.: María del Mar Fernández Arjona

El presente trabajo ha sido financiado por:

Proyecto de excelencia P11-CVI-07637, Junta de Andalucía

Asimismo, como doctoranda disfruté de una Beca como Personal Investigador en Formación (PIF) asociada al Proyecto de excelencia P11-CVI-07637, Junta de Andalucía

Durante la realización de esta tesis doctoral he tenido la oportunidad de ampliar mi formación predoctoral con una estancia de tres meses de duración en el *Centre for Biological Sciences* en la Universidad de Southampton, Reino Unido, tutorizada por el Dr. Diego Gómez-Nicola (01/09/2016-30/11/2016). Subvención concedida por el programa de ayuda para Estancias en Centros de Investigación de Calidad, Servicio de Investigación, Plan Propio de la Universidad de Málaga.

Parte de los resultados obtenidos han sido publicados en:

Fernández-Arjona M, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. 2017. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Vol 11, Issue 235.
doi: 10.3389/fncel.2017.00235.

Y se han presentado en los siguientes congresos:

- 59th Meeting of the Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida. Málaga, 2015
- 10th FENS Forum of Neuroscience. Copenhagen, 2016.
- IX Reunión de la Red Glial Española. Alicante, 2017.
- 17th National Congress of the Spanish Society of Neuroscience. Alicante, 2017.

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado un momento especial, en el que por fin respiro y aprovecho esta oportunidad para agradecer tanto apoyo recibido durante esta etapa de mi vida, sin el que seguro este trabajo no hubiera llegado a buen puerto.

En primer lugar, debo expresar mi agradecimiento a las personas que directamente me han ayudado han conseguir este trabajo. Al investigador principal del proyecto y Catedrático Pedro Fernández-Llebrez, por depositar su confianza en mí, por apoyarme y compartir sus conocimientos con generosidad. A mis directores: la Doctora María Dolores López Ávalos (la jefa) y el Catedrático Jesús Mateos Grondona (el codire), gracias por acogerme en esta aventura, por dedicarme tantas horas de trabajo en el laboratorio, a pié de ordenador y a cualquier hora del día, aunque eso os supusiera restarlo vuestro tiempo libre. Gracias a vuestra ayuda, he conseguido llegar hasta aquí y poder presentar este trabajo del que me siento muy satisfecha y orgullosa. Los alumnos os adoran y he podido comprender en primera persona el motivo. Me llevo conmigo el conocimiento que me habéis transmitido, pero lo mejor ha sido que he disfrutado del trabajo en todo momento. Gracias por cada uno de esos momentos.

Gracias a los Doctores del departamento de Fisiología Animal, por hacerme sentir como en casa desde el primer día. A Marga, por todos tus consejos, protocolos y trucos de clases y del laboratorio, que aun tan apurada de tiempo has compartido desinteresadamente. A Manolo, por toda la ayuda en el laboratorio y en las prácticas, por transmitir generosamente tus conocimientos en cualquier parte. A Juan Pérez, por todos tus consejos tan variados y tan útiles, para el laboratorio, la estancia o lo que se terciara. A Leonor, Rick, Juan Suárez, por todo su apoyo y su ayuda en las prácticas. También quiero agradecer a Mamme, Rosi y en especial a Pablo, la transmisión de conocimiento en el laboratorio desde las trincheras, gracias por todos esos protocolos, explicaciones y horas de trabajo que me habéis dedicado. También quisiera agradecer el apoyo de todos los compañeros de laboratorio a: Clara, Pilar, Román, Sara, Celia, Carmen, Inma, Cristóbal, Marta, Leyre y a todos los alumnos con los que he compartido el laboratorio. Y de forma especial, quisiera agradecer el apoyo y ayuda de Silvia, eres el alma del laboratorio, la alegría de la huerta y más “apañá” que las pesetas, ha sido todo un placer haber contado contigo estos años. Y cómo no, al personal de la limpieza, en especial a Inma y Ana, que nos atienden y nos cuidan con mucho cariño.

También quisiera agradecer el apoyo recibido en el laboratorio del Doctor Diego Gómez Nicola, en el CNS Inflammation Group, Biological Sciences de Southampton. I would like to thank you for welcoming me in your group, for sharing your knowledge, for dedicating your time to me with patience and selflessness. Thanks to Renzo, Katie, Alex, Daniel, Paul, Claire, Lucy, Sarah, Georgi and Gemma for helping me always with a smile. I would particularly like to thank my two angels Emilie and Julie, willing, good professionals, good attitude and really generous. It has been a pleasure learning from you both. And of course, I want to thank Diego, the group leader. Definitely, it is your merit the good work of the group, congratulations. Thank you for welcoming me, I felt at home. Undoubtedly, a part of this work has been made possible thanks to you.

Gracias a todos los Doctores, técnicos y becarios del departamento de Biología Celular por vuestra colaboración. En especial a Ana por toda su ayuda y buena disposición cada vez que se la necesita. También, agradecer a Antonio Jiménez, María y Luis por vuestra ayuda y apoyo, en especial en el congreso internacional de hidrocefalia. Y al antiguo Director José Becerra por su amabilidad y apoyo.

También me gustaría agradecer la colaboración del equipo del SCAI. Empezando por David Navas, por su paciencia, buena disposición y ayuda en la toma de imágenes con la microscopía confocal. A Manoli Vega y a Ramón Hidalgo por su gran ayuda en el procesamiento de las imágenes y los cálculos estadísticos. A Reme Crespillos por su asistencia en Servicio de Biología Molecular. Y al personal de la Facultad de Medicina, en particular del estabulario a Ricardo y Ana por su amabilidad, y del departamento de Anatomía Patológica a Martina Álvarez y María José Lozano por sus consejos en la puesta a punto de algunos anticuerpos.

Además, tengo que agradecer el apoyo y amabilidad de todos los Doctores y becarios de Fisiología Vegetal: Carolina, María Jesús, Lourdes, Sergio, Candela, Elena, José Antonio, Delia, José Ángel, Fernando, Rafa, Antonio Matas, Nieves ha sido un placer teneros de vecinos. Un especial agradecimiento va para Isa, por compartir penas, alegrías e incertidumbres, se ha hecho todo más llevadero.

Por otro lado, quisiera dar las gracias a cada uno de los Doctores del Departamento Biología Vegetal. Aunque han pasado varios años no olvido vuestra generosidad y paciencia, ya que durante mi paso por allí me colé en todas las salidas de campo y clases que pude, y siempre me aceptasteis de buen grado. En especial a José María Nieto, Enrique, Baltasar, Blanca, Marta, etc., y cómo no, gracias también a Lola y Eva. También, agradecer ese intercambio de conocimiento y esos ratitos a mis compis del laboratorio Marianela, Carmen,

Jose, Rodri, Paulina y Luís, me llevo muchos recuerdos vuestros. Pero en particular quería agradecer a Andrés el despertarme el gusanillo por la Botánica y que tuvieras tanta paciencia en repetir y machacar esos nombrecillos latinos hasta fijar y comprender los conceptos. Y a Noelia esas salidas de campo, seguidas de los trasiegos de fotos y de pliegos que liábamos y que tanto disfrutábamos. Sois geniales, gracias por darme esos ratitos.

Tengo un especial agradecimiento para Elena Bañares y Antonio Flores. A Elena, por transmitirme una actitud de esfuerzo y constancia en el laboratorio llevando siempre la mejor de las sonrisas. Y a Antonio, por dedicarme todas aquellas horas de despacho, de redacción y correcciones de manuscritos, para enseñarme a plantear, pensar, discrepar y en conjunto, a investigar.

Va un agradecimiento muy entrañable a nuestros amigos y a todos los compañeros de Julio, en particular a Manolo Robles y Susi, Fran y Mónica, Diego, Macarena, Rafa, Marcos, Carmen, Mariló, Loli y un largo etcétera. Pero quisiera transmitir un agradecimiento especial a Paco Páez, por apoyarme desde los comienzos en la carrera con todos los gestos de ánimo posibles. Has tenido más fe en mí, que yo misma. No me extraña que los resis te aprecien tanto. Yo también me siento especialmente tutorizada por ti. Gracias Paquito.

Además, tengo que agradecer el apoyo a mi familia. Desde mis sobrinos Sandrita, Marina, Pablo, Dani, Celia, Javier y Pili. A mis cuñaos Antoñita y José Carlos, por eso paseos en coche a recoger los niños, jeje. A mis "cuñailas" Lidia, Feli y Paquita, por esos ratitos tan buenos de charlitas los viernes, Y a mis hermanos, Juanito, Francisco y Antonio, porque sé que están ahí apoyándome siempre. Un especial agradecimiento a Pepe (donde quiera que esté) y Maruja, por apoyarme desde el primer día como si fuera vuestra hija. Y cómo no, gracias a mis papis: Paco y Antonia, por insistir en que estudiara y apoyarme en todo lo que decida, aunque no tengáis muy claro que estoy haciendo exactamente.

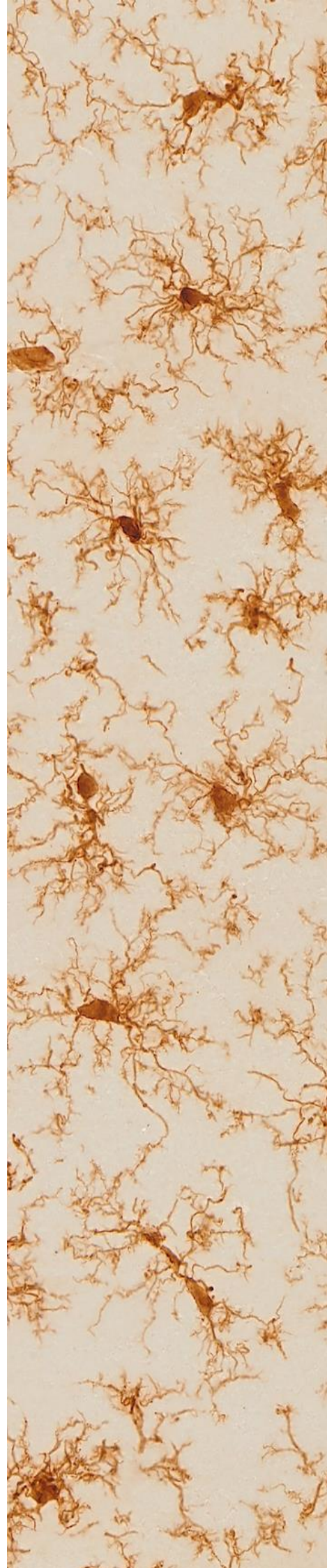
Finalmente, me gustaría agradecer el apoyo de mis dos cielos: Inmita y Julito, sois los mejores niños que se pueda tener, me siento muy orgullosa de vosotros porque ya no vais de la mano, sino que vais volando y cumpliendo vuestros sueños gracias a vuestro propio esfuerzo.

Y por último, gracias a Julio. Por apoyarme en todo momento, por reconstruir mi escala de valores cuando me despisto y por compartir conmigo todo lo que sabes. En definitiva, por estar siempre a mi lado, y en particular por haber sufrido y disfrutado conmigo esta aventura.

Como dijo Isaac Newton: "Si yo he visto más allá, es porque logré pararme sobre hombros de gigantes". Gracias a todos.

A Julito, Inma y Julio

Abreviaturas



#: cualquier número (*any number*)

ANOVA: análisis de varianza (*analysis of variance*)

αMEM: medio de cultivo Eagle mínimo esencial (*minimum essential medium Eagle*)

BHE: barrera hematoencefálica (BBB: *blood brain barrier*)

BrdU: marcador de mitosis, bromodesoxiuridina (*bromodeoxyuridine*)

CC: circularidad celular (*cell circularity*)

CA3: región del hipocampo *Cornu Ammonis 3* (*hippocampal region*)

CCL2: quimiocina CC tipo 2 (*chemokine CC2*), MCP-1: proteína quimioatrayente monocítica 1 (*monocytic chemokine protein 1*)

CCR2: receptor de la quimiocina CC2 (*chemokine receptor CC2*)

CCR2^{-/-}: cepa de ratón deficiente del receptor CCR2 (*CCR2 knockout*)

CD#: cluster de diferenciación #

CHA: área del polígono convexo (*convex hull area*)

CHC: círculo que incluye el polígono convexo (*convex hull circle*)

CHSR: ratio de los diámetros del polígono convexo (*convex hull span ratio*)

CNS: *central nervous system*

CP: putamen caudado (*caudate putamen*)

CSF1: factor estimulante de colonias 1 (*colony stimulant factor 1*)

CSF1R: receptor del factor estimulante de colonias 1 (*colony stimulant factor receptor 1*)

CX3CR1: receptor fractalquina (*fractalkine receptor*)

CX3CL1: ligando específico (quimiocina) del receptor fractalquina (*chemokine fractalkine*)

CX3CR#: receptor de quimiocina tipo CX3C# (*CX3C# chemokine receptor*)

CX3CL#: quimiocina del receptor CX3C# (*CX3C# chemokine*)

D: dimensión fractal (*fractal dimension*)

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño celular (*damage-associated molecular patterns*)

DMEM/F12: medio de cultivo con mezcla de nutrientes adecuado para microglía

(*Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F12*)

EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

Ep: cultivo primario de endoteliales (*ependymal cell culture*)

Ex: explante de la pared ventricular (*ventricular wall explant*)

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FOXJ1: factor de transcripción ciliar *Forkhead box protein J1* (*ciliar transcription factor*)

IIG9: proteína que regula la movilidad ciliar (*ciliar protein*)

GAPDH: proteína de referencia para cuantificar expresión de genes por PCR, gliceraldehído-3-fosfato des-hidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

H/HA: hemaglutinina (*hemagglutinin*)

H1N1: subtipo de virus *influenza* responsable de la pandemia de la gripe A del 2009-2010

H5N1: subtipo de virus *influenza* responsable de la epidemia de la gripe aviar del 2004-2006

HBSS: medio de cultivo Hank equilibrado en sales (*Hank's balanced salt solution*)

HCA: análisis de agrupación jerárquica (*hierarchical cluster analysis*)

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico [*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid*]

Hyp: hipotálamo (*hypothalamus*)

IBA1: molécula adaptadora de unión a calcio iónico, marcador de microglía (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

ICV: intracerebroventricular

IFRα: interferón alfa

IL-1β: interleucina 1 beta (*interleukine 1 beta*)

IL-1R#: receptor de interleucina 1 (*interleukine 1 receptor #*)

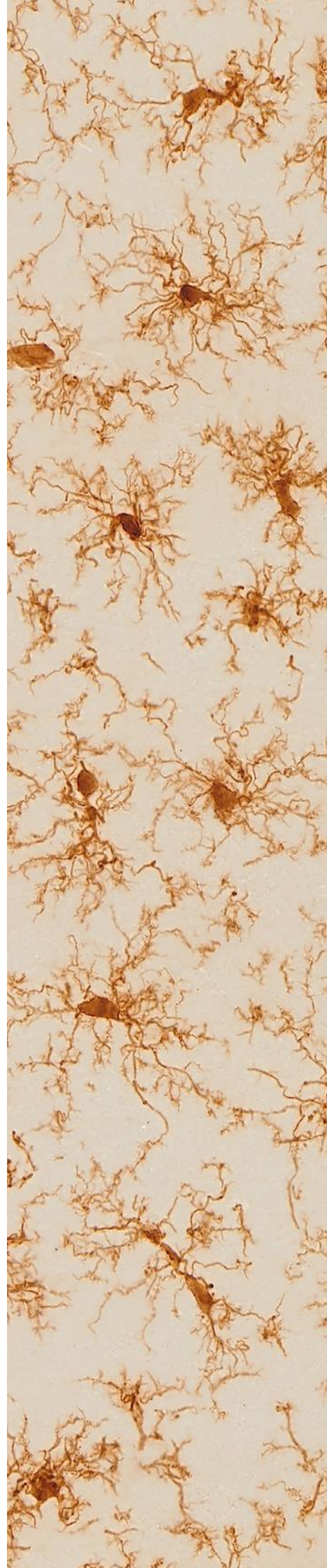
IL-#: interleucina # (*interleukine #*)

Iκβ: inhibidor del factor de transcripción kappa beta

IRF-3: factor de transcripción del interferón

- A:** lacunaridad (*lacunarity*)
- LCR:** líquido cefalorraquídeo (CSF: *cerebro spinal fluid*)
- LD#:** función lineal discriminante # (*linear discriminant function #*)
- LDA:** análisis lineal discriminante (*linear discriminant analysis*)
- LPS:** lipopolisacárido (*lipopolysacharide*)
- LV:** ventrículo lateral (*lateral ventricle*)
- Ly6C:** proteínas que se expresan en la superficie de monocitos, neutrófilos, células T y células NK (células mieloides)
- M1:** estado de activación pro-inflamatorio de macrófagos/microglía
- M2:** estado de activación anti-inflamatorio de macrófagos /microglía
- MHCII:** complejo mayor de histocompatibilidad clase II (*major histocompatibility complex class II*)
- MMI:** índice de multimodalidad (*multi-modality index*)
- MSACH:** diámetro máximo del polígono convexo (*maximum span across the convex hull*)
- MyD88:** molécula adaptadora de la ruta de activación pro-inflamatoria de la microglía
- NA:** neuraminidasa (*neuraminidase*)
- NF- κ B:** Factor de transcripción nuclear kappa beta (*nuclear factor Kappa beta*)
- NK:** células asesinas naturales del inglés *natural killer*
- NLRs:** receptores similares al dominio de unión y oligomerización de nucleótidos (*nod-like receptors: nucleotid-binding oligomerization domain*)
- PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogens-associated molecular patterns*)
- PC#:** componente principal # (*principal component #*)
- PCA:** análisis de componentes principales (*principal component analysis*)
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- P3C:** peptide sintético Pam₃CysSK₄ (*N-palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,s)-propyl)-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysine*)
- PFA:** paraformaldehído (*paraformaldehyde*)
- PPR:** receptores de reconocimiento de patrones moleculares (*pattern recognition receptor*)
- PSR:** receptor de fosfatidilserina (*phosphatidylserin receptor*)
- PU1:** factor de transcripción de proliferación microglial
- qPCR:** PCR a tiempo real o cuantitativa (*quantitative PCR*)
- ROS:** especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
- RT-PCR:** PCR con transcriptasa inversa (*reverse transcription PCR*)
- SF:** núcleo septofimbrial del cerebro (*septo-fimbrial nucleus*)
- Siglecs:** proteínas de membranas (lectinas) que se unen a ácido siálico (*sialic acid recognizing Ig superfamily lectins*)
- TGF β :** factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*)
- TGFR#:** receptores del factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor receptor #*)
- TIRAP:** proteína adaptadora de la ruta de activación pro-inflamatoria de la microglía
- TLR#:** receptores similares a Toll tipo # (*Toll-like receptor #*)
- TLR#^{-/-}:** cepa de ratón deficiente en el receptor TLR # (*TLR # knockout*)
- TNF α :** factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
- TNFR#:** receptor del factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha receptor #*)
- TRAM:** molécula adaptadora de la ruta de activación pro-inflamatoria de la microglía
- TREM:** receptor de microglía (*triggering receptor expressed on myeloid cells-2*)
- SNC:** sistema nervioso central (CNS: *Central nervous system*)
- STAT#:** factor de transcripción # (*transcription factor #*)
- UNV:** unidad neurovascular
- VRC:** criterio de ratio de varianzas (*variance ratio criterion*)
- VCAM-1:** Molécula de adhesión celular vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)

Índices



INDICE GENERAL

1. SUMMARY	Página 1
2. INTRODUCCIÓN	Página 19
2.1. Microglía	Página 20
2.1.1. El descubrimiento de la microglía	Página 20
2.1.2. Los diferentes estados de la microglía	Página 24
2.1.2.1. La microglía en estado vigilante o de reposo	Página 24
2.1.2.2. El estado pro-inflamatorio de la microglía	Página 27
2.1.2.3. El estado anti-inflamatorio de la microglía	Página 29
2.1.3. Proteínas de membrana implicadas en la respuesta inmune	Página 30
2.1.3.1. Los receptores de patrones moleculares	Página 30
2.1.3.2. Receptores de quimiocinas	Página 32
2.1.3.3. Otros receptores	Página 34
2.2. Neuroinflamación	Página 34
2.2.1. El sistema inmune del sistema nervioso central	Página 35
2.2.2. Neurodegeneración	Página 39
2.2.3. El modelo de neuroinflamación generado mediante la administración de neuraminidasa	Página 45
2.2.3.1. La neuraminidasa	Página 46
2.2.3.2. El daño del epéndimo en el modelo de neuroinflamación por neuraminidasa	Página 47
2.3. Análisis de la forma de las células de microglía	Página 49
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	Página 54
4. MATERIAL AND METHODS	Página 62
4.1. Animals	Página 63
4.2. Ventricular wall explants	Página 63
4.3. Isolation and culture of ependymal cells	Página 64
4.4. Isolation and culture of microglial cells	Página 64
4.5. Cell viability assays	Página 65
4.5.1. Viability assay of ependymal cells in explants	Página 65
4.5.2. Viability assay of cultured ependymocytes	Página 67
4.6. Intracerebroventricular injection	Página 68
4.7. Free floating sections of brain tissue	Página 69
4.8. Immunohistochemistry and immunocytochemistry	Página 69
4.8.1. Immunohistochemistry	Página 69
4.8.2. Immunocytochemistry	Página 70
4.9. PCR for gene expression studies	Página 71
4.9.1. RNA isolation	Página 72
4.9.2. Reverse transcription	Página 73
4.9.3. Polymerase chain reaction (PCR) analysis	Página 73

4.9.4. Quantitative PCR	Página 75
4.10. Image acquisition	Página 76
4.11. Image processing for morphometric classification of microglial cells	Página 78
4.12. Image processing for the correlation of morphological parameters and IL-1β expression level	Página 79
4.13. Morphometric analysis of microglial cells	Página 81
4.14. Statistical analysis	Página 84
4.14.1. Hierarchical cluster analysis	Página 84
4.14.2. Linear discriminant analysis	Página 86
4.14.3. Principal components analysis	Página 86
4.14.4. Simple linear regression	Página 87
4.14.5. Analysis of variance	Página 87
5. RESULTS	Página 88
5.1. Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis	Página 89
5.1.1. Intracerebroventricular NA induced morphological changes in microglial cells in the septofimbrial nucleus, the CA3 hippocampal area, and the periventricular hypothalamus	Página 89
5.1.2. IL-1 β expression evidences an acute neuroinflammatory reaction provoked by NA in periventricular areas	Página 91
5.1.3. Five quantitative morphological parameters of microglia were statistically different in cells from NA treated animals compared to saline controls	Página 92
5.1.4. Hierarchical cluster analysis allows the identification of four types of microglial cells based on morphological parameters.....	Página 95
5.1.5. Linear discriminant analysis revealed that <i>convex hull span ratio</i> , <i>cell circularity</i> and <i>convex hull area</i> are the critical parameters when sorting microglial cells	Página 98
5.1.6. Principal components analysis revealed that <i>maximum span across the convex hull</i> and <i>convex hull circularity</i> are supplementary features that aid microglia classification	Página 102
5.2. Morphological parameters of NA-activated microglial cells correlate with IL-1β expression level	Página 110
5.2.1. Different degrees of IL-1 β expression in the population microglial cells activated after NA administration	Página 110
5.2.2. Morphological measurements of microglia from NA treated rats present a broad variability	Página 112
5.2.3. Morphological parameters values correlate with the level of expression of IL-1 β in NA-activated hypothalamic microglia	Página 115
5.3. Toll like receptor 4 plays a key role in NA-induced activation of microglia	Página 118

5.3.1. Intracerebroventricular NA increases the number of IBA1-positive, IL-1 β -positive, and ICAM-1-positive cells, the first two in a TLR4 dependent manner.....	Página 119
5.3.2. Intracerebroventricular NA increases the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , and IL-6, in a TLR4 dependent manner	Página 126
5.3.3. NA induced an increase in mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , and IL-6 in cultured microglia, in a TLR4 dependent manner	Página 128
5.4. Microglia activated by NA participate in ependymal cell death.....	Página 130
5.4.1. Ependymal damage in ventricular wall explants co-cultured with NA-activated microglia	Página 131
5.4.2. NA-activated microglia impair the viability of isolated cultured ependymal cells	Página 134
5.4.3. NA induces the up-regulation of inflammatory cytokines and their receptors in ventricular wall explants	Página 136
5.4.4. Ependymocytes constitutively express IL-1 β receptors	Página 138
5.5. The recruitment of circulating inflammatory monocytes aids the remarkable inflammatory response mounted by resident microglia in response to intraventricular NA	Página 140
5.5.1. Neuraminidase provokes an increase in the population of IBA1-positive cells, which is dependent on the chemokine receptor CCR2	Página 140
5.5.2. No signs of stimulated microglia proliferation during NA-induced inflammation	Página 143
5.5.3. MHCII and Ly6C positive cells, and inflammatory monocytes, but not perivascular macrophages, are recruited during NA-induced inflammation	Página 146
5.5.4. NA provoked the up-regulation of various cytokines, although more moderately in CCR2 ^{-/-} mice	Página 151
6. DISCUSIÓN	Página 161
6.1. Clasificación de las células de microglía en un modelo de neuroinflamación en función de su morfología, mediante el uso de análisis de agrupamiento jerárquico y de componentes principales	Página 162
6.1.1. Diferentes parámetros morfométricos medidos en la microglía revelan su activación inducida por la NA	Página 162
6.1.2. El análisis de clúster jerárquico y de componentes principales permite la clasificación morfológica de la microglía	Página 165
6.1.3. Propuesta de un árbol de decisión basado en parámetros morfológicos para la categorización de las células de la microglía	Página 168

6.2. La correlación entre el nivel de expresión de IL-1β y los parámetros morfológicos demuestra que dichos parámetros pueden predecir el grado de activación de la microglía	Página 170
6.2.1. Diferentes grados de expresión de IL-1 β en la microglía activada por inyección de NA	Página 171
6.2.2. Los parámetros morfométricos revelan una amplia variabilidad morfológica en la microglía activada por NA	Página 172
6.2.3. Existe una correlación entre diferentes parámetros morfométricos y el nivel de expresión de IL-1 β en la población de microglía hipotalámica activada por NA	Página 174
6.3. El receptor TLR4 de la microglía es clave en la activación del proceso inflamatorio generado por la NA y TLR2 participa incrementando la expresión de citoquinas inflamatorias	Página 176
6.3.1. El receptor TLR2 de la microglía participa en la inflamación inducida por la NA, aunque no es esencial	Página 176
6.3.2. El receptor TLR4 de la microglía es esencial para iniciar el proceso inflamatorio inducido por la NA	Página 178
6.3.3. Los receptores TLR2 y TLR4 de la microglía como dianas terapéuticas	Página 180
6.4. La microglía activada por la neuraminidasa participa en la muerte endimaria	Página 183
6.4.1. El descenso de viabilidad de los endimocitos se relaciona directamente con la activación de la microglía	Página 184
6.4.2. Otras posibles causas de la muerte endimaria mediada por NA	Página 185
6.4.3. La muerte endimaria podría estar mediada por citoquinas inflamatorias liberadas por la microglía activada	Página 187
6.5. Los macrófagos circulantes reclutados al parénquima nervioso durante la inflamación inducida por neuraminidasa incrementan la virulencia del proceso inflamatorio iniciado por la microglía residente	Página 189
6.5.1. El receptor CCR2 participa en el incremento de macrófagos/microglía que ocurre tras la administración de NA	Página 189
6.5.2. El incremento de la microglía tras la administración de NA no es debido a la proliferación de la microglía residente	Página 190
6.5.3. La administración de NA genera la entrada en el parénquima nervioso de células MHCII y Ly6C positivas, pero no de macrófagos perivasculares	Página 191
6.5.4. El receptor CCR2 hace que la respuesta inflamatoria tras la administración de NA sea más virulenta	Página 195
7. CONCLUSIONS	Página 198
8. BIBLIOGRAFÍA	Página 201

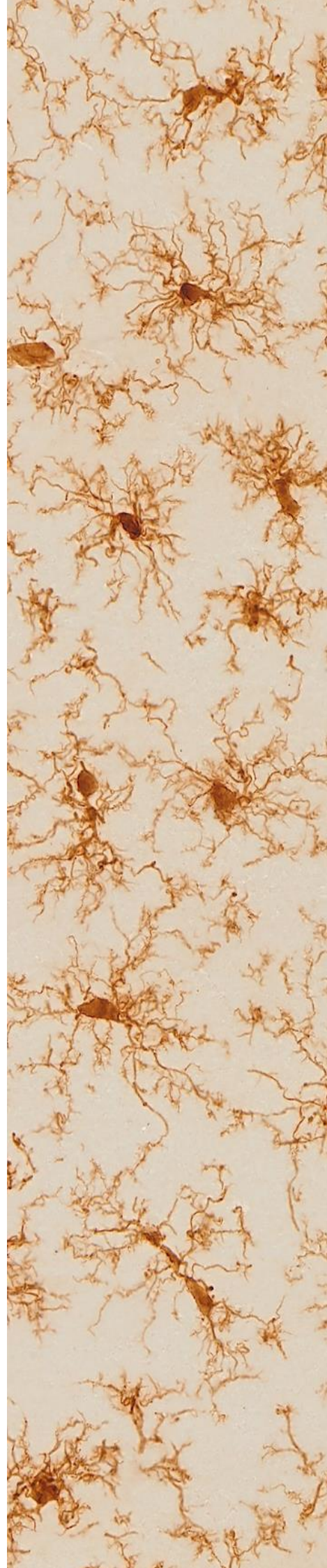
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura I-1. Investigadores fundamentales en el descubrimiento de las células de microglía	Página 21
Figura I-2. Dibujos esquemáticos de los métodos histológicos que permitieron identificar las células microgliales	Página 22
Figura I-3. Ilustraciones de microglía realizadas por Pío del Río-Hortega	Página 23
Figura I-4. Funciones de la microglía en un cerebro sano	Página 25
Figura I-5. Los estados de activación de la microglía según el perfil inflamatorio y la función efectora	Página 28
Figura I-6. Esquema resumido de las vías de señalización por la activación de TLR2 y TLR4	Página 30
Figura I-7. La respuesta inmune en el SNC	Página 37
Figura I-8. Polarización de la microglía hacia los fenotipos M1 y M2 en accidentes cerebrovasculares	Página 40
Figura I-9. Balance entre los fenotipos M1 y M2 de la microglía en la enfermedad de Alzheimer	Página 42
Figura I-10. Conjunto de fractales de Mandelbrot	Página 52
Figure M-1. Schematic illustration of the experiments carried out with ventricular wall explants and ependymal cells	Página 66
Figure M-2. Pre-processing of cell digital image	Página 78
Figure M-3. Image processing for the quantification of IL-1 β expression in IBA1 positive cells	Página 80
Figure M-4. Image processing for the morphometric analysis of fluorescently labeled IBA1 microglia	Página 81
Figure M-5. Schematic drawings of the parameters used to analyze the morphology of the microglial cells	Página 83
Figure R-1. Polymorphism of microglial cells from different brain areas in basal conditions and after an inflammatory stimulus	Página 90
Figure R-2. Neuraminidase induces IL-1 β expression in microglial cells	Página 91
Figure R-3. The morphological parameters <i>fractal dimension</i> , <i>lacunarity</i> , <i>cell area</i> , <i>density</i> , and <i>cell perimeter</i> reveal microglial activation after NA treatment	Página 93
Figure R-4. Classification of microglia according to morphological parameters	Página 97
Figure R-5. Distribution of microglial cell Clusters in different brain areas	Página 101
Figure R-6. Distribution of microglial cells on the principal components plane	Página 103
Figure R-7. Categorization of microglial cells by means of a logical decision tree based on morphological parameters	Página 105
Figure R-8. Different microglia filled shapes and their corresponding parameters values	Página 106
Figure R-9. Distribution of microglial cell Types in different brain areas	Página 108

Figure R-10. A proposed model of the distribution of microglial morphotypes in the rat brain subjected to induced sterile inflammation	Página 109
Figure R-11. IL-1 β staining highlights microglia activation in periventricular areas after NA injection	Página 110
Figure R-12. IL-1 β level of expression among the microglial cell population is notably diverse	Página 111
Figure R-13. Morphological variability of microglial cells and their corresponding parameters values	Página 113
Figure R-14. Morphological parameters analysis of NA-activated microglia sampled from caudate-putamen, septofimbrial nucleus and hypothalamus	Página 114
Figure R-15. Linear regression analysis between five different morphological parameters and IL-1 β expression in a population of NA-activated microglial cells from the hypothalamus.....	Página 116
Figure R-16. IBA1 immunostaining increases during NA-induced neuroinflammation in TLR2 or TLR4 deficient mice	Página 119
Figure R-17. IBA1 positive cell counts in TLR2 and TLR4 deficient mice injected with NA	Página 120
Figure R-18. Immunostaining of IL-1 β appears after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice	Página 122
Figure R-19. Quantification of IL-1 β positive cells after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice	Página 123
Figure R-20. ICAM-1 immunostaining after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice	Página 124
Figure R-21. Quantification ICAM-1 positive cells in TLR2 and TLR4 mice treated with NA	Página 125
Figure R-22. Pro-inflammatory cytokines expression in the hypothalamus of TLR2 and TLR4 deficient mice after NA injection	Página 127
Figure R-23. Pro-inflammatory cytokines expression in isolated cultured microglia from TLR2 and TLR4 deficient mice after in vitro NA stimulation	Página 129
Figure R-24. Purified microglial and ependymocyte cultures obtained for co-culture experiments	Página 131
Figure R-25. Viability of ependymocytes in explants co-cultured with NA-activated microglia	Página 133
Figure R-26. Viability of ependymal cells co-cultured with NA-activated microglial cells	Página 135
Figure R-27. Expression of cytokine receptors in ventricular wall explants	Página 137
Figure R-28. The receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 are expressed by ependymal cells	Página 138
Figure R-29. Quantification of the expression of cytokine receptors by ependymal cells.....	Página 139
Figure R-30. IBA1 immunohistochemistry in CCR2 deficiency mice injected with NA	Página 141

Figure R-31. IBA1 positive cell counts in CCR2 deficiency mice injected with NA	Página 142
Figure R-32. BrdU proliferation study in CCR2 deficient mice injected with NA	Página 143-4
Figure R-33. Expression of microglia proliferation related genes during NA-induced neuroinflammation	Página 145
Figure R-34. Perivascular macrophages recruitment into the brain parenchyma after NA	Página 146-7
Figure R-35. MHCII positive cells recruitment into the brain parenchyma after NA injection	Página 148
Figure R-36. Recruitment of Ly6C positive cells into the brain parenchyma after NA injection	Página 150
Figure R-37. CCR2 deficiency determines the Ly6C-positive cell type that is recruited after NA-injection	Página 151
Figure R-38. IL-1 β immunostaining in CCR2 deficient mice during NA-generated neuroinflammation	Página 152
Figure R-39. IL-1 β positive cell counts in CCR2 deficiency mice during NA-induced neuroinflammation	Página 153
Figure R-40. Expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α after NA-injection in CCR2 deficient mice	Página 154
Figure R-41. Expression of the chemokine CCL2 and the cytokine IL-6 after NA-injection in CCR2 deficiency	Página 155
Figure R-42. Expression of the anti-inflammatory cytokines IL-10, TGF β and IL-4 in CCR2 deficient mice after NA-injection	Página 156
Table M-1: List of primary antibodies	Página 70
Table M-2: List of secondary antibodies	Página 71
Table M-3: Sequence of primers used in PCR and qPCR	Página 74
Table R-1: Morphometric values of microglial cells from the septofimbrial nuclei	Página 158
Table R-2: Morphometric values of microglial cells from hippocampus	Página 159
Table R-3: Morphometric values of microglial cells from hypothalamus	Página 160
Table R-4.: Multimodality index (MMI) of morphometric parameters	Página 96
Table R-5. Variance ratio criterion (VRC) following Calinski-Harabasz	Página 98
Table R-6. Parameters ANOVA used for LDA for clusters comparison	Página 98
Table R-7. Coefficients of linear discriminant functions (LDs)	Página 99
Table R-8. Coefficients of principal components analysis (PCs)	Página 102
Table R-9. Regression and correlation coefficients of simple linear regression between degree of IL-1 β expression and the morphometric parameters in microglial cells from hypothalamic area	Página 117

1. Summary



In 1919 Pío del Río Hortega, a disciple of Santiago Ramón y Cajal, developed a histochemical technique that allowed to distinguish microglia from other neuroglial cells. Thus, microglial cells were first identified by Río Hortega, who also recognized one of the major features of these cells: the morphological change that they undergo in pathological situations. Nowadays microglia are widely accepted as a particular type of macrophage that permanently resides within the nervous system, where it represents the most relevant component of the immune system (Kettenmann et al., 2011).

In the healthy brain microglia are involved in maintaining homeostasis in the nervous system. These cells are endowed with profuse ramifications that enable them to permanently scan the surrounding environment, a function that made them deserve the name of surveillant cells. To do so, microglia surface is decorated with a variety of pattern recognition receptors (PRRs) that recognize and bind a wide range of molecules arising from pathogens (the pathogen-associated molecular patterns or PAMPs) or from the damaged own cells (damage-associated molecular patterns or DAMPs). When microglia gets activated by one of these molecules the activation of the immune cascade starts (Kawai and Akira, 2006). Microglia then adopt a pro-inflammatory phenotype (also named M1) characterized by the synthesis and release of cytotoxic mediators (particularly cytokines) aimed to eliminate the noxious element (e.g. virus or bacteria), and chemoattractant signals to recruit other peripheral immune cells from the blood towards the brain parenchyma, thus orchestrating an immune response (Ransohoff and Perry, 2009). In a later phase, microglia also participate in the resolution of the inflammatory process, engaging an anti-inflammatory phenotype (or M2 state) with restorative functions such as phagocytosis, thus allowing the again the proper functioning of the nervous tissue and the return a homeostatic situation (Orihuela et al., 2016). However, during the pro-inflammatory phase microglia sometimes also results deleterious and may provoke neuronal death (Belarbi and Rosi, 2013). On the contrary, the anti-inflammatory phase is always related to neuroprotection (Sierra et al., 2013). The detailed knowledge of the balance between these two antagonistic states of microglia is attracting much attention, especially in neurodegenerative processes as Alzheimer's disease,

Parkinson's disease or multiple sclerosis. The role microglia play in each of these pathologies is different, complex and not fully understood (Dheen et al., 2007; Gold and El Khoury, 2015; Sugama et al., 2009; Zindler and Zipp, 2010).

Some neurodegenerative processes, only barely studied, are provoked by pathogens, either virus or bacteria, that bear the enzyme neuraminidase (NA) in their structure. Among them, the influenza virus is probably the best known, due to the enormous incidence of flu every year. Although influenza virus mainly generates respiratory problems, in some cases additional complications, consisting in a neurodegenerative process, may arise. The studies carried out with the influenza virus concluded that the membrane glycoproteins NA and hemagglutinin are crucial in the mechanism of infection and spreading of the virus in the host. Both glycoproteins recognize sialic acid, which appear as terminal sugar in glycoproteins and glycolipids exposed in the host cells surface. The enzymatic activity of NA cleaves these sialic acid residues, thus contributing to virus dispersion (Wagner et al., 2002). Sialic acids are widely present not only in the surface of the cells, but also in the extracellular matrix (Varki and Schauer, 2009). Also sialylation or de-sialylation of membrane proteins and glycolipids plays a relevant role in cellular communication, and in particular in the immune response (Varki and Gagneux, 2012). Therefore, the enzymatic activity of viral NA might result in a broader array of effects than initially expected.

Some years ago a model consisting in the intracerebroventricular (ICV) administration of NA purified from *Clostridium perfringens* was developed (Grondona et al., 1996). Rats received a single dose of NA within the right lateral ventricle, which initiated a sterile neuroinflammatory process characterized by the sequential infiltration of monocytes, neutrophils and lymphocytes from the circulation to the choroid plexus, cerebrospinal fluid (CSF) and eventually the brain parenchyma (Granados-Durán et al., 2015). Moreover, certain neurodegenerative events occurred, namely the vacuolation of some myelin tracts (Granados-Durán et al., 2017) and the detachment and loss of patches of ependymal epithelium. The inflammatory process dispels in few weeks, and myelin vacuolation disappear. However, the lost ependymal cells do not regenerate, so that some areas of the ventricular surface will remain naked for the rest of life

(Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008). This experimental model recapitulates most of the events concurring in a neuroinflammatory process, and represents a useful tool to analyze the particular role of NA in such events. The present work utilizes this same model with the purpose of investigating the mechanism by which NA initiates the neuroinflammatory process, with particular emphasis on the role of microglial cells. Also, this model has been used here to carry out a morphological analysis of microglial cells.

As Río Hortega noticed, microglia undergo a significant morphological change upon activation, so that in these cells form and function are intimately related. With the aim of developing an unbiased and objective method of classifying microglial cells based on their morphology, a sample and heterogeneous population of cells was surveyed from histological sections of different brain regions of rats treated ICV with NA. Several morphological parameters were measured for each cell, and statistical methods provided a means to establish a categorization of cells. In this context, a correlation of morphological parameters with a marker of microglial activation (i.e. the expression of the cytokine IL-1 β) was investigated as well.

On the other hand, the mechanism by which NA is able to induce microglial activation has been also addressed. Specifically the possible participation of Toll-like receptors (TLRs; a particular type of PPRs) of microglial cells in the initiation of the inflammatory response induced by NA. This information might shed some light on the search for novel therapeutic targets for the treatment of neuroinflammation. As mention before, one of the neurodegenerative events occurring during NA induced inflammation is the loss of ependymal cells. Here we will use two different *in vitro* approaches to inquire into the mechanism of NA-provoked ependymal cell death, including the possibility of the involvement of microglia. It has been previously described the recruitment of peripheral immune cells to the inflammatory process induced by NA. Among them, circulating monocytes/macrophages are probably the most abundant, which once in the brain parenchyma adopt a similar function as resident microglia. One of the objectives of this work was devoted to examine the relative contribution of infiltrated cells, compared to that of resident microglia, to the inflammatory process.

Thus, the hypotheses raised and the established objectives are as follows:

Hypothesis 1. The different microglial morphotypes that arise after the ICV administration of NA can be classified in an objective way based on their morphological parameters, which besides correlate with the degree of activation of these cells.

***Objective 1.** Develop a method, based on morphological features, to objectively classify the microglial population found after the ICV injection of NA.*

Hypothesis 2. Neuraminidase activates microglial cells by means of the receptors TLR2 and/or TLR4.

***Objective 2.** Study the role of microglial receptors TLR2 and TLR4 in the initiation of the neuroinflammatory reaction triggered by NA.*

Hypothesis 3. Microglial cells activated by neuraminidase are involved in ependymal cell death.

***Objective 3.** Evaluate the effect of NA-activated microglial cells on ependymal cell viability in vitro.*

Hypothesis 4. The monocytes infiltrated to the nervous parenchyma contribute to the inflammatory process provoked by neuraminidase, which is previously initiated by resident microglia.

***Objective 4.** Asses the cellular infiltration and the inflammation occurring after the ICV administration of NA in mice deficient of the CCL2 chemokine receptor, CCR2.*

1. Morphological analysis and classification of microglial cells. A correlation of morphological parameters with the degree of activation.

Traditionally, a relationship between the form and the function of microglial cells has been consistently reported (Davis et al., 1994; Lawson et al., 1990). However only few studies addressed the task of classifying the different morphotypes in an objective way, or related them to different activation states. Here we intended this goal, taking advantage of the variety of microglial morphologies observed in the brain of rats injected with NA. With this purpose, vibratome sections were obtained from rats ICV injected with NA or saline, and sacrificed at different times post-injection (2, 4 and 12 hours). To properly label the whole ramification pattern of microglial cells, the immunohistochemical marker IBA1 was chosen. Several brain areas adjacent to the ventricular system (the septofimbria, the hippocampus and the hypothalamus) were scanned for image acquisition. In this way, high resolution images of individual microglial cells were obtained, which were then processed with ImageJ software, and later analysed with the FracLac plugin, which allows the measurement of diverse morphological parameters.

Initially only five parameters were measured (*fractal dimension, lacunarity, area, perimeter, and density*). Comparing the cells sampled from NA and those from saline injected animals, ANOVA showed differences in all the above parameters. Therefore, these morphological parameters were appropriate to distinguish surveillant (from saline injected animals) from activated (from NA injected animals) microglial cells.

Next, a more comprehensive morphological analysis was performed, measuring up to 15 different parameters. These parameters were used to establish an objective method to categorize microglial cells. First, four of those parameters (*cell circularity, convex hull area, cell perimeter and convex hull span ratio*) were selected according to their multimodality index (MMI; Schweitzer and Renehan, 1997). MMI gives an idea of the distribution of the data around one or multiple values of the parameter; parameters with $MMI > 0.55$ are multimodal and therefore suitable to perform cluster analysis.

The hierarchical cluster analysis (HCA) performed on z-transformed data sets yielded a dendrogram based on the Euclidean distance between groups (Ward, 1963). The HCA suggests the different groups in which a heterogeneous population can be divided. This analysis resulted in a proposal of 4 groups or Clusters of microglial cells based on the four mentioned parameters. A further linear discriminant analysis (LDA; Fisher, 1936) suggested the most useful parameters (*convex hull span ratio*, *convex hull area*, and *cell circularity*) to predict the allocation of a particular microglial cell to one of the 4 established clusters. These three parameters had predictive value, and were used to propose the first part of a decision tree. The second part of the tree was established by a posterior principal components analysis (PCA; Soltys et al., 2005) which revealed two supplementary parameters (*maximum span across the convex hull* and *convex hull circularity*) that allowed a refined subdivision of each Cluster, resulting in the classification of microglia in a total of 8 Types.

When these 8 Types were distributed in the saline/NA treatments and in the three studied areas (septofimbria, hippocampus, and hypothalamus) the association of certain morphotypes to a functional status (surveillant/activated) and brain region emerged. For example, Cluster 4 unequivocally represents activated microglia. However, surveillant cells were allocated in different Types. Interestingly, Type 1.1 was a surveillant phenotype in hypothalamus, but an activated phenotype in hippocampus, and this apparent contradiction occurred as well for other Types. Therefore, these results suggest that the surveillant phenotype may be, to a large degree, specific of each brain region. For this reason, we suggest that the location of microglia within the brain should be taken into consideration for future classifications of microglia. Consequently, this study resulted in the proposal of a method for the objective classification of microglial cells based in their morphological quantifiable parameters.

As mentioned above the morphology of microglial cells changes upon activation (Davis et al., 1994; Lawson et al., 1990); the cell body enlarges, and ramifications shorten and thicken (Karperien et al., 2013).

At the same time, they release an array of inflammatory mediators and cytokines as IL-1 β (Kettenmann et al., 2011). In fact, we routinely used IL-1 β immunostaining to monitor the extent of inflammation and microglial activation in the NA-neuroinflammation model. Clearly, IL-1 β staining was quite heterogeneous among microglial cells, and also morphology was different amidst the IL-1 β positive cells. These observations reflect that activation is not an “all or nothing” process. Rather, in the course of activation or de-activation, microglia may undergo subtle changes, probably elusive to most methods of detection.

For this reason, and because we handled a quite powerful technique to quantify microglia morphology, we aimed to search for a correlation between individual morphological parameters and the degree of activation, which was assessed by the level of expression of IL-1 β , well recognized marker of microglial activation.

In this case, brain sections were obtained from rats sacrificed 12 hours after the ICV injection on NA. Doble immunofluorescence was performed using IBA1 and IL-1 β antibodies. As expected, IL-1 β revealed the extent of inflammation, and only labelled cells located few microns ($\sim 100 \mu\text{m}$) from the ventricular surface. Besides, within the IL-1 β positive population a wide range of label intensity could be observed, revealing different degrees of activation.

High resolution images were captured with a confocal microscope from periventricular regions in septofimbrial nucleus, caudate-putamen and hypothalamus. A z-stack projection of multiple confocal planes was used to compile information of most arborizations of the cells. Individual microglial cells were cropped from each image. The IBA1 staining (in the green channel) was processed to obtain filled and outlined shapes of each cell, which were later employed to measure morphological parameters, in a similar manner as explained before (FracLac plugin for ImageJ). The parameters measured were *fractal dimension*, *lacunarity*, *area*, *perimeter*, and *density*.

On the other hand, IL-1 β staining (in the red channel) was systematically quantified to get a number of “IL-1 β pixels”.

The ratio between “IL-1 β pixels” over “IBA1 pixels” (that is, the parameter area, in pixels, previously measured) was calculated as an estimation of the level of expression of IL-1 β , thus being independent of each cell's shape or size (which may change upon activation).

Next, the simple linear regression analysis was performed, which illustrates how the value of a dependent variable (in this case each morphological parameter) varies when the value of an independent variable (here the level of expression of IL-1 β) changes. For the five parameters, the regression coefficients of each function pointed out significant dependence of the dependent variable (morphometric parameters) on the independent variable (IL-1 β expression). The correlation coefficients (which measure the strength of the linear relationship between the two variables) showed significant correlations for each linear regression.

These results show that slightly activated microglia (low IL-1 β expression) present a hypertrophied shape, with more complex arborizations (high fractal dimension) and higher heterogeneity (high lacunarity). Also, the area and the perimeter are large, and the cells present a low density.

On the contrary, microglial cells showing a higher degree of activation (higher IL-1 β expression) appear bushy with short and thick ramifications (low fractal dimension), a more homogenous morphology (lower lacunarity), decreased area and perimeter, and a higher density. Therefore it may be concluded that, in microglial cells, individual morphological parameters correlate with the degree of activation.

Regression analysis is widely used to make predictions. Given that the morphological parameters used here present a statistically significant dependence on IL-1 β expression, each of them could be considered a good predictor of the level of expression of IL-1 β expression.

Also, these results indicate that microglial morphological change towards the M1 activation state is gradual and correlates to IL-1 β expression.

2. The role of microglial receptors TLR2 and TLR4 in the initiation of the neuroinflammatory reaction triggered by NA

The family of pattern recognition receptors known as TLRs plays a crucial role in the initiation of the innate immune response and in the subsequent adaptive immune response. TLRs recognize nonspecific molecular patterns from bacteria and virus, triggering an inflammatory process aimed to eliminate those pathogens (Kawai and Akira, 2006). Among them, TLR2 y TLR4 are the most relevant subtypes in the initiation of the inflammatory response in the CNS (Lehnardt, 2010). The activation of these receptors with specific agonists, like lipopolysaccharides (LPS) for TLR4, or peptidoglycans or synthetic peptides (P3C; Pam3CysSK4) for TLR2, induces an increase of cytokine release (Hoffmann et al., 2007; Lin et al., 2011; Olson and Miller, 2004).

However, the mechanism used by NA to initiate brain inflammation is unknown, as well as any relationship with receptors TLR2 or TLR4. Interestingly, it has been shown that de-sialilation of TLR4 by the endogenous neuraminidase Neu1 is necessary for its activation (Amith et al., 2010). Therefore, we investigated the participation of TLR2 and TLR4 in the inflammation provoked by NA injected in the cerebral ventricles. Mouse strains deficient in either one of these receptors (TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-}) were used for this purpose.

First, the inflammatory reaction induced by NA in TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} and wild type (WT) mice was analyzed by immunohistochemistry. Mice were sacrificed 24 hours after the injection of NA, and brain tissue sections were immunostained with IBA1, IL-1 β and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, and adhesion molecule involved in the infiltration of blood cells to tissues during inflammatory processes). Positive cells for each of these markers were counted in the septofimbrial nucleus and the hypothalamus. In parallel, another set of TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} and WT mice injected with NA were sacrificed 6 hours after the injection and their brains used for RNA isolation. These samples were used for the quantification by qPCR of the level of expression of several pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 y TNF α). Regarding cell counts, IBA1-positive cells increased after NA treatment in WT and TLR2^{-/-}, but this increase was absent in TLR4^{-/-} mice. IL-1 β -positive cell counts

gave a similar result, although in this case the increase observed in WT and TLR2^{-/-} was only partially blunted in TLR4^{-/-}. ICAM-1-positive cells increased after NA injection, but in this case no dependence of TLR2 or TLR4 was noticed. Respecting mRNA quantifications, the mRNA levels of the three cytokines analyzed increased after NA treatment in WT animals, an increase that was completely abolished in TLR4^{-/-} mice. In TLR2^{-/-} mice, IL-1 β and TNF α NA-dependent over-expression was partially blunted, but IL-6 mRNA increase was similar to that of WT mice. All these results demonstrate that the NA-induced inflammatory reaction is largely dependent on the receptor TLR4, while the receptor TLR2 also participates but not in a decisive manner.

To more specifically address the way NA activates microglial cells, pure microglial cultures were prepared from WT, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-} mice. The cultures were exposed to NA, and specific agonists of TLR2 (P3C) or TLR4 (LPS) were used as controls. Microglial activation was monitored by the over-expression of the three same cytokines as above (IL-1 β , IL-6 y TNF α) measured by qPCR. As expected, LPS induced the over-expression of the three cytokines in WT and TLR2^{-/-}, but not in TLR4^{-/-} cells. Also as expected, P3C increased the mRNA levels of the cytokines in WT and TLR4^{-/-} cultures, but not in TLR2^{-/-} ones. Interestingly, cytokines expression after NA treatment was completely abolished in TLR4^{-/-} cultures. In TLR2^{-/-} microglia, IL-1 β and TNF α expression was reduced compared to WT cells, and IL-6 expression was unaffected. These in vitro results show that NA activates microglial cells mainly through the receptor TLR4, and that TLR2 may play also a secondary role.

Taken together, both the in vivo and the in vitro results point to the same conclusion, that is, TLR2 participates in NA-induced inflammation, but it does not seem to be the main pathway. Meanwhile, the receptor TLR4 is fundamental in the initiation of such inflammatory process, and in particular TLR4 present in microglial cells. These results represent a major finding, as they reveal part of the mechanism used by NA (which as stated before is present in virus and bacteria that can invade the brain) to activate microglial cells and initiate certain neuroinflammatory processes.

The specific actions of NA through these receptors is highlighted by the fact that the NA-induced increase in ICAM-1-positive cell counts was similar in WT, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-} mice. So, NA-induced ICAM-1 over-expression is probably dependent on other mechanism.

Since NA has a sialidase activity, it is tempting to speculate that NA may act by desialylating the receptor TLR4, a step that has been demonstrated essential for TLR4 activation (Amith et al., 2010).

3. The effect of NA-activated microglial cells on the viability of ependymal cells

Neuraminidase is a sialidase found in the membranes or cell wall of certain virus and bacteria. Some bacterial or viral infections affecting the CNS, such as flu (influenza), mumps or measles, have been associated to ependymal death, and even occasionally to hydrocephalus (Johnson and Johnson, 1969; Johnson et al., 1967; Margolis and Kiham, 1969; Takano et al., 1993). In human foetuses with hydrocephalus some ependymal denudation has been reported (Domínguez-Pinos et al., 2005). Ependymal loss has also been related to a decreased CSF flow that may favour hydrocephalus (Jiménez et al., 2014). On the other hand, breaks in the ependymal barrier could allow the access of the pathogens, and also the infiltrated immune cells, from the CSF to the nervous parenchyma, a fact that could bring consequences related to neurodegeneration (Lucas et al., 2006).

In an experimental setting, NA administered within the ventricles or rats causes, among other effects, a partial loss of the ependymal lining of the ventricular walls, (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008). High dose of NA result in a complete loss of the ependymal lining and severe hydrocephalus (Grondona et al., 1996). As the ependyma does not regenerate, a glial scar appears in the nude areas. In fact, it is not clear if ependymal cells die and later detach, or if, on the contrary, the loosening of their adhesion to neighbour cells and/or extracellular matrix enhances their release from the ependymal layer.

Due to the relevance of this damage in some CNS pathologies, investigating the causes of the ependymal loss in the NA-induced neuroinflammation model should be of significant interest.

Previous experiments have gathered some information regarding this issue. Ependymal loss occurs quite early after the injection of NA, even before the infiltration of peripheral cells. Apoptotic figures are rare, and the participation of the NA-activated complement system has been demonstrated. However, the complement does not account for all ependymal death (Granados-Duran et al, 2016). We raised the question if microglial cells, which are activated by NA during the first hours after the injection, could be involved.

To address this question, we setup two types of in vitro co-culture experiments. First, explants were obtained from the ventricular walls of rats, and co-cultured with pure microglial cultures. NA or LPS were added to the culture media to induce microglial activation, and 24 hours later the viability of ependymal cells in the explants was assessed by trypan blue staining. Viability was similar in explants cultured alone and in explants co-cultured with non-activated microglia. However, it decreased in explants co-cultured with microglia activated either with LPS or with NA. Therefore, the increased ependymal cell death in the explants was due to the activated microglia, and not to the sole presence of NA.

The second approach utilized isolated purified ependymal cells obtained from rats (Grondona et al., 2013), which were co-cultured with microglial cells in a similar fashion as explained above. Again, LPS or NA were added to the medium as microglial activators. In this case, ependymal cells were sampled at different time points from time 0 up to 24 hours to measure viability. The viability of ependymocytes significantly decreased only in co-cultures that were treated either with NA or LPS. In control situations, which included ependymocytes cultured alone and added NA or LPS, and ependymocytes co-cultured with microglia but no LPS/NA, the viability did not change significantly. Again, these results confirmed those obtained with the explants, that is, ependymocytes viability is compromised in the presence of activated microglia, but not by the sole presence of NA in the culture.

Other authors, however, have reported a slight cytotoxic effect of NA on ependymal cells (Granados-Duran et al, 2016). Taken together, all these data seem to indicate that during NA-induced neuroinflammation ependymal cells are damaged not only by the activated complement, but also by activated microglial cells, among other factors, as a direct action of NA should not be ruled out.

Once demonstrated that activated microglia was participating in ependymal death, we hypothesized that some inflammatory cytokines released by microglia (e.g. IL-1 β or TNF α) could mediate such effect. Therefore, the presence of the cytokine receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 in ependymal cells was examined. As a preliminary test, we used ventricular wall explants exposed to NA, and measured by qPCR the expression level of these receptors. As expected, NA caused an increase of the expression of the cytokine IL-1 β , but also of the receptors investigated, IL-1 β R1 and TNF α R1.

However, explants are a complex system composed of several cell types; as these results were not conclusive regarding ependymal cells, we next used purified ependymal cells, although with some limitations imposed by the ependymocytes isolation technique. The RNA isolated from hypothalamus was used as control, and the identity of ependymal cells was proved by the expression of specific genes (FOXP1, forkhead box protein J1; and IIG9, a phosphatase involved in ciliary movement). Using first RT-PCR, the presence of both receptors was detected in pure ependymocytes, although the TNF α R1 band was quite faint. Then, qPCR confirmed this result: in ependymocytes IL-1 β R1 was expressed at similar levels as in hypothalamus, while TNF α R1 was almost undetectable.

In summary, ependymal cells express the cytokine receptor IL-1 β R1, so this cytokine is a potential candidate to mediate the damage provoked by activated microglia on ependymal cells. Still, more conclusive experiments, for example using a co-culture setting of ependymocytes and activated microglia along with a functional blockade of the receptor, are required. The participation of the cytokine TNF α is less probable, as its receptor is barely expressed by ependymocytes. However, as before, more definitive experiments would confirm this.

4. Evaluation of the cellular infiltration and the inflammatory reaction occurring after the ICV administration of NA in mice deficient of the CCL2 chemokine receptor, CCR2.

It is widely accepted that CNS resident microglia bear an important part in neuroinflammation. This is probably true also in the experimental model of neuroinflammation induced by NA. However, the relative importance of resident microglia compared to that of the infiltrated immune cells is unknown.

Few hours after the administration of NA within the ventricles, begin the recruitment of neutrophils, monocytes/macrophages, and both T (CD3 ϵ) and B lymphocytes (Granados-Durán et al., 2015). The transit from the circulating blood to the inflamed tissue is made possible by an array of receptors and chemokines. Among them, it has been shown that monocyte infiltration is largely dependent on the receptor CCR2, which is expressed in different types of immune cells to mediate their movement towards inflamed tissues (Gouwy, 2004; Palomino and Marti, 2015; Semple et al., 2010). Mice deficient of the receptor CCR2 (CCR2^{-/-}) typically present an almost complete absence of monocytes in inflamed tissues (Mildner et al., 2009), and even their departure from the bone marrow towards the circulation is severely impaired, so the number of circulating monocytes in this mice is greatly reduced (Tsou et al., 2007). Thus, this mutant strain offers a useful tool to approach the objective stated above, that is, to evaluate the relative importance of resident microglia versus infiltrated cells in NA-induced neuroinflammation.

To address this issue, WT and CCR2^{-/-} mice were ICV injected with saline or NA, and sacrificed 6 hours later (as previous works have shown that infiltration peaks at around this moment). The brains were either processed for immunohistochemistry or qPCR, in any case with the aim of analyzing inflammatory markers. Also, some animals were treated with the proliferation marker BrdU, with the purpose of investigating the possible proliferative expansion of microglia population during inflammation.

IBA1-positive cell counts, performed in caudate-putamen and septofimbria (both next to the injection site) increased after NA-injection, but not so in CCR2^{-/-} mice.

The possibility that such increase could be due to proliferation was ruled out, as BrdU-positive cell counts (that also increased after NA-injection) were similar in WT and CCR2^{-/-} mice. A more specific analysis of microglial cell proliferation was carried out by quantitating markers related to microglial proliferation by qPCR, specifically PU.1 (a transcription factor), CSF1R (the receptor for colony stimulating factor 1) and IL-34 (a ligand of the same receptor). All of them were similarly expressed in saline and NA-injected samples, and in both strains of mice. Therefore, we concluded that proliferation of microglia could not explain the IBA1-positive increase observed. However, further experiments including IBA1 and BrdU double label to specifically count the proliferating microglia are necessary.

To clarify the source of the IBA1-positive cell increase in NA-injected animals, some immunohistochemical markers were employed to quantify different populations of cells involved in inflammation. The CD206 antibody was used to identify perivascular macrophages, but these cells did not change in any experimental situation. Another marker employed was the major histocompatibility complex class II (MHCII), which is expressed by antigen presenting cells. There was a considerable recruitment of MHCII-positive cells after NA treatment, but it was not dependent on CCR2 (as it was of similar magnitude in WT and CCR2^{-/-} strains).

The membrane protein Ly6C, is a surface marker for various immune cell types (Lee et al., 2013). Ly6C identifies two populations of cells: CCR2⁺Ly6C⁺ and CCR2⁻Ly6C⁺; only the second one would be able to infiltrate to the nervous parenchyma in CCR2^{-/-} mice. Similarly as occurred for MHCII, NA induced a considerable recruitment of Ly6C-positive cells, which was of similar magnitude in WT and CCR2^{-/-} mice. This result is somehow puzzling, as one would expect a lower recruitment of Ly6C-positive cells in the mutant strain, because the population CCR2⁺Ly6C⁺ (which includes monocytes) should not have access to the brain. Two possible explanations could be hypothesized: 1) a compensatory effect, that is, the deficit of CCR2⁺Ly6C⁺ cells is balanced by a higher infiltration of CCR2⁻Ly6C⁺ cells; 2) the recruitment of CCR2⁺Ly6C⁺ cells is so much lower than that of CCR2⁻Ly6C⁺ cells, that this last population conceals the previous one.

Although these results related to infiltration in the initial phase of the inflammation provoked by NA are somewhat incomplete, some conclusions may be drawn. The increase of IBA1-positive cells observed in WT animals (but not so in CCR2^{-/-} mice) is neither due to microglial proliferation nor to perivascular macrophage infiltration. These IBA1-positive cells arise probably from infiltrated monocytes (CCR2⁺Ly6C⁺), whose entrance to the brain parenchyma is CCR2 dependent. Other cells whose migration is not dependent on CCR2 (CCR2⁺Ly6C⁺) are recruited as well, probably neutrophils or T lymphocytes (based also on previous reports).

On the other hand, the level of expression of different cytokines in WT and CCR2^{-/-} mice injected with NA was quantified by qPCR. Both IL-1 β and TNF α increased after NA treatment, but more moderately in CCR2^{-/-} mice. NA also induced the expression of other inflammatory mediators, such as CCL2 (the chemokine ligand of CCR2), IL-4, IL-10 and TGF β , in WT animals, but in CCR2^{-/-} mice the response was diverse. Specifically, CCL2, IL-6 and IL-4 expression increased in CCR2^{-/-} as in WT mice. The over-expression of IL-1 β , TNF α and IL-10 was milder in CCR2^{-/-} than that observed in WT animals. Finally, NA induced an over-expression of TGF β in WT animals, which was completely blunted in CCR2^{-/-} mice.

These results are in accordance with a deficient recruitment of peripheral cells in CCR2^{-/-} mice. The higher expression of IL-1 β and TNF α in WT mice compared to CCR2^{-/-} could be due to infiltrated monocytes, which, besides, contribute to the increased population of IBA1-positive cells found in the nervous parenchyma after NA injection (i.e. macrophages/microglia). In CCR2^{-/-} mice, the deficient monocyte infiltration would explain the milder increase of IL-1 β and TNF α expression, as well as the smaller population of IBA1-positive cells in the nervous tissue.

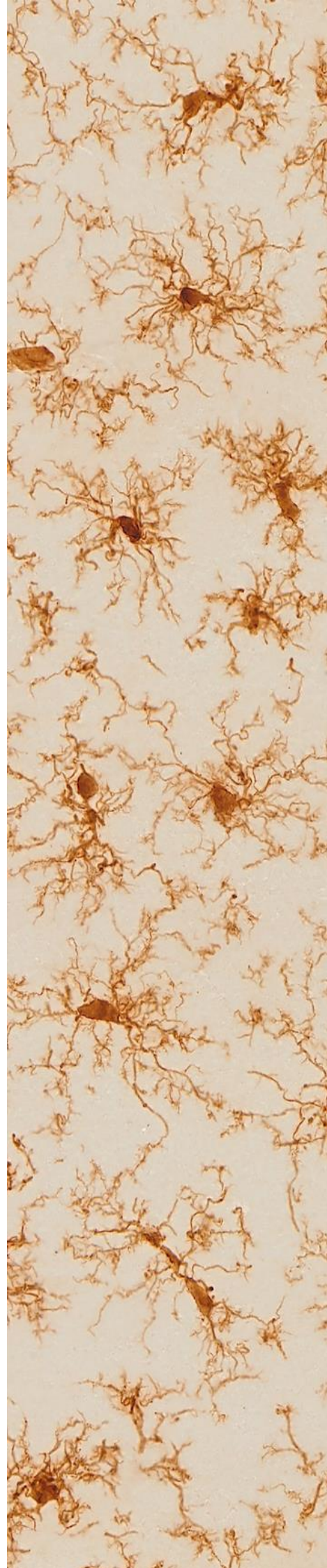
On the other hand, NA-injection also induced the overexpression of the anti-inflammatory cytokines IL-10, TGF β and IL-4. This is an interesting result, as it suggests the startup of restorative mechanisms engaged to solving inflammation and repairing tissue damage.

Taken together, the results obtained from the implementation of the NA-induced inflammation model to CCR2^{-/-} mice reveal that, upon NA injection, mutant mice

also suffer an inflammatory process, although less virulent than that observed in WT mice. Therefore, microglia seems to be a major player in NA-induced neuroinflammation, but the recruitment of peripheral cells (particularly monocytes) exacerbates such process.

In summary, microglia is the keystone in the neuroinflammatory process induced by NA. It participates, among other things, in the ependymal loss associated to the presence of NA within the cerebral ventricles. As NA activates microglia through the receptor TLR4, with the secondary participation of TLR2, this information may illuminate novel therapeutic targets for the treatment of infections provoked by NA-bearing pathogens and its related complications, such as hydrocephalus or neurodegenerative events.

2. Introducción



2.1. LA MICROGLÍA

Tradicionalmente se ha considerado a las neuronas como el tipo celular más importante del sistema nervioso. Pero éstas no podrían desempeñar su papel sin el apoyo de otras células que conforman la denominada neuroglía, glía o células gliales. La glía ejerce, en términos generales, diversos papeles de sostén y soporte para el sistema nervioso, y entre ellas se incluyen varios tipos celulares: en el sistema nervioso periférico las células de Schwann y las células satélite de los ganglios, y en el sistema nervioso central (SNC) los oligodendrocitos (forman las vainas de mielina que rodean a los axones), los astrocitos (contribuyen a mantener un ambiente controlado dentro del SNC), las células endoteliales (tapizan las cavidades ventriculares y forman un epitelio de intercambio entre el parénquima nervioso y el líquido cefalorraquídeo) y la microglía. Todas ellas comparten el mismo origen embrionario a partir del ectodermo salvo la microglía, cuyo origen es hematopoyético. Las células de microglía son los macrófagos residentes del SNC y los principales responsables de la respuesta inmune en el parénquima nervioso. Aunque fueron descritas hace más de un siglo, han cobrado especial relevancia en la última década por su implicación en procesos neurodegenerativos. Protegen al organismo contra agentes patógenos y en situaciones como traumatismos o accidentes cerebrovasculares mediante mecanismos pro-inflamatorios, pero también desempeñan un papel anti-inflamatorio. Además, realizan otras funciones fisiológicas fundamentales para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis del SNC.

2.1.1. El descubrimiento de la microglía

A inicios del siglo XX, varios investigadores españoles contribuyeron de forma muy destacada al estudio del sistema nervioso (Fig. I-1). Santiago Ramón y Cajal recibió el premio Nobel de medicina por sus aportaciones sobre la morfología y los procesos de las células nerviosas (Baratas Diaz, 1997). Aparte de sus investigaciones sobre el neurotropismo, Ramón y Cajal lideró una escuela de investigadores que aportaron importantes avances sobre el conocimiento del sistema nervioso.

Tras detectar otras células diferentes a las neuronas en el tejido nervioso, inició el camino de la identificación de los diferentes tipos celulares que forman la neuroglía (Sierra et al., 2016; Tremblay et al., 2015).



Figura I-1. Investigadores fundamentales en el descubrimiento de las células de microglía. (A) Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) médico especializado en histología y anatomía patológica. Compartió el premio Nobel de medicina con Camilo Golgi en 1906. (B) Nicolás Achúcarro y Lund (1880-1918) médico neurocientífico especializado en enfermedades mentales. (C) Pío del Río Horteiga (1882-1945) médico especialista en histología y neuroanatomía.

Para ello, puso a punto una tinción para marcar los astrocitos, específicamente mediante el método del cloruro de oro sublimado (Fig. I-2B), diferenciándolos así del resto de células (Ramón y Cajal, 1913). Sin embargo, no logró una clara separación entre microglía y oligodendrocitos, clasificados inicialmente dentro del mismo grupo como células adendríticas o “el tercer elemento”.

El primer científico en diferenciar la microglía como un tipo celular diferente fue Nicolás Achúcarro mediante una tinción de taninos y nitrato de plata amoniacal (Fig. I-2 A). Con esta tinción Achúcarro diferenció claramente unas células fagocíticas granuloadiposas de otras con forma de estrella, fibrillas neurogliales y prolongaciones dirigidas hacia los vasos sanguíneos, que se correspondían con microglía y astrocitos respectivamente (Achúcarro, 1911).

Por su parte, su discípulo Pío del Río-Horteiga puso a punto el método del carbonato de plata (Fig. I-2 C) que mostraba que “la microglía se caracteriza por su núcleo pequeño y oscuro envuelto por escaso protoplasma y sus extensiones torcidas y ramificadas, adornadas con espinas laterales” y así logró diferenciar claramente la microglía de los oligodendrocitos (Fig. I-2 D). Pío denominó a esta

técnica método Golgi-Hortega (Río-Hortega, 1919a, 1919b, 1919c, 1919d, 1922). De esta forma, Río-Hortega pudo realizar una descripción detallada de la microglía como tipo celular diferenciado y cuya entidad prevalece hasta hoy día.

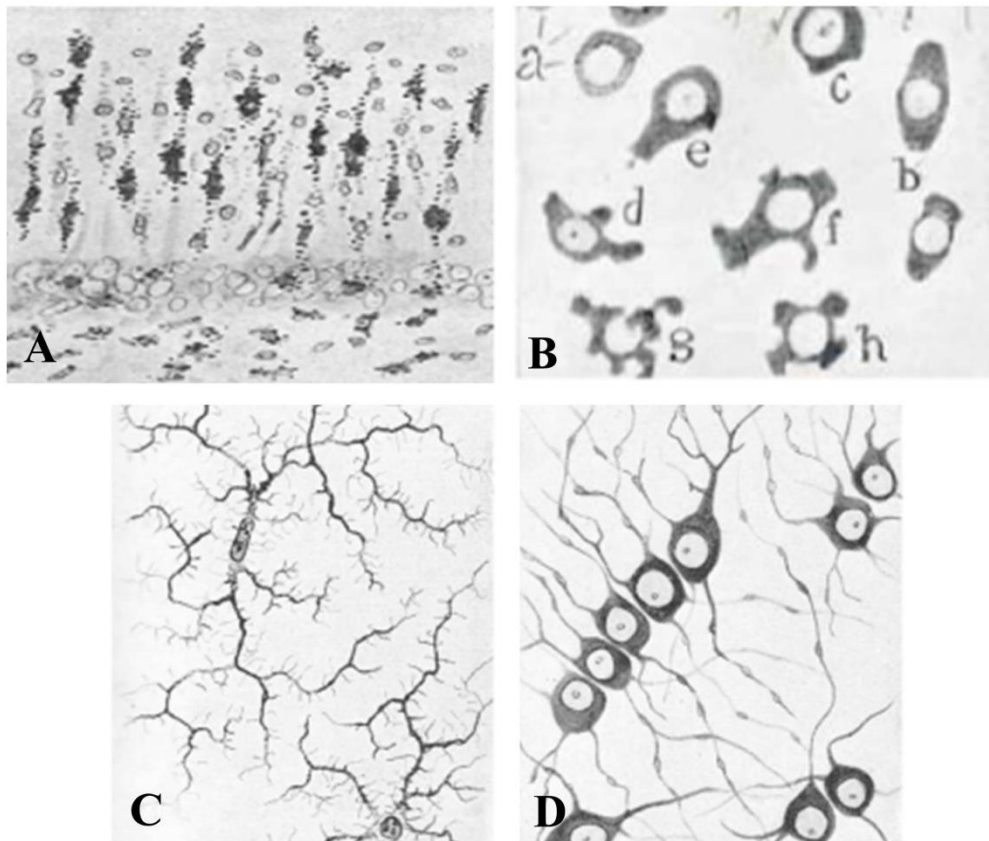


Figura I-2. Dibujos esquemáticos de los métodos histológicos que permitieron identificar las células microgliales. (A) El método de taninos y nitrato de plata amoniacal desarrollado por Achúcarro permitió observar la capacidad fagocítica de la microglía (a las que denominó células granuloadiposas) en el cerebro de un conejo con rabia. (B) Ramón y Cajal introdujo su método de cloruro de oro sublimado, que permitió diferenciar los astrocitos de otras células débilmente marcadas, a las cuales denominó “el tercer elemento”. Río-Hortega completó el trabajo de ambos, por medio del método de carbonato de plata diferenció la microglía (C) de los oligodendrocitos (D), éstos últimos identificados con el método Golgi-Hortega. Modificado de Tremblay et al., 2015.

Además de describir la distribución y el fenotipo morfológico de la microglía, Río-Hortega reconoció la existencia de un estado de reposo que se transformaba en un fenotipo ameboide en diferentes patologías del cerebro (Fig. I-3). La microglía ramificada retraía sus finas prolongaciones cuando adquiría función fagocítica o cuando migraba o proliferaba.

Por lo que dedujo que la microglía era una célula ligada a los leucocitos, ya que realizaba fagocitosis durante el desarrollo y en determinadas patologías (Río-Hortega, 1919d; Sierra et al., 2016).

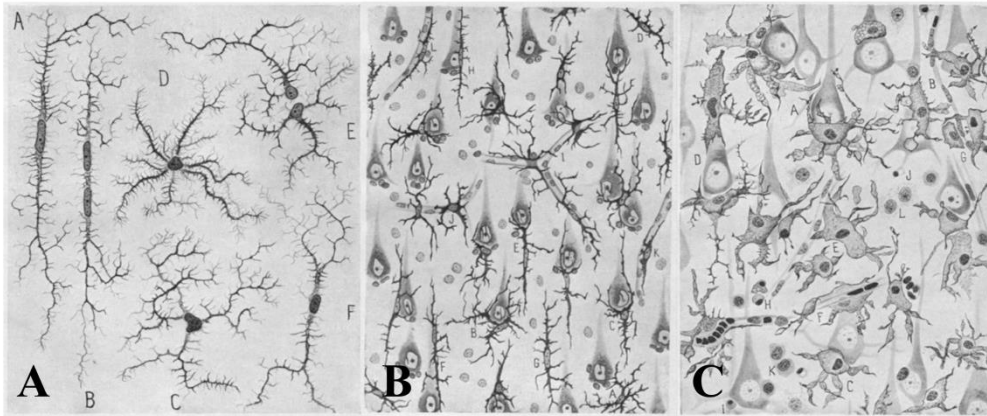


Figura I-3. Ilustraciones de microglía realizadas por Pío del Río-Hortega. (A) Principales formas de microglía observadas en un cerebro humano sano. **(B)** Morfología de la microglía de un paciente con meningitis aguda. **(C)** Microglía del cortex cerebral de un conejo en una zona cercana a una herida tras 48 h de evolución. Tomado de Sierra et al., 2016.

El origen embriológico de la microglía ha sido motivo de debate durante bastante tiempo. Aunque hay trabajos que argumentan que su origen es el neuroectodermo (Fedoroff et al., 1997) actualmente se ha demostrado que derivan de progenitores del saco vitelino que migran hacia el sistema nervioso y, por lo tanto, tienen un origen mesenquimático o mesodérmico (Alliot et al., 1999; Chan et al., 2007). En el ratón, la microglía derivada del saco embrionario invade el parénquima cerebral antes del octavo día del período embrionario (E.8) y posteriormente prolifera localmente (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012).

La proliferación de la microglía residente representa la fuente principal de nuevas células microgliales en estadios posteriores y en el adulto (Askew et al., 2017). En animales adultos sanos el aporte de células sanguíneas a la población de células inmunes del cerebro es muy pequeño (Ajami et al., 2007). Sin embargo, se ha visto que tras la pérdida de la integridad de la barrera hematencefálica una subpoblación de monocitos que entra en el parénquima cerebral se transforma en microglía (Mildner et al., 2007).

2.1.2. Los diferentes estados de la microglía

De acuerdo con las descripciones iniciales de Río-Hortega, durante muchos años se ha considerado que la microglía presentaba dos estados funcionales claramente identificables por la morfología celular: uno de reposo, donde las células muestran una morfología ramificada, y otro activado o reactivo, en el que adoptan una forma ameboide. En la actualidad se sabe que esta microglía “en reposo” desempeña importantes funciones fisiológicas y que el estado activado comprende a su vez diferentes morfologías y fenotipos funcionales.

2.1.2.1. La microglia en estado vigilante o de reposo

En la última década se ha visto que las funciones de la microglía van mucho más allá de generar una respuesta durante la inflamación en el SNC. Tradicionalmente, se ha pensado que la microglía estaba en reposo o en quiescencia hasta que aparecía una perturbación de la homeostasis del tejido cerebral, momento en el que se activaba para iniciar la respuesta inmune. Pero el estudio de imágenes de microscopía de excitación de dos fotones (*two-photon microscopy*) reveló un alto dinamismo en la microglía que no concuerda mucho con un estado de reposo (Davalos et al., 2005). Esta técnica ha permitido ver que la microglía escanea constantemente con sus finas prolongaciones el parénquima cerebral intacto que tiene a su alrededor en cuestión de minutos. Al hacerlo, la microglía entra en contacto con el soma, las dendritas, los axones y las espinas dendríticas de neuronas de su entorno (Nimmerjahn et al., 2005).

La microglía realiza una función de vigilancia continua e intensa del medio ambiente que le rodea, realizando movimientos de emisión y retracción de sus prolongaciones (Nimmerjahn et al., 2005). Junto con los astrocitos también ejerce una intensa vigilancia de la barrera hematoencefálica y de las moléculas que pudieran acceder a través de ella al SNC (Hermann and ElAli, 2012). Participa en la neurogénesis en el adulto fagocitando las células que sufren apoptosis durante dicho proceso (Sierra et al., 2013). Además, la microglía participa activamente en el proceso de poda sináptica (del inglés *pruning*), desempeñando así un papel fundamental en el desarrollo de las conexiones neuronales (Kettenmann et al., 2011; Miyamoto et al., 2013).

Asimismo, la microglía en reposo supervisa la situación funcional de las sinapsis y contribuye a la renovación de las conexiones sinápticas si es necesario (Wake et al., 2009). La microglía también controla su propia auto-renovación (Askew et al., 2017; Lawson et al., 1992). En definitiva, la microglía no solo tiene un papel inmune fundamental, sino que también realiza tareas relacionadas con el desarrollo, el mantenimiento y la renovación del SNC (Gomez-Nicola and Perry, 2015).

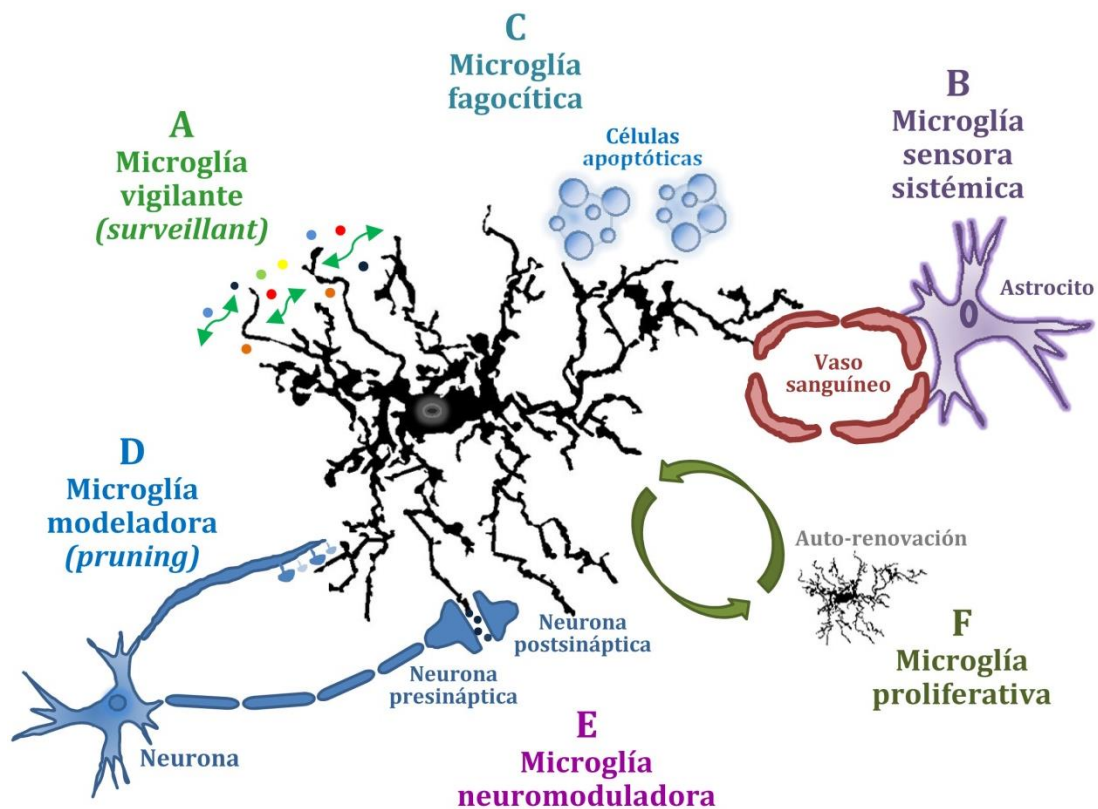


Figura I-4. Funciones de la microglía en un cerebro sano. (A) Las células microgliales vigilantes escanean su entorno cercano para controlar el mantenimiento de la homeostasis del medio del SNC. (B) La microglía sensora sistémica está en íntimo contacto con la barrera hematoencefálica, lo que le permite detectar sustancias neurotóxicas o mediadores inflamatorios procedentes de la circulación sistémica. (C) La microglía fagocítica retira rápidamente células muertas, para prevenir el daño en otras células circundantes. (D) También se ocupa de remodelar (en inglés “pruning”) sinapsis multitudinarias mediante un proceso fagocítico que es crucial para el desarrollo normal del SNC. (E) Además, la microglía puede modular directa o indirectamente la sinapsis nerviosa. (F) La población de microglía prolifera y se auto-renueva sin la necesidad de la contribución de progenitores derivados de la médula ósea. Modificado de Gómez-Nicola and Perry, 2015.

Una de las características distintivas de la microglía es una alta expresión del receptor de fractalquina (del inglés *fractalkine*) CX3CR1. En condiciones normales las neuronas expresan el ligando de dicho receptor, la citoquina CX3CL1/fractalquina, el cual representa una señal de inhibición para la microglía. De esta forma, cuando se expresan ambos mediadores la microglía mantiene su estado vigilante sin activarse. Una deficiencia en la producción del ligando CX3CL1 por parte de la neurona estará indicando a la microglía que la neurona sufre algún tipo de alteración.

La microglía entrará entonces en un proceso de activación que puede ser neurotóxico (Kierdorf and Prinz, 2013; Wolf et al., 2013). Por tanto, esta interacción neurona-microglía mediada por la fractalquina se puede considerar un mecanismo fisiológico clave para el desarrollo y funcionamiento del SNC, pues controla procesos básicos relacionados con la promoción de la supervivencia de neuronas y precursores neuronales, la modulación de la transmisión sináptica, la plasticidad, el modelado de las sinapsis múltiples (*pruning*), el refuerzo de las sinapsis y la maduración de las redes neuronales (Arnoux and Audinat, 2015; Kettenmann et al., 2011; Limatola and Ransohoff, 2014).

En la misma línea, la fagocitosis activada por la apoptosis neuronal también se considera fisiológica, ya que ocurre durante el desarrollo normal del cerebro. En los nichos neurogénicos esta fagocitosis fisiológica, que está regulada por el receptor CX3CR1 (Bachstetter et al., 2011), tiene especial relevancia por su alta eficiencia respecto a otros fagocitos; de esta forma ayuda a mantener la homeostasis del cerebro (Sierra et al., 2013). La fagocitosis de las sinapsis múltiples durante el desarrollo o tras un daño promueve una configuración precisa de los circuitos neuronales. Así, la microglía puede eliminar las sinapsis débiles o bien modificar el número de sinapsis durante el desarrollo.

También se ha visto que la densidad de espinas dendríticas disminuye tras una activación de la microglía por medio de LPS o por el sistema del complemento. De esta forma la microglía contribuye a la plasticidad sináptica a los circuitos neuronales (Kettenmann et al., 2013; Miyamoto et al., 2013).

Es más, se ha comprobado que existe una compleja participación de la microglía junto con los astrocitos en la regulación de la actividad sináptica. Diferentes neurotransmisores modulan la movilidad y morfología de la microglía, la cual interacciona con las sinapsis favoreciendo o no la transmisión sináptica (Béchade et al., 2013; Hristovska and Pascual, 2016).

Además, numerosas evidencias sugieren que la liberación de factores por parte de la microglía puede modular la proliferación de células madre neurales, su diferenciación hacia neuronas o glías, y favorecer la supervivencia de los neuroblastos (Gemma and Bachstetter, 2013).

2.1.2.2. El estado pro-inflamatorio de la microglía

La microglía activada destruye a microorganismos invasores y retira los restos celulares que son potencialmente dañinos para el tejido circundante (Kreutzberg, 1996). Además produce citoquinas y factores de crecimiento que favorecen el retorno del tejido a la homeostasis (Streit, 2000). Esto muestra que la microglía desempeña otras funciones, además de la fagocitosis, relacionadas con los mecanismos de defensa del organismo. Se han descrito dos estados de activación de la microglía en función de su papel en el proceso inflamatorio, denominados mediante los términos M1 y M2 (Hellwig et al., 2013; Orihuela et al., 2016).

El fenotipo M1 o de activación clásica es un estado pro-inflamatorio caracterizado por actuar en la primera línea de defensa del sistema inmune innato (Ransohoff and Perry, 2009). En ocasiones la respuesta pro-inflamatoria mediada por la microglía M1 es tan exacerbada que genera neurotoxicidad (Belarbi and Rosi, 2013).

Por su parte, el fenotipo M2 tiene un papel neuroprotector que facilita la resolución de la inflamación, y se caracteriza por producir citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF β (Kettenmann et al., 2011; Streit et al., 1999). La respuesta anti-inflamatoria mediada por la microglía M2 ocasionalmente incrementa la actividad fagocítica de la microglía (Durafourt et al., 2012; Orihuela et al., 2016).

El fenotipo M1 se relaciona, por ejemplo, con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), que se realiza por medio de los receptores de membrana del tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*; Kettenmann et al., 2011). Un ejemplo de estos patrones moleculares es la pared bacteriana con lipopolisacáridos (LPS) presente en las bacterias Gram+, que activa a los receptores de membrana del tipo TLR4 (Lehnardt et al., 2003). De esta forma, la microglía tiene la capacidad de reconocer una amplia variedad de agentes infecciosos como bacterias, hongos y virus (Esen and Kielian, 2006; Kaushik et al., 2011; Rambach et al., 2010).

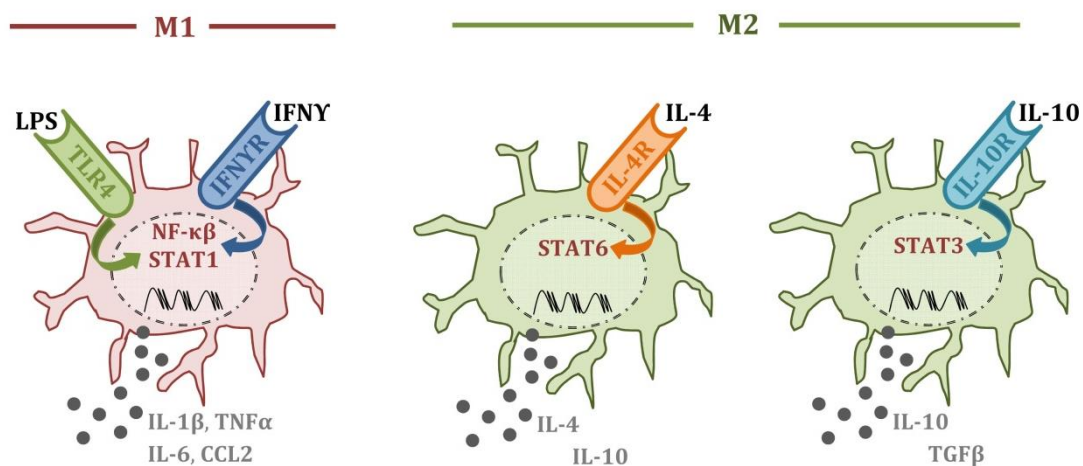


Figura I-5. Los estados de activación de la microglía según el perfil inflamatorio y la función efectora. En el estado de activación M1, la exposición a LPS o IFN γ estimula a los receptores TLR4 o IFN γ R respectivamente, lo que conduce a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT1. De este modo se inicia la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF α , IL-6 o la quimiocina CCL2. El estado M2 se puede desencadenar por varios factores. Por ejemplo, la unión de IL-4 a su receptor IL-4R inicia la activación de STAT6, llevando las células hacia un fenotipo anti-inflamatorio con un aumento en la liberación IL-4 e IL-10. Otra vía de activación hacia el estado M2 es mediante STAT3, donde la estimulación por IL-10 desplaza a las células a un estado inmunosupresor primario con la liberación de IL-10 y TGF β . Simplificado de Orihuela et al., 2016.

La respuesta de la microglía con fenotipo M1 incluye la liberación de mediadores pro-inflamatorios que destruye a los patógenos, como TNF α , IL-1 β e IL-12 (Fig. I-5), además de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), citoquinas y quimiocinas como CCL2 (Aloisi, 2001; Tambuyzer et al., 2008). Asimismo, durante el estado de activación M1 se inicia la respuesta inmune adaptativa mediante la activación de los linfocitos T (Martinez and Gordon, 2014).

2.1.2.3. El estado anti-inflamatorio de la microglía

La función más destacada de la microglía durante el estado anti-inflamatorio es la fagocitosis. La microglía es el macrófago tisular del sistema nervioso, e inicia y dirige la respuesta inflamatoria en el cerebro. La fagocitosis es un mecanismo que sirve para interiorizar material extracelular, y que se utiliza para diversas funciones como tomar nutrientes, regular la expresión de receptores de superficie, mantener la polaridad celular y en la presentación de antígenos (Sierra et al., 2013). Mediante la fagocitosis las células reconocen, introducen y degradan fragmentos celulares grandes ($>0.5\mu\text{m}$) y se considera esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. En particular, una eliminación eficiente de las células apoptóticas reduce la transformación de éstas a células necróticas. Las células necróticas suelen perder la integridad de la membrana plasmática y liberar el contenido celular. Un comienzo rápido de la fagocitosis de neutrófilos y linfocitos T apoptóticos reduce la producción de citoquinas inflamatorias, minimizando el daño cerebral (Magnus et al., 2001; Napoli and Neumann, 2009; Neumann et al., 2008).

Por otro lado, la fagocitosis y digestión intracelular de microbios permite obtener pequeños fragmentos de proteínas microbianas, que una vez exportados a la superficie celular podrán ser presentados como antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad II. De esta forma la microglía realiza la presentación de antígenos, y participa en el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Ransohoff and Engelhardt, 2012).

La fagocitosis es por tanto un proceso beneficioso para el SNC tanto en situación fisiológica como patológica. De hecho una alteración en la presentación de antígenos se asocia con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Nagata et al., 2010). Además, una fagocitosis lenta e insuficiente de los restos apoptóticos se ha observado en procesos patológicos y neurodegenerativos como en accidentes cerebrovasculares (Faustino et al., 2011), en la enfermedad de priónica (Ciesielski-Treska et al., 2004), en la enfermedad de Parkinson (Park et al., 2008) y en la enfermedad de Alzheimer (Hughes et al., 2010).

2.1.3. Proteínas de membrana implicadas en la respuesta inmune

Como hemos visto, la microglía es altamente dinámica y tiene una gran capacidad de respuesta a señales externas. Para poder detectar y responder a dichas señales externas está dotada de un abanico de receptores que le proporcionan información del estado del medio ambiente donde se encuentra. Una vez detectada la señal podrá iniciar la respuesta adecuada correspondiente.

2.1.3.1. Los receptores de patrones moleculares

Las células de microglía representan el principal exponente del sistema inmune residente en el SNC, y son la primera línea de defensa contra patógenos como virus y bacterias capaces de acceder a este tejido. Para detectar a estos agentes infecciosos la microglía dispone de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) que se expresan de forma constitutiva.

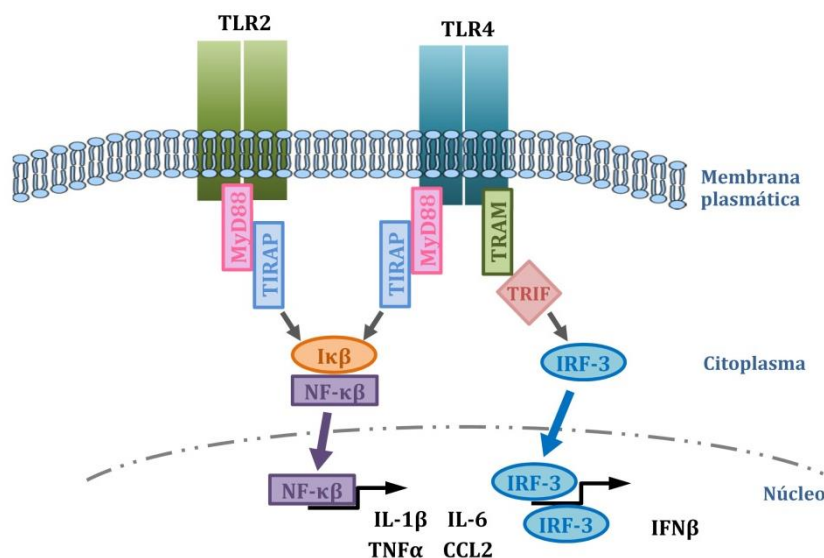


Figura I-6. Esquema resumido de las vías señalización iniciadas por la activación de TLR2 y TLR4. Tras la unión de un ligando al receptor TLR2, éste se une a las proteínas adaptadoras intracelulares MyD88 y TIRAP. Posteriormente, se degrada el inhibidor $\kappa\beta$ ($I\kappa\beta$), lo cual libera a NF- $\kappa\beta$, que puede entonces trasladarse al núcleo e inducir la expresión de genes proinflamatorios, tales como las interleuquinas IL-1 β y IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la proteína quimioatrayente monocítica-1 (MCP-1/CCL2). En la activación mediada por TLR4 también se puede iniciar la vía dependiente de MyD88, como se describe para TLR2. Sin embargo, existe una vía alternativa: tras la activación de TLR4, se unen las moléculas adaptadoras TRAM y TRIF, lo que induce la traslocación del factor de transcripción IRF-3 al núcleo, donde se inicia la transcripción de genes tales como IFN β . Modificado de Kielan et al., 2006.

Estos receptores participan en el control de la inmunidad innata y modulan las actividades de defensa con células efectoras (Hanisch et al., 2008; Kettenmann et al., 2011). Los PRRs se agrupan en tres familias: los receptores parecidos a Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*), los receptores similares a NOD (NLRs, del inglés *NOD-like receptors*; *NOD: nucleotide-binding oligomerization domain*), y los receptores similares a RIG-I (RLRs, del inglés *RIG-I-like receptors*; *RIG-I: retinoic acid-inducible gene-1*). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos como los PAMPs, así como patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular patterns*; Kumar et al., 2011).

La familia de receptores TLR realiza un papel clave en el inicio de la respuesta inmune innata y en la subsiguiente respuesta inmune adaptativa. Los TLRs reconocen patrones moleculares bacterianos y víricos inespecíficos e inician un proceso inflamatorio cuyo fin es erradicar dichos patógenos (Kawai and Akira, 2006). Se han descrito al menos 11 TLRs en humanos y 13 TLRs en ratones (Kettenmann et al., 2011). Entre ellos, TLR2 y TLR4 son los subtipos más relevantes en el inicio de la respuesta inflamatoria en el SNC (Lehnhardt, 2010).

Una activación de la microglía con agonistas de TLR4 como el LPS o con agonistas de TLR2 como peptidoglicanos o péptidos sintéticos como Pam₃CysSK₄ (*N-palmitoyl-2-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl)-(R)-cysteiny-l-seryl-(lysyl)3-lysine*) provoca un incremento en la liberación de citoquinas (Hoffmann et al., 2007; Lin et al., 2011; Olson and Miller, 2004). Ambos receptores pueden iniciar una vía de señalización dependiente de MyD88, que culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B (del inglés *nuclear factor light-chain-enhancer of activated B cells*), que inicia la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. El receptor TLR4 puede además inducir la síntesis de interferón (IFN β) a través de la vía de señalización de TRAM (Fig. I-6; Esen and Kielian, 2006; Kawai and Akira, 2006; Kettenmann et al., 2011; McCarthy et al., 2017). Otra de las respuestas resultante de la activación de TLR2 y TLR4 es la producción de ROS, que producen la muerte de los agentes patógenos y la activación de los linfocitos T (Orihuela et al., 2016).

Asimismo, el desarrollo de la respuesta inmune innata incluye un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que facilita la invasión de células inmunes circulantes y el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Nagyoszi et al., 2010). Esta compleja respuesta inflamatoria montada con la finalidad de controlar a los patógenos puede en ocasiones generar un daño neurodegenerativo (Lehnardt et al., 2003). También se ha visto la participación de TLR2 y TLR4 en el inicio de infecciones bacterianas y víricas del SNC (Kawai and Akira, 2006; Suh et al., 2009). Se sabe que el virus *influenza* (causante de la gripe) tiene como principal mecanismo fisiopatológico para invadir y propagarse en el huésped las enzimas hemaglutinina (H o HA) y neuraminidasa (N o NA; Wagner et al., 2002). Experimentalmente, se sabe que la NA tiene la capacidad *per se* de generar una respuesta neuroinflamatoria (Granados-Durán et al., 2015), aunque el mecanismo concreto no se ha descrito. En particular, se desconoce si la NA es reconocida como PAMP por los receptores TLR2 o TLR4. Por consiguiente, el avance en el conocimiento de los mecanismos subyacentes de la activación de la microglía mediante NA y del papel de los receptores TLR en este proceso neuroinflamatorio es fundamental.

2.1.3.2. Receptores de quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (8-14 kDa) que regulan la migración de las células inmunes. Estas moléculas poseen características comunes, como la presencia en su estructura de cisteínas unidas por puentes disulfuro, las cuales son clave para ejercer su función quimioatrayente (Charo and Ransohoff, 2006; Conductier et al., 2010; Mackay, 2001). Hay cuatro subgrupos diferentes de quimiocinas basados en la secuencia inicial de los residuos de cisteína (C) ubicados en el extremo N-terminal: quimiocinas C (con una sola cisteína), quimiocinas CC (con dos cisteínas adyacentes), y quimiocinas CXC y CX3C (con uno o tres aminoácidos, respectivamente, entre las dos cisteínas; Takeshita and Ransohoff, 2012). En el sistema nervioso las quimiocinas son producidas por diferentes tipos de células, como neuronas y microglía. Todas las quimiocinas son moléculas solubles excepto CX3CL1 que se puede encontrar como molécula soluble o anclada a la membrana de neuronas (Fernandez and Lolis, 2002).

Los receptores de quimiocinas son proteínas de membranas acopladas a proteínas G. El receptor CCR2 se activa por medio de numerosas citoquinas como CCL2 (también llamada MCP-1, del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL12 (MPC-5) o CCL13 (MPC-4) que se conocen como proteínas quimioatrayentes de monocitos, siendo CCL2 la más potente (Takeshita and Ransohoff, 2012). En concreto, cuando ocurre una inflamación en cualquier localización del organismo el receptor CCR2 regula la salida de los monocitos de la médula ósea. De hecho, ratones deficientes de CCR2 presentan un alto número de monocitos en la médula ósea y un bajo número de monocitos circulantes (Tsou et al., 2007). La expresión de CCR2 en diferentes tipos de células inmunes posibilita la entrada de éstas en los tejidos inflamados, y también en el parénquima nervioso durante un proceso neuroinflamatorio (Gouwy, 2004; Palomino and Marti, 2015; Semple et al., 2010).

La expresión de CCR2 es constitutiva en monocitos y se reduce cuando se diferencian a macrófagos (Fantuzzi et al., 1999). Además, los linfocitos T CD4+ (Connor et al., 2004) y ocasionalmente los linfocitos NK (NK, del inglés *natural killer*; van Helden et al., 2012) migran por medio del receptor CCR2 hacia el foco inflamatorio. El receptor CCR2 juega un importante papel en la extravasación y transmigración de células inmunocompetentes hacia el parénquima nervioso en diversos procesos inflamatorios del SNC, como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer o en accidentes cerebrovasculares (Cartier et al., 2005; Chu et al., 2014; Semple et al., 2010).

La infiltración celular que ocurre durante la inflamación no depende exclusivamente de estas quimiocinas y sus receptores. Por ejemplo, se ha observado en condiciones inflamatorias una sobre-expresión de ICAM-1 (del inglés *intercelular adhesión molecule 1*; CD54) y VCAM-1 (del inglés *vascular cell adhesión molecule 1*) en los plexos coroideos, lo que facilita un reclutamiento secuencial de leucocitos hacia el parénquima nervioso por medio de sus respectivos ligandos celulares: LFA-1 (del inglés *lymphocyte function-associated antigen 1*; o α L β 2-integrina) y α 4-integrina (Engelhardt et al., 2001; Long, 2011).

2.1.3.3. Otros receptores

La microglía presenta además un amplio abanico de receptores de citoquinas que modulan su función. Entre ellos cabe mencionar a los receptores TNFR1/p55 y TNFR2/p75, que responden a la citoquina pro-inflamatoria TNF α (Dopp et al., 1997), y a los receptores IL1RI e IL1RII, cuyo ligando es IL-1 β (Herx et al., 2000). Asimismo, la microglía también responde a la citoquina anti-inflamatoria TGF β mediante los receptores TGFRI y TGFRII (Feng and Derynck, 2005).

El receptor TREM2 (del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells-2*), perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, es uno de los marcadores distintivos de la microglía presente en el tejido nervioso. Está relacionado con la respuesta pro-inflamatoria y con la migración celular (Wang et al., 2015). Los receptores PSR (del inglés *phosphatidylserine receptor*) reconocen a la fosfatidilserina, que identifica a las células apoptóticas, y son cruciales para una fagocitosis eficiente (Ravichandran, 2011). La microglía también presenta receptores basureros o *scavenger* y receptores del complemento, que están relacionados con la respuesta inmune innata (Kettenmann et al., 2011), así como receptores Fc (de la región Fc, *fragment crystallizable*, de las inmunoglobulinas), que participan en la respuesta inmune adaptativa (ElAli and Rivest, 2016).

Por último, la microglía también expresa un amplio rango de receptores de neurotransmisores que desempeñan diferentes funciones, como mediar su interacción con las neuronas en condiciones fisiológicas y patológicas (Kettenmann et al., 2011).

2.2. LA NEUROINFLAMACIÓN

El término neuroinflamación hace referencia a la reacción celular y molecular que acontece en el SNC como consecuencia de un daño, una infección o un proceso neurodegenerativo (Pacheco et al., 2012). Esta reacción inflamatoria desarrollada por el sistema inmune es un mecanismo de defensa frente a la invasión del SNC por patógenos. Hace décadas se pensaba que el SNC era un lugar inmunoprivilegiado, protegido y aislado del resto del organismo por la barrera hematoencefálica (BHE).

Actualmente se sabe que el SNC es inmunológicamente activo, aunque es cierto que la respuesta adaptativa se completa en órganos periféricos (Lampron et al., 2013).

El inicio de la respuesta inmune en el SNC es llevado a cabo por la microglía residente y los astrocitos, los cuales establecen comunicación con los linfocitos T infiltrados en el parénquima cerebral y con otros componentes del sistema inmune innato (Ransohoff and Brown, 2012). Posteriormente, se inicia la respuesta inmune adaptativa, que conlleva la activación de los linfocitos T, que a su vez colaboran en la activación de los linfocitos B, así como en la promoción de la función efectora de macrófagos, células dendríticas y células NK por medio de citoquinas (Parker, 1993). Numerosas evidencias sugieren que el sistema inmune juega también un papel crucial en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Amor and Woodroffe, 2014).

2.2.1. El sistema inmune en el sistema nervioso central

Tradicionalmente el SNC se ha considerado un órgano privilegiado desde el punto de vista inmunológico. La BHE, formada por el endotelio vascular polarizado y una capa de astrocitos estrechamente asociados, proporciona al SNC un aislamiento (controlado) del resto del organismo (Desalvo et al., 2011). Por este motivo, la infiltración de las células del sistema inmune hacia el parénquima nervioso en condiciones fisiológicas está muy limitada. Sin embargo, aunque es cierto que existe una importante restricción al paso de proteínas plasmáticas, de células inmunes y de moléculas anti-inflamatorias asociadas desde la periferia hacia el parénquima nervioso, este aislamiento o privilegio inmunológico no debe ser malinterpretado, ya que el sistema inmune es bastante activo en el SNC (Galea et al., 2007).

En la configuración de la BHE existe una estrecha colaboración entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los pericitos y los astrocitos, que forman una unidad funcional denominada unidad neurovascular (UNV; (Hermann and ElAli, 2012). La UNV favorece la existencia de un entorno químico e iónico adecuado para la función neuronal (Banerjee and Bhat, 2007).

Además, la UNV contribuye activamente a la inmunidad innata del SNC, ya que 1) modula ciertas funciones de la microglía, de los astrocitos, y de las células endoteliales y pericitos, y 2) libera moléculas que pueden regular la permeabilidad de la BHE y, por consiguiente, la infiltración de células circulantes en el parénquima nervioso (Lampron et al., 2013).

Las células endoteliales actúan como mediador entre el sistema inmune periférico y el SNC, y son consideradas como la primera línea de defensa del sistema inmune del SNC (Danese et al., 2007). La activación de los receptores TLR2/6 presentes en las células endoteliales resulta en la inhibición de la expresión de proteínas de las uniones estrechas, incrementándose la permeabilidad endotelial y, por tanto, de la BHE (Nagyoszi et al., 2010). Por otra parte, los leucocitos circulantes se unen a las células endoteliales por medio de moléculas de adhesión del tipo ICAM-1 y VCAM-1, cuya expresión está regulada por citoquinas y quimiocinas liberadas por la microglía, los astrocitos y los pericitos. La sobre-expresión de estas moléculas de adhesión facilita el acceso de células inmunes circulantes hacia el parénquima cerebral (Takeshita and Ransohoff, 2012).

Aunque el papel de los astrocitos en el sistema inmune innato es menos importante que el de la microglía, éstos controlan la entrada de las células inmunes a través de la BHE (Bechmann et al., 2007). Las prolongaciones de los astrocitos abrazan a más del 90% de los capilares del cerebro y esta interacción es clave para que la BHE cumpla su función (Jacobs and Doering, 2010). Pero además los astrocitos producen una gran variedad de moléculas bioactivas que controlan la función endotelial, tanto citoquinas (TNF α , IL-1 β , IL-3 y IL-6; Chung and Benveniste, 1990) como quimiocinas (CXCL10, CCL2 y BAFF; Farina et al., 2007).

Cuando se activa el sistema inmune y se incrementa la permeabilidad de la BHE, numerosas células circulantes se infiltran hacia el parénquima nervioso, y se establece una compleja red de moléculas de señalización solubles que van a modular el comportamiento de las células que participan en el proceso inflamatorio (Tian et al., 2012). Las células gliales junto con las neuronas regulan la respuesta de los macrófagos y los linfocitos infiltrados (Lampron et al., 2013).

A su vez, los macrófagos infiltrados favorecen el reclutamiento de linfocitos en el parénquima nervioso, y contribuyen a la respuesta inflamatoria local mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Mildner et al., 2009).

Los linfocitos T naïve (inmaduros) se transformarán en linfocitos Th (del inglés *T helper*) o colaboradores, que podrán ser de dos tipos: linfocitos Th1, que favorecen respuestas pro-inflamatorias y se caracterizan por producir IL-2, IFN γ y TNF β , y linfocitos Th2, que tienen un perfil anti-inflamatorio, promueven la respuesta humoral, y producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Abbas et al., 1996; Mosmann and Sad, 1996). Durante la neuroinflamación la microglía M1 induce la proliferación y la activación de los linfocitos T infiltrados a linfocitos Th1 y Th2. Los astrocitos, por su parte, inducen la activación de los linfocitos T a linfocitos Th2 (Aloisi et al., 1998).

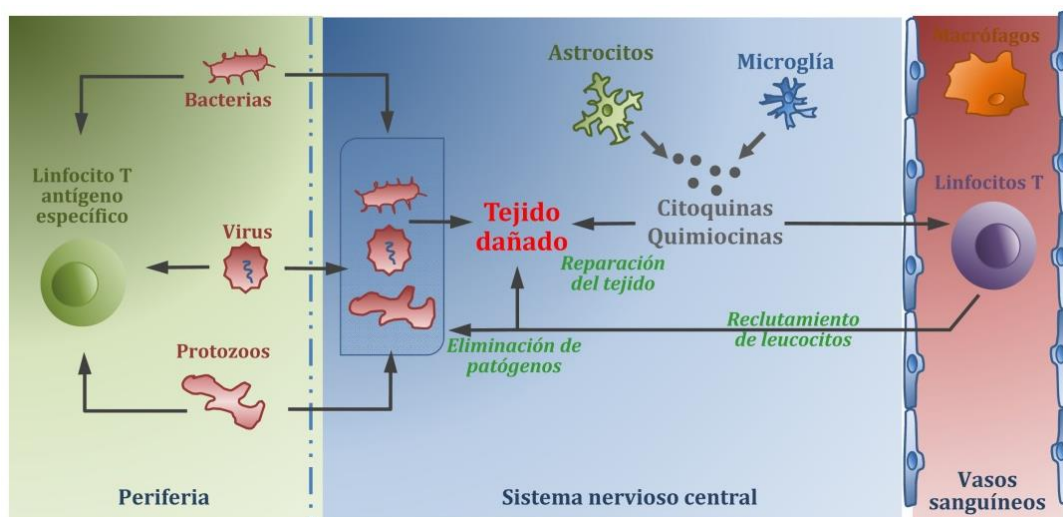


Figura I-7. La respuesta inmune en el SNC. La microglía y los astrocitos residentes en el SNC inician la respuesta inmune innata encaminada a la protección y a la reparación tras una infección o lesión del SNC. Las citoquinas y quimiocinas liberadas por células residentes (como microglía y astrocitos) promueven el reclutamiento de linfocitos T y macrófagos, que colaboran en la eliminación del patógeno. Esta respuesta innata no inicia directamente la respuesta adaptativa en el propio SNC, sino que los linfocitos T (antígeno específico) maduran en los nódulos linfáticos de la periferia. La respuesta innata también se produce en los trastornos neurodegenerativos, y utiliza los mismos componentes que el sistema de defensa contra patógenos. Modificado de Ransohoff and Brown, 2012.

Son numerosas las evidencias que apuntan a que las células microgliales residentes del SNC como un elemento clave en la neuroinflamación (Rivest, 2009).

Estas células son las principales reguladoras de la respuesta inmune en el SNC , y desempeñan diversidad de funciones relacionadas con la respuesta inmune (Kettenmann et al., 2011).

De este modo, las células de la microglía dirigen la respuesta inflamatoria pero, aun siendo inmunocompetentes, se diferencian de los macrófagos periféricos y células dendríticas en su incapacidad de completar la maduración de los linfocitos en la respuesta adaptativa (Carson et al., 2006). La respuesta inmune adaptativa, por tanto, no se inicia directamente en el SNC (Fig. I-7; Ransohoff and Brown, 2012).

Un papel fundamental del sistema inmune innato es proporcionar información clave para activar la respuesta inmune adaptativa. Esta segunda fase se lleva a cabo en órganos periféricos, donde las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos, entre otras) presentan a los linfocitos antígenos procedentes de agentes patógenos bacterianos, virales o protozoos (Dudda et al., 2005; Mora et al., 2005). Tras la fagocitosis de los patógenos y el procesamiento de sus componentes, las células presentadoras de antígeno exponen en su superficie moléculas del patógeno unidas a las proteínas de membrana MHCII (del inglés *major histocompatibility complex class II*). De este modo los antígenos del patógeno son presentados a los linfocitos T naïve, lo cual es necesario para el inicio de la respuesta adaptativa (Edele et al., 2008; Oyoshi et al., 2011). La presentación del antígeno promueve la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos T naïve mediante dos vías:

1. Hacia linfocitos T CD4+, efectores o Th, que contribuyen a la activación de los linfocitos B y modulan la función de las células inmunes innatas como los macrófagos y las células NK (Parker, 1993).
2. Hacia linfocitos T CD8, citotóxicos, o CTL (del inglés *cytolytic T lymphocyte*), los cuales reconocen y atacan células tumorales o infectadas y, al secretar IFN γ , potencian la función de los macrófagos y las células NK (Wong and Pamer, 2003).

Para poder realizar la presentación de antígenos, los fagocitos se tienen que desplazar a tejidos periféricos. Algunos autores afirman que no existen células

presentadoras de antígeno residentes en el SNC que realicen dicha función, por lo que el SNC precisa interactuar de algún modo con órganos periféricos para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Galea et al., 2007).

Recientemente se ha descrito la existencia de un sistema particular de drenaje linfático desde el SNC hasta los ganglios linfáticos periféricos, establecido por medio de barreras endoteliales, epiteliales y gliales (Engelhardt et al., 2017). Este novedoso sistema de drenaje linfático podría proporcionar dicha vía de comunicación.

Sin embargo, otros autores han demostrado que algunos monocitos que atraviesan la BHE posteriormente se diferencian a células dendríticas que promueven la proliferación y expansión de linfocitos Th (Ifergan et al., 2008). Además, se ha observado que la microglía tiene la capacidad de fagocitar y presentar antígenos en enfermedades inflamatorias (O'Keefe et al., 2002). El comportamiento y las características de la microglía y de las células dendríticas son muy diferentes, lo que evidencia la necesidad de abordar el estudio de la respuesta inmune en el SNC de una forma particular (Hanamsagar et al., 2014).

2.2.2. Neurodegeneración

Como hemos visto, la respuesta inmune que realiza la microglía tiene como objetivo promover mecanismos reparadores y la homeostasis en el SNC. Por un lado la microglía en el estado de activación M1 ataca a agentes patógenos, y por otro lado el estado de activación M2 se ocupa principalmente de limpiar restos celulares y de recuperar la homeostasis en el tejido. Sin embargo, hay numerosas evidencias que indican que en ocasiones el fenotipo de activación M1 de la microglía puede ser deletéreo y neurotóxico (Orihuela et al., 2016).

En este sentido, se ha visto que en el caso de accidentes cerebrovasculares, donde la microglía activada produce IL-1, IL-6 y TNF α , aparece un efecto tóxico sobre las neuronas (Fig. I-8). Si la activación de la microglía es muy intensa o se prolonga en el tiempo, se pueden desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Smith et al., 2012).

Asimismo, se ha podido relacionar la afectación isquémica de áreas particulares del cerebro y la activación microglial con la neurodegeneración en ese área en particular y con las correspondientes alteraciones motoras (Olson and McKeon, 2004). Por su parte, la activación alternativa al fenotipo M2 favorece la reparación tisular, entre otras formas mediante la activación de la fagocitosis. Se hace necesario, por tanto, valorar el papel neuroprotector frente al papel neurotóxico de la microglía activada (Fig. I-8; Taylor and Sansing, 2013).

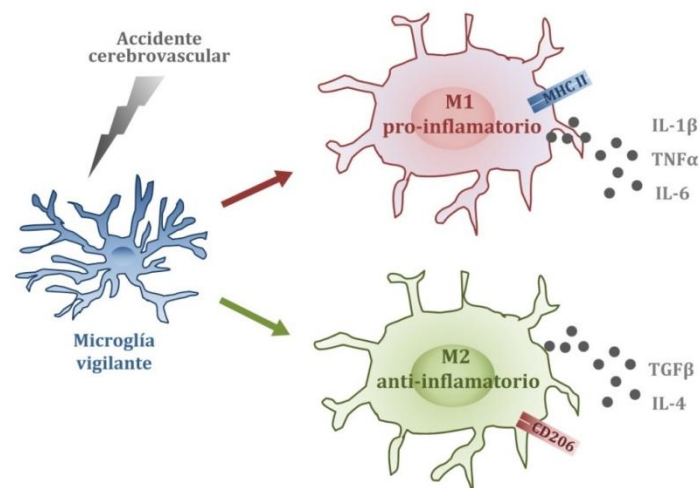


Figura I-8. Polarización de la microglía hacia los fenotipos M1 y M2 en accidentes cerebrovasculares. El estado M1 de la microglía es pro-inflamatorio; se liberan citoquinas como IL-1 β , TNF α y IL-6, y en la superficie celular se expresan moléculas como MHCII. El estado M2 de la microglía es anti-inflamatorio, reparador y pro-fagocítico; se secreta IL-4 y TGF β , se expresan los receptores CD206. Modificado de Taylor and Sansing, 2013.

También en numerosas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad priónica, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica o diferentes tipos de encefalitis, se ha descrito un proceso inflamatorio en el que la microglía adquiere algún estado de activación que se relaciona con la muerte neuronal (Dheen et al., 2007; Sugama et al., 2009).

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria crónica del SNC que se caracteriza por una pérdida de la cubierta de mielina. Aunque su causa no está clara, parece tener un componente autoinmune (Luis et al., 2015). En los pacientes afectados se ha observado un estado pro-inflamatorio de la microglía y de los macrófagos infiltrados, que producen citoquinas pro-inflamatorias y otras

sustancias neurotóxicas, las cuales son directamente responsables de la severidad del daño (Zindler and Zipp, 2010). A nivel histológico se han observado en los estados iniciales de la enfermedad agrupaciones de células microgliales asociadas con alteraciones de los axones (Singh et al., 2013; van Horssen et al., 2012).

Posteriormente, la transmigración de linfocitos B atraídos por las quimiocinas (Zindler and Zipp, 2010) y la expresión del MHCII por parte de la microglía (Singh et al., 2013) conllevan el inicio de una respuesta inmune adaptativa en la que se producen anticuerpos contra la mielina. Por todo ello, se considera que la microglía desempeña un papel importante en el inicio y el progreso de la esclerosis múltiple; la supresión del estado de activación de la microglía se contempla como una estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico de la enfermedad (Dheen et al., 2007; Thompson and Tsirka, 2017; Zindler and Zipp, 2010).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en el ganglío basal denominado sustancia negra. Como consecuencia se produce un déficit de dopamina en los ganglios basales, lo que a su vez determina las alteraciones motoras características de esta patología (De Virgilio et al., 2016). Se ha puesto de manifiesto que la microglía tiene un papel fundamental en el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa (Dheen et al., 2007; Sugama et al., 2009). De hecho, se ha detectado una alta concentración de citoquinas pro-inflamatorias como CCL2 (Reale et al., 2009), IL-1 β (Blum-Degen et al., 1995; Reale et al., 2009), IL-6 (Blum-Degen et al., 1995; Chen et al., 2008) y TNF α (Mogi et al., 1994; Reale et al., 2009) en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de estos pacientes. Además, una producción excesiva de ROS por parte de la microglía activada da lugar a un daño oxidativo que favorece la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Gao et al., 2011; Wu et al., 2003). Por último, en pacientes de Parkinson se ha detectado una alta expresión MHCII en la microglía localizada en la sustancia negra, indicativo del desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (McGeer et al., 1988). Por todo ello, la microglía se ha considerado como posible diana terapéutica. De hecho, se está explorando la posibilidad de potenciar los mecanismos neuroprotectores de la microglía (Le et al., 2016) y una de las opciones más esperanzadoras consiste en combinar terapias

inmunomoduladoras junto con fármacos que potencien la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (De Virgilio et al., 2016).

La enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en la tercera edad es la enfermedad de Alzheimer, que en sus fases iniciales se caracteriza por el deterioro de algunas funciones cognitivas y en estados avanzados con alteraciones del comportamiento e incapacidad verbal (Dubois et al., 2007). Neuropatológicamente se caracteriza por el desarrollo de placas de péptido β -amiloide (placas seniles) en el neuropilo y la pérdida de neuronas, especialmente en el cortex prefrontal (Stamouli and Politis, 2016). Hay además reclutamiento de astrocitos y microglía activados alrededor de estas placas (Meda et al., 1995; Sasaki et al., 1997).

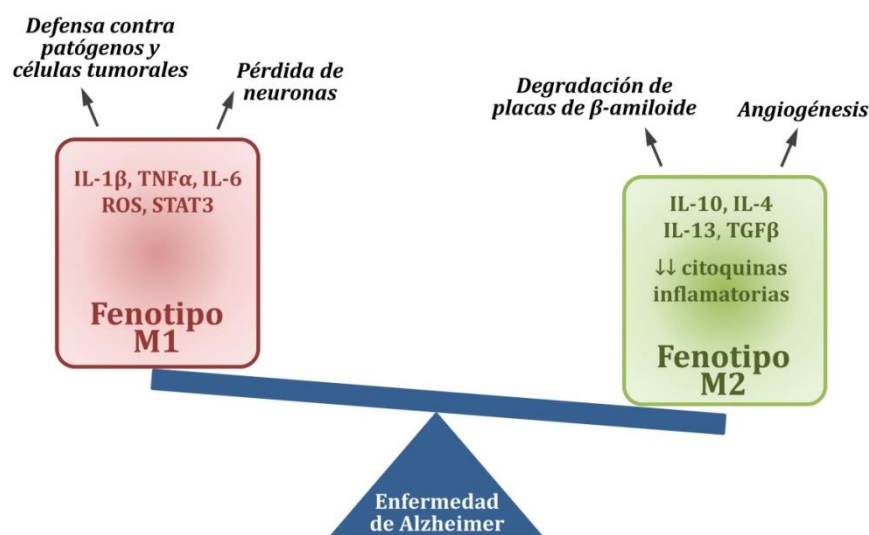


Figura I-9. Balance entre los fenotipos M1 y M2 de la microglía en la enfermedad de Alzheimer. El fenotipo M1 de la microglía es pro-inflamatorio y neurotóxico y, aunque está diseñado para atacar a los agentes patógenos y a las células tumorales, en la enfermedad de Alzheimer provoca la muerte neuronal. El fenotipo M2 es anti-inflamatorio y fagocítico, y contribuye a la reparación tisular mediante la fagocitosis de los depósitos de β -amiloide en las placas seniles. Modificado de Wang et al., 2015.

Conforme progresa la enfermedad la microglía activada produce citoquinas pro-inflamatorias y ROS, que participan en la neurodegeneración (Block ML, 2008; Blum-Degen et al., 1995; Meda et al., 1995; Shi et al., 2016; Song et al., 2011; Stamouli and Politis, 2016), lo que ha llevado a proponer estas rutas pro-inflamatorias como dianas terapéuticas para controlar el avance de la enfermedad (Block ML, 2008; Wang et al., 2015).

Sin embargo, el papel de la microglía en la enfermedad de Alzheimer es bastante complejo. De hecho, se han demostrado diferentes vías de activación de la microglía; por una parte por medio del receptor TLR4, lo cual resulta en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias neurotóxicas (Song et al., 2011). Al mismo tiempo, la activación del receptor NLR3 (Cho et al., 2014; Gold and El Khoury, 2015) o el bloqueo del receptor CX3CR1 (Merino et al., 2016) resultan en la activación de la fagocitosis. Por ello, las investigaciones actuales tienen el doble y complejo objetivo de restringir la activación M1 citotóxica y promover la activación M2 fagocítica (Fig. I-9; Cho et al., 2014; Farfara et al., 2008; Gold and El Khoury, 2015; Mandrekar-Colucci and Landreth, 2010; Merino et al., 2016; Stamouli and Politis, 2016).

La esclerosis lateral amiotrófica es otra enfermedad neurodegenerativa donde la activación de la microglía tiene un papel clave. La pérdida progresiva de motoneuronas superiores e inferiores conlleva una parálisis que suele terminar en la muerte por fallo respiratorio (Brites and Vaz, 2014). Existe un amplio consenso sobre la evolución fisiopatológica de la enfermedad. En sus inicios aparece una fase anti-inflamatoria, con microglía M2, e infiltración de linfocitos T reguladores y T colaboradores (Th), lo que contribuye a mantener la viabilidad de las motoneuronas. Al progresar la enfermedad, la microglía pasa a una activación M1, con producción de citoquinas inflamatorias y ROS que contribuyen a la pérdida de las motoneuronas (Henkel et al., 2009; Hooten et al., 2015; Liao et al., 2012). Por ello, el factor de transcripción NF- κ B, determinante en la expresión de citoquinas inflamatorias, se ha considerado como diana terapéutica (Frakes et al., 2014). De hecho, el bloqueo del NF- κ B prolongó la supervivencia de las motoneuronas (Parisi et al., 2016a, 2016b).

Existen también numerosas evidencias que relacionan la neuroinflamación con el desarrollo de enfermedades psiquiátricas. Por ejemplo, se han detectado altas concentraciones de citoquinas inflamatorias en el cerebro o en el LCR de pacientes con autismo (Chez et al., 2007; Vargas et al., 2005) o esquizofrenia (Lin et al., 1998; Miller et al., 2011; Nawa and Takei, 2006; Potvin et al., 2008). Además, existen datos que indican que infecciones ocurridas durante etapas fetales están asociadas

al desarrollo posterior tanto de esquizofrenia (Brown, 2006) como de autismo (Brown and Patterson, 2011). El estudio de casos de exposición a virus de influenza, toxoplasmosis, rubeola o *E.coli* durante el embarazo ha revelado la necesidad de prevenir este tipo de infecciones durante la gestación (Bland et al., 2010; Brown and Patterson, 2011). La presencia de citoquinas inflamatorias en la madre embarazada y en el feto, y la concurrencia de un daño neurológico posterior, señalan a la neuroinflamación orquestada por la microglía como intermediaria en el proceso fisiopatológico psiquiátrico (Ashdown et al., 2006; Bilbo and Schawrz, 2009).

Todo lo anteriormente expuesto indica que la microglía juega un papel clave en la neurotoxicidad en todas estas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, al recapitular el proceso inflamatorio en cada una de ellas, es evidente que los eventos neurotóxicos no aparecen en el mismo orden (Aktas et al., 2007). Así, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer la degeneración neuronal precede a un proceso que combina funciones pro-inflamatorias a la vez que anti-inflamatorias (Cho et al., 2014; Gold and El Khoury, 2015; Merino et al., 2016; Song et al., 2011). Sin embargo, en la esclerosis múltiple y en la enfermedad de Parkinson la microglía ya muestra un estado pro-inflamatorio en las primeras etapas de la enfermedad, incluso antes de la neurodegeneración (McGeer et al., 1988; Singh et al., 2013; Zindler and Zipp, 2010). Por otro lado, en los accidentes cerebrovasculares y en los procesos infecciosos el parénquima cerebral es invadido por células del sistema inmune periférico, y el estado pro-inflamatorio que generan lleva a la muerte neuronal (Ekstrand, 2012; Smith et al., 2012; Tsai and Baker, 2013).

Pero el papel de la microglía en el desarrollo de otras patologías neurodegenerativas no es del todo conocido. Como aquellas complicaciones que a veces surgen en infecciones debidas a virus de las familias *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae*, como son el virus *influenza*, el parainfluenza, el virus de las paperas o el virus sincitial respiratorio, todos ellos con NA en su estructura (Noriega et al., 2010; Popescu et al., 2017; Surana et al., 2011; Yildızdaş et al., 2011).

Aunque la incidencia de este tipo de complicaciones en gripes provocadas por el virus *influenza* es considerable (Glaser et al., 2012) se sabe poco de la fisiopatología de la neurodegeneración en estos procesos infecciosos. El estudio de los mecanismos subyacentes, y en particular de la activación de la microglía, en estos procesos neuroinflamatorios se hace imprescindible.

2.2.3. El modelo de neuroinflamación generada mediante la administración de neuraminidasa

Mediante la neuroinflamación generada tras una inyección ICV de NA se puede simular de forma estéril una infección vírica o bacteriana generada por agentes patógenos que contengan NA (Granados-Durán et al., 2015). Este modelo experimental permite analizar los eventos generados específicamente por la enzima NA que, como se ha dicho anteriormente, utilizan algunos patógenos para su infección y dispersión en el huésped. Una dosis alta de NA administrada ICV en ratas produce la destrucción masiva del epitelio endotelial que recubre la pared ventricular, la oclusión del acueducto cerebral y el desarrollo de hidrocefalia (Grondona et al., 1996). Con una dosis menor sólo se pierden algunas porciones del epéndimo, pero alteración será permanente ya que el epéndimo no se regenera (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008). Además de la pérdida parcial del epéndimo se genera una respuesta neuroinflamatoria, con activación de la microglía y de los astrocitos en áreas cercanas a los ventrículos, e infiltración de neutrófilos, monocitos, linfocitos T CD8+ y linfocitos B, procedentes del torrente circulatorio (Granados-Durán et al., 2015).

También se ha demostrado la activación del sistema del complemento que está presente en el LCR (Granados-Durán et al., 2016). Curiosamente, algunos tractos de mielina se ven afectados por la aparición de vacuolas, alteración que, al contrario que la pérdida endotelial, se repara posteriormente (Granados-Durán et al., 2017). El proceso inflamatorio remite en dos o tres semanas, aunque algunas secuelas se mantienen por un tiempo más prolongado (gliosis), y otras incluso permanecen de por vida (pérdida de epéndimo). Resulta inmediato preguntarse hasta qué punto la NA es la causa directa de todos estos efectos, o si éstos son consecuencia de la respuesta inflamatoria iniciada por la NA.

2.2.3.1. La neuraminidasa

La neuraminidasa es una enzima hidrolasa que escinde los enlaces glucosídicos del ácido neuramínico o ácido siálico (Taylor and von Itzstein, 1994). Esta enzima está presente en organismos diversos, desde bacterias y virus hasta mamíferos. La NA del virus de la *influenza* es especialmente conocida, por ser considerada como diana de fármacos encaminados a prevenir la propagación de la infección causada por el virus de la gripe (Colman, 1994; Parker et al., 2009; Smutova et al., 2014). Tanto la NA como la hemaglutinina participan en la invasión y dispersión vírica durante la infección (Wagner et al., 2002). Se han descrito hasta 9 tipos de NA de influenza diferentes (N1-N9), las cuales muestran diferente eficiencia en la escisión de los diferentes enlaces (α 2-3, α 2-6 y α 2-8) que unen el ácido siálico a las glicoproteínas, lo cual influye en la patogenicidad de los distintos subtipos víricos (Air, 2012).

El ácido siálico es un glúcido terminal que se encuentra unido a las glucoproteínas y glucolípidos de la matriz extracelular y del glucocálix (Schnaar et al., 2014). Se sabe que el ácido siálico desempeña múltiples funciones relacionadas con la comunicación intercelular (Schauer, 2009). Por un lado, el conjunto de todo el ácido siálico que recubre las membranas celulares genera una máscara biológica que interviene en numerosos procesos de señalización y reconocimiento. (Pshezhetsky and Ashmarina, 2013). De esta forma, la desialización puede indicar el inicio fenómenos de secuestro y destrucción celular (Kerfoot et al., 2008; Grewal et al., 2008), de apoptosis (Zhuo et al., 2008) o de reparación del tejido adulto (Rutishauser, 2008). El ácido siálico puede también funcionar en sentido opuesto, siendo necesario para el reconocimiento hormonas, de lectinas, de anticuerpos, etc (Varki and Gagneux, 2012). Resulta particularmente relevante el papel del ácido siálico en la respuesta inmune, ya que regula la vía alternativa de activación del complemento (Fearon, 1978), modula la migración de leucocitos mediante la expresión de selectinas (Rosen, 1993) y controla la activación inmune celular mediante Siglecs (del inglés *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*; Liu et al., 2009), que son proteínas que se unen al ácido siálico ubicadas en la superficie celular, particularmente en células inmunes.

Numerosos virus y bacterias aprovechan estas estructuras de reconocimiento y unión para su mecanismo de infección (Air, 2012; Gee et al., 2006; Isa et al., 2006).

2.2.3.2 El daño del epéndimo en el modelo de neuroinflamación por neuraminidasa

Las células endoteliales o endotelocitos forman un epitelio monoestratificado cúbico que tapiza la pared de los ventrículos cerebrales y el canal central medular. Una de sus características morfológicas distintivas es que son multiciliadas, lo que les permite realizar un batido asimétrico que genera un flujo constante del LCR (Lehtreck et al., 2008). Los endotelocitos están unidos entre sí mediante interdigitaciones (Mirzadeh et al., 2008), y entre ellos podemos encontrar uniones adherentes, uniones estrechas y uniones de tipo gap, todo lo cual confiere a la capa endotelial características de barrera y una función coordinada (Jiménez et al., 2014; Mirzadeh et al., 2008). Las uniones adherentes están compuestas de cadherinas y β -cateninas asociadas a filamentos de actina, proporcionando estabilidad y consistencia a la capa endotelial (Brightman and Palay, 1963; Li et al., 2007).

Por otra parte, también se ha demostrado la presencia en el epitelio endotelial de integrinas, glucoproteínas que participan en la unión de las células con la matriz extracelular subyacente (Grooms et al., 1993). El uso de lectinas específicas para ácido siálico ha permitido comprobar que la superficie luminal del epéndimo es muy rica en ácido siálico (Granados-Durán et al., 2015; Grondona et al., 1996; Jiménez et al., 2014). Tanto cadherinas como integrinas presentan ácido siálico terminal (Varki and Gagneux, 2012; Varki and Schauer, 2009), y su desialización desencadena alteraciones estructurales de los epitelios (Cioffi et al., 2012; Grooms et al., 1993; Liwosz et al., 2006; Nagra et al., 2009). Esto sugiere que estas moléculas de adhesión participan en la integridad del epitelio endotelial y que su desialización podría desestructurar dicho epitelio.

Existen evidencias que relacionan la integridad de la capa endotelial con el inicio de patologías del SNC. Algunos estudios apuntan a la alteración de proteínas de las uniones adherentes o de proteínas de las uniones de tipo gap como posible causa del desprendimiento y/o la muerte de los endotelocitos (Jiménez et al.,

2014; Rodríguez et al., 2012; Sival et al., 2011). Además, en fetos humanos con hidrocefalia se observa una denudación del epéndimo en el acueducto cerebral y en los ventrículos laterales (Domínguez-Pinos et al., 2005). En otros casos, la hidrocefalia se ha relacionado con el flujo ralentizado del LCR, debido a un batido ciliar deficiente por parte de un epéndimo alterado (Jiménez et al., 2014; Lehtreck et al., 2008; Sival et al., 2011).

Algunos procesos víricos cuyos agentes causales portan NA en su superficie evolucionan a patologías neurológicas. En concreto, se han dado casos de encefalitis e hidrocefalia causados por el virus de las paperas (Alp et al., 2005; Taştan et al., 2007). Además, ciertos casos de encefalopatías (Fujimoto et al., 1998; Steininger et al., 2003) y el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré han sido asociados con el virus *influenza* (Sivadon-Tardy et al., 2009; Vellozzi et al., 2014). Aunque este último virus afecta principalmente a las vías respiratorias, los numerosos casos de problemas neurológicos ocasionados por el virus *influenza* A (subtipo H1N1) durante la pandemia de 2009 cobraron especial relevancia (Glaser et al., 2012; Noriega et al., 2010; Surana et al., 2011), así como también los provocados por la gripe aviar de 2004-2005 (debida al virus *influenza* A subtipo H5N1)(de Jong et al., 2005; Gu et al., 2007; Zhang et al., 2009). En los últimos años se ha prestado especial atención a los casos de esquizofrenia (Brown, 2006) y autismo (Brown, 2012) relacionados con infecciones generadas por el virus *influenza* durante el desarrollo fetal.

Aunque se desconoce gran parte del mecanismo de estas patologías, sería interesante analizar la integridad de la capa endimaria en las mismas, dada la actividad sialidasa que presentan sus agentes causales. La administración de NA en los ventrículos cerebrales produce desialización y posterior desprendimiento del epéndimo (Granados-Durán et al., 2015). Los efectos pleiotrópicos que causa la NA en el cerebro son complejos, por lo que es difícil abordar su estudio conjunto. Además, se sabe poco del papel intrínseco y directo de la NA de los patógenos sobre el proceso inflamatorio, y mucho menos sobre la muerte de los endimocitos. El modelo de neuroinflamación aguda inducida por NA es de gran valor para abordar todas estas cuestiones.

2.3. ANÁLISIS DE LA FORMA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

La morfología de la microglía es una de sus características más destacadas. Aunque estas células están aparentemente distribuidas de manera uniforme en el parénquima nervioso, una observación más detallada muestra que ni la morfología ni la distribución son iguales en todas las regiones del cerebro.

Pío del Río-Hortega describió la distribución y la morfología de la microglía y también reconoció que las células ramificadas se transformaban en microglía de varilla o ameboidea en diferentes situaciones de enfermedad cerebral (Río-Hortega, 1919a, 1919b, 1919c, 1919d; Sierra et al., 2016). En función de su forma, las células de microglía se empezaron a clasificar en tres subtipos distintos, compactas, ramificadas longitudinalmente y ramificadas radialmente (Lawson et al., 1990), los cuales están estrechamente relacionadas con su estado funcional (Davis et al., 1994). En condiciones normales predomina la microglía con morfología ramificada, más recientemente denominada vigilante o *surveillant*, que realiza funciones diversas como se explicó con anterioridad. En situaciones de neuroinflamación o después de una lesión ocurre una des-ramificación progresiva de la microglía. Por lo tanto, la microglía ramificada puede transformarse a un "estado activado", que se caracteriza morfológicamente por ser células ramificadas hinchadas, con un cuerpo celular más grande y prolongaciones más cortas y gruesas (Graeber et al., 1988). Alternativamente, puede adoptar un "estado reactivo", típicamente células esféricas pequeñas, o bien en forma de barra o ameboide (Davis et al., 1994). Se han descrito también otras morfologías asociadas a determinadas funciones, como microglía en estado fagocítico, con prolongaciones que contienen fragmentos picnóticos (Sierra et al., 2013; Streit et al., 1999), microglía en fase de motilidad, donde las células presentan prolongaciones dinámicas que exhiben ciclos de extensión y retracción (Petersen and Dailey, 2004), o incluso microglía en un estado locomotor, que se desplaza desde una región a otra del tejido nervioso (Stence et al., 2001).

Desde el punto de vista funcional, la clasificación más extendida de la microglía define un fenotipo pro-inflamatorio M1 y otro anti-inflamatorio M2, como se ha explicado de forma pormenorizada en apartados previos (Orihuela et al., 2016).

Aunque la relación entre la forma y la función en estas células es evidente y ha sido extensamente documentada, la asociación de un morfotipo particular a un estado funcional no es tan inmediata. Algunos estudios han intentado abordar esta cuestión; por ejemplo, se ha analizado la forma de estas células en situaciones patológicas como lesiones craneales (Zanier et al., 2015), en condiciones de estrés fisiológico (Ayoub and Salm, 2003) o de estrés psicológico (Hinwood et al., 2013); otros autores han realizado un análisis morfológico de las células microgliales en cultivos celulares (Amadio et al., 2013; Bernhardt and Nicholls, 1999; Glenn et al., 1992; Mcwhorter et al., 2013). Sin embargo, en algunos casos las diferencias morfológicas pueden ser muy sutiles y no ser cuantificables por medidas euclidianas tales como el área o el diámetro.

Un análisis cuantitativo de la complejidad de las ramificaciones de la microglía es particularmente interesante, ya que, como se ha dicho anteriormente, esta propiedad morfológica está estrechamente relacionada con el estado de activación (Davis et al., 1994).

Una metodología ampliamente usada con esta finalidad es el análisis Sholl (Sholl, 1953), que se basa en superponer una serie de círculos concéntricos sobre una imagen de la célula, usando como centro de los mismos el propio soma celular, para luego contar el número de intersecciones entre las prolongaciones celulares y dichos círculos. Este método se ha utilizado para cuantificar las ramificaciones de la microglía en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer (Baron et al., 2014) y en un modelo experimental de daño neuronal (provocado por axotomía del nervio hipogloso; Yamada and Jinno, 2013). Estos análisis mostraron diferencias objetivas entre distintas poblaciones de microglía, asociando algunos de ellos a estados patológicos particulares.

Otros autores han estudiado las ramificaciones de las células microgliales mediante reconstrucciones en 3 dimensiones de las células. Existen diversos programas informáticos (e.g. NeuroLucida software, MBF Bioscience Inc.) que mediante el delineamiento manual permiten obtener una imagen digital del esqueleto de las ramificaciones de las células. Diferentes parámetros morfológicos

de microglía han sido cuantificados en condiciones fisiológicas en cerebros humanos sanos (Torres-Platas et al., 2014).

Otros estudios han ido un paso más allá, al tratar de establecer diferentes morfotipos de células microgliales basándose en la cuantificación de parámetros morfológicos y un posterior análisis estadístico. De esta manera, se han propuesto nuevas categorizaciones de la microglía en diferentes modelos experimentales, como en el aprendizaje visual en monos (Santos-Filho et al., 2014), en infecciones experimentales (de Sousa et al., 2015; Diniz et al., 2016), y en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (Ohgomori et al., 2016). Estos trabajos propusieron hasta cuatro tipos de células microgliales diferentes basándose en la cuantificación de sus características morfológicas, lo cual evita la posible arbitrariedad o la subjetividad de la clasificación.

Otra técnica menos usada, que surgió con el objetivo de cuantificar el grado de irregularidad de los objetos, es la *dimensión fractal* (D ; Mandelbrot, 1982). Benoit Mandelbrot, creador de la geometría fractal, abordó el estudio de objetos con rugosidad, grietas y fracturas en la naturaleza, ya que “las nubes no son esferas, las montañas no son conos, las costas no son círculos y las cortezas de los árboles no son lisas, ni los relámpagos viajan en una línea recta” (Mandelbrot, 1982). Mediante el diseño de conjuntos de fractales, planteó las aproximaciones matemáticas que estimasen la complejidad de los objetos.

El conjunto de Mandelbrot (Fig. I-10) es el más conocido de los conjuntos de fractales, donde cada imagen sucesiva es una ampliación de la previa (Mandelbrot, 1987). Mediante el análisis de este tipo de imágenes, se obtuvo la aproximación matemática para calcular la D de cualquier objeto, lo cual sería equivalente a cuantificar el grado de repetición de patrones que pueden aparecer a diferente escala en un objeto; esta propiedad fue denominada autosimilitud o autosemejanza. Por lo tanto, la medida de la D mostrará objetivamente el grado de complejidad de un objeto, de tal forma que cuanto más irregular sea, mayor será el valor de D ; además, es un índice cuantitativo muy sensible, ya que su valor cambia ante pequeñas variaciones en la forma (Cutting and Garvin, 1987).

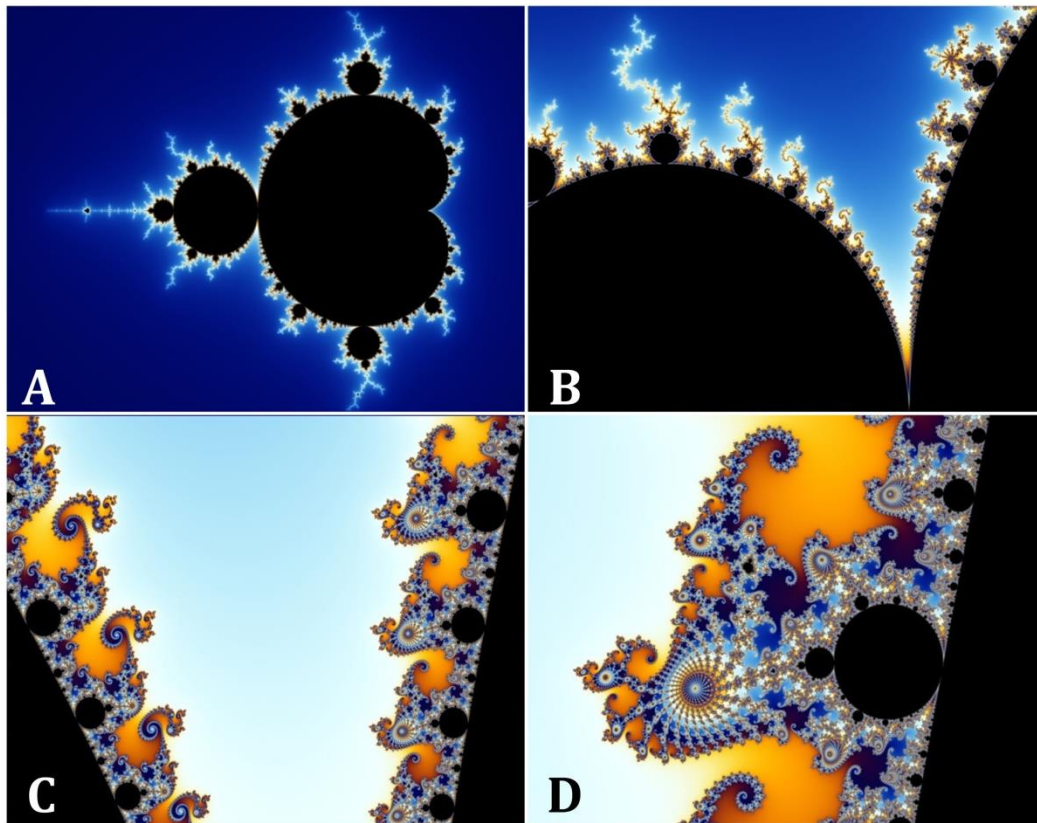


Figura I-10. Conjunto de fractales de Mandelbrot. La sucesión de imágenes A-D muestra un ejemplo de invariabilidad en relación a la escala, de tal forma conforme nos acercamos a ciertas partes de la imagen reaparece en miniatura la imagen total. Tomado de <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>

De hecho, la aplicación del análisis fractal sobre el estudio de sistemas orgánicos ha proporcionado una información muy particular sobre la organización de estructuras complejas como el árbol bronquial (Goldberger and West, 1987), la red vascular (Cross et al., 1993; Talu, 2011) y la distribución de células en el tejido tumoral (Landini and Rippin, 1992; Losa and Nonnenmacher, 1996).

De este modo se ha demostrado que el análisis de estructuras y formas biológicas por medio de D es una herramienta valiosa para estudiar las células, tejidos y órganos desde una perspectiva diferente (Losa, 2009). La cuantificación de la complejidad de las ramificaciones en oligodendrocitos (Bernard et al., 2001) y del árbol dendrítico de neuronas del hipocampo (Milošević et al., 2007), también ha permitido identificar y clasificar diferentes morfotipos en ambos tipos celulares de forma objetiva.

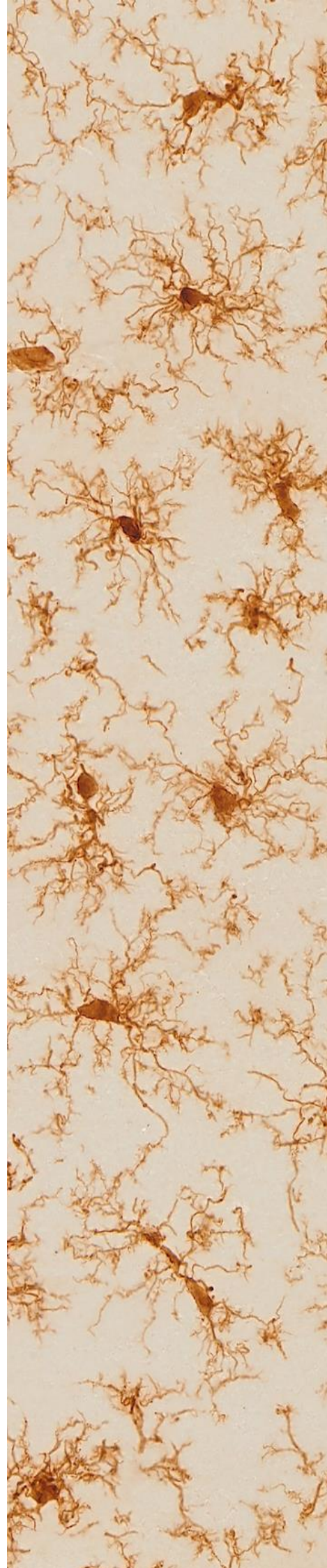
Del mismo modo, la D puede proporcionar información sobre la complejidad morfológica de la microglía en un amplio rango de formas (Fernández and Jelinek, 2001; Karperien et al., 2013).

De hecho, diferentes parámetros morfológicos de microglía han sido cuantificados en condiciones fisiológicas en cerebros de rata sanos (Kongsui et al., 2014), así como en situaciones patológicas como lesiones craneales (Soltys et al., 2001) o procesos isquémicos (Soltys et al., 2005).

Otro parámetro que proporciona una medida cuantitativa de la morfología celular es la *lacunaridad* (Λ). La *lacunaridad* se refiere a la existencia de “lagunas” o huecos en la forma, y se usa para definir el grado de heterogeneidad o de varianza traslacional y rotacional de un objeto. De esta forma se describen el patrón morfológico y la dispersión espacial (Plotnick et al., 1996). Valores más altos de Λ indicarán una mayor heterogeneidad del objeto (Karperien et al., 2011). El valor de Λ de una célula complementa al valor de D , proporcionando en ocasiones un herramienta distintiva (Smith et al., 1996). En concreto, al analizar una variedad de células microgliales procedentes de diferentes procesos patológicos (como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia o accidentes cerebrovasculares) se ha observado que algunas células que presentaban el mismo valor de D diferían en el valor de Λ . Esto indica que la determinación paralela de D y de Λ permite distinguir de manera objetiva células cuyas formas se diferencian sólo sutilmente (Karperien et al., 2011).

Existen diferentes técnicas para medir la D de un objeto, como los procedimientos Hausdorff, Minkowski-Bouligand, Calliper o Mass; pero el método *box counting* ha sido el más usado para medir la D de muchas estructuras biológicas, tanto en dos dimensiones como en tres dimensiones (Fernández and Jelinek, 2001). Esta metodología, que también se puede utilizar para calcular la Λ , ha sido utilizada en este trabajo, por lo que se explicará detalladamente más adelante (sección 4.13).

3. Hipótesis y objetivos



El modelo experimental de administración ICV de NA recapitula un proceso neuroinflamatorio agudo, en el que ocurre una activación de la microglía así como del sistema del complemento, y la infiltración de células circulantes hacia el parénquima nervioso.

Asimismo, ocurren algunos procesos degenerativos inmediatos, en concreto una vacuolización reversible de algunos tractos mielínicos y la destrucción definitiva de algunas zonas del epitelio ependimario.

La enzima NA se encuentra en algunos virus y bacterias, y es utilizada por éstos en su mecanismo de infección y/o dispersión en el huésped. En concreto, la enorme cantidad de personas afectadas por la gripe cada año ha motivado numerosos estudios sobre la fisiopatología infectiva del virus *influenza*. Aunque se ha podido averiguar que, en el caso de la gripe, la NA es clave en la infectividad del virus, sin embargo el posible efecto directo esta enzima vírica (o en su caso bacteriana) sobre las células del SNC está muy poco descrito.

El modelo de inflamación inducida por NA anteriormente mencionado es de gran utilidad para abordar esta cuestión. Dado que la microglía es la piedra angular del sistema inmune en el SNC, este trabajo se centra en estudiar el papel de este tipo celular en el comienzo del proceso neuroinflamatorio generado mediante NA.

Brevemente, los objetivos planteados están encaminados a estudiar el mecanismo de activación de la microglía por la NA, la posible participación de la microglía activada por NA en la muerte de los endimocitos, y el papel de la microglía residente frente a los monocitos circulantes infiltrados en la neuroinflamación que se genera tras la inyección de NA. Además, se ha planteado un objetivo adicional con la finalidad de desarrollar un método cuantitativo para valorar la morfología de estas células de forma objetiva.

Hipótesis 1. Los distintos morfotipos de microglía que se originan tras la inyección ICV de neuraminidasa pueden ser clasificados de manera objetiva en función de sus parámetros morfométricos, y se pueden relacionar con el grado de activación.

Objetivo 1. Realizar un análisis morfológico encaminado a la clasificación objetiva de la microglía durante el proceso neuroinflamatorio agudo generado por la administración de NA.

Objetivo 1.1. Clasificar los diferentes morfotipos de microglía por medio de un análisis de agrupación jerárquico, un análisis linear discriminante y un análisis de componentes principales.

Para ello, se realizará un análisis morfométrico exhaustivo de células individuales, midiéndose hasta 15 parámetros diferentes. Dichos parámetros se utilizarán para realizar una categorización objetiva de estas células, basada en su forma, y relacionada con su grado de activación y su localización concreta en el cerebro.

Objetivo 1.2. Estudiar la posible correlación entre los parámetros morfométricos de la microglía y su grado de activación, utilizando como indicador de dicha activación el nivel de expresión de la citoquina IL-1 β .

Secciones de cerebro obtenidas de animales que sufren una inflamación inducida por NA serán sometidas a inmunohistoquímica doble con IBA1 e IL-1 β . En células de microglía individuales, el marcaje con IBA1 se utilizará para realizar un análisis de forma, midiendo parámetros morfométricos, mientras que la tinción con IL-1 β se utilizará para estimar el grado de activación pro-inflamatoria de cada célula. Posteriormente se analizará mediante métodos estadísticos si existe o no correlación entre los parámetros morfológicos y el nivel de expresión de IL-1 β .

Mediante este análisis morfológico de la microglía se pretende revalorizar una herramienta de evaluación del estado de la microglía, cuya morfología se sabe que cambia en multitud de situaciones patológicas (o incluso fisiológicas) del SNC.

Esta herramienta se podría utilizar en muestras de pacientes con procesos neurodegenerativos o psiquiátricos, tanto en tejido procedente de biopsias como obtenido *post mortem*, lo que podría arrojar luz sobre la participación de la microglía en dichas patologías.

Hipótesis 2. La neuraminidasa activa a las células de microglía a través de los receptores TLR2 y/o TLR4

Objetivo 2. Estudiar el papel de los receptores TLR2 y TLR4 en el inicio de la reacción inflamatoria provocada por neuraminidasa.

Objetivo 2.1. Analizar la respuesta inflamatoria inducida por NA en cerebros de ratones deficientes de TLR2 o TLR4 mediante inmunohistoquímica.

Ratones TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} y salvajes serán inyectados ICV con NA, y sacrificados 24 horas después. La reacción inflamatoria será cuantificada mediante recuentos celulares en secciones de tejido inmunomarcadas con IBA1, IL-1 β e ICAM1.

Objetivo 2.2. Cuantificar la respuesta inflamatoria inducida por NA en cerebros de ratones deficientes de TLR2 o TLR4 mediante qPCR.

Ratones TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} y salvajes serán inyectados ICV con NA, y sacrificados 6 horas tras la inyección. Tras obtener el RNA del tejido cerebral, se cuantificará el nivel de expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α .

Objetivo 2.3. Cuantificar la respuesta in vitro de la microglía aislada de ratones TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} y salvajes tras su exposición a NA.

Se obtendrán cultivos primarios puros de microglía a partir de ratones deficientes de TLR2 o TLR4 así como de ratones salvajes. Dichos cultivos serán expuestos a NA así como a agonistas específicos de TLR2 y de TLR4. Posteriormente se aislará el RNA total para la cuantificación mediante qPCR de la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria, como IL-1 β , IL-6, TNF α .

Dada la importancia de los receptores TLR en la inflamación, y en particular TLR2 y TLR4 en el SNC, esperamos que participen también en el proceso inflamatorio inducido por la NA que se desarrolla en nuestro modelo experimental. El estudio de la respuesta inflamatoria en los mutantes TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-} ayudará a dilucidar esta cuestión. Por otra parte, desconocemos el mecanismo de acción de esta sialidasa en dicho modelo, por lo que nos hemos planteamos que pueda actuar a través de los receptores mencionados. Los estudios *in vitro* utilizando microglía aislada de las cepas mutantes TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-} arrojarán luz sobre dicho mecanismo.

Hipótesis 3. La microglía activada por neuraminidasa participa en la muerte endimaria.

Objetivo 3. Evaluar el efecto de la microglía activada por NA sobre la viabilidad de los endimocitos in vitro.

Objetivo 3.1. Cuantificar la viabilidad de los endimocitos en explantes de pared ventricular en presencia de microglía activada por NA.

Para ello, se obtendrán explantes a partir de las paredes de los ventrículos laterales de rata. Dichos explantes se colocarán en co-cultivo con cultivos puros de microglía. Se añadirá NA para activar a la microglía, y se cuantificará la viabilidad de las células endimarias con un colorante vital.

Objetivo 3.2. Determinar la viabilidad de endimocitos aislados en presencia de microglía activada por NA.

Se obtendrán cultivos puros de células endimarias aisladas de rata, así como cultivos puros de microglía. Las células endimarias, que se mantienen en suspensión, serán añadidas a los cultivos de microglía, que permanecen adheridas a la placa. Tras la activación de la microglía con NA, se cuantificará la viabilidad de las células endimarias mediante un colorante vital.

Objetivo 3.3. *Cuantificar el nivel de expresión de las citoquinas inflamatorias IL-1 β y TNF α en explantes de pared ventricular tratados con NA.*

Explantes de pared ventricular similares a los utilizados en el objetivo 3.1 serán tratados *in vitro* con NA. Los explantes representan un modelo de cultivo complejo, ya que en ellos se preserva la citoarquitectura del tejido y por tanto encontramos diferentes tipos celulares. Por debajo del epitelio endimario se encuentra una población de microglía subependimaria. El tratamiento de los explantes con NA debería activar a esta población de microglía. Para confirmar este hecho, los explantes expuestos a NA serán utilizados para obtener RNA y cuantificar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF α mediante qPCR.

Objetivo 3.4. *Estudiar la presencia de receptores para las citoquinas inflamatorias IL-1 β y TNF α en las células endimarias.*

Para indagar en el posible mecanismo de muerte endimaria mediada por la microglía activada, se investigará si las células endimarias expresan los receptores para las citoquinas que podrían intervenir en dicha muerte, en particular IL-1 β y TNF α . Para ello, se evaluará la presencia de dichos receptores en explantes de pared ventricular, y posteriormente se cuantificará su expresión mediante qPCR en cultivos puros de endimocitos.

Uno de los eventos más llamativos en el modelo de inflamación inducida por NA es la muerte y/o desprendimiento de las células endimarias. De hecho, tampoco está claro qué ocurre primero, si su muerte o su desprendimiento del epitelio. Por la relevancia de este evento en algunas patologías del SNC, consideramos necesario averiguar las causas de este daño endimario. Aunque estudios recientes demuestran la participación del sistema del complemento, que es activado directamente por la NA, se sabe que no es la única causa (Granados-Durán et al., 2016). Los objetivos planteados en este trabajo van encaminados a analizar si la microglía activada por NA perjudica la viabilidad de los endimocitos, y, en caso positivo, si éstos poseen los receptores de las citoquinas pro-inflamatorias que pudieran mediar en el daño endimario.

Hipótesis 4. Los monocitos infiltrados al parénquima nervioso contribuyen a la inflamación inducida por neuraminidasa, proceso previamente iniciado por la microglía residente.

Objetivo 4. Estudiar la infiltración celular y el proceso inflamatorio generado tras la administración ICV de NA en ratones deficientes del receptor CCR2 de la quimiocina CCL2.

Objetivo 4.1. Estudiar mediante inmunohistoquímica la inflamación aguda inducida por NA en ratones mutantes para el receptor CCR2.

Ratones CCR2^{-/-} y salvajes serán inyectados ICV con NA y sacrificados 6 horas después. Secciones obtenidas de sus cerebros se utilizarán para hacer recuentos de diferentes poblaciones celulares implicadas en la inflamación, que serán detectadas mediante el empleo de marcadores inmunohistoquímicos como IBA1, IL-1 β , Ly6c, CD206 y MHCII. Además, los ratones serán tratados antes de su sacrificio con el marcador de proliferación BrdU, que permitirá evaluar, también mediante inmunohistoquímica, la proliferación celular durante las primeras fases del proceso inflamatorio, para así determinar si la proliferación contribuye a las poblaciones celulares que participan en dicho proceso.

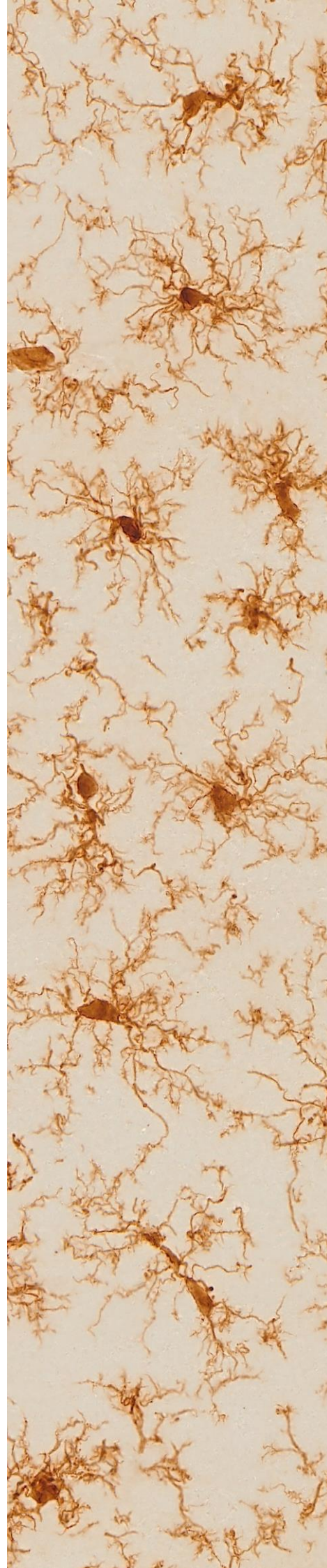
Objetivo 4.2. Analizar mediante qPCR la expresión de genes relacionados con la inflamación en ratones mutantes para el receptor CCR2.

Ratones CCR2^{-/-} y salvajes serán inyectados ICV con NA. Seis horas tras la inyección los cerebros se extraerán para aislar el RNA. Mediante qPCR se cuantificará la expresión de genes pro-inflamatorios (IL-1 β , TNF α , IL-6, CCL2), anti-inflamatorios (IL-4, IL-10, TGF β), así como de genes relacionados con la proliferación de la microglía (PU1, IL-34, CSF1R).

Está ampliamente aceptado que la microglía residente en el SNC desempeña un papel fundamental en la neuroinflamación.

Aunque esto es cierto probablemente también en la inflamación inducida por NA en nuestro modelo experimental, no sabemos cuán relevante es la participación relativa de la microglía en comparación con el papel desempeñado por las células del sistema inmune circulantes que se infiltran hacia el parénquima cerebral durante las primeras fases de la respuesta inflamatoria. En el mutante CCR2^{-/-} la infiltración celular está seriamente mermada, y constituye por tanto una buena herramienta para estudiar este aspecto de la inflamación. Podemos anticipar que al no reclutarse los monocitos circulantes el proceso inflamatorio inducido por NA en los mutantes CCR2^{-/-} será más leve. La cuantificación de diferentes parámetros relacionados con la inflamación nos indicará la importancia relativa de esta población celular respecto a la de la microglía residente.

4. Material and methods



4.1. ANIMALS

Wistar rats (350 g) were provided by Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). TLR2 (B6.129-Tlr2tm1kir/J) and TLR4 (B6.B10ScN-Tlr4lps-del/JthJ) deficient mice (TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} respectively) were bred by The Jackson Laboratory and purchased through Charles River Laboratories (Lyon, France). The wild-type strain used as control was C57BL/6J, also provided by Charles River Laboratories. These animals were maintained in the animal house at Universidad de Málaga, under a 12 h light/dark cycle, at 23°C and 60% humidity, with food and water available *ad libitum*. Animal care and handling was performed according to guidelines established by Spanish legislation (RD 53/2013) and the European Union regulation (2010/63/EU). All procedures performed were approved by the ethics committee of Universidad de Málaga (Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga; reference 2012-0013). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

The mouse strain C57BL/6J-CCR2^{-/-} (here named CCR2^{-/-}) is characterized by being deficient of the CCR2 receptor. As control strain for CCR2^{-/-}, the c-fms-EGFP strain (the MacGreen mouse) was used, which expresses EGFP under the promoter of the receptor for colony-stimulating factor 1 (CSF1R) encoded by c-fms proto-oncogene. These mice express green fluorescence in macrophages and microglial cells (Sasmono et al., 2003) and shares the same background as CCR2^{-/-}. Both strains were provided by Harlan (Bicester, UK), and used in the experiments carried out at The Centre for Biological Sciences, University of Southampton, UK. All procedures were performed in accordance with UK Home Office licensing.

4.2. VENTRICULAR WALL EXPLANTS

Explants were obtained from the lateral ventricle wall of adult rats, following the procedure described by Grondona et al (2013). Rats were decapitated with a guillotine and the heads immersed in 70° alcohol prior to brain extraction. The dissection of the brains was performed in sterile conditions in cold Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco) under a microscope.

To prevent any damage the ependymal epithelium, particular care was taken to avoid any contact of the dissecting tools with the ventricular surface, and the resulting explants were then handled with plastic Pasteur pipettes. Explants were obtained from both the striatal wall and the septal wall of each lateral ventricle. They were about 0.5 mm thick and included about 1.0-1.5 mm² of ventricular surface. These explants were used for 1) obtention of isolated ependymocytes (section 4.3), 2) experiments of co-culture with microglial cells (section 4.5.1), 3) gene expression studies (section 4.9).

4.3. ISOLATION AND CULTURE OF EPENDYMAL CELLS.

Ventricular wall explants obtained as previously explained were used in order to get pure isolated ependymal cells, following a procedure established by (Grondona et al., 2013). Briefly, the explants were initially washed with HBSS without calcium and magnesium (Gibco) for 30-40 min, and then incubated with TrypLE Express solution (Gibco) for about 40 min. This is a commercial enzymatic cocktail designed for cell dissociation from tissues. The explants were then incubated during 24 hours in a separation medium consisting of α MEM (Gibco) supplemented with 0.2% Pluronic F-127, 0.3% D-glucose, 0.01% DNase type I and 0.01 M HEPES (all of them from Sigma-Aldrich). After 24 hours, detached ependymal, which were free floating and moving in the medium, were harvested by centrifugation (300 g, 10 min) and suspended in the supplemented α MEM (described above). Isolated ependymal cells were used for viability studies in co-culture with microglial cells (section 4.5.2), and to determine the expression of specific citoquine receptors (section 4.9) to perform the experiments.

4.4. ISOLATION AND CULTURE OF MICROGLIAL CELLS

Microglial cells were isolated according to the Saura's method (Saura et al., 2003). The mix cells cultures were obtained from rats or mice of 3-5 days were sacrificed by decapitation. The brains were dissected out and the meninges eliminated with the aid of a magnifying glass. Cortical brain tissue was disrupted in the presence of 0.25% trypsin solution plus 1mM EDTA in HBSS (Sigma).

After mechanical and chemical dissociation, and harvested by centrifugation (300g, 10 min) cells were seeded in DMEM-F12 (Gibco; 11320033), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich; F7524) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich; P4333), at a density of 250,000 cells/mL, and cultured at 37°C in humidified 5% CO₂. The medium was replaced every five days; confluence was achieved after two weeks. After maintaining the culture in confluence for 1-2 weeks, microglial cells were isolated by the following mild trypsinization method. The medium was removed and the mixed culture carefully washed; then it was treated with 0.25% trypsin solution plus 1mM EDTA in HBSS during 1h at 37°C. During this incubation the main monolayer detaches like a sheet, leaving exposed the microglia underneath which is adhered to the plate bottom. The purity of these microglial cultures was checked by immunocytochemistry, and usually was about 95%. The average yield with this method was about 5,000 cells/well in 24 multiwell plates (Sigma-Aldrich, TPP tissue culture plates, Z707791) and about 20,000 cells/well in 12 multiwell plates (Sigma-Aldrich, TPP tissue culture plates, Z707775). Rat microglial cultures were used for co-cultures with explants (section 4.5.1) or ependymocytes (section 4.5.2). Mouse microglial cultures were obtained from wild type, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} strains, and used to investigate the activation mechanism of NA.

When required, microglial cultures were activated by the addition of: 1) the synthetic triacylated lipoprotein Pam3CSK4 (P3C; InvivoGen, 12A10-MM; 2µg/mL), which is an agonist of TLR2; 2) pure lipopolysaccharide (LPS; InvivoGen, 13I06-MM; 5µg/mL), which is a specific ligand of TLR4; or 3) neuraminidase (NA; Sigma-Aldrich, N3001; 50mU/mL), whose effect on microglial cells is under investigation herein.

4.5. CELL VIABILITY ASSAYS

4.5.1. Viability assay of ependymal cells in explants

Ventricular wall explants obtained from adult rats were used to assess ependymal cell viability under different experimental conditions, which are outlined in Figure M-1 A. Explants were individually placed in 12-well plates in DMEM-F12 medium,

supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Some explants were co-cultured with pure primary microglial cells ($n = 6$).

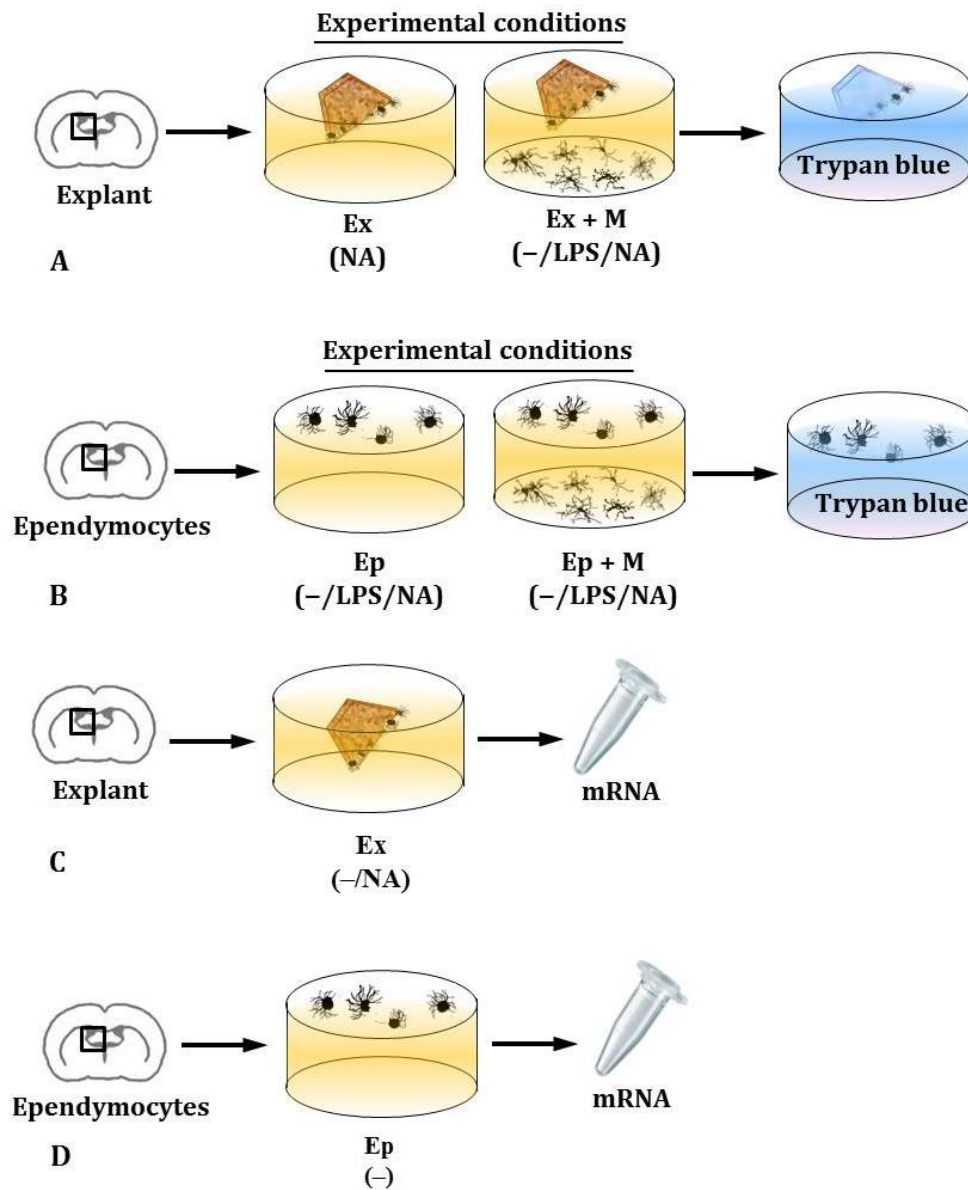


Figure M-1. Schematic illustration of the experiments carried out with ventricular wall explants and ependymal cells. (A) Co-culture of explants obtained from the lateral wall of rats, with microglial cells. The inflammatory stimuli LPS or NA were added, or omitted in controls (-). After 24 h of co-culture in different conditions, the explants were stained with trypan blue, fixed and paraffin-sectioned. The viability of ependymal cells within the ependymal epithelium was evaluated by live/dead cell counts. (B) Co-cultures of rat ependymal cells (Ep) with non-activated (-) microglial cells (M), or after activation by addition of LPS or NA. The viability of ependymal cells was evaluated at different times (up to 24 h) by trypan blue staining. Extraction of total RNA from periventricular explants (C) or pure ependymocytes cultures (D) was performed for qPCR quantifications. Ep: rat ependymal cell culture; Ex: rat lateral ventricle wall explant; M = microglial cell culture; (-) = control medium; LPS = medium with lipopolysaccharide; NA = medium with neuraminidase.

Microglia activation was achieved by addition of LPS to the medium. In some co-cultures microglia was activated with NA. Control conditions consisted of: 1) explants treated with NA but without microglia (n = 5), and 2) explants co-cultured with non-activated microglia (n = 5). All these culture conditions were maintained for 24 hours.

Then, the viability assay was performed as follows. Explants were incubated for 10 min in a 0.4% solution of the vital stain trypan blue (Gibco; 15250061). After staining they were washed with HBSS for 2 min, then immersed in Bouin's fixative solution for 2 hours (5% acetic acid, 9% formaldehyde, and 0.9% picric acid), and later embedded in paraffin wax.

Five micrometer paraffin sections were obtained from each explant, aiming to get a cutting plane perpendicular to the ependymal surface, so that ependymal cells could be clearly identifiable. Paraffin sections were mounted on slides treated by poly-L-lysine solution (Sigma-Aldrich; P8920). After deparaffinization, tissue sections were stained with hematoxylin to visualize the tissue and to stain live cells, while dead cells were distinguished by a bright blue label. Images were captured using an Olympus VS120 microscope through UPLSAPO 20x objective. About 400 live (white) or dead (blue) ependymal cells were counted per explant, and viability was expressed as the percentage of living cells.

4.5.2. Viability assay of cultured ependymocytes

Primary cultures of ependymal cells obtained from rats were placed in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were seeded at a density of ~1,500 cells/well in a 24-multiwell plate. Some ependymal cells were placed in wells already containing a pure microglial culture (from rat) previously prepared. To trigger microglial activation, LPS or NA were added; some wells were left without NA or LPS as controls. LPS or NA were also added to wells with ependymal cells but with no microglia.

Incubation times were 1, 3, 6 and 24 h; n = 6 replicates for each experimental condition and time point were performed.

After incubation, ependymal cells were immediately processed to evaluate their viability by treating them with a 0.4% trypan blue solution for 5 min. Then, they were fixed with 4% PFA (Sigma-Aldrich; 1004965000) for 5 min, and washed three times with 0.9% sterile saline. Live (white) and dead (blue) cells were counted under the microscope, up to about 400 cells per sample. Viability was expressed as the percentage of live cells.

4.6. INTRACEREBROVENTRICULAR INJECTION

An acute and sterile neuroinflammatory process was generated in rats or mice by a single injection of the enzyme neuraminidase (NA) within the right lateral ventricle of the brain (Grondona et al., 1996; Del Carmen Gómez-Roldan et al., 2008). Sham rodents were injected with 0.9% sterile saline. Animals were sacrificed at different times after the injection.

Intracerebroventricular (ICV) injection procedure in rats was performed following (Granados-Durán et al., 2015). Briefly, the animals were anaesthetized with ketamine/xylazine solution (80 and 12 mg/kg, respectively; Sigma-Aldrich) and positioned in a stereotaxic frame. A scalp incision along the sagittal midline was performed to access the skull and the bone was perforated with a drill in the following coordinates: 0.5 mm posterior, 1.4 mm lateral and 3.5 mm ventral from Bregma (Paxinos and Watson, 2007). Neuraminidase from *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich, N3001) dissolved in 0.9% sterile saline was administered by a single injection 3.5 mm below the dura mater with the aid of a pump; a dose of 500 mU (in 20 μ L) of NA were perfused during 10 min at a rate of 2 μ L/min.

The ICV injection procedure was fine-tuned for mice. In this case, stereotaxic coordinates were 0.1 mm posterior, 0.9 mm lateral and 2.0 mm ventral from Bregma (Franklin and Paxinus, 2008). The amount of NA injected was 75 mU in 1 μ L, perfused during 5 min at a rate of 0.2 μ L/min.

The animals were sacrificed at different times post-injection (2, 4, 6 and 12h), and their brains used for immunohistochemistry (section 4.8.1) or for RNA extraction (section 4.9.1).

4.7. FREE FLOATING SECTIONS OF BRAIN TISSUE

Prior to sacrifice, the animals were anesthetized and systemically perfused with 0.9% saline, followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed and post-fixed overnight in the same fixative solution. They were later sectioned with a vibratome (40 μm thickness) in the coronal plane, and the sections were cryoprotected with a sucrose and ethylene glycol solution (30% w/v and 30 v/v respectively, in 0.1 phosphate buffer). Brain sections including the lateral ventricles and the third ventricle (distance from Bregma between -0.80 mm and -3.30 mm for rat, and around -0.30 mm from Bregma for mice), were selected for immunohistochemistry (section 4.8.1).

4.8. IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY

4.8.1. Immunohistochemistry

Free floating vibratome sections were first treated, to quench endogenous peroxidase, with 10% methanol and 3% hydrogen peroxide in PBS during 45 min. After washings with PBS, nonspecific binding sites were saturated with PBT solution (0.3 % bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 in PBS pH 7.3). Primary antibodies (Table M-1) were incubated overnight at 4°C. The following morning the sections were washed with PBS and incubated with biotinylated secondary antibody (Table M-2, Immunoperoxidase) at room temperature for 1.5 h. The avidin-biotin-complex amplification system (ABC; 1:250 dilution; Thermo Fisher Scientific) was used afterward (at room temperature, 45 min) to detect the secondary biotinylated antibodies. The peroxidase activity was revealed with 0.05% diaminobenzidine and 0.03% hydrogen peroxide in PBS for 10 min. After thorough washes, the sections were then mounted onto gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with Eukitt mounting medium.

Colocalization by double immunofluorescence was performed using the same primary antibodies, which were diluted in the same solution and co-incubated overnight at 4°C. In this case the secondary antibodies were labeled with Alexa fluor 488 or Alexa fluor 594 (Table M-2, Immunofluorescence) and incubated for

1.5 h. Sections were washed with PBS, mounted onto gelatin-coated slides, coverslipped with the anti-fading agent Mowiol 4-88 (Calbiochem/EMD Chemicals) and stored at 4°C. Negative controls of the immunohistochemistry consisted in omitting the primary antibodies.

Table M-1. List of primary antibodies

Antigen	Antibody	Target cells	Reference	Dilution
IBA1	Anti-rat IBA1 Host: rabbit	Microglia Macrophages	Wako 19-19741	1:500
IL-1β	Anti-rat IL-1 β Host: goat	Activated microglia Lymphocytes	R&D Systems AF501NA	1:500
ICAM-1	Anti-rat ICAM-1 Host: goat	Endothelial cells	R&D Systems AF583	1:40
βIV tubulin	Anti-rat β IV tubulin Host: mouse	Ependymal cells	Sigma T7941	1:1000
IBA1	Anti-mo IBA1 Host: rabbit	Microglia Macrophages	Wako 19-19741	1:500
BrdU	Anti-mo BrdU Host: rat	Mitotic cells	DS Hybridoma Bank	1:2000
CD206	Anti-mo CD206 Host: rat	Perivascular macrophages	AbD Serotec MCA2235GA	1:500
MHC II	Anti-mo MHC II Host: rat	Microglia Macrophages Dendritic cells	eBioscience 14-5321-85	1:500
Ly6C	Anti-mo Ly6C Host: rat	Monocytes Granulocytes Lymphocytes	BIO-RAD MCA2389B	1:1000
IL-1β	Anti-mo IL-1 β Host: rabbit	Activated microglia Lymphocytes	PeptoTech 500-P51	1:1000
CD11b	Anti-mo CD11b Host: rat	Microglial	AbD Serotec	1:500

4.8.2. Immunocytochemistry

Isolated ependymal cells were first fixed in 2% PFA at 4°C for 30 min. Then cells were centrifuged, the cell pellet washed with PBS, and placed onto poly-L-lysine coated slides. Cells were allowed to air dry overnight prior to immunostaining. In the case of microglial cells, mix cells cultures were grown over a sterile poly-L-lysine coated coverslip placed at the bottom of the multiwell plate. After maintaining confluence for 1-2 weeks, microglial cells were isolated as described in section 4.4. Prior to immunostaining, 2% PFA was added to the plate to fix cells during 30 min.

Immunocytochemistry was performed as described by Grondona et al (2013). Primary antibodies (Table M-1) were incubated for 18 h at 4°C, and secondary antibodies (Table M-2) were applied for 30 min at room. After extensive washings coverslips with cells were mounted in slides to be analyzed under the microscope.

Table M-2. List of secondary antibodies

Antibody	Reference	Dilution
Immunoperoxidase		
Anti-rat biotinilated Host: rabbit	Vector labs	1:200
Anti-rabbit biotinilated Host: goat	Pierce 31820	1:1000
Anti-goat biotinilated Host: rabbit	Vector VA9500	1:1000
Immunofluorescence		
Anti-rabbit Alexa 488 Host: goat	Molecular Probes	1:1000
Anti-rat Alexa 488 Host: goat	Molecular Probes	1:1000
Anti-rat Alexa 594 Host: goat	Molecular Probes	1:1000
Anti-rabbit Alexa 594 Host: donkey	Invitrogen	1:1000
Anti-goat Alexa 594 Host: donkey	Invitrogen	1:1000

4.9. PCR FOR GENE EXPRESSION STUDIES

Animals were anesthetized and transcordially perfused with heparinized 0.9% saline. The brains were then extracted and properly dissected under RNase-free conditions. The hypothalamic region was used for the study performed with TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} strains. The whole left side of the brain (opposite side of the ICV injection, approximately from 2mm to -2mm antero-posterior distances to Bregma) was taken for the experiments with CCR2^{-/-}. Immediately after dissection, tissue samples were immersed in RNAlater (Sigma-Aldrich), and kept overnight at 4°C. The next day this solution was removed and the tissue pieces placed at -80°C for storage until RNA isolation.

4.9.1. RNA isolation

Total RNA from mice brains and from ventricular wall explants (Fig. M-1 C) was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen; 15596026), following manufacturer instructions. One mL of reagent was added to about 100 g of tissue. Tissue was homogenized in TRIzol reagent with the help of a pestle and passing the sample repeatedly through a pipette. Then, 1-Bromo-3-chloropropane (Sigma; B9673) was added and after vigorous shaking and centrifugation three phases appeared; the upper aqueous phase containing the RNA was transferred to a new tube, and 0.5 mL of isopropanol (Sigma; I9516) was added to precipitate RNA. After 10 min incubation and centrifugation (10 min, 12,000 g at 4°C), supernatant was carefully poured and discarded. The RNA pellet was washed with 75% ethanol (Sigma; E7023), pulled down by centrifugation and, after carefully discarding ethanol, the RNA pellet was air dried. Finally the RNA was resuspended in a volume $\leq 50 \mu\text{L}$ of RNase-free water.

The concentration of RNA was measured in a NanoDrop microvolume spectrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific). Samples were stored at -80°C .

When RNA was isolated from pure microglia cultures (Fig M-1 D) the culture media was removed, the cells washed with cold PBS, and TRIzol reagent was added to the well (0.5-1 mL, depending on the type of culture plate), to have about 20×10^3 cells/mL of TRIzol. In the case of ependymal cells, which are cultured in suspension, the culture media was collected and cells spun down by centrifugation. The media was carefully pipetted out and 0.5 mL of TRIzol reagent was added to the ependymocytes pellet ($\sim 2 \times 10^3$ cells). Both microglia and ependymocytes were homogenized by passing TRIzol solution through a pipette several times. RNA isolation proceeded as previously explained, adjusting the volume of reagents when required (0.5 mL starting volume of TRIzol).

The $A_{260/280}$ ratio of the isolated RNA was usually about 1.8.

4.9.2. Reverse transcription

Before preparing the reverse transcription (RT) reaction, RNA samples were diluted with RNase-free water in order to bring them to a similar range of RNA concentration. cDNA synthesis from isolated total RNA was performed using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis (Invitrogen; 11752-050). All handling was done in ice and using RNase-free plastic ware.

The reaction mix (prepared according to the manufacturer's protocol) had a final volume of 20 μ L, and contained 1.25 μ M oligo(dT)20, 1.25 ng/ μ l of random hexamers, dNTPs and 5 mM MgCl₂. RNA was added to have ~500 ng. Finally the reverse transcriptase enzyme was added to each tube to initiate the RT reaction, which was carried out in a thermocycler (MasterCycler Gradient, Eppendorf; Hamburgo, Alemania). In these conditions, the resulting cDNA concentration should be equivalent to 25 ng RNA/ μ L.

The sequential reaction steps were: 1st) initial denaturation, 10 min at 25°C; 2nd) cDNA synthesis, 30 min at 50°C; 3rd) 10 min at 25°C; 4th) RNA denaturation after the addition of RNase (1 μ L, 2 U), 20 min at 37°C. Finally, cDNA was stored at -20°C until its use for PCR (section 4.9.3) or quantitative PCR (section 4.9.4).

4.9.3. Polymerase chain reaction (PCR) analysis

Primers to target the mRNA of genes related to inflammation (Table M-3) were design using the program Primer3 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Target genes sequences were obtained from the Genbank NCBI Reference Sequence. The parameters introduced in Primer3 for the automated design of primer pairs were preferably as follows: 1) PCR product size 100-250 bp; 2) primers size 18-20 bp; 3) primers melting temperature (T_M): minimum = 57°C; optimal = 60°C; maximum = 63°C, with maximum T_M difference of 3°C; 4) maximum self-complementarity 4 bp.

cDNA amplification was carried out using the 5 PRIME MasterMix for standard PCR (2200100), following the manufacturer's protocol. A final reaction volume of 25 μ L

was prepared containing 10 μ L of 2.5x mastermix, resulting in the following final concentrations: 1.25 U Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, 1.5 mM Mg^{2+} , and 200 μ M of each dNTP. Forward and reverse primers for the target gene were added to obtain a final concentration of 400 nM. The cDNA was added in the appropriate volume to have the equivalent to 10 ng of RNA (in most cases, 1 μ L of the cDNA-reaction volume; only exceptionally >1 μ L). All manipulations during the reaction setup were made on ice.

Table M-3. Sequence of primers used in PCR and qPCR

Gene	Primers (5'→3')	Product size (bp)	Accession #
GAPDH (mo)	TGAACGGGAAGCTCACTGG TCCACCACCTGTTGCTGTA	307	NM_008084.3
IL-1β (mo)	GAGTGTGGATCCCAAGCAAT ACGGATTCCATGGTGAAGTC	201	NM_008361.4
TNGα (mo)	GATTATGGCTCAGGGTCCAA ACAGAGGCAACCTGACCACT	197	NM_013693.3
IL-6 (mo)	TTCCATCCAGTTGCCTTCTT CAGAATTGCCATTGCACAAC	199	NM_031168.2
GAPDH (rat)	CACTGCCACTCAGAAGACTG GGCATGTCAGATCCACAAC	200	NM_017008.4
FOXJ1 (rat)	GACTATGCCACCAACCCACA CGGATGGAATTCTGCCAGGT	173	NM_053832.1
IIIβ9 (rat)	ACAACCCCAGCTATGTTCCGG GGCAGTCTCGATAGAAGGG	277	NM_145786.1
IL-1β R1 (rat)	AGAAACTCAACATACTGCCTCA CAGCCACATTCATCACCATC	268	NM_013123.3
TNFα R1 (rat)	TGTTGCCTCTGGTTATCTT ACCCTCCACCTCTTTGAC	140	NM_0130991.1
GAPDH (mo)*	ACCCCAGCAAGGACACTGAGCAA AGGGCTCCCTAGGCCCTCCTG	120	NM_008084.2
IL-1β (mo)*	GGCTGCTCTGGGATTCCTTC AGTCATCCTCATTGCCACTGTA	120	NM_000576.2
TNFα (mo)*	TCCCCAGGGACCTCTCTCTA GAGGGTTGCTACAACATGGG	102	NM_000594.3
CCL2 (mo)*	TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA TTTGCTTGCCAGGTGGTCC	104	NM_002982
Il-6 (mo)*	GGCACTGGCAGAAAACAACC ACCAGGCAAGTCTCCTCATTG	90	NM_000600.4
IL-10 (mo)*	CGAGATGCCTTCAGCAGAGT GGCAACCCAGGTAACCTTA	109	NM_000572.2
TGFβ (mo)*	GGAAATTGAGGGCTTTCCGC CGGTAGTGAACCCGTTGATGT	89	NM_000660.5
Il-4 (mo)*	CTTTGCTGCCTCCAAGAACAC CCAACGTACTCTGGTTGGCT	233	NM_000589.3

* Primers designed and used in The Centre for Biological Sciences, University of Southampton, UK.

PCR amplification was carried out in a MasterCycler Gradient thermocycler. The PCR steps were as follows: 1st) initial denaturation, at 95°C for 3 min; 2nd) 35 PCR cycles of melting (94°C for 30 sec) - annealing (55°C for 30 sec) - elongation (68°C for 45 sec); 3rd) final elongation, at 68°C for 7 min. Annealing temperature was sometimes adjusted according to particular primers requirements.

Amplicons were run in a 2% agarose gel (Thermo Fisher Scientific; 17850) in TBE buffer (89 mM Tris pH 7.6, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA). Ethidium bromide solution (1 µL/10 mL of gel; Sigma-Aldrich; E1510) was added to the gel to stain amplicons. Five µL of MassRuler DNA Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific; R0621) were added to each PCR sample. The Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific; 10068013) ranging from 100 to 2,000 base pairs (bp) was used as size reference. After electrophoresis, the bands were visualized under ultraviolet light, and gel images captured using a Molecular Imager camera (ChemiDoc™ XRS +; Bio-Rad).

4.9.4. Quantitative PCR

Quantitative (qPCR) or real-time PCR was used to quantify specific mRNAs represented in our cDNA samples. In this case the PCR products were detected using SYBR Green I fluorescent dye, which binds specifically to the double-stranded DNA (Morrison et al., 1998) that is progressively synthesized at each PCR cycle. The hot start reaction mix FastStart Essential DNA Green Master (Roche; 06 402 712 001) based on SYBR Green I fluorescence method, was used for this purpose. PCR reactions were prepared following manufacturer's instructions, and handling all reagents in on ice. For a final reaction volume of 20µL / well, 10µL of the Fast Start mastermix were placed in each well of specifically designed 96-well plate (Roche; 05102413001); forward and reverse primers were then added to get a final concentration of 0.4 µM each. Next, 500 pg of cDNA were dispensed (amount considered adequate after preliminary trials); water was added so that the final volume in all wells was the same. Then, the 96-well plate was placed in a LightCycler® 96 Instrument (Roche) for PCR reaction and amplicon fluorescence detection.

The following PCR protocol was programmed in the LightCycler®: 1st) denaturation at 95°C for 10 min; 2nd) 45 PCR cycles of melting (95°C for 10 sec) - annealing (60°C for 10 sec) - elongation (72°C for 10 sec); 3rd) a final elongation step at 95°C for 5 min.

The information obtained (amplification curves, melting curves and crossing points, CP, or cycle threshold, Ct) for each transcript was processed using the software provided with the LightCycler® equipment.

To estimate the PCR efficiency (E), serial dilutions of the cDNA samples were amplified, and E calculated according to the equation $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$ (Rasmussen, 2001). Relative quantification was based on the level of expression of a target gene relative to the level of expression of a reference gene (Pfaffl, 2001); the reference gene used in this study was glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Thus, for each cDNA experimental sample, the expression of a particular target gene relative to GAPDH expression (Gene exp. rel. GAPDH) was calculated as follows:

$$\text{Gene exp. rel. GAPDH} = (E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}} / (E_{\text{GAPDH}})^{\Delta\text{CP}_{\text{GAPDH}}}$$

where E is the efficiency of the corresponding gene (target gene or GAPDH), $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ is the difference in crossing point (CP) values for the target gene obtained in the control sample and in the experimental sample, and $\Delta\text{CP}_{\text{GAPDH}}$ is the difference in CP values for GAPDH obtained in the control sample and in the experimental sample (Pfaffl, 2001).

4.10. IMAGE ACQUISITION

Images of immunostained tissue or cultures were acquired with different goals. For cell quantification purposes, images were systematically taken from the brain areas of interest, or sometimes counted directly under the microscope. Optical microscopy photographs were obtained using a digital camera (Nikon Digital Sight, DS-Fi1) coupled to an optical microscope (Leica, model DMLB) using NIS Elements software F2.20 (Nikon).

However, more detailed acquisition methods were employed when images were intended to be used for morphometric analysis of microglial cells (Objective 1 of this Thesis).

In this case, digital colour images of tissue sections DAB-stained with IBA1 were obtained using an Olympus VS120 microscope (for Objective 1.1 of this Thesis). The UPLSAPO 60x0 oil immersion objective was used to capture high resolution images (pixel size = 115 nm²) of the selected areas. A multi-plane virtual-Z mode allowed to capture 20 images (1 µm thick) in 20 µm depth of the tissue section, which were later combined to obtain a single high quality image including detailed magnification of ramified processes of the cells. In the brain areas selected for each study, at least two sections per animal were scanned. Each acquired image was a TIFF file of 96 ppi, and contained at least 30 cells. These images were cropped to delimit single cells, as is later described in *Image processing*.

Moreover, with the aim of describing the progression of the acute inflammation, a second set of images was acquired from parallel tissue sections, in this case DAB-stained with anti-IL-1 β . The brain areas selected were scanned to establish the spatio-temporal spreading of the neuroinflammation, using in this case the UPLSAPO 40x2 objective.

On the other hand, with the purpose of measuring morphological parameters along with IL-1 β expression level (Objective 1.2 of this Thesis), double immunofluorescence with IBA1 (Alexa fluor 488-conjugated secondary antibody) and IL-1 β (Alexa fluor 594-conjugated secondary antibody) was performed on tissue sections of NA treated rats. In this case, images of activated microglia were acquired using the inverted microscope LEICA SP5 II equipped with a confocal scan unit. Images were captured with a 63x oil objective, using Ar (488nm) and He-Ne (594nm) lasers. For each microscopic field selected, a three-dimensional projection was obtained from 15-20 images taken along the z axis, by means of the z-stack mode.

4.11. IMAGE PROCESSING FOR THE MORPHOMETRIC CLASSIFICATION OF MICROGLIAL CELLS

The morphometric analysis was carried out in DAB-stained microglial cells labelled with IBA1 antibody (Fig. M-2 A-C). For this purpose, cells were selected and cropped according to the following criteria: i) random selection starting from the area nearest to the ventricle towards the brain parenchyma up to a depth of about 100 μm ; ii) no overlapping with neighboring cells; iii) complete nucleus and branches (at least apparently).

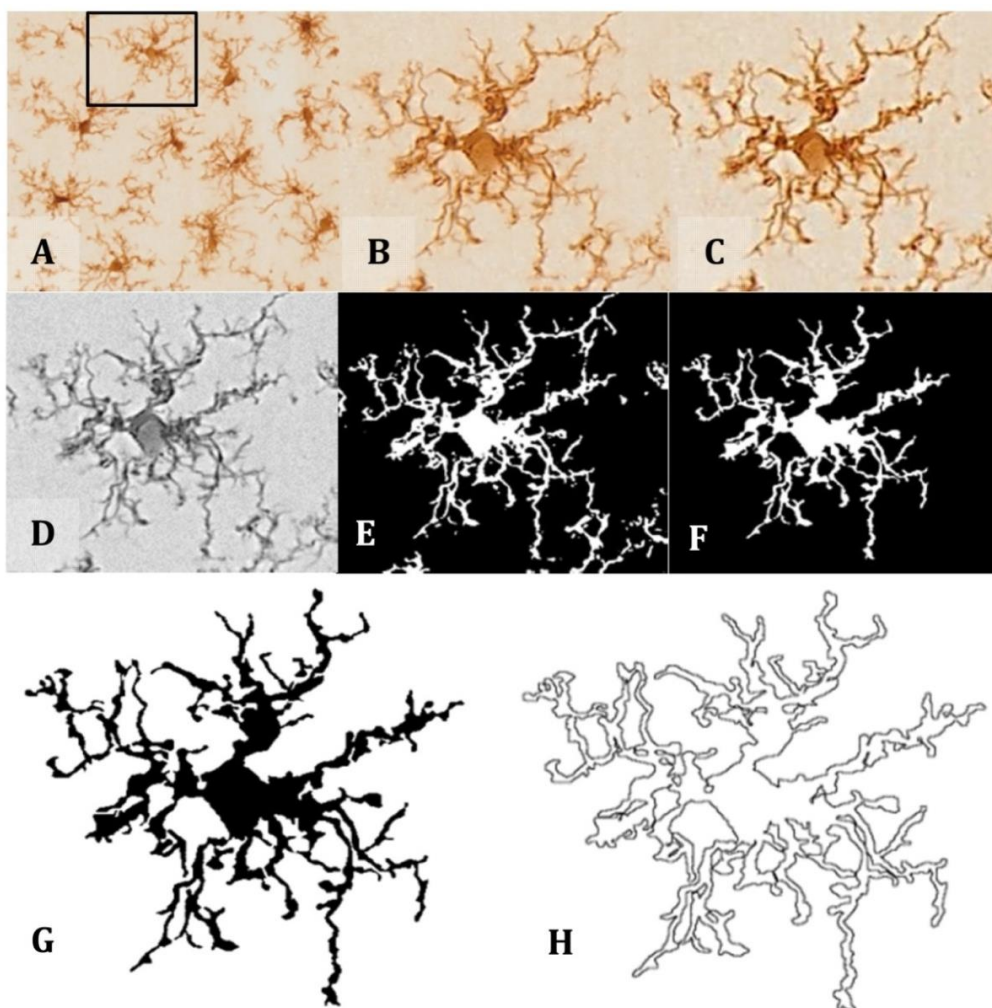


Figure M-2. Pre-processing of cell digital image. After random selection of cells from the tissue picture (A, B), the noise was removed by filtering the overall background to get a shape extraction (C). Next, the image was changed to grayscale (D), and then transformed into a binary image (E) using the same threshold for all pictures. The binary image was edited to clear the background and to join all branches (F), so that the cell image would be formed by a continuous set of pixels. Finally, a filled shape (G) and its pairwise outline shape (H) were used for morphological parameters measures.

Selection was done blinded to treatment. A total of ten cells per brain area were selected from each animal. In order to analyze several morphological parameters, each single cell cropped image was processed in a systematic way to obtain a filled image (Fig. M-2 G), and its counterpart outlined shape (Fig. M-2 H).

For this purpose, a series of steps were performed using *FIJI* free software (freely downloadable from <http://fiji.sc/Fiji>): 1st) the image was filtered to soften the background and enhance the contrast (Fig. M-2 B and C, respectively); 2nd) it was then transformed to 8-bit grayscale (Fig. M-2 D), and 3rd) binarized to obtain a black and white image by applying a previously established threshold (Fig. M-2 E). 4th) With the aim of obtaining a cell image formed by a single and continuous set of pixels, each image was manually edited: some pixels were cleared to separate ramifications pertaining to neighboring cells, while some pixels were added to join processes belonging to the selected cell. This skilled step was carefully done under the view of the original image of the cell, with special care to avoid bias (compare Fig. M-2 E with M-2 F). 5th) The filled shape was then cropped (to place the pattern in the center of the picture) and saved to analyze (Fig. M-2 G), and 6th) finally the filled figure was processed to extract and save the outlined shape (Fig. M-2 H).

4.12. IMAGE PROCESSING FOR THE CORRELATION OF MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND IL-1 β EXPRESSION LEVEL

Images of tissue sections double-labeled for IBA1 and IL-1 β by immunofluorescence were taken with a confocal microscope as explained before (Figure M-3 A,B). Individual cells were selected following the same criteria as before (section 4.11). The green and red channels were separated (Figure M-3 C,D) to be processed in different ways.

First, the green channel, corresponding to IBA1 staining (Figure M-3 C,E), was processed in a similar manner as that described above for the morphometric analysis (section 4.11).

Thus, filled and outlined shapes of each cell were obtained (Figure M-4), and later used to measure five morphometric parameters (*fractal dimension, lacunarity, area, perimeter* and *density*) to be correlated to IL-1 β expression.

The red channel, corresponding to IL-1 β staining, was used to quantify the level of expression of IL-1 β as follows. The red channel image was binarized (Fig. M-3 D,F) using a previously established threshold (determined empirically), which was applied to all cell images. This binary image rendered a number of “red-IL-1 β ” pixels, corresponding to the expression of IL-1 β . Then, the binary filled image obtained from the green channel was used to obtain a number of “green-IBA1” pixels, which should correspond to the total area occupied by that particular microglial cell.

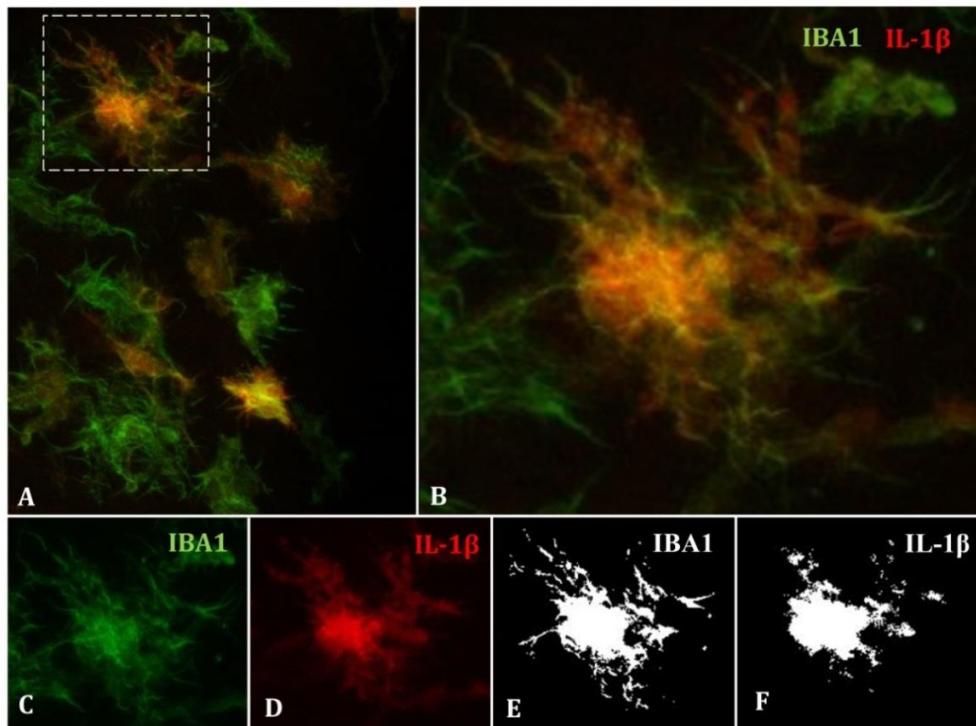


Figure M-3. Image processing for the quantification of IL-1 β expression in IBA1 positive cells. Random selected microglia (B) were cropped from double fluorescence immunostaining images acquired with a confocal microscope (A). The cell image in the green channel, corresponding to IBA1 staining (C), and the image in the red channel, corresponding to IL-1 β staining (D), were both changed to binary images (E and F respectively) to then obtain the number of labeled pixels for each marker. The number of red pixels (IL-1 β) relative to the number of green pixels (IBA1), expressed as percentage, was used as estimation of the level of expression of IL-1 β .

The ratio of “red-IL-1 β ” pixels to “green-IBA1” pixels (expressed as percentage) was considered as a measure of the level of expression of IL-1 β in individual microglial cells, independently of the size or shape of the cell (variables that may change upon cell activation, and which are represented by the “green-IBA1” pixels).

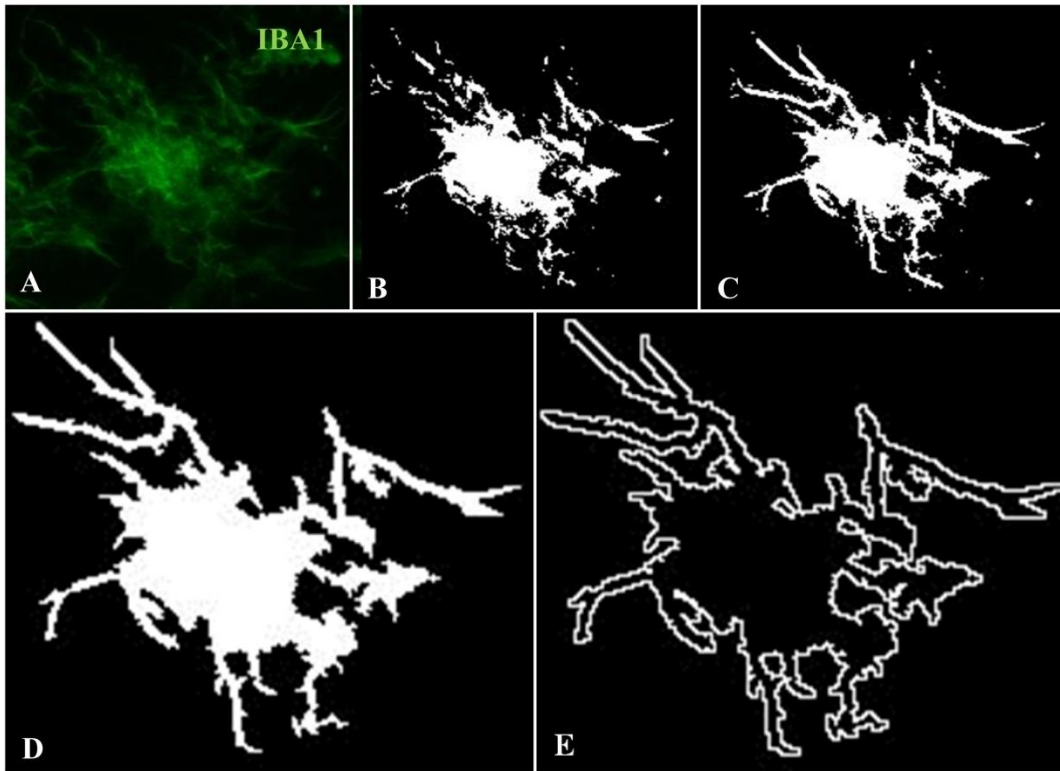


Figure M-4. Image processing for the morphometric analysis of fluorescently labeled IBA1 microglia. The same images of cells double labeled for IBA1 and IL-1 β previously used for IL-1 β quantification, were also used for obtaining high quality images of microglia shape, suitable for morphometric analysis. For each cell, the image in the green channel (A; IBA1 staining), was transformed into a binary image (B) and edited (C) to obtain a single and continuous field of pixels correspondent to the cell's shape. Filled (D) and outlined (E) shapes were then obtained, and were later used to measure various morphometric parameters.

4.13. MORPHOMETRIC ANALYSIS OF MICROGLIAL CELLS

With the aim of quantifying the morphological changes of microglial cells over the course of inflammation, 15 parameters were measured with the free software *FracLac* for *ImageJ* (Karperien A., *FracLac* for *ImageJ*. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>. 1999-2013; available at the *ImageJ* website, National Institutes of Health) (Karperien et al., 2013). The filled and outlined processed images obtained as previously described (section 4.11) were used for those measurements. Those parameters, which are schematically explained in Figure M-5, were the following:

Fractal dimension (D) is a recognized method to identify intermediate microglial forms ranging from simple rounded to complex branched (Karperien et al., 2013).

A higher D means a greater complexity of the pattern. Mandelbrot (Mandelbrot, 1983) defined a mathematical approach to describe fractal patterns, where D is the exponent to which scale (ε) is raised to get the number of identical parts to itself (N_ε). Therefore, D can be calculated from the ratio of $\ln N_\varepsilon$ to $\ln \varepsilon$ within a structure as the slope of a simple linear regression between $\ln N_\varepsilon$ vs $\ln \varepsilon$ data.

$$N_\varepsilon = \varepsilon^D \quad D = \ln N_\varepsilon / \ln \varepsilon$$

Box counting software was used to count the number of boxes containing any foreground pixels of the outlined pictures processed along successively smaller calibre grids (Fig. M-5 A). The box size scale was obtained as power series; that is, the base is raised to the exponent added to it to make successive sizes. The slope finally obtained for each image was the average of twelve measurements with different and random placement of the grid.

Lacunarity (Λ) is associated with changes in the soma and additional morphological features. This parameter measures heterogeneity or translational and rotational invariance in a shape (Karperien et al., 2011).

Low Λ value infers homogeneity, having the different parts of an image similar variance. On the contrary, high Λ measurements imply heterogeneity, containing the image many differently sized gaps or lacunas. The Λ calculated with the box counting software *FracLac* is a mass distribution of pixels from microglia images (Fig. M-5 B). The value of Λ obtained was a coefficient of variation expressed as pixel density per box as a function of box size. To avoid bias in Λ results, the mean of mass distribution by power series scales and also with twelve grid locations was calculated (Karperien et al., 2011).

Cell area was quantified as the total number of pixels present in the filled shape of the cell image (Fig. M-5 C), later transformed to squared micrometers (pixel area = $0.013 \mu\text{m}^2$).

Convex hull area, where the convex hull is the smallest convex polygon (that with all interior angles smaller than 180°) containing the whole cell shape (Fig. M-5 D).

Density was calculated by dividing the *area* of the cell by its *convex hull area* (Fig. M-5 E). Some authors call this parameter *solidity*.

Cell perimeter is measured based on the single outline cell shape (Fig. M-5 F) as the number of pixels expressed in microns (pixel side = 0.115 μm).

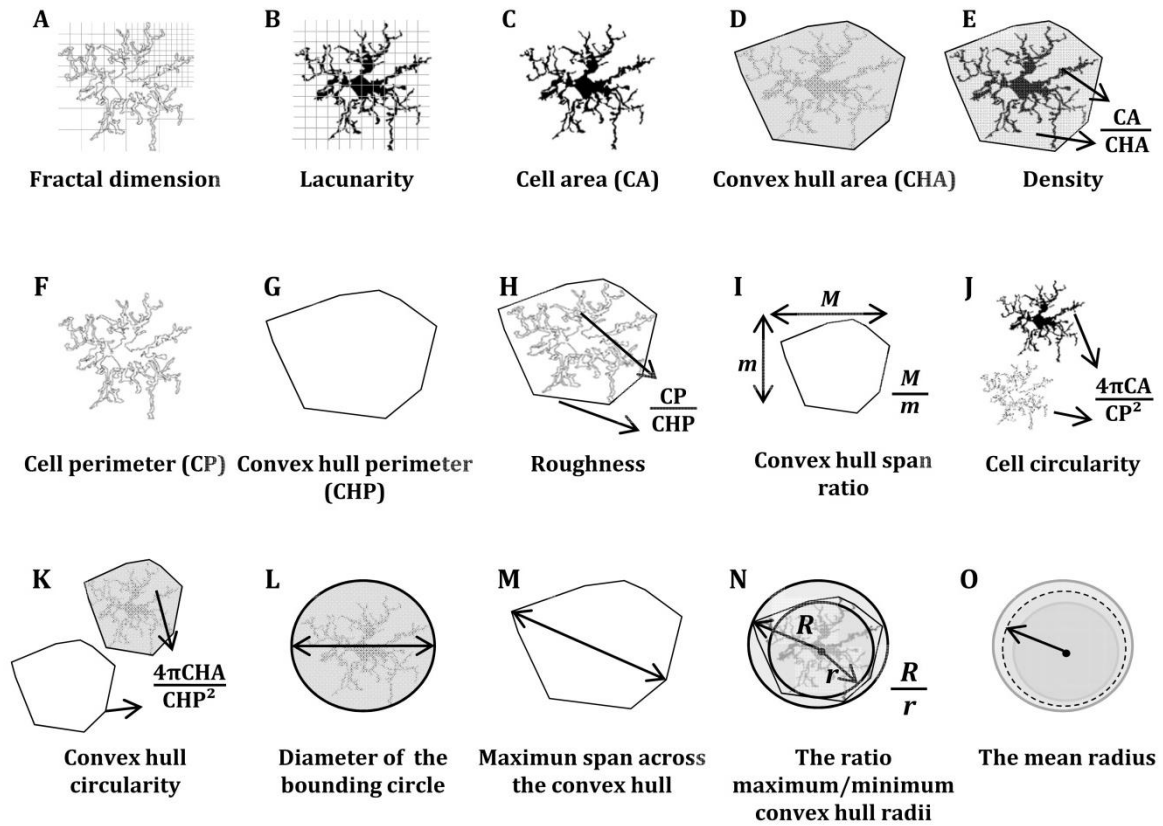


Figure M-5. Schematic drawings of the parameters used to analyze the morphology of the microglial cells. Fractal dimension (A) and lacunarity (B) were measured by the box counting method. Cell area (C) and cell perimeter (F) were assessed by counting cell shape pixels, and both were used to calculate the cell circularity (J). Shape measures such as convex hull area (D) and convex hull perimeter (G) were necessary to quantify convex hull circularity (K), convex hull span ratio (I) and maximum span across the convex hull (M). The bounding circle was required to obtain the diameter of the bounding circle (L). Finally, some parameters were appraised by combining previous estimations such as density (E), roughness (H), the ratio maximum/minimum convex hull radii (N) and the mean radius (O).

Convex hull perimeter is the single outline of the convex hull (Fig. M-5 G) expressed in microns.

Roughness was calculated as the ratio of *cell perimeter* to *convex hull perimeter* (Fig. M-5 H).

Convex hull span ratio is the ratio of the major to the minor axes of the convex hull (Fig. M-5 I). This parameter is also known as *form factor*.

Cell circularity was calculated as $(4\pi \times \text{cell area}) / (\text{cell perimeter})^2$ (Fig. M-5 J). The circularity value of a circle is 1.

Convex hull circularity was calculated as $(4\pi \times \text{convex hull area}) / (\text{convex hull perimeter})^2$ (Fig. M-5 K).

Diameter of the bounding circle is the diameter (expressed in μm) of the smallest circle that encloses the convex hull (Fig. M-5 L).

Maximum span across the convex hull is the maximum distance between two points across the convex hull (Fig. M-5 M).

The ratio maximum/minimum convex hull radii is the division of the largest to the smallest radius from the center of mass of the convex hull to an exterior point (Fig. M-5 N).

The mean radius was calculated as the mean length in microns from the center of mass of the convex hull to an exterior point (Fig. M-5 O).

4.14. STATISTICAL ANALYSIS

An elaborate statistical analysis was necessary to perform the classification of the microglial cells based on their morphological analysis. Statistical methods used included hierarchical cluster analysis, linear discriminant analysis and principal components analysis. On the other hand, simple linear regression analysis was necessary to investigate the correlation between morphometric parameters and IL-1 β expression in activated microglial cells. Finally, the analysis of variance was used to compare the group means in most experiments.

4.14.1. Hierarchical cluster analysis

With the aim of identifying similar types of microglial cells, a hierarchical cluster analysis was performed based on the measured morphometric parameters (section 4.13).

SPSS Statistics software, version 21.0 (Armonk, NY; IBM Corp.) was used for this purpose. Distance or similarity measures were generated measuring Euclidean distance (the square root of the sum of the squared differences between values for the items) by the Ward's method (Ward, 1963) for interval data. All data were normalized in order to obtain values in a similar scale.

A dendrogram plot based on the Euclidean distance (<http://www.r-project.org>) was used to display the number of potential clusters. To find out the more suitable parameters for separating our population of cells into different cell types, the multimodality index (MMI) of each parameter was calculated (Scheweitzer and Renehan, 1997) using the following formula:

$$\text{MMI} = [M3^2 + 1] / [M4 + 3(n-1)^2 / (n-2)(n-3)]$$

where $M3$ is skewness, $M4$ is kurtosis, and n is the sample size.

The number of appropriate clusters was estimated by the Thorndike procedure (Thorndike, 1953). Briefly, the average within-cluster distance is plotted for different numbers of clusters, resulting in a curve that shows a decrease in the distance as the number of clusters increases. The number of clusters finally selected was revealed by a sudden flattening of the curve in the plot.

Additionally, the Calinski-Harabasz criterion was performed to evaluate the optimal number of clusters; this index is sometimes called the variance ratio criterion (VRC). The optimal number of clusters is the solution with the highest Calinski-Harabasz index value (Caliński and Harabasz, 1974). The VRC is calculated as:

$$\text{VRC}_k = (SS_B / SS_W) \times [(N-k) / (k-1)]$$

where SS_B is the overall between-cluster variance or sum of squares, SS_W is the overall within cluster variance or sum of squares, k is the number of clusters and N is the number observations.

4.14.2. Linear discriminant analysis

The aim of this analysis was to identify characteristics that differentiate the groups previously established (section 4.14.1), and also to create a function able to distinguish, as accurately as possible, members of each group. The following equation shows linear discriminant functions:

$$LD = A_1X_1 + B_2X_2 + \dots A_nX_n + C$$

where A_n is the coefficient of individual morphometric parameters, X_n is each variable (the morphometric parameter value) and C is a constant. Then, a number of discriminant functions equal to $g - 1$ were generated (where g is the number of groups being discriminated, that is, 4 groups or clusters in our case). Some functions may offer a higher discriminant power than others. The F statistic value was used to contrast the hypothesis between group means. Additionally, the selection of variables was considered by the global Wilks's λ value, which was evaluated by the chi-squared transformation. The values of standardized coefficients show the net contribution of each variable to the discriminant function. The function was considered satisfactory when the predictive ability of the discriminate function exceeded 90%. The centroid of each group and the boundaries in the territorial map describe the predicted groups (Fisher, 1936; Ohgomori et al., 2016; Yamada and Jinno, 2013). Linear discriminant analysis was carried out by SPSS Statistics software.

4.14.3. Principal components analysis

To assess the overall picture of phenotypic variations in microglial cells, a principal components analysis (PCA) was carried out. The two principal components should exceed more than 70% of the accumulated variance (Soltys et al., 2005). Cells' values were distributed or plotted on the component plane by the SPSS Statistics software. The color code was assigned to the cells based on the hierarchical cluster classification (section 4.14.1) and on the NA/saline treatment. The selected components were supplementary to the main variables suggested by the previous linear discriminant analysis (section 4.14.2).

4.14.4. Simple linear regression

With the aim of analysing the possible correlation of the expression level of a well-defined marker of activation, IL-1 β , with different morphological parameters (specifically *fractal dimension*, *lacunarity*, *area*, *perimeter* and *density*), simple linear regressions were performed. Morphological parameters were the dependent variables and the level of expression of IL-1 β (as determined in section 4.12) was the independent one. The relationship between the independent variable and each dependent variable (morphological parameter) was analyzed by pairwise datasets of each cell, performing a separated simple linear regression for each parameter. Regression coefficients ($F_{0.05(2),70,70}$) of each function pointed out dependence of the dependent variable (morphometric parameters) on the independent variable (IL-1 β expression). The correlation coefficients ($r_{0.05(2),76}$; $t_{0.05(2),76}$) measure the strength of the linear relationship between the two variables.

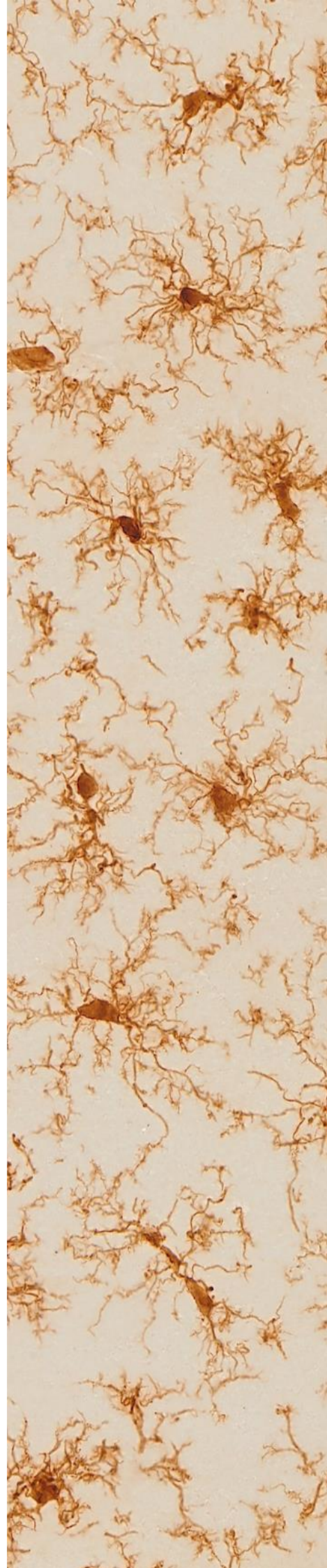
4.11.5. Analysis of variance

Comparisons of data were carried out using SPSS Statistics software. The *Kolmogorov-Smirnov* normality tests, along with the *Levene* homoscedasticity test, were used to verify if data could be analysed by parametric methods. Two-way analysis of variance (*ANOVA*) was used to compare morphometric parameter values, using “Time” as Factor 1 and “treatment” as Factor 2, with three and two levels respectively. In experiments involving viability measures, immunopositive-cell counts or qPCR, the comparison of groups’ means was carried out by the two-way or one-way *ANOVA*. The *Kruskal-Wallis* test was performed for the non-parametric data. Pairwise multiple comparisons were performed by *Tuckey* or *Bonferroni* tests. Non parametric data was analyzed by pairwise comparisons done with *Holm-Sidak* or *Tamhane* tests.

For two sample comparisons, *Student’s t-test* was used for parametric data, and *Mann-Whitney U* test in the case of non-parametric data.

Differences were considered significant when a P value < 0.05 was obtained.

5. Results



5.1. MICROGLIA MORPHOLOGICAL CATEGORIZATION IN A RAT MODEL OF NEUROINFLAMMATION BY HIERARCHICAL CLUSTER AND PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS

Microglial cells morphology is probably their most striking feature. According to their shape, they have been categorized into broadly distinct subtypes, which are closely related to their functional state. However, this classification has been frequently based on visual and therefore biased observations. Quantifiable morphological parameters may be used to facilitate microglia classification. In the current study we searched for a method to objectively categorize microglial cells based on their individual morphological parameters.

5.1.1. Intracerebroventricular NA induced morphological changes in microglial cells in the septofimbrial nucleus, the CA3 hippocampal area, and the periventricular hypothalamus

Few hours after NA injection, morphological changes of microglia were observed in different brain areas (Fig. R-1) nearby the ventricular wall, as the injection is performed within the right lateral ventricle. For the present study, three regions located close to the ventricular surface were selected (the septofimbrial nucleus, the CA3 hippocampal area, and the periventricular hypothalamus) based on the evident morphological change of microglia (and later confirmed activation by IL-1 β staining), and because they are relevant structures in cognitive processes and for neuroendocrine integration. At first sight, microglial cells labelled with IBA1 ranged from ramified in saline treated animals (Fig. R-1 A-C, G-I, M-O) to de-ramifying or bushy forms in NA injected ones (Fig. R-1 D-F, J-L, P-R). However, microglia polymorphism was also evident within the control group treated with saline. Thus, cells from hippocampus (Fig. R-1 G-I) were highly branched with thin extensions and small round or oval somas, while those in the septofimbrial nucleus (Fig. R-1 A-C) displayed less secondary processes and a larger cell body. Furthermore, cells in the hypothalamus (Fig. R-1 M-O) appeared hypertrophied, with shorter and thicker branches, a morphology similar to that observed in NA treated animals (Fig. R-1 D, K, L).

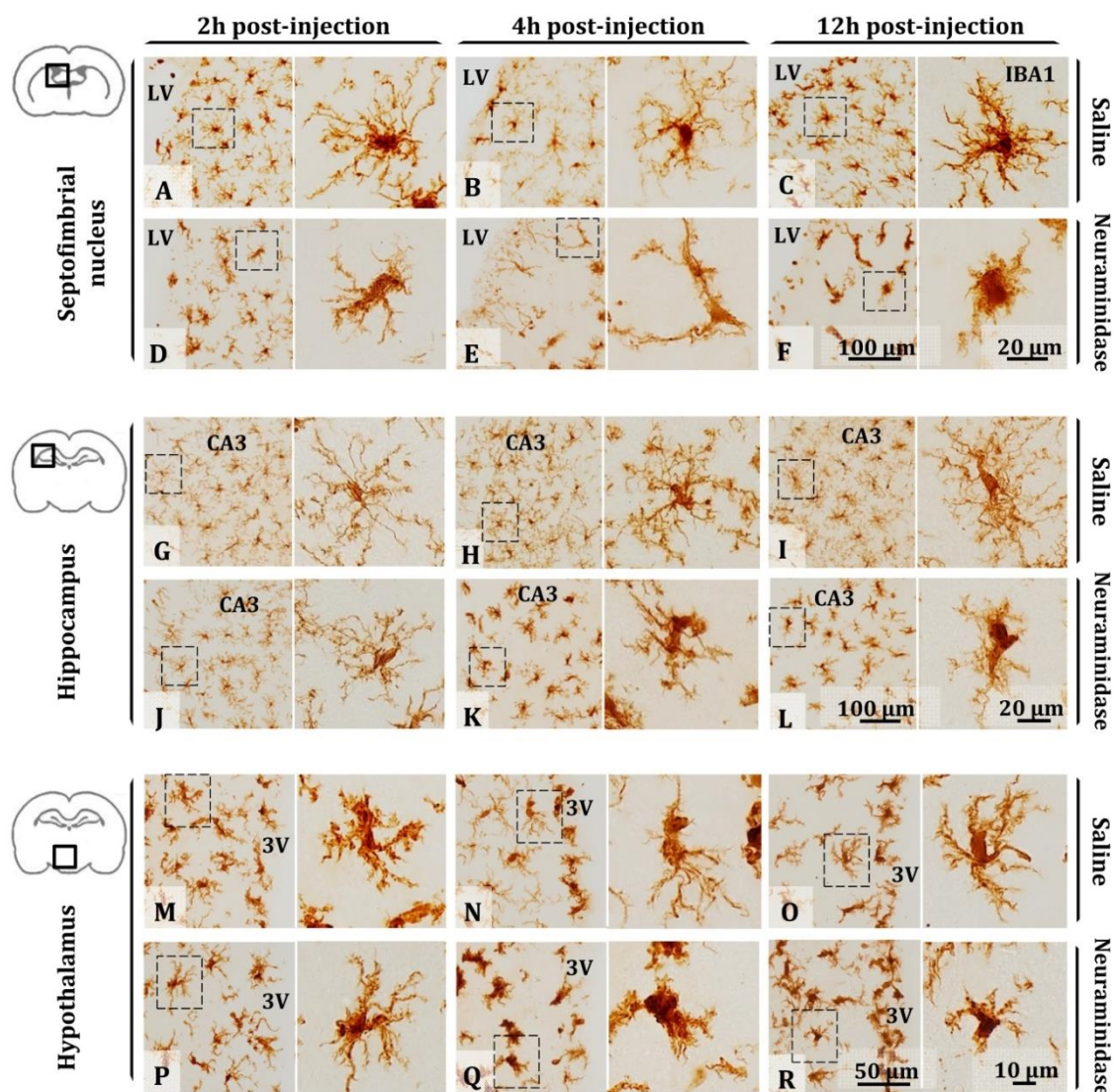


Figure R-1. Polymorphism of microglial cells from different brain areas in basal conditions and after an inflammatory stimulus. Microglia morphology, evidenced by the size and form of the soma, and the presence and the length of secondary/tertiary branches, remained unchanged 12 h after saline administration within the lateral ventricle in the three areas studied: the septofimbrial nucleus (A-C), the hippocampus (G-I), and the hypothalamus (M-O). Neuraminidase injection resulted in morphological changes of microglial cells in the septofimbrial nucleus (D-F), the hippocampus (J-L) and the hypothalamus (P-R). Only 2 h after neuraminidase (NA) injection, cells in the septofimbrial nucleus showed a larger soma (D), and thicker primary branches after 12 h (F) compared to the pairwise sham samples (A-C). In basal conditions microglia located in the hippocampus (G-I) exhibited a higher degree of ramification compared to cells in other areas (A-C, M-O). These profuse ramifications appeared slightly decreased 2 h after NA injection (J), and clearly reduced 4 h (K) and 12 h (L) later. Microglia in the hypothalamus presented a different shape to that located in the hippocampus or septofimbria, with low homogeneity, a large soma and thick branches that could be observed in samples from saline treated rats (M-O). A significant drop in branch length was observed 4 h (Q) and 12 h (R) after NA injection. LV = lateral ventricle; CA3 = field CA3 of the hippocampus; 3V = third ventricle.

Bushy microglia, with short and poorly ramified processes of different thickness around swollen cell bodies, were found in several locations of NA treated samples (Fig. R-1 F, Q, R). Occasionally, some cells showed a highly heterogeneous form (Fig. R-1 E).

5.1.2. IL-1 β expression evidences an acute neuroinflammatory reaction provoked by NA in periventricular areas

Upon appropriate stimulation, resident microglia and macrophages infiltrated from systemic circulation become polarized towards a pro-inflammatory M1 phenotype, which is characterized by the synthesis of cytokines such as IL-1 β (Orihuela et al., 2016).

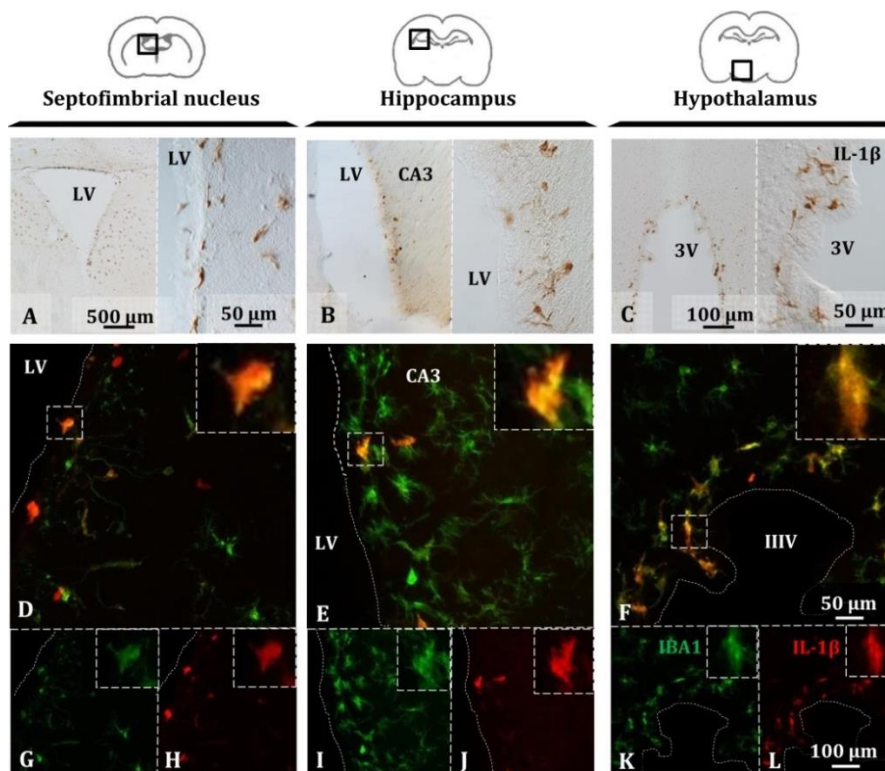


Figure R-2. Neuraminidase induces IL-1 β expression in microglial cells. (A-C) Brain sections of rats sacrificed 12 h after NA injection were immunostained for IL-1 β . Positive cells appeared near the ventricle in all the areas studied, indicating an inflammatory reaction. (D-L) Parallel sections from the septofimbrial nucleus (D, G, H), hippocampus (E, I, J) and hypothalamus (F, K, L) were double-labeled by immunofluorescence with IBA1 (green) and IL-1 β (red) antibodies. Some cells show label with both makers, while many others do not express IL-1 β . Samples from saline injected animals did not display IL-1 β staining (data not shown). Dashed lines indicate the ventricular surface. LV = lateral ventricle; CA3 = field CA3 of the hippocampus; IIIIV = third ventricle.

In NA injected animals, immunohistochemistry revealed IL-1 β positive cells in the periventricular areas of the septofimbrial nucleus (Fig. R-2 A), the CA3 of hippocampus (Fig. R-2 B), and the hypothalamus (Fig. R-2 C) 12 h after the injection. In some NA treated animals, IL-1 β labelling was detectable even at shorter post-injection times (2-4 hours), and no label at all was observed in saline injected animals (data no shown). Thus, in this model NA could be considered to produce a sterile inflammatory reaction that drives microglia towards a pro-inflammatory phenotype.

Double immunofluorescence showed a broad colocation of IL-1 β in IBA1 positive cells in all the studied areas: the septofimbrial nucleus (Fig. R-2 D), the hippocampus (Fig. R-2 E) and the hypothalamus (Fig. R-2 F). However, many IBA1 positive cells did not display IL-1 β staining (Fig. R-2 D-F). IL-1 β positive cells were mostly located nearby the ventricular surface (cells for this study were sampled within 100 μ m from the ventricle).

5.1.3. Five quantitative morphological parameters of microglia were statistically different in cells from NA treated animals compared to saline controls

Morphological analysis of a total of 480 microglial cells was performed by measuring five different parameters. *Fractal dimension (D)*, determined by the box counting method, showed a statistically significant decrease ($P < 0.001$) in NA treated samples with respect to saline ones in the three areas studied (Fig. R-3 A-C), which was more pronounced in the septofimbrial nucleus 12 h after NA administration (Fig. R-3 A). This reduction in D values indicate a lower pattern complexity (Karperien et al., 2013), that is, less branch complexity of microglial cells after NA treatment. In saline controls, D values about 1.40-1.45 were obtained in the hippocampus (Fig. R-3 B), while those values ranged 1.30-1.35 in the septofimbrial nucleus (Fig. R-3 A) and the hypothalamus (Fig. R-3 C). Those differences in D values in basal conditions indicate heterogeneity of microglial populations between different brain areas.

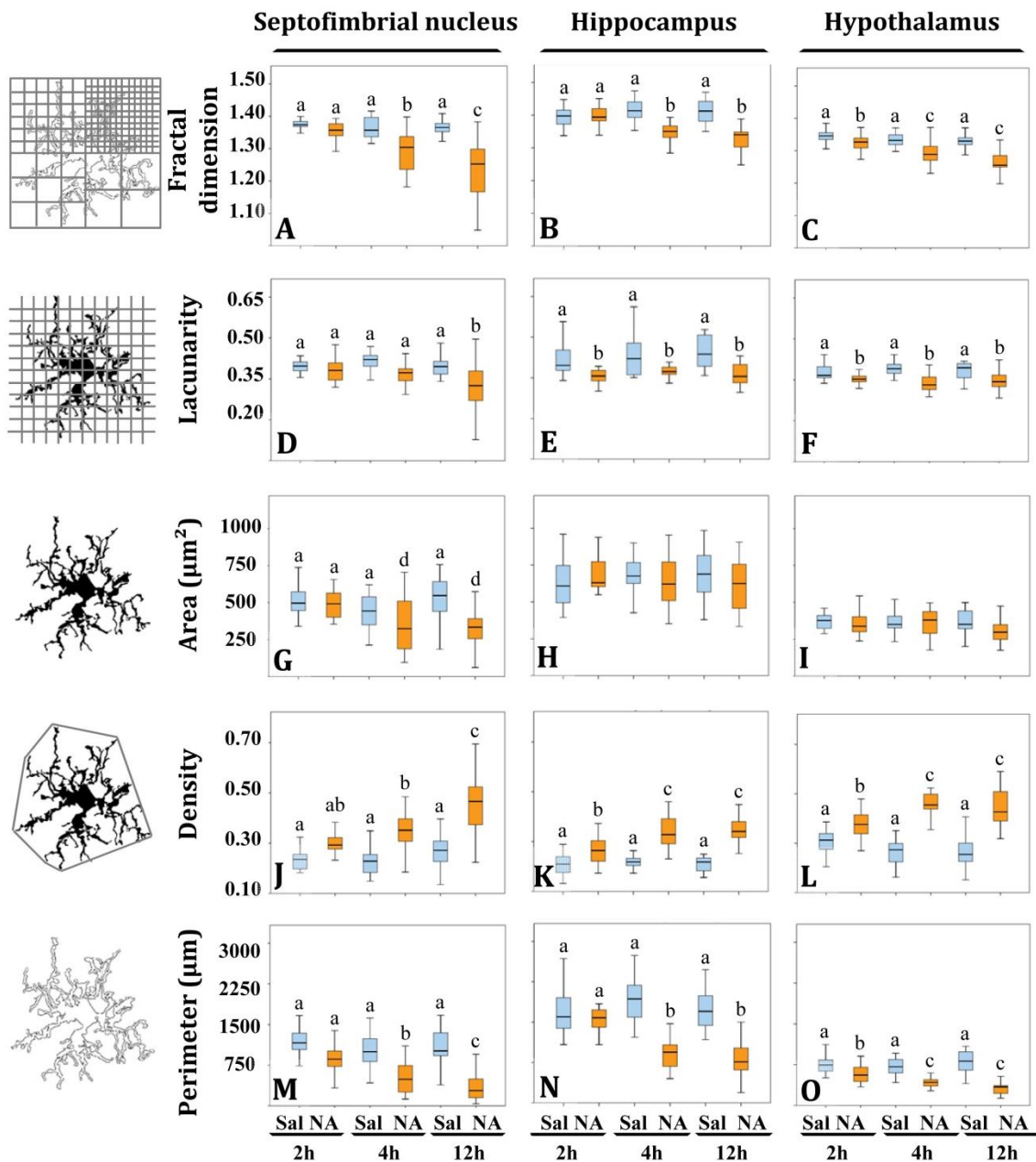


Figure R-3. The morphological parameters fractal dimension, lacunarity, cell area, density, and cell perimeter reveal microglial activation after NA treatment. A morphological analysis of microglia from different brain areas was carried out in samples from NA treated and sham rats. Twelve hours after NA injection, all parameters changed significantly compared to saline injected animals, in the three selected areas: the septofimbrial nucleus, the hippocampus and the hypothalamus. However, the parameter area did not change in microglia from hippocampus (**H**) and the hypothalamus (**I**), even though the rest of parameters revealed microglial activation in those regions. Activation of microglia was evidenced by lower fractal dimension (**A-C**) and lacunarity (**D-F**), indicating decreased branch complexity and heterogeneity respectively, a higher density (**J-L**), what implies a more compact shape, and a lower cell perimeter (**M-O**). Pair comparisons results are shown with letters on top of each bar of the histograms. Within each graph, the same letter means no significant difference between the groups, while different letters indicate a statistically significant difference. If no letter appears on top of a bar, no differences exist between any group (**H** and **I**). In **A-F** and **J-O**: a, b, c = $P < 0.001$. In **G**: a, d = $P < 0.05$.

In the case of the parameter *lacunarity* (Λ), a statistically significant decline ($P < 0.001$) was also observed after the administration of NA (Fig. R-3 D-F), with values ranging from 0.41-0.44 in saline samples and 0.31-0.37 in NA treated ones. The decrease was evident as soon as 2 h after the injection in hippocampus (Fig. R-3 E) and hypothalamus (Fig. R-3 F). Since Λ assess heterogeneity or translational and rotational invariance in an image, lower Λ values imply homogeneity (Karperien et al., 2011), i.e. under the influence of NA microglial cells change towards a more homogenous shape.

The parameter *area* was clearly different in microglial cells from different brain regions (compare Fig. R-3 H with R-3 I), again was indicating various microglial populations. However this parameter did not change in hippocampus (Fig. R-3 H) nor in hypothalamus (Fig. R-3 I) upon NA treatment. Conversely, in the septofimbrial nucleus (Fig. R-3 G) NA provoked a significant decrease ($P < 0.05$) in microglia *area* 4 h after injection ($505 \pm 70 \mu\text{m}^2$ in saline vs $350 \pm 70 \mu\text{m}^2$ in NA).

When *density* was analysed, values of this parameter were significantly increased ($P < 0.001$) in all the areas studied when NA was administered, and such increase was evident as early as 2 h post-injection of NA (Fig. R-3 J-L). *Density* values doubled in microglial cells in hippocampus (Fig. R-3 K), hypothalamus (Fig. R-3 L), and septofimbrial nucleus (Fig. R-3 J), with values ranging from 0.21 ± 0.01 in saline microglia in hippocampus, up to 0.46 ± 0.02 in NA microglia in hypothalamus. The increase in *density* shows the tendency of the cells to be more compact after NA injection.

Finally, the *perimeter* of the cells was analysed as well; it decreased significantly ($P < 0.001$) in the three areas studied when NA was injected (Fig. R-3 M-O). As occurred with *density* and *area*, *perimeter* values were different in basal conditions between the studied areas, the hippocampus presenting the highest values ($1770 \pm 112 \mu\text{m}$; Fig. R-3 N), and the hypothalamus the lowest ($330 \pm 60 \mu\text{m}$; Fig. R-3 O). A decrease in cell *perimeter* is indicative of fewer ramifications.

Pair comparisons of the microglia from different experimental groups within each region studied indicated that three different morphotypes could be distinguished, particularly when *D*, *density* and *perimeter* values are compared (letters *a*, *b* and *c* in each graph of Fig. R-3). Neither *area* nor *lacunarity* were sensitive enough to distinguish these three morphotypes (Fig. R-3 G-I).

We next searched for a more comprehensive method to classify our microglia population, regardless the brain region or the experimental treatment.

5.1.4. Hierarchical cluster analysis allows the identification of four types of microglial cells based on morphological parameters

The choice of suitable variables is critical in determining the outcome of hierarchical cluster analysis (HCA). At the first stage of this study, we considered the five parameters explained above, and examined the multimodality index (MMI) of those parameters. The MMI gives an idea of the distribution of the data around one or multiple values of the parameter. Thus, parameters with $MMI > 0.55$ are multimodal and therefore suitable to perform cluster analysis (Schweitzer and Renhan, 1997).

Among the previously analysed parameters, only *cell perimeter* had a MMI greater than 0.55, and the other four had MMI lower than 0.55, so we proceeded to quantify new parameters (up to 15 parameters; Tables R-1, R-2 and R-3 at the end of Results, pages 161-163) and calculate their MMI (Table R-4).

Based on their MMI, the following four morphometric parameters were selected for the cluster analysis: *cell circularity*, *convex hull area*, *cell perimeter* and *convex hull span ratio*.

The HCA performed on z-transformed data sets yielded a dendrogram based on the Euclidean distance between groups, using the Ward's method (Fig. R-4 A).

The Thorndike's procedure (Thorndike, 1953) was applied to establish the appropriate number of clusters (Fig. R-4 B). This method uses the representation of linkage distance versus linkage steps (or number of clusters); a sudden decrease in linkage distance occurs at a certain number of clusters, which is evidenced by a marked flattening of the curve.

In our case, this happens when the number of linkage steps is four (dashed line in Fig. R-4 B). Microglial cells were thus classified into four clusters (Fig. R-4 A).

Table R-4: Multimodality index (MMI) of morphometric parameters

Parameter	MMI
<i>Cell circularity</i>	0.669*
<i>Convex hull area</i>	0.577*
<i>Cell perimeter</i>	0.567*
<i>Convex hull span ratio</i>	0.558*
<i>Convex hull circularity</i>	0.546
<i>Max/Min convex hull radii</i>	0.479
<i>Roughness</i>	0.450
<i>Convex hull perimeter</i>	0.439
<i>Density</i>	0.429
<i>Convex hull mean radii</i>	0.429
<i>Cell area</i>	0.412
<i>Diameter of the bounding circle</i>	0.408
<i>Maximun span across the convex hull</i>	0.404
<i>Fractal dimension</i>	0.396
<i>Lacunarity</i>	0.393

* Selected parameters with MMI > 0.55

Moreover, the variance ratio criterion (VRC) values of k-clusters were also determined (Table R-5). The higher VRC values point out the most appropriate number of clusters; it appraises both the distance between different clusters, as well as the closeness of data within each of those clusters (Caliński and Harabasz, 1974). In our analysis the VRC value was highest in the case of 4 clusters (Table R-5), thus corroborating the previous cluster definition by the Thorndike procedure.

Clusters were numbered according to their size, from the largest to the smallest: Cluster 1, 2, 3 and 4.

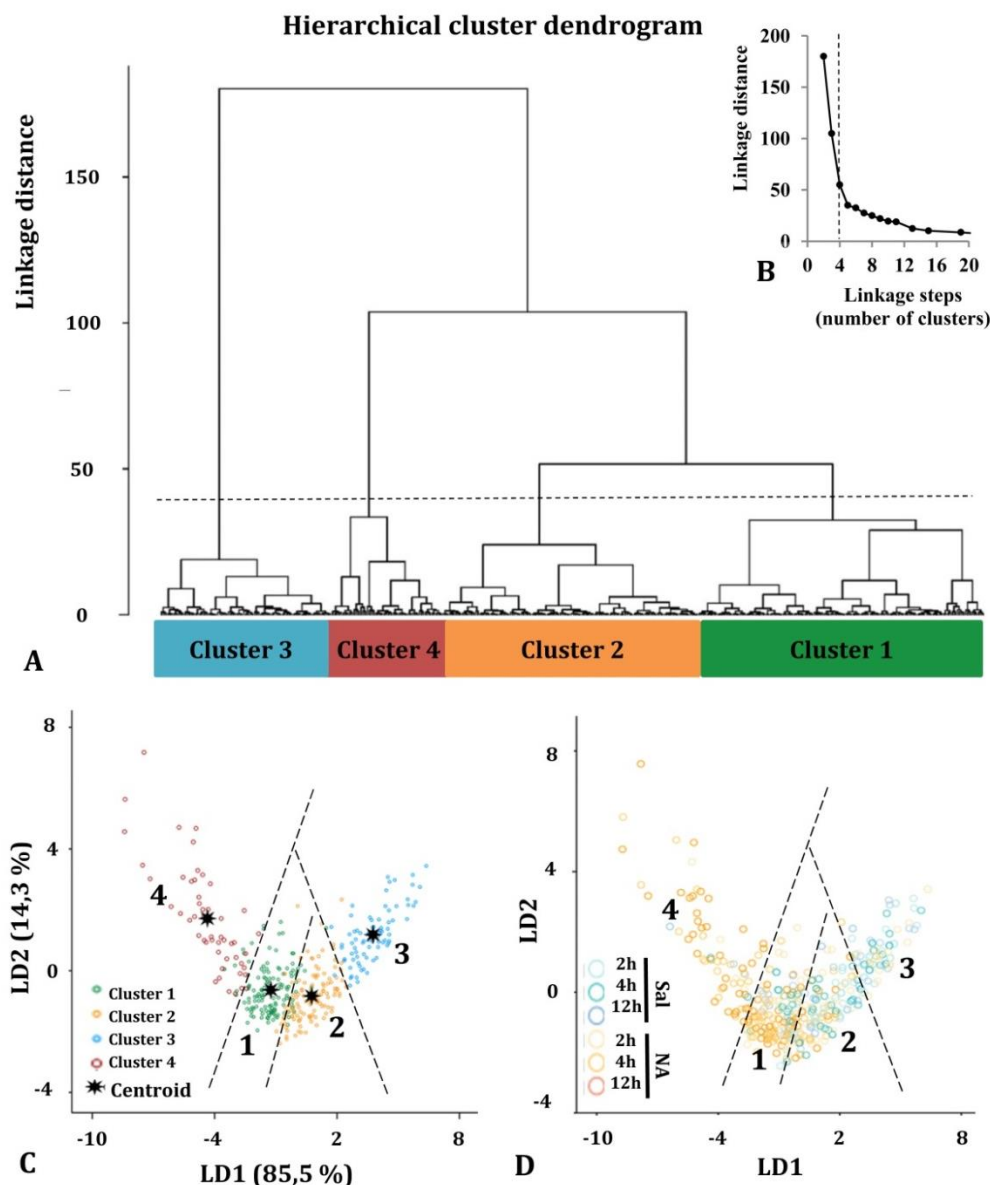


Figure R-4. Classification of microglia according to morphological parameters. (A) Hierarchical cluster analysis of microglial cells sampled from septofimbrial nucleus, hippocampus and hypothalamus of rats after the injection of NA or saline, based on four suitable parameters selected according to their multimodality index value. Dendrogram for 480 cells, where the abscissa represents individual microglia and the ordinate corresponds to the linkage distance measured by Euclidean distance. The dashed line denotes the cut off for four clusters, numbered 1 through 4, which were color coded green, orange, blue and dark red, respectively. (B) A plot of linkage distance versus linkage steps (or number of clusters) was performed following Thorndike's procedure. The vertical dashed line points out a marked decline in the slope, which indicates that 4 is an appropriate number of clusters. (C, D) Territorial mapping of microglial cells on the plane explained by the first two linear discriminant functions (LD1 and LD2); the proportion of trace for each LD is shown in parenthesis. In the graph on the left (C) cells are color coded according to cluster allocation; the centroids represent the mean value of each cluster. In the graph on the right (D) the same cells are color coded based on saline/NA treatment.

Table R-5: Variance ratio criterion (VRC) following Calinski-Harabasz

Number of clusters	VRC
2	124.4
3	410.2
4	453.9*
5	347.3
6	410.1
7	451.2
8	446.6
9	124.4

* The highest VRC value indicates the appropriate number of clusters

5.1.5. Linear discriminant analysis revealed that convex hull span ratio, cell circularity and convex hull area are the critical parameters when sorting microglial cells

One of the goals of the linear discriminant analysis (LDA) is to predict the allocation of a particular microglial cell to one of the 4 established clusters. Therefore, first we analysed whether there were significant differences between clusters for each of the independent variables, using group means and ANOVA (Table R-6).

Table R-6: Parameters ANOVA used for LDA for clusters comparison.

Parameter	Wilks' s lambda	F	df1	df2	P
<i>Cell perimeter</i>	0.500	125.35	3	476	< 0.001
<i>Cell circularity</i>	0.477	137.51	3	476	< 0.001
<i>Convex hull area (μm)</i>	0.242	393.44	3	476	< 0.001
<i>Convex hull span ratio</i>	0.520	115.55	3	476	< 0.001

The differences were statistically significant for each variable, suggesting that these variables were good discriminators for microglia classified in the 4 different clusters.

Next, we searched for linear discriminant functions which could explain the variance, and also suggest the variables that are more relevant for discrimination, i.e. that have the highest predictive capacity. This search resulted in two functions: the linear discriminant function 1 (LD1), with a correlation of 0.929, explained 85.5% of variance, and the linear discriminant function 2 (LD2), with a correlation of 0.716, described 14.3% of variance (Table R-7). Thus, both functions together accumulated 99.7% of variance, and only a 0.03% remained unexplained. Moreover, Wilks's *lambda* and chi-squared pointed out significant differences between the means of the compared groups (Wilks's *lambda* = 0.479; chi-squared = 275.9; df = 6; P < 0.001).

Table R-7: Coefficients of linear discriminant functions (LDs)

Main parameters	LD1	LD2
<i>Convex hull span ratio</i>	-0.68*	0.62
<i>Convex hull area</i>	0.68*	0.63
<i>Cell perimeter</i>	0.42	0.33
<i>Cell circularity</i>	-0.39	0.88**
Proportion of trace (%)	85.5	14.3

*, ** The highest absolute values indicate the best predictor parameters

The discriminant functions include coefficients for each variable, which are listed in Table R-7. The value of those coefficients indicates the partial contribution of each variable to the function, that is, the importance of each variable as predictor of cell sorting in the 4 clusters, with a higher absolute value indicating a better predictive variable.

In the current study the strongest predictors by means of the function LD1 were the *convex hull span ratio* and the *convex hull area*, because they present the highest coefficient values. Regarding the function LD2, the most relevant parameter was *cell circularity* (Table R-7). Besides, the cross validated classification by using LD1 and LD2 functions resulted in 87.9% of the cells correctly allocated in the corresponding cluster.

The discriminant scores of 480 microglial cells were determined for LD1 and LD2, and plotted in a territorial map using a colour code to identify each cluster (Fig. R-4 C). This type of graph shows how cells within each cluster are grouped around a centroid (the cluster mean).

This territorial map was used to see how microglia from NA treated (yellow-orange circles in Fig. R-4 D) and saline control animals (blue circles in Fig. R-4 D) are distributed. Interestingly, most microglia in the territory of Cluster 3 belong to saline controls or NA treated but at short post-injection times, and most cells in Cluster 4 come from NA treated animals. Cluster 1 includes mostly cells from NA treated rats, but also some from saline controls. Cluster 2 includes a mixture of cells from both experimental conditions.

This puzzling result could be explained by the following histogram distribution (Fig. R-5), where the percentage of cells in each cluster was plotted considering the brain area of origin, the saline/NA treatment and the time post-injection.

Thus, Cluster 4 clearly represents NA activated microglia in the three brain areas studied, but Cluster 4 cells are more abundant in the hypothalamus (Fig. R-5). Cluster 1 also includes mostly cells from NA treated animals, but some cells from saline controls are also allocated in this cluster, particularly those from the hypothalamus and the septofimbrial nucleus (Fig. R-5). Clusters 2 and 3 represent cells in saline controls or cells in NA treated rats but at short post-injection times (i.e. not yet activated), thus clarifying, at least partially, the apparent mixture of phenotypes within these clusters.

The histogram shows additional information; for example, resting microglial cells residing in the hippocampus belong mainly to the Cluster 2 (while this phenotype is scarce in the hypothalamus), and the activated phenotypes in this area are distributed between Clusters 3, 4, and preferentially Cluster 1.

A further analysis was performed to refine this classification (see next section).

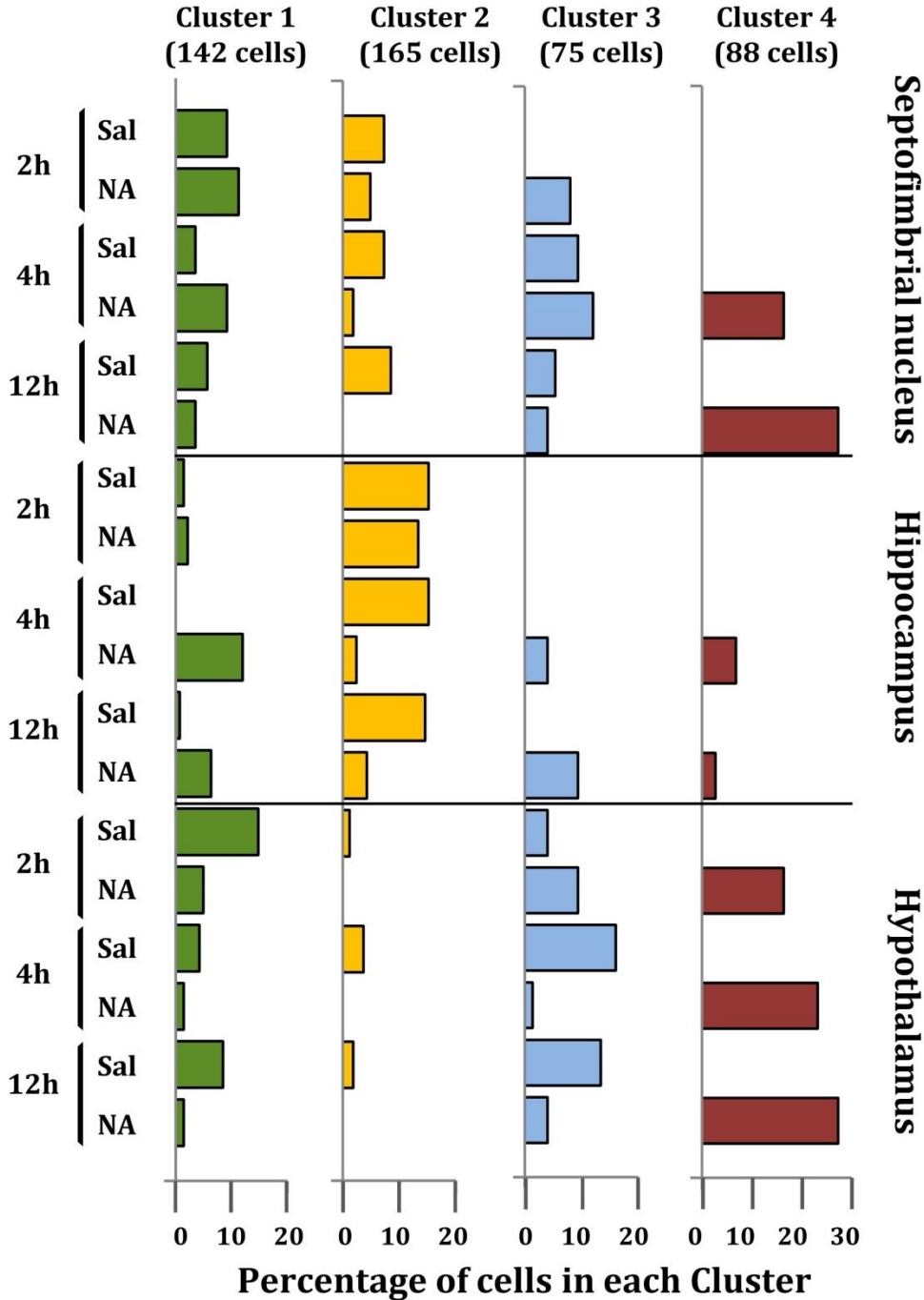


Figure R-5. Distribution of microglial cell Clusters in different brain areas. The percentage of microglial cells belonging to the different clusters was plotted considering their brain location, saline/NA treatment, and post-injection time. Cluster 1 cells (green bars) slightly decreased after NA injection in the hypothalamus; however in the hippocampus they appeared after NA injection. Cluster 2 cells (yellow bars) were mainly present in saline samples of all brain areas, so they probably represent a surveillant morphotype. Cluster 3 cells (blue bars) were scarce compared to other clusters, and distributed in saline and NA samples. As occurred with Cluster 1, a correlation of Cluster 3 cells with a particular functional state is not easy to establish. Finally, Cluster 4 cells (dark red bars) were exclusively present in NA injected animals; therefore corresponded to activated microglia.

5.1.6. Principal components analysis revealed that *maximum span across the convex hull* and *convex hull circularity* are supplementary features that aid microglia classification

The eleven morphometric parameters describing microglial shape obtained previously were subjected to principal components analysis (PCA). As a result, the first two principal components (PC) accounted for 79.4% of the observed variability (PC1 = 62.3%, PC2 = 17.1%; Fig. R-6 A; Table R-8).

Table R-8: Coefficients of principal components analysis (PCs)

Principal components	PC1	PC2
<i>Convex hull perimeter</i>	0.97*	
<i>Convex hull mean radii</i>	0.95*	
<i>Diameter of the bounding circle</i>	0.91*	0.37
<i>Maximun span across the convex hull</i>	0.90*	0.38
<i>Roughness</i>	0.89	
<i>Fractal dimension</i>	0.86	
<i>Cell area</i>	0.85	
<i>Density</i>	-0.72	
<i>Convex hull circularity</i>	0.50	-0.80**
<i>Lacunarity</i>	0.48	
<i>Max/Min convex hull radii</i>	-0.44	0.78
Proportion of trace (%)	62.3	17.1

*,**The highest absolute values indicate the parameters with greater influence

In this analysis, some of the fifteen parameters can be discarded, because they overlap with others in the same component, PC1 or PC2. Only those parameters with the strongest correlation with each component (i.e. with the highest coefficient values) should be considered (Table R-8).

Thus, PC1 was highly affected by *convex hull perimeter* or *maximun span across the convex hull*, while PC2 was mainly influenced by *convex hull circularity* or *max/min convex hull radii*.

Since the present analysis intended to further classify microglial cells, those parameters with high PC coefficients were chosen. Thus, *maximum span across the convex hull* was pondered as the main parameter of PC1, and *convex hull circularity* for PC2. These parameters were selected based on their potency as discriminators, which was also evaluated by pair comparisons within each of the 4 Clusters.

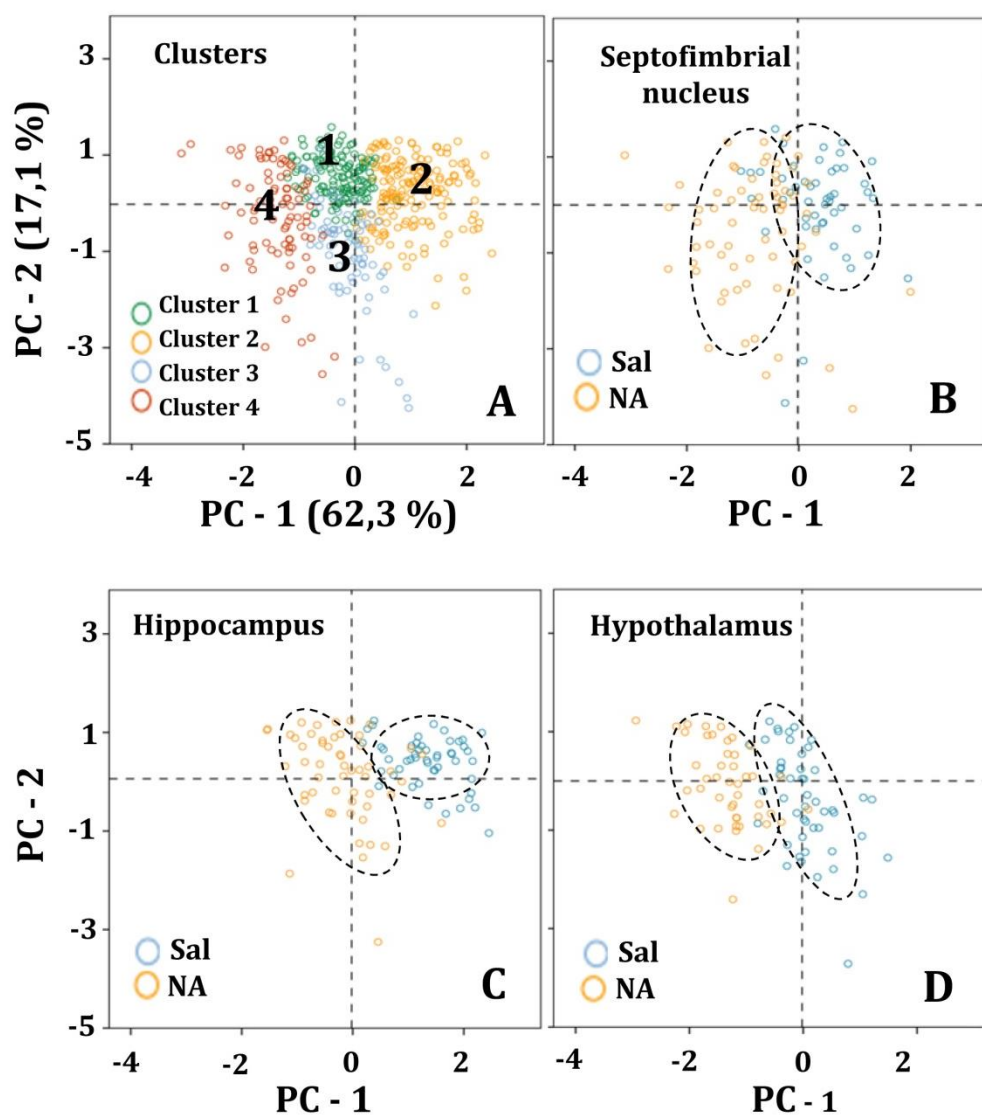


Figure R-6. Distribution of microglial cells on the principal components plane. (A) Distribution of microglial cells on the principal components plane with projections of the main variables (PC1 and PC2) from coordinates origin, and the percentage of total variance explained by each component. Each cell was color coded according to its Cluster allocation. Cells belonging to the same cluster appear grouped on the component plane. (B-D) The same distribution was plotted for each of the studied areas, and using a color code to indicate saline (blue) or NA (yellow) treatment. Dashed elliptical lines were drawn to highlight the region of the plane occupied by each type of cells.

To compare hierarchical cluster results obtained previously with PC analysis outcome, microglia scores were distributed on the PC plane (Fig. R-6).

Cells were categorized by colours according to their cluster allocation (Fig. R-6 A). Such graph showed that cells belonging to different clusters were grouped in the same region of the PC plane. Thus, the PCA results validate the four cluster partition obtained by HCA. In this way, the PC plane revealed the possibility of separating Cluster 2 and Cluster 4 by the PC2; microglia included in Cluster 2 would present high branch complexity in contrast to cells in Cluster 4, which would exhibit simpler ramifications. On the other hand, PC1 could be used to separate Cluster 1, which would include cells with a more circular shape, from Cluster 3, mostly containing polarized cells (Fig. R-6 A).

The distribution of cells in the PC plane allows going one step further, since some clusters can be broken down by the coordinate axis. Thus, the values obtained from the main PC parameters were useful to split each of the four clusters into sub-clusters (here called Types; Fig. R-7 B).

In this way, Clusters 1 and 3 were subdivided by considering the parameter *maximum span across the convex hull* (selected as major component of PC1 based on its high coefficient value), and Clusters 2 and 4 were further divided by using the parameter *convex hull circularity* (selected as a main parameter of PC2). To find out if the pairwise fragmented Types were actually different, the statistical comparison of the means of the discerning parameter was performed.

The results showed significant differences ($P < 0.001$) in the parameter *maximum span across the convex hull* (MSACH, Fig. R-7 B) between the two new morphotypes (Type 1.1 and Type 1.2) obtained from Cluster 1, as well as between those obtained from Cluster 3 (Type 3.1 and Type 3.2). Similarly, the two new microglial morphotypes obtained according to the parameter *convex hull circularity* (CHC, Fig. R-7 B) from Cluster 2 (Types 2.1 and 2.2) and from Cluster 4 (Types 4.1 and 4.2) were also statistically different ($P < 0.001$).

Morphometric microglia values

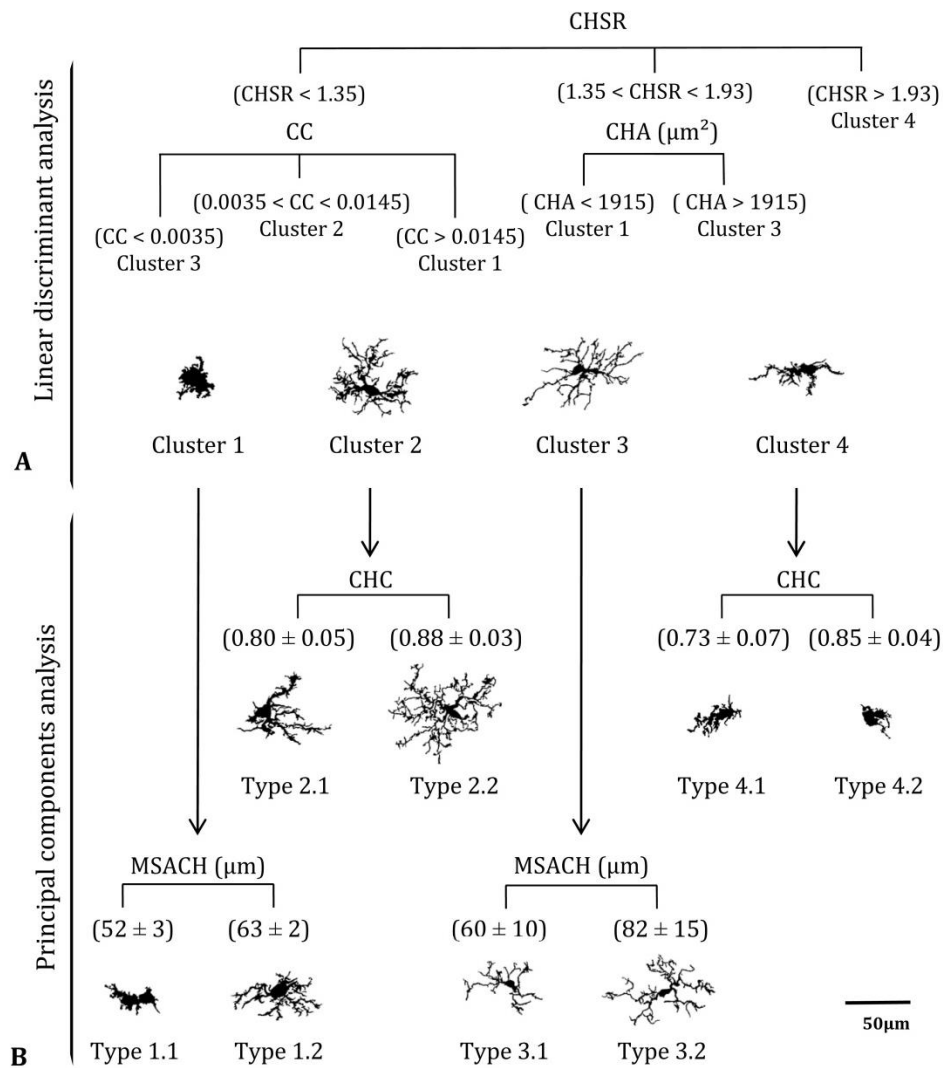


Figure R-7. Categorization of microglial cells by means of a logical decision tree based on morphological parameters. (A) With the aim of assigning cells into one of the four proposed clusters a logical decision tree was designed based on the strongest predictor parameters revealed by the linear discriminant analysis. For each individual microglial cell, the first parameter to be analyzed would be the *convex hull span ratio* (CHSR). Cells with a value greater than 1.93 could be assigned to Cluster 4, while those with lower values would be then evaluated by its *cell circularity* (CC) or its *convex hull area* (CHA). These two parameters would allow to allocate cells to Clusters 1, 2 and 3, according to the parameter values indicated in (A). (B) Principal components analysis suggested a further microglia classification with a descriptive categorization. In this case cells within the different clusters were classified based on values respect to the plot axis in the PC plane. The main parameter of PC-1, *maximum span across the convex hull* (MSACH), allowed to split Clusters 1 and 3, resulting in Types 1.1 and 1.3, and Types 3.1 and 3.2 respectively. In both cases, the resulting Types were significantly different according to their MSACH values ($P < 0.001$). The main parameter of PC-2, *convex hull circularity* (CHC), was used to split Clusters 2 and 4 in Types 2.1 and 2.2 and Types 4.1 and 4.2 respectively. Differences in CHC between these Types were significant ($P < 0.001$). Cells are all in the same scale (scale bar: 50 μm).

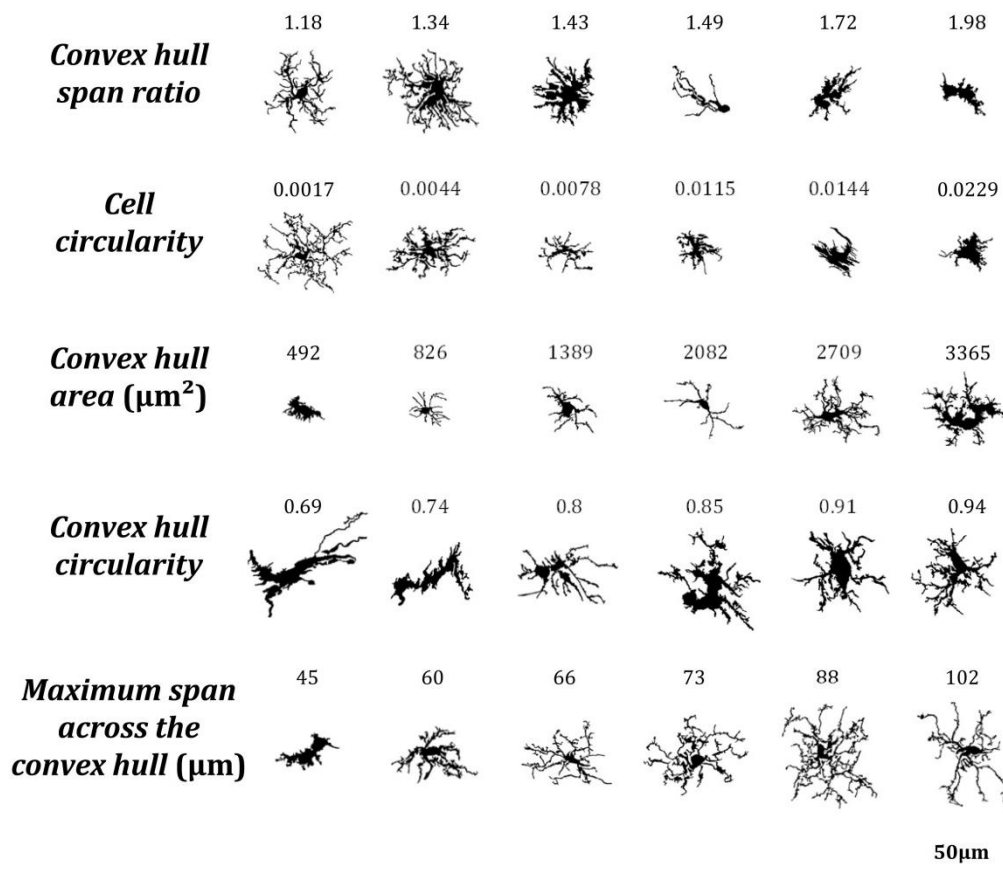


Figure R-8. Different microglia filled shapes and their corresponding parameters values. Values of the strongest predictor parameters of linear discriminant analysis and principal components analysis, corresponding to a survey of microglial cells from different brain areas and saline/NA treatments. Parameters values are at the top of each cell. Cells are shown in the same scale (scale bar: 50 μm).

The classification of microglia by linear discriminant analysis (LDA) was connected to the cell classification performed by principal components analysis (PCA), resulting in a tree (Fig. R-7), where the top panel corresponds to the LDA and has a predictive capacity, and the bottom panel corresponds to the PCA, which is not predictive. In this way, cells were first allotted to 4 Clusters according to three parameters (*convex hull span ratio*, CHSR, *cell circularity*, CC, and *convex hull area*, CHA; Fig. R-7 top), and later subdivided in 8 Types based in two additional parameters (CHC and MSACH; Fig. R-7 bottom).

The range of values of each of the 5 parameters considered for the decision tree was quite ample, and therefore cells with rather different morphological features may be included (Fig. R-8).

To find out if the four Clusters and the defined eight Types of microglia were related to their different activation states, the scores of microglial cells obtained by PCA were scattered on the PC plane, considering the saline/NA treatment, and the brain area sampled: the septofimbrial nucleus (Fig. R-6 B), the hippocampus (Fig. R-6 C), and the hypothalamus (Fig. R-6 D). In each brain area, cells from saline or NA treatments were grouped in the same region of the plane (dashed ovals in Fig. R-6 B-D).

However, these regions did not completely overlap when comparing different brain areas (compare saline in hippocampus Fig. R-6 C, with saline in hypothalamus Fig. R-6 D), suggesting that microglial cells residing in those areas are morphologically distinct, and therefore would be classified as different Clusters or Types. Furthermore, the resting morphology of cells in hypothalamus (blue circles in Fig. R-6 D) widely overlaps with NA activated cells in hippocampus (orange circles in Fig. R-6 C), indicating that the resting versus activated morphology is dependent on the brain area.

As a result of the decision tree, a new histogram was obtained, presenting the percentage of cells of each Type within each brain region (Fig. R-9).

For simplification, only cells from 12 h post-injection samples were included. According to this histogram, Type 2.1 mostly represents surveillant microglia from septofimbria, while Type 2.2 represents surveillant microglia in hippocampus. This does not mean that these phenotypes are not present in other regions, but here we emphasize the most typical location of each Type.

This histogram also shows that Cluster 4, as well as the subtypes derived from it, include activated microglia. In this case, Type 4.1 and Type 4.2 are found both in septofimbria and in hypothalamus; while Type 4.1 is more abundant in septofimbria, Type 4.2 is more frequent in hypothalamus.

As previously exposed, Cluster 1 and Cluster 3 include a mixture of surveillant (saline) and activated (NA) phenotypes.

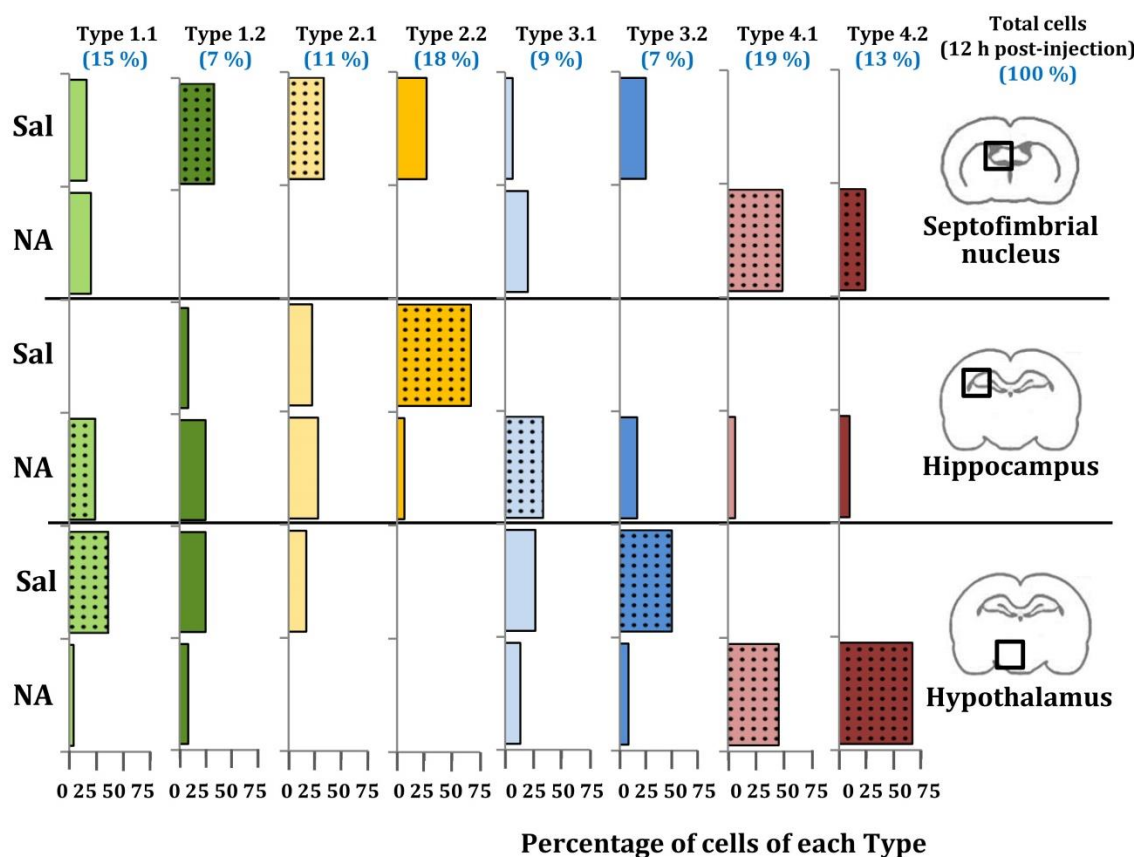


Figure R-9. Distribution of microglial cell Types in different brain areas. Microglial cells from 12 h post-injection animals were classified using the previously proposed decision tree. For each cell Type, the distribution (percentage) of cells in different brain areas (septofimbrial nucleus, hippocampus and hypothalamus) and treatments (saline/NA) was plotted as histogram. Color of bars indicates Cluster origin (same color code as Fig. 7), using light color for Type x.1 and dark for Type x.2. At the top in blue, the distribution (percentage) in Types of the total cells analyzed (about 150 cells) is indicated. Dotted bars indicate the most representative microglial Type for each brain region and treatment.

However, the histogram helps to clarify this issue. Type 1.1 is a surveillant phenotype in hypothalamus, but an activated phenotype in hippocampus, while Type 1.2 a surveillant phenotype in septofimbria. Therefore, the same Type (1.1) may represent different activation phenotypes depending on the brain region.

Similarly, Cluster 3 cells distribute between surveillant and activated cells; Type 3.1 represents an activated state in the hippocampus, while Type 3.2 represents a surveillant phenotype in hypothalamus.

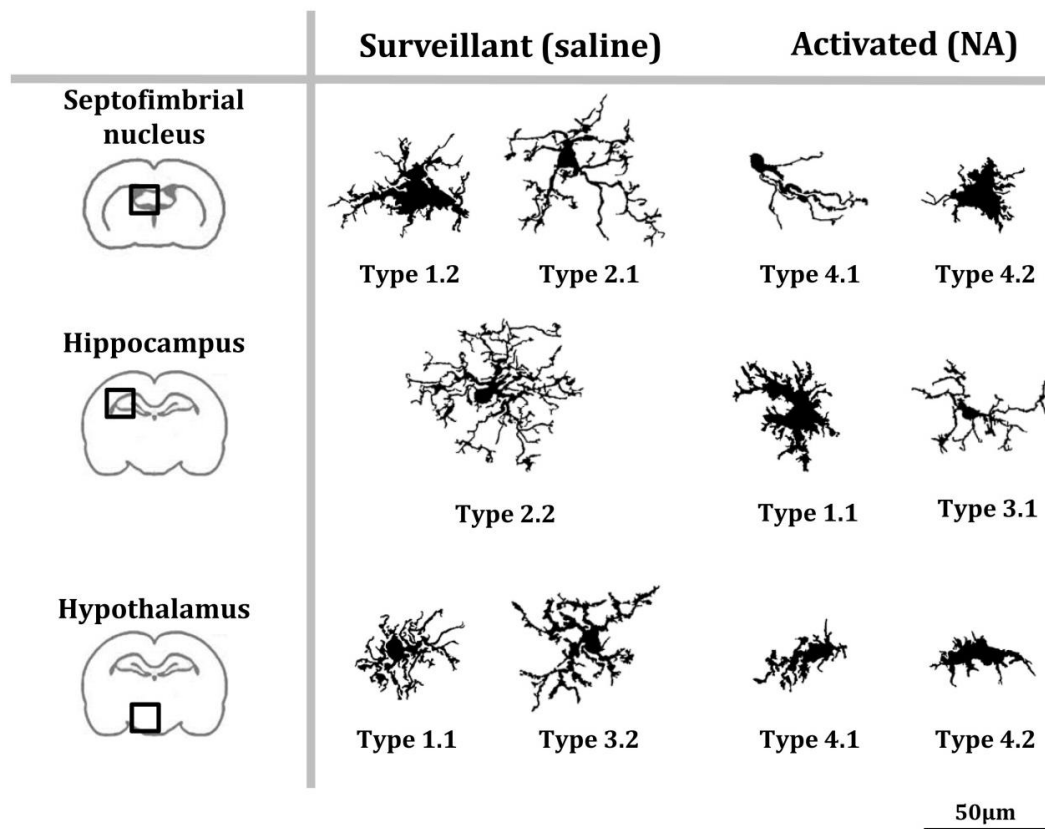


Figure R-10. A proposed model of the distribution of microglial morphotypes in the rat brain subjected to induced sterile inflammation. Surveillant microglia are represented by morphotypes of Cluster 1 (Types 1.1 and 1.2) and Cluster 2 (Types 2.1 and 2.2). An additional surveillant morphotype (Type 3.2) can be found in the hypothalamus. Type 2.2 is almost exclusive of the hippocampus, and is the main surveillant form found in this brain region. Upon activation by NA injection, the most representative morphotypes are Types 4.1 and 4.2 derived from Cluster 4, and Type 3.1. However, morphotypes derived from Cluster 1 can also be found in brains treated with NA (e.g. Type 1.1 in hippocampus). Therefore, some Types are clearly associated to surveillant (2.1, 2.2, 3.2) or activated (3.1, 4.1, 4.2) forms of microglia, while others (Type 1.1) can correspond to either state. For this reason, to define the activation status of a particular microglial cell its brain location must be taken into account. Cells are shown in the same scale (scale bar: 50 μm).

In this way, the distribution of microglial cells from each Type in the different brain areas and under different activation states is settled (Fig. R-10). However, as the histogram shows, this is evaluated in terms of abundance, as most Types are not exclusive of a region or treatment (saline/NA).

5.2. MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF NA-ACTIVATED MICROGLIAL CELLS CORRELATE WITH IL-1 β EXPRESSION LEVEL

We previously established that microglial cells can be classified according to their morphological parameters. These parameters resulted to be quite sensitive in order to discriminate subtle differences in the shape of microglial cells. Such shape differences are usually related to microglial activation. In this study we aimed to correlate selected morphological parameters with the level of IL-1 β expression, as this cytokine is the most representative hallmark of microglial M1 activation.

5.2.1. Different degrees of IL-1 β expression in the population microglial cells activated after NA administration

It is widely accepted that microglial cell polarization to the M1 state can be identified by IL-1 β expression (Orihuela et al., 2016) ICV administration of NA results in the activation of microglial cells located nearby the ventricular system, which is detected by IL-1 β expression.

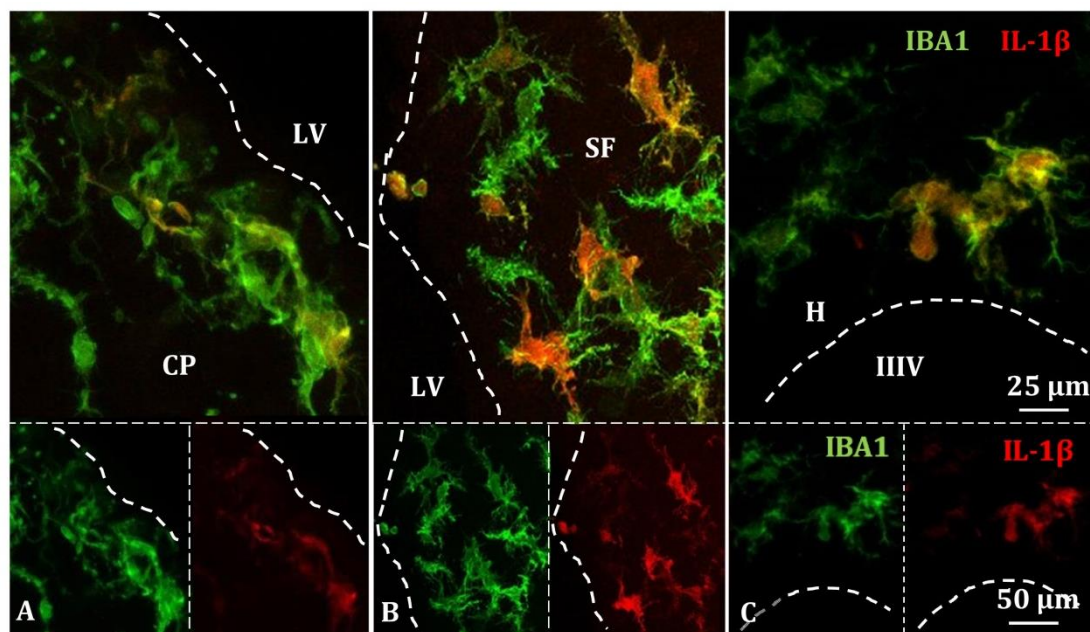


Figure R-11. IL-1 β staining highlights microglia activation in periventricular areas after NA injection. Double immunofluorescence showed a broad colocation of IL-1 β (red) in IBA1 (green) in caudate-putamen (A), septofimbrial nucleus (B) and hypothalamus (C) of NA injected animals 12 h after the injection. The diverse intensity of IL-1 β staining is manifest. CP = caudate-putamen, SF = septofimbrial nucleus, H = hypothalamus, LV = lateral ventricle, IIIIV = third ventricle. The dashed lines indicate the ventricular surface.

Double immunofluorescence showed a broad colocalization of IL-1 β in IBA1 positive cells in periventricular areas of caudate-putamen (Fig. R-11 A), septofimbrial nucleus (Fig. R-11 B), and also the hypothalamus (Fig. R-11 C) of NA injected animals 12 h after the injection. Since NA was injected within the right lateral ventricle, IL-1 β positive cells appeared first in microglia located close to this ventricle in caudate-putamen and septofimbrial nucleus (6 h post-injection; not shown). Later (12 h post-injection), IL-1 β positive microglia can be observed in the hypothalamus nearby the third ventricle, as NA is distributed to other brain areas by the rostro-caudal cerebrospinal fluid flow.

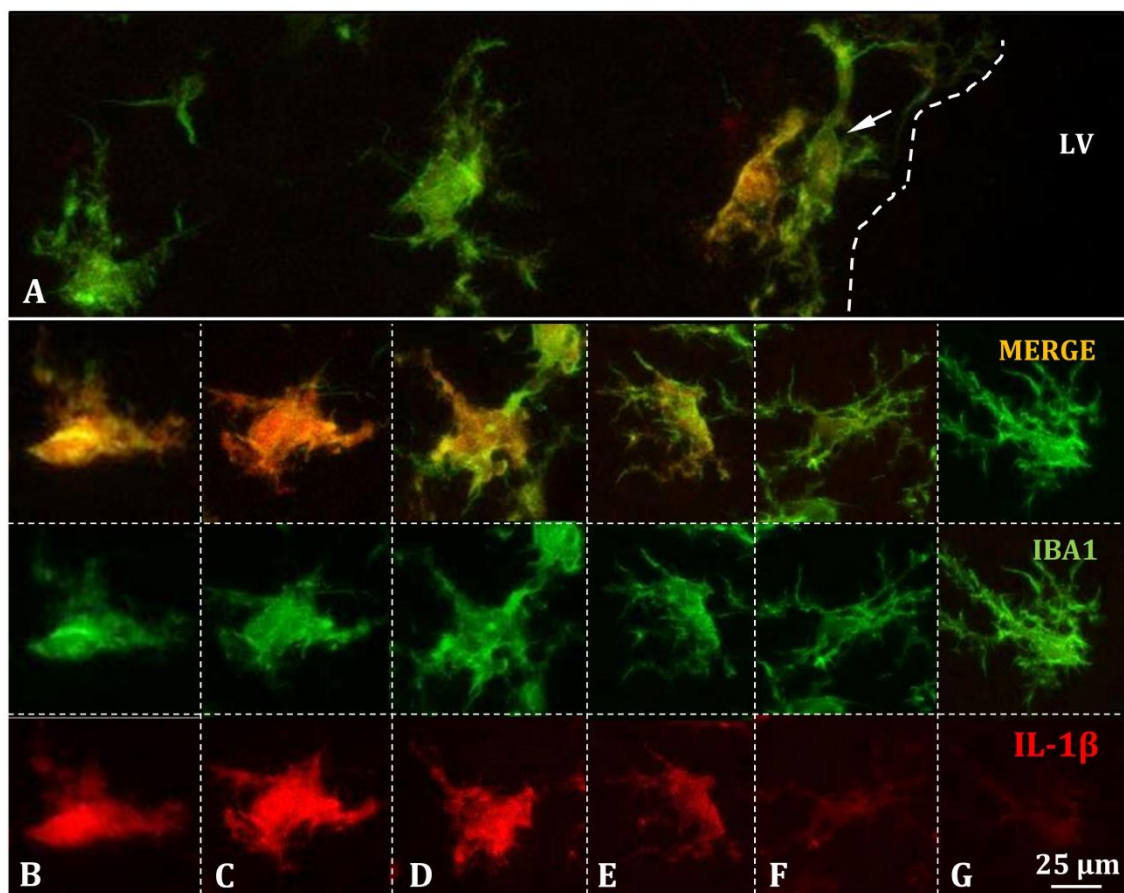


Figure R-12. IL-1 β level of expression among the microglial cell population is notably diverse. (A) Double fluorescence image of the septofimbria showing IBA1 positive (green) microglial cells nearby the ventricular surface. IL-1 β staining (red) in these cells is not equally intense. (B-G) Sampling of microglial cells with diverse levels of IL-1 β (red) expression, ranging from high (B, C), or medium (D, E) to low (F, G). Note that as IL-1 β staining decreases from B to G, arborization of cells (revealed by IBA1) increases. LV = lateral ventricle. The dashed line outlines the ventricular surface.

IL-1 β positive microglia were found up to about 100 μ m under the ventricular surface, and they remarkably presented variable degree of IL-1 β expression (Fig. R-12), ranging from quite high (Fig. R-12 B, C) and medium (Fig. R-12 D, E) to almost none (Fig. R-12 F, G). With a naked eye, microglia with lower IL-1 β expression bears more and longer ramifications (Fig. R-12 F, G). Moreover, cells with higher IL-1 β expression were usually located closer to the ventricle, although it was also possible to find some low-expressing IL-1 β cells next to the ventricle. (see arrow in Fig. R-12 A).

As proximity to the ventricle or subjective visual assessment of cell's shape are not reliable parameters to infer IL-1 β expression in microglial cells, we aimed to correlate objective morphometric parameters with IL-1 β expression level. To do so, microglial cells double-labelled with IBA1 (Fig. R-12, green) and IL-1 β (Fig. R-12, red) were randomly picked from the subventricular region of caudate-putamen, septofimbria and hypothalamus of rats injected with NA 12 h before.

5.2.2. Morphological measurements of microglia from NA treated rats present a broad variability

Microglial cells double labelled with IBA1 (green channel) and IL-1 β (red channel) were selected as previously explained (section 4.11); a total of 130 cells were picked in the periventricular region of caudate-putamen, septofimbrial nucleus, and hypothalamus. Images were acquired with a confocal microscope, and high resolution z-stack images were generated in order to include all ramifications of each cell. For each cell, the green channel (IBA1) image was processed to obtain filled and outlined shapes as previously described (Fig. M-3 and M-4; see Material and methods), which were then used to obtain the following morphometric parameters: *fractal dimension*, *lacunarity*, *area*, *perimeter*, and *density* (Fig. R-13). Morphological variability among microglial cells could be appreciated with the naked eye, which was also evident in the wide range of values of the parameters measured (Fig. R-13).

On the other hand, the image of the red channel (IL-1 β staining) was also binarized and used to obtain a number of red-pixels (Fig. M-3). The number of red-pixels

relative to the number of green-pixels (IBA1), resulted in a value that was considered as the expression of IL-1 β relative to IBA1, regardless the size or arborization of each particular cell.

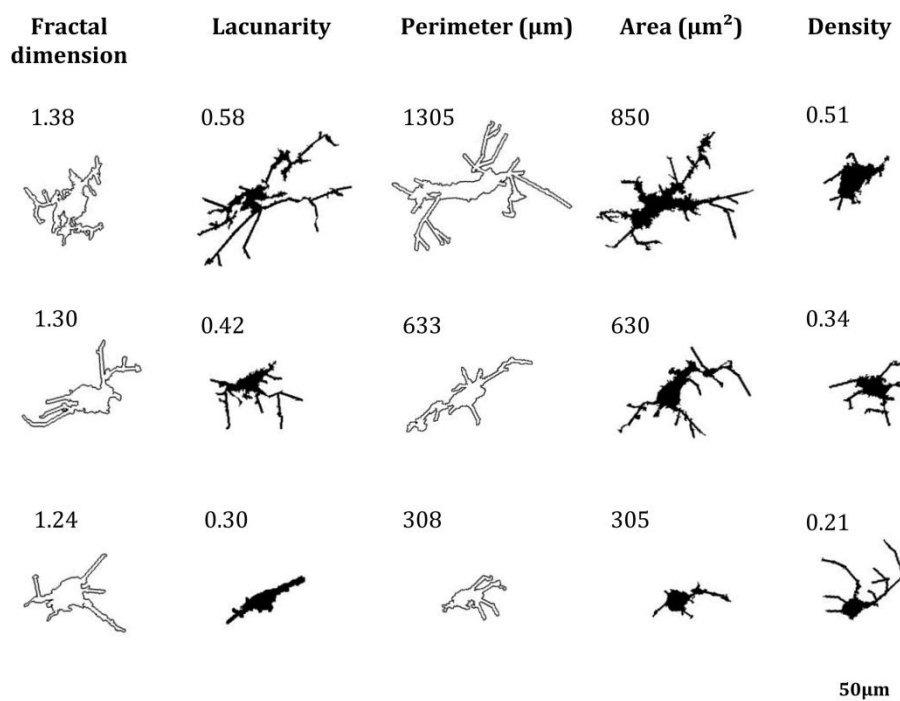


Figure R-13. Morphological variability of microglial cells and their corresponding parameters values. Values of fractal dimension, lacunarity, cell area, density, and cell perimeter of a survey of NA-activated microglia from different brain areas. As can be observed, activated microglia can adopt quite diverse forms. Parameters values are at the top of each cell. All shapes are at the same size scale.

Fractal dimension (D) was determined by the box counting method; data ranged 1.15-1.42 with a mean value of 1.30 ± 0.04 (Fig. R-14 A). These values correspond to different morphotypes (Fig. R-13), from de-ramifying, hypertrophied or bushy (higher values) to unramified or amoeboid (lower values), but never ramified or resting microglial cells (Karperien et al., 2013). The one-way ANOVA pointed out that there was no significant difference between cells from the three regions studied ($F = 0.41$; $df = 2, 126$; $P > 0.95$). Data of the parameter *lacunarity* (Λ) did not follow a normal distribution nor showed homoscedasticity. Therefore the non-parametric Kruskal-Wallis test was used; it revealed significant differences between cells in the different regions ($H = 11.67$; $P < 0.005$).

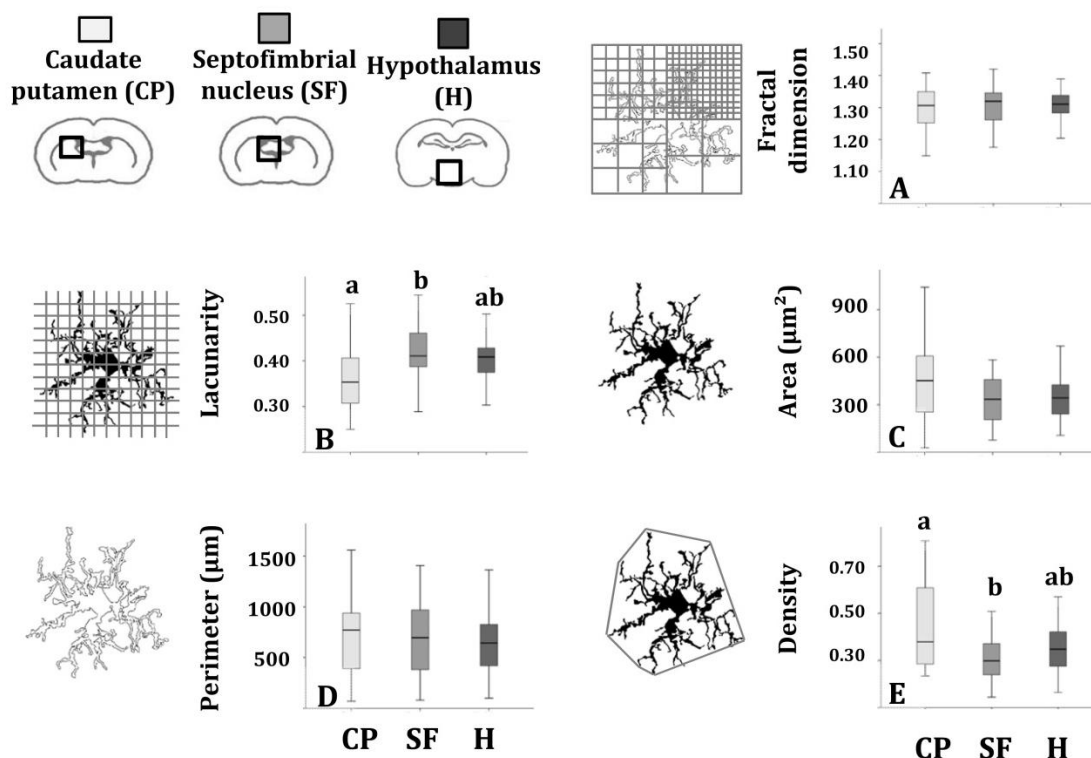


Figure R-14. Morphological parameters analysis of NA-activated microglia sampled from caudate-putamen, septofimbrial nucleus and hypothalamus. Cells from 12 h post-NA injection animals were sampled for their morphological analysis based on five parameters. A total of 23, 41 and 67 cells were sampled from caudate-putamen, septofimbrial nucleus and hypothalamus respectively. *Fractal dimension* (A), *area* (C) and *perimeter* (D) were similar in microglia from the three selected areas. However, nonparametric ANOVA by ranks revealed that, according to the parameters *lacunarity* (B) and *density* (E), the same cell populations appeared as different. More specifically, based on *lacunarity* and *density*, caudate-putamen and septofimbrial cell populations were different between them, while the hypothalamic population did not differ from those in the other two regions. Within each graph, the same letter means no significant difference between the groups, while different letters indicate a statistically significant difference ($P < 0.005$). If no letter appears on top of a bar, no differences exist between any groups.

The Mann-Whitney U test for pairwise comparisons revealed lower Λ values in caudate-putamen (0.37 ± 0.02) compared to Λ measured in septofimbrial cells (0.43 ± 0.02 ; Fig. R-14 B). Since lower Λ values imply homogeneity (Karperien et al., 2011), microglia from caudate-putamen are more homogeneous while those from the septofimbrial nucleus are more heterogeneous. Hypothalamic microglial cells were not different to those cells in other regions regarding Λ (0.41 ± 0.01).

As for Λ , the parameter *area* was analyzed by a non-parametric method. This parameter was similar in the three regions, with a mean value of $480 \pm 114 \mu\text{m}^2$ ($H = 4.22$; $P = 0.10$; Fig. R-14 C). Similarly, the mean *perimeter* of the cells from the

different regions was not significantly different, resulting in a mean value of $467 \pm 94 \mu\text{m}$ ($F = 0.45$; $df = 2, 129$; $P > 0.95$; Fig. R-14 D).

Finally, mean *density* of the cells from the three brain regions was analysed with the Kruskal-Wallis test. *Density* values between the regions studied were significantly different ($H=7.99$; $P < 0.05$; Fig. R-14 E). Mean *density* of microglia from caudate-putamen (0.44 ± 0.04) was higher ($P < 0.005$) than that of cells from septofimbria (0.33 ± 0.02). Higher *density* values indicate a more compact cell shape. Hypothalamic microglial cells did not show significant differences in *density* (0.36 ± 0.02) compared to cells in other regions.

Therefore, based on *lacunarity* and *density* values, NA-activated microglia in caudate-putamen seem to be different from those sampled in septofimbria. However, activated microglia in hypothalamus are indistinguishable from cells in caudate-putamen and septofimbria. In addition, the data obtained for cells sampled in the hypothalamus follow a normal distribution, which allows parametric analysis. Based on these facts, we considered hypothalamic microglial population as a good archetype for the following analysis.

5.2.3. Morphological parameters values correlate with the level of expression of IL-1 β in NA-activated hypothalamic microglia

We had previously verified significant differences in morphological parameters upon transition of microglia to the M1 activation state. We next pursued to investigate if morphological changes accompanying microglial activation are drastic or otherwise gradual, so that the gradual morphological change could then correlate to a progressive increase in IL-1 β expression. To demonstrate this, the simple linear regression analysis was performed using the five morphological parameters analysed above (Section 5.2.2). Only hypothalamic microglial cells were used for this analysis, as they were considered adequate archetypes, as explained above. The regression analysis illustrates how the value of a dependent variable varies when the value of an independent variable changes.

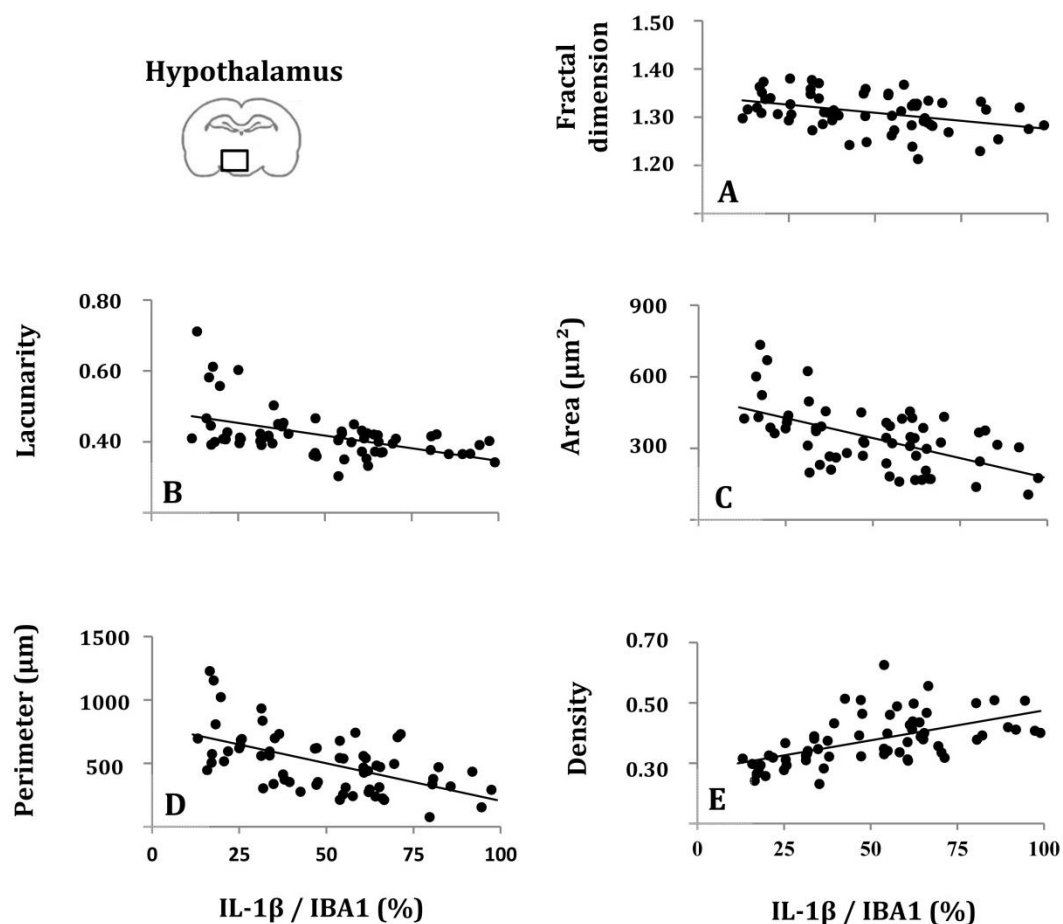


Figure R-15. Linear regression analysis between five different morphological parameters and IL-1 β expression in a population of NA-activated microglial cells from the hypothalamus. A total of 67 microglial cells were plotted in graphs of each morphological parameter versus IL-1 β expression (expressed as IL-1 β staining relative to IBA1 staining). The parameters fractal dimension (A), lacunarity (B), cell area (C), and cell perimeter (D) showed a negative dependence on IL-1 β expression, while the parameter density (E) had a positive dependence on the same independent variable. Regression analyses were significant for all parameters. Correlation coefficients were significantly strong for the straight-line relationship between each paired variables.

In this case, the independent variable is the level of IL-1 β expression by each individual microglial cell, expressed as IL-1 β positive pixels relative to IBA1 positive pixels. On the other hand, the quantitative morphometric parameters measured on the same microglial cell will be dependent variables. Thus, each microglial cell is described by a dataset of five morphological parameters and IL-1 β expression. So, the relationship between the degree of IL-1 β expression and each parameter was analysed by the pairwise dataset of each cell performed a simple linear regression for each parameter.

The functional dependence of each variable, i.e. *fractal dimension* (Fig. R-15 A), *lacunarity* (Fig. R-15 B), *area* (Fig. R-15 C), *perimeter* (Fig. R-15 D), and *density* (Fig. R-15 E), on IL-1 β expression was tested by analysis of variance computing the sum of squares of each linear regression, for a population of 71 microglial cells (Fig. R-15; Table R-9).

Table R-9. Regression and correlation coefficients of simple linear regression between degree of IL-1 β expression and the morphometric parameters in microglial cells from hypothalamic area

Parameter	Regression lines	Regression coefficients	Correlation coefficients		
		F	r	t	F
<i>Fractal dimension</i>	$Y_i = 1.34 - 0.0007X_i$	10.6*	0.39**	3.65**	2.29**
<i>Lacunarity</i>	$Y_i = 0.49 - 0.0014X_i$	20.5**	0.49**	4.91**	2.99**
<i>Perimeter</i>	$Y_i = 3410 - 22.43X_i$	28.8**	0.57**	5.88**	3.61**
<i>Area</i>	$Y_i = 1595 - 11.87X_i$	26.7**	0.56**	5.80**	3.56**
<i>Density</i>	$Y_i = 0.22 + 0.003X_i$	27.7**	0.56**	5.74**	3.52**

*, ** The highest absolute values indicate the parameters with greater influence

Regression coefficients ($F_{\alpha(2), 70, 70}$) of each function pointed out significant dependence ($P < 0.001$) of the dependent variable (morphometric parameters) on the independent variable (IL-1 β expression; Table R-9). The correlation coefficients ($r_{\alpha(2), 76}$; $t_{\alpha(2), 76}$), which measure the strength of the linear relationship between the two variables, showed significant correlations ($P < 0.001$) for each linear regression (Table R-9).

Regression analysis is widely used to make predictions. Given that the morphological parameters used here present a statistically significant dependence on IL-1 β expression, each of them could be considered a good predictor of the level of expression of IL-1 β expression. Also, these results indicate that microglial morphological change towards the M1 activation state is gradual and correlates to IL-1 β expression.

5.3. TOLL LIKE RECEPTOR 4 PLAYS A KEY ROLE IN NA-INDUCED ACTIVATION OF MICROGLIA

Toll-like receptors (TLRs) are a large family of membrane proteins which recognise conserved structural motifs found in microbes, the so called pathogen associated molecular patterns (PAMPs). They are sensitive sensors that serve as the first line of defence in the immune response.

Peptidoglycan for TLR2 and lipopolysaccharide (LPS) for TLR4 are known specific ligands which trigger intracellular signalling pathways, resulting in the expression of IL-1 β and TNF α (Kawai and Akira, 2006; Lehnardt, 2010). To date is unknown if TLRs are involved in the inflammatory process triggered by microbial NA. To investigate this, the NA neuroinflammation model employed here was used on TLR2 and TLR4 deficient mouse strains.

For this purpose, wild-type (WT), TLR2 knockout (TLR2^{-/-}), and TLR4 knockout (TLR4^{-/-}) mice were injected ICV with NA and were sacrificed 24 h later. Brain tissue was processed for: i) immunohistochemical labelling with inflammation markers (IBA1, IL-1 β , ICAM-1); ii) quantification of mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , and IL-6 by qPCR.

This study was performed in selected brain regions, namely the septofimbrial nucleus, which is close to the injection site and is particularly affected by the inflammatory process, and the hypothalamus, which although located farther from the injection site shows signs of inflammation. The caudate-putamen region was excluded because of an important haemorrhage in a considerable number of mice.

TLRs are widely distributed in different tissues and cells, and microglia express several isoforms of these receptors. To search the relevance of TLR signalling in microglial cells during NA induced inflammation, pure microglia cultures obtained from WT, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice were *in vitro* stimulated with NA.

5.3.1. Intracerebroventricular NA increases the number of IBA1-positive, IL-1 β -positive, and ICAM-1-positive cells, the first two in a TLR4 dependent manner

Wild-type, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice were ICV injected with NA, and sacrificed 24 h later. Brain sections were subjected to immunolabeling with selected markers: 1) IBA1, which specifically labels microglia and peripheral, perivascular and meningeal macrophages, and whose expression increases during the immunological activation of these cells; 2) IL-1 β , a pro-inflammatory cytokine expressed in activated microglia which indicates M1 polarization (Orihuela et al., 2016); and 3) ICAM-1, which is expressed by the endothelium, the epidermis and cells of the immune system, and is involved in the extravasation of leukocytes from the blood vessels.

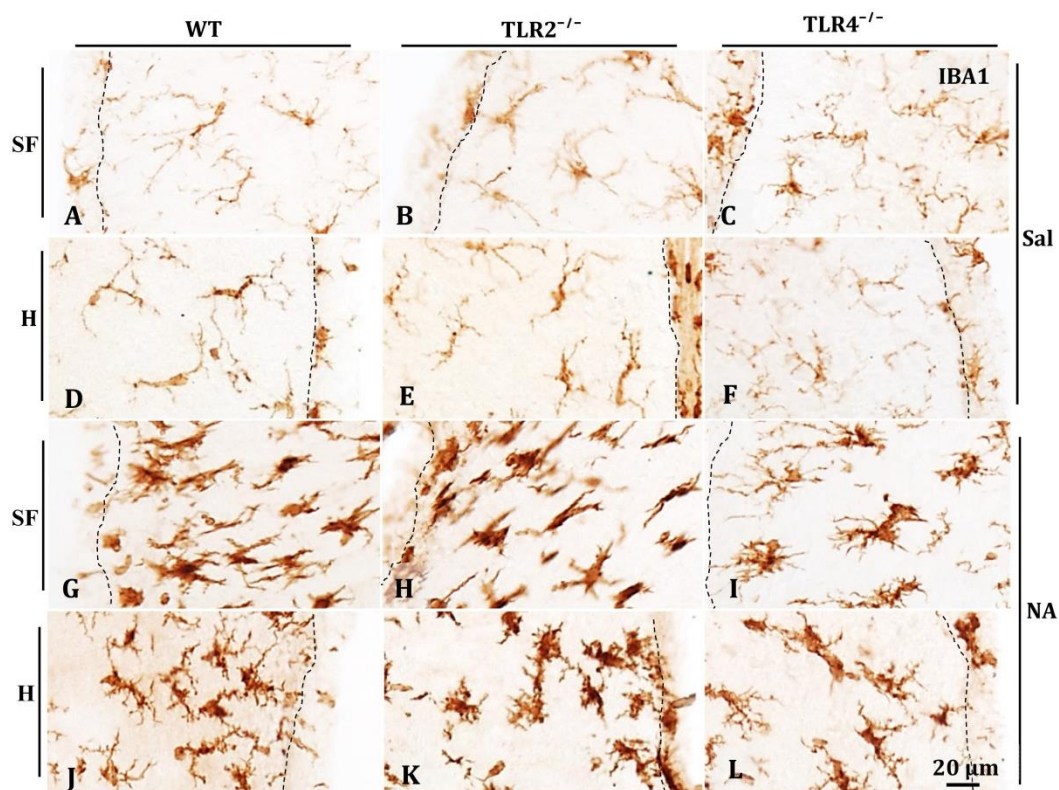


Figure R-16. IBA1 immunostaining increases during NA-induced neuroinflammation in TLR2 or TLR4 deficient mice. Images taken from the septofimbrial nucleus of WT (A, G), TLR2^{-/-} (B, H) and TLR4^{-/-} (C, I) mice, and from the hypothalamus of WT (D, J), TLR2^{-/-} (E, K) and TLR4^{-/-} (F, L) mice. Animals were sacrificed 24 h after saline/NA injection. Samples from animals injected with saline (A-F) exhibited a weaker IBA1 label compared to those treated with NA (G-L). Dashed lines indicate the ventricular surface. SF = septofimbrial nucleus; H = hypothalamus; Sal = saline treatment; NA = neuraminidase treatment.

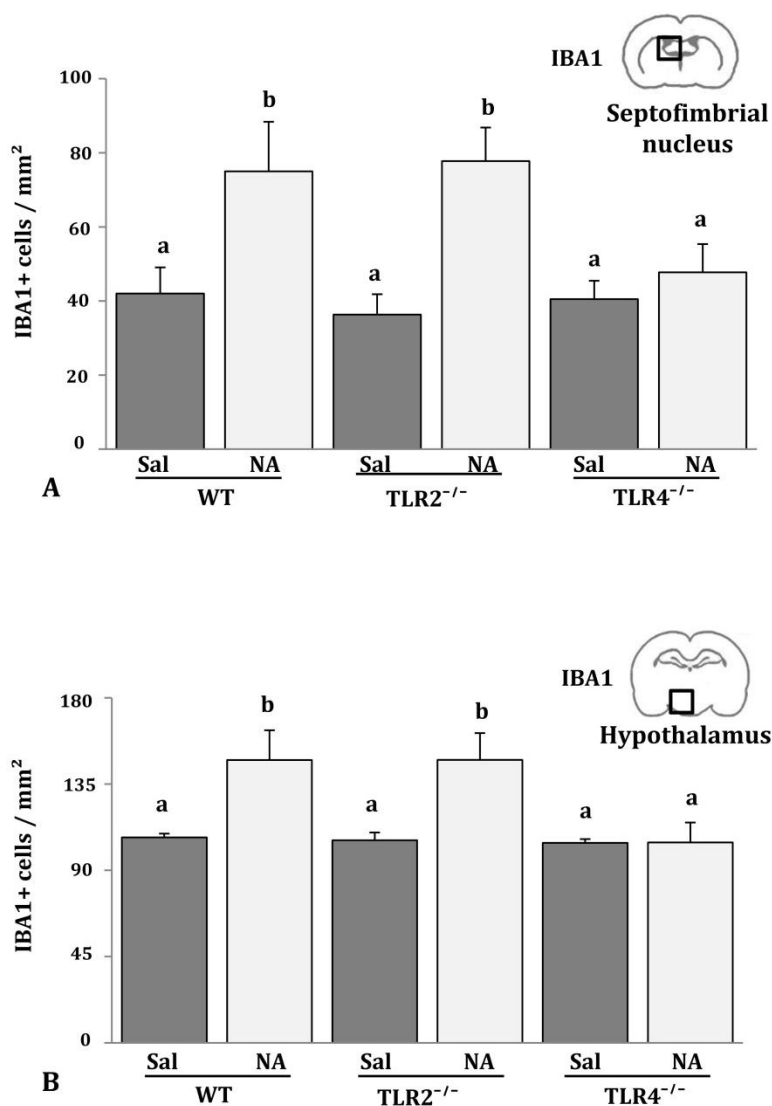


Figure R-17. IBA1 positive cell counts in TLR2 and TLR4 deficient mice injected with NA. IBA1 positive cells were counted in the septofimbrial nucleus (A) and the hypothalamus (B) and expressed as cells/mm². Animals were sacrificed 24 h after saline/NA injection. Bars are the mean + SD of n= 3 saline injected or n= 9-10 NA injected animals (for each strain). The Kruskal-Wallis test was used for comparing groups means. Letters a and b above bars indicate the absence (if the same letter appears) or presence (if different letters appear) of a statistical difference between groups ($P < 0.001$).

As mentioned above, IBA1 is present in microglial cells and macrophages. The constitutive expression of this protein increases upon activation, what facilitates the discrimination between vigilant and activated microglia, and also enables microglia/macrophages cell count. Both the level of IBA1 expression and the number of IBA1 expressing cells are indications of the severity of the inflammation taking place under different experimental conditions.

Mice injected with saline showed a homogeneous distribution of microglial cells in the septofimbria (Fig. R-16 A-C) and the hypothalamus (Fig R-16 D-F), as well as a weak IBA1 label in these cells. IBA1 staining was apparently similar in sections from saline-injected WT (Figs. R-16 A, D), TLR2^{-/-} (Figs. R-16 B, E), and TLR4^{-/-} (Figs. R-16 C, E) mice. With a naked eye animals injected with NA (Figs. R-16 G-L) showed a stronger IBA1 labeling compared to animals injected with saline (Figs. R-16 A-E); no evident differences were observed between the three strains studied when NA was injected.

However, cell counts analyzed by the Kruskal-Wallis test revealed statistically significant differences in both the septofimbrial nucleus (Fig. R-17 A; $P < 0.001$) and the hypothalamus (Fig. R-17 B; $P < 0.001$). Comparisons by pairs showed an increased number of IBA1-positive cells in WT and TLR2^{-/-} animals treated with NA ($P < 0.001$) compared to saline injected mice. Conversely, such increase did not occur in TLR4^{-/-}, with IBA1-positive cell counts similar to those of saline controls of any of the three strains. The same results were obtained in the two brain regions studied. Also, no differences were found between NA-injected WT and NA-injected TLR2^{-/-} mice ($P = 1.000$).

Cytokines of the IL-1 family are typically secreted at very early stages of the inflammatory response by microglial cells after appropriate stimulation. In microglial cells, IL-1 β expression is associated with polarization to the M1-proinflammatory state. The number of IL-1 β positive cells provides valuable information about the inflammation degree coming about in the tissue.

Saline-treated animals were essentially devoid of IL-1 β positive cells (not shown). Neuraminidase injection resulted in the emergence of IL-1 β positive cells in diverse brain locations, including the septofimbrial nucleus (Fig. R-18 A-B) and the hypothalamus (Fig. R-18 D-E).

However, this fact was only observed in WT and TLR2^{-/-} strains, while NA-injected TLR4^{-/-} mice showed only few IL-1 β positive cells in septofimbria (Fig. R-18 C) and hypothalamus (Fig R-18 F). This observation was corroborated by cell counts (Fig. R-19).

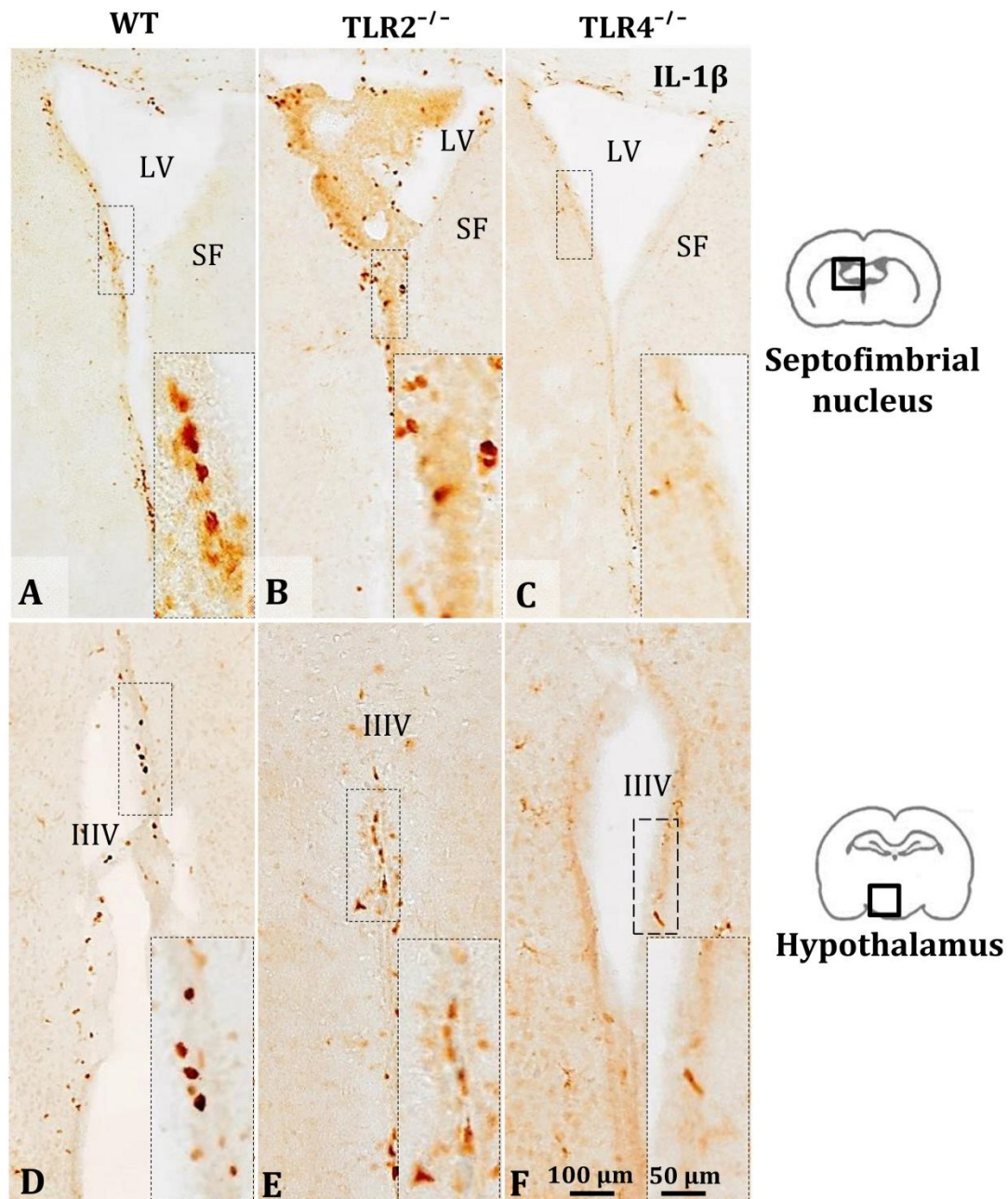


Figure R-18. Immunostaining of IL-1 β appears after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice. Histological images from septofimbrial nucleus (A-C) and hypothalamus (D-F) of WT (A, D), TLR2^{-/-} (B, E) and TLR4^{-/-} (C, F) strains 24 h after the injection of NA. Staining was evident in subventricular cells or in cells close to the ventricular surface, and decreased towards deeper regions of parenchyma. Positive IL-1 β label was almost undetectable in samples treated with saline (not shown). Within each image a magnified detail is shown. LV = lateral ventricle; SF = septofimbrial nucleus; IIIV = third ventricle.

The Kruskal-Wallis test indicated statistically significant differences in IL-1 β cell counts in both the septofimbrial nucleus (Fig. R-19 A; $P < 0.001$) and the hypothalamus (Fig. R-19 B; $P < 0.001$).

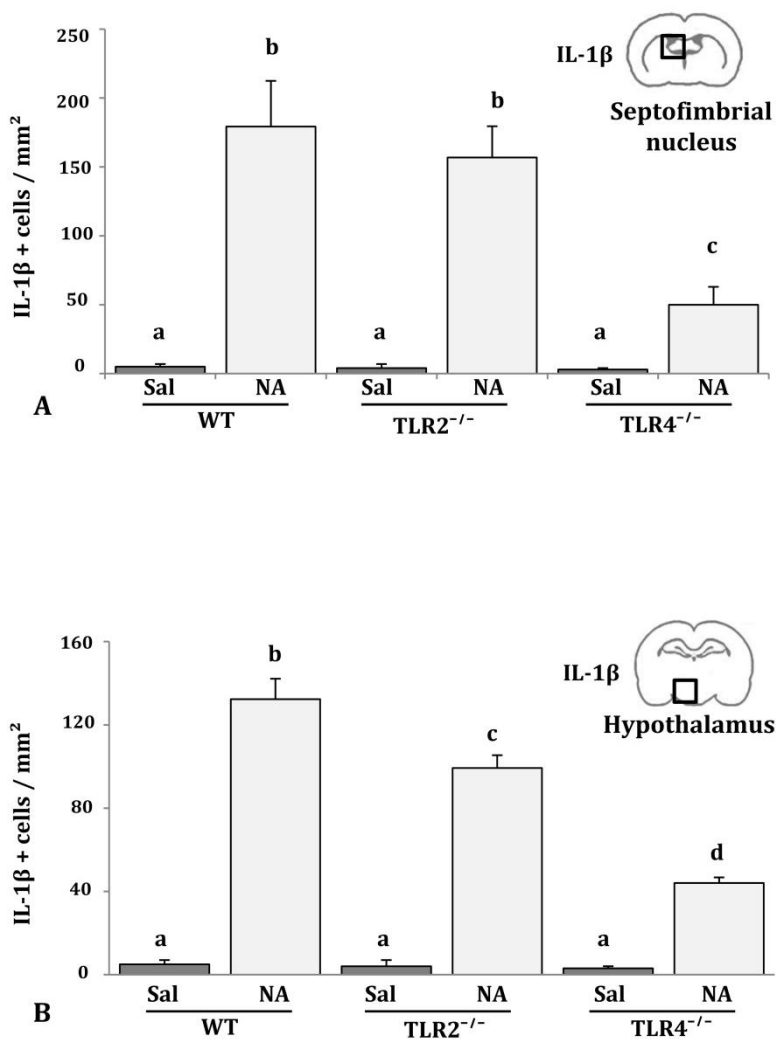


Figure R-19. Quantification of IL-1 β positive cells after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice. IL-1 β positive cells were counted in the septofimbrial nucleus (A) and the hypothalamus (B), and expressed as cells/mm². Bars are the mean + SD of n= 3 saline injected or n= 9-10 NA injected animals (for each strain). Kruskal-Wallis test was used to compare groups means. Letters (a-d) on top of the bars indicate the absence (if same letter) or presence (if different letters) of a significant difference between the compared groups ($P < 0.001$).

Neuraminidase injection resulted in increased IL-1 β cell counts in the three strains when compared with their respective controls. In the septofimbrial region (Fig. R-19 A), no differences were found between NA-injected animals of WT and TLR2^{-/-} strains ($P = 0.683$), while cell counts in TLR4^{-/-} mice were significantly lower ($P < 0.001$). In the hypothalamus (Fig. R-19 B), IL-1 β cell counts were decreased in TLR2^{-/-} compared to WT ($P < 0.001$), and further decreased in TLR4^{-/-} mice ($P < 0.001$).

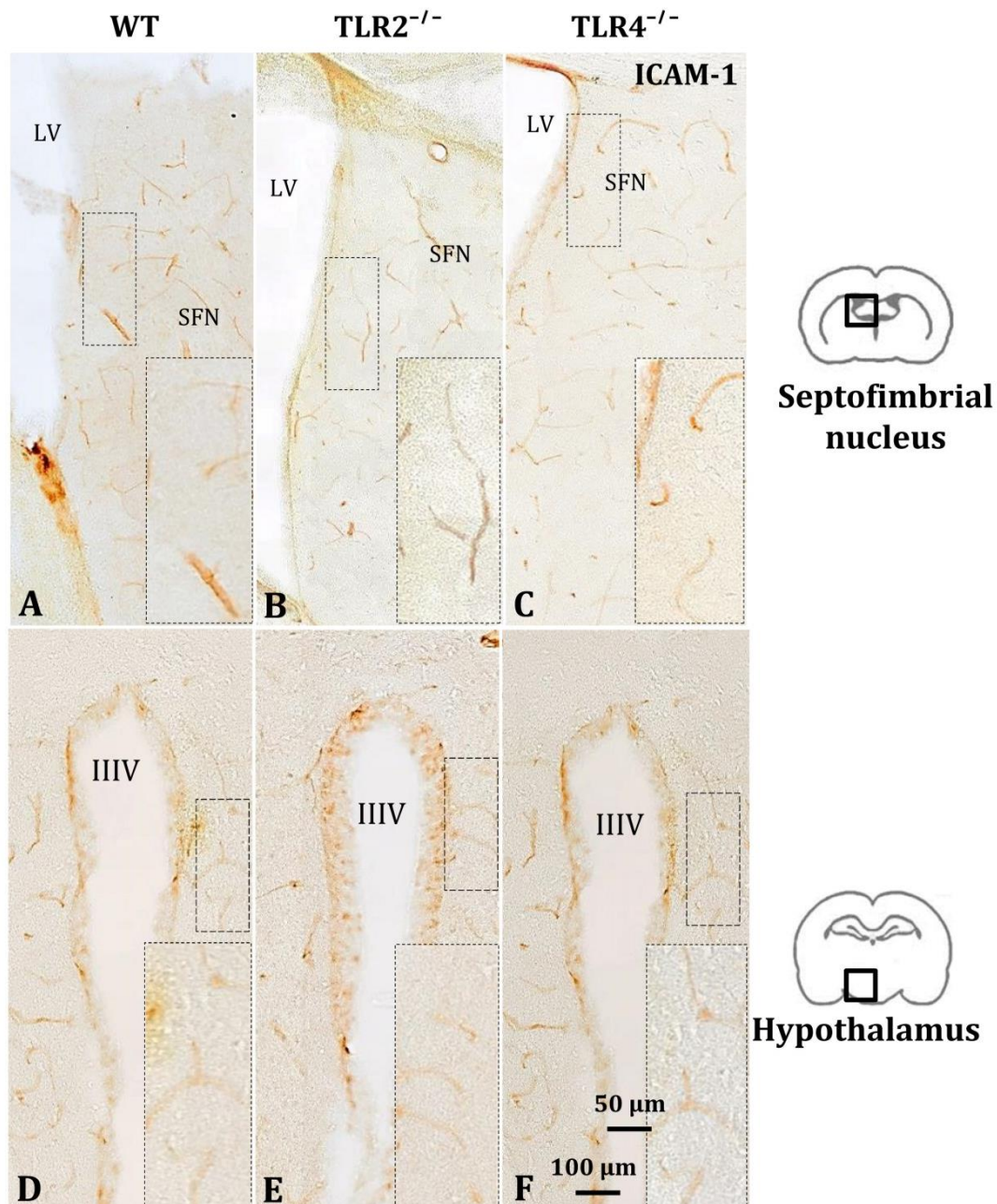


Figure R-20. ICAM-1 immunostaining after NA injection in TLR2 and TLR4 deficient mice. Images taken from the septofimbrial nucleus (A-C) and the hypothalamus (D-F) of WT (A, D), TLR2^{-/-} (B, E) and TLR4^{-/-} (C, F) mice 24 h after the injection of NA. Insets show magnified details of each image. The ICAM-1 label in samples from saline treated animals was almost undetectable (not shown). LV = lateral ventricle; SF = septofimbrial nucleus; IIIV = third ventricle.

It is known that adhesion molecules are involved in the extravasation of blood cells to tissues during inflammatory processes. Among them, the expression of ICAM-1 undergoes a significant increase in the endothelium of vessels in the injured brain (Lindsberg et al., 1996). This molecule may therefore be used as an indicator of inflammation in the nerve tissue.

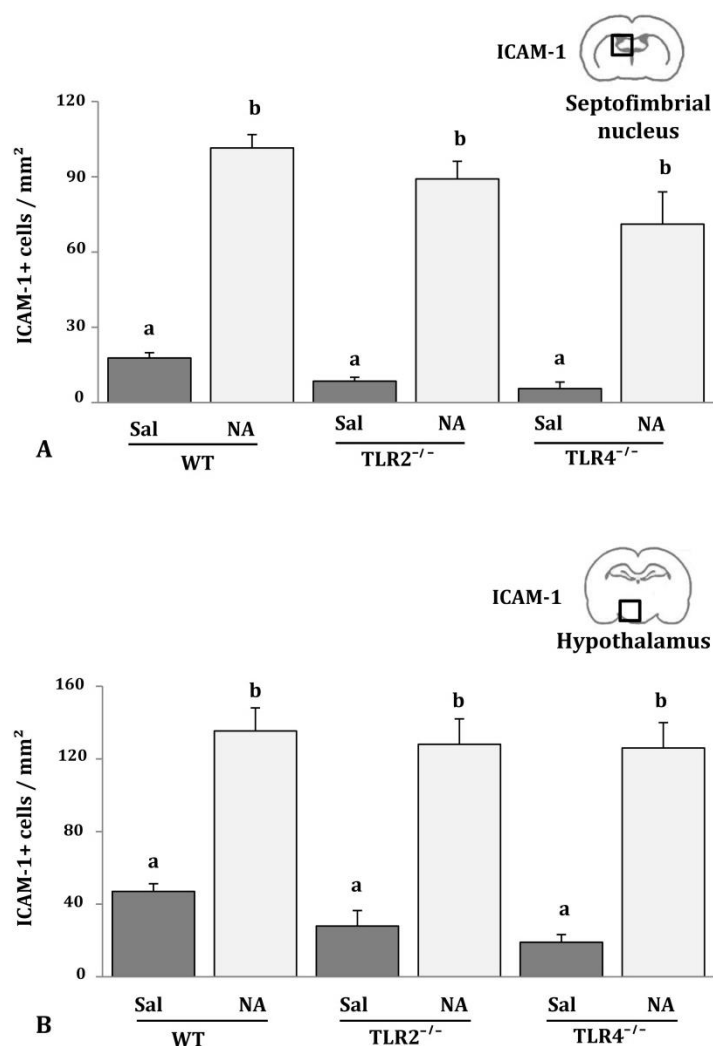


Figure R-21. Quantification ICAM-1 positive cells in TLR2 and TLR4 mice treated with NA. ICAM-1 positive cell counts were performed in the septofimbrial nucleus (A) and the hypothalamus (B), and expressed as cells/mm². Bars are the mean + SD of n= 3 saline injected or n= 9-10 NA injected animals (for each strain). Kruskal-Wallis test was used for means comparisons. Letters a and b on top of the bars indicate the absence (if same letter) or presence (if different letter) of a significant difference between the groups compared (P < 0.001).

In tissue sections obtained from animals treated with saline ICAM-1 was almost undetectable (not shown). After NA-treatment ICAM-1 staining was visible in parenchymal brain vessels, including those in the septofimbria (Fig. R-20 A-C) and the hypothalamus (Fig. R-20 D-F). To evaluate the possible differences in an objective way, a quantitation procedure for ICAM-1 positive cells was performed. ICAM-1 cell counts were analyzed by the Kruskal-Wallis test, resulting in statistically significant differences between groups in both the septofimbria (Fig. R-21 A; P < 0.001) and the hypothalamus (Fig. R-21 B; P < 0.001).

In both regions, ICAM-1 cell counts increased in NA-treated animals compared to saline ones. Such increase occurred in the three mouse strains studied (WT, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-}), and no differences were detected among NA-injected animals of different strains.

5.3.2. Intracerebroventricular NA increases the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , and IL-6, in a TLR4 dependent manner

The NA-induced inflammatory reaction was further analysed by quantifying the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines by qPCR.

Wild type, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-} mice were saline or NA injected, and sacrificed 6 h later. The hypothalamus was dissected out for total RNA isolation and qPCR. This brain region was preferred for this study because of the low RNA yield obtained from other regions (i.e. septofimbria and caudate-putamen).

Neuraminidase induced a significant increase of IL-1 β expression (Fig. R-22 A) in the hypothalamus of WT ($P < 0.001$) and TLR2^{-/-} ($P < 0.005$) mice compared to saline injected animals, but not in TLR4^{-/-} mice. Similarly, TNF α levels (Fig. R-22 B) were higher after NA-injection in WT ($P < 0.001$) and in TLR2^{-/-} ($P < 0.005$) mice, but not in TLR4^{-/-} animals. Interleukin-6 mRNA levels behaved in a similar way (Fig. R-22 C), presenting increased values in WT ($P < 0.001$) and in TLR2^{-/-} ($P < 0.005$) mice injected with NA.

However, in TLR4^{-/-} animals no differences were observed between NA-treated and saline-injected animals for any of the cytokines analysed (IL-1 β , $P = 0.319$; TNF α , $P = 0.368$; IL-6, $P = 0.436$).

In summary, there was an increase in cytokines expression after NA treatment in WT and TLR2^{-/-} strains, which was however not observed in the TLR4^{-/-} strain. Also, when comparing WT and TLR2^{-/-} strains both under NA stimulation, IL-1 β ($P < 0.05$) and TNF α ($P < 0.05$) increases were milder in TLR2^{-/-} mice than in WT ones.

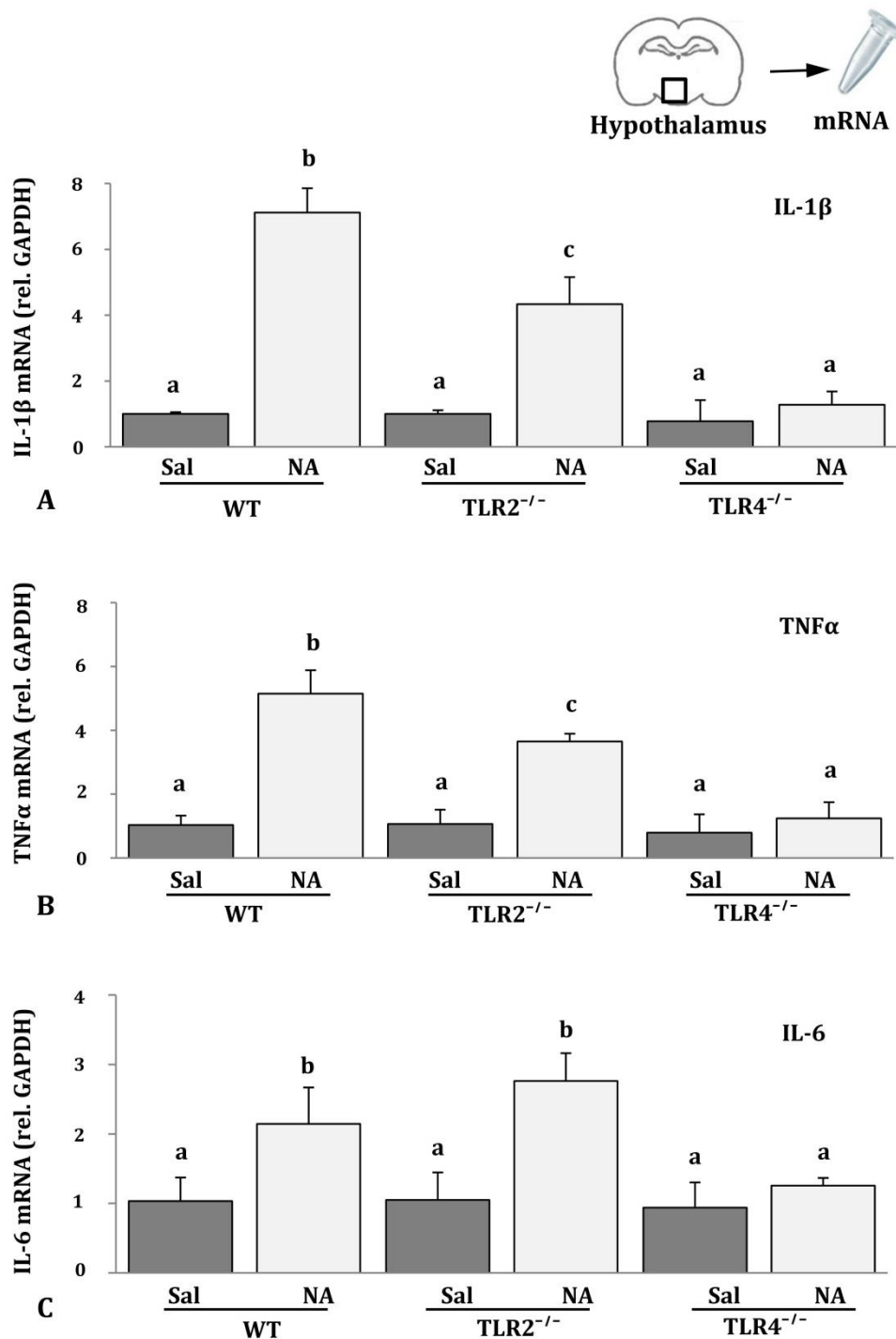


Figure R-22. Pro-inflammatory cytokines expression in the hypothalamus of TLR2 and TLR4 deficient mice after NA injection. The mRNA levels of IL-1 β (A), TNF α (B) and IL-6 (C) was measured by qPCR in hypothalamic tissue from WT, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice obtained 6 h after saline/NA injection. mRNA levels of the target genes were expressed relative to the expression level of GAPDH, using the Pfaffl method. The histograms show means + SD of n= 3 saline injected and n= 5 NA injected animals of each strain. Two-way ANOVA was used to compare the means of the groups. Letters (a-c) on top of the bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of a significant difference (P < 0.05) between groups.

5.3.3. NA induced an increase in mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , and IL-6 in cultured microglia, in a TLR4 dependent manner

Microglia are key players in triggering the innate immune response in the central nervous system. After pattern molecules recognition by membrane proteins such as TLRs, they activate and secrete inflammatory cytokines. To find out whether microglial cells can initiate by themselves the inflammatory response provoked by NA, and if NA acts through TLR2 or TLR4, microglia were isolated from WT, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice to obtain pure cultures of microglial cells.

These primary microglial cultures were stimulated with NA or with, specific activating ligands for TLR2 and TLR4: the synthetic triacylated lipoprotein Pam3CSK4 (P3C), which specifically activates TLR2, and pure lipopolysaccharide (LPS), which is a specific ligand for TLR4.

Control cultures were added saline. Six hours after NA, P3C or LPS addition to pure microglia cultures, total RNA was isolated and the expression of inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF α and IL-6 was quantified by qPCR. mRNA levels of the three genes are expressed relative to GAPDH mRNA.

Two-way ANOVA pointed out significant differences in the expression levels of IL-1 β (F = 5.9; df = 11, 32; P < 0.001), TNF α (F = 4.7; df = 11, 32; P < 0.001), and IL-6 (F = 12.8; df = 11, 32; P < 0.001) between different treatments. The expression of the three pro-inflammatory cytokines in WT microglia cultures increased after treatment with LPS, P3C and NA compared to saline treated cultures (Fig. R-23).

This result demonstrate that, as well as LPS and P3C, NA is also able to directly activate microglial cells. Microglia isolated from TLR2^{-/-} responded with an increased expression of IL-1 β (Fig. R-23 A), TNF α (Fig. R-23 B), and IL-6 (Fig. R-23 C) after LPS and NA treatments, but no response was observed after P3C treatment, which was expected as it is known that P3C is a specific ligand of TLR2.

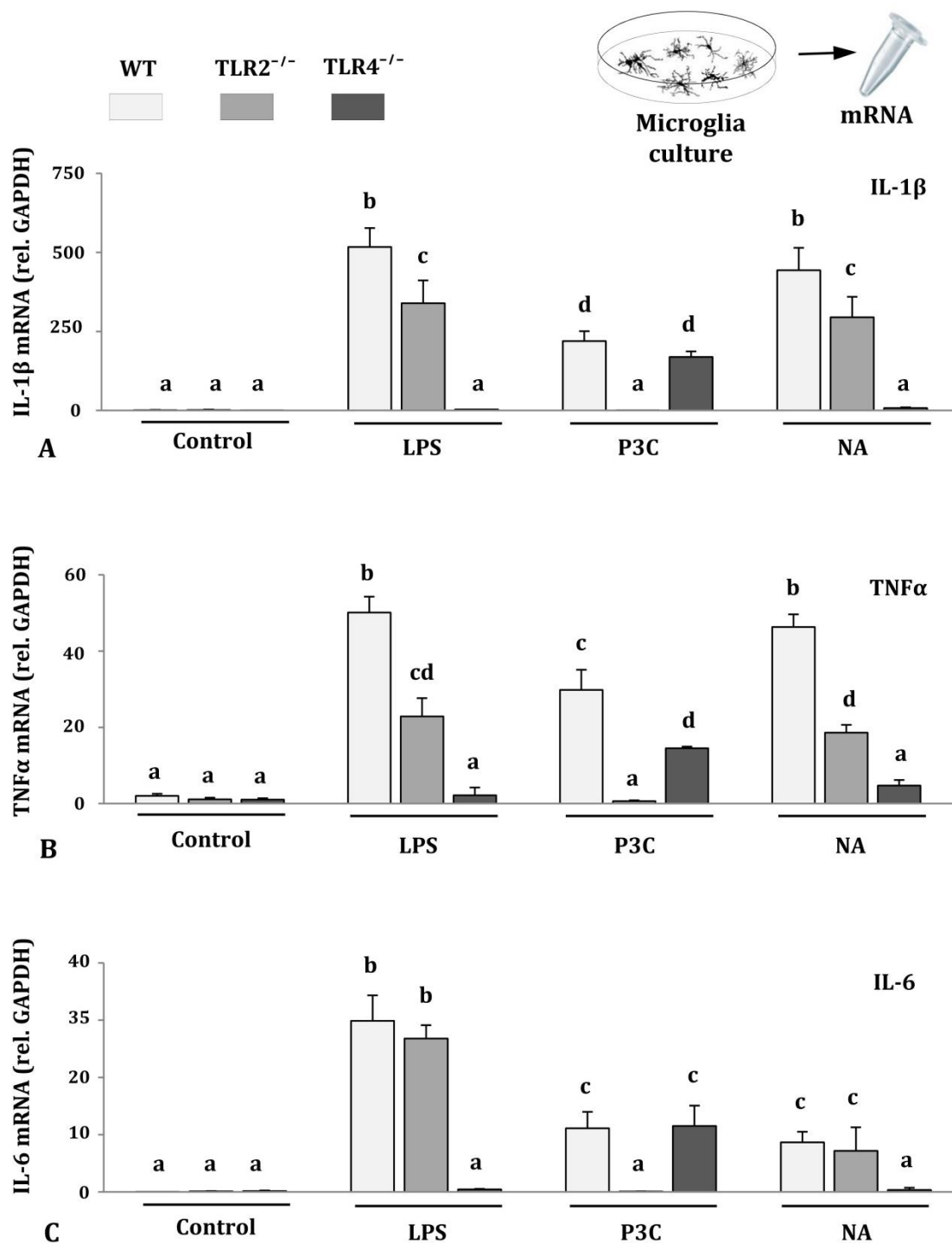


Figure R-23. Pro-inflammatory cytokines expression in isolated cultured microglia from TLR2 and TLR4 deficient mice after in vitro NA stimulation. Pure microglia cultures isolated from WT, TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice strains were stimulated in vitro with lipopolysaccharide (LPS), the synthetic lipoprotein Pam3CSK4 (P3C), or neuraminidase (NA) for 6 hours. Total RNA was then isolated, and the mRNA levels of IL-1β (A), TNFα (B) and IL-6 (C) were quantified by qPCR. mRNA levels are expressed relative to GAPDH using the Pfaffl method. The histograms show means + SD of n= 3-5 independent cultures. Two-way ANOVA was used to compare treatments. Letters (a-c) above each bar indicate the absence (same letter) or presence (different letters) of a statistically significant difference (P < 0.001) between the compared groups.

On the other hand, TLR4^{-/-} microglial response showed a significant increase in the expression of IL-1 β (Fig. R-23 A), TNF α (Fig. R-23 B) and IL-6 (Fig. R-23 C) after P3C and NA treatment, but no increase for any cytokine after LPS stimulation occurred. Pair comparisons were carried out with Student's *t*-test; statistical differences obtained had a significance of $P < 0.001$. Note that TLR4^{-/-} microglia was stimulated by P3C, indicating that the cells from this strain are capable of initiating an immune response independent of TLR4.

Given the negative response to NA observed in microglia from TLR4^{-/-} mice and, on the contrary, the activation induced by NA in microglial cells from WT and TLR2^{-/-} mice, it is proper to conclude that the microglial TLR4 plays a key role in the inflammatory response generated by NA.

5.4. MICROGLIA ACTIVATED BY NA PARTICIPATE IN EPENDYMAL CELL DEATH

It is well documented that NA administered ICV provokes denudation and death of the ependymal epithelium, is not restored over time (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008; Grondona et al., 2013). The ependymal lining is then replaced by a glial scar. In the most severe cases, this is, when high NA doses are injected, the ependymal loss is complete, and an obstructive hydrocephalus develops. In the model used here, NA doses are lower, resulting in a partial ependymal loss. Although the NA neuroinflammation model has been described in detail (Granados-Durán et al., 2015) the mechanism underlying ependymal cells death is still not clear. The same authors reported that, although the complement system contributes to ependymal damage and death, NA may provoke mild ependymal damage without the aid of complement (Granados-Durán et al., 2016). To further investigate the cause of the ependymal death provoked by NA, we used an approach consisting in the co-culture of pure microglia with ependymal cells, the latter either ventricular wall explants or isolated. In this setting, microglia was stimulated by the addition of NA to the culture media, and the viability of ependymocytes evaluated. For these experiments, both microglia and explants/ependymocytes were isolated from rats.

5.4.1. Ependymal damage in ventricular wall explants co-cultured with NA-activated microglia

It is widely accepted that activated microglia overexpress the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α (Kawai and Akira, 2006; Kettenmann et al., 2011), a fact that was here used as a proof of microglial activation in cultures treated with NA.

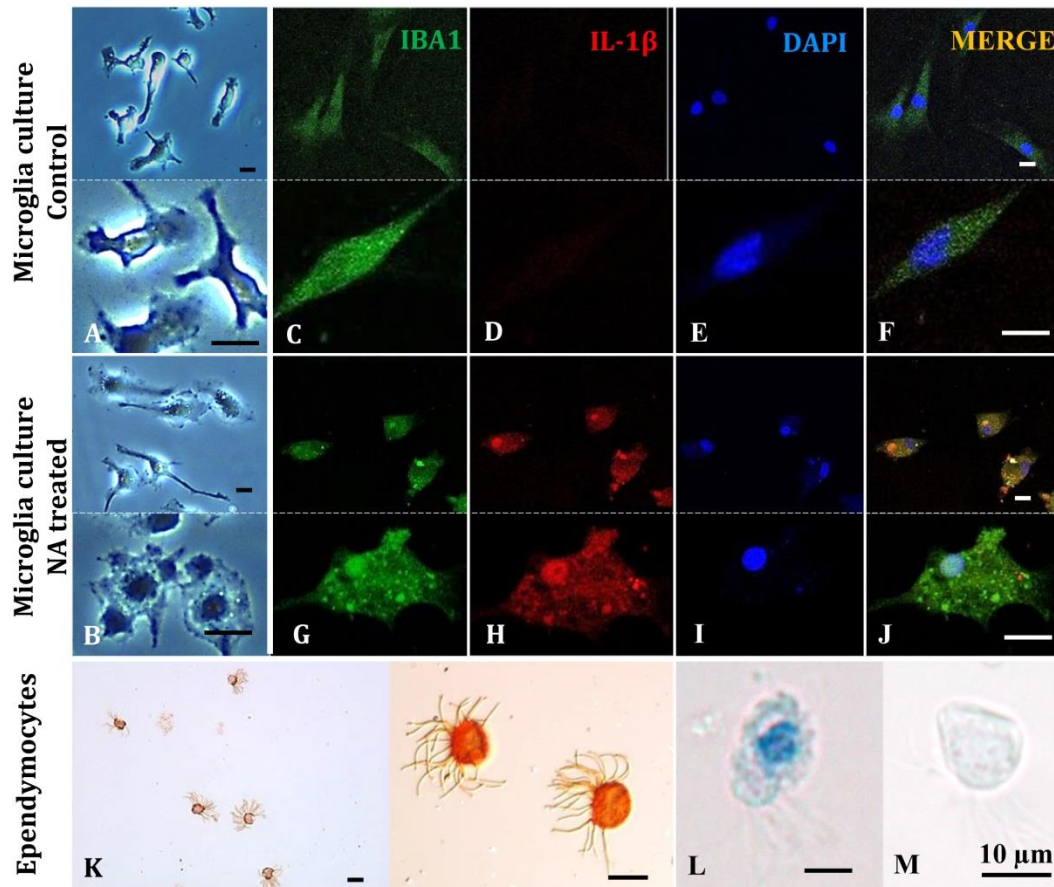


Figure R-24. Purified microglial and ependymocyte cultures obtained for co-culture experiments. Pure microglial cultures visualized by bright field microscopy under control conditions (A) and after NA addition to the culture medium (B). Double immunofluorescence images were acquired with a confocal microscope for control microglia culture (C-F) and NA treated microglia culture (G-J). The identity and high purity (> 95%) of rat primary isolated microglial cells was demonstrated by IBA1 fluorescence immunostaining (C, G). The activation of microglial cells after NA stimulation was evidenced by immunocytochemical labeling for the inflammatory cytokine IL-1 β (D, H). IL-1 β staining in control non-stimulated cultures was negative (D), while NA treated cultures showed a positive staining (H). Ependymal cells were isolated from adult rats, and purified using an in vitro strategy. The high purity (> 95%) and identity of the isolated cells was evaluated by immunocytochemistry using the cilia specific marker β IV-tubulin (K). The bunch of cilia in ependymal cells is also noticeable. Trypan blue solution staining was used to test ependymocytes viability (from Granados-Duran et al., 2016), where blue indicates a dead cell (L) and white a live cell (M) (Scale bar = 10 μ m).

The expression of IL-1 β by cultured microglial cells was analyzed by fluorescent immunocytochemistry (Fig. R-24). Doble staining for IBA1 (Fig. R-24, green) and IL-1 β (Fig. R-24, red) revealed that surveillant microglia do not express detectable levels of IL-1 β (Fig. R-24 C), but when NA was added to the culture media microglia overexpressed IL-1 β (Fig. R-24 F). Thus, NA itself induced the expression of IL-1 β by microglial cells.

Once confirmed the activation of cultured microglia by NA, we proceeded to perform co-culture experiments of ventricular wall explants with pure microglial cultures. Under these conditions, microglia was activated by addition of NA to the culture medium. Negative controls consisted in the omission of either NA or microglial cells; LPS stimulation was used as positive control.

The percentage of living ependymocytes within the ependymal layer of the explants was evaluated 24 h after NA or LPS addition by trypan blue exclusion, as previously described (Material and methods, section 4.5.1; Fig. M-1 A). After trypan blue staining and fixation, the explants were embedded in paraffin and sectioned, taking care for the sectioning plane to be perpendicular to the ependymal epithelium.

Counting of blue (dead, trypan-blue stained) and purple (live, hematoxyline-stained) cells within the ependymal layer was carried out (see Material and methods for procedure details; Fig. R-25 A-D).

Dead subependymal cells were frequent, and carefully excluded from counting. In the absence of microglial cells, explants treated with NA showed a low number of dead cells (arrows in Fig. R-25 A). A similar result was obtained explants were co-cultured with non-stimulated microglia (Fig. R-25 B). However, the percentage of dead ependymal cells increased in co-cultures treated with LPS (Fig. R-25 C), as well as in co-cultures stimulated with NA (Fig. R-25 D). In these cases, dead ependymal cells were detected (arrows in Fig. R-25 C, D) together with detachment of some ependymal cells (arrowheads in Fig. R-25 C, D).

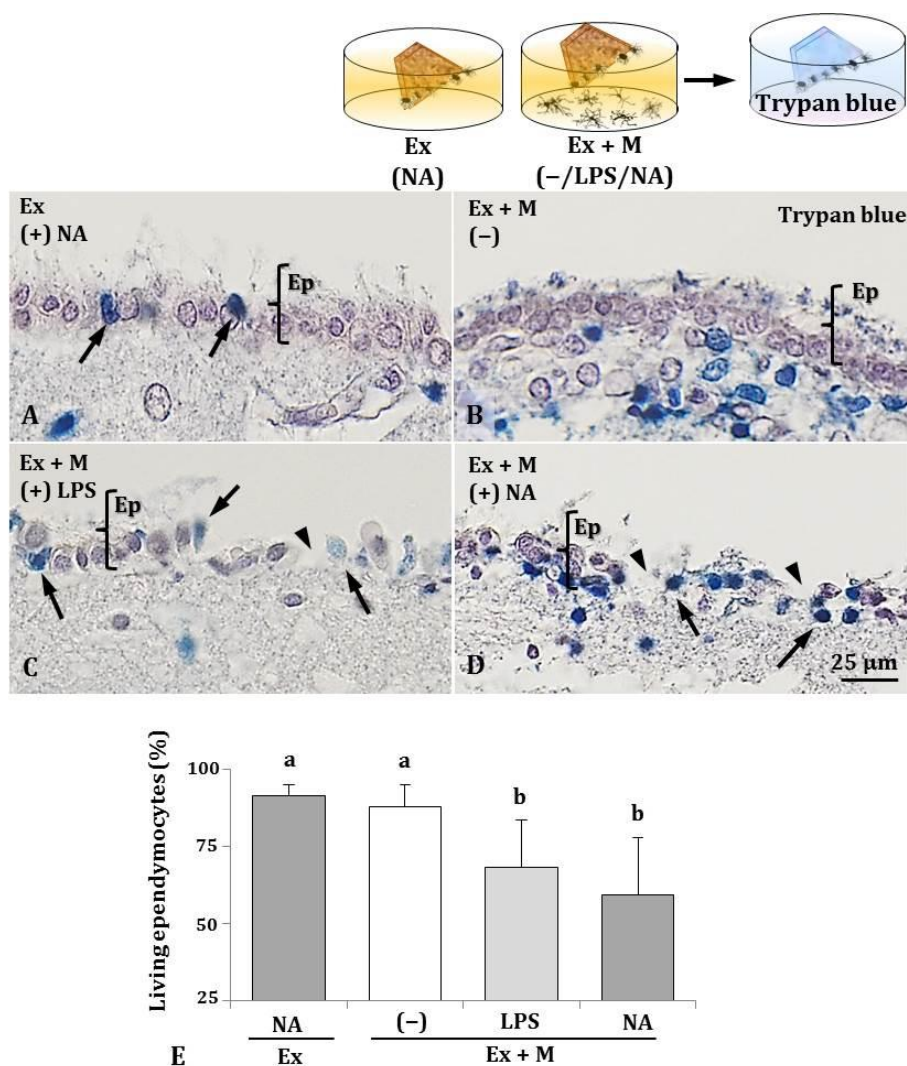


Figure R-25. Viability of ependymocytes in explants co-cultured with NA-activated microglia. Ventricular wall explants with an intact ependymal cell layer were obtained from adult rats. The explants were exposed to microglial cells, either resting (**B**) or stimulated with LPS (**C**) or NA (**D**). Some explants were exposed to NA in the absence of microglia (**A**). After 24 h exposure, all explants were stained with trypan blue, fixed, paraffin-embedded and sectioned. Explant tissue sections were also stained with hematoxylin. Dead ependymal cells were stained blue (arrows in **A**, **C** and **D**), and easily distinguishable from alive cells, which appeared purple. Live and dead ependymal cells were counted, and viability was expressed as the percentage of living cells (**E**). In explants cultured alone and treated with NA (**A**) and in those co-cultured with non-stimulated microglia (**B**), only few dead ependymal cells could be found (arrows). Ependymal cell viability was similar in both conditions (a letter in **E**). However, in those explants co-cultured with microglia activated either with LPS (**C**) or with NA (**D**) the ependymal layer appeared partially disrupted, with more dead cells (arrows in **C** and **D**) and some detached cells (arrowheads in **C** and **D**). A similar decrease of ependymal cell viability was observed in these conditions (b letter in **E**), compared to explants cultured only with NA or with non-stimulated microglia (**E**). Bars in histogram represent mean \pm SD of $n=4-6$ independent experiments. Means were compared by one-way ANOVA. Letters a and b on top of the bars indicate the absence (if same letter) or existence (if different letter) of a significant difference between the compared conditions ($P < 0.01$). Ex = explant; M = microglia culture; NA = medium supplemented with neuraminidase; LPS = medium supplemented with lipopolysaccharide; (-) = control medium.

Live/dead cell countings in several explants (n= 4-6) was expressed as % living ependymocytes. One-way ANOVA ($F = 5.2$; $df = 3, 16$; $P = 0.007$) showed significant differences in ependymocytes viability between the different experimental conditions (Fig. R-25 E). Pairwise multiple comparisons pointed out similar viabilities in explants treated with NA ($92 \pm 4\%$) and explants co-cultured with non-stimulated microglia ($88 \pm 7\%$).

However, in explants co-cultured with microglia, the addition of either LPS ($68 \pm 15\%$) or NA ($59 \pm 19\%$) induced a similar decrease in the percentage of living ependymocytes compared to both types of controls (explant: (+) NA, (-) microglia, and explant: (-) NA, (+) microglia; $P < 0.01$).

Therefore, NA- or LPS-activated microglia reduces ependymal cell viability within the ependymal epithelium of explants in about 25%.

5.4.2. NA-activated microglia impair the viability of isolated cultured ependymal cells

The results obtained with explants co-cultured with microglia indicated a role of activated microglia in ependymocytes death. However, other cell types present in the explants may influence the viability results. Taking advantage of the ependymal cell isolation and purification method developed in our laboratory (Grondona et al., 2013), we proposed to perform similar co-culture experiments but using purified ependymal cells instead of explants.

An independent isolation of primary ependymocytes was carried out for each experiment replicate. Immunocytochemistry with β IV-tubulin, a specific ependymal cell marker, confirmed the high purity ($> 95\%$) of ependymal cells (Fig. R-24 G). On the other hand, microglia isolations to obtain pure cultures (Saura et al., 2003) were carefully programmed to ensure the proper timing of both types of primary cell cultures. For co-culture experiments, microglial cells were attached to the bottom of the multi-well plate, while ependymal cells were subsequently added and remained in suspension.

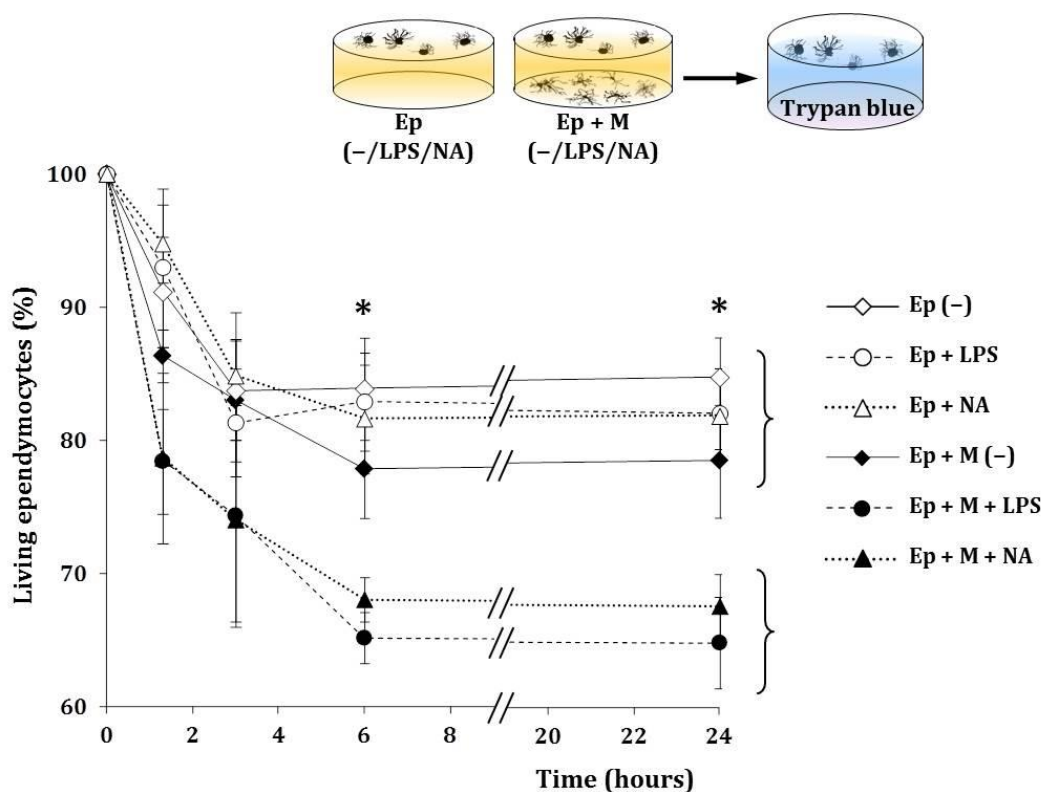


Figure R-26. Viability of ependymal cells co-cultured with NA-activated microglial cells. Ependymal cells cultures were exposed to different experimental conditions in the absence/presence of microglial cells, and with/without microglia activators (LPS or NA). Samples were taken from each culture to determine the viability of ependymocytes by trypan blue staining at 1, 3, 6 and 24 h. Ependymocytes viability was expressed as the percentage of living cells (considering the viability at the beginning of the culture 100%). Each point represents the mean \pm SEM. Two-way ANOVA was used to compare the different conditions within each time point. Holm-Sidak method pairwise multiple comparisons were performed between different culture conditions. The brackets span those conditions showing no statistical difference between them. The conditions included in the top bracket did present a statistical difference with respect to those included in the bottom bracket. Ep = ependymal cell culture, M = microglia culture; (-) = control medium; LPS = medium supplemented with lipopolysaccharide; NA = medium supplemented with neuraminidase (* $P < 0.001$).

Pure ependymal cell cultures were exposed to different experimental conditions, and viability was determined by trypan blue exclusion (Fig. M-1 B). Live (white; Fig. R-24 I) and dead (blue; Fig. R-24 H) ependymocytes were counted to calculate the percentage of living ependymocytes in each multi-well plate. Counts were performed at different time points after the initiation of the experiment (with the addition of ependymal cells) up to 24 h. Negative control conditions consisted in ependymal cells cultured in the absence of microglia, or with no microglial activator (LPS or NA). As a positive control, microglia was alternatively stimulated with LPS.

Two-way ANOVA was used to compare the viability obtained under different experimental conditions. Comparisons were performed between treatments, as well as between different time points (Experimental condition: $F = 49.9$, $df = 5$, $P < 0.001$; Time: $F = 35.8$, $df = 3$, $P = 0.001$; Interaction: $F = 1.2$, $df = 15$, $P = 0.277$). This analysis revealed significant differences between experimental conditions as well as between times (Fig. R-26), which were further examined by pairwise multiple comparisons with the Holm-Sidak method.

Six hours after LPS or NA stimulation, the viability of ependymocytes similarly decreased to about 65-70%, but only in the presence of microglia (Fig. R-26); no further decreased occurred up to 24 h in culture. In the absence of microglia, as well as with non-stimulated microglia, viability decreased over time but less than in co-cultures treated with NA or LPS ($P < 0.001$).

Thus, in all culture conditions ependymocytes viability decreased up to 80-85% during the first 6 h in culture, and remained unchanged 24 h later. But when ependymocytes were co-cultured with activated microglia, a larger significant decreased occurred. According to our results, NA or LPS activated microglia decreased ependymocytes viability an additional 15% compared to control culture situations, suggesting that activated microglia jeopardize ependymal cell survival.

5.4.3. NA induces the up-regulation of inflammatory cytokines and their receptors in ventricular wall explants

Once demonstrated that activated microglia could impair ependymal cells viability, we hypothesized that this effect might be mediated by inflammatory cytokines released by activated microglia, such as IL-1 β and TNF α . Thus, the expression of the receptors for these cytokines was explored in ventricular wall explants and purified ependymal cells.

Explants obtained from the lateral ventricle wall of rats were placed in culture and stimulated with NA for 6 h. Total RNA was then isolated (Fig. M-1 C) and used for the quantification by qPCR (Fig. R-27) of the expression of IL-1 β receptor (IL-1 β R1), as well as the TNF α receptor (TNF α R1).

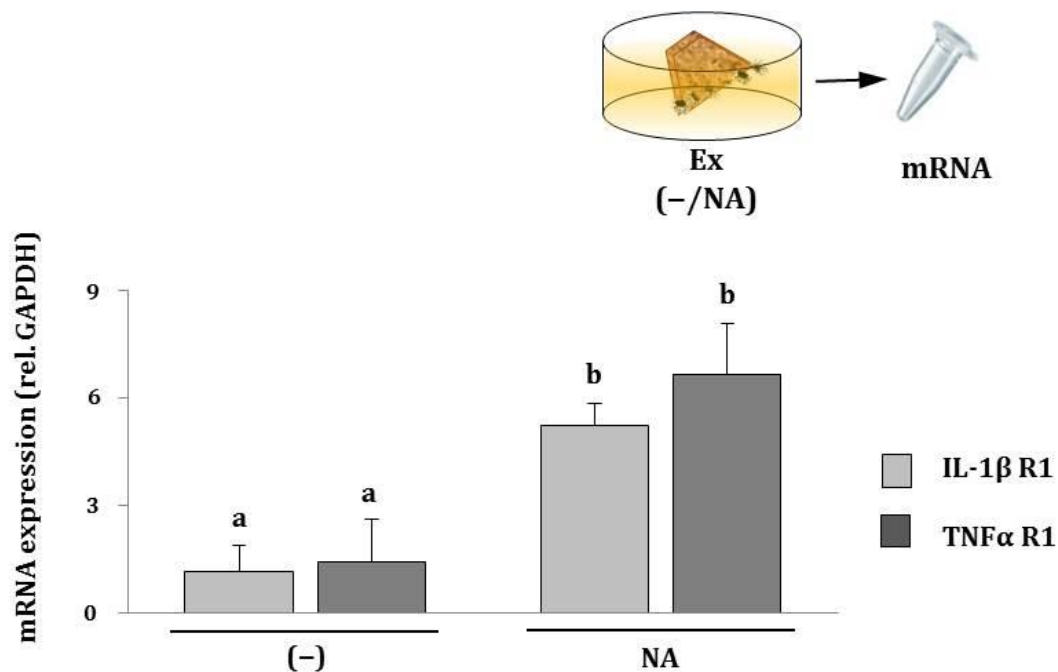


Figure R-27. Expression of cytokine receptors in ventricular wall explants. Control and NA treated rat brain explants obtained from the lateral ventricle wall of adult rats were placed in culture and treated with NA. The expression of the cytokine receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 was evaluated by qPCR through the Pfaffl method. Their mRNA levels were expressed relative to GAPDH mRNA. The three genes were up-regulated after NA treatment. Pairwise comparison was performed by Mann-Whitney. Letters a and b on top of the bars indicate the absence (if same letter) or existence (if different letter) of a significant difference between the compared conditions ($P < 0.01$).

Pair comparisons by Mann-Whitney analysis pointed out a significant increase in the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in explants treated with NA compared to untreated explants ($P < 0.005$). Moreover, explants treated with NA showed increased expression of the cytokine receptors IL-1 β R1 ($P < 0.005$) and TNF α R1 ($P < 0.01$) compared to control non-treated explants. Therefore, NA induced the overexpression of specific cytokine receptors (IL-1 β R1 and TNF α R1) in ventricular wall explants.

This result supports the possibility that the actions of activated microglia on ependymal cells might be mediated by these cytokines. However, the particular cell types within the explant accounting for such increase remained unknown. The following experiment was design to clarify if ependymal cells express these cytokine receptors.

5.4.4. Ependymocytes constitutively express IL-1 β receptors

Ependymocytes were isolated from adult rats and purified to investigate the presence of the cytokine receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 by PCR (Fig. M-1 D). First, the presence of the mRNA for ependymal cell specific genes (FOXJ1 and IIIG9) and for cytokine receptor IL-1 β R1 was explored by RT-PCR (Fig. R-28).

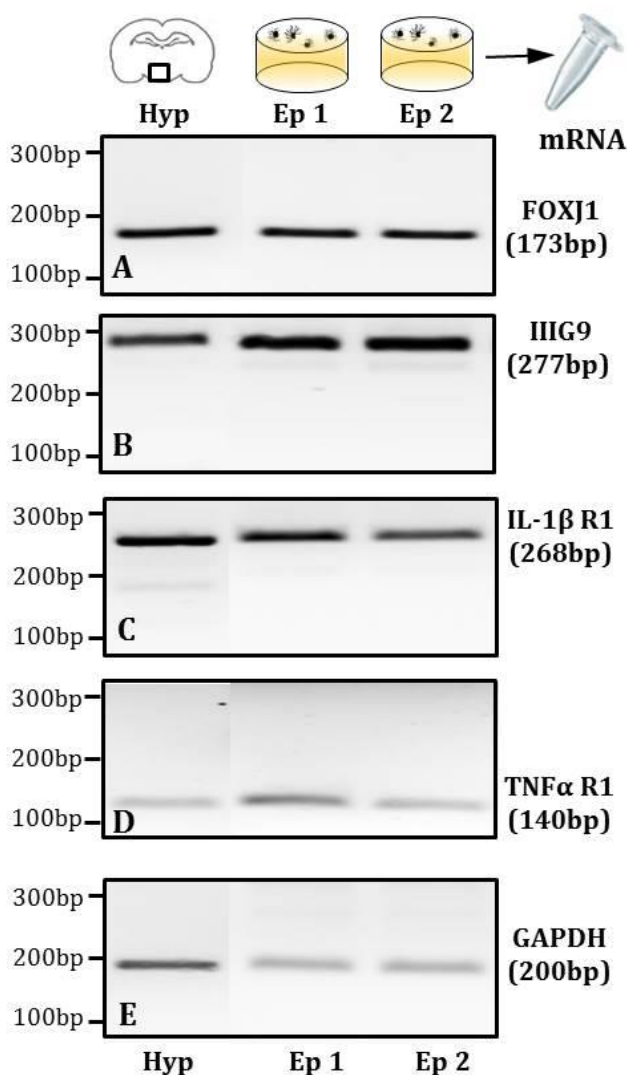


Figure R-28. The receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 are expressed by ependymal cells. Total RNA was isolated from rat hypothalamus (Hyp), and two independent pure ependymocyte cultures (Ep 1 and Ep 2). RT-PCR analysis was carried out to search the expression of ependymocytes specific genes FOXJ1 (A) and IIIG9 (B), and the cytokine receptors IL-1 β R1 (C) and TNF α R1 (D); GAPDH mRNA was used as housekeeping reference (E). The specificity of the pure culture of ependymal cells was confirmed by the higher expression of FOXJ1 and IIIG9 in ependymocytes compared to hypothalamus (compare FOXJ1 and IIIG9 bands intensity relative to GAPDH band). Moreover, RT-PCR revealed the presence of IL-1 β R1 specifically in the pure ependymal cultures.

The housekeeping gene GAPDH was used as reference (Fig. R-28 D). Two independent endependymocyte isolations were compared to RNA obtained from rat hypothalamus (including third ventricle ependyma). As would be expected, endependymocytes expressed high levels of FOXJ1 (Fig. R-28 A) and IIIG9 (Fig. R-28 B) compared to hypothalamic tissue (note the intensity of the bands over GAPDH band intensity). Moreover, RT-PCR also revealed the presence of IL-1 β R1 and TNF α R1 in pure endependymal cells (Fig. R-28 C).

To further examine these results, we proceeded to quantify the basal expression of IL-1 β and TNF α receptors by qPCR (Fig. R-29). Two independent endependymal cell isolations were used, and compared to rat caudate-putamen and hypothalamus RNA extracts (both including ventricular wall with ependyma). Relative quantification was performed by Pfaffl method.

The mRNA levels of typical endependymal cell genes such as FOXJ1 and IIIG9 were much higher in RNA obtained from pure endependymal cells compared to RNA from caudate-putamen or hypothalamus, thus confirming the specificity and purity of our endependymal cells samples.

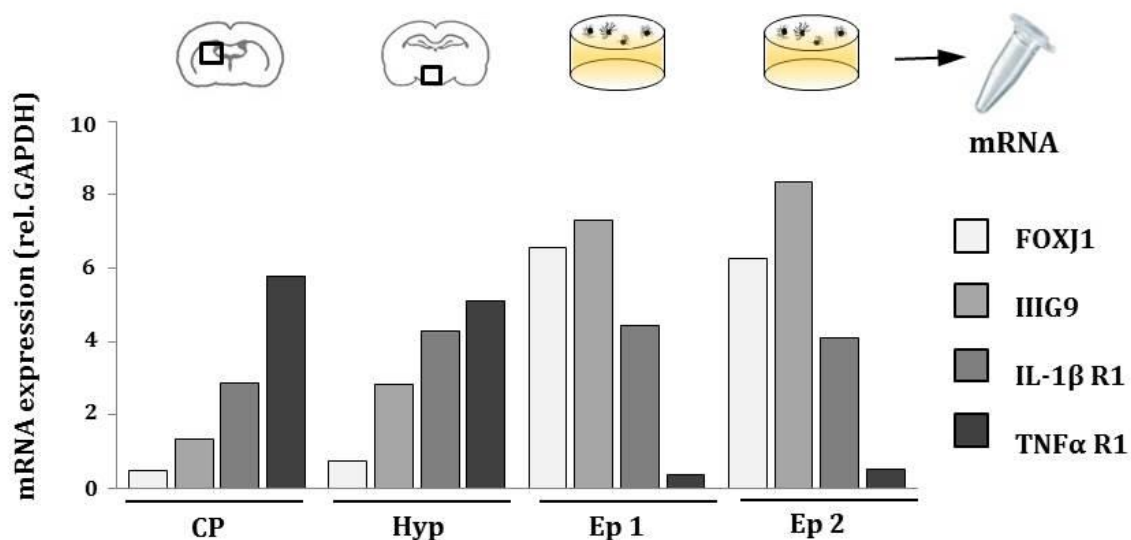


Figure R-29. Quantification of the expression of cytokine receptors by endependymal cells. Total RNA was isolated from two independent samples of pure endependymocytes (Ep 1 and Ep 2), and rat caudate-putamen (CP) and hypothalamus (Hyp) for comparisons. The mRNA levels of FOXJ1, IIIG9, and receptors IL-1 β R1 and TNF α R1 were quantified (relative to GAPDH mRNA) by qPCR using the Pfaffl method. The histogram shows quantifications of the different genes in each independent sample.

Regarding cytokine receptors, the expression level of IL-1 β R1 in ependymocytes was similar to that of caudate-putamen or hypothalamus. However, TNF α R1 was barely expressed in ependymal cells, while it was clearly detected in caudate-putamen and hypothalamus. These qPCR results confirm the constitutive expression of IL-1 β R1 in ependymal cells. In addition, our results indicate that TNF α R1 is not expressed in ependymocytes, at least in basal conditions.

5.5. THE RECRUITMENT OF CIRCULATING INFLAMMATORY MONOCYTES AIDS THE REMARKABLE INFLAMMATORY RESPONSE MOUNTED BY RESIDENT MICROGLIA IN RESPONSE TO INTRAVENTRICULAR NA

Microglia are considered the keystone of the innate immune response in the brain. The results so far obtained in this work also demonstrate their relevant role in the inflammatory process generated by the intraventricular administration of NA. However, in this model it has been described a prominent infiltration of leukocytes, first (4 h post-NA injection) involving neutrophils and monocyte/macrophages, and later (24 h post-injection) T and B lymphocytes (Granados-Durán et al., 2015).

To investigate the relative participation of microglia versus the infiltrating cells in the inflammatory process, the CCR2-knock out mouse strain was used (CCR2^{-/-}). This strain lacks the chemokine receptor type 2 (CCR2), which is the receptor for the chemokine ligand 2 (CCL2), also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). The cytokine CCL2 mainly mediates the recruitment of monocytes (Tsou et al., 2007). The monocyte/macrophage infiltration that occurs during inflammation is largely impaired in CCR2 deficient mice. Therefore, this strain is a useful tool to evaluate the relative contribution of resident microglia versus recruited monocyte/macrophages to the inflammatory process induced by NA.

5.5.1. Neuraminidase provokes an increase in the population of IBA1 positive cells, which is dependent on the chemokine receptor CCR2

First we aimed to quantify the amount of IBA1 positive cells during NA-induced inflammation in CCR2^{-/-} mice, compared to WT mice with normal monocyte recruitment.

These experiments were performed at 6 h post-injection, as according to previous works the infiltration process at this moment is at its peak. The IBA1 antibody targets resident microglia and perivascular macrophages, as well as infiltrated monocyte/macrophages. To discriminate between these cell types, only a subjective distinction based on the cell shape is possible. Therefore, IBA1 positive cells were counted irrespective of each particular cell type.

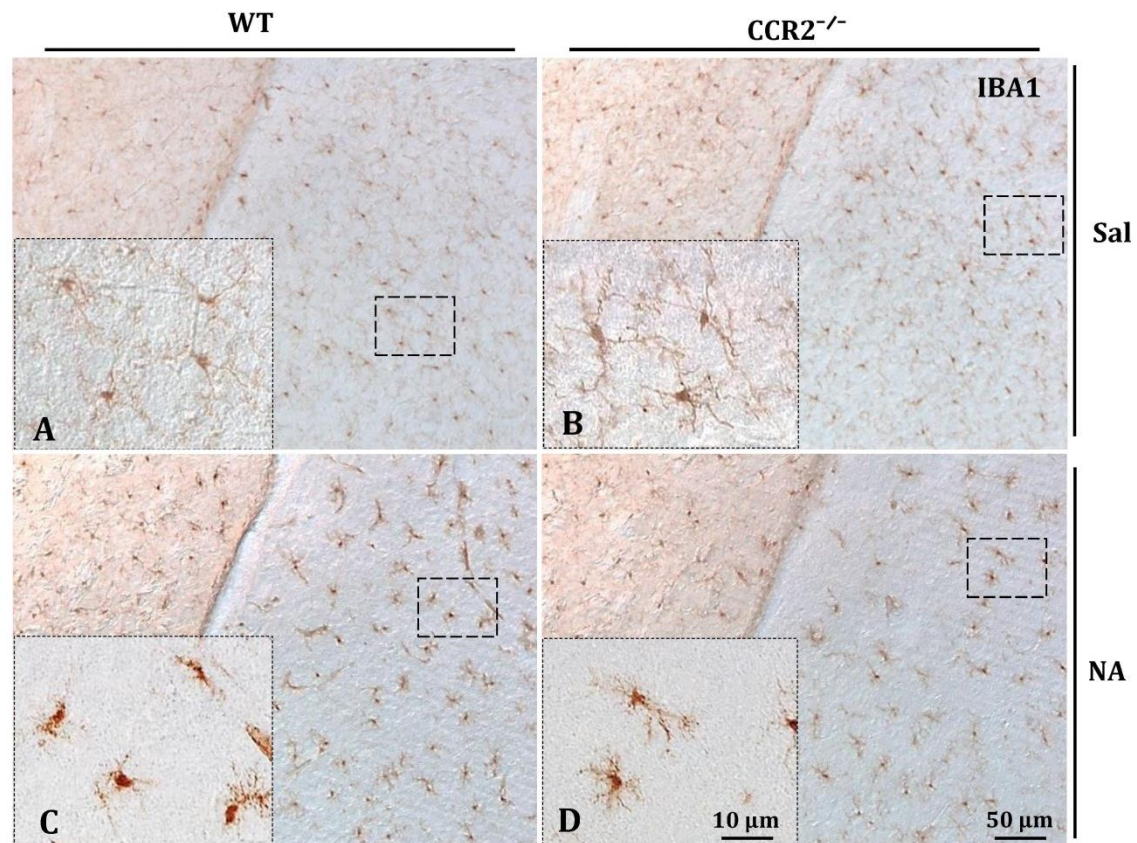


Figure R-30. IBA1 immunohistochemistry in CCR2 deficiency mice injected with NA. Histological images taken from brain areas nearby the right lateral ventricle of WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) mice, which were injected with saline (A, B) or with NA (C, D). Samples from animals injected with NA (C, D) exhibited a weaker IBA1 label compared to those treated with saline (A, B).

IBA1 staining was weaker in saline injected animals compared to NA treated ones (Fig. R-30). This was observed in both strains, and indicates the widely described up-regulation of IBA1 during inflammation.

Furthermore, IBA1 positive cells were counted in two areas close to the injection site: the septofimbrial nucleus and caudate-putamen (Fig. R-31). ANOVA revealed differences between groups in both areas, septofimbria ($F = 13.3$; $df = 3, 10$; $P < 0.001$) and caudate-putamen ($F = 11.7$; $df = 3, 10$; $P < 0.001$). Specifically, NA injection resulted in a slight increase in IBA1 positive cells in WT mice, which did not occur in $CCR2^{-/-}$ mice. So, the NA-induced increase in IBA1 positive cells is dependent on CCR2 integrity. To find out the origin of such increase, a proliferation study was carried out, along with the analysis of the infiltrated cells.

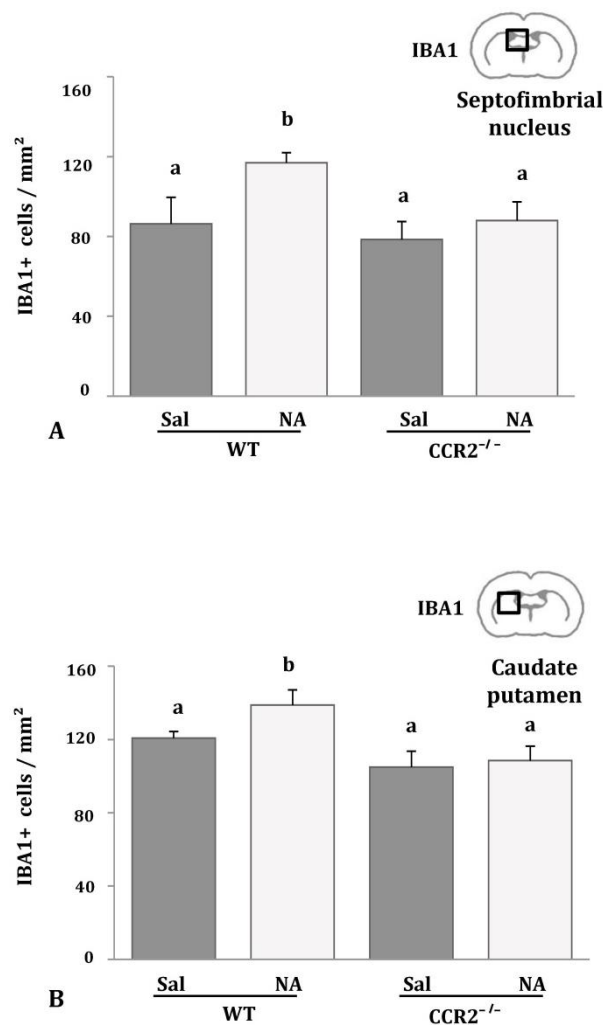
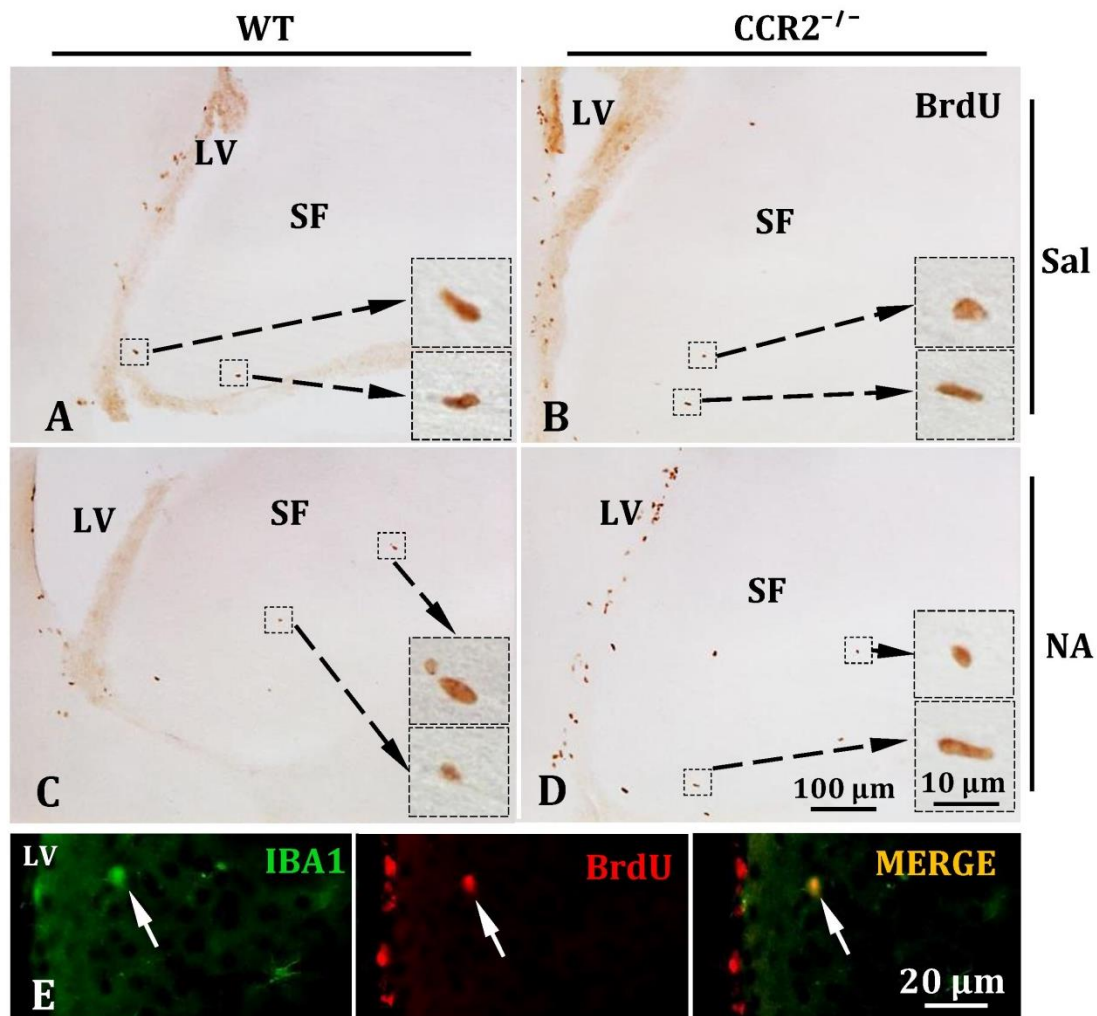


Figure R-31. IBA1 positive cell counts in CCR2 deficiency mice injected with NA. IBA1 positive cells were counted in septofimbria (A) and caudate-putamen (B) of WT and $CCR2^{-/-}$ animals injected with saline or NA, and sacrificed 6 h post-injection. Cells counts are expressed per unit surface. Bars in the histogram are mean + SD of $n = 3$ saline injected, and $n = 4$ NA injected animals. ANOVA analysis was performed to compare group means. Letters a and b on top of the bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of a statistical difference ($P < 0.001$) between the compared groups.

5.5.2. No signs of stimulated microglia proliferation during NA-induced inflammation

With the aim of addressing if microglia proliferation was responsible for the observed increase in IBA1 positive cells after NA injection, the proliferating cells were labelled with bromodeoxyuridine (BrdU) administered by intraperitoneal injection two hours later from ICV injection. Proliferating cells were later detected in tissue sections by anti-BrdU immunohistochemistry (Fig. R-32, A-D), and BrdU positive cells in the septofimbrial nucleus were counted (Fig. R-32, F).

Septofimbria was preferred to caudate-putamen because in this last region the subventricular zone niche would largely account for BrdU positive cell counts. Double immunofluorescence with anti-BrdU and IBA1 showed that microglia/macrophages are proliferating in the septofimbria (Fig. R-32 E).



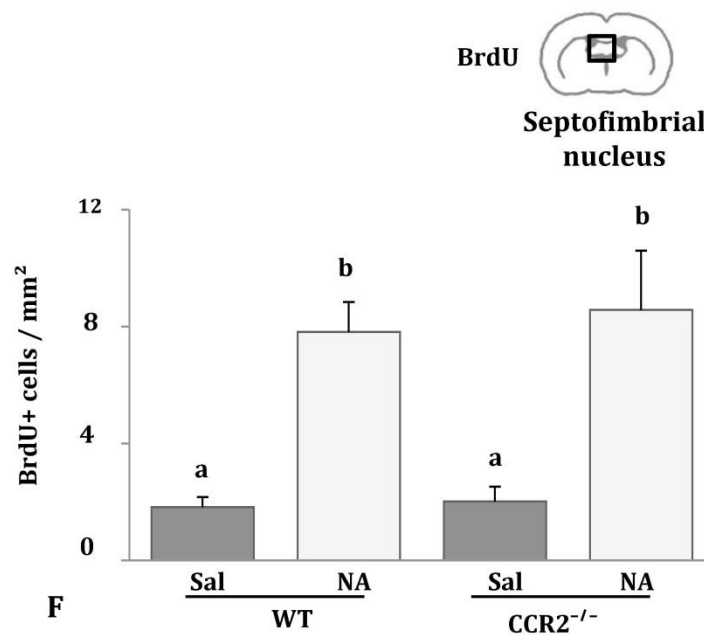


Figure R-32. BrdU proliferation study in CCR2 deficient mice injected with NA. Mice were saline/NA injected within the lateral ventricle, and in parallel, 2 h later they received an intraperitoneal injection of the proliferation marker bromodeoxyuridine (BrdU). After 6 h, divided cells that incorporated BrdU were detected by anti-BrdU immunohistochemistry. Histological images were taken from the septofimbrial nucleus in WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) mice, injected with saline (A, B) or with NA (C, D). Scattered BrdU positive cells can be observed in septofimbria (magnified details in insets). Abundant positive cells appear next to the ventricular wall (LV), which highlight the subventricular neurogenesis niche. Double immunofluorescence (E) using IBA1 (green) and BrdU (red) point out microglial proliferation in septofimbria (white arrow in E). BrdU positive cell counts were carried out in the septofimbrial nucleus, and expressed as cells per surface unit (F). Histogram bars are mean + SD of n= 3 saline injected, and n= 4 NA injected animals. Group means were compared by ANOVA. Letters (a, b) above bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of a statistically significant difference ($P < 0.001$). SF = septofimbrial nucleus; LV = lateral ventricle.

Wild type and CCR2^{-/-} mice were either saline or NA injected, and BrdU positive cells in the septofimbrial nucleus were counted. ANOVA revealed statistical differences among the groups ($F = 27.5$; $df = 3, 10$; $P < 0.001$). Basal proliferation was similar in both strains ($P = 0.42$), and NA injection provoked a 4-fold increase also in both strains (Fig. R-32 F). Pairwise multiple comparisons showed no difference in NA stimulated proliferation between WT and CCR2^{-/-} ($P = 0.892$).

These results suggest that NA injection does not stimulate microglial proliferation in WT animals, and that CCR2^{-/-} mice respond in a similar fashion.

Thus, microglial proliferation could be ruled out as the only explanation for the observed increase in IBA1 positive cells upon NA stimulation. We next explored if the recruitment of peripheral cells could account for such increase.

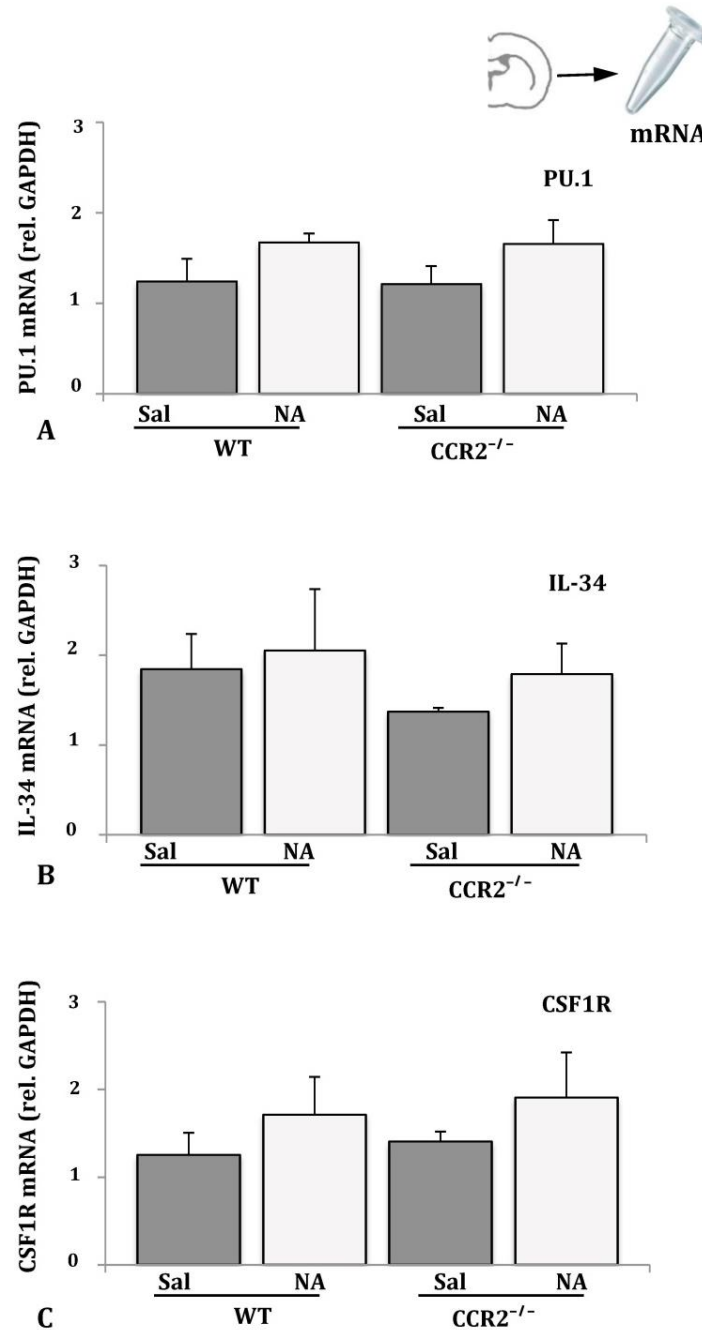
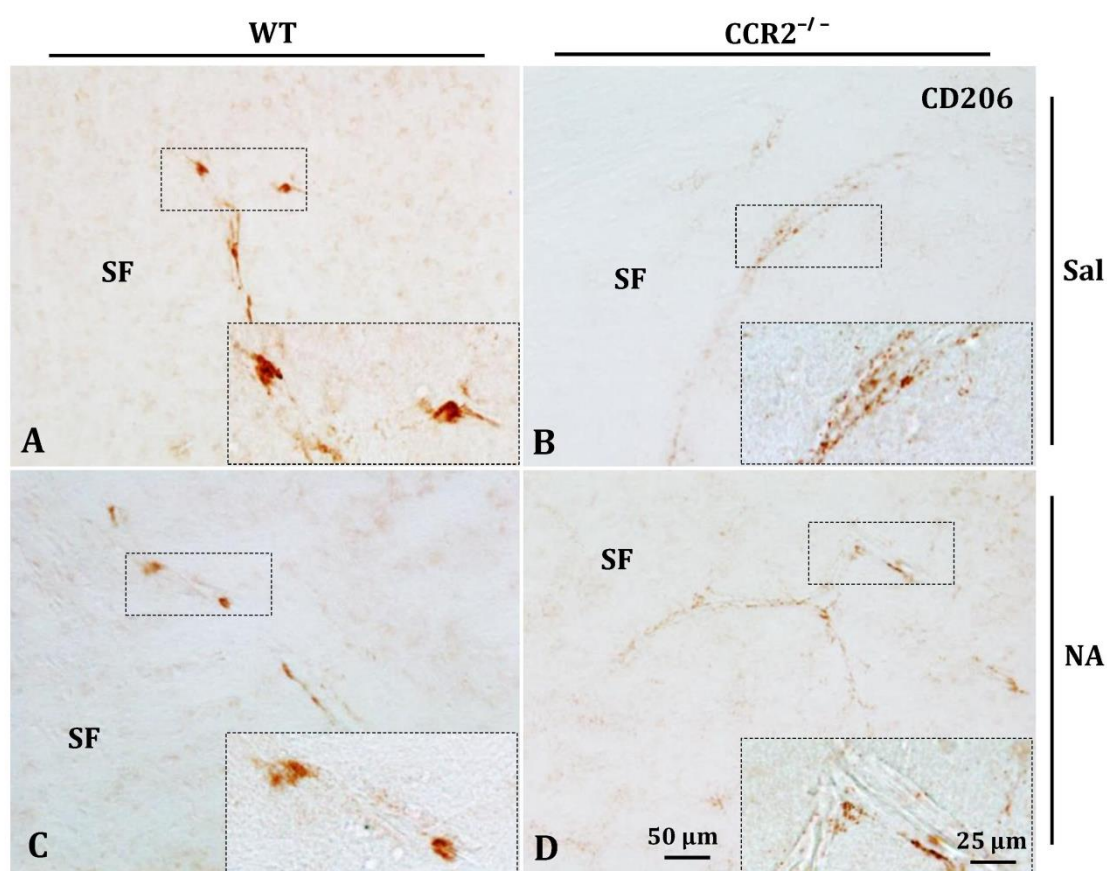


Figure R-33. Expression of microglia proliferation related genes during NA-induced neuroinflammation. The expression of three genes related to microglia proliferation (PU.1: A, IL-34: B and CSF1R: C) was quantified by qPCR in brain tissue obtained from WT and CCR2^{-/-} mice treated with saline/NA. mRNA levels of the three genes were relativized to GAPDH mRNA. Histograms present means + SD for n= 3 saline injected, and n= 4 NA injected animals. Kruskal-Wallis test for PU.1 and ANOVA for IL-34 and CSF1R were used for means comparisons; no differences were found in any of the genes analyzed.

5.5.3. MHCII and Ly6C positive cells, but not perivascular macrophages, are recruited during NA-induced inflammation

Another conceivable cause of the IBA1 positive cell increase observed in WT animals after the injection of NA is the recruitment of circulating monocyte/macrophages towards the brain parenchyma. As mentioned before, it has been described that after the injection of NA within the lateral ventricle of rats there is a prominent infiltration of leucocytes that reaches a peak 6-24 hours later (Granados-Durán et al., 2015); infiltration occurs preferentially from large blood vessels located in the meninges, in choroid plexus, and in subependymal parenchyma.

Different infiltrating cell types were studied by immunohistochemistry after NA stimulation in both WT and *CCR2*^{-/-} mice. Firstly, perivascular macrophages were identified with an antibody against the mannose receptor CD206, and CD206 positive cells were counted (Fig. R-34). One-way ANOVA showed no statistical differences among the groups ($P = 0.836$; Fig. R-34 E).



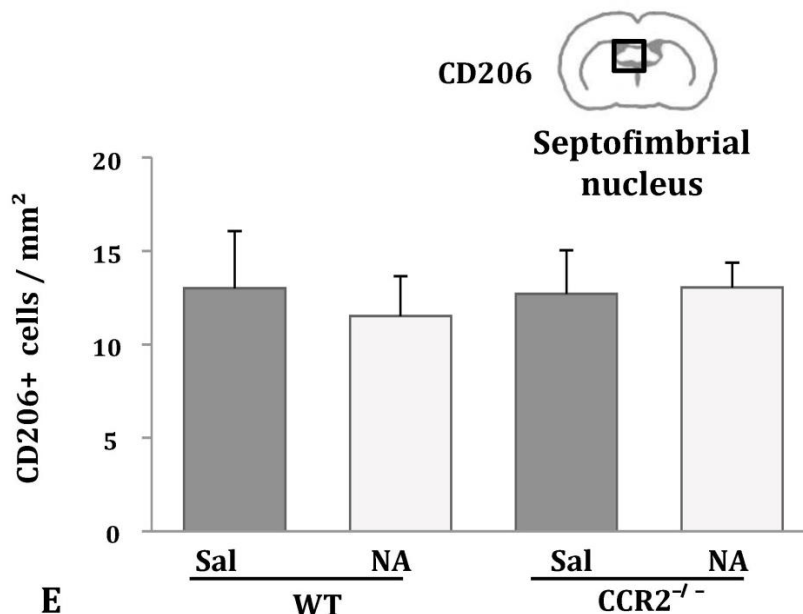


Figure R-34. Perivascular macrophages recruitment into the brain parenchyma after NA injection. Perivascular macrophages were identified by immunohistochemistry with CD206/mannose receptor. WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) mice, either injected with saline (A, B) or NA (C, D) were studied. Images show the septofimbrial area, with magnified details of some CD206 positive cells in insets. CD206 positive cells in septofimbrial nucleus were counted (F). Bars represent the mean + SD of n= 3 saline injected, and n= 4 NA injected animals. ANOVA revealed the absence of differences between groups. SF = septofimbrial nucleus.

No MHCII positive cells were found in saline injected animals of both strains (Fig. R-35 A, B). Conversely, NA injected animals from both WT and CCR2^{-/-} strains presented abundant MHCII positive cells (Fig. R-35 C, D), which appeared grouped at different locations, particularly in the corpus callosum (see insets in Fig. R-35 C, D). This observation suggests MHCII positive cells arising from blood vessels and migrating radially into the nervous parenchyma.

MHCII positive cell counts were performed in the corpus callosum. In accordance to our observations, the number of MHCII positive cells dramatically increased after NA injection in both strains compared to saline treated mice, where positive cells were virtually absent. Besides, WT and CCR2^{-/-} injected with NA had similar MHCII positive cell density ($P = 0.575$; Fig. R-35 F).

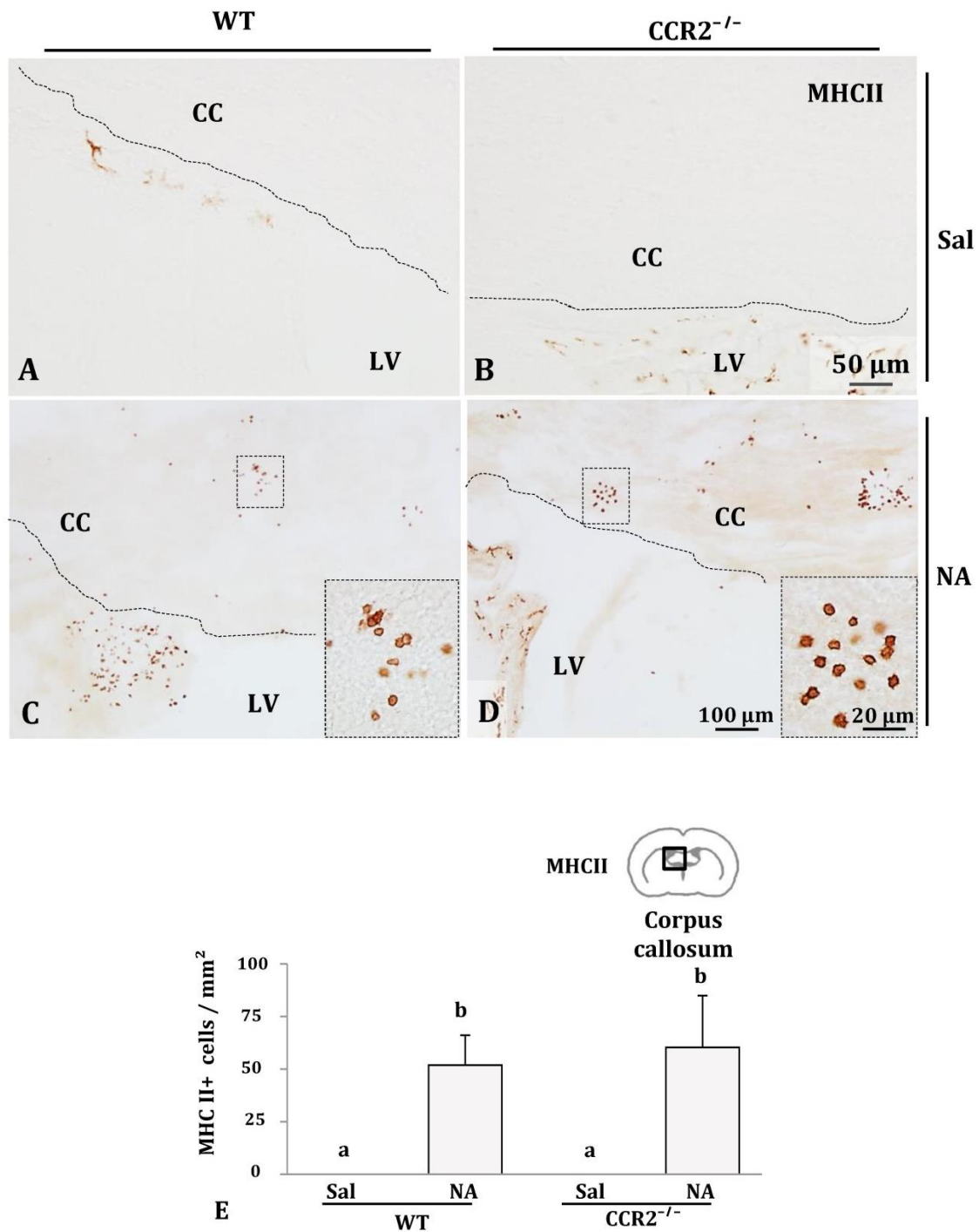


Figure R-35. MHCII positive cells recruitment into the brain parenchyma after NA injection. Histological images of MHCII immunostaining taken from the corpus callosum of WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) mice, which were previously injected with saline (A, B) or NA (C, D). Sections from saline treated animals are virtually devoid of MHCII cells (A, B). Conversely, after NA treatment groups of MHCII positive cells appear scattered in the corpus callosum of both WT (C) and CCR2^{-/-} (D) mice (insets show magnified details of MHCII cells). On the other hand, MHCII positive cells were counted in the corpus callosum (E). Bars in the histogram are mean + SD (Sal, n= 3; NA, n= 4). The Kruskal-Wallis test was used to compare group means. Letters (a, b) on top of the bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of significant differences (P < 0.001). CC = corpus callosum; LV = lateral ventricle.

Finally, the recruitment of Ly6C positive cells after NA administration was also analyzed. Ly6C is a membrane protein expressed by monocytes/dendritic cell precursors, T lymphocytes, natural killer cells, neutrophils and also endothelial cells (Lee et al., 2013). It is useful for the identification of cells, which can be divided in two populations: CCR2⁺ Ly6C^{hi} and CCR2⁻ Ly6C^{hi}.

In saline injected animals, Ly6C highlighted the vascular endothelium, and no Ly6C positive cells were found (Fig. R-36 A, B). Conversely, in NA-injected mice the recruitment of Ly6C positive cells was evident in both WT and CCR2^{-/-} strains (Fig. R-36 C, D). Ly6C positive cell counts (performed in the corpus callosum) and one-way Kruskal-Wallis test confirmed these observations ($P < 0.005$). Ly6C cell counts were significantly higher in NA treated animals, however CCR2 deficiency did not make any difference compared to WT ones ($P = 0.126$).

Given the different possible identities of the recruited Ly6C positive cells, a more detailed double immunofluorescence study was carried out using Ly6C (red in Fig. R-37) and IBA1 (green in Fig. R-37) antibodies. In WT animals it was possible to find Ly6C positive and IBA1 negative cells (Fig. R-37 B), as well as Ly6C positive and IBA1 positive cells (Fig. R-37 C). We hypothesize that these might be monocytes, whose recruitment is CCR2 dependent.

However, in the strain CCR2^{-/-} no Ly6C positive cell was also labeled by IBA1 (Fig. R-37 A); the identity of these cells is not so clear. As Ly6C positive cell counts in the corpus callosum of both strains were similar, it is reasonable to infer that most Ly6C cells access the brain parenchyma in a CCR2 independent fashion.

In summary, the study on cell recruitment after NA injection revealed that: i) there is no infiltration of perivascular macrophages (CD206 positive); ii) there is a considerable recruitment of MHCII positive cells, which is not dependent on CCR2 signaling (as it was of similar magnitude in WT and CCR2^{-/-} strains); iii) Ly6C positive unknown cells are also recruited, along with a probably small fraction of Ly6C positive monocytes. The latter could account for the IBA1 positive cell increase initially observed, which was also dependent on CCR2 (Section 5.5.1).

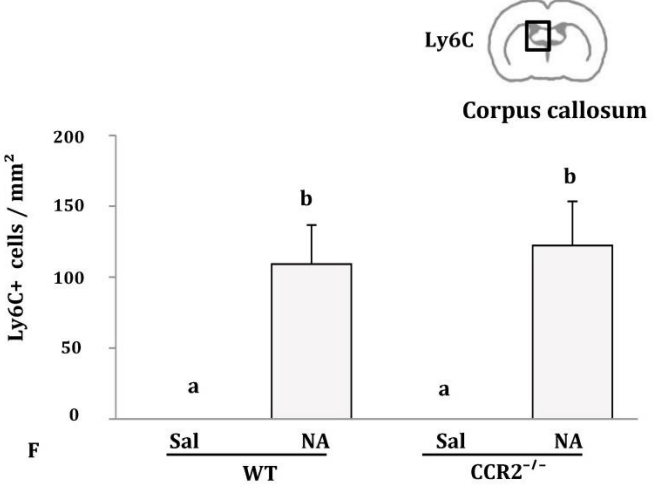
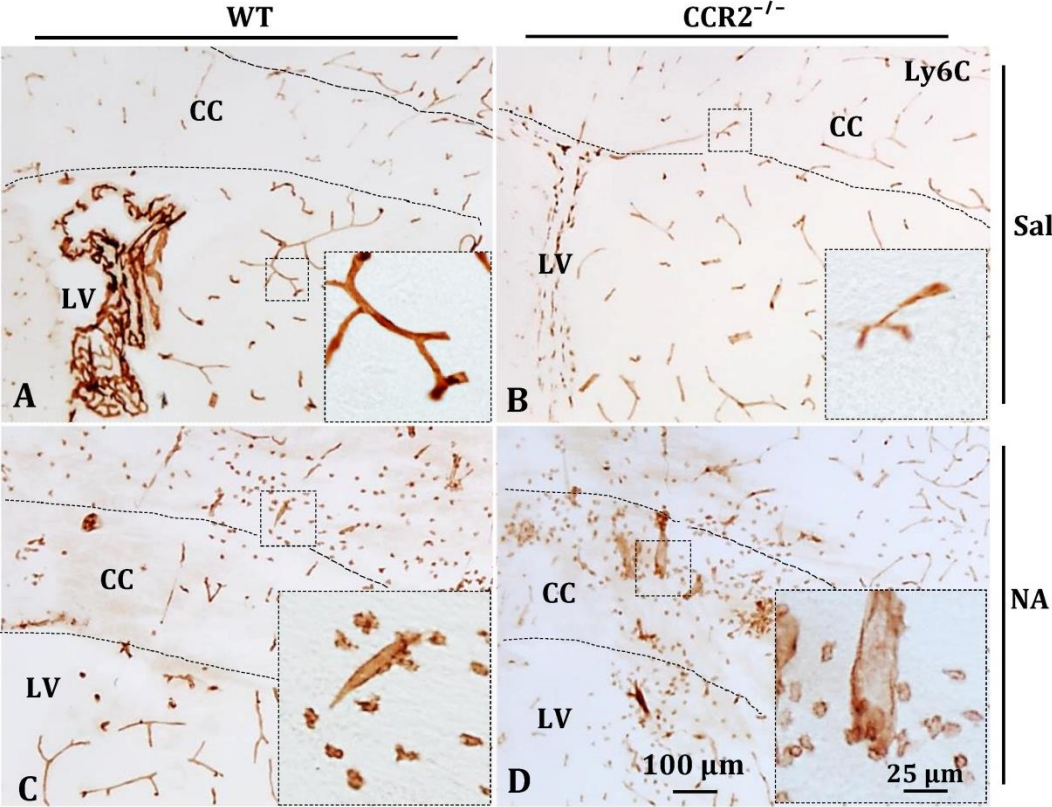


Figure R-36. Recruitment of Ly6c positive cells into the brain parenchyma after NA injection. Histological images were taken from the corpus callosum of WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) animals, 6 h after the injection of saline (A, B) or NA (C, D). Ly6C immunostaining revealed the total absence of Ly6C positive cells in the corpus callosum of saline injected animals. However blood vessels were clearly identified, as is shown in insets (A, B). Upon NA injection, abundant Ly6C positive cells appeared, both in WT (C) and CCR2^{-/-} animals (D). Furthermore, Ly6C positive cells were counted in the corpus callosum (E). Bars in histogram are mean + SD (Sal, n= 3; NA, n= 4) of Ly6C positive cells per mm². As expected, Kruskal-Wallis test confirmed a significant increase in Ly6C cells after NA injection (P < 0.005), but no differences were detected between WT and CCR2^{-/-} mice (P = 0.126). SF = septofimbrial nucleus; LV = lateral ventricle.

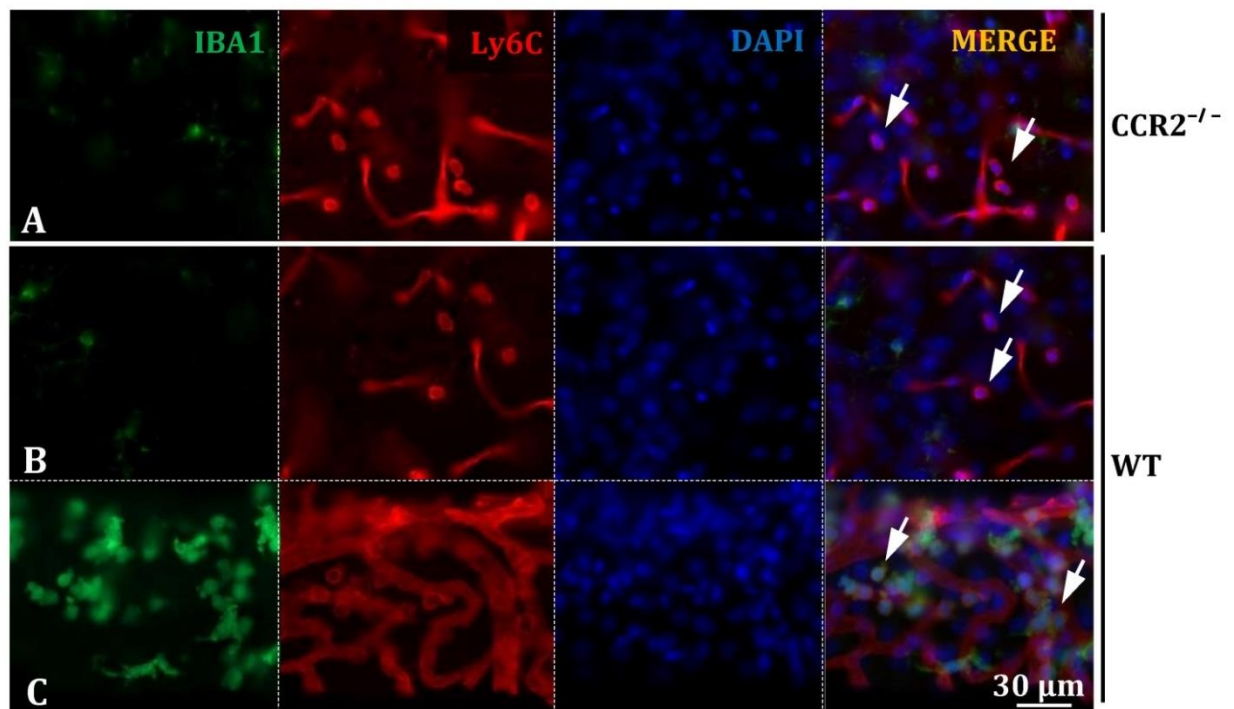


Figure R-37. CCR2 deficiency determines the Ly6C-positive cell type that is recruited after NA-injection. To further investigate which type of Ly6C cell infiltrates the brain parenchyma after the injection of NA, double immunofluorescence with IBA1 (green in A-C) and Ly6C (red in A-C) was performed. In $CCR2^{-/-}$ tissue sections (A) Ly6C positive (red) but IBA1 negative, were found. These cells were not identified (white arrows in A). However, in brain sections from WT animals (B, C) Ly6C positive cells were frequently IBA1 positive (white arrows in C) and therefore identified as infiltrated monocytes. In the same WT animals, Ly6C positive and IBA1 negative cells could be found as well (white arrows in B).

5.5.4. NA provoked the up-regulation of various cytokines, although more moderately in $CCR2^{-/-}$ mice

It has been widely documented that in $CCR2$ deficient mice the recruitment of monocyte/macrophages into inflamed tissues is amply diminished (Crane et al., 2009).

Thus, this strain offers an opportunity to evaluate the importance of resident cells in the inflammatory response, in our case that induced by NA. Therefore, inflammation was provoked by ICV injection of NA in WT and $CCR2^{-/-}$ mice, with the purpose of measuring various inflammatory mediators.

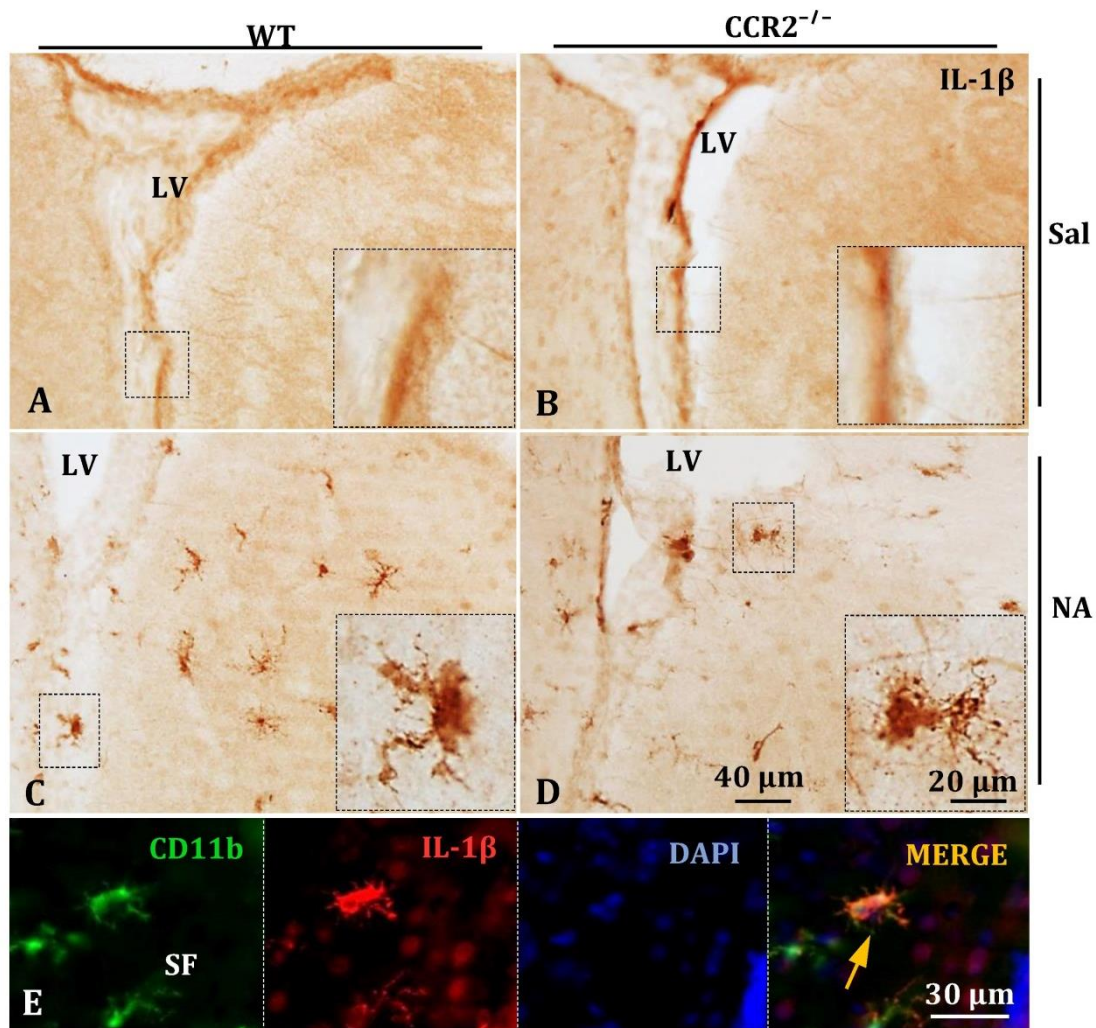


Figure R-38. IL-1 β immunostaining in CCR2 deficient mice during NA-generated neuroinflammation. Sections from WT (A, C) and CCR2^{-/-} (B, D) mice injected with saline (A, B) or NA (C, D) were immunostained with IL-1 β antibody. Histological images were taken from areas nearby the site of injection, the right lateral ventricle. While IL-1 β staining was negative in saline injected animals (A, B; only brownish background was observed), in NA injected animals frequent IL-1 β positive cells were present. The insets show amplified details. Double immunofluorescence (E) identified most IL-1 β positive cells (red in E) as microglia/macrophages (yellow arrow in E), as they were labeled by CD11b (green in E).

The pro-inflammatory cytokine IL-1 β was first evaluated by immunohistochemistry. IL-1 β positive cells were counted in the septofimbrial nucleus and in caudate-putamen. Positive label for IL-1 β on samples treated with saline was undetectable (Fig. R-38 A, B), conversely to NA-injected samples where IL-1 β positive cells were evident in periventricular brain areas in both strains (Fig. R-38 C-D).

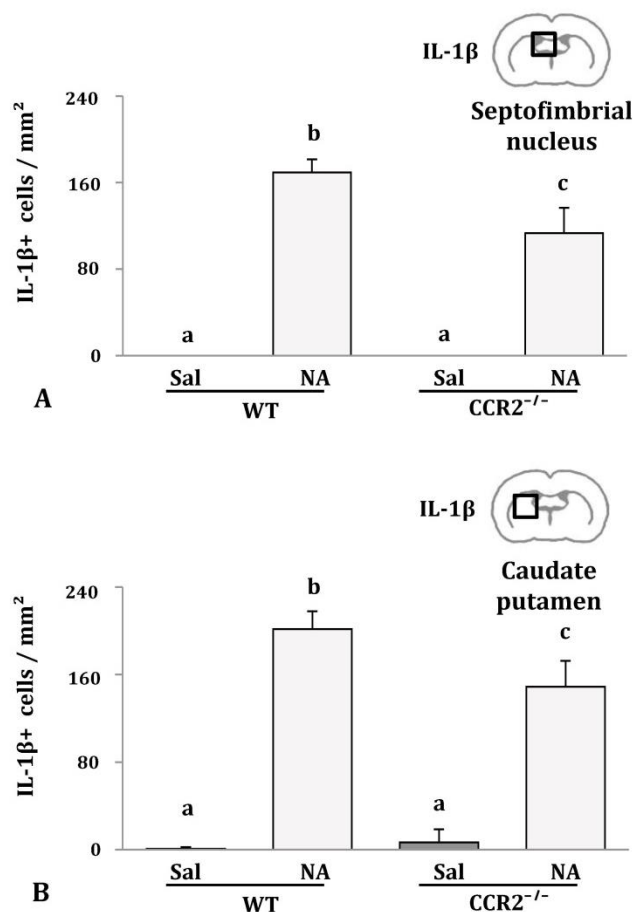


Figure R-39. IL-1 β positive cell counts in CCR2 deficiency mice during NA-induced neuroinflammation. Counting of IL-1 β positive cells was carried out in the septofimbrial nucleus (A) and caudate-putamen area (B) of WT and CCR2^{-/-} animals, after 6 h injection of saline/NA. Bars represent the mean + SD (Sal, n = 3; NA, n = 4). The groups means were compared by the Kruskal-Wallis test, which showed a significant increase in IL-1 β positive cells after NA injection in both strains ($P < 0.001$ for both areas). Such increase was more moderate in CCR2^{-/-} mice than in WT animals. Letters (a–c) above bars indicate the absence (if same letter) or presence (if different letter) of significant differences between groups ($P < 0.05$).

Doble immunofluorescence with CD11b, a marker of macrophages/microglia, identified most IL-1 β positive cells as these cell types (Fig. R-38 E). Kruskal-Wallis test showed that IL-1 β positive cell counts in the different groups were statistically different (Fig. R-39) in both septofimbria ($P < 0.001$) and caudate-putamen ($P < 0.001$).

Compared to saline injected animals, NA-injection provoked a dramatic increase in IL-1 β positive cells in both strains. However, such increase was less pronounced in CCR2^{-/-} mice compared to that observed in WT ones ($P < 0.05$).

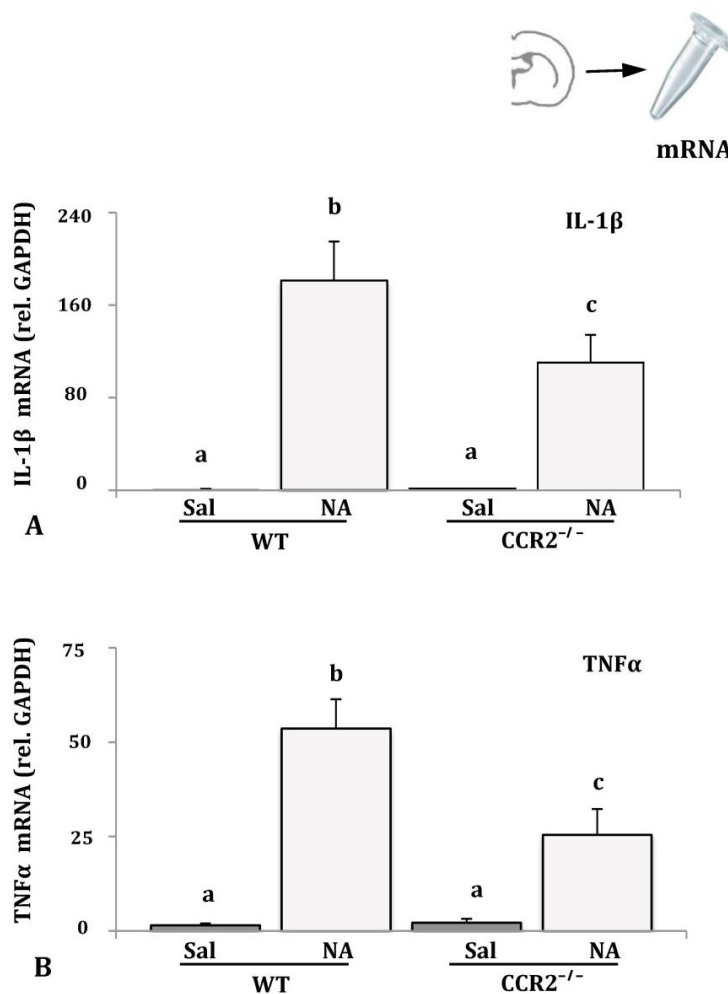


Figure R-40. Expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α after NA-injection in CCR2 deficient mice. Wild type and CCR2^{-/-} animals were injected with saline or NA, and 6 h later their brains dissected out for total RNA extraction. IL-1 β (A) and TNF α (B) mRNA levels were quantified by qPCR, and expressed relative to mRNA levels of the housekeeping gene GAPDH. Histogram bars represent mean + SD of n= 3 saline injected and n= 4 NA injected animals. Kruskal-Wallis test was used to compare group means ($P < 0.005$ for both cytokines). Letters (a-c) on bars indicate the absence (same letter) or the existence (different letters) of significant differences when pair comparisons were performed ($P < 0.05$).

The expression of IL-1 β and other pro-inflammatory cytokines was also quantified by qPCR. Similarly to the results obtained by immunohistochemistry, NA injection resulted in a prominent increase in IL-1 β mRNA levels ($P < 0.005$), which was milder in CCR2^{-/-} mice ($P < 0.05$; Fig R-40 A). TNF α mRNA levels behaved in a similar fashion ($P = 0.05$; Fig R-40 B). Therefore, NA provoked a significant up-regulation of both cytokines, but to some extent dependent on CCR2 signaling integrity.

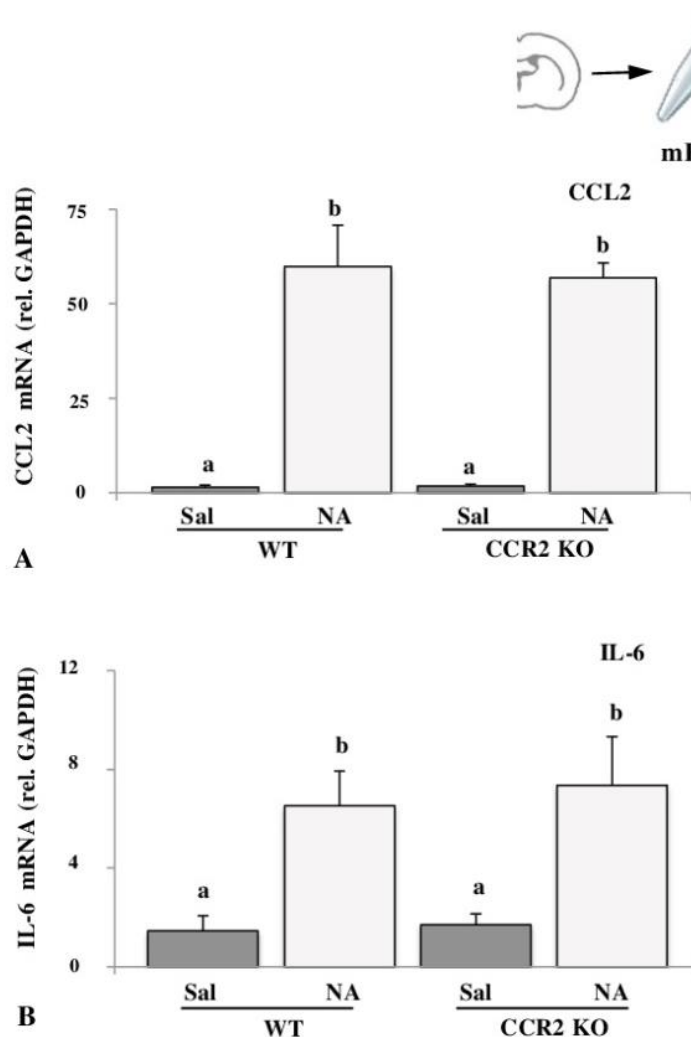


Figure R-41. Expression of the chemokine CCL2 and the cytokine IL-6 after NA-injection in CCR2 deficiency. The same RNA samples used in the previous figure were here employed for qPCR quantification of other pro-inflammatory cytokines, CCL2 (also known as MCP-1; **A**) and IL-6 (**B**). Group means were compared by the Kruskal-Wallis test. Letters (a-b) on bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of significant differences when pair comparisons were performed ($P < 0.05$).

Other chemotactic (CCL2, the ligand of CCR2) and pro-inflammatory (IL-6) cytokines were also evaluated by qPCR. NA-injection induced the expression of both CCL2 ($P = 0.626$; Fig. R-41 A) and IL-6 ($P = 0.518$; Fig. R-41 B), but in both cases there were no differences in CCR2^{-/-} mice compared to WT animals.

On the other hand, some anti-inflammatory cytokines were analyzed as well, in particular IL-10 (Fig. R-42 A), TGF β (Fig. R-42 B) and IL-4 (Fig. R-42 C).

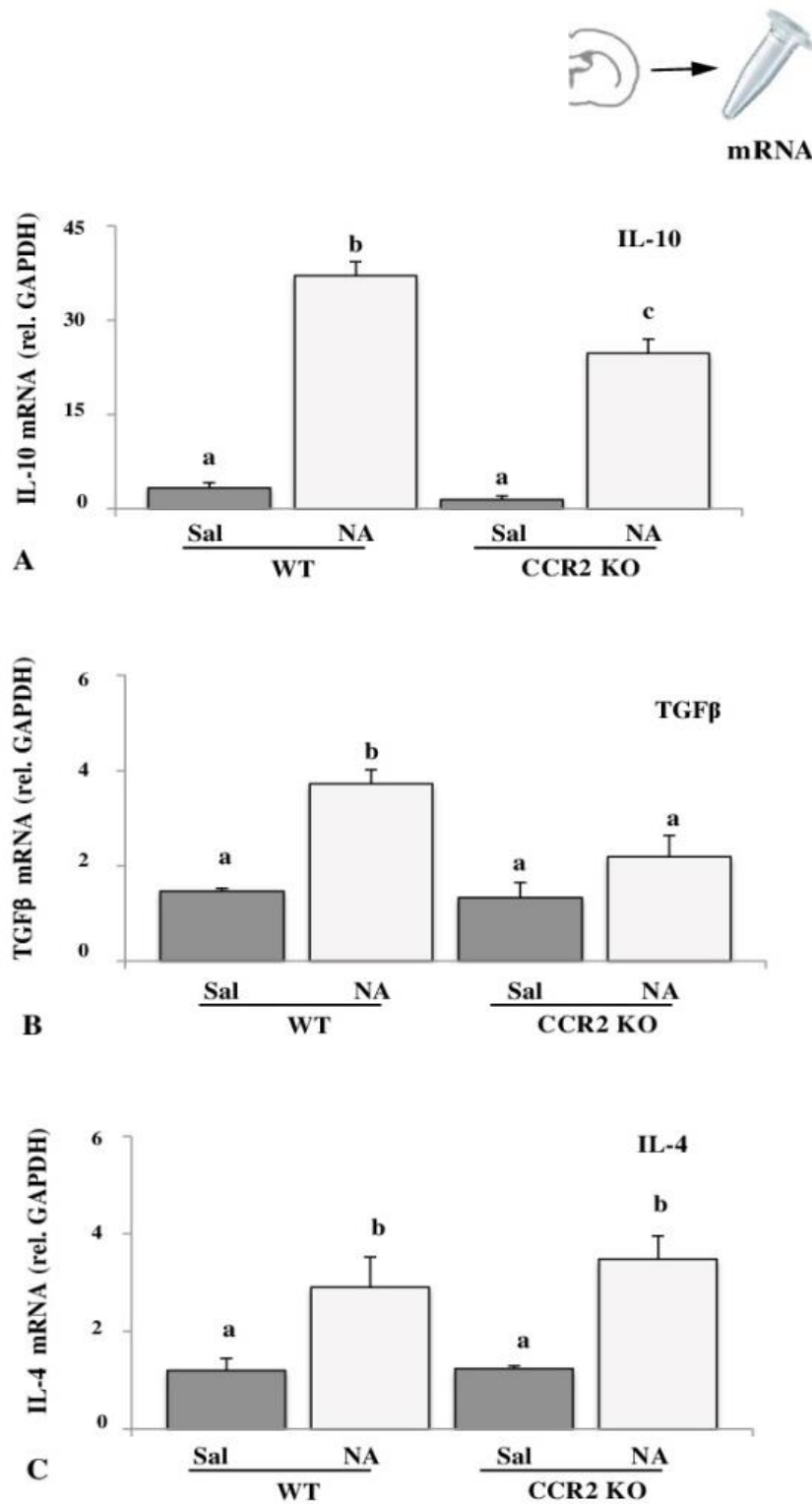


Figure R-42. Expression of the anti-inflammatory cytokines IL-10, TGFβ and IL-4 in CCR2 deficient mice after NA-injection. The same RNA samples used in the previous figure were here employed for qPCR quantification of the anti-inflammatory cytokines IL-10 (A), TGFβ (B) and IL-4 (C). The Kruskal-Wallis test was used for group mean comparisons. Letters (a-c) on bars indicate the absence (same letter) or presence (different letter) of significant differences when pair comparison was performed ($P < 0.05$).

Saline injection induced the up-regulation of these three anti-inflammatory cytokines, although to a larger extent for IL-10 ($P < 0.005$; about 30-fold increase) and less pronounced for TGF β and IL-4 ($P < 0.005$; about 2-fold increase). In CCR2^{-/-} mice, the NA induced up-regulation of these cytokines was not always as that observed in WT animals. Specifically, IL-10 mRNA levels suffered a milder increase in CCR2^{-/-} mice, as occurred for IL-1 β or TNF α (Figs. R-40 and R-42 A), TGF β did not experience any significant change in CCR2^{-/-} animals upon NA injection (Fig. R-42 B), and finally IL-4 suffered a similar increase in both strains (Fig. R-42 C).

Hence, the ICV injection of NA induces the expression of various pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as chemotactic cytokines. This induction is in some cases (CCL2, IL-6, IL-4) independent of CCR2 signaling, while in other cases is partially (IL-1 β , TNF α , IL-10) or completely (TGF β) dependent.

TABLE R-1. Morphometric values of microglial cells from the septofimbrial nuclei (mean \pm SD, n=160)

Parameter	2 h		4 h		12 h	
	Saline	NA	Saline	NA	Saline	NA
<i>Cell circularity</i>	0.005 \pm 0.001	0.009 \pm 0.004	0.007 \pm 0.006	0.022 \pm 0.021	0.006 \pm 0.003	0.031 \pm 0.020
<i>Convex hull area (μm^2)</i>	2214 \pm 525	1695 \pm 461	1940 \pm 770	1183 \pm 683	2135 \pm 674	886 \pm 443
<i>Cell perimeter (μm)</i>	1181 \pm 254	902 \pm 222	1040 \pm 400	592 \pm 325	1132 \pm 374	449 \pm 223
<i>Convex hull span ratio</i>	1.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.6	1.6 \pm 0.5	1.7 \pm 0.7	1.4 \pm 0.4	1.8 \pm 0.6
<i>Convex hull circularity</i>	0.86 \pm 0.03	0.81 \pm 0.11	0.83 \pm 0.07	0.77 \pm 0.11	0.85 \pm 0.07	0.78 \pm 0.10
<i>Max/Min convex hull radii</i>	1.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6	2.1 \pm 0.9	1.7 \pm 0.4	2.0 \pm 0.6
<i>Roughness</i>	6.6 \pm 0.9	5.6 \pm 1.1	5.9 \pm 1.4	4.2 \pm 1.5	6.3 \pm 1.4	3.7 \pm 1.2
<i>Convex hull perimeter (μm)</i>	179 \pm 22	162 \pm 22	168 \pm 33	133 \pm 36	176 \pm 28	115 \pm 27
<i>Density</i>	0.23 \pm 0.04	0.32 \pm 0.07	0.25 \pm 0.08	0.35 \pm 0.13	0.27 \pm 0.06	0.42 \pm 0.13
<i>Convex hull mean radii (μm)</i>	29 \pm 4	27 \pm 4	28 \pm 5	23 \pm 6	29 \pm 5	20 \pm 4
<i>Cell area (μm^2)</i>	504 \pm 108	523 \pm 123	435 \pm 118	371 \pm 195	562 \pm 193	344 \pm 139
<i>Diameter of the bounding circle (μm)</i>	66 \pm 9	63 \pm 12	64 \pm 13	52 \pm 14	66 \pm 10	45 \pm 10
<i>Maximum span across the convex hull (μm)</i>	65 \pm 9	62 \pm 12	63 \pm 13	52 \pm 14	65 \pm 10	45 \pm 10
<i>Fractal dimension</i>	1.37 \pm 0.02	1.35 \pm 0.04	1.36 \pm 0.04	1.30 \pm 0.06	1.36 \pm 0.03	1.28 \pm 0.06
<i>Lacunarity</i>	0.41 \pm 0.05	0.38 \pm 0.04	0.42 \pm 0.05	0.38 \pm 0.05	0.42 \pm 0.07	0.37 \pm 0.07

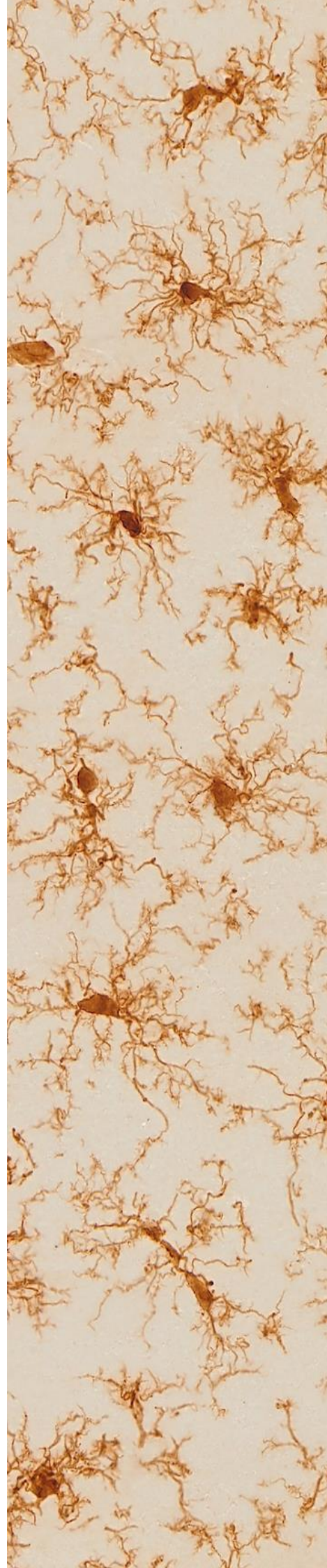
TABLE R-2. Morphometric values of microglial cells from hippocampus (mean \pm SD, n=155)

Parameter	2 h		4 h		12 h	
	Saline	NA	Saline	NA	Saline	NA
<i>Cell circularity</i>	0.003 \pm 0.001	0.004 \pm 0.002	0.003 \pm 0.001	0.013 \pm 0.008	0.003 \pm 0.001	0.018 \pm 0.020
<i>Convex hull area (μm^2)</i>	3107 \pm 697	2926 \pm 719	3416 \pm 702	1640 \pm 748	3235 \pm 642	1422 \pm 635
<i>Cell perimeter (μm)</i>	1687 \pm 383	1662 \pm 401	1929 \pm 386	844 \pm 370	1827 \pm 426	729 \pm 329
<i>Convex hull span ratio</i>	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.5 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3
<i>Convex hull circularity</i>	0.87 \pm 0.04	0.87 \pm 0.04	0.87 \pm 0.03	0.82 \pm 0.10	0.88 \pm 0.03	0.82 \pm 0.07
<i>Max/Min convex hull radii</i>	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2	1.9 \pm 0.5
<i>Roughness</i>	8.0 \pm 1.1	8.1 \pm 1.5	8.7 \pm 1.2	5.3 \pm 1.6	8.4 \pm 1.3	4.9 \pm 1.5
<i>Convex hull perimeter (μm)</i>	210 \pm 24	204 \pm 26	221 \pm 23	155 \pm 33	214 \pm 22	143 \pm 34
<i>Density</i>	0.21 \pm 0.04	0.26 \pm 0.05	0.22 \pm 0.04	0.34 \pm 0.09	0.21 \pm 0.03	0.35 \pm 0.08
<i>Convex hull mean radii (μm)</i>	35 \pm 4	34 \pm 4	37 \pm 4	26 \pm 6	35 \pm 4	24 \pm 5
<i>Cell area (μm^2)</i>	651 \pm 183	754 \pm 199	747 \pm 126	533 \pm 198	686 \pm 171	494 \pm 238
<i>Diameter of the bounding circle (μm)</i>	78 \pm 9	75 \pm 9	82 \pm 10	56 \pm 12	79 \pm 9	55 \pm 14
<i>Maximum span across the convex hull (μm)</i>	78 \pm 10	74 \pm 9	81 \pm 10	58 \pm 12	78 \pm 9	54 \pm 14
<i>Fractal dimension</i>	1.39 \pm 0.03	1.40 \pm 0.03	1.42 \pm 0.04	1.33 \pm 0.05	1.41 \pm 0.04	1.32 \pm 0.05
<i>Lacunarity</i>	0.41 \pm 0.06	0.39 \pm 0.06	0.46 \pm 0.09	0.38 \pm 0.05	0.44 \pm 0.06	0.38 \pm 0.06

TABLE R-3. Morphometric values of microglial cells from hypothalamus (mean \pm SD, n=155)

Parameter	2 h		4 h		12 h	
	Saline	NA	Saline	NA	Saline	NA
<i>Cell circularity</i>	0.010 \pm 0.004	0.018 \pm 0.010	0.009 \pm 0.004	0.028 \pm 0.009	0.008 \pm 0.002	0.032 \pm 0.019
<i>Convex hull area (μm^2)</i>	1395 \pm 427	1006 \pm 303	1626 \pm 591	763 \pm 216	1589 \pm 445	777 \pm 429
<i>Cell perimeter (μm)</i>	773 \pm 188	558 \pm 158	795 \pm 230	411 \pm 88	797 \pm 193	431 \pm 289
<i>Convex hull span ratio</i>	1.4 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3	1.7 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3
<i>Convex hull circularity</i>	0.85 \pm 0.04	0.81 \pm 0.06	0.78 \pm 0.08	0.82 \pm 0.05	0.82 \pm 0.06	0.80 \pm 0.06
<i>Max/Min convex hull radii</i>	1.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	2.0 \pm 0.5	1.7 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	2.1 \pm 0.5
<i>Roughness</i>	5.4 \pm 1.0	4.5 \pm 0.8	4.9 \pm 0.9	3.8 \pm 0.5	5.1 \pm 1.0	3.8 \pm 1.6
<i>Convex hull perimeter (μm)</i>	143 \pm 22	123 \pm 18	159 \pm 26	107 \pm 15	154 \pm 22	107 \pm 27
<i>Density</i>	0.31 \pm 0.05	0.38 \pm 0.06	0.26 \pm 0.05	0.47 \pm 0.06	0.26 \pm 0.07	0.43 \pm 0.10
<i>Convex hull mean radii (μm)</i>	24 \pm 4	21 \pm 3	27 \pm 5	18 \pm 3	26 \pm 4	18 \pm 5
<i>Cell area (μm^2)</i>	422 \pm 91	370 \pm 89	411 \pm 124	356 \pm 91	410 \pm 164	306 \pm 119
<i>Diameter of the bounding circle (μm)</i>	54 \pm 8	47 \pm 8	63 \pm 12	41 \pm 6	59 \pm 9	42 \pm 10
<i>Maximum span across the convex hull (μm)</i>	53 \pm 8	47 \pm 8	62 \pm 12	41 \pm 6	59 \pm 10	42 \pm 10
<i>Fractal dimension</i>	1.35 \pm 0.02	1.32 \pm 0.04	1.33 \pm 0.03	1.29 \pm 0.04	1.33 \pm 0.03	1.27 \pm 0.04
<i>Lacunarity</i>	0.37 \pm 0.03	0.36 \pm 0.03	0.41 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	0.40 \pm 0.05	0.37 \pm 0.04

6. Discusión



6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA EN UN MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN EN FUNCIÓN DE SU MORFOLOGÍA, MEDIANTE EL USO DE ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO Y DE COMPONENTES PRINCIPALES

El objetivo de este trabajo ha sido poner de manifiesto y categorizar, de forma objetiva, los diferentes morfotipos que se pueden encontrar en una población heterogénea de células microgliales, procedentes de distintas localizaciones del cerebro y en diversos estados de activación. Tras cuantificar numerosos parámetros morfométricos en células de microglía individuales, se valoraron las diferencias y similitudes entre las células mediante varios métodos de análisis estadístico, lo que resultó en una clasificación de estas células en distintos tipos celulares. Finalmente, se relacionaron los diferentes morfotipos de microglía obtenidos con distintos estados de activación y con las distintas regiones del cerebro estudiadas.

6.1.1. Diferentes parámetros morfométricos medidos en la microglía revelan su activación inducida por la NA

Nuestro modelo experimental consiste en la inducción de un proceso neuroinflamatorio mediante la inyección de NA en el ventrículo lateral de ratas (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008; Grondona et al., 1996). De esta forma se produce una inflamación aséptica, que afecta a áreas cercanas a la pared ventricular en diferentes estructuras cerebrales, como la septofimbria, el hipocampo y el hipotálamo. La presencia de la citoquina IL-1 β en las células de la microglía indica que están polarizadas a un fenotipo M1 pro-inflamatorio (Olah et al., 2011; Orihuela et al., 2016; Walker et al., 2014). Doce horas después de la inyección de NA, la mayoría de las células microgliales muestran inmunotinción para IL-1 β (Fig. R-2). Sin embargo, también se encontraron células microgliales negativas a IL-1 β , que pueden considerarse en reposo (vigilantes), tanto en ratas controles inyectadas con solución salina como en ratas tratadas con NA a tiempos cortos tras la inyección. Por lo tanto, en este modelo de inflamación encontramos una población de microglía que presenta diversos estados de activación.

Con el objetivo de clasificar las células microgliales según su morfología y estado de activación, se midieron 5 parámetros morfológicos para cada célula muestreada: *dimensión fractal (D)*, *lacunaridad (Λ)*, *área*, *densidad* y *perímetro*. En las tres áreas cerebrales seleccionadas para este estudio (septofimbria, hipocampo e hipotálamo) todos estos parámetros fueron diferentes en las células microgliales de los animales tratados con NA en comparación con los controles (ratas inyectadas con solución salina o bien ratas sacrificadas a tiempos cortos después de la inyección de NA; Fig. R-3). Por lo tanto, los cambios morfológicos pueden estar estrechamente ligados a la conversión de la microglía desde un estado vigilante a un estado activado, es decir, a la polarización al fenotipo M1.

En comparación con los trabajos publicados por otros autores, los valores de D obtenidos aquí (dentro de un rango de 1,42-1,23) coinciden con la presencia de las cuatro formas ampliamente descritas de microglía: 1) ramificada en reposo/inactiva, 2) hipertrofiada, 3) arbustiva no reactiva, 4) no ramificada/ameboide/activada (Fernández and Jelinek, 2001; Karperien et al., 2013). Además, tras la inyección de NA los valores de D de las células microgliales disminuyeron en las tres áreas estudiadas (Fig. R-3 A-C), tal como han descrito esos mismos autores (Fernández and Jelinek, 2001; Karperien et al., 2013). Sin embargo, otros estudios encontraron un aumento en este parámetro en situaciones de lesión cerebral, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer o trastornos afectivos (Karperien et al., 2008; Soltys et al., 2001). Por otro lado, los valores de la lacunaridad (Λ) también disminuyeron después del tratamiento con NA (Fig. R-3 D-F), lo que indica un cambio de la forma de las células hacia una morfología más homogénea (Karperien et al., 2011). La clasificación de la microglía basada en los resultados de D se complementa con los datos de Λ ; se ha descrito una fuerte correlación entre D y Λ en la microglía tipo reactiva (Karperien et al., 2011), lo cual coincide con nuestros resultados.

Respecto a otros parámetros morfométricos, algunos estudios apuntan a una variabilidad sustancial en las células microgliales de la corteza cerebral sana (Kongsui et al., 2014; Torres-Platas et al., 2014) y microglía fagocítica (Perez-Pouchoulen et al., 2015).

También se observa una alta diversidad en la microglía presente en situaciones patológicas tales como el estrés crónico inducido (Hinwood et al., 2013) o el accidente cerebrovascular isquémico (Morrison and Filosa, 2013). Por ejemplo, el *perímetro* de la microglía disminuye después de la administración de lipopolisacárido (LPS), una oclusión permanente de la arteria cerebral media o una lesión cerebral traumática (Zanier et al., 2015). Nuestros resultados del *perímetro* coinciden con los descritos previamente; la inyección de NA indujo una reducción en el valor de este parámetro (Fig. R-3 M-O), lo que permitiría la identificación de diferentes morfotipos microgliales basándonos en los valores perimetrales. En nuestro modelo, el parámetro *densidad* (también llamado *solidez*) aumentó después del tratamiento con NA (Fig. R-3 J-L). En todas las áreas este aumento fue coherente con la presencia de diferentes morfotipos de microglía. Otros autores también observaron incrementos en los valores de *densidad* después de una lesión cerebral (Soltys et al., 2001; Zanier et al., 2015) o tras la inyección de LPS (Kongsui et al., 2015). Por último, los cambios en el parámetro *área* en nuestro modelo de inflamación no fueron consistentes, ya que se observó una disminución después de la inyección de NA, pero sólo en una de las áreas del cerebro estudiadas (el núcleo septofimbrial, Fig. R-3 G). Una resistencia similar al cambio de este parámetro morfométrico en células microgliales ha sido descrita en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer (Baron et al., 2014), en la microglía activada por envejecimiento y en ratas lesionadas quirúrgicamente (Hovens et al., 2014). Por lo tanto, se puede deducir que, al menos en nuestro modelo, la *dimensión fractal*, la *lacunaridad*, la *densidad* y el *perímetro*, pero no el *área* de la célula, son indicadores morfológicos sensibles de la activación de las células microgliales.

Nuestros resultados morfométricos se ajustan a ciertos morfotipos categorizados de la microglía que han sido previamente descritos (Fernández and Jelinek, 2001; Karperien et al., 2013). En primer lugar, un fenotipo ramificado de reposo o vigilancia, con soma celular pequeño, con ramificaciones primarias largas y ramificaciones secundarias bastante delgadas, estaría presente en animales inyectados con solución salina, y sería descrito por D , Λ y *perímetro* altos, y una baja *densidad*.

Cuatro horas después de la inyección de NA, otra morfología comenzaría a aparecer, que podría corresponder a microglía des-ramificada, con un soma más grande y prolongaciones más cortas y más gruesas. Esta morfología de la microglía se caracterizaría por valores inferiores de D , Λ y *perímetro*, y una *densidad* aumentada. Finalmente, un tercer morfotipo, presente en ratas 12 h después de la inyección de NA, sería la microglía no ramificada reactiva/activada, con un cuerpo celular grande y pocas prolongaciones de mayor grosor. Se caracterizaría por valores más bajos de D , Λ y *perímetro*, y *densidades* más altas. Este último morfotipo también podría estar asociado a la microglía M1 polarizada.

6.1.2. El análisis de clúster jerárquico y de componentes principales permite la clasificación morfológica de la microglía

Con el fin de categorizar adecuadamente los diferentes morfotipos que existen en la población microglial presente en nuestro modelo experimental y correlacionarlos con su estado de activación, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico o de clúster jerárquico (HCA, del inglés *hierarchical cluster analysis*; Fig. R-4 A). En este enfoque matemático, la elección de los parámetros es crucial para determinar el resultado del análisis. Los conjuntos de datos que se distribuyen de forma multimodal son los más apropiados para separar una población de células en morfotipos (Schweitzer and Ranehan, 1997). Sin embargo, sólo algunos autores han tenido en cuenta el índice multimodal (MMI, del inglés *multimodality index*) para hacer su selección de parámetros. Este enfoque más riguroso permitió la distinción de dos morfotipos de microglía después de la infección por Dengue (Diniz et al., 2016) y cuatro tipos de microglía reactiva después de la axotomía del nervio hipogloso (Yamada and Jinno, 2013). En nuestro modelo neuroinflamatorio, se midieron quince parámetros morfométricos y se analizaron sus conjuntos de datos por MMI. Aunque previamente se habían encontrado diferencias significativas en D , Λ y *densidad* al comparar la microglía procedente de animales tratados con NA respecto a los controles (tratados con salino), el MMI para esos parámetros resultó no ser adecuado para el análisis de clúster jerárquico.

En cambio, la *circularidad de las células* (CC, del inglés *cell circularity*), el *área del polígono convexo* (CHA, del inglés *convex hull area*), el *perímetro celular* (CP, del inglés *cell perimeter*) y la *ratio de diámetros del polígono convexo* (CHSR, del inglés *convex hull span ratio*) presentaron valores de MMI superiores a 0,55 y, por lo tanto, se escogieron para la clasificación de las células microgliales en grupos (Tabla R-1). Utilizando estos parámetros, y siguiendo el procedimiento de Thorndike (1953), la microglía presente en nuestro modelo experimental se clasificó en cuatro morfotipos o Clusters, que fueron numerados del 1 al 4 (Fig. R-4 B). La distribución de las células microgliales en un mapa territorial por análisis lineal discriminante (LDA, del inglés *linear discriminant analysis*; Fig. R-4 C) mostró que los Clústeres 3 y 4 fueron los más distantes, por lo que corresponden a los morfotipos más diferentes en nuestro modelo. Los Clústeres 1 y 2 estuvieron más próximos entre sí. Cuando se representan las células microgliales en el mismo mapa territorial pero usando un código de color relacionado con el tratamiento salino/NA (Fig. R-4 D) el Clúster 3 coincidió con la microglía de muestras salinas, por tanto debe corresponder a microglía vigilante, y el Clúster 4 ocupó el mismo lugar de la microglía de animales tratados con NA, y que debería ser por tanto microglía activada. Los Clústeres 1 y 2 incluyeron una mezcla de células de ratas tratadas con salino y con NA. Por lo tanto, aunque los Clústeres 1 y 2 representaron dos poblaciones microgliales diferentes según su morfología, no es posible asociar dichos Clústeres con un morfotipo vigilante o activado. Sobre la base de este resultado, aunque la correlación entre la forma y la activación en las células microgliales está ampliamente aceptada, la definición del estado de activación basándonos en la morfología no es siempre clara y directa.

Para dilucidar esta cuestión, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal components analysis*; Fig. R-6). El PCA considera otro conjunto de variables, que pueden ser diferentes a las consideradas en el LDA. Después de examinar todos los parámetros morfométricos, el PCA revela los que tienen más peso sobre la varianza. Por medio del PCA, los parámetros útiles seleccionados fueron *diámetro máximo a través del polígono convexo* (MSACH, del inglés *maximum span across the convex hull*) y *circularidad del polígono convexo* (CHC, del inglés *convex hull circularity*; Fig. R-7).

Las células se representaron en el plano PCA utilizando un código de 4 colores para indicar su asignación de Clúster (figura R-6 A), o un código de 2 colores para mostrar su tratamiento de origen, es decir, salino o NA (Fig. R-6 B-D). Por lo tanto, la microglía se puede mostrar desde un punto de vista diferente al obtenido mediante el LDA. Además, del total de células examinadas, el número de células perteneciente a cada Clúster en cada área cerebral y en cada tratamiento se representó mediante un histograma (Fig. R-5). Estos análisis adicionales (PCA e histograma) proporcionaron una visión más clara de los morfotipos encontrados en nuestro modelo. Aunque el LDA apuntó al Clúster 3 como microglía vigilante, el Clúster 2 se ajusta mejor con el estado de vigilancia, ya que su población disminuye en todas las áreas del cerebro después de la inyección de NA. El morfotipo del Clúster 2 es más abundante en el hipocampo y el núcleo septofimbrial, pero es bastante escaso en el hipotálamo. El morfotipo del Clúster 3 puede considerarse intermedio, ya que está presente tanto en muestras de animales tratados con solución salina como en animales tratados con NA. Al considerar los cambios en las distintas áreas estudiadas, en el hipotálamo el número de células del Clúster 3 disminuye después de la inyección de NA, pero sin embargo en el hipocampo aumenta. Una contradicción similar ocurre con el Clúster 1: tras la inyección de NA hay un aumento de este morfotipo en el hipocampo, pero una disminución en el hipotálamo. Por último, el Clúster 4 puede considerarse inequívocamente un morfotipo activado, ya que sólo aparece después de la inyección de NA en todas las áreas estudiadas. Por lo tanto, se ha desarrollado una herramienta útil, basada en la morfología celular, para clasificar las células microgliales en diferentes estados de activación. Sin embargo, es relevante tener en cuenta el área en estudio, ya que los resultados obtenidos con la microglía de un área pueden no ser extrapolables a otras áreas del cerebro. Es decir, el mismo morfotipo de microglía puede representar a una célula vigilante en una región del cerebro, mientras que puede corresponder a una forma activada en otra área cerebral.

Si es complicado establecer una correlación entre la asignación de Clúster y el estado de activación en nuestro modelo experimental, la comparación de nuestros resultados con los de otros investigadores es bastante más difícil. Podemos relacionar nuestro morfotipo del Clúster 2 con la microglía de vigilancia, siempre

presente antes de la lesión, que se ha clasificado como *microglía ramificada* antes de la lesión cerebral (Soltys et al., 2001), como *microglía de Tipo I* antes de axotomía hipoglosa (Yamada and Jinno, 2013), o como *microglía de Tipo S* en los controles de un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (Ohgomori et al., 2016). Por otra parte, las células de nuestro Clúster 4 pueden corresponder a un morfotipo activado, presente en diversas situaciones experimentales/patológicas cerebrales, denominadas *microglía arbustiva* en situación de lesión cerebral (Soltys et al., 2001), *microglía tipo IV* después de la axotomía (Yamada and Jinno, 2013), o *microglía R3* en procesos avanzados de esclerosis lateral amiotrófica (Ohgomori et al., 2016).

6.1.3. Propuesta de un árbol de decisión basado en parámetros morfológicos para la categorización de las células de la microglía

Después de la clasificación predictiva mediante LDA de las células de microglía en Clústeres, la representación de dichas células en un plano de componentes principales (PC, del inglés *principal components*) mostró que los diferentes Clústeres estaban claramente separados, lo cual corroboró la clasificación realizada por HCA y LDA. Sin embargo, 1) la población de células quedó dispersa a lo largo del eje de PC (Fig. R-6), y 2) los morfotipos de los Clústeres 1 y 3 no se correlacionaban adecuadamente con un estado de reposo/activación. Por lo tanto, decidimos buscar otra subdivisión de estos grupos. Para ello, se propuso un árbol de decisión lógica (Fig. R-7), basado en los parámetros predictivos más significativos revelados por el LDA, que inicialmente permiten asignar células en los grupos definidos; posteriormente, cada grupo se subdivide de nuevo sobre la base de parámetros adicionales, seleccionados de acuerdo con el PCA. Esta última subdivisión propuesta no puede ser considerada como predictiva, como sí lo es la anterior, ya que el PCA no puede validar la clasificación propuesta (Soltys et al., 2005; Yamada and Jinno, 2013). Sin embargo, se consideró que el PCA podría aprovechar la descripción cuantitativa de la forma de la microglía basada en otros parámetros, incluso cuando la distribución de datos de esos otros parámetros fuese unimodal.

Por lo tanto, el primer paso del procedimiento propuesto consiste en evaluar la *ratio de diámetros del polígono convexo* (CHSR), la *circularidad celular* (CC) y la *área del polígono convexo* (CHA) de cada célula microglial. Estos parámetros permiten la asignación de cada célula en uno de los cuatro Clústeres establecidos por LDA (Fig. R-7 A). Además, el PCA mostró dos parámetros adicionales, el *diámetro máximo a través del polígono convexo* (MSACH) y la *circularidad del polígono convexo* (CHC), que pueden utilizarse (al menos en nuestro modelo) para categorizar las células en un total de 8 Tipos (Fig. R-7 B). La subdivisión propuesta por PCA debe considerarse sólo cuando los valores de los parámetros principales estén claramente polarizados. Las diferencias entre los subgrupos o Tipos resultantes deben ser en cualquier caso corroboradas por un análisis estadístico.

La ejecución del árbol de decisiones propuesto (Fig. R-7) con ayuda de la distribución de los 8 Tipos obtenidos en un histograma (Figura R-8), revela ciertos morfotipos vigilantes (los Tipos 2.1 y 2.2) y activados (los Tipos 4.1 y 4.2) inequívocos. Además, se resuelve la situación conflictiva de los Clústeres 1 y 3, que incluyen fenotipos de vigilancia (Tipos 1.1, 1.2 y 3.2) y fenotipos activados (Tipos 1.1 y 3.1) dependiendo de la región del cerebro donde se localice la célula. Los Tipos de microglía más representativos en cada región del cerebro se resumen en la figura R-10. Hay que tener en cuenta que: 1) en la mayoría de los casos, no hay un Tipo de microglía exclusiva para una región del cerebro o para un estado de activación; 2) ciertos morfotipos pueden corresponder a una microglía vigilante en unas áreas cerebrales y a una microglía activada en otros lugares. Por lo tanto, la localización anatómica de la microglía siempre tiene que ser tomada en cuenta. En definitiva, este trabajo demuestra que la microglía en condiciones inflamatorias (NA) puede ser diferenciada de la microglía en reposo mediante la medida de parámetros morfológicos, cuyos valores son estadísticamente diferentes en ambos estados de las células microgliales. Se han propuesto cuatro grupos o Clústeres de microglía diferentes por medio del HCA. Luego, el LDA ha sugerido tres parámetros morfológicos relevantes para clasificar cualquier célula de microglía por medio de un árbol de decisiones. Posteriormente, se han identificado por PCA otros dos parámetros válidos adicionales, que han permitido la subdivisión de los Clústeres, obteniéndose un total de ocho Tipos de células microgliales.

La asignación de las células de la microglía que encontramos en nuestro modelo experimental en los Clústeres/Tipos aquí propuestos ha resultado en una distribución dispersa de la microglía en vigilancia (presente en ratas tratadas con solución salina) en diferentes Clústeres/Tipos. Sin embargo, la asignación de la microglía activada (presente en ratas tratadas con NA) ha sido más homogénea, ya que se ha clasificado mayoritariamente en el Clúster 4. Curiosamente, algunas células con fenotipo vigilante de áreas específicas del cerebro ocasionalmente se clasificaron bajo el mismo morfotipo que células activadas localizadas en otras áreas cerebrales, lo que indica que el fenotipo de la microglía vigilante puede ser, hasta cierto punto, específico de una región. Por dicho motivo se sugiere que la ubicación de la microglía dentro del cerebro debe ser considerada para futuras clasificaciones. Por lo tanto, estos resultados permiten establecer una relación entre los diferentes morfotipos y los distintos estados de activación de las células microgliales, teniendo en cuenta necesariamente su localización cerebral. También se propone una reevaluación de parámetros morfométricos por PCA, particularmente en el caso de aquellos parámetros con distribución unimodal.

6.2. LA CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE IL-1 β Y LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DEMUESTRA QUE DICHS PARÁMETROS PUEDEN PREDECIR EL GRADO DE ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA

Como se ha descrito previamente, la inyección de NA en el ventrículo lateral genera una activación de la microglía, que se evidencia por la expresión de IL-1 β . La inmunohistoquímica de fluorescencia mostró que las células de microglía cercanas a las paredes ventriculares son las que expresan de forma específica esta citoquina inflamatoria, mientras que conforme nos alejamos de la superficie ventricular la marca de IL-1 β fue prácticamente inexistente. Este hecho sugiere que la NA que difunde desde las cavidades ventriculares es la que induce la activación de la microglía. En las regiones seleccionadas para este estudio (el núcleo septofimbrial, el putamen caudado y el hipotálamo) se encontraron células de microglía activadas en el parénquima nervioso hasta 100-200 μ m desde la superficie ventricular (Fig. R-2).

La expresión de IL-1 β por las células de la microglía demuestra una polarización hacia el estado de activación M1, fenotipo pro-inflamatorio que aparece a las pocas horas del estímulo inflamatorio (Olah et al., 2011; Orihuela et al., 2016; Walker et al., 2014). Sin embargo, en nuestro modelo de inflamación la población de microglía IL-1 β positiva (activada) no parecía mostrar una morfología homogénea. Por ello, se decidió analizar si dentro de esta población de microglía activada aparecían diferentes rasgos morfológicos, que se pudieran corresponder además con diferentes grados de activación.

6.2.1. Diferentes grados de expresión de IL-1 β en la microglía activada por inyección de NA

Doce horas tras la inyección de NA se encontró un alto número de células de la microglía que expresaban IL-1 β y que además parecían mostrar una alta variabilidad morfológica. Inicialmente se confirmó que las células de la microglía seleccionadas para el estudio mostraban un rango amplio de marca de IL-1 β , que se correspondería con diferentes niveles de expresión de esta citoquina. A simple vista, no se pudo asociar un mayor nivel de marca de IL-1 β con la proximidad a la pared ventricular (flecha en Fig. R-12 A). Además, si bien es cierto que todas las células IL-1 β positivas seleccionadas mostraban un soma generalmente hipertrofiado, también se observó que dichas células mostraban patrones de ramificaciones variados y, salvo alguna excepción, todas estaban lejos de ser redondas o ameboides. Todo ello indica que las células de microglía seleccionadas para este análisis se encontraban en un estado M1 de activación pero con diferentes grados de expresión de IL-1 β y, además, que presentaban un amplio abanico de morfologías.

Tradicionalmente se han descrito dos formas de microglía: una considerada como un estado de reposo en el que las células presentan una morfología altamente ramificada, y otra considerada como un estado activado en el que adquiere forma ameboide (Davis et al., 1994). Otros trabajos han descrito microglía activadas con forma hipertrofiada (Ayoub and Salm, 2003) o cilíndrica (Taylor et al., 2014; Wierzba-Bobrowicz et al., 2002).

Actualmente está ampliamente aceptado que la microglía ramificada no se encuentra en estado de reposo, sino que es altamente dinámica en su papel de vigilar su entorno (Nimmerjahn et al., 2005), presentando diversos estados funcionales en condiciones normales (Gomez-Nicola and Perry, 2015; Ransohoff and Perry, 2009). Pero además, este escenario es aún más complejo, ya que se ha observado que en algunas situaciones patológicas la microglía conserva sus ramificaciones. En este sentido, el estudio detallado de la conversión de la microglía ramificada hacia una forma ameboide ha revelado que inicialmente la microglía sustituye las ramas existentes por un conjunto de protuberancias completamente nuevas y altamente móviles. Durante este cambio, hay una primera fase de retracción de ramificaciones (T: transicional), una segunda fase de formación de nuevas ramificaciones altamente dinámicas (M; movilidad), y finalmente la fase de movilidad se combina con otra tercera fase de desplazamiento de la microglía a través del parénquima (L: locomoción) (Petersen and Dailey, 2004; Stence et al., 2001). Por otra parte, se ha observado que, tras una lesión cerebral traumática, las prolongaciones microgliales convergen hacia el lugar de la lesión sin que haya un desplazamiento del cuerpo celular, estableciéndose una barrera potencial entre el tejido sano y el lesionado (Davalos et al., 2005). Por lo tanto, algunos autores han descrito células de la microglía con morfotipos intermedios, con abundantes ramificaciones y altamente dinámicas en situaciones de daño cerebral. Estas formas intermedias de microglía activada parecen ser también los morfotipos predominantes en nuestro estudio.

6.2.2. Los parámetros morfométricos revelan una amplia variabilidad morfológica en la microglía activada por NA

Una vez seleccionada una población de microglía con un amplio rango de expresión de IL-1 β , se procedió a la valoración de su morfología mediante parámetros cuantificables y por tanto objetivos, a saber: *dimensión fractal (D)*, *lacunaridad (Λ)*, *perímetro*, *área* y *densidad*. El análisis morfométrico realizado en esta población de microglía activada mostró una amplia variedad morfológica, apreciable a simple vista por el rango de valores obtenidos en las mediciones de los distintos parámetros (Fig. R-13).

Dado que la población de células del hipotálamo no mostró diferencias significativas (en los parámetros medidos) respecto a las poblaciones del caudado putamen y del núcleo septofimbrial (Fig. R-14), se decidió tomar la microglía del hipotálamo como población de referencia para continuar con el estudio; de esta forma los resultados fueron más consistentes y fiables.

Los valores de *dimensión fractal* (D) dan información acerca del grado de complejidad celular: así, valores muy altos indican un alto grado de ramificación y viceversa (Karperien et al., 2013). En función de los resultados obtenidos con la microglía hipotalámica (Fig. R-14 A; $D = 1,20-1,39$), podemos decir que en dicha población no hay microglía ramificada vigilante (que suele presentar una $D > 1,45$) ni microglía ameboidea (que se caracteriza por una $D < 1,2$), siendo predominante la microglía ramificada intermedia de tipo arbustivo o hipertrofiada. En algunos trabajos, sin embargo, se ha observado la presencia de una microglía hiper-ramificada cuyos valores de D varían entre 1,45-1,60 (Karperien and Jelinek, 2015). El morfotipo hiper-ramificado, que parece transitorio y previo a una activación, se ha vislumbrado tras un traumatismo (Soltys et al., 2001), en un proceso isquémico (Soltys et al., 2005), y tras una lesión vascular realizada con láser (Sheets et al., 2013). Dado el rango de valores de D que hemos obtenido en nuestra muestra ($D = 1,20-1,39$) podemos descartar la presencia de microglía hiper-ramificada.

La *lacunaridad*, es un parámetro que informa acerca de la homogeneidad (valores bajos) o heterogeneidad (valores altos) que muestra una imagen (Karperien et al., 2011). La población activada de microglía hipotalámica presentó un amplio rango de valores de lacunaridad (Fig. R-14 B; $\Lambda = 0,09-0,71$) si los comparamos con los obtenidos con la microglía ramificada, hipertrofiada o arbustiva ($\Lambda = 0,22-0,34$) presente en un proceso isquémico (Soltys et al., 2001).

Los valores de *área* medidos en la microglía activada en nuestro modelo (Fig. R-14 C; *área* = 200-600 μm^2) fueron más bajos que los obtenidos en microglía de ratas jóvenes (1000-2000 μm^2) o incluso de edad avanzada (800-2000 μm^2) (Baron et al., 2014). Los valores de área más bajos de nuestra microglía serían compatibles con un estado de activación.

El *perímetro* en nuestra población de microglía activada (Fig. R-14 D; *perímetro* = 200-1300 μm) presentó un rango de valores más amplio que el obtenido por otros autores tras administrar LPS (200-600 μm ; Kozłowski and Weimer, 2012). Es probable que en dicho modelo de LPS el grado de activación de la microglía sea mayor que en nuestro modelo, que emplea dosis moderadas de NA.

Por último, el rango de valores de *densidad* en nuestra población de microglía (Fig. R-14 E; *densidad* = 0,1-0,6) coincide con el de estudios realizados en animales sometidos a un traumatismo (Soltys et al., 2001), a una situación de estrés hídrico (Ayoub and Salm, 2003) o a un proceso isquémico (Soltys et al., 2005). En estas situaciones los datos de *densidad* (o *solidez*) van desde valores bajos en microglía ramificada (*densidad* = 0,25), valores medios en la microglía hipertrofiada (*densidad* = 0,3-0,4) y valores altos en la microglía arbustiva (*densidad* > 0,4). Según esto, en nuestra población de microglía hipotalámica podríamos encontrar todos estos fenotipos, ya que la densidad oscila desde 0,1 hasta 0,6.

Los resultados morfométricos aquí obtenidos y su comparación con los obtenidos en otros trabajos nos llevan a deducir que dentro de la población de microglía hipotalámica activada por NA se encuentran preferentemente morfotipos ramificados del tipo hipertrofiado y arbustivo, mientras que no hay microglía ramificada vigilante ni microglía hiper-ramificada. Igualmente, la microglía ameboidea también es prácticamente inexistente.

6.2.3. Existe una correlación entre diferentes parámetros morfométricos y el nivel de expresión de IL-1 β en la población de microglía hipotalámica activada por NA

Una vez obtenidos los valores de los diferentes parámetros morfométricos y el nivel de marcaje con IL-1 β para cada célula de nuestra población, se realizó un análisis de regresión lineal simple de cada parámetro morfométrico individual respecto al nivel de expresión de IL-1 β . De esta forma se pretendió investigar si había un cambio de forma gradual que se correspondiera con el grado de activación de la microglía.

Los resultados del análisis de regresión de los cinco parámetros morfométricos estudiados mostraron que hay dependencia de cada una de las variables (cada parámetro morfométrico) respecto a la variable independiente (el porcentaje de expresión de IL-1 β ; Fig. R-15); todos los coeficientes de regresión fueron significativos y además los coeficientes de correlación dieron cuenta de la fiabilidad del análisis (Tabla R-4).

Además, los valores de *dimensión fractal* (D), *lacunaridad* (Λ), *perímetro* y *área* disminuyeron conforme aumentaba la expresión de la citoquina inflamatoria. Por el contrario, el parámetro *densidad* fue incrementando conforme la microglía expresaba más IL-1 β .

Estos resultados sugieren que la microglía levemente activada (bajos niveles de IL-1 β) presenta una forma hipertrofiada. Cuando la microglía presenta un mayor grado de activación (niveles más altos de IL-1 β) adopta un morfotipo arbustivo. La microglía hipertrofiada y levemente activada muestra una mayor complejidad en las ramificaciones ($D = 1,30-1,40$), y una alta heterogeneidad ($\Lambda = 0,4-0,7$) que implica mayor grado de polaridad celular. El *área* ($400-600 \mu\text{m}^2$) y el *perímetro* celular ($750-1300 \mu\text{m}$) son grandes, mostrando un soma hipertrofiado con una *densidad* celular baja ($0,1-0,35$).

Por otro lado, las células de microglía con un mayor grado de activación (altos niveles de IL-1 β) presentan una forma arbustiva con ramificaciones más cortas y más gruesas ($D = 1,20-1,30$). Grados aún mayores de activación estarían asociados a una morfología más homogénea ($\Lambda = 0,1-0,4$) con *área* ($200-400 \mu\text{m}^2$) y *perímetro* ($200-750 \mu\text{m}$) menores, y mayor *densidad* celular ($0,35-0,7$).

Por lo tanto, estos resultados indican que los parámetros morfológicos de la microglía correlacionan con el grado de activación de la misma. Dichos parámetros podrían ser utilizados como herramientas objetivas para evaluar el grado de activación de estas células en distintas situaciones fisiológicas o patológicas.

6.3. EL RECEPTOR TLR4 DE LA MICROGLÍA ES CLAVE EN LA ACTIVACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO GENERADO POR LA NEURAMINIDASA, MIENTRAS QUE EL RECEPTOR TLR2 PARTICIPA INCREMENTANDO LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Dado que los receptores TLR de la microglía tienen un papel clave en el inicio de la respuesta inmune (Kawai and Akira, 2006), se planteó como objetivo averiguar si los receptores TLR2 y TLR4 de microglía tienen un papel relevante en el inicio del proceso inflamatorio generado mediante la administración de NA, proceso que se puede considerar estéril, ya que se inicia por la presencia de una sola proteína, con actividad sialidasa, en las cavidades ventriculares.

Con este fin se analizó la respuesta inflamatoria tras la administración de NA en ratones WT, TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-}. Además se utilizaron cultivos puros de microglía, procedentes de estas tres cepas de ratón, para evaluar la activación de la microglía tras estimulación con NA *in vitro*. De esta forma se pudo evaluar la relevancia de cada receptor TLR en el inicio del proceso inflamatorio generado por la NA.

6.3.1. El receptor TLR2 de la microglía participa en la inflamación inducida por la NA, aunque no es esencial

La inflamación generada por la administración de NA en los ratones mutantes TLR2^{-/-} fue ligeramente más leve que la generada en los ratones WT. El recuento de células de microglía (Fig. R-17) y de células que expresaban IL-1 β (Fig. R-19) en secciones histológicas mostró que no había diferencias significativas entre ambas cepas de ratones tras la administración de NA; sin embargo el recuento de células IL-1 β positivas en el hipotálamo sí fue algo menor en los TLR2^{-/-} que en los WT.

Por otra parte, el análisis de la expresión de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , TNF α y IL-6 por qPCR (Fig. R-22) en hipotálamo sí mostró una menor expresión de IL-1 β y TNF α en los ratones TLR2^{-/-} respecto a los WT, ambos tratados con NA. Estos resultados indican que el receptor TLR2 participa de alguna forma en el proceso neuroinflamatorio inducido por NA.

Dicho análisis también se realizó en la cepa TLR4^{-/-}, en la cual sin embargo la expresión de dichas citoquinas fue casi nula. Estos resultados sugieren que TLR2 participaría en la inflamación inducida por la NA, pero que esta vía de activación no sería la principal. Además, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de genes pro-inflamatorios en cultivos puros de microglía expuestos a NA (Fig. R-23). La expresión de IL-1 β y TNF α en la microglía de los animales TLR2^{-/-} fue menor que en la microglía procedente de animales WT. De este modo se confirmó que los receptores TLR2 de la microglía intervienen en la cascada pro-inflamatoria inducida por la NA.

Por otro lado, también se cuantificó la molécula de adhesión ICAM-1 mediante inmunocitoquímica. En estudios previos se observó un incremento en la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular tras la inyección de NA (Granados-Durán et al., 2015). En el presente trabajo, este resultado se reprodujo en ratones normales, pero además en las cepas TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-} dicha sobre-expresión de ICAM-1 fue similar a la obtenida en los ratones WT (Fig. R-21). Esto sugiere que la sobre-expresión de ICAM-1 en la inflamación inducida por la NA no depende de la vía de señalización mediada por TLR2 o TLR4.

Al igual que sugieren nuestros resultados, se ha descrito que los receptores TLR2 participan en otros procesos inflamatorios, como el que se desarrolla tras una isquemia cerebral, donde astrocitos y neuronas (Stridh et al., 2011) y también la microglía (Lehnardt et al., 2007a) facilitan la propagación del proceso inflamatorio y del daño tisular. Asimismo, en la meningitis bacteriana generada por estreptococos la activación de los receptores TLR2 de la microglía provoca la muerte neuronal (Lehnardt et al., 2006) y la apoptosis de la propia microglía (Lehnardt et al., 2007b). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la activación de la microglía a través de TLR2 puede dar lugar a fenotipos funcionalmente diferentes: por un lado una activación al estado M1, que produce mediadores pro-inflamatorios que generan un daño neurotóxico, y por otro lado una activación al estado M2, en el que la fagocitosis de los depósitos de péptido β -amiloide da lugar a un efecto neuroprotector (Chen et al., 2006; Liu et al., 2012).

6.3.2. El receptor TLR4 de la microglía es esencial para iniciar el proceso inflamatorio inducido por la NA

Tras la inyección de NA, la respuesta inflamatoria ocurrida en los ratones TLR4^{-/-} fue mucho más leve que la observada en los ratones WT y en los ratones TLR2^{-/-}, y similar a la ocurrida en los ratones WT tratados con solución salina. Esto se puso de manifiesto en los recuentos de microglía (Fig. R-17) y de células IL-1 β positivas (Fig. R-19), que fueron mucho menores en los TLR4^{-/-} que en los TLR2^{-/-} o en los WT. Además, no hubo incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias tras la inyección de NA en los ratones TLR4^{-/-}, lo que sí ocurrió en los TLR2^{-/-} y en los WT (Fig. R-22). Estos resultados fueron corroborados por los obtenidos en los experimentos con cultivos puros de microglía: la NA no incrementó la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la microglía TLR4^{-/-}, pero sí lo hizo en los cultivos de microglía TLR2^{-/-} o WT (Fig. R-23). Estos resultados sugieren que el receptor TLR4, y en particular el que expresan las células de microglía, tiene un papel relevante y esencial en el inicio del proceso inflamatorio inducido por la NA. Esto constituye uno de los principales hallazgos de este trabajo, ya que revela parte del mecanismo por el cual la NA provoca neuroinflamación.

Sin embargo, en ratones TLR4^{-/-} tratados con NA sí se observó un incremento de ICAM-1 en el endotelio vascular, que fue similar al de ratones WT y TLR2^{-/-} (Fig. R-21). Esto sugiere que en los ratones TLR4^{-/-} la NA sí genera una cierta respuesta inflamatoria, mediante algún mecanismo independiente de este receptor.

Estos resultados coinciden con otros trabajos en los que se pone de manifiesto papel relevante del receptor TLR4 en respuestas neuroinflamatorias relacionadas con accidentes cerebrovasculares hemorrágicos (Caso et al., 2007; Okada and Suzuki, 2017). En estos procesos se ha observado que el inicio de la cascada de activación de TLR4 es responsable de lesiones cerebrales tempranas que empeoran el pronóstico de esta patología. En el caso de procesos isquémicos se ha dado un paso más, demostrándose que la activación de TLR4 en la microglía es clave para la liberación de citoquinas inflamatorias tóxicas (Yao et al., 2013).

Además, el papel de TLR4 sobre la depresión (Gárate et al., 2011), la obesidad (Milanski et al., 2009) o patologías derivadas del abuso de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2010) ha generado gran interés.

Cabe destacar los avances relacionados con la enfermedad de Alzheimer. Así, se ha demostrado que los agregados de β -amiloide activan a la microglía por medio de TLR4, generándose citoquinas inflamatorias neurotóxicas que repercuten en la progresión de la enfermedad (Jin et al., 2008). Por otra parte, se ha evidenciado que la activación de TLR4 y el consecuente aumento de citoquinas inflamatorias provoca una retroalimentación positiva que resulta en un aumento acelerado de los precursores de β -amiloide (Dan et al., 2015). Este descubrimiento representa un paso muy importante en el control de la progresión la enfermedad ya que vislumbra la posibilidad de modular la formación de los péptidos de β -amiloide.

Por otra parte, se ha descrito que los diferentes tipos de receptores TLR pueden interactuar en la membrana en diversas combinaciones formando heterodímeros, generándose una respuesta diferente a la que ocurriría si se activaran de forma independiente (Rosenberger et al., 2014). En algunos procesos inflamatorios como la meningitis neumocócica la reactividad inmunológica precisa de ambos receptores, TLR2 y TLR4 (Klein et al., 2008). Igualmente, en la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado que TLR2 y TLR4 participan juntos en la interacción con la proteína β -amiloide (Reed-Geaghan et al., 2009). Además, en el proceso inflamatorio que se desarrolla tras un traumatismo craneoencefálico se ha descrito la existencia de un heterodímero formado por TLR2 y TLR4, el cual se activa por la hemoglobina procedente de la hemorragia intracraneal (Wang et al., 2014).

Con estos resultados previos, no debemos descartar la posibilidad de que la NA actuara mediante la unión a este tipo de heterodímeros.

Sobre la base de nuestros resultados podemos deducir que en la respuesta inflamatoria inducida por la NA el receptor TLR4 tiene un papel fundamental mientras que la participación de TLR2 es secundaria.

Una posible hipótesis sería que el receptor TLR4 iniciara la respuesta inflamatoria y que el receptor TLR2 colaborara en su desarrollo, una vez que ésta ya se hubiera iniciado a través del TLR4. Esta hipótesis se basa en la importante reducción de la respuesta inflamatoria en los ratones TLR4^{-/-} tratados con NA, a pesar de tener un TLR2 funcional. Por su parte, dicha respuesta es menor, aunque de cierta entidad, en los ratones TLR2^{-/-}, que presentan un TLR4 funcional y por tanto capaz de iniciar dicha respuesta.

Por consiguiente, este estudio nos lleva a concluir que el receptor TLR4 de la microglía tiene un papel clave en inicio del proceso neuroinflamatorio generado por la NA, y que el receptor TLR2 de la microglía participa en la síntesis de citoquinas inflamatorias (aunque no es esencial) una vez el proceso ha sido iniciado a través del receptor TLR4. Por otra parte, existen algunos acontecimientos del proceso inflamatorio (como la sobre-expresión de ICAM-1) que ocurren por mecanismos independientes de los receptores TLR2 y TLR4.

6.3.3. Los receptores TLR2 y TLR4 de la microglía como dianas terapéuticas

Se sabe que la NA bacteriana favorece la formación de biopelículas o *biofilms*, y por ello la colonización de los tejidos por estos microorganismos (Soong et al., 2006). Por otra parte, la NA vírica permite la dispersión de nuevos viriones (Colman, 1994). Este proceso se ha estudiado extensamente en el caso del virus *influenza*, el cual genera un proceso infeccioso respiratorio en el que la NA tiene un papel fundamental y determina su virulencia (Wagner et al., 2002).

Pero además este virus ha generado diferentes complicaciones neurológicas en numerosas ocasiones (Glaser et al., 2012; Noriega et al., 2010; Surana et al., 2011). En los últimos años ha cobrado especial interés el número de casos de esquizofrenia (Brown, 2006) y autismo (Brown and Patterson, 2011) que se relacionan con infecciones generadas por el virus *influenza* durante la etapa fetal, además de casos de encefalopatías (Fujimoto et al., 1998; Steininger et al., 2003) y del desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (Sivadon-Tardy et al., 2009; Vellozzi et al., 2014).

Asimismo, hay casos de enfermedades desmielinizantes inflamatorias debidas a infecciones por virus que contienen NA (Bale, 2015; Nardone et al., 2011; Özkale et al., 2012; Sonmez et al., 2004; Voudris et al., 2002) que también han generado casos de encefalitis e hidrocefalias (Taştan et al., 2007). Aunque se sabe algo sobre el papel de la NA en el desarrollo de estas infecciones, su posible relevancia en los procesos neurológicos subsiguientes es desconocida. Conocer el mecanismo de acción de la NA es, por tanto, de gran interés.

En concreto, durante la última década se ha avanzado en el conocimiento del mecanismo mediante el cual la NA activa a los receptores TLR2 y TLR4. Se sabe que los TLRs están altamente glucosilados. La desialización del TLR4 por medio de la sialidasa endógena Neu1 es necesaria para la activación de este receptor y el inicio de la vía de señalización (Amith et al., 2010).

Por otro parte, en la membrana plasmática existen otros receptores de patrones moleculares, en concreto la familia de las Siglecs, que son lectinas con afinidad por el ácido siálico localizadas principalmente en la superficie de las células del sistema inmune. Se ha propuesto que las Siglecs se unen a los TLRs a través de sus residuos de ácido siálico, y proporcionan una inhibición constitutiva de estos receptores (Chen et al 2014). La desialización libera al receptor TLR de esa inhibición, ya que permite la separación de la Siglec. Recientemente Chen y colaboradores han propuesto un interesante mecanismo según el cual primero ocurriría una activación parcial del receptor TLR mediante la unión de alguna molécula patrón (DAMPs o PAMPs). El TLR así activado favorecería la traslocación de la Neu1 intracelular a la superficie, y ésta se encargaría de desializar al receptor TLR, y por tanto de liberarlo de su bloqueo por Siglec. Entonces se produciría una activación mucho más intensa de la vía de señalización pro-inflamatoria. Este mecanismo se podría considerar de algún modo como una retroalimentación positiva de la respuesta inflamatoria mediada por los TLRs.

De toda la familia de TLRs y Siglecs, en concreto el TLR4 y el Siglec-E (murino) funcionarían de este modo (Chen 2014). Así, las Siglecs proporcionan un mecanismo de inhibición de los TLRs que impide la activación de la respuesta inmune a antígenos propios.

Ante la entrada al organismo de algún patógeno o cuando ocurre un daño tisular, se inicia el mecanismo arriba explicado. Si además el patógeno contiene NA, la sialidasa vírica/bacteriana podría favorecer este mecanismo de activación inmune.

Según nuestros resultados, el receptor TLR4 es esencial en el inicio de la inflamación estéril generada por NA. En nuestro modelo experimental la NA inyectada podría estar realizando el papel de la Neu1 de desializar el receptor TLR4 y liberarlo de su bloqueo por Siglec-E. Además, recientemente se ha descrito la presencia específica en la microglía residente de la isoforma Siglec-H, que no se encuentra en macrófagos perivasculares ni en monocitos infiltrados (Konishi et al., 2017).

Una de las principales estrategias antivirales se basa en la inhibición de la actividad enzimática de la NA (Mckimm-Breschkin, 2013). De esta forma se evita la liberación de nuevos viriones de la superficie celular (Kim et al., 1997; von Itzstein et al., 1993). Estos compuestos antivirales (como oseltamivir o Tamiflu®) son análogos estructurales del ácido siálico que se unen a la NA con una afinidad mucho más elevada que el ácido siálico (hasta 10.000 veces mayor), bloqueando así la actividad enzimática de la NA (Varghese et al., 1992).

Estudios recientes han mostrado que el desarrollo de resistencias en pacientes con procesos infecciosos víricos tratados con estos antivirales (Gubareva et al., 2001). En concreto, algunas mutaciones específicas en la secuencia de la NA vírica origina cambios estructurales a la enzima, que se traducen en la aparición de subtipos víricos resistentes a estos inhibidores (Abed et al., 2006). Por este motivo, actualmente el desarrollo de nuevos inhibidores con diferentes mecanismos de inhibición se considera una prioridad (Mckimm-Breschkin, 2013).

El avance en el conocimiento de las interacciones entre Siglecs y TLRs ofrece nuevas estrategias para el tratamiento de los procesos inflamatorios. En este sentido, se está considerando como una valiosa diana terapéutica la sialidasa Neu1 endógena, ya que se ha visto que tanto su modificación genética como la inhibición de su actividad enzimática proporciona una alta protección frente a la endotoxemia (Chen et al., 2014).

Asimismo, se ha demostrado que la inhibición de la actividad sialidasa de Neu1 protege a los ratones contra la sepsis bacteriana, ya que impide la separación del complejo SiglecG-TLR, quedando bloqueada la activación de la vía TLR pro-inflamatoria (Chen et al., 2011).

Por otro lado, también se está estudiando el empleo de antagonistas de TLR4 para bloquear su activación; mediante esta estrategia se consiguió mitigar los daños resultantes en un proceso de isquemia-reperfusión a nivel medular (Li et al., 2014). Otros compuestos inhibidores utilizados para bloquear la respuesta pro-inflamatoria tienen como dianas alguno de los elementos de la vía de señalización de TLRs. En este caso se ha descrito una disminución de las placas seniles y del daño neuronal en modelos murinos de Alzheimer (Shi et al., 2016). Además, también se han descrito efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios de polifenoles que actúan a distintos niveles en dicha vía de señalización (Rahimifard et al., 2017).

6.4. LA MICROGLÍA ACTIVADA POR LA NEURAMINIDASA PARTICIPA EN LA MUERTE EPENDIMARIA

En este trabajo se ha utilizado la inyección ICV de NA en roedores como modelo de neuroinflamación aguda. Sin embargo, se observa también de forma consistente otro evento llamativo: la pérdida parcial o total (dependiendo de la dosis de NA utilizada) del epitelio ependimario (Del Carmen Gómez-Roldán et al., 2008; Granados-Durán et al., 2015; Grondona et al., 1996).

Cuando la dosis de NA utilizada es alta, hay una pérdida masiva del epéndimo, que da lugar a una hidrocefalia obstructiva bastante severa. Dosis bajas de NA no provocan hidrocefalia.

En cualquier caso, el epéndimo desprendido nunca se regenera, y las funciones que ejerce el epéndimo como barrera, en el intercambio regulado entre el parénquima y el líquido cefalorraquídeo (CSF, del *inglés cerebrospinal fluid*), en el movimiento de éste gracias al batido ciliar, etc., quedan alteradas.

Ciertas infecciones víricas que afectan al SNC, como es el caso de las paperas, la gripe o el sarampión, han sido asociadas a la muerte endimaria, y en ocasiones también a hidrocefalia (Johnson and Johnson, 1969; Johnson et al., 1967; Margolis and Kiham, 1969; Takano et al., 1993). La pérdida de la barrera endimaria podría favorecer el acceso de los agentes patógenos y las células inflamatorias infiltradas desde el CSF hacia el parénquima nervioso, lo cual podría tener consecuencias desde el punto de vista de la neurodegeneración (Lucas et al., 2006). Por todo ello, es importante dilucidar el mecanismo por el cual la NA causa la muerte de los endimocitos y/o la denudación endimaria.

6.4.1. El descenso de viabilidad de los endimocitos se relaciona directamente con la activación de la microglía

En el planteamiento de las posibles causas de la muerte endimaria es necesario tener en cuenta que ésta ocurre muy pronto tras la inyección de NA, incluso antes de que haya infiltración de células inflamatorias (Granados-Durán et al., 2016).

En este trabajo nos preguntamos si la microglía activada por la NA podría participar en dicha muerte. Para abordar esta cuestión se realizaron una serie de experimentos *in vitro* en los que se analizó la viabilidad de las células endimarias, utilizando tanto explantes de pared ventricular (conteniendo células endimarias, subependimo y parénquima nervioso) como cultivos puros de endimocitos. En ambos casos, los endimocitos se co-cultivaron con células de microglía activadas.

Estos experimentos resultaron en una mayor muerte endimaria en presencia de microglía activada (tanto por NA como por LPS), en comparación con co-cultivos con microglía no activada o cultivos sin microglía (R-25 y R-26). En estos experimentos la sola presencia de NA no afectó a la viabilidad de los endimocitos, por lo que cabría concluir que la muerte endimaria no ocurre por la acción directa de NA. Sin embargo, en un trabajo previo sí se observó una leve reducción de la viabilidad endimaria en presencia de una mayor concentración de NA (Granados-Durán et al., 2016).

Además, en ese mismo trabajo se demostró que la NA provoca la activación del sistema del complemento presente en el CSF, y que éste participa en la muerte endimaria, aunque no sería la única causa.

Todo ello indica que la NA presente en el CSF puede provocar la muerte de las células endimarias por varios mecanismos, entre los que se incluirían la activación tanto del complemento como de la microglía por acción de la NA, sin descartar una leve acción directa de la propia NA sobre la viabilidad de dichas células.

6.4.2. Otras posibles causas de la muerte endimaria mediada por NA

Algunos estudios señalan a la alteración de las proteínas que conforman las uniones adherentes intercelulares como una posible causa de la muerte y/o desprendimiento de las células endimarias (Jiménez et al., 2014).

Las uniones adherentes son un tipo de unión intercelular cuyos componentes principales son las proteínas transmembrana cadherinas (N-cadherina en el tejido nervioso) y las cateninas en el lado citosólico de la membrana (Hartsock and Nelson, 2008).

Una expresión anormal de N-cadherinas coincide con la denudación del epitelio endimario en patologías como la hidrocefalia y la espina bífida (Guerra et al., 2015). Además, el bloqueo de N-cadherinas dispara una apoptosis masiva que conduce a una denudación endimaria que precede a la dilatación ventricular (Oliver et al., 2013). Algunos autores han mostrado que cambios cualitativos o cuantitativos en la glucosilación de las E-cadherinas alteran la estabilidad del epitelio en cultivos de células CHO (del inglés *chinese hamster ovary*) (Liwosz et al., 2006). En el caso del epitelio endimario, se ha puesto de manifiesto la presencia de N-cadherinas en las uniones celulares que proporcionan integridad a la capa endimaria (Jiménez et al., 2014). Además, el glucocálix de la cara luminal de este epitelio es muy rico en ácido siálico, el cual es eliminado tras la administración de NA (Granados-Durán et al., 2015).

En nuestro modelo de inyección ICV de NA, la desialización de las proteínas de adhesión por la NA podría contribuir a la disrupción de la integridad del epitelio

ependimario y a la muerte de sus células. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron un aumento en la muerte endimaria por la sola presencia de NA. Además, las células endimarias pueden ser separadas de su monocapa, aisladas y mantenidas en cultivo durante varias semanas (Grondona et al., 2013), lo cual indica que la unión a las células vecinas no es esencial para su supervivencia.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en otro trabajo de nuestro equipo la NA sí produjo un ligero aumento de la muerte de los endimocitos (Granados-Durán et al., 2016). En este caso, podríamos especular la existencia de un cierto efecto citotóxico de la NA sobre estas células, o quizás que su viabilidad se ve comprometida por la desialización de algunas proteínas en la superficie celular. En cualquier caso, parece claro que la acción directa de la NA no sería la causa principal de la muerte endimaria en nuestro modelo de neuroinflamación.

Por otra parte, se ha demostrado la participación de otro tipo de moléculas de adhesión, las glucoproteínas transmembrana llamadas integrinas, en la integridad del epitelio endimario, pero en este caso en la unión de las células con la matriz extracelular (Grooms et al., 1993).

El bloqueo de la unión de la $\beta 1$ -integrina con la matriz extracelular mediante anticuerpos funcionales resultó en la expansión de los ventrículos cerebrales e hidrocefalia (Nagra et al., 2009). Estos trabajos evidencian que la alteración de las proteínas de adhesión en las células endimarias puede favorecer su muerte/desprendimiento.

Además, se ha visto que la sialización de la $\beta 1$ -integrina bloquea la unión de la galectina-3 (Schauer, 2009) y que la desialización de los β -galactósidos de la misma induce la apoptosis (Suzuki and Abe, 2008; Zhuo et al., 2008). La galectina-3 es una lectina soluble con un dominio conservado que reconoce a β -galactósidos de las membranas celulares e interviene en diferentes procesos como la adhesión, la proliferación, la apoptosis y la migración celular (Shin, 2013; Yang and Liu, 2003). En condiciones inflamatorias la expresión de esta proteína se incrementa en diferentes regiones periventriculares (James et al., 2016).

En concreto, en un modelo inflamatorio de encefalomiелitis la síntesis de galectina-3 aumenta en la microglía activada, pero no en la microglía ramificada o en reposo (Shin et al., 2013). Este mecanismo podría explicar la mayor proporción de muerte endimaria observada en nuestros experimentos en presencia de microglía activada por NA. Por una parte la NA propiciaría la desialización de los β -galactósidos de la membrana de los endimocitos, y por otra la microglía activada sería la fuente de galectina-3 necesaria para iniciar la apoptosis. En contra de esta posibilidad está el hecho de que cuando utilizamos LPS en lugar de NA para activar a la microglía la viabilidad de los endimocitos se reduce igualmente, a pesar de no ocurrir la desialización por NA. Además, en ninguno de nuestros estudios histológicos previos se detectaron endimocitos apoptóticos en animales inyectados con NA. Por tanto, el mecanismo de inducción de muerte y/o desprendimiento de las células endimarias en el modelo de inyección de NA está por aclarar.

6.4.3. La muerte endimaria podría estar mediada por citoquinas inflamatorias liberadas por la microglía activada

Aunque el papel principal de la microglía en el cerebro es protector, la microglía activada libera citoquinas inflamatorias que en ocasiones pueden generar un efecto neurotóxico (Lull and Block, 2010; Ransohoff and Perry, 2009). Este hecho ha sido descrito en neuronas (Allan et al., 2005; Xie et al., 2004), en células de Purkinje (Kaur et al., 2014) y en células ganglionares (Sivakumar et al., 2011). Asimismo, estos efectos nocivos de las citoquinas inflamatorias también se han observado en procesos neuroinflamatorios experimentales provocados mediante la inoculación del virus de la influenza A, el cual tiene NA en su envuelta lipídica (Jurgens et al., 2012; Wang et al., 2010).

En nuestro modelo, la activación microglial causada por la NA produce un incremento de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α (R-22 y R-23), que podrían provocar daños celulares, incluida la muerte de las células endimarias. Además, la NA produjo un incremento en la expresión de los receptores de IL-1 β y TNF α en explantes de pared ventricular (Fig. R-27), lo que sugiere que este tejido se hace más susceptible a estas citoquinas inflamatorias.

La presencia de dichos receptores específicamente en endimocitos se confirmó mediante PCR en cultivos puros de estas células (Fig. R-28). Sin embargo, cuando se cuantificó la expresión de los mismos por qPCR se comprobó que, mientras que el receptor de IL-1 β se expresa en endimocitos de forma constitutiva, el receptor de TNF α por el contrario apenas se detecta (Fig. R-29). La presencia de IL-1 β R1 en el epéndimo ha sido descrita también por otros autores mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Ericsson et al., 1995; French et al., 1999). Sin embargo, en un estudio mediante inmunohistoquímica para localizar el receptor de TNF α en cerebro de rata no se describió la presencia de dicho receptor en el epéndimo (Sairanen et al., 2001), lo cual confirmaría nuestros resultados.

La presencia del receptor de IL-1 β en las células endimarias nos permite especular la posibilidad de que esta citoquina intervenga en la muerte endimaria que ocurre tras la activación de la microglía. Sin embargo, para confirmar esta posibilidad sería necesaria alguna evidencia directa, por ejemplo desarrollando el mismo ensayo de viabilidad de endimocitos realizado en este trabajo pero en presencia de anticuerpos funcionales que bloqueen el receptor IL-1 β R1.

Como conclusión, los co-cultivos de explantes de pared ventricular o de células endimarias puras junto a cultivos puros de microglía han permitido estudiar el papel de la microglía en la muerte endimaria causada por la NA. La viabilidad de los endimocitos disminuyó de forma significativa en presencia de microglía activada por NA. La presencia de receptores de citoquinas inflamatorias, particularmente de IL-1 β , en endimocitos sugiere que dicha citoquina podría mediar en la muerte endimaria inducida por la microglía activada por la NA. Además, en un estudio previo se demostró que la NA activa el sistema del complemento presente en el CSF, lo cual también contribuiría a la muerte endimaria. Por último, no se debe descartar un efecto directo de la NA sobre las células endimarias, ya que una pequeña fracción de ellas mueren cuando se incuban sólo con NA. La muerte y/o el desprendimiento del epéndimo que ocurre por la presencia de NA en las cavidades ventriculares son debidos, por tanto, a múltiples factores.

6.5. LOS MACRÓFAGOS CIRCULANTES RECLUTADOS AL PARÉNQUIMA NERVIOSO DURANTE LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR NEURAMINIDASA INCREMENTAN LA VIRULENCIA DEL PROCESO INFLAMATORIO INICIADO POR LA MICROGLÍA RESIDENTE

En la inflamación generada mediante la administración ICV de NA ocurre una infiltración de neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T (CD3 ϵ) y linfocitos B (Granados-Durán et al., 2015). Entre ellas, la infiltración de los monocitos es totalmente dependiente del receptor CCR2 (Godaly et al., 2001; Kowarik et al., 2012; Nolz et al., 2011; Strazielle et al., 2016; Tsou et al., 2007; Turner et al., 2014). Los ratones deficientes del receptor CCR2 (CCR2^{-/-}) se caracterizan por una disminución importante en la incorporación de monocitos a los tejidos inflamados (Mildner et al., 2009). Incluso la salida de monocitos de la médula ósea hacia el torrente sanguíneo se ve comprometida (Tsou et al., 2007).

Utilizando esta cepa de ratones, se planteó el objetivo de estudiar la relevancia de los monocitos infiltrados en el proceso inflamatorio generado por la NA, para lo cual se analizaron diferentes parámetros inflamatorios. Además, también se cuantificó la proliferación de la microglía y la infiltración de macrófagos perivasculares, para valorar el papel de la microglía residente respecto al de los monocitos periféricos.

6.5.1. El receptor CCR2 participa en el incremento de macrófagos/microglía que ocurre tras la administración de NA

Para analizar el papel del receptor CCR2 en la respuesta inflamatoria generada por la NA, en primer lugar se realizó un recuento de monocitos/macrófagos/microglía en ratones inyectados ICV con NA. Los monocitos o macrófagos infiltrados en el parénquima cerebral dan lugar a nuevas células de microglía. En este trabajo, ambas poblaciones de microglía, la generada *de novo* y la microglía residente, se valoraron conjuntamente por medio del marcador IBA1. El recuento de células IBA1 positivas puso de manifiesto que el receptor CCR2 es determinante en el incremento de microglía en el foco inflamatorio periventricular (Fig. R-31), ya que en dicha región los ratones CCR2^{-/-} inyectados con NA no mostraron diferencias con los controles tratados con salino.

6.5.2. El incremento de la microglía tras la administración de NA no es debido a la proliferación de la microglía residente

Una posible causa del incremento de células IBA1 positivas en las regiones periventriculares afectadas por la inflamación inducida por NA podría ser la proliferación de la microglía. Por ello, se realizó un estudio de proliferación utilizando el marcador BrdU, el cual fue inyectado por vía intraperitoneal 2 h después de la inyección ICV de NA/salino, y 4 h antes del sacrificio.

El número de células marcadas con BrdU fue significativamente mayor en los animales tratados con NA respecto a los controles inyectados con solución salina, lo cual fue así tanto en ratones WT como en ratones CCR2^{-/-} (Fig. R-32). La existencia de microglía en proliferación se evidenció mediante doble inmunofluorescencia con anti-BrdU y anti-IBA1 (Fig. R-32 E). Sin embargo, con este resultado no podemos concluir que la NA produzca un incremento en la proliferación de microglía, ya que no se utilizaron marcadores específicos (como IBA1) para identificar la naturaleza de las células proliferantes.

Posteriormente, mediante qPCR sí se cuantificaron marcadores relacionados específicamente con la proliferación de la microglía, como el factor de transcripción PU.1 (Gomez-Nicola et al., 2013), el receptor del factor estimulante de colonias: CSF1R (Patel and Player, 2009) y su ligando IL-34 (Lin et al., 2008). Los niveles de estos marcadores fueron similares en los ratones tratados ICV con NA y con solución salina, y tampoco se encontraron diferencias entre las dos cepas de ratones estudiadas (Fig. R-33). Estos resultados indicarían que la NA no induce una proliferación significativa de la microglía.

Se sabe que en condiciones normales existe un mecanismo de recambio de células microgliales en el cerebro, basado en la proliferación de microglía residente y con escasa contribución de progenitores circulantes (Askew et al., 2017; Lawson et al., 1992). Asimismo, se ha sugerido que la proliferación de las células microgliales podría ser la causa principal del incremento de la población de microglía en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (Bolmont et al., 2008). Evidencias directas de la proliferación de la microglía (incorporación de BrdU en IBA1 células positivas) han sido aportadas recientemente en modelos murinos de

la enfermedad de Alzheimer (Kamphuis et al., 2012) y de la enfermedad priónica (Gomez-Nicola et al., 2013). Además, en procesos inflamatorios agudos generados mediante la administración de LPS se ha descrito que la activación de la microglía va acompañada de un incremento en su proliferación (Gomes et al., 2013; Ponomarev et al., 2005); curiosamente, algunos autores han observado que esta proliferación es dependiente de la región cerebral estudiada (Fukushima et al., 2015). Dado que se ha descrito un pico de proliferación de la microglía a los 4-5 días tras la administración de LPS, sería interesante desplazar nuestro estudio de proliferación de microglía activada por NA a esa ventana temporal, para obtener más información sobre el mecanismo de incremento de la población de microglía residente en una fase sub-aguda de la neuroinflamación.

6.5.3. La administración de NA genera la entrada en el parénquima nervioso de células MHCII y Ly6C positivas, pero no de macrófagos perivasculares

Siguiendo con el propósito de averiguar la procedencia del incremento en la población de microglía presente en los ratones WT tras la administración de NA, se realizó un análisis inmunocitoquímico con marcadores específicos de diferentes tipos celulares. Un tipo celular que podría contribuir a la población de microglía son los macrófagos perivasculares. Estos macrófagos con función fagocítica están localizados en áreas perivasculares, en el líquido cefalorraquídeo de las meninges y en los plexos coroideos, y desarrollan un papel clave en la respuesta a estímulos infecciosos (Galea et al., 2005). En nuestro modelo de inflamación generada por NA no se encontraron diferencias significativas en el número de macrófagos perivasculares (CD206 positivos) entre los animales tratados con NA respecto a los controles, ni tampoco entre los ratones WT y los CCR2^{-/-} (Fig. R-34). Este resultado descartaría a dichas células como el origen del incremento de células IBA1 positivas observado tras inyectar NA.

Por otra parte, se analizó la presencia de células presentadoras de antígeno positivas al complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII). Este marcador se expresa de forma constitutiva en células dendríticas y linfocitos B. Además, los linfocitos T pueden aumentar su expresión durante procesos infecciosos (Chen and Jensen, 2008). En algunos procesos inflamatorios del cerebro se ha observado un

incremento de la expresión de MHCII en la microglía (Gómez-Nicola et al., 2014; Kuric and Ruscher, 2014). Como era de esperar, los animales controles inyectados con salino no presentaron células positivas a este marcador, mientras que sí fueron frecuentes en animales inyectados con NA. Además, no se observaron diferencias en el número de células MHCII positivas entre los animales WT y CCR2^{-/-} tratados con NA (Fig. R-35). La distribución concéntrica y próxima a los vasos sanguíneos de estas células MHCII positivas y su morfología redondeada sugieren un proceso incipiente de infiltración desde dichos vasos hacia el parénquima cerebral. La morfología y distribución de las células MHCII positivas observada en nuestro modelo (Fig. 35 C, D) es claramente diferente a la que presenta la microglía MHCII positiva en otros procesos inflamatorios (Gómez-Nicola et al., 2014; Kuric and Ruscher, 2014).

Las células MHCII positivas que encontramos tras la administración de NA no parecen ser microglía activada. Dado que la infiltración de células MHCII positivas se produce por efecto de la administración de NA y, además, es similar en las dos cepas de ratones utilizadas, se deduce que dichas células, además de estar activadas, su infiltración es independiente del receptor CCR2. Dichas células podrían corresponder probablemente a linfocitos T activados que, como se ha descrito previamente, se infiltran en las primeras horas tras la inyección de NA (Granados-Durán et al., 2015).

Finalmente, para continuar con el objetivo de identificar la procedencia de la subpoblación de microglía que se incrementó en los ratones WT respecto a los CCR2^{-/-} al administrar NA, se utilizó el marcador Ly6C. La familia de proteínas Ly6 ha sido ampliamente utilizada para analizar la infiltración de leucocitos en el parénquima cerebral. Aunque la función de estas proteínas no es del todo conocida, se sabe que cada subtipo de proteína Ly6 está íntimamente relacionado con un linaje celular. En particular, las proteínas Ly6C1 y la Ly6C2 se expresan en la superficie de monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células T y células NK (Lee et al., 2013). Se ha podido seguir el reclutamiento de monocitos circulantes mediante el análisis de células CCR2⁺Ly6C^{hi} presentes en el cerebro en

enfermedades autoinmunes (Mildner et al., 2009) y en la fase inicial de la isquemia cerebral (Garcia-Bonilla et al., 2016).

Tras la administración de NA se encontraron numerosas células Ly6C positivas en regiones periventriculares, en los plexos coroideos, en el cuerpo caloso, etc. (Fig R-36 A-D), lo que indicaría que en la inflamación provocada por la NA hay infiltración de monocitos circulantes. Un resultado no esperado fue que en la cepa CCR2^{-/-} la infiltración de células Ly6C fue similar a la ocurrida en los WT, lo cual parece indicar que el receptor CCR2 no es necesario para la entrada de las células Ly6C que se infiltran en el modelo de NA, y cuestiona que dichas puedan ser monocitos. Sin embargo, la colocalización de Ly6C e IBA1 en algunas de las células infiltradas en el WT confirmaría que al menos parte de dichas células son monocitos (Fig. R-37).

La infiltración similar de células Ly6C en ambas cepas podría tener dos posibles explicaciones alternativas. En los animales WT se estarían reclutando células CCR2⁺Ly6C^{hi} (probablemente monocitos) por medio del receptor CCR2, y también células CCR2⁻Ly6C^{hi}, mientras que en los mutantes CCR2^{-/-} solo se estarían reclutando células CCR2⁻Ly6C^{hi}. Si esta última población fuera mucho mayor que la población de CCR2⁺Ly6C^{hi} entonces podrían enmascararla, es decir, el recuento de las células CCR2⁺Ly6C^{hi} sería insignificante y quedaría oculto bajo el recuento de todas las células Ly6C positivas, resultando en recuentos similares en ambas cepas. Sería necesario un recuento de células que co-expresan Ly6C e IBA1 para confirmar esta hipótesis.

Otra posibilidad sería que en los animales CCR2^{-/-} ocurriera una compensación, de tal modo que el déficit de células CCR2⁺Ly6C^{hi} fuera contrarrestado por una mayor infiltración de células CCR2⁻Ly6C^{hi}. Este fenómeno de compensación ya se ha descrito en otros trabajos, donde se observó un importante incremento del número de eosinófilos infiltrados (en lugar de macrófagos) en el tejido adiposo en ratones CCR2^{-/-}. Curiosamente, los eosinófilos infiltrados en esos ratones CCR2^{-/-} modificaron su fenotipo, imitando así a los macrófagos que suelen ocupar este espacio en los animales WT (Bolus et al., 2015).

Se sabe que durante las primeras 24 horas de la inflamación generada mediante la administración ICV de NA se produce una infiltración de neutrófilos, de monocitos/macrófagos, de linfocitos T (CD3 ϵ) y de linfocitos B (Granados-Durán et al., 2015). En los últimos años se han realizado numerosos trabajos donde se describen los receptores de membrana que utilizan estos tipos celulares para acceder al parénquima nervioso. Por un lado, los monocitos (Tsou et al., 2007), los linfocitos T CD4⁺ (Connor et al., 2004) y ocasionalmente los linfocitos NK (van Helden et al., 2012) migran por medio del receptor CCR2 hacia el foco inflamatorio. En cuanto a los receptores de otras quimiocinas, los neutrófilos expresan CXCR1 (Godaly et al., 2001) y los linfocitos B CXCR3 y CXCR5 (Kowarik et al., 2012; Turner et al., 2014). En los linfocitos T la expresión de receptores que facilitan la infiltración es compleja, ya que depende de su estado funcional: naïve o inmaduro, efector y célula memoria (Nolz et al., 2011). Por lo que las células Ly6C que se infiltran en el parénquima nervioso tras la administración de NA podrían ser neutrófilos, linfocitos T o linfocitos B, por ser todas CCR2⁻.

Por otra parte, se ha demostrado que ICAM-1 modula diversos aspectos de los linfocitos T, como su función, diferenciación y migración (Gottrand et al., 2015; Smith, 2003). El incremento en la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular tras el tratamiento con NA (Granados-Durán et al., 2015) sustentaría la posible identidad de linfocitos T de las células CCR2-Ly6C^{hi} reclutadas en ambas cepas, sin que esto descarte a los otros tipos celulares mencionados (neutrófilos y linfocitos B). De hecho, Granados-Durán et al. (2015) describieron una importante infiltración de neutrófilos, mayor incluso que la de monocitos y linfocitos T o B, a las 4 horas tras la inyección de NA.

Todos estos resultados nos llevan a concluir que el incremento de células IBA1 positivas observado en la fase inicial de la inflamación inducida por NA no se debe a la proliferación de la microglía, ni a la invasión de macrófagos periféricos, y que probablemente se debe a la infiltración de monocitos (con fenotipo CCR2⁺Ly6C^{hi}), cuya entrada al parénquima nervioso depende del receptor CCR2. Además, podemos decir que hay infiltración de otros tipos celulares con fenotipo

CCR2-Ly6C^{hi} y MHCII⁺, cuya infiltración es independiente del CCR2. Estas últimas células podrían corresponder a linfocitos T o a neutrófilos.

6.5.4. El receptor CCR2 hace que la respuesta inflamatoria tras la administración de NA sea más virulenta

El análisis del proceso inflamatorio generado por la NA en ratones CCR2^{-/-} comparado con el que ocurre en ratones WT reveló que, en ambas cepas, la NA provoca un incremento en el número de células IBA1-positivas e IL-1 β -positivas (Fig. R-39) y en la expresión (por qPCR) de esta citoquina y de TNF α (Fig. R-40). Sin embargo, dicho incremento fue algo menor en la cepa CCR2^{-/-}. La NA también indujo la expresión de otros mediadores inflamatorios, como CCL2, IL-6, IL-4, IL-10 y TGF β , en los animales WT, pero en los CCR2^{-/-} no siempre fue así. En concreto, el incremento de IL-1 β , de TNF α (como ya se ha dicho) y de IL-10 fue más moderado en los CCR2^{-/-} que en los WT; la quimiocina CCL2 y las citoquinas IL-6 e IL-4 se incrementaron en los CCR2^{-/-} de manera similar a los WT; finalmente, el incremento en la expresión de TGF β observado en los WT no ocurrió en los animales CCR2^{-/-} (Figs. R-40, R-41, R-42).

Podríamos asumir que las diferencias observadas entre los ratones WT y los CCR2^{-/-} son el resultado de la infiltración deficitaria que ocurre en estos últimos. Así, es probable que la mayor expresión de las citoquinas más dañinas (IL-1 β y TNF α) en los WT sea debida a los monocitos circulantes infiltrados en esta cepa, y que además generaron el incremento de macrófagos/microglía en el parénquima nervioso. En los animales CCR2^{-/-}, por su parte, la infiltración deficiente de monocitos tras la administración de NA explicaría el incremento atenuado de IL-1 β y TNF α así como la menor población de macrófagos/microglía en el tejido nervioso.

Dada la conocida capacidad neurotóxica de estas citoquinas pro-inflamatorias, sus niveles atenuados en los animales CCR2^{-/-} podría asociarse a un menor daño cerebral en dicha cepa en comparación con los WT. Por otra parte, también se observó un aumento en los niveles de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, TGF β e IL-4 tras la inyección de NA, lo que sugiere la puesta en marcha de mecanismos reparadores del daño tisular encaminado a la resolución del proceso inflamatorio.

Asumiendo que dichas citoquinas son producidas por la microglía, se mostraría la acción dual y antagónica que presentan frecuentemente los macrófagos/microglía, generando efectos pro-inflamatorios a la vez que otros anti-inflamatorios (Ransohoff and Perry, 2009).

En el caso de la neuroinflamación inducida por NA, sabemos que es un proceso agudo, en el cual una semana después de la inyección buena parte de los síntomas de inflamación han desaparecido (Granados-Durán et al., 2015), y a las dos semanas el proceso inflamatorio está prácticamente resuelto y la degeneración mielínica se ha reparado (Granados-Durán et al., 2017). Las citoquinas anti-inflamatorias mencionadas probablemente contribuyen a ello. Por su parte, el incremento en estas citoquinas tras la inyección de NA observado en los mutantes CCR2^{-/-} no fue igual que en los WT en todos los casos: IL-4 aumentó igual, IL-10 lo hizo de forma más moderada, mientras que el incremento de TGFβ fue nulo en la cepa CCR2^{-/-}. Por tanto, la deficiente infiltración celular que ocurre en ausencia de CCR2 también repercute en la respuesta anti-inflamatoria que se inicia tras la inyección de NA.

Con respecto al papel de los monocitos infiltrados en el tejido nervioso, los resultados obtenidos por distintos autores son contradictorios, variando en función del proceso patológico. En algunos casos la presencia de los receptores CCR2 favorece la recuperación tras procesos de hipoxia e isquémicos, lo cual se refleja en una mejora del aprendizaje (Pimentel-Coelho et al., 2015). Asimismo, tras un traumatismo en el cerebro el receptor CCR2 participa en la recuperación de la actividad locomotora, la memoria espacial e incluso la densidad neuronal (Hsieh et al., 2014). Igualmente, CCR2 favorece la supervivencia de los neuroblastos, propiciando así la neurogénesis tras un accidente cerebrovascular (Laterza et al., 2017).

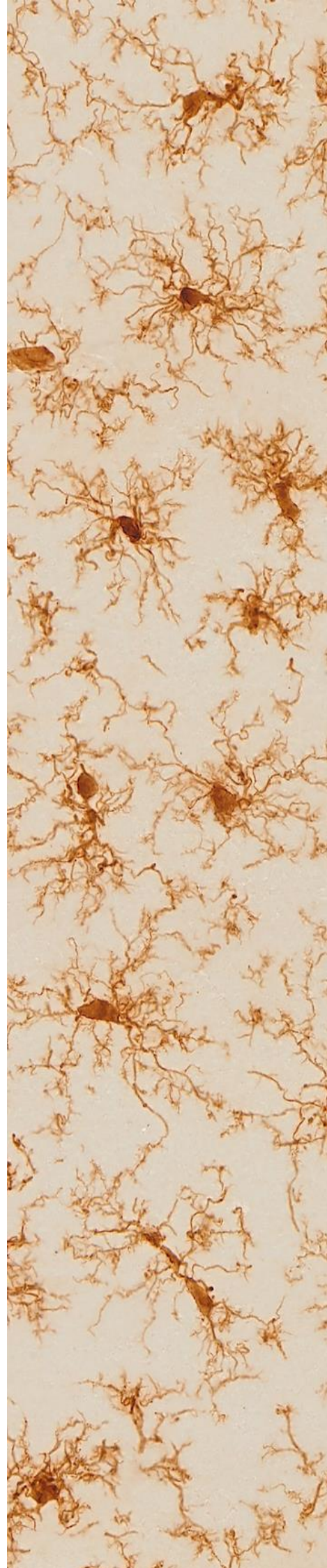
Además, se ha observado un papel relevante de estas células en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, donde los monocitos infiltrados por medio de los receptores CCR2 presentan un papel fagocítico de los depósitos de β-amiloide, de tal forma que una deficiencia de este receptor acelera la progresión de la enfermedad (El Khoury et al., 2007; Liu et al., 2014). Aunque en

patologías neurodegenerativas crónicas, como la enfermedad priónica, la infiltración de monocitos no causa un impacto en la población de microglía (Gómez-Nicola et al., 2014).

Por el contrario, en otros casos se ha observado un efecto perjudicial de los monocitos infiltrados gracias a CCR2. Por ejemplo, dichos monocitos contribuyen a una discapacidad neurológica aguda tras una hemorragia intracraneal (Hammond et al., 2014), así como a la inflamación inducida por un traumatismo en personas de edad avanzada (Morganti et al., 2016). Además, los receptores CCR2 permiten la invasión de monocitos infectados por virus, que generan encefalitis, como es el caso del virus del herpes simple (Boivin et al., 2012; Menasria et al., 2015) o de citomegalovirus, donde el receptor CCR2 regula la salida de los monocitos desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo y su posible posterior entrada en el cerebro (Crane et al., 2009).

Estos trabajos sustentan la hipótesis de que en los procesos agudos, donde los monocitos presentan un papel pro-inflamatorio neurotóxico, la infiltración de los mismos (mediada por el receptor CCR2) en el parénquima nervioso tiene consecuencias negativas en el pronóstico de la patología, exacerbando el proceso inflamatorio y generando un daño mayor. Esta hipótesis se puede trasladar a nuestro modelo de inflamación inducida por NA, que se considera un proceso agudo. En este caso, el receptor CCR2 tiene un papel relevante en la virulencia de la inflamación, ya que facilita la infiltración de los monocitos, que contribuyen al proceso inflamatorio iniciado por la microglía residente. Por estas y otras evidencias, el receptor CCR2 se considera una diana terapéutica muy prometedora para el control de los procesos neuroinflamatorios y para el dolor neuropático (Ramesh, 2014). En futuros diseños experimentales, el receptor CCR2 debería ser tenido en cuenta como un elemento clave en el desarrollo de los procesos inflamatorios provocados por virus/bacterias.

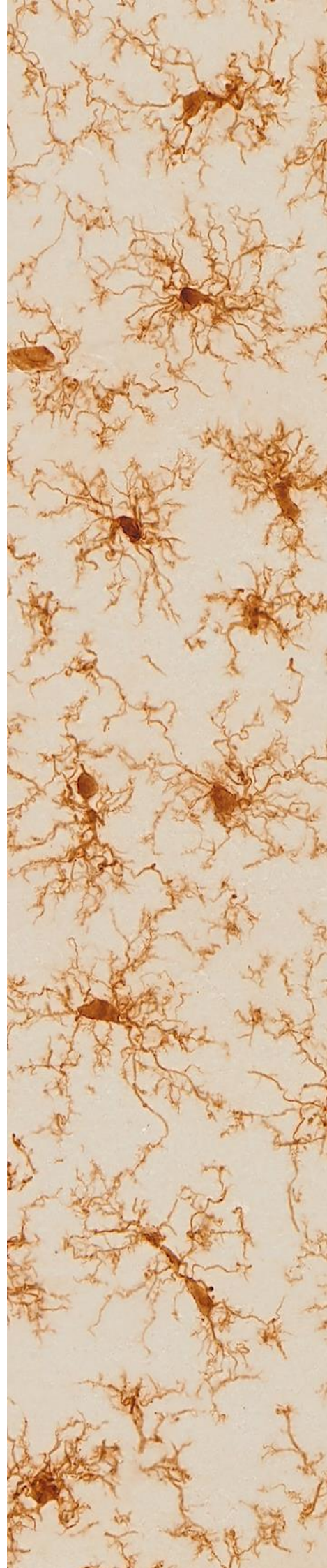
7. Conclusiones



1. The morphological analysis of microglial cells allows their classification in distinct morphotypes, which may be related to different activation states.
2. The specific location of microglia in the different regions of the brain is a crucial factor, which must be considered when intending its classification in morphotypes.
3. The correlation observed between various morphological parameters and Il-1 β expression level demonstrates that such parameters may be used to predict the degree of activation of microglial cells.
4. The receptor TLR4 of microglia is essential in the initiation of the inflammatory process provoked by neuraminidase, while the receptor TLR2 contributes by increasing the expression of inflammatory cytokines.
5. Microglial cells activated by neuraminidase participate in ependymal cell death, although they are not the unique factor involved.
6. Microglia play a fundamental role in the inflammation induced by neuraminidase, and the monocytes recruited to the nervous parenchyma further contribute to the virulence of the inflammatory process.

1. El análisis morfológico de la microglía permite su clasificación en diferentes morfotipos, que pueden relacionarse con distintos estados de activación.
2. La localización de la microglía en las distintas regiones cerebrales es un factor fundamental a considerar cuando se clasifica la microglía en morfotipos.
3. La correlación existente entre los parámetros morfológicos y el nivel de expresión de $Il-1\beta$ demuestra que dichos parámetros pueden ser utilizados para predecir el grado de activación de la microglía.
4. El receptor TLR4 de la microglía es clave en el inicio del proceso inflamatorio generado por la neuraminidasa, mientras que el receptor TLR2 participa incrementando la expresión de citoquinas inflamatorias.
5. La microglía activada por la neuraminidasa participa en la muerte endotelial, aunque no es el único factor implicado.
6. La microglía desempeña un papel esencial en la inflamación inducida por la neuraminidasa, y los monocitos reclutados al parénquima nervioso contribuyen a incrementar la virulencia del proceso inflamatorio.

8. Bibliografía



- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793.
- Abed, Y., Baz, M., and Boivin, G. (2006). Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir. Ther.* 11, 971–976.
- Achúcarro, N. (1911). Nuevo método para el estudio de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Boletín Soc. Española Biol. I*, 139–141.
- Air, G. M. (2012). Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respi. Viruses* 6, 245–256.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F. M. V (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10, 1538–1543.
- Aktas, O., Ullrich, O., Infante-Duarte, C., Nitsch, R., and Zipp, F. (2007). Neuronal damage in brain inflammation. *Arch. Neurol.* 64, 185–189.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, a. M., Sanchez-Vera, I., and Guerri, C. (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-Induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci.* 30, 8285–8295.
- Allan, S. M., Tyrrell, P. J., and Rothwell, N. J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 629–640. d
- Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* 117, 145–152.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36, 165–179.
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., and Adorini, L. (1998). Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.* 160, 4671–4680.
- Alp, H., Tan, H., Orbak, Z., and Keskin, H. (2005). Acute hydrocephalus caused by mumps meningoencephalitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 657–658.
- Amadio, S., De Ninno, A., Montilli, C., Businaro, L., Gerardino, A., and Volonté, C. (2013). Plasticity of primary microglia on micropatterned geometries and spontaneous long-distance migration in microfluidic channels. *BMC Neurosci.* 14, 121–133.
- Amith, S. R., Jayanth, P., Franchuk, S., Finlay, T., Seyrantepe, V., Beyaert, R., et al. (2010). Neu1 desialylation of sialyl α -2,3-linked β -galactosyl residues of Toll-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cell. Signal.* 22, 314–324.
- Amor, S., and Woodroffe, M. N. (2014). Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. *Immunology* 141, 287–291.
- Arnoux, I., and Audinat, E. (2015). Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plast.* 2015, 1–8.
- Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., and Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 11, 47–55.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., et al. (2017). Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Rep.* 18, 391–405.
- Ayoub, A. E., and Salm, a K. (2003). Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *J. Neurosci.* 23, 7759–7766.
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., et al. (2011). Fractalkine and CX3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 32, 2030–2044.
- Bale, J. F. (2015). Virus and immune-mediated encephalitis: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Pediatr. Neurol.* 53, 3–12.
- Banerjee, S., and Bhat, M. A. (2007). Neuron-gial interactions in blood-brain barrier formation. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 235–258.



- Baratas Diaz, L. A. (1997). La obra neuroembriológica de Santiago Ramón y Cajal. *Dynamis* 17, 259–279.
- Baron, R., Babcock, A. A., Nemirovsky, A., Finsen, B., and Monsonego, A. (2014). Accelerated microglial pathology is associated with A β plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 13, 584–595.
- Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y., and Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 32.
- Bechmann, I., Galea, I., and Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 28, 5–11.
- Belarbi, K., and Rosi, S. (2013). Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Bernard, F., Bossu, J. L., and Gaillard, S. (2001). Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J. Neurosci. Res.* 65, 439–445.
- Bernhardt, R., and Nicholls, J. (1999). Transformation of leech microglial cell morphology and properties following co-culture with injured central nervous system tissue. *J. Exp. Biol.* 202, 6, 723–8.
- Bilbo, S. D., and Schawrz, J. M. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front. Behav. Neurosci.* 3.
- Bland, S. T., Beckley, J. T., Young, S., Tsang, V., Watkins, L. R., Maier, S. F., et al. (2010). Enduring consequences of early-life infection on glial and neural cell genesis within cognitive regions of the brain. *Brain. Behav. Immun.* 24, 329–338.
- Block ML (2008). NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci. Dec* 39.
- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., and Riederer P (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett. Dec* 29202, 17–20.
- Boivin, N., Menasria, R., Gosselin, D., Rivest, S., and Boivin, G. (2012). Impact of deficiency in CCR2 and CX3CR1 receptors on monocytes trafficking in herpes simplex virus encephalitis. *J. Gen. Virol.* 93, 1294–1304.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C. A., Klunk, W. E., et al. (2008). Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci.* 28, 4283–4292.
- Bolus, W. R., Gutierrez, D. A., Kennedy, A. J., Anderson-Baucum, E. K., and Hasty, A. H. (2015). CCR2 deficiency leads to increased eosinophils, alternative macrophage activation, and type 2 cytokine expression in adipose tissue. *J. Leukoc. Biol.* 98, 467–477.
- Brightman, M. W., and Palay, S. L. (1963). The fine structure of Ependyma in the brain of the rat. *J Cell Biol* 19, 415–39.
- Brites, D., and Vaz, A. R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Brown, A. S. (2006). Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 32, 200–202.
- Brown, A. S. (2012). Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev. Neurobiol.* 72, 1272–1276.
- Brown, A. S., and Patterson, P. H. (2011). Maternal infection and schizophrenia: Implications for prevention. *Schizophr. Bull.* 37, 284–290.
- Caliński, T., and Harabasz, J. (1974). A dendrite method for cluster analysis. *Commun. Stat. Methods* 3, 1–27.
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., and Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* 213, 48–65.
- Cartier, L., Hartley, O., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.-H. (2005). Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 16–42.



- Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M. a., and Lizasoain, I. (2007). Toll-Like Receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115, 1599–1608.
- Chan, W. Y., Kohsaka, S., and Rezaie, P. (2007). The origin and cell lineage of microglia—New concepts. *Brain Res. Rev.* 53, 344–354.
- Charo, I. F., and Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621.
- Chen, G. Y., Brown, N. K., Wu, W., Khedri, Z., Yu, H., Chen, X., et al. (2014). Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *Elife* 3, e04066.
- Chen, G.-Y., Chen, X., King, S., Cavassani, K. A., Cheng, J., Zheng, X., et al. (2011). Amelioration of sepsis by inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-SiglecG interaction. *Nat. Biotechnol.* 29, 428–435.
- Chen, H., O'Reilly, E. J., Schwarzschild, M. A., and Ascherio, A. (2008). Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 167, 90–95.
- Chen, K., Iribarren, P., Hu, J., Chen, J., Gong, W., Cho, E. H., et al. (2006). Activation of Toll-like Receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *J. Biol. Chem.* 281, 3651–3659.
- Chen, X., and Jensen, P. E. (2008). MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 40–44.
- Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P., and Kominsky, M. (2007). Elevation of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Cerebrospinal Fluid of Autistic Children. *Pediatr. Neurol.* 36, 361–365.
- Cho, M. H., Cho, K., Kang, H. J., Jeon, E. Y., Kim, H. S., Kwon, H. J., et al. (2014). Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 10, 1761–1775.
- Chu, H. X., Arumugam, T. V., Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2014). Role of CCR2 in Inflammatory Conditions of the Central Nervous System. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1425–1429.
- Chung, I., and Benveniste, E. (1990). Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J. Immunol.* 15, 2999–3007.
- Ciesielski-Treska, J., Grant, N. J., Ulrich, G., Corrotte, M., Bailly, Y., Haeberle, A. M., et al. (2004). Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* 46, 101–115.
- Cioffi, D. L., Pandey, S., Alvarez, D. F., and Cioffi, E. A. (2012). Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1067–L1077.
- Colman, P. M. (1994). Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 3, 1687–1696.
- Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J. L., and Rovère, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J. Neuroimmunol.* 224, 93–100.
- Connor, S. J., Paraskevopoulos, N., Newman, R., Cuan, N., Hampartzoumian, T., Lloyd, A. R., et al. (2004). CCR2 expressing CD4+ T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease. *Gut* 53, 1287–94.

- Crane, M. J., Hokeness-Antonelli, K. L., and Salazar-Mather, T. P. (2009). Regulation of Inflammatory Monocyte/Macrophage Recruitment from the Bone Marrow during Murine Cytomegalovirus Infection: Role for Type I Interferons in Localized Induction of CCR2 Ligands. *J. Immunol.* 183, 2810–2817.
- Cross, S., Start, R., Silcocks, P., Bull, A., Cotton, D., and Underwood, J. (1993). Quantitation of the renal arterial tree by fractal analysis. *J. Pathol.* 170, 479–8.
- Cutting, J. E., and Garvin, J. J. (1987). Fractal curves and complexity. *Percept. Psychophys.* 42, 365–370.
- Dan, W. U., Xian, Z., Min, Z., and Ai-ling, Z. (2015). The role of the TLR4 / NF- κ B signaling pathway in A β accumulation in primary hippocampal neurons. *Acta Physiol. Sin.* 67, 319–328.
- Danese, S., Dejana, E., and Fiocchi, C. (2007). Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J. Immunol.* 178, 6017–6022.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., et al. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.
- Davis, E. J., Foster, T. D., and Thomas, W. E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* 34, 73–78.
- de Jong, M. D., Cam, B. Van, Qui, P. T., Hien, V. M., Thanh, T. T., Hue, N. B., et al. (2005). Fatal Avian Influenza A (H5N1) in a Child Presenting with Diarrhea Followed by Coma. *N. Engl. J. Med.* 352, 686–691.
- de Sousa, A. A., dos Reis, R. R., de Lima, C. M., de Oliveira, M. A., Fernandes, T. N., Gomes, G. F., et al. (2015). Three-dimensional morphometric analysis of microglial changes in a mouse model of virus encephalitis: Age and environmental influences. *Eur. J. Neurosci.* 42, 2036–2050.
- De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., Rizzo, M. I., Gallo, A., et al. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmun. Rev.* 15, 1005–1011.
- Del Carmen Gómez-Roldán, M., Pérez-Martín, M., Capilla-González, V., Cifuentes, M., Pérez, J., García-Verdugo, J. M., et al. (2008). Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J. Comp. Neurol.* 507, 1571–1587.
- Desalvo, M. K., Mayer, N., Mayer, F., and Bainton, R. J. (2011). Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of *Drosophila*. *Glia* 59, 1322–1340.
- Dheen, S. T., Kaur, C., and Ling, E.-A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–97.
- Diniz, D. G., Silva, G. O., Naves, T. B., Fernandes, T. N., Araújo, S. C., Diniz, J. A. P., et al. (2016). Hierarchical Cluster Analysis of three-dimensional reconstructions of unbiased sampled microglia shows not continuous morphological changes from stage 1 to 2 after Multiple Dengue infections in *Callithrix penicillata*. *Front. Neuroanat.* 10, 23.
- Domínguez-Pinos, M. D., Páez, P., Jiménez, A.-J., Weil, B., Arráez, M.-A., Pérez-Fígares, J.-M., et al. (2005). Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 595–604.
- Dopp, J. M., Mackenzie-Graham, A., Otero, G. C., and Merrill, J. E. (1997). Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J. Neuroimmunol.* 75, 104–112.

- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6: 734-746.
- Dudda, J. C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., et al. (2005). Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: Important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 35, 1056-1065.
- Durafourt, B. A., Moore, C. S., Zammit, D. A., Johnson, T. A., Zaguia, F., Guiot, M. C., et al. (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 60, 717-727.
- Edele, F., Molenaar, R., Gutle, D., Dudda, J. C., Jakob, T., Homey, B., et al. (2008). Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J. Immunol.* 181, 3745-3749.
- Ekstrand, J. J. (2012). Neurologic Complications of Influenza. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19, 96-100.
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., et al. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* 13, 432-438.
- ElAli, A., and Rivest, S. (2016). Microglia Ontology and Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 4.
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P., and Weller, R. O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* 18, 123-131.
- Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K., and Wolburg, H. (2001). Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation. *Microsc. Res. Tech.* 52, 112-129.
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R. P., and Sawchenko, P. E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J. Comp. Neurol.* 361, 681-698.
- Esen, N., and Kielian, T. (2006). Central role for MyD88 in the responses of microglia to pathogen-associated molecular patterns. *J. Immunol.* 176, 6802-11.
- Fantuzzi, L., Borghi, P., Ciolli, V., Pavlakis, G., Belardelli, F., and Gessani, S. (1999). Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 94, 875-883.
- Farfara, D., Lifshitz, V., and Frenkel, D. (2008). Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 762-780.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138-145.
- Faustino, J. V., Wang, X., Johnson, C. E., Klivanov, A., Derugin, N., Wendland, M. F., et al. (2011). Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J. Neurosci.* 31, 12992-13001.
- Fearon, D. T. (1978). Regulation by membrane sialic acid of β 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Immunology* 75, 1971-1975.
- Fedoroff, S., Zhai, R., and Novak, J. P. (1997). Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 50, 477-486.
- Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659-693.

- Fernandez, E. J., and Lolis, E. (2002). Structure junction, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 469–499.
- Fernández, E., and Jelinek, H. F. (2001). Use of Fractal Theory in Neuroscience: Methods, Advantages, and Potential Problems. *Methods* 24, 309–321.
- Fisher, R. (1936). The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann. Eugen.* 7, 179–188.
- Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., et al. (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81, 1009–1023.
- Franklin, K., and Paxinus, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3th editio. San Diego, California (USA): Academic Press.
- French, R. A., VanHoy, R. W., Chizzonite, R., Zachary, J. F., Dantzer, R., Parnet, P., et al. (1999). Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J Neuroimmunol* 93, 194–202.
- Fujimoto, S., Kobayashi, M., Uemura, O., Iwasa, M., Ando, T., Katoh, T., et al. (1998). PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. *Lancet* 352, 873–5.
- Fukushima, S., Furube, E., Itoh, M., Nakashima, T., and Miyata, S. (2015). Robust increase of microglia proliferation in the fornix of hippocampal axonal pathway after a single LPS stimulation. *J. Neuroimmunol.* 285, 31–40.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V. H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28, 12–18.
- Galea, I., Palin, K., Newman, T. A., Van Rooijen, N., Perry, V. H., and Boche, D. (2005). Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia* 49, 375–384.
- Gao, H.-M., Zhou, H., Zhang, F., Wilson, B. C., Kam, W., and Hong, J.-S. (2011). HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J. Neurosci.* 31, 1081–1092.
- Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J. L., Bravo, L., Berrocoso, E., Caso, J. R., et al. (2011). Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J. Neuroinflammation* 8, 151.
- Garcia-Bonilla, L., Faraco, G., Moore, J., Murphy, M., Racchumi, G., Srinivasan, J., et al. (2016). Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. *J. Neuroinflammation* 13, 285.
- Gee, G. V., Dugan, A. S., Tsomaia, N., Mierke, D. F., and Atwood, W. J. (2006). The role of sialic acid in human polyomavirus infections. *Glycoconj. J.* 23, 19–26.
- Gemma, C., and Bachstetter, A. (2013). The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 7(229), 1–5.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (80-.)*. 330, 841–845.
- Glaser, C. A., Winter, K., DuBray, K., Harriman, K., Uyeki, T. M., Sejvar, J., et al. (2012). A population-based study of neurologic manifestations of severe influenza A (H1N1) pdm09 in California. *Clin. Infect. Dis.* 55, 514–520.
- Glenn, J. A., Ward, S. A., Stone, C. R., Booth, P. L., and Thomas, W. E. (1992). Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J. Anat* 180, 109–118.
- Godaly, G., Bergsten, G., Hang, L., Fischer, H., Frendeus, B., Lundstedt, A.-C., et al. (2001). Neutrophil recruitment, chemokine receptors, and resistance to mucosal infection. *J. Leukoc. Biol.* 69, 899–906.



- Gold, M., and El Khoury, J. (2015). β -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Semin. Immunopathol.* 37, 607–611.
- Goldberger, A. L., and West, B. J. (1987). Fractals in physiology and medicine. *Yale J. Biol. Med.* 60, 421–435.
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D. I., Gonçalves, N., et al. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J. Neuroinflammation* 10, 16.
- Gomez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S., and Perry, V. H. (2013). Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 33, 2481–2493.
- Gomez-Nicola, D., and Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain. *Neurosci.* 21, 169–184.
- Gómez-Nicola, D., Schettters, S. T. T., and Hugh Perry, V. (2014). Differential role of CCR2 in the dynamics of microglia and perivascular macrophages during prion disease. *Glia* 62, 1041–1052.
- Gottrand, G., Courau, T., Thomas-Vaslin, V., Prevel, N., Vazquez, T., Ruocco, M. G., et al. (2015). Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* 146, 657–670.
- Gouwy, M. (2004). Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* 76, 185–194.
- Graeber, M. B., Streit, W. J., and Kreutzberg, G. W. (1988). The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *J. Neurocytol.* 17, 573–580.
- Granados-Durán, P., López-Ávalos, M. D., Grondona, J. M., Gómez-Roldán, M. D. C., Cifuentes, M., Pérez-Martín, M., Álvarez, M., Rodríguez de Fonseca, F., Fernández-Llebrez, P. (2015). Neuroinflammation Induced by Intracerebroventricular Injection of Microbial Neuraminidase. *Front. Med.* 2, 1–12.
- Granados-Durán, P., López-Ávalos, M. D., Cifuentes, M., Pérez-Martín, M., Fernández-Arjona, M. del M., Hughes, T. R., Johnson, K., Morgan, P., Fernández-Llebrez, P., Grondona, J. M. (2017). Microbial neuraminidase induces a moderate and transient myelin vacuolation independent of complement system activation. *Front. Neurol.* 8, 1–14.
- Granados-Durán, P., López-Ávalos, M. D., Hughes, T. R., Johnson, K., Morgan, B. P., Tamburini, P. P., Fernández-Llebrez, P., Grondona J. M. (2016). Complement system activation contributes to the ependymal damage induced by microbial neuraminidase. *J. Neuroinflammation* 13, 1–15.
- Grewal, Pk., Uchiyama, S., Ditto, D., Varki, N., Dt, L., Nizet V, et al. (2008). The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med* 14, 648–55.
- Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., and López-Ávalos, M. D. (2013). A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochem. Cell Biol.* 139, 205–220.
- Grondona, J. M., Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Pérez, J., Jiménez, A.J., Pérez-Fígares, J., Fernández-Llebrez, P. (1996). Ependymal Denudation, Aqueductal Obliteration and Hydrocephalus after a Single Injection of Neuraminidase into the Lateral Ventricle of Adult Rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 999–1008.
- Grooms, S. Y., Terracio, L., and Jones, L. S. (1993). Anatomical localization of beta 1 integrin-like immunoreactivity in rat brain. *Exp. Neurol.* 122, 253–259.

- Gu, J., Xie, Z., Gao, Z., Liu, J., Korteweg, C., Ye, J., et al. (2007). H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* 370, 1137–1145.
- Gubareva, L. V., Kaiser, L., Matrosovich, M. N., Soo-Hoo, Y., and Hayden, F. G. (2001). Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with Oseltamivir. *J. Infect. Dis.* 183, 523–531.
- Guerra, M. M., Henzi, R., Ortloff, A., Lichtin, N., Vio, K., Jimenez, A. J., et al. (2015). Cell junction pathology of neural stem cells is associated with ventricular zone disruption, hydrocephalus, and abnormal neurogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 653–671.
- Hammond, M. D., Taylor, R. A., Mullen, M. T., Ai, Y., Aguila, H. L., Mack, M., et al. (2014). CCR2⁺Ly6C^{hi} inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. *J. Neurosci.* 34, 3901–3909.
- Hanamsagar, R., Cardona, S., Kielian, T., and Cardona, S. (2014). “Roles in immune responses,” in *microglia in health and disease*, ed. Springer (New York, NY), 115–144.
- Hanisch, U. K., Johnson, T. V., and Kipnis, J. (2008). Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci.* 31, 176–182.
- Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 660–669.
- Hellwig, S., Heinrich, A., and Biber, K. (2013). The brain’s best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W., and Appel, S. H. (2009). Microglia in ALS: The good, the bad, and the resting. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 389–398.
- Hermann, D. M., and ElAli, A. (2012). The Abluminal Endothelial Membrane in Neurovascular Remodeling in Health and Disease. *Sci. Signal.* 5, 236. re4.
- Herx, L. M., Rivest, S., and Yong, V. W. (2000). Central Nervous System-Initiated Inflammation and Neurotrophism in Trauma: IL-1 Is Required for the Production of Ciliary Neurotrophic Factor. *J. Immunol.* 165, 2232–2239.
- Hinwood, M., Tynan, R. J., Charnley, J. L., Beynon, S. B., Day, T. A., and Walker, F. R. (2013). Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: Structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb. Cortex* 23, 1784–1797.
- Hoffmann, O., Braun, J. S., Becker, D., Halle, a., Freyer, D., Dagand, E., et al. (2007). TLR2 Mediates Neuroinflammation and Neuronal Damage. *J. Immunol.* 178, 6476–6481.
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., and Appel, S. H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 12, 364–375.
- Hovens, I., Nyakas, C., and Schoemaker, R. (2014). A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* 1, 82–88.
- Hristovska, I., and Pascual, O. (2016). Deciphering resting microglial morphology and process motility from a synaptic prospect. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 1–7.
- Hsieh, C. L., Niemi, E. C., Wang, S. H., Lee, C. C., Bingham, D., Zhang, J., et al. (2014). CCR2 deficiency impairs macrophage infiltration and improves cognitive function after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 31, 1677–1688.
- Hughes, M. M., Field, R. H., Perry, V. H., Murray, C. L., and Cunningham, C. (2010). Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads asncd of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia* 58, 2017–2030.

- Ifergan, I., Kébir, H., Bernard, M., Wosik, K., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., et al. (2008). The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 131, 785–799.
- Isa, P., Arias, C. F., and López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27–37.
- Jacobs, S., and Doering, L. C. (2010). Astrocytes prevent abnormal neuronal development in the fragile X mouse. *J. Neurosci.* 30, 4508–4514.
- James, R. E., Hillis, J., Adorján, I., Gratton, B., Mundim, M. V., Iqbal, A. J., et al. (2016). Loss of galectin-3 decreases the number of immune cells in the subventricular zone and restores proliferation in a viral model of multiple sclerosis. *Glia* 64, 105–121.
- Jiménez, A. J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M. M., Fernández-Llebreg, P., and Pérez-Fígares, J.-M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2, e28426.
- Jin, J.-J., Kim, H.-D., Maxwell, J. A., Li, L., and Fukuchi, K. (2008). Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 23.
- Johnson, R., Johnson, K., and Edmonds, C. (1967). Virus-induced hydrocephalus: development of aqueductal stenosis in hamsters after mumps infection. *Science (80-)*. 1157, 1066–7.
- Johnson, R. T., and Johnson, K. P. (1969). Experimental and Molecular Pathology Hydrocephalus as a sequela of experimental myxovirus infections ☆. *Exp. Mol. Pathol.* 10, 68–80.
- Jurgens, H. A., Amancherla, K., and Johnson, R. W. (2012). Influenza Infection Induces Neuroinflammation, Alters Hippocampal Neuron Morphology, and Impairs Cognition in Adult Mice. *J. Neurosci.* 32, 3958–3968.
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., and Hol, E. M. (2012). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswe PS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 60, 615–629.
- Karperien, A., Ahammer, H., and Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–18.
- Karperien, A., Jelinek, H. F., and Milosevic, N. (2011). Reviewing lacunarity analysis and classification of microglia in neuroscience. in *ESMTB*
- Karperien, A. L., and Jelinek, H. F. (2015). Fractal, multifractal, and lacunarity analysis of microglia in tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 2013–2016.
- Karperien, A. L., Jelinek, H. F., and Buchan, A. M. (2008). Box-counting analysis of microglia form in schizophrenia, alzheimer's disease and affective disorder. *Fractals* 16, 103–107.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Zou, Z., and Ling, E. A. (2014). Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct. Funct.* 219, 151–170.
- Kaushik, D. K., Gupta, M., and Basu, A. (2011). Microglial response to viral challenges: every silver lining comes with a cloud. *Front. Biosci.* 17, 2187–2205.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816–825.
- Kerfoot, S. M., McRae, K., Lam, F., McAvoy, E. F., Clark, S., Brain, M., et al. (2008). A novel mechanism of erythrocyte capture from circulation in humans. *Exp. Hematol.* 36, 111–118.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77, 10–18. 3.

- Kielian, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous System glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res.* 83, 711-730.
- Kierdorf, K., and Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Kim, C. U., W, L., Williams, M., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., et al. (1997). Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 681-690.
- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H., Wagner, H., Koedel, U., et al. (2008). Innate Immunity to Pneumococcal Infection of the Central Nervous System Depends on Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Infect. Dis.* 198, 1028-1036.
- Kongsui, R., Beynon, S. B., Johnson, S. J., and Walker, F. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *J. Neuroinflammation* 11, 182..
- Kongsui, R., Johnson, S. J., Graham, B. A., Nilsson, M., and Walker, F. R. (2015). A combined cumulative threshold spectra and digital reconstruction analysis reveal structural alterations of microglia within the prefrontal cortex following low-dose LPS administration. *Neuroscience* 310, 629-640.
- Konishi, H., Kobayashi, M., Kunisawa, T., Imai, K., Sayo, A., Malissen, B., et al. (2017). Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes. *Glia.*
- Kowarik, M. C., Cepok, S., Sellner, J., Grummel, V., Weber, M. S., Korn, T., et al. (2012). CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, 624.
- Kozłowski, C., and Weimer, R. M. (2012). An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* 7, 1-9.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16-34.
- Kuric, E., and Ruscher, K. (2014). Dynamics of major histocompatibility complex class II-positive cells in the postischemic brain - influence of levodopa treatment. *J. Neuroinflammation* 11, 145.
- Lampron, A., ElAli, A., and Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its Environment. *Neuron.*
- Landini, G., and Rippin, J. W. (1992). Fractal dimensions of the epithelial-connective tissue interface in premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 15, 144-149.
- Laterza, C., Wattananit, S., Uoshima, N., Ge, R., Pekny, R., Tornero, D., et al. (2017). Monocyte depletion early after stroke promotes neurogenesis from endogenous neural stem cells in adult brain. *Exp. Neurol.* 297, 129-137.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Lawson, L., Perry, V., and Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse. *Neuroscience* 48, 405-415.
- Le, W., Wu, J., and Tang, Y. (2016). Protective microglia and their regulation in Parkinson's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 89.
- Lechtreck, K. F., Delmotte, P., Robinson, M. L., Sanderson, M. J., and Witman, G. B. (2008). Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *J. Cell Biol.* 180, 633-643.

- Lee, P. Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C. C., and Nigrovic, P. A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* 94, 585–594.
- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253–263.
- Lehnardt, S., Henneke, P., Lien, E., Kasper, D. L., Volpe, J. J., Bechmann, I., et al. (2006). A Mechanism for Neurodegeneration Induced by Group B Streptococci through Activation of the TLR2/MyD88 Pathway in Microglia. *J. Immunol.* 177, 583–592.
- Lehnardt, S., Lehmann, S., Kaul, D., Tschimmel, K., Hoffmann, O., Cho, S., et al. (2007a). Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J. Neuroimmunol.* 190, 28–33.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., et al. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8514–8519.
- Lehnardt, S., Wennekamp, J., Freyer, D., Liedtke, C., Krueger, C., Nitsch, R., et al. (2007b). TLR2 and Caspase-8 Are Essential for Group B Streptococcus-Induced Apoptosis in Microglia. *J. Immunol.* 179, 6134–6143.
- Li, X.-Q., Wang, J., Fang, B., Tan, W.-F., and Ma, H. (2014). Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood–spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol. Brain* 7, 28.
- Li, Y. C., Bai, W. Z., and Hashikawa, T. (2007). Regionally varying F-actin network in the apical cytoplasm of ependymocytes. *Neurosci. Res.* 57, 522–530.
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., and Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* 237, 147–152.
- Limatola, C., and Ransohoff, R. M. (2014). Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Lin, A., Kenis, G., Bignotti, S., Tura, G.-J.-B., De Jong, R., Bosmans, E., et al. (1998). The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr. Res.* 32, 9–15.
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., et al. (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science (80-.)*. 320, 807–811.
- Lin, H.-Y., Tang, C.-H., Chen, J.-H., Chuang, J.-Y., Huang, S.-M., Tan, T.-W., et al. (2011). Peptidoglycan induces interleukin-6 expression through the TLR2 receptor, JNK, c-Jun, and AP-1 pathways in microglia. *J. Cell. Physiol.* 226, 1573–1582.
- Lindsberg PJ, Carpén O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. (1996). Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation.* 94, 5: 939-45.
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., and Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 8342–8355.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* 188, 1098–1107.
- Liu, Y., Chen, G. Y., and Zheng, P. (2009). CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol.* 30, 557–561.
- Liwosz, A., Lei, T., and Kukuruzinska, M. A. (2006). N-Glycosylation affects the molecular organization and stability of e-cadherin junctions. *J. Biol. Chem.* 281, 23138–23149.

- Long, E. O. (2011). ICAM-1: Getting a Grip on Leukocyte Adhesion. *J. Immunol.* 186, 5021–5023.
- Losa, G. A. (2009). The fractal geometry of life. *Riv. di Biol. Forum* 102, 29–60.
- Losa, G. A., and Nonnenmacher, T. F. (1996). Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod. Pathol.* 9, 174–82.
- Lucas, S.-M., Rothwell, N. J., and Gibson, R. M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147, S232–S240.
- Luis, J., Flores-Alvarado, Gabriel-Ortiz, G., Pacheco-Moisés, F. P., and Bitzer-Quintero, O. K. (2015). Mecanismos patogénicos en el desarrollo de la esclerosis múltiple: ambiente, genes, sistema inmune y estrés oxidativo. *Invest. Clin.* 56, 1–14.
- Lull, M., and Block, M. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7, 354–65.
- Mackay, C. R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* 2, 95–101.
- Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K. V., and Gold, R. (2001). Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J. Immunol.* 167, 5004–5010.
- Mandelbrot, B. (1987). *Los objetos fractales: Forma, azar y dimensión*. 2nd Editio. Barcelona: Tutquets editores.
- Mandelbrot, B. B. (1982). *The Fractal Geometry of Nature*. New York: WH Freeman and Company.
- Mandrekar-Colucci, S., and Landreth, G. E. (2010). Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 156–67.
- Margolis, G., and Kiham, L. (1969). Hydrocephalus in hamsters, ferrets, rats, and mice following inoculations with reovirus type 1. *Lab. Investig.* 22, 183–188.
- Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.
- McCarthy, G. M., Bridges, C. R., Blednov, Y. A., and Harris, R. A. (2017). CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. *F1000Research* 6, 1144.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., and McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1285.
- Mckimm-Breschkin, J. L. (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respi. Viruses*.
- Mcwhorter, F. Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., and Liu, W. F. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17253–8.
- Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L., Baron, P., Villalba, M., et al. (1995). Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374, 647–650.
- Menasria, R., Canivet, C., Piret, J., and Boivin, G. (2015). Infiltration pattern of blood monocytes into the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis. *PLoS One* 10.
- Merino, J., Muñetón-Gómez, V., MI, A., and Toledano-Díaz A (2016). Effects of CX3CR1 and Fractalkine chemokines in amyloid beta clearance and p-Tau accumulation in Alzheimer's disease (AD) rodent models: Is Fractalkine a systemic biomarker for AD? *Curr Alzheimer Res* 13, 403–12.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, a., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* 29, 359–370..

- Mildner, A., MacK, M., Schmidt, H., Brück, W., Djukic, M., Zabel, M. D., et al. (2009). CCR2⁺Ly-6C^{hi} monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 132, 2487–2500.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.-K., Mack, M., et al. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6C^{hi}CCR2⁺ monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* 10, 1544–1553.
- Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., and Kirkpatrick, B. (2011). Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. *Biol. Psychiatry*.
- Milošević, N. T., Ristanović, D., Gudović, R., Rajković, K., and Marić, D. (2007). Application of fractal analysis to neuronal dendritic arborisation patterns of the monkey dentate nucleus. *Neurosci. Lett.* 425, 23–27.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278.
- Miyamoto, A., Wake, H., Moorhouse, A. J., and Nabekura, J. (2013). Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 70.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 165, 208–210.
- Mora, J. R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., and von Andrian, U. H. (2005). Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 201, 303–16.
- Morganti, J. M., Riparip, L.-K., Chou, A., Liu, S., Gupta, N., and Rosi, S. (2016). Age exacerbates the CCR2/5-mediated neuroinflammatory response to traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* 13, 80.
- Morrison, H. W., and Filosa, J. A. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J. Neuroinflammation* 10, 4.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittewer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954–962.
- Mosmann, T., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138–146.
- Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619–630.
- Nagra, G., Koh, L., Aubert, I., Kim, M., and Johnston, M. (2009). Intraventricular injection of antibodies to beta1-integrins generates pressure gradients in the brain favoring hydrocephalus development in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1312–21.
- Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A. E., Fazakas, C., Dung, N. T. K., Haskó, J., et al. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 57, 556–564.
- Napoli, I., and Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030–1038.
- Nardone, R., Golaszewski, S., Trinkka, E., Tezzon, F., and Zuccoli, G. (2011). Acute disseminated encephalomyelitis preceding measles exanthema. *J. Child Neurol.* 26, 1590–2.
- Nawa, H., and Takei, N. (2006). Recent progress in animal modeling of immune inflammatory processes in schizophrenia: Implication of specific cytokines. *Neurosci. Res.* 56, 2–13.

- Neumann, J., Sauerzweig, S., Ronicke, R., Gunzer, F., Dinkel, K., Ullrich, O., et al. (2008). Microglia Cells Protect Neurons by Direct Engulfment of Invading Neutrophil Granulocytes: A New Mechanism of CNS Immune Privilege. *J. Neurosci.* 28, 5965–5975.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum* 11, 95–96.
- Nolz, J. C., Starbeck-Miller, G. R., and Harty, J. T. (2011). Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy* 3, 1223–1233.
- Noriega, L., Verdugo, R., Araos, R., Munita, J., Díaz, V., Marcotti, A., et al. (2010). Pandemic influenza A (H1N1) 2009 with neurological manifestations, a case series. *Influ. Other Respir Viruses* May 14, 117–20.
- O'Keefe, G. M., Nguyen, V. T., and Benveniste, E. N. (2002). Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J. Neurovirol.* 8, 496–512.
- Ohgomori, T., Yamada, J., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., and Jinno, S. (2016). Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1^{G93A} transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 43, 1340–1351.
- Okada, T., and Suzuki, H. (2017). Toll-like receptor 4 as a possible therapeutic target for delayed brain injuries after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen. Res.* 12, 193–196.
- Olah, M., Biber, K., Vinet, J., and Boddeke, H. W. G. M. (2011). Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol. Disord. drug targets* 10, 108–118.
- Oliver, C., González, C. A., Alvial, G., Flores, C. A., Rodríguez, E. M., and Bátiz, L. F. (2013). Disruption of CDH2/N-cadherin-based adherens junctions leads to apoptosis of ependymal cells and denudation of brain ventricular walls. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 846–60.
- Olson, E., and McKeon, R. J. (2004). Characterization of Cellular and Neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. *J. Neurol. Sci* 227, 7–19.
- Olson, J. K., and Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., and Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665.
- Oyoshi, M. K., Elkhail, A., Scott, J. E., Wurbel, M. A., Hornick, J. L., Campbell, J. J., et al. (2011). Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *J. Clin. Invest.* 121, 2210–2220.
- Özkale, Y., Erol, I., Özkale, M., Demir, Ş., and Alehan, F. (2012). Acute disseminated encephalomyelitis associated with influenza AH1N1 infection. *Pediatr. Neurol.* 47, 62–64.
- Pacheco, R., Contreras, F., and Prado, C. (2012). Cells, molecules and mechanisms involved in the neuro-immune interaction. *Cell Interact.*
- Palomino, D. C. T., and Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)* 13, 469–473.
- Parisi, C., Napoli, G., Amadio, S., Spalloni, A., Apolloni, S., Longone, P., et al. (2016a). MicroRNA-125b regulates microglia activation and motor neuron death in ALS. *Cell Death Differ.* 23, 531–541.
- Parisi, C., Napoli, G., Pelegrin, P., and Volonté, C. (2016b). M1 and M2 Functional imprinting of primary microglia: role of P2X7 activation and miR-125b. *Mediators Inflamm.* 2016.

- Park, J., Paik, S., Jou, I., and Park, S. (2008). Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein; implications for Parkinson's disease. *Glia* 15, 1212–23.
- Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 331–60.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A. J., and Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* 77, 3722–3730.
- Patel, S., and Player, M. R. (2009). Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 599–610.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sixth edit. Perth, Australia: Elsevier.
- Perez-Pouchoulen, M., Vanryzin, J. W., and Mccarthy, M. M. (2015). Morphological and phagocytic profile of microglia in the developing rat cerebellum 1 , 2 , 3. *eNeuro* 2, 1–15.
- Petersen, M. A., and Dailey, M. E. (2004). Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46, 195–206.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–45.
- Pimentel-Coelho, P. M., Michaud, J. P., and Rivest, S. (2015). C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) signaling protects neonatal male mice with hypoxic-ischemic hippocampal damage from developing spatial learning deficits. *Behav. Brain Res.* 286, 146–151.
- Plotnick, R. E., Gardner, R. H., Hargrove, W. W., Prestegard, K., and Perlmutter, M. (1996). Lacunarity analysis: A general technique for the analysis of spatial patterns. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics* 53, 5461–5468.
- Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., and Dittel, B. N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J. Neurosci. Res.* 81, 374–389.
- Popescu, C. P., Florescu, S. A., Lupulescu, E., Zaharia, M., Tardei, G., Lazar, M., et al. (2017). Neurologic complications of influenza B virus infection in adults, Romania. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 574–581.
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A., Gendron, A., Bah, R., and Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol. Psychiatry* 63, 801–8.
- Pshezhetsky, A., and Ashmarina, L. I. (2013). Desialylation of surface receptors as a new dimension in cell signaling. *Biochem. Biokhimiia* 78, 736–45.
- Rahimifard, M., Maqbool, F., Moeini-Nodeh, S., Niaz, K., Abdollahi, M., Braidy, N., et al. (2017). Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing Res. Rev.* 36, 11–19.
- Rambach, G., Dum, D., Mohsenipour, I., Hagleitner, M., Würzner, R., Lass-Flörl, C., et al. (2010). Secretion of a fungal protease represents a complement evasion mechanism in cerebral aspergillosis. *Mol. Immunol.* 47, 1438–1449.
- Ramesh, G. (2014). Novel Therapeutic Targets in Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Inflamm. Cell Signal.* 1.
- Ramón y Cajal, S. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* XI, 215–315.
- Ransohoff, R. M., and Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164–1171.
- Ransohoff, R. M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 623–635.
- Ransohoff, R. M., and Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.



- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR Methods Appl.*, 21–34.
- Ravichandran, K. S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445–455.
- Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M., et al. (2009). Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain. Behav. Immun.* 23, 55–63.
- Reed-Geaghan, E. G., Savage, J. C., Hise, A. G., and Landreth, G. E. (2009). CD14 and Toll-Like Receptors 2 and 4 Are Required for Fibrillar A β -Stimulated Microglial Activation. *J. Neurosci.* 29, 11982–11992.
- Río-Hortega, P. (1919a). El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. *Boletín Soc. Española Biol.* 8, 67–82.
- Río-Hortega, P. (1919b). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos granuloadiposos). *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 91–103.
- Río-Hortega, P. (1919c). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. III. Naturaleza probable de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 108–115.
- Río-Hortega, P. (1919d). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 154–166.
- Río-Hortega, P. (1922). ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Boletín Soc. Española Biol.* X, 1–4.
- Rivest, S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 429–439.
- Rodríguez, E. M., Guerra, M. M., Vío, K., González, C., Orloff, A., Bátiz, L. F., et al. (2012). A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol. Res.* 45, 231–241.
- Rosen SD (1993). Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immunol* 5, 237–47.
- Rosenberger, K., Derkow, K., Dembny, P., Krüger, C., Schott, E., and Lehnardt, S. (2014). The impact of single and pairwise Toll-like receptor activation on neuroinflammation and neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* 11, 166.
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 26–35.
- Sairanen, T. R., Lindsberg, P. J., Brenner, M., Carpén, O., and Sirén, A. (2001). Differential cellular expression of tumor necrosis factor- α and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J. Neurol. Sci.* 186, 87–99.
- Santos-Filho, C., de Lima, C. M., Fôro, C. A. R., de Oliveira, M. A., Magalhães, N. G. M., Guerreiro-Diniz, C., et al. (2014). Visuospatial learning and memory in the *Cebus apella* and microglial morphology in the molecular layer of the dentate gyrus and CA1 lacunosum molecular layer. *J. Chem. Neuroanat.* 61, 176–188.
- Sasaki, A., Yamaguchi, H., Ogawa, A., Sugihara, S., and Nakazato, Y. (1997). Microglial activation in early stages of amyloid β protein deposition. *Acta Neuropathol.* 94, 316–322.
- Sasmono, R. T., Oceandy, D., Pollard, J. W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B. J., et al. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 101, 1155–1163.
- Saura, J., Tusell, J. M., and Serratos, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44, 183–189.
- Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 507–514.



- Schweitzer, L., and Renahan, W. (1997). The use of cluster analysis for cell typing. *Brain Res. Protoc.*, 100–108.
- Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2014). Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 94, 461–518.
- Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science (80-.)*. 336, 86–90.
- Semple, B. D., Kossmann, T., and Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 459–473.
- Sheets, K. G., Jun, B., Zhou, Y., Zhu, M., Petasis, N. A., Gordon, W. C., et al. (2013). Microglial ramification and redistribution concomitant with the attenuation of choroidal neovascularization by neuroprotectin D1. *Mol. Vis.* 19, 1747–59.
- Shi, S., Liang, D., Chen, Y., Xie, Y., Wang, Y., Wang, L., et al. (2016). Gx-50 reduces β -amyloid-induced TNF- α , IL-1 β , NO, and PGE2 expression and inhibits NF- κ B signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Immunol.* 46, 665–676.
- Shin, T. (2013). The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochem.*
- Shin, T., Carrillo-Salinas, F. J., Felú Martínez, A., Mecha, M., and Guaza, C. (2013). Immunohistochemical localization of galectin-3 in the brain with Theiler's murine encephalomyelitis virus (DA strain) infection. *Korean J. Veterinary Res.* 53, 159–162.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* 87, 387–406.1.
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., and Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64, 1801–1840.
- Singh, S., Metz, I., Amor, S., Van Der Valk, P., Stadelmann, C., and Brück, W. (2013). Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol.* 125, 595–608.
- Sivadon-Tardy, V., Orlikowski, D., Porcher, R., Sharshar, T., Durand, M., Enouf, V., et al. (2009). Guillain-Barré syndrome and influenza virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 48, 48–56.
- Sivakumar, V., Foulds, W. S., Luu, C. D., Ling, E. A., and Kaur, C. (2011). Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J. Pathol.* 224, 245–260.
- Sival, D. A., Guerra, M., Den Dunnen, W. F. A., Bátiz, L. F., Alvial, G., Castañeyra-Perdomo, A., et al. (2011). Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol.* 21, 163–179.
- Smith, A. (2003). LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J. Cell Sci.* 116, 3123–3133.
- Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., and Banik, N. L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 87, 10–20.
- Smith, T. G., Lange, G. D., and Marks, W. B. (1996). Fractal methods and results in cellular morphology - Dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods* 69, 123–136.



- Smutova, V., Albohy, A., Pan, X., Korchagina, E., Miyagi, T., Bovin, N., et al. (2014). Structural basis for substrate specificity of mammalian neuraminidases. *PLoS One* 9.
- Soltys, Z., Orzylowska-Sliwinska, O., Zaremba, M., Orłowski, D., Piechota, M., Fiedorowicz, A., et al. (2005). Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. *J. Neurosci. Methods* 146, 50–60.
- Soltys, Z., Ziaja, M., Pawlinski, R., Setkowicz, Z., and Janeczko, K. (2001). Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* 63, 90–97.
- Song, M., Jin, J., Lim, J.-E., Kou, J., Pattanayak, A., Rehman, J. A., et al. (2011). TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A β deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 8, 92.
- Sonmez, F. M., Ödemis, E., Ahmetoglu, A., and Ayvaz, A. (2004). Brainstem encephalitis and acute disseminated encephalomyelitis following mumps. *Pediatr. Neurol.* 30, 132–134.
- Soong, G., Muir, A., Gomez, M. I., Waks, J., Reddy, B., Planet, P., et al. (2006). Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *J. Clin. Invest.* 116, 2297–2305.
- Stamouli, E. C., and Politis, A. M. (2016). Pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease. *Psychiatriki* 27, 264–275.
- Steininger, C., Popow-Kraupp, T., Laferl, H., Seiser, A., Gold, I., Djamshidian, S., et al. (2003). Acute encephalopathy associated with influenza C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 36, 567–74.
- Stence, N., Waite, M., and Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33, 256–266.
- Strazielle, N., Creidy, R., Malcus, C., Boucraut, J., and Gherzi-Egea, J. F. (2016). T-Lymphocytes traffic into the brain across the blood-csf barrier: Evidence using a reconstituted choroid plexus epithelium. *PLoS One* 11.
- Streit, W. J. (2000). Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. *Toxicol. Pathol.* 28, 28–30.
- Streit, W. J., Walter, S. A., and Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 563–581.
- Stridh, L., Smith, P. L., Naylor, A. S., Wang, X., and Mallard, C. (2011). Regulation of Toll-like receptor 1 and -2 in neonatal mice brains after hypoxia-ischemia. *J. Neuroinflammation* 8, 45.
- Sugama, S., Takenouchi, T., Cho, B. P., Joh, T. H., Hashimoto, M., and Kitani, H. (2009). Possible roles of microglial cells for neurotoxicity in clinical neurodegenerative diseases and experimental animal models. *Inflamm. Allergy- Drugs Targets* 8, 277–284.
- Suh, H. S., Zhao, M. L., Choi, N., Belbin, T. J., Brosnan, C. F., and Lee, S. C. (2009). TLR3 and TLR4 are innate antiviral immune receptors in human microglia: Role of IRF3 in modulating antiviral and inflammatory response in the CNS. *Virology* 392, 246–259.
- Surana, P., Tang, S., McDougall, M., Tong, C. Y. W., Menson, E., and Lim, M. (2011). Neurological complications of pandemic influenza A H1N1 2009 infection: European case series and review. *Eur. J. Pediatr.* 170, 1007–1015.
- Suzuki, O., and Abe, M. (2008). Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma. *Oncol. Rep.* 19, 743–748.
- Takano, T., Mekata, Y., Yamano, T., and Shimada, M. (1993). Early ependymal changes in experimental hydrocephalus after mumps virus inoculation in hamsters. *Acta Neuropathol.* 85, 521–525.

- Takeshita, Y., and Ransohoff, R. M. (2012). Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: Chemokine regulation and in vitro models. *Immunol. Rev.* 248, 228–239.
- Talu, S. (2011). Fractal analysis of normal retinal vascular network. *Oftalmologia* 55, 11–16.
- Tambuyzer, B. R., Ponsaerts, P., and Nouwen, E. J. (2008). Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J. Leukoc. Biol.* 85, 352–370.
- Taştan, Y., Çam, H., Yılmaz, I., Demirel, A., Uysal, S., Çokuğraş, C. H., et al. (2007). Reversible acute tetraventricular hydrocephalus complicating possible mumps meningoencephalitis. *Pediatr. Int.* 49, 100–102.
- Taylor, N., and von Itzstein, M. (1994). Molecular Modeling Studies on Ligand-Binding to Sialidase from Influenza-Virus and the Mechanism of Catalysis. *J. Med. Chem.* 37, 616–624.
- Taylor, R. A., and Sansing, L. H. (2013). Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin. Dev. Immunol.* 2013.
- Taylor, S. E., Morganti-Kossmann, C., Lifshitz, J., and Ziebell, J. M. (2014). Rod microglia: A morphological definition. *PLoS One* 9.
- Thompson, K. K., and Tsirka, S. E. (2017). The diverse roles of microglia in the neurodegenerative aspects of central nervous system (CNS) autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Thorndike, R. L. (1953). Who belongs in the family? *Psychometrika* 18, 267–276.
- Tian, L., Ma, L., Kaarela, T., and Li, Z. (2012). Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J. Neuroinflammation* 9, 594.
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., et al. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J. Neuroinflammation* 11, 12.
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., and Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* 9.
- Tsai, J. P., and Baker, A. J. (2013). Influenza-associated neurological complications. *Neurocrit. Care* 18, 118–130.
- Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., et al. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117, 902–909.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 2563–2582.
- van Helden, M. J. G., Zaiss, D. M. W., and Sijts, A. J. A. M. (2012). CCR2 Defines a Distinct Population of NK Cells and Mediates Their Migration during Influenza Virus Infection in Mice. *PLoS One* 7, 1–6.
- van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J. L., Peferoen, L., et al. (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J. Neuroinflammation* 9, 156.
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., and Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* 57, 67–81.
- Varghese, J. N., McKimm-Breschkin, J. L., Caldwell, J. B., Kortt, A. A., and Colman, P. M. (1992). The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 14, 327–332.
- Varki, A., and Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 16–36.

- Varki, A., and Schauer, R. (2009). "Sialic Acids," in *Essentials of Glycobiology*, eds. A. Varki, R. Cummings, and J. Esko (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Vellozzi, C., Iqbal, S., and Broder, K. (2014). Guillain-barré syndrome, influenza, and influenza vaccination: The epidemiologic evidence. *Clin. Infect. Dis.* 58,
- von Itzstein, M., Wu, W., Kok, G., Pegg, M., Dyason, J., Jin, B., et al. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*. Jun 3363, 418–23.
- Voudris, K. A., Skardoutsou, A., Hasiotou, M., Theodoropoulos, B., and Vagiakou, E. A. (2002). Long-term findings on brain magnetic resonance imaging in acute encephalopathy with bilateral striatal necrosis associated with measles. *J. Child Neurol.* 17, 776–777.
- Wagner, R., Matrosovich, M., and Klenk, H. D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 12, 159–166.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J. Neurosci.* 29, 3974–3980.
- Walker, F. R., Beynon, S. B., Jones, K. A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., et al. (2014). Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain. Behav. Immun.* 37, 1–14.
- Wang, S., Le, T. Q., Kurihara, N., Chida, J., Cisse, Y., Yano, M., et al. (2010). Influenza virus–cytokine–protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 202, 991–1001.
- Wang, W.-Y., Tan, M., Yu, J.-T., and Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 3, 1–15.
- Wang, Y.-C., Zhou, Y., Fang, H., Lin, S., Wang, P.-F., Xiong, R.-P., et al. (2014). Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage. *Ann. Neurol.* 75, 876–889.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–244.
- Wierzba-Bobrowicz, T., Gwiazda, E., Kosno-Kruszewska, E., Lewandowska, E., Lechowicz, W., Bertrand, E., et al. (2002). Morphological analysis of active microglia — rod and ramified microglia in human brains affected by some neurological diseases (SSPE, Alzheimer's disease and Wilson's disease). *Folia Neuropathol* 40, 125–131. l.
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., and Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Wong, P., and Pamer, E. G. (2003). CD8 T C cell responses to infectious pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 29–70.
- Wu, D., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., V, J.-L., H, I., et al. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13100, 6145–50.
- Xie, Z., Smith, C. J., and Van Eldik, L. J. (2004). Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45, 170–179.
- Yamada, J., and Jinno, S. (2013). Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J. Comp. Neurol.* 521, 1184–1201.
- Yang, R. Y., and Liu, F. T. (2003). Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 267–276.
- Yao, L., Kan, E. M., Lu, J., Hao, A., Dheen, S. T., Kaur, C., et al. (2013). Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J. Neuroinflammation* 10, 785.



- Yıldızdaş, D., Kendirli, T., Arslanköylü, A. E., Horoz, Ö. Ö., İncecik, F., İnce, E., et al. (2011). Neurological complications of pandemic influenza (H1N1) in children. *Eur. J. Pediatr.* 170, 779–788.
- Zanier, E. R., Fumagalli, S., Perego, C., Pischotta, F., and De Simoni, M.-G. (2015). Shape descriptors of the “never resting” microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive care Med. Exp.* 3, 39.
- Zhang, Z., Zhang, J., Huang, K., Li, K.-S., Yuen, K.-Y., Guan, Y., et al. (2009). Systemic infection of avian influenza A virus H5N1 subtype in humans. *Hum. Pathol.* 40, 735–739..
- Zhuo, Y., Chammas, R., and Bellis, S. L. (2008). Sialylation of B1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 22177–22185.
- Zindler, E., and Zipp, F. (2010). Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 24, 551–562.