



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## **Els macròfags perivasculars i la infiltració leucocitària en la isquèmia cerebral**

Jordi Pedragosa Ollé



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**





**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Institut  
D'Investigacions  
Biomèdiques  
August Pi i Sunyer

# ELS MACRÒFAGS PERIVASCULARS I LA INFILTRACIÓ LEUCOCITÀRIA EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

Programa de Doctorat en Biomedicina

Departament de Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Tesi doctoral presentada per

**JORDI PEDRAGOSA OLLÉ**

Barcelona, Setembre de 2019





Aquest treball s'ha realitzat al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB) del CSIC-IDIBAPS, dins dels projectes nacionals del Ministeri d'Economia i Competitivitat (MINECO) SAF2011-30492, SAF2014-56279-R i SAF2017-87459-R i amb l'ajuda de l'AGAUR de la Generalitat de Catalunya 2017-SGR-645.

S'ha rebut el suport econòmic de la beca FI-DGR per a la contractació de personal investigador novell FI-DGR de l'any 2015 al 2018.

L'interessat:

**Jordi Pedragosa Ollé**

Vist i plau del tutor:

**Dr. Àngel Chamorro Sánchez**

Professor Titulat de la Facultat de medicina de la Universitat de Barcelona.

Director de la Unitat Funcional de Patologia Vasculat Cerebral de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Director del grup d'Isquèmia Cerebral: estudis clínics i experimentals de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Vist i plau de la directora:

**Dra. Anna Maria Planas Obradors**

Professora d'Investigació del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) i coordinadora de l'Àrea de Neurociències de l'IDIBAPS

Vist i plau del codirector:

**Dr. Francesc Miró Mur**

Investigadors del programa PERIS de la Conselleria de Salut de la Generalitat de Catalunya en l'Hospital Clínic de Barcelona



*“A la persona que va inventar el llit  
li haurien de fer un monument”*

*iaia Neus*



## **AGRAÏMENTS**



## AGRAÏMENTS

Des de ben petit ja feia experiments amb els insectes que trobava pel carrer. Fins i tot els intentava observar al microscopi que tenia a mitges amb el meu germà. Tot i que després d'allò han passat ja uns anys, crec que moltes persones del meu voltant no haurien arribat a imaginar mai que fos capaç d'escriure una tesi doctoral. Afortunadament sembla ser que tothom es pot equivocar un mica.

A continuació podreu llegir el treball que he realitzat amb l'ajuda de molta gent. No ha estat una feina fàcil. Afortunadament el fet d'estar envoltat de tanta bona gent disposada a col·laborar des de l'inici fins al final m'han permès créixer professionalment i han fet més fàcil aquesta etapa.

Primer de tot voldria agrair a la meva directora de tesi, l'Anna, per donar-me la possibilitat d'investigar sobre aquesta malaltia i la confiança que ha tingut en mi des del primer moment i sobretot les facilitats que m'ha donat per desenvolupar aquest treball. He pogut aprendre molt dels seus coneixements científics i de la seva passió per la investigació.

També voldria agrair al meu tutor, l'Àngel, per la possibilitat de formar part del grup i aprendre de la seva perseverança per trobar una cura per l'ictus.

En Francesc, com a codirector, ha estat també una persona molt important alhora de plantejar i posar a punt molts experiments. Sense els seus coneixements, ganes de treballar i d'ensenyar així com la seva predisposició per ajudar-me, estic ben segur que tirar endavant aquesta tesi hagués sigut una tasca molt més feixuga.

Durant tots aquests anys en el laboratori (610) he coincidit amb molta gent dels quals he après moltíssim. En primer lloc vull agrair a l'Ester, Isabel, Angelica i Vanesa tota la paciència que van tenir amb mi des del primer moment quan vaig arribar al laboratori. D'elles vaig aprendre moltes de les tècniques que he utilitzat en la present tesi i també a tractar i a tenir molta paciència amb els animals.

Treballar amb animals no és una tasca fàcil. Sobretot a l'hora de programar experiments i tenir els animals disponibles. Gràcies a la Paqui i la seva paciència en posar creuaments i tenir-ho tot ben organitzat en excels llarguíssims no hauria estat possible tirar-ho endavant. També a la Clara i a la Marina que en els darrers moments hem estat treballant colze a colze fent conducta amb els animals. Només voldria ressaltar Marina que de tu també he après a no rendir-me i a continuar endavant amb un somriure a la cara per molt complicats que siguin els problemes. Per mi ets i seràs un referent esperit de superació.

Vull agrair també al Mattia (*y a tus paquetes de Amazon*), Amaia (*y tus onzas de chocolate*), Alba (i els teus cotilleos), Leo (pels teus consells, amabilitat i experiència) i Sara per la bona predisposició, flexibilitat i ganes d'ajudar-me en els moments que us he necessitat. També al Roger, l'estudiant de màster més motivat que he conegut mai! Ha estat un plaer compartir el temps durant el teu treball de màster i el temps que et vas quedar de més al laboratori. Espero que abans que acabis la tesi a Göttingen pugui venir a fer-te una visita!

Afortunadament no tot es va quedar en fer feina al laboratori sinó que amb l'Ester i el Roger també vam fer pinya per anar al gimnàs i després recuperar les calories cremades menjant braves, fent cerveses a l'Ascot i gelats a la Toscana amb tots els que han passat pel grup i els

que han arribat més recentment; Nuriña, Alba, Mariona Baliu, Amaia, Mattia, Clara, Marina, Nuria Gaja, Wenson, Meike, Ewa, Coral, Andrea, Mariona, Andrés, Laura, Maria A., Maria D., Miguel i Judit.

Gràcies també al Carles, Valérie, Joan Serratos i Roser Cortés pels vostres consells i també per les hores que heu dedicat del vostre temps per explicar-me diferents tècniques i el funcionament de diferents aparells. També als companys de la “Resso”, la Lupe i el Xavi; amb qui he compartit hores i hores al soterrani de l’hospital i m’han ajudat a passar el temps un mica millor compartint els bons i no tant bons moments del dia a dia.

Voldria agrair també al grup de neuròlegs de l’Hospital Clínic i les reunions que hem tingut per poder millorar els nostres estudis. També a l’Ellen Gelpi del BTN per haver compartit els seus coneixements de diferents patologies del SNC d’una manera molt didàctica i agraïda.

Ha estat molt important començar el dia a la feina amb un “*Buenos días Jordi*” per part dels companys de recepció, manteniment i neteja; Pedro, Antonio, Isaac i Tere. Així com també dels companys d’informàtica Edu i Rafa.

En especial vull agrair a tota la meva família. Concretament als meus pares per haver-me donat ales per poder arribar fins a on he arribat. També al meu germà bessó, l’Oriol que m’ha estat acompanyant des de l’inici de tot. A l’avi Jaume i la iaia Neus per les grans lliçons de la vida i a tenir paciència. Sobretot també a la iaia Pilar que s’ha encarregat de fer-me companyia gairebé cada dia durant aquesta etapa i de preparar-me els magnífics *tuppers* per dinar que feien enveja als meus companys. Voldria dedicar també tot aquest treball a la a l’avi Josep i la tieta Serafina perquè desafortunadament van patir aquesta malaltia.

Elisabet et vull agrair amb lletres majúscules la paciència que has tingut tot aquest temps i en concret aquest últim estiu. Crec que no podia haver trobat una millor companya de viatge que fos tan comprensible. També vull agrair a la teva família el tracte que han tingut amb mi.

Finalment, fent un balanç de la trajectòria durant el doctorat i tenint en compte que el metro em va destrossar l’ordinador portàtil i que em van robar la meva estimada moto. Els dinars compartits a la cantina, les cases rurals, les calçotades i totes les altres activitats que hem fet conjuntament amb els membres del IIBB han fet que hagi valgut la pena aquesta etapa de la vida.

Gràcies!



# ÍNDEX



<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>7</b>
<b>1. L'ICTUS</b> .....	<b>9</b>
1.1. Factors de risc, epidemiologia i impacte socioeconòmic.....	9
1.2. L'ictus isquèmic .....	10
1.3. Tractament de l'ictus isquèmic .....	10
1.4. Anatomia vascular cerebral en humans i rosegadors .....	12
1.5. Estudis experimentals amb animals.....	14
1.5.1. Model d'oclusió de l'artèria cerebral mitja .....	15
1.5.2. Valoració de la lesió cerebral per ressonància magnètica .....	16
1.5.3. Valoració dels dèficits neurològics .....	17
<b>2. FISIOPATOLOGIA DE L'ICTUS</b> .....	<b>19</b>
2.1. La cascada isquèmica .....	19
<b>3. RESPOSTA INFLAMATÒRIA DESENCADENADA PER L'ICTUS ISQUÈMIC</b> .....	<b>21</b>
3.1. Senyals d'inflamació en la fase aguda.....	21
3.2. Afectació de la vasculatura cerebral .....	22
3.2.1. La cèl·lula endotelial i la barrera hematoencefàlica .....	22
3.2.2. Activació endotelial: molècules d'adhesió .....	22
3.2.3. Mecanismes implicats en el trencament de la BHE .....	24
3.3. La immunitat innata .....	27
3.4. Resposta de les cèl·lules mieloides residents al cervell .....	29
3.4.1. La micròglia .....	29
3.4.2. Els macròfags associats al cervell.....	33
3.5. La infiltració leucocitària .....	35
3.5.1. Els neutròfils.....	35
3.5.2. Els monòcits .....	37
3.5.3. Vies d'infiltració de leucòcits al cervell .....	41
<b>4. REPARACIÓ TISSULAR</b> .....	<b>44</b>
4.1. La polarització fenotípica dels macròfags .....	44
4.1.1. La polarització fenotípica en la isquèmia cerebral.....	46
4.2. Paper del fenotip M2 en la reparació del SNC .....	47
4.2.1. Paper dels macròfags en l'angiogènesi .....	48
<b>HIPÒTESI i OBJECTIUS</b> .....	<b>49</b>

<b>MÈTODES</b> .....	<b>53</b>
<b>1. MODELS ANIMALS D'ISQUÈMIA CEREBRAL</b> .....	<b>55</b>
1.1 Models d'isquèmia cerebral en ratolí .....	55
1.1.1 Oclusió permanent de l'artèria cerebral mitja en la seva porció distal .....	55
1.1.2 Oclusió intraluminal permanent de l'artèria cerebral mitja proximal .....	55
1.2 Model d'isquèmia cerebral en rata .....	56
1.2.1 Oclusió transitòria intraluminal de l'artèria cerebral mitja proximal .....	56
<b>2. AVALUACIÓ DEL VOLUM D'INFART PER IMATGE DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA</b> .....	<b>56</b>
<b>3. VALORACIÓ NEUROLÒGICA</b> .....	<b>57</b>
3.1 Valoració neurològica en rata .....	57
3.2 Valoració neurològica en ratolí .....	58
<b>4. VALORACIÓ DE LA INTEGRITAT DE LA BHE MITJANÇANT L'EXTRAVASACIÓ DE BLAU D'EVANS EN RATA</b> .....	<b>59</b>
<b>5. ADMINISTRACIÓ DE LIPOSOMES DE CLODRONAT EN RATA</b> .....	<b>59</b>
<b>6. CITOMETRIA DE FLUX</b> .....	<b>60</b>
6.1 Aïllament de cèl·lules infiltrants al cervell isquèmic .....	60
6.2 Aïllament i processament de cèl·lules de la sang.....	60
6.3 Aïllament de les cèl·lules del moll de l'os.....	60
6.4 Aïllament i processament de les cèl·lules de la melsa .....	61
<b>7. AÏLLAMENT I ADMINISTRACIÓ DE MONÒCITS DEL MOLL DE L'OS</b> .....	<b>61</b>
<b>8. ANÀLISIS DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA</b> .....	<b>61</b>
8.1 Extracció d'ARN de cèl·lules sortejades .....	61
8.2 Extracció d'ARN de teixit total en rata .....	61
8.3 Extracció d'ARN de teixit total en ratolí.....	62
8.4 Quantificació i avaluació de la qualitat de l'ARN .....	62
8.4.1 ARN de cèl·lules aïllades per <i>FACS-cell sorting</i> .....	62
8.4.2 ARN del teixit total .....	62
8.5 Microarray d'ARN.....	62
8.6 Conversió de l'ARN a ADNc .....	63
8.6.1 Preamplificació del ADNc de les cèl·lules sortejades .....	63
8.7 Assajos quantitius d'expressió gènica mitjançant PCR a temps real (RT-PCR) .....	63
<b>9. WESTERN BLOT</b> .....	<b>64</b>
<b>10. IMMUNOTINCIONS</b> .....	<b>65</b>
10.1 Immunofluorescència en talls de vibràtom .....	65

## ÍNDEX

10.2	Immunofluorescència en seccions de teixit congelat .....	65
10.2.1	Quantificació cel·lular.....	66
10.2.2	Quantificació dels vasos FITC <sup>+</sup> .....	66
10.3	Immunohistoquímica en seccions de parafina.....	67
10.3.1	Quantificació cel·lular.....	67
<b>RESULTATS</b>	.....	<b>69</b>
Resum dels articles.....		71
Primer article.....		75
Segon article.....		97
Tercer article: .....		119
<b>DISCUSSIÓ</b> .....		<b>171</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....		<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....		<b>187</b>





## **ABREVIATURES**





- AB** Artèria Basilar
- ACA** Artèria Cerebral Anterior
- ACC** Artèria Caròtida Comú
- ACI** Artèria Caròtida Interna
- ACM** Artèria Cerebral Mitja
- ACP** Artèria Cerebral Posterior
- AD** de l'anglès *Alzheimer's disease*
- ADC** Coeficient Aparent de Difusió
- ADN** Àcid Desoxiribonucleic
- ADNc** Àcid Desoxiribonucleic complementari
- AIT** Atac Isquèmic Transitori
- AMPA** Receptor Àcid  $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoazolepropionic
- ANGII** de l'anglès *Angiotensin II*
- AP-1** de l'anglès *Transcription Factor AP-1 (Activator Protein 1)*
- Apaf-1** de l'anglès *Apoptotic protease-activating factor-1*
- ARN** Àcid Ribonucleic
- ATP** Trifosfat d'Adenosina
- AV** Artèria Vertebral
- BAM** de l'anglès *Border-Associated Macrophage*
- BDNF** de l'anglès *Brain-Derived Growth Factor*
- BHE** Barrera Hematoencefàlica
- CAM** de l'anglès *Cell Adhesion Molecules*
- CCL2** de l'anglès *C-C Motif Chemokine Ligand 2*
- CCR2** de l'anglès *C-C Chemokine Receptor type 2*
- CD** de l'anglès *Cluster of Differentiation*
- CINC** de l'anglès *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*
- COX-2** Ciclooxygenasa 2
- CX3CR1**: Receptor de Fractalquina
- DAMP** de l'anglès *Damage-Associated Molecular Pattern*
- DWI** de l'anglès *Diffusion-weighted imaging*
- EAAT** de l'anglès *Excitatory Amino Acid Transporter*,
- EP2** de l'anglès *Prostaglandin E2 receptor*

## ABREVIATURES

**EPO** Eritropoetina

**ERK** de l'anglès *Extracellular signal-Regulated Kinase*

**FACS** de l'anglès *fluorescent activated cell sorting*

**FcγR** de l'anglès *Fc gamma Receptor*

**FGF** de l'anglès *Fibroblast Growth Factor*

**FSC** Flux Sanguini Cerebral

**G-CSF** de l'anglès *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

**GDNF** de l'anglès *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*

**GM-CSF** de l'anglès *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

**GO** categories d'Ontologia Genètica

**HB-EGF** de l'anglès *Heparin-Binding Epidermal Growth Factor*

**HC** Hemisfèri Contralateral

**HIF-1** de l'anglès *Hypoxia-Inducible Factor 1*

**HINI** Hemisfèri Ipsilateral no Infartat

**HMGB1** de l'anglès *High-Mobility Group Box Protein 1*

**HPA** de l'anglès *Hypothalamic-Pituitary Axis*

**HSP** de l'anglès *Heat Shock Protein*

**IC** de l'anglès *Immune Complexes*

**IGF** de l'anglès *Insulin Growth Factor*

**iGluR** de l'anglès *ionotropic Glutamate Receptor*

**IL** Interleucina

**INFγ** Interferó γ

**iNOS** Òxid Nítric Sintasa Induïble

**IRF** de l'anglès *Interferon Regulatory Factor*

**JMJD3** de l'anglès *Jumonji Domain-containing protein D3*

**JNK** de l'anglès *c-Jun N-terminal Kinase*

**LCR** Líquid Cefaloraquidi

**Lex** de l'anglès *Lewis X (trisaccharide)*

**LFA-1** de l'anglès *Leukocyte Function-Associated antigen-1*

**LOX** de l'anglès *Lipoxygenase*

**LPS** Lipopolisacàrid

**Mac-1** de l'anglès *Macrophage antigen-1*

**MAPK** de l'anglès *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MCP-1** de l'anglès *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

**MEC** Matriu Extracel·lular

**mGluR** de l'anglès *metabotropic Glutamate Receptor*

**MIP** de l'anglès *Macrophage Inflammatory Protein*

**MMP** Metal·loproteïnasa de Matriu

**mNSS** de l'anglès *modified Neurological Severity Score*

**MPC** Macròfags associats al Plexe Coroide

**MPO** Mieloperoxidasa

**MPV** Macròfags Perivasculars

**MPVM** Macròfags Perivasculars associats a les Meninges

**NADPH** Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Fosfat

**NET** de l'anglès *Neutrophil Extracellular Trap*

**NF-κB** de l'anglès *Nuclear Factor-κB*

**NGF** de l'anglès *Nerve Growth Factor*

**NK** de l'anglès *Natural Killer*

**NKT** de l'anglès *Natural Killer T cells.*

**NMDA** N-Metil-D-Aspartat

**NO** Òxid Nítric

**NOX** de l'anglès *NADPH oxidase*

**OMS** Organització Mundial de la Salut

**P2X7** de l'anglès *P2X purinoreceptor 7*

**PARP-1** de l'anglès *Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1*

**PBS** Tampó fosfat Salí

**PC** Plexes Coroides

**PCR** Reacció en Cadena de la Polimerasa

**PGE2** de l'anglès *Prostaglandin E2*

**PKC** de l'anglès *Protein Kinase C*

**PLC** de l'anglès *Phospholipase C*

**PPARγ** de l'anglès *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*

**PRR** de l'anglès *Pattern Recognition Receptor*

**PSGL-1** de l'anglès *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*

**PTGES** de l'anglès *Prostaglandin E2 Synthase*

**PVC** Patologia Vascular Cerebral

**PWI** de l'anglès *Perfusion Weighted Imaging*

**R** Receptor

**RANTES** de l'anglès *Regulated upon Activation: Normally T-Expressed*

**RI** Regió Infartada

## ABREVIATURES

**RM** Ressonància Magnètica

**ROS** de l'anglès *Reactive Oxygen Species*

**rtPA** Activadors del Plasminogen Tissular Recombinant

**SLe<sup>x</sup>** de l'anglès *Sialyl Lewis X (fucosylated tetrasaccharide)*

**SNC** Sistema Nerviós Central

**STAT** de l'anglès *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*

**TCA** Àcid Tricloracètic

**TGF** de l'anglès *Transforming Growth Factor*

**Th** de l'anglès *Lymphocyte T helper.*

**TLR** de l'anglès *Toll-Like Receptor*

**TNF** de l'anglès *Tumour Necrosis Factor*

**Treg** de l'anglès *Regulatory T Cells*

**TREM2** de l'anglès *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2.*

**UNV** Unitat Neurovascular

**UTP** Trifosfat d'Uridina

**VEGF** de l'anglès *Vascular Endothelial Growth Factor*

**VI** Volum d'Infart

**VIH** Virus de la Immunodeficiència Humana

**VLA** de l'anglès *Very Late Activation antigen*

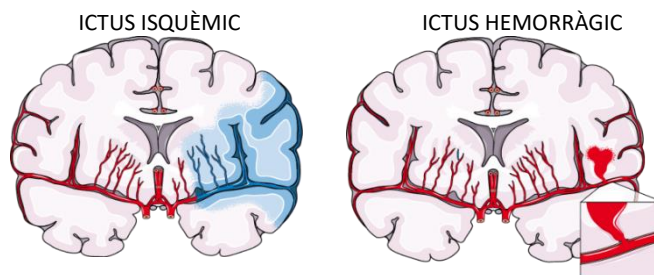
**$\alpha\beta$**  Beta Amiloide

# **INTRODUCCIÓ**



## 1. L'ICTUS

El terme ictus fa referència al conjunt de patologies cerebrovasculars caracteritzades per la manca sobtada d'irrigació sanguínia en una regió cerebral causada per un grup heterogeni d'etiologies. La isquèmia cerebral és el tipus d'ictus més comú a Catalunya corresponent amb el 85% dels casos (**Figura 1**). L'ictus hemorràgic es correspon al 15% restant i el seu pronòstic és més greu en comparació amb l'ictus isquèmic (<http://www.fundacioictus.com/wp-content/uploads/2018/05/Informe-completo.pdf>).



**Figura 1:** Representació d'una secció coronal de cervell humà on es representa l'ictus isquèmic i l'ictus hemorràgic. (Suport gràfic extret de Medical Art, SERVIER.2012).

Tot i presentar semblances en la clínica, els mecanismes fisiopatològics implicats en els dos tipus de patologies vasculars cerebrals (PVC) són diferents. El present treball de tesi doctoral es centra en l'estudi de l'ictus isquèmic.

### 1.1. Factors de risc, epidemiologia i impacte socioeconòmic

Existeixen múltiples factors de risc que poden contribuir a la predisposició de patir un ictus. Aquests, es classifiquen en funció de la seva naturalesa en si són factors modificables o no. Pel que fa als factors no modificables "aquells sobre els quals una intervenció no és possible" hi trobem la predisposició genètica, l'edat i el sexe. Per altra banda, la hipertensió, algunes cardiopaties formadores d'èmbols com la fibril·lació auricular, la hipercolesterolèmia, el tabaquisme, la dieta, l'obesitat, la diabetis i el sedentarisme entre d'altres (Johnson *et al.*, 2016) s'entenen com factors total o parcialment modificables. Sobre aquests últims factors incideixen les nombroses campanyes de salut pública i prevenció relacionades amb l'ictus. Actualment, s'entén que la prevenció és el millor tractament per les PVC ja que quan es pateix un ictus la viabilitat del teixit nerviós es veu greument compromesa.

En els darrers anys la taxa de mortalitat de l'ictus ha disminuït a Europa. Aquest fet és degut a la influència de les campanyes de salut pública sobre l'estil de vida de la població, les campanyes d'informació de la simptomatologia de l'ictus i la importància en la ràpida actuació així com a la optimització dels protocols d'actuació per part de les unitats d'ictus hospitalàries entre d'altres. Malgrat tot, la PVC continua sent la segona causa de mort i la major causa de discapacitat en adults de tot el món segons *Global Burden of Disease* (<https://www.thelancet.com/lancet/visualisations/gbd-compare>) i la Organització Mundial de la Salut.



## INTRODUCCIÓ

S'ha pogut registrar també que l'ictus és la segona causa de mort en la població europea essent la mortalitat més elevada en dones que en homes (Townsend *et al.*, 2015). Cal tenir en compte que segons estimacions demogràfiques l'any 2025 un 30.7% de la població europea superarà els 60 anys d'edat. L'elevada associació del risc de patir un ictus amb l'edat pronostiquen que a la unió europea els episodis d'ictus augmentaran un 36% entre els anys 2000 i 2025 (Truelsen *et al.*, 2006). En base a les previsions de futur, si augmenta la incidència dels casos d'ictus i la taxa de supervivència, es produirà un increment del nombre de persones amb una gran varietat de seqüeles de llarga durada o cròniques com per exemple problemes de mobilitat, en la visió, la parla, trastorns de personalitat i de depressió entre d'altres que necessitaran assistència i rehabilitació constant (Wolfe *et al.*, 2011). Aquest fet es tradueix en un augment en l'impacte socioeconòmic d'aquesta malaltia.

### 1.2. L'ictus isquèmic

L'ictus isquèmic es produeix quan disminueix sobtadament el flux sanguini cerebral (FSC) degut a l'oclusió d'una artèria cerebral. Concretament, s'estima que quan es produeix una disminució del 25% en el FSC, la probabilitat de patir un ictus és superior al 95% (Mergenthaler, Dirnagl and Meisel, 2004). L'ictus isquèmic es pot classificar segons l'etiologia d'aquesta oclusió (Sommer, 2017; Kamel *et al.*, 2019):

- **Origen aterotrombòtic:** L'oclusió del vas es produeix degut a la formació d'una placa d'ateroma que redueix la llum del vas progressivament o bé per la desestabilització d'una placa d'ateroma que originarà un trombe i acabarà produint un embolisme.
- **Origen cardioembòlic:** En pacients amb cardiopaties es poden originar èmbols a dins del cor que en sortir a la circulació, poden produir l'oclusió d'una artèria cerebral.
- **Origen indeterminat:** En un terç dels casos se'n desconeix l'origen (ictus criptogènic). En aquest grup s'hi engloben els casos en els que coexisteixen múltiples etiologies o bé en què l'etiologia no és del tot clara degut a una avaluació incompleta.

La gravetat d'un ictus pot variar segons el territori cerebral afectat i la durada de l'oclusió. Per aquest motiu és molt important restablir la circulació del territori afectat amb tractaments de reperfusió. També es poden produir atacs isquèmics transitoris (AIT) on l'oclusió arterial va seguida de reperfusió ràpida i espontània del teixit cerebral que en principi no deixa seqüeles.

### 1.3. Tractament de l'ictus isquèmic

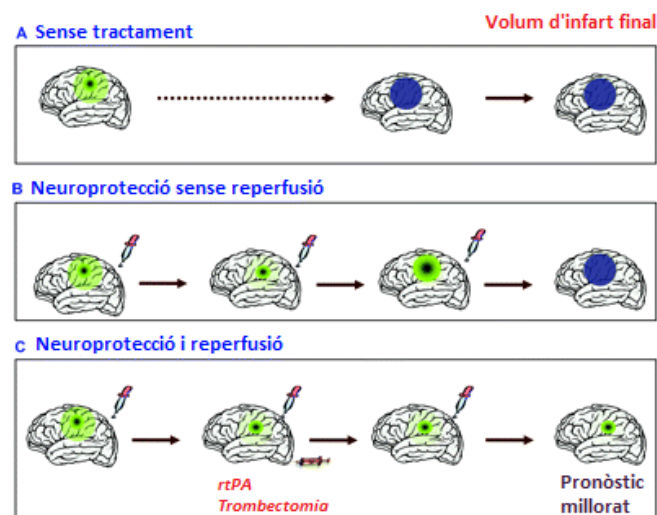
La frase en anglès *time is brain* il·lustra la vulnerabilitat del teixit nerviós quan es produeix un ictus. S'estima que per cada minut transcorregut en un ictus isquèmic moren 2 milions de neurones (Fassbender *et al.*, 2017). Per aquest motiu, l'objectiu fonamental del tractament de l'ictus isquèmic és restablir el flux sanguini per tal de reduir la progressió del dany neuronal.

Actualment l'únic tractament farmacològic aprovat per a la recanalització d'un vas obstruït per un trombe és l'administració intravenosa de l'activador del plasminogen tissular recombinant (rtPA). Cal destacar que la finestra terapèutica d'aquest tractament és molt reduïda i només se n'indica l'administració durant les primeres 4,5 hores des de l'inici de la simptomatologia clínica. Hi ha un seguit de contraindicacions que impedeixen l'administració del fàrmac a alguns pacients ja que existeixen efectes adversos relacionats amb la transformació

hemorràgica de l'infart cerebral (Urta and Chamorro, 2013). D'aquestes contraindicacions es destaquen una elevada pressió sanguínia, símptomes que suggereixin una hemorràgia subaracnoidal, cirurgies recents, hemorràgia interna, recompte plaquetari inferior a  $100.000/\text{mm}^3$  entre d'altres (Peisker *et al.*, 2017). Tenint en compte l'estreta finestra terapèutica i la llista de contraindicacions, globalment s'estima que només un 5% dels pacients que arriben als hospitals poden rebre aquest tractament (Fonarow *et al.*, 2011). No obstant, en les Unitats d'Ictus el número de pacients que reben tractaments de reperfusió augmenta de forma espectacular.

En els últims anys diversos assajos clínics han demostrat l'eficàcia de la intervenció endovascular per millorar la recanalització vascular. Els dispositius de trombectomia mecànica permeten extreure directament el trombe de l'artèria cerebral oclusa. La trombectomia mecànica allarga la finestra terapèutica fins a les 24 hores des del inici de la simptomatologia clínica (Thomalla *et al.*, 2018) i permet tractar pacients amb contraindicacions pel tractament amb rtPA. A més a més, s'ha reportat l'obtenció d'uns majors índexs de recanalització vascular que arriben al 75% i la recuperació funcional dels pacients és més favorable (Chamorro *et al.*, 2016; Peisker *et al.*, 2017). Malgrat tot, hi ha pacients que no s'aconsegueix la recanalització completa del vas i d'altres que desenvolupen transformacions hemorràgiques.

L'actual recerca en el camp se centra en l'establiment de noves estratègies terapèutiques que millorin el pronòstic dels pacients. Concretament, el nostre laboratori conjuntament amb la Unitat Funcional de Patologia Vascular Cerebral de l'Hospital Clínic han realitzat diferents estudis preclínics i participat en l'assaig clínic URICO-ICTUS utilitzant un agent antioxidant natural molt potent, l'àcid úric. Aquest compost, va mostrar una protecció en models animals d'isquèmia i reperfusió i una millora funcional en animals i pacients amb hiperglucèmia (**Figura 2**) (Romanos *et al.*, 2007; Chamorro *et al.*, 2014; Amaro *et al.*, 2015; Justicia *et al.*, 2016).



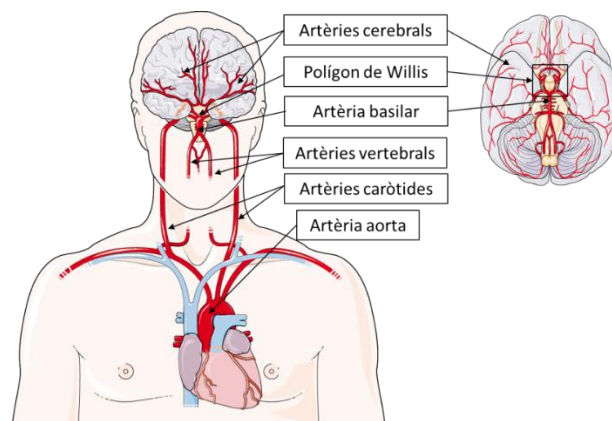
**Figura 2.** Situació hipotètica de la progressió del dany després de la isquèmia. (A) Si no s'intervé, el dany progressa ràpidament i esdevé permanent (color blau). (B) En absència de reperfusió els fàrmacs neuroprotectors fins ara no han impedit que el dany isquèmic progressi en els pacients, tot i mostrar efectes beneficiosos en models animals. (C) Potencialment, l'administració de fàrmacs neuroprotectors juntament amb la recanalització del vas oclus podria permetre que la regió perifèrica (verd) no progressés i esdevingués nucli isquèmic (blau). Suport gràfic adaptat de (Chavez *et al.*, 2009).

Llegenda; rtPA: activador del plasminogen tissular recombinant

## INTRODUCCIÓ

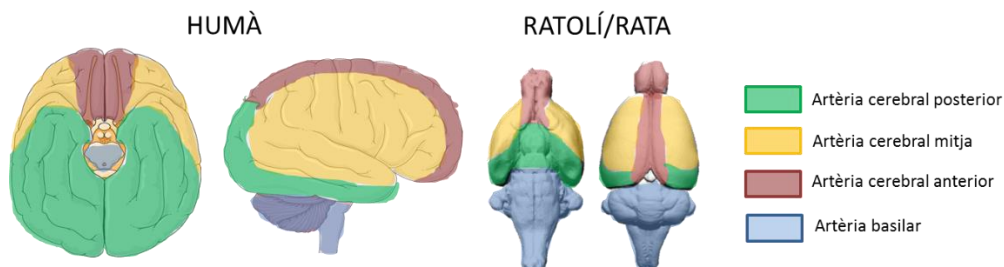
### 1.4. Anatomia vascular cerebral en humans i rosegadors

El sistema nerviós central (SNC) està irrigat per quatre grans artèries que s'originen a l'artèria aorta. Per la part anterior i posterior del coll transcorren les artèries caròtides comuns (ACCs) i vertebrals (AVs) respectivament. Per una banda, les artèries caròtides internes (ACI) penetren el crani des de la bases per posicions més rostre laterals i permeten la irrigació de la part més anterior de l'encèfal. Per altra banda, les AVs accedeixen a la cavitat craniana des d'una posició més posterior i quan s'uneixen formen l'artèria basilar (AB) que irrigarà el cerebel i el tronc de l'encèfal (**Figura 3**). L'AB es bifurca per donar lloc a les artèries cerebrals posteriors (ACPs) que es connecten a través d'artèries comunicants amb les ACIs originant una estructura que rep el nom de polígon de Willis.



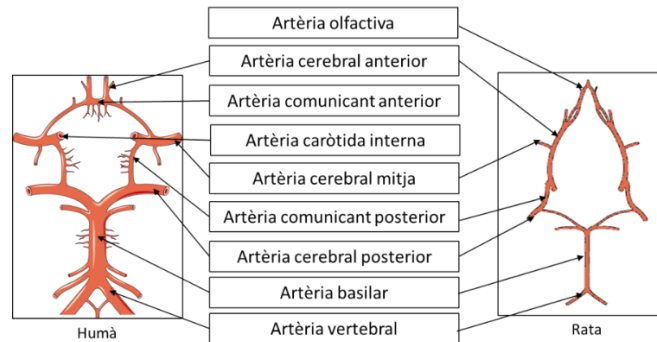
**Figura 3.** Representació de les artèries que irriguen el cervell humà (Suport gràfic adaptat de Medical Art, SERVIER.2012).

En el polígon de Willis es comuniquen les artèries cerebrals anteriors (ACAs), les artèries cerebrals mitges (ACMs) i les ACPs. Totes elles s'encarreguen d'irrigar les diferents estructures cerebrals. El polígon de Willis és una estructura anatómica de vital importància, doncs si una de les seves artèries tributàries principals, com l'ACC, s'obstrueix progressivament a causa de l'arteriosclerosi, l'estructura permet compensar la circulació cerebral gràcies a l'expansió dels vasos del polígon de Willis. L'organització anatómica de la circulació cerebral en humans i rosegadors (ratolí i rata) és força similar (**Figura 4**). No obstant això, existeixen algunes diferències en l'arquitectura del polígon de Willis (Lee, 1995).



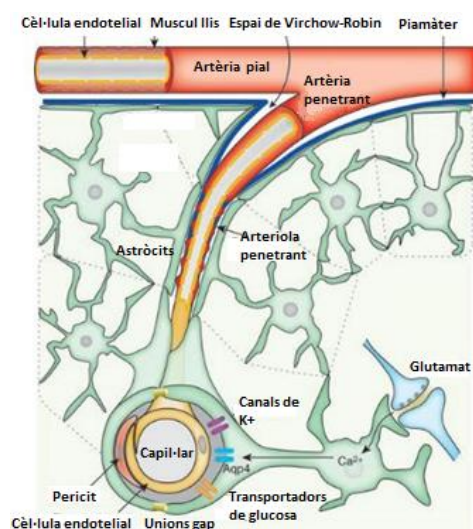
**Figura 4.** Esquema representatiu de les àrees d'irrigació de les principals artèries cerebrals en humans i rosegadors. Suport gràfic adaptat de (Felten, O'Banion and Maida, 2016).

En humans, les ACIs originen les ACMs. En rosegadors, en canvi, les ACIs s'integren en el polígon de Willis i contribueixen altament al subministrament sanguini a les artèries olfactivas. Existeixen també variacions en les artèries comunicants anteriors i posteriors que es poden apreciar en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Esquema representatiu de l'organització del polígon de Willis en humà i rata. Suport gràfic adaptat (Lee, 1995).

Cada artèria principal es divideix progressivament en artèries més petites que recorren la superfície cerebral per l'espai subaracnoid i subpial. Aquestes artèries estan submergides en líquid cefaloraquidi (LCR) produït pels plexes coroides. Les artèries pials es ramifiquen i penetren al parènquima (arterioles penetrants). Aquestes es continuen ramificant fins a esdevenir capil·lars que queden totalment envoltats pels perícits, peus dels astròcits, micròglia i neurones (**Figura 6**). El conjunt d'aquests components s'anomena unitat neurovascular (UNV). Finalment, la xarxa de capil·lars connecta amb les vènules post capil·lars, aquestes van augmentant de diàmetre fins a formar les venes centrals i les venes pials. El sistema venós cerebral s'encarrega de drenar la sang pobre amb oxigen i amb productes resultants del metabolisme cerebral fora del SNC (Zhang, Inman and Weller, 1990; Lee, 1995; Iadecola and Nedergaard, 2007).



**Figura 6.** La unitat neurovascular. Representació de les estructures anatòmiques que estan en contacte amb les artèries pials i les arterioles penetrants. Suport gràfic adaptat de (Iadecola and Nedergaard, 2007).

### 1.5. Estudis experimentals amb animals

En les últimes dècades hi ha hagut un increment substancial en el coneixement de la fisiopatologia de l'ictus gràcies a la utilització de models animals (Dirnagl, Iadecola and Moskowitz, 1999). S'ha descrit i establert molts models d'isquèmia cerebral en diferents espècies animals (gossos, conills, cabres, micos, entre d'altres) essent els rosegadors (ratolins i rates) les espècies més utilitzades. Aquest fet és degut principalment al conjunt d'avantatges econòmics i pràctics com per exemple en el transport, l'estabulació, la possibilitat de tenir soques homogènies genèticament per reduir la variabilitat experimental i la possibilitat d'obtenir animals modificats genèticament.

Tot i la similitud entre humans i rosegadors pel que fa a la distribució de les artèries cerebrals i el patró de bifurcacions de les artèries de la superfície cortical, 65 milions d'anys d'evolució han provocat grans diferències en l'estructura cerebral donat que els rosegadors són lissencefàlics (absència de circumvolucions cerebrals) i presenten una menor proporció de substància blanca, a més a més de l'existència de diferències importants en la resposta immunitària entre humans i rosegadors (Mestas and Hughes, 2004).

El fet d'utilitzar grups d'animals joves, sans, homogenis genèticament i majoritàriament mascles (Neuhaus *et al.*, 2014) ha originat un debat intens sobre les limitacions dels models animals degut a la manca de concordança entre els estudis amb animals i els assajos clínics (Fisher *et al.*, 2009). Així doncs, cal ser conscient que un model és només un model, i com a tal, presenta un ventall de limitacions que cal tenir en compte. Tenint present aquestes limitacions, existeixen diferents models que ens poden ajudar a entendre els diferents aspectes de la fisiopatologia de l'ictus (**Taula 1**).

**Taula 1.** Visió general de diferents models experimentals d'isquèmia cerebral. Adaptat de (Prinz and Endres, 2010).

Models animals d'isquèmia cerebral	Possible correlació amb humans	Observacions histològiques
<b>Isquèmia global</b>		
A. Permanent (aturada circulatòria)	Aturada circulatòria, ofegament, estrangulament	Edema cerebral i mort cel·lular
B. Transitòria (oclusió de 4 vasos, aturada circulatòria transitòria)	Aturada circulatòria amb ressucitació	Mort neuronal retardada i astrogliosis
<b>Isquèmia focal</b>		
A. Permanent (p.e. oclusió de l'ACM)	Ictus isquèmic sense recanalització	Mort neuronal per necrosis i inflamació
B. Transitòria (p.e. oclusió de l'ACM i reperfusió)	Ictus isquèmic amb recanalització espontània o amb teràpia trombolítica	Mort neuronal per necrosis i inflamació
C. Lleu (p.e. oclusió breu de l'ACM i reperfusió)	Atac isquèmic transitori	Mort neuronal retardada i astrogliosis

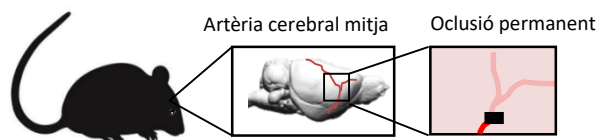
Llegenda; ACM: artèria cerebral mitja

### 1.5.1. Model d'oclusió de l'artèria cerebral mitja

L'ACM és el territori vascular afectat amb més freqüència en l'ictus isquèmic en humans (Howells *et al.*, 2010). En la majoria dels casos es produeix una recanalització del vas espontàniament o bé per intervenció mèdica. No obstant això, en alguns dels casos, l'artèria queda oclusa permanentment (Kassem-Moussa and Graffagnino, 2002).

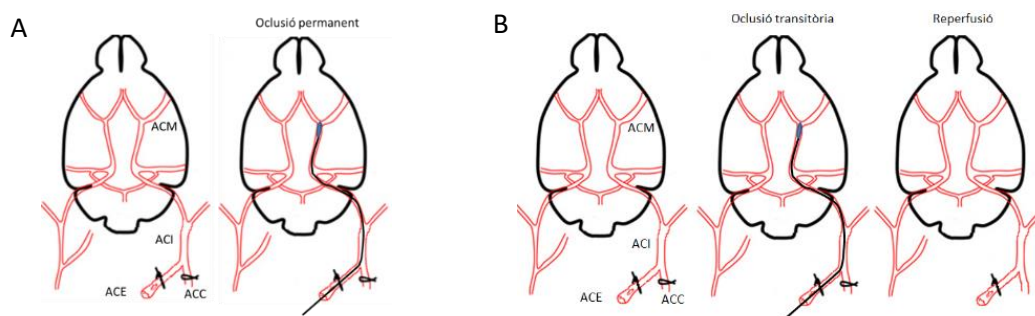
Els models d'isquèmia cerebral es poden classificar en primer lloc segons si requereixen o no d'una craniotomia i en segon lloc, segons si es tracta d'una isquèmia permanent o transitòria.

- **Models que requereixen de craniotomia:** són més invasius i donen lloc a un major nombre de factors de confusió que no es donen en la clínica com per exemple: el traumatisme cranial, canvis regionals en la temperatura del cervell, canvis en la pressió intracranial i la disrupció mecànica de la barrera hematoencefàlica (BHE). En aquest model s'oclou l'ACM de la superfície del cervell (Tamura *et al.*, 1981). El present treball de tesi es fonamenta en l'ús del model d'oclusió permanent distal de l'ACM en ratolí, un model que requereix craniotomia i en què les àrees corticals afectades per la isquèmia són principalment l'escorça cerebral motora i part de l'escorça somatosensorial (**Figura 7**).



**Figura 7.** Visió esquemàtica de l'artèria cerebral mitja en ratolí i la seva oclusió permanent distal.

- **Models que no requereixen de craniotomia:** no es consideren tant invasius. En aquests casos s'introdueix un filament de niló per l'ACI fins a arribar a la base de l'ACM. Amb aquest model cal evitar malmetre el nervi vague que recorre pel costat de l'ACC així com també tenir en compte que es pot provocar un dany endovascular pel simple fet d'introduir un filament (Longa *et al.*, 1989). Les àrees cerebrals afectades en aquests models són el còrtex motor i somatosensorial i també l'estriat (**Figura 8**). En la present tesi s'ha dut a terme el model d'oclusió proximal permanent de l'ACM en ratolí i el model d'oclusió proximal transitòria de l'ACM en rata.



**Figura 8.** Esquema del model quirúrgic d'oclusió proximal de l'ACM. A) Model d'oclusió permanent. B) Model d'oclusió transitòria. En ambdós models s'introdueix un filament fins a l'origen de l'ACM.

Llegenda; ACM: artèria cerebral mitja, ACI: artèria caròtida interna, ACE: artèria caròtida externa, ACC: artèria caròtida comú.



### 1.5.2. Valoració de la lesió cerebral per ressonància magnètica

El dany cerebral provocat per un ictus es pot visualitzar amb una extensa varietat de tècniques de neuroimatge. Moltes d'aquestes tècniques s'utilitzen en la pràctica clínica a nivell de diagnosi, tractament (guia de les intervencions) i seguiment del pacient al llarg del temps. La resolució en la neuroimatge ha evolucionat de tal manera que permet visualitzar el cervell de rosegadors amb molt detall (Ashwal *et al.*, 2007). La ressonància magnètica (RM) es basa en la utilització d'un camp magnètic per excitar els protons (nuclis dels àtoms d'hidrogen) del teixit i que s'alineïn entre ells. Quan s'interromp l'efecte del camp magnètic, els protons alliberen la seva energia en forma d'ones de radio i retornen a la seva posició original. Aquestes ones de radio, son recollides per un escàner i enviades a un ordinador per al seu processament en forma d'imatge (Roberts and Mikulis, 2007). La utilització de la RM en estudis amb models animals proporciona una informació molt valuosa ja que permeten fer un seguiment longitudinal de l'evolució de la lesió cerebral en el mateix animal (Knight *et al.*, 1994).

Cal tenir en compte que la lesió cerebral té un comportament dinàmic i evoluciona en el temps. Per aquest motiu hi ha diferents seqüències d'adquisició d'imatges en funció de la fase de la lesió cerebral i en funció de la pregunta que volem respondre.

- **Fase aguda (<12h):** El millor mètode de RM per demostrar l'afectació del parènquima cerebral en les primeres hores després de l'inici de la isquèmia és la imatge de difusió (DWI). Aquesta seqüència avalua el moviment de difusió de les molècules d'aigua, i en aquesta fase aguda reflecteix l'edema citotòxic (Kohn *et al.*, 1995). Per una banda, la DWI conjuntament amb els mapes de coeficient aparent de difusió (ADC) permeten determinar el volum del nucli isquèmic (teixit no rescatable). Per altra banda, l'obtenció d'imatges ponderades per perfusió (PWI, de l'anglès) permeten obtenir informació sobre el FSC. Combinant les imatges de DWI amb les de PWI es permet identificar la zona de penombra (teixit potencialment rescatable) (Røhl *et al.*, 2001).
- **Fase subaguda (primers dies):** L'adquisició d'imatges tipus T2w és adequada en els primers dies després de la isquèmia ja que la disrupció de la barrera hematoencefàlica (BHE) i la mort cel·lular per necrosi, provoquen que incrementi el contingut d'aigua en el teixit (edema vasogènic) (Yang and Rosenberg, 2011). Aquest fet provoca un augment del temps de relaxació en les constants T1 (temps de relaxació longitudinal) i sobre tot T2 (temps de relaxació transversal) dels protons (Roberts and Mikulis, 2007) i es permet identificar la zona de lesió cerebral.
- **Fase crònica (setmanes a mesos):** En aquesta fase tenen lloc esdeveniments de restauració de la BHE, eliminació de cèl·lules necròtiques i s'inicien esdeveniments de plasticitat neuronal. La presència d'edema citotòxic i vasogènic disminueix i per tant també la resolució de les imatges esmentades anteriorment. Així doncs, en aquesta fase, deixant de banda l'abast de la lesió cerebral, és més interessant per l'investigador, obtenir informació funcional de l'activitat cerebral per estudiar mecanismes de degeneració o regeneració. Les tècniques utilitzades per obtenir aquesta informació són la imatges per tensors de difusió (DTI) i les imatges per ressonància magnètica funcional (fMRI) (Sotak, 2002; Kim *et al.*, 2007).

### 1.5.3. Valoració dels dèficits neurològics

Durant dècades, la valoració de l'infart cerebral i els estudis histològics han estat els únics punts emprats per avaluar el potencial terapèutic d'una intervenció en els models animals. Així doncs, quan s'observava la reducció del volum d'infart en un dels grups de tractament es considerava un efecte beneficiós de la intervenció. Tot i que aquesta aproximació pot ser certa, la utilització de les tècniques histològiques és insuficient per valorar el potencial funcional d'un fàrmac en un model animal. Cal ser conscients que l'objectiu final és millorar el pronòstic dels pacients i per tant, una intervenció no només ha de protegir del teixit cerebral o bé promoure la recuperació d'aquest, sinó que també s'ha d'intentar restaurar la funció a tots els nivells. La falta de translació en molts estudis ha promogut la utilització d'una ampla varietat de tests conductuals i escales neurològiques en la recerca amb models animals que tenen en compte les funcions somatosensorials, de locomoció, d'habilitat de moviments, d'aprenentatge i memòria entre d'altres (**Figura 9**) (Schallert *et al.*, 2000; DeVries *et al.*, 2001; Farr and Whishaw, 2002; Balkaya *et al.*, 2018).

Els tests que tenen en compte les funcions somatosensorials més utilitzats en models d'isquèmia cerebral són:

- **Test de la cinta adhesiva (*Tape test*):** Consisteix en col·locar un adhesiu a les potes de davant de l'animal i avaluar la capacitat de l'animal de percebre i retirar-se l'adhesiu .
- **Test del cilindre (*Cylinder test*):** Consisteix en col·locar l'animal dins un cilindre transparent i avaluar la preferència d'utilització de les potes del davant quan l'animal s'aixeca i toca la paret.

Respecte els tests que tenen en compte l'habilitat de realitzar un moviment:

- **Tasca d'assoliment del pinso (*Pellet reachig task*):** Es valoren els moviments que realitza l'animal amb les extremitats anteriors quan intenta agafar una peça de pinso.

En l'aprenentatge i memòria:

- **Laberint aquàtic (*Water-maze*):** Es realitza en una piscina amb aigua i amb indicadors visuals a les parets per permetre la orientació dels animals. Consisteix fonamentalment en que l'animal ha d'aprendre i recordar la localització d'una plataforma amagada per tal d'escapar-se de l'aigua amb la menor distància recorreguda i el mínim de temps possible.
- **Laberint en forma de Y (*Y-maze*):** Els ratolins son animals molt curiosos i contínuament exploren el seu territori cercant qualsevol objecte nou o possible canvi del seu entorn. Aquest test consisteix en valorar la capacitat d'exploració de les diferents àrees del laberint en forma de Y en un temps determinat.



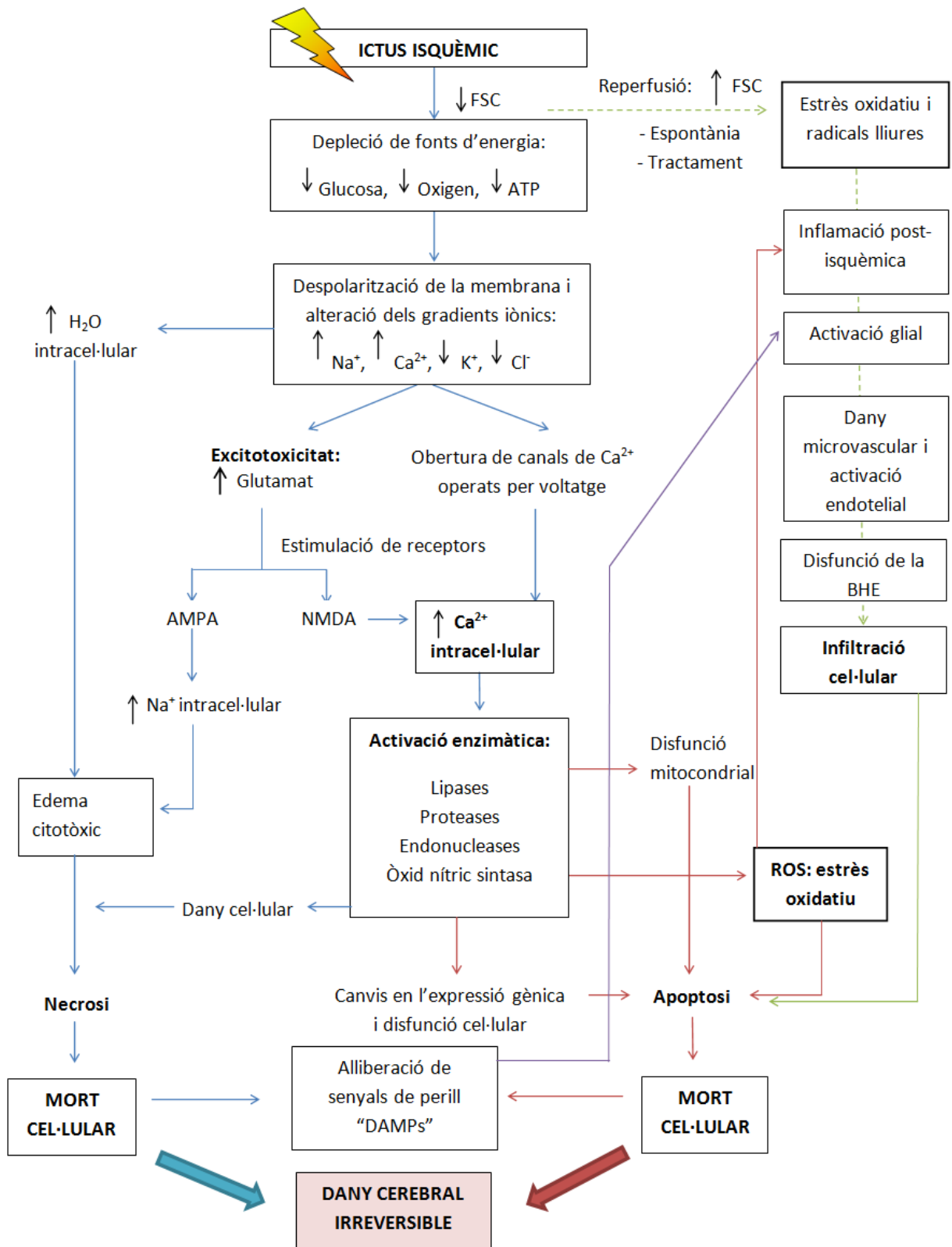


## 2. FISIOPATOLOGIA DE L'ICTUS

El cervell és un òrgan molt delicat que requereix d'un subministrament continuat de glucosa i oxigen a través de les artèries, donat que les neurones tenen poques reserves d'energia. El cervell humà adult, tot i només constituir un 2% del pes corporal, és l'òrgan amb un major consum de glucosa per minut i per gram de teixit (5.6 mg glucosa/minut per cada 100 g de teixit) (Mergenthaler *et al.*, 2013).

### 2.1. La cascada isquèmica

La interrupció sobtada del subministrament de glucosa i oxigen desencadenen una cascada d'esdeveniments cel·lulars i moleculars (**Figura 10**). En el nucli isquèmic, la mort cel·lular es dona principalment per la falta d'energia (Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010). En aquesta situació les neurones no poden mantenir el gradient iònic a través de la membrana cel·lular ja que no poden generar suficient ATP per mantenir el correcte funcionament de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Com a conseqüència, es produeix l'acumulació citoplasmàtica de ions  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  que promouen una entrada d' $\text{H}_2\text{O}$  intracel·lular que provoca la mort de la cèl·lula per necrosi. La zona perifèrica al nucli isquèmic o zona de penombra existeix un flux colateral que evita que el dany progressi ràpidament. En aquesta zona, la reducció del FSC no és suficient per provocar la mort per fallada energètica. És per aquest motiu, que les neurones d'aquesta regió es troben en una situació d'estrès que les fa críticament vulnerables (Chamorro *et al.*, 2012). L'excessiva acumulació de glutamat extracel·lular i conseqüentment la sobre activació dels receptors NMDA indueixen una acumulació intracel·lular de ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquests ions permeten activar diferents enzims dependents de calci que acabaran generant radicals lliures i metabòlits de l'àcid araquidònic entre d'altres. Aquests esdeveniments acabaran induint un dany cel·lular que pot culminar amb necrosi o bé amb la mort cel·lular programada (apoptosi). Les cèl·lules lesionades tindran un paper clau en la inflamació post-isquèmica ja que alliberen senyals de perill que activaran el sistema immunitari (Iadecola and Anrather, 2011).



**Figura 10:** Representació esquemàtica dels mecanismes de mort cel·lular desencadenats per la cascada isquèmica. Suport gràfic adaptat de (Castillo, 2001; Lakhan, Kirchgessner and Hofer, 2009; Iadecola and Anrather, 2011).

Llegenda; FSC: flux sanguini cerebral, AMPA: Receptor Àcid α-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoazolepropionic, NMDA: N-Metil-D-Aspartat, BHE: barrera hemoencefàlica, ROS: espècies reactives d'oxigen, DAMPs: damage-associated molecular patterns.

### 3. RESPOSTA INFLAMATÒRIA DESENCADENADA PER L'ICTUS ISQUÈMIC

La inflamació post-isquèmica està caracteritzada per una seqüència ordenada d'esdeveniments en què es veuen involucrades una gran varietat de cèl·lules presents en els diferents compartiments cerebrals: el parènquima, espais perivasculars i vasos cerebrals així com els diferents components cel·lulars i moleculars presents en la sang.

#### 3.1. Senyals d'inflamació en la fase aguda

Immediatament després de l'establiment de la situació d'isquèmia, els diferents components de la UNV generen una sèrie de senyals pro-inflamatoris gràcies a l'activació de diferents vies de senyalització cel·lular. En aquestes hi participen diversos factors de transcripció tals com el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), el factor induïble per la hipòxia (HIF-1) (Lee *et al.*, 2004), el factor regulador de l'interferó 1 (IRF1) i el factor activador de la transcripció STAT3 (Lakhan, Kirchgessner and Hofer, 2009), entre altres. Aquests factors promouran l'expressió de diversos gens proinflamatoris, molècules d'adhesió, citocines, quimiocines, metal·loproteïnases de la matriu (MMPs), importants per amplificar la resposta inflamatòria tal i com es detalla en la **Taula 2**.

**Taula 2:** Mediadors no transcripcionals i transcripcionals implicats en la inflamació post isquèmica. Suport extret de (Iadecola and Anrather, 2011).

<b>Initiation</b>	<b>Amplification</b>
Nontranscriptional (cell type)	Transcriptional (cell type)
Adhesion molecules	Adhesion molecules
P-selectin (EC, PLT)	ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, Mac-1, VLA-1, (EC, Leuk, PVM, MG, AG)
<b>Cytokines</b>	<b>Cytokines</b>
IL-1 $\beta$ (MG, PVM, MC)	IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-20, TNF (EC, PVM, MG, AG, Neu)
IL-1 $\alpha$ (PLT)	
TNF (MC)	
<b>Chemokines</b>	<b>Chemokines</b>
CCL5 (RANTES), CXCL4, CXCL7 (PLT)	CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), CXCL2/3 (MIP2), CXCL8 (IL-8) (EC, PVM, MG, AG, Neu)
CX3CL1 (Fractalkine) (Neu)	
<b>Proteases</b>	<b>Proteases</b>
Elastase, MMP-8, MMP-9, MT6-MMP (Leuk)	MMP2, MMP9 (EC, Leuk)
Clotting factors (Circ)	Complement (Circ, EC, AG, Neu)
Complement (Circ, EC, AG, Neu)	
<b>Small molecules</b>	<b>Other</b>
Prostanoids, leukotrienes (EC,PLT,MG, Neu)	iNOS (MG, Leuk, EC)
ATP (Circ, Neu)	COX-2 (Neu, MG, Leuk, EC)
Radicals (EC, PLT, Leuk, PVM, MG, Neu)	LOX (Neu, Leuk)
	PTGES (Neu, MG, Leuk, EC)
	NADPH oxidase (MG, Leuk)

*Llegenda; AG: astroglia, Circ: plasma, EC: endothelial cells, Leuk: leukocytes, Macr: macrophages, MC: mast cells, MG: microglia, Neu: neurons, PLT: platelets, PVM: perivascular macrophages. BDNF: brain-derived growth factor, COX-2: cyclooxygenase-2, EPO: erythropoietin, FGF: fibroblast growth factor, G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor, GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor, HB-EGF: heparin-binding epidermal growth factor, LOX: lipoxygenase, Mac-1: macrophage-1 antigen, MIP: macrophage inflammatory protein, NGF: nerve growth factor, PTGES: prostaglandin E2 synthase-1, RANTES: regulated upon activation: normally T-expressed: and presumably secreted, VCAM-1: vascular adhesion molecule 1, VLA-1: very late activation antigen-1.*

### 3.2. Afectació de la vasculatura cerebral

El procés inflamatori s'inicia en el compartiment intravascular just després de l'oclusió arterial. La hipòxia resultant, els canvis en el flux sanguini i la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) produeixen l'activació de les cèl·lules endotelials, plaquetes i el sistema del complement. Aquest fet promou l'expressió i translocació de molècules d'adhesió a la superfície de les cèl·lules endotelials i de les plaquetes així com també la contracció dels perícits. La reducció de la biodisponibilitat d'òxid nítric (potent vasodilatador i inhibidor de l'agregació plaquetària i adhesió dels leucòcits) i la formació intravascular d'agregats de fibrina, plaquetes i leucòcits acaben provocant una reducció encara més accentuada del FSC en el territori isquèmic (Iadecola and Anrather, 2011).

#### 3.2.1. La cèl·lula endotelial i la barrera hematoencefàlica

Les cèl·lules endotelials dels vasos cerebrals tenen una estructura segellada particular gràcies a les unions estretes i adherents que actuen com a barrera inicial entre la sang i les cèl·lules del cervell. Les cèl·lules endotelials descansen sobre una làmina basal formada per diferents components proteics (col·lagen IV, laminina, fibronectina i altres components de la matriu extracel·lular (MEC)). En contacte amb la lamina basal hi trobem els perícits, macròfags perivasculars i els peus dels astròcits. La interacció dels diferents components de la MEC i les cèl·lules esmentades formen la BHE (Sandoval and Witt, 2008). La BHE, és una barrera molt important ja que permet mantenir regulat l'ambient extracel·lular del parènquima cerebral tot mantenint-lo separat de la circulació sistèmica (Hawkins and Davis, 2005). Per una banda, és una barrera que permet el pas selectiu de determinats nutrients gràcies a un sistema de transportadors específics (aigua, glucosa, aminoàcids). Per altra banda impedeix el pas de molècules polars i altres substàncies així com també de cèl·lules immunitàries. Cal remarcar que durant molts anys es pensava que el cervell era un òrgan immunològicament privilegiat (ja que era capaç de tolerar la presència d'antígens sense desencadenar una resposta inflamatòria) degut a la presència de la BHE i l'absència de vasos limfàtics cerebrals. Actualment, diferents experiments estan fent canviar aquesta punt de vista i revelen que realment existeix una interacció activa entre el sistema nerviós i el sistema immunològic malgrat que els vasos limfàtics només s'han detectat a la duramàter (Kamel and Iadecola, 2012; Aspelund *et al.*, 2015; Louveau *et al.*, 2015; Ahn *et al.*, 2019).

#### 3.2.2. Activació endotelial: molècules d'adhesió

En condicions d'homeòstasi les cèl·lules que circulen per la sang no s'adhereixen a l'endoteli cerebral. En canvi, sota una situació d'inflamació com la provocada per la isquèmia cerebral, l'endoteli de les vècules post-capil·lars és capaç d'expressar ràpidament alts nivells de molècules d'adhesió que permeten el reclutament de leucòcits cap al focus de la inflamació.

Aquestes molècules es classifiquen en 3 grans famílies:

**Les selectines** son glicoproteïnes de membrana que es classifiquen en tres grups segons el tipus cel·lular en que s'expressen. Consisteixen en les E- (endoteli), P- (plaqueta i endoteli) i L- (leucòcit) selectines (Lasky, 1992). Després de l'activació endotelial es produeix ràpidament la translocació de les E-selectines i P-selectines a la superfície de la membrana cel·lular i s'afavoreix la interacció dels neutròfils i monòcits circulants amb l'endoteli gràcies al reconeixement dels residus Siayl-Lewis<sup>x</sup> (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). Aquest pas provoca una adhesió primària de les cèl·lules circulants que afavoreix el seu rodolament i disminució de la seva velocitat per la superfície vascular.

**Les immunoglobulines d'adhesió cel·lular (CAMs)** són una família composta per cinc membres. Les molècules d'adhesió intercel·lulars 1 i 2 (ICAM-1 i ICAM-2), la molècula d'adhesió vascular-cel·lular 1 (VCAM-1), la molècula d'adhesió plaqueta-endoteli 1 (PECAM-1) i la molècula d'adhesió cel·lular a la mucosa 1 (MAdCAM-1). S'ha observat uns baixos nivells d'expressió d'ICAM-1 a la superfície endotelial en condicions fisiològiques. De la mateixa manera que la E-selectina, l'expressió d'ICAM-1 s'indueix per l'efecte de les citocines IL-1 $\alpha$  i TNF $\alpha$  (Frijns and Kappell, 2002). Un cop iniciat el rodament dels leucòcits sobre l'endoteli vascular gràcies a la presència de les selectines, les molècules d'adhesió de tipus CAM entren en joc augmentant l'adhesió dels leucòcits circulants sobre l'endoteli activat i s'inicia el procés de transmigració cel·lular.

**Les integrines** són una família de glicoproteïnes de membrana formades per dues subunitats. La subunitat comú ( $\beta$ ) i la subunitat variable ( $\alpha$ ). Es distingeixen tres subfamílies en funció de la subunitat  $\beta$ . Les integrines  $\beta$ 1 estan relacionades amb la unió de la cèl·lula endotelial als diferents components de la MEC com la laminina i el col·lagen. En el cervell, aquestes integrines que mantenen la unió entre les cèl·lules endotelials amb els diferents components de la BHE són indispensables pel manteniment de la integritat de la microvasculatura (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006). Les integrines  $\beta$ 3 presents en les plaquetes, participen en la generació i l'estabilització de coàguls (Frijns and Kappell, 2002). Són però les integrines  $\beta$ 2 (CD18) que dimeritzades amb diferents subunitats de integrines  $\alpha$  (CD11a, CD11b i CD11c) permeten la interacció entre els leucòcits i l'endoteli. Així doncs, després del rodament i disminució de la velocitat dels leucòcits circulants per la interacció amb les E-selectines i la presència de mediadors inflamatoris com el TNF $\alpha$  es promou l'expressió i translocació d'aquestes integrines (LFA-1, Mac-1 i CD18/11c) a la membrana cel·lular d'aquests leucòcits i es potencia l'adherència amb l'endoteli gràcies a la interacció de les integrines amb les CAMs. A més a més, els limfòcits i monòcits expressen també les integrines  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4 i CD49d) que permeten la unió amb VCAM-1 i amb lligands de la matriu subendotelial, promovent d'aquesta manera la transmigració cel·lular (Frijns and Kappell, 2002).

Tot seguit es mostra una taula detallada amb les diferents molècules d'adhesió expressades en diferents tipus cel·lulars i la seva funció (**Taula 3**).

## INTRODUCCIÓ

**Taula 3:** Molècules d'adhesió entre l'endoteli activat i els leucòcits circulants. Suport extret de (Frijns and Kappell, 2002).

Adhesion Molecule	Action	Cells of Origin	Expression	Counterreceptor	Target Cells
<b>Selectins</b>					
E-selectin, CD62E	Rolling	Activated EC	Induced by cytokines	SLe <sup>x</sup> on PSGL-1, L-selectin, $\beta$ 2 integrins	Neutrophils, monocytes, lymphocytes
P-selectin, CD62P	Rolling	Stored in granules of platelets and EC	Surface expression induced by thrombin, histamine	SLe <sup>x</sup> and Le <sup>x</sup> on PSGL-1, L-selectin	Neutrophils, monocytes
L-selectin, CD62L	Rolling	All leukocytes	Constitutive	SLe <sup>x</sup> , P- and E-selectin	Activated EC, platelets, eosinophils
<b>Immunoglobulin gene superfamily</b>					
ICAM-1, CD54	Firm adhesion and transmigration	EC, leukocytes, fibroblasts, epithelial cells	Constitutive (low), upregulated by cytokines	LFA-1, Mac-1	All leukocytes
ICAM-2, CD102	Firm adhesion	EC, platelets	Constitutive	LFA-1	All leukocytes
VCAM-1, CD106	Firm adhesion and transmigration	EC	Constitutive (low), upregulated by cytokines	VLA-4	Monocytes, lymphocytes
PECAM-1, CD31	Leukocyte transmigration and adhesion	EC, platelets, leukocytes	Constitutive	PECAM-1	EC, platelets, leukocytes
<b><math>\beta</math>2 (CD18) integrins</b>					
CD18/11a (LFA-1)	Firm adhesion and transmigration	All leukocytes	Constitutive, function on leukocyte activation	ICAM-1 and ICAM-2	EC
CD18/11b (Mac-1)	Firm adhesion and transmigration	Neutrophils, monocytes, NK cells	Constitutive, surface expression increased after activation	ICAM-1	EC
CD18/11c	Minor role in leukocyte adhesion	Neutrophils, monocytes, NK cells	Constitutive, surface expression increased after activation	Complement fragments	
<b><math>\beta</math>1 (CD29) integrins</b>					
VLA-4, CD49d/CD29	Firm adhesion and transmigration	Lymphocytes, monocytes		VCAM-1	Monocytes, macrophages, EC, epithelial cells

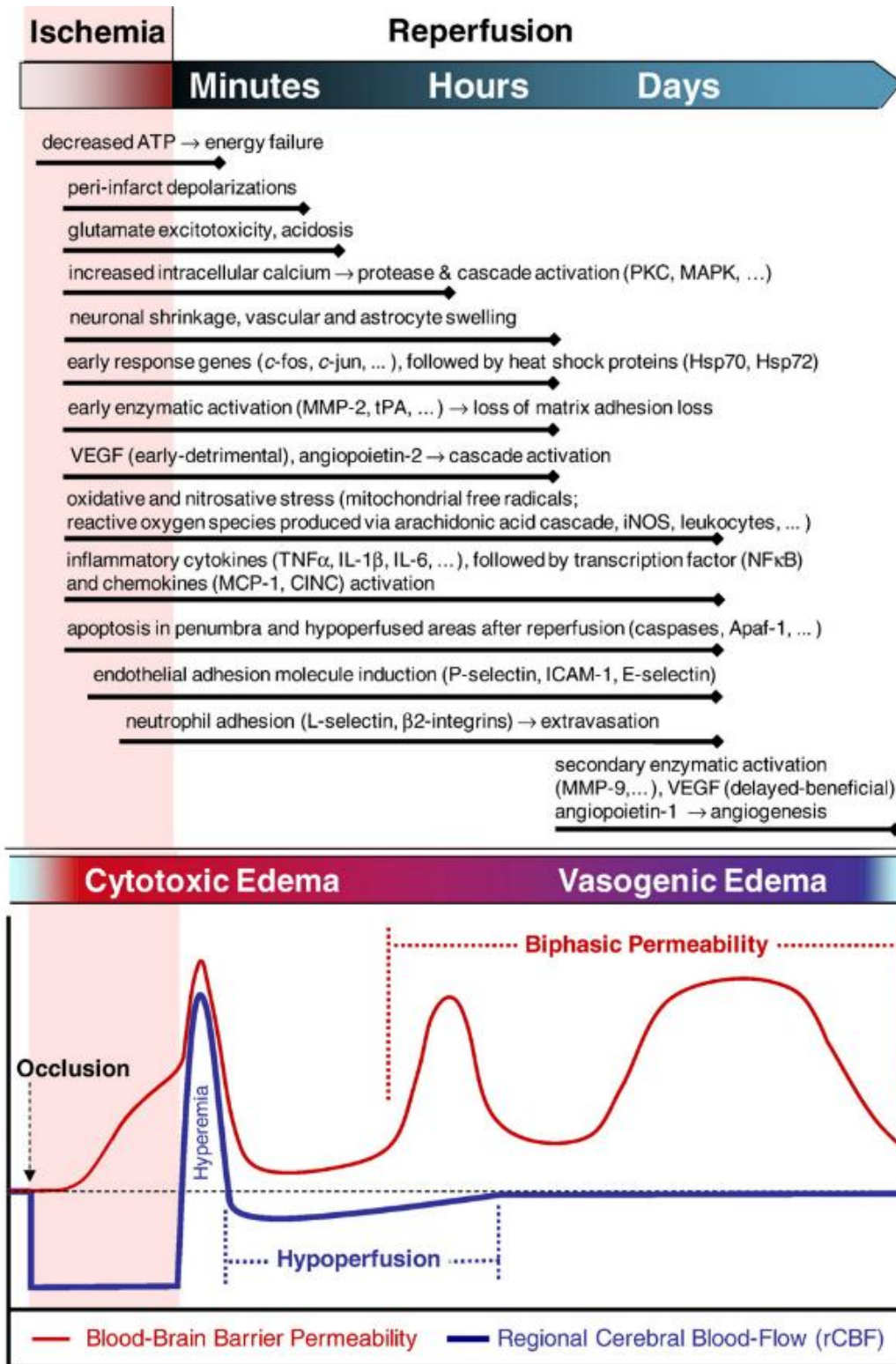
*Llegenda; EC: endothelial cells, SLe<sup>x</sup>: sialyl Lewis X (fucosylated tetrasaccharide), Lex: Lewis X (trisaccharide), PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1, Mac-1: macrophage antigen-1, NK: natural killer, CAM: cell adhesion molecules, LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1, VLA-4: very late antigen-4.*

### 3.2.3. Mecanismes implicats en el trencament de la BHE

La BHE és una estructura dinàmica altament regulada pel que fa a les interaccions entre les cèl·lules que la formen i la MEC. La BHE es pot desestabilitzar en diferents condicions patològiques com en la infecció pel VIH, la malaltia d'Alzheimer, l'esclerosi múltiple i també en l'ictus (Abbott, Rönnbäck and Hansson, 2006). Tant la isquèmia cerebral com la reperfusió post isquèmica formen part dels processos patològics involucrats en la desestabilització de la BHE.

En la condició d'isquèmia, l'estrès oxidatiu, els mediadors inflamatoris, el desequilibri osmòtic i l'acumulació intracel·lular d'àcid làctic comprometen la viabilitat i funcionalitat de l'endoteli i el pericít (Krueger *et al.*, 2015) (**Figura 11**). En aquesta situació, es produeix l'inflament de les cèl·lules endotelials, astròcits i neurones i com a conseqüència es debiliten els complexos d'unió que mantenen les cèl·lules endotelials unides entre elles i és al cap de minuts, hores i dies que s'observen canvis en la permeabilitat endotelial (Sandoval and Witt, 2008).





**Figura 11.** Esquema dels mediadors que participen en la permeabilitat de la BHE al llarg del temps en la isquèmia/reperfusió. Suport gràfic extret de (Sandoval and Witt, 2008).

Llegenda; PKC: protein kinase-C, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, Hsp: heat shock protein, MMP: matrix-metalloproteinases, tPA: tissue plasminogen activator, VEGF: vascular endothelial growth factor, iNOS: inducible nitric oxide synthase, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, CINC: cytokine-induced neutrophil chemoattractant, Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1, ICAM: intercellular adhesion molecule-1.

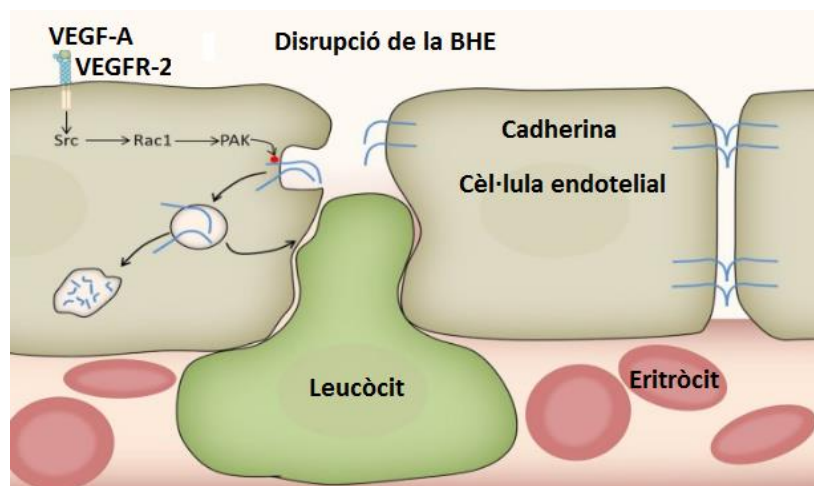


## INTRODUCCIÓ

La condició d'hipòxia, la producció de radicals lliures i la inflamació promoguda per la presència de citocines proinflamatòries activen diferents vies de senyalització mitjançades pels factors de transcripció NF- $\kappa$ B i HIF-1.

**NF- $\kappa$ B:** Aquest factor de transcripció està considerat com a un “regulador mestre” de molts processos inflamatoris (Taniguchi and Karin, 2018). L'activació i translocació d'aquest factor al nucli cel·lular promou l'expressió de diferents citocines proinflamatòries, molècules d'adhesió i proteases en la isquèmia cerebral com TNF $\alpha$ , iNOS, COX-2, ICAM-1, IL-6 i MMP9 entre d'altres (Harari and Liao, 2010; Gorina *et al.*, 2011).

**HIF-1:** El factor 1 induïble per la hipòxia (HIF-1) és un factor transcripcional considerat també un “regulador mestre” de nombrosos gens induïbles en condicions d'hipòxia. Consta d'una subunitat induïble HIF-1 $\alpha$  i una subunitat constitutiva HIF-1 $\beta$ . En condicions ambientals de normòxia, HIF-1 $\alpha$  es degrada ràpidament després de la seva poliubiquitinació. En canvi, l'ambient hipòxic estabilitza HIF-1 $\alpha$  i promou l'activació de la via HIF en el cervell isquèmic (Serra-Pérez *et al.*, 2010). HIF-1  $\alpha$  és un activador directe de l'expressió gènica de VEGF-A. Indirectament HIF-1 $\alpha$  induïx la producció d'eritropoetina (EPO) que provoca un augment de la secreció de VEGF. La producció de VEGF-A en condició d'isquèmia segueix un patró d'expressió bifàsic. En les primeres hores està descrit que VEGF-A s'uneix al seu receptor VEGFR-2 en les cèl·lules endotelials i s'activa la via de senyalització Src-Rac1-PAK. PAK provocaria la fosforilació de molècules d'adhesió endotelials (cadherines) que finalitzaria amb la seva internalització i culminaria amb la disrupció de les unions intercel·lulars de la BHE (**Figura 12**). Per altra banda els títols de VEGF-A en dies posteriors a la isquèmia estarien implicats en processos beneficiosos d'angiogènesi (Geiseler and Morland, 2018). L'estabilització de la subunitat HIF-1 $\alpha$  i translocació al nucli promou en general l'expressió d'una gran quantitat de gens relacionats amb la proliferació i supervivència cel·lular, l'eritropoesi, el metabolisme de nucleòtids, de ferro i de glucosa, el metabolisme de la matriu extracel·lular, la permeabilitat vascular i l'angiogènesi entre d'altres processos (Lee *et al.*, 2004).



**Figura 12.** Representació esquemàtica de la disrupció de la BHE per l'efecte de VEGF-A. Suport gràfic adaptat de (Geiseler and Morland, 2018).

*Llegenda;* VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A, VEGFR-2: vascular endothelial growth factor receptor 2.

La reperfusió del teixit isquèmic pot generar un dany tissular secundari que es coneix com a dany per reperfusió i que inclou la disrupció de la BHE observable en 3 fases clarament delimitades en el temps (**Figura 11**).

L'augment sobtat de la perfusió cerebral resultat del procés de reperfusió conjuntament amb la desestabilització inicial de les unions entre les cèl·lules endotelials descrit en la fase aguda de la isquèmia participarien en la primera fase de permeabilitat de la BHE.

Després de la hiperèmia reactiva la viabilitat de l'endoteli i del pericit es veu compromesa i es produeix un fenomen d'hipoperfusió degut a l'inflament dels peus dels astròcits i l'obstrucció de vècules post capil·lars. Aquesta situació facilita l'adhesió de neutròfils a l'endoteli i es potencia la situació inflamatòria en el teixit afectat així com també l'augment de la permeabilitat de la BHE. En conjunt, l'increment en l'estrès oxidatiu, la situació inflamatòria i la degradació enzimàtica de la MEC per part de proteases s'han considerat responsable d'aquesta segona fase de permeabilitat de la BHE (compresa entre les 3-8 hores després de la reperfusió) (Ji, Sang and Seung, 2005).

Apareix una tercera fase d'obertura de la BHE que té a veure amb els processos d'edema vasogènic i d'angiogènesis que es prolonga durant els dies següents de la reperfusió. Finalment, un dels participants implicats en les primeres fases de la desestabilització de la BHE com el VEGF-A i les MMPs seran importants en la última fase de restauració de la BHE gràcies a la remodelació de la MEC i la formació de nous vasos cerebrals (Geiseler and Morland, 2018).

### 3.3. La immunitat innata

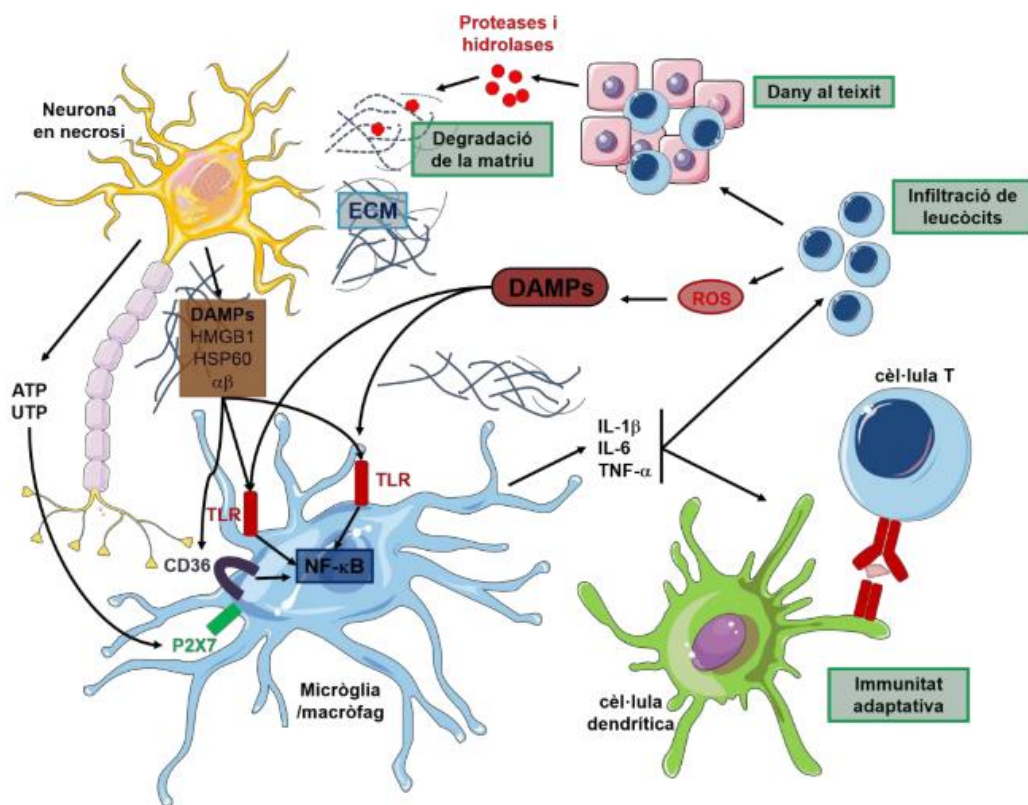
El sistema immunitari innat és un sistema de defensa evolutivament molt conservat que permet donar una resposta ràpida davant d'infeccions per patògens i/o també en situacions d'inflamació estèril com en l'ictus. Aquest sistema està format per barreres físiques i químiques, per components cel·lulars com els macròfags, neutròfils i cèl·lules NKs així com també per proteïnes de la sang com el sistema del complement i mediadors inflamatoris com les citocines (Chamorro *et al.*, 2012).

A mesura que progressa la cascada isquèmica i es produeix una situació d'estrès i mort cel·lular, s'inicia la producció, secreció i/o alliberació del contingut intracel·lular de les cèl·lules estressades i necròtiques al parènquima cerebral (**Figura 10**). Els productes derivats de la degradació de la MEC per part de les proteases així com el producte resultant de la interacció de les ROS amb els lípids, l'ATP, l'UTP, l'HMGB1, i les HSPs, son interpretats pel sistema immune innat com a senyals de perill. Aquestes molècules s'anomenen de forma general *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs). Els DAMPs tenen la capacitat d'activar els *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) com els *Toll-Like Receptors* (TLRs) i receptors purinèrgics de les cèl·lules del sistema immunitari innat residents al cervell (microglia i macròfags perivasculars) així com també les cèl·lules endotelials (Marsh, Williams-Karnesky and Stenzel-Poore, 2009). L'activació d'aquests receptors indueix la producció de ROS, l'expressió de citocines proinflamatòries (IL1- $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) i la síntesi i activació de MMPs (MMP2, MMP3 i MMP9) a través de la via de senyalització NF- $\kappa$ B i HIF-1 $\alpha$  (Gülke, Gelderblom and Magnus, 2018) (**Figura 13**).

## INTRODUCCIÓ

En la immunitat innata a part de la resposta cel·lular es produeix també una resposta humoral. El sistema del complement forma part de la branca humoral de la immunitat innata i la seva activació és desencadena típicament sota condicions d'infecció. El sistema del complement el componen diferents subunitats (des de la C1 a la C9) que condueixen a la lisi cel·lular. A més a més el sistema del complement té la funció d'opsonitzar (C1q, C3b i iC3b), de potenciar la fagocitosis, promoure el reclutament i activar cèl·lules inflamatòries per part de les anafilatoxines (C3a i C5a) (Yanamadala and Friedlander, 2010). En el SNC tant la glia com les neurones son capaces de sintetitzar components del complement. En la isquèmia cerebral, tot i tractar-se d'una situació d'inflamació estèril, diversos components circulants del complement es poden activar i accedir al cervell a través de la BHE desestabilitzada i exacerbar el dany cerebral (Beek, Elward and Gasque, 2003).

En conjunt, la producció de citocines, proteases de la MEC i l'activació del complement condueixen a un patró temporal i coordinat de reclutament i infiltració de leucòcits que exacerbaran el dany tissular i es continuaran produirant més DAMPs de manera que la branca de la immunitat innata es mantindrà activada (Iadecola and Anrather, 2011) i s'iniciarà una resposta del sistema immunitari adaptatiu (Chamorro *et al.*, 2012).



**Figura 13.** Esquema representatiu de la immunitat innata en el SNC. Suport gràfic adaptat de (Iadecola and Anrather, 2011).

Llegenda: ECM: extracellular matrix, DAMPs: damage-associated molecular pattern, HMGB1: high mobility group box 1 protein, HSP: heat shock protein, TLR: toll like receptor, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell, αβ: beta amiloide.

Ens els següents apartats es desglossarà la funció d'alguns dels tipus cel·lulars que participen en la resposta immunitària innata i en el procés inflamatori; com ara la micròglia, els macròfags perivasculars, els neutròfils i el monòcits.

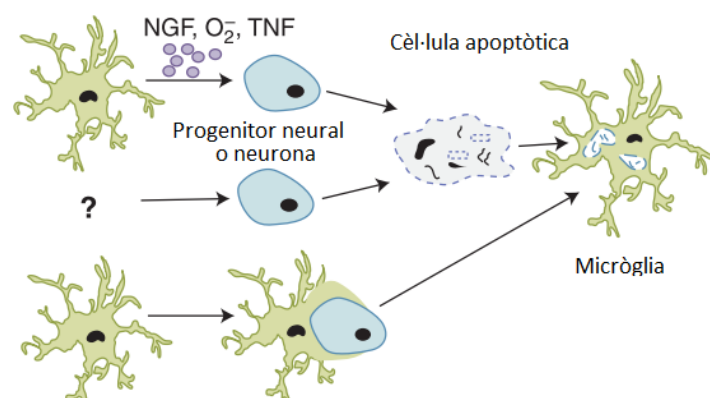
### 3.4. Resposta de les cèl·lules mieloides residents al cervell

En el SNC en condicions d'homeòstasi hi ha una població heterogènia de cèl·lules mieloides. La micròglia és la cèl·lula mioide resident en el parènquima del SNC però també hi ha altres poblacions en diferents compartiments del SNC com les cèl·lules dendrítiques, el macròfags associats als plexes coroides (MPC), a les meninges (MPVM) i als espais perivasculars i de Virchow-Robin (MPV) (Van Hove *et al.*, 2019). Tot i compartir funcions immunològiques de vigilància i eliminació de restes cel·lulars i metabòliques, estudis recents han demostrat que aquestes poblacions tenen orígens diferents (Prinz and Priller, 2014; Goldmann *et al.*, 2016).

#### 3.4.1. La micròglia

La micròglia és la població de macròfags residents del SNC que s'origina a partir de progenitors embrionaris del sac vitel·li (Ginhoux *et al.*, 2013). Es troba àmpliament distribuïda per tot el parènquima del SNC i representa el 10-20% de la població total de les cèl·lules gials (Soulet and Serge, 2008). En condicions fisiològiques la micròglia contribueix en el la regulació de l'homeòstasi del SNC durant el desenvolupament i en l'edat adulta a través de diferents mecanismes (Schafer and Stevens, 2015):

- **Regulació de la mort cel·lular programada:** Durant el desenvolupament del SNC es generen més progenitors neuronals o neurones dels necessaris. La micròglia s'encarrega de fagocitar les cèl·lules que desenvolupen mort programada sense desencadenar una resposta inflamatòria. Durant la neurogènesi en el cervell adult es generen nous progenitors neurals que no s'incorporen en els circuits neuronals. Aquests progenitors neurals o neurones poden ser fagocitats directament per la micròglia o bé poden morir per apoptosi i acabar essent fagocitats per la micròglia (**Figura 14**).

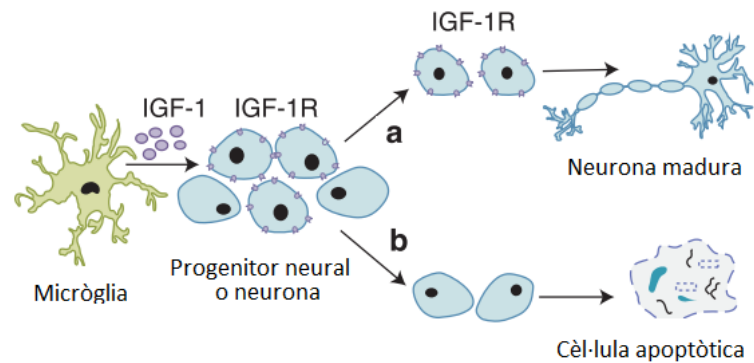


**Figura 14.** Participació de la micròglia en la mort cel·lular programada. Suport gràfic adaptat de (Schafer and Stevens, 2015).

Llegenda: NGF: nerve growth factor, TNF: tumor necrosis factor.

## INTRODUCCIÓ

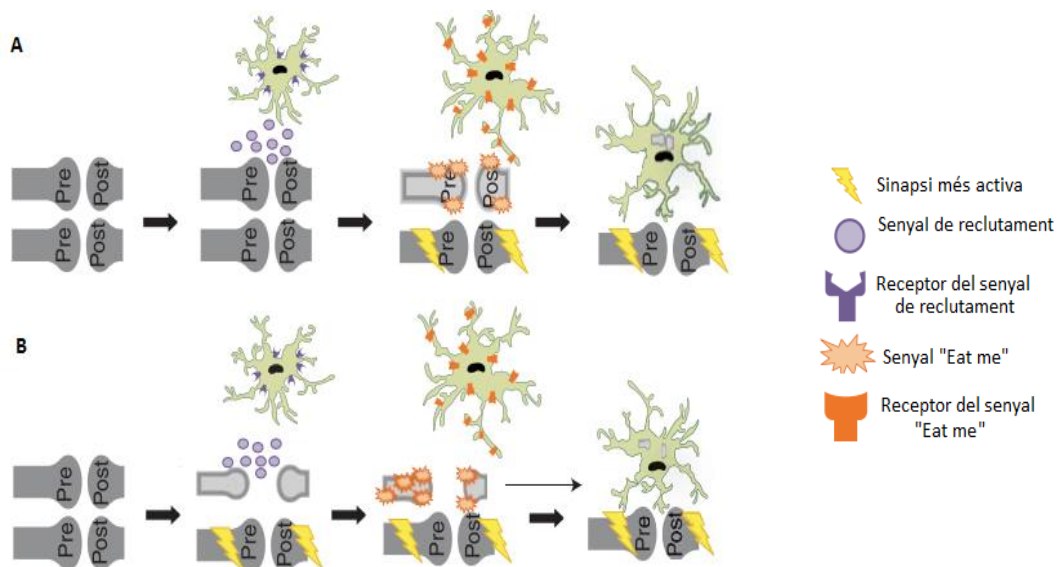
- **Regulació de la supervivència cel·lular:** Al mateix temps s'ha observat que la micròglia proporciona suport tròfic a neurones i progenitors neurals a través del factor IGF-1 i en promou la seva supervivència, proliferació i diferenciació (**Figura 15**).



**Figura 15.** Participació de la micròglia en la supervivència cel·lular. Suport gràfic adaptat de (Schafer and Stevens, 2015).

Llegenda; IGF-1: insulin-like growth factor-1, IGF-1R: insulin-like growth factor-1R.

- **Poda sinàptica:** Durant el desenvolupament del SNC també es formen connexions sinàptiques en excés que seran eliminades per part de la micròglia en els primers estadis post-natals. Des del naixement fins l'adult es produeixen molts esdeveniments de plasticitat neuronal. La micròglia participa tant en el manteniment de les sinapsis més actives com en l'eliminació d'aquelles amb menys activitat (**Figura 16**).



**Figura 16.** Participació de la micròglia en el remodelat sinàptic. A) Eliminació de l'excés de d'espines sinàptiques. B) Eliminació de les espines sinàptiques amb menys activitat. Suport gràfic adaptat de (Schafer and Stevens, 2015).

Quan es produeix una pertorbació de l'homeòstasi cerebral ja sigui per una infecció o per un dany al teixit, la micròglia s'activa, experimenta un canvi morfològic passant d'una morfologia ramificada a una morfologia ameboide amb una alta capacitat fagocítica i que la fa pràcticament indistingible dels macròfags derivats de monòcits que han infiltrat al parènquima cerebral (del Zoppo *et al.*, 2007). La falta de marcadors específics que permetin la diferenciació d'aquests tipus cel·lulars ha provocat que la caracterització de la micròglia en condicions patològiques hagi estat una tasca complicada durant molt de temps.

Clàssicament la micròglia i els macròfags derivats de monòcits s'han intentat classificar segons diferències morfològiques (morfologia ramificada vs. ameboide) i en base al grau d'expressió dels marcadors de superfície CD45 i CD11b en citometria de flux (la micròglia: CD45<sup>low</sup> CD11b<sup>+</sup>, els macròfags: CD45<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup>) (Ford *et al.*, 1995). Desafortunadament, aquestes aproximacions tenen limitacions ja que tant la morfologia com l'expressió dels marcadors de superfície poden variar en condicions patològiques.

Recentment s'han utilitzat diferents eines basades en l'expressió del receptor de la fractalquina (CX3CR1). CX3CR1 s'expressa en la micròglia però també en algunes poblacions de monòcits circulants i macròfags tissulars residents (Yona *et al.*, 2013). Per una banda s'han desenvolupat ratolins modificats genèticament *knock in* CX3CR1-GFP (que expressen la proteïna fluorescent GFP sota el promotor CX3CR1) i s'han generat animals quimèrics mitjançant el transplantament de cèl·lules del moll de l'os de manera que es permet distingir els macròfags infiltrants de la micròglia resident. No obstant això, un quimerisme incomplet i una inflamació subjacent degut al procediment de la generació d'animals quimèrics poden interferir en la distinció de les poblacions (Ginhoux and Prinz, 2015). Per altra banda s'ha desenvolupat també un model d'animal transgènic basat en la inducció de l'expressió d'una proteïna fluorescent sota el promotor de CX3CR1 (CX3CR1<sup>CreER/+</sup> R26<sup>DsRed</sup>) mitjançant l'administració de tamoxifè (un estrogè sintètic anàleg que s'uneix a un domini modificat del receptor d'estrògens (ER) del constructe CreER i en permet la seva migració al nucli per activar la transcripció de la proteïna fluorescent en qüestió) (Feil, Valtcheva and Feil, 2009). Donat que la micròglia no es reemplaça constantment a diferència dels monòcits circulants, amb el temps, només la micròglia mantindrà l'expressió de la proteïna fluorescent (Parkhurst *et al.*, 2013).

També s'han utilitzat animals *knock in* (LysM-eGFP) que permeten diferenciar les cèl·lules del llinatge mioide (monòcits) de la micròglia segons l'expressió de la proteïna fluorescent eGFP sota el promotor de LysM (Greenhalgh *et al.*, 2018).

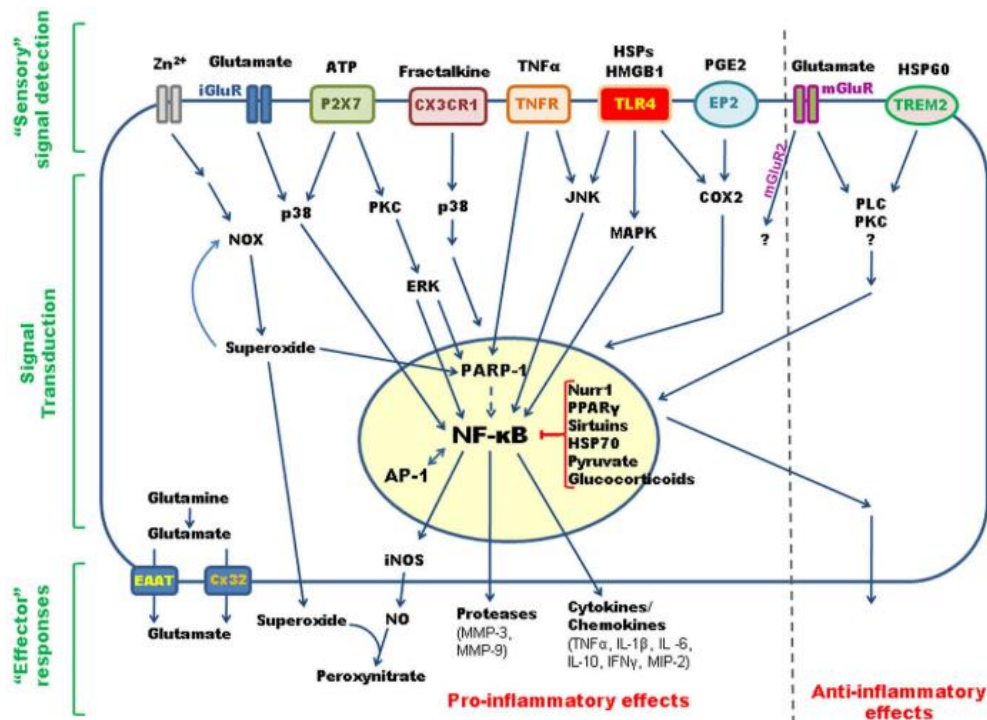
Gràcies als nous models animals s'ha observat que la micròglia es pot diferenciar dels macròfags infiltrats segons el perfil d'expressió gènica (p.e. *Sall1*, *P2ry12*, *Tmem119* entre d'altres) (DePaula-Silva *et al.*, 2019). Gràcies a això s'han obtingut anticossos que permeten el marcatge específic de la micròglia (p.e. anticossos anti-P2yr12 i Tmem119) i en permeten la seva identificació en talls histològics (Bennett *et al.*, 2016; Villa *et al.*, 2018).

La utilització dels diferents models animals ha ajudat a caracteritzar funcionalment i fenotípicament la micròglia en condicions fisiològiques i patològiques. Concretament, en la isquèmia cerebral, s'alliberen una àmplia varietat de factors que provoquen que la micròglia



## INTRODUCCIÓ

s'activi i generi una resposta inflamatòria (**Figura 17**) (Yenari, Kauppinen and Swanson, 2010; Gülke, Gelderblom and Magnus, 2018). A més a més, a mesura que la mort neuronal avança, es produeix la disrupció de la senyalització CD200-CD200R i CX3CL1-CX3CR1 entre la micròglia i les neurones i es potencia d'aquesta manera un fenotip pro-inflamatori (Iadecola and Anrather, 2011). En conjunt, l'activació de la micròglia amplificarà la resposta inflamatòria iniciada a la llum del vas, es promourà la disrupció de la BHE, el reclutament i la infiltració de leucòcits circulants que culminarà amb un augment del dany cerebral.



**Figura 17.** Resposta de la micròglia en la isquèmia cerebral. Suport gràfic extret de (Yenari, Kauppinen and Swanson, 2010).

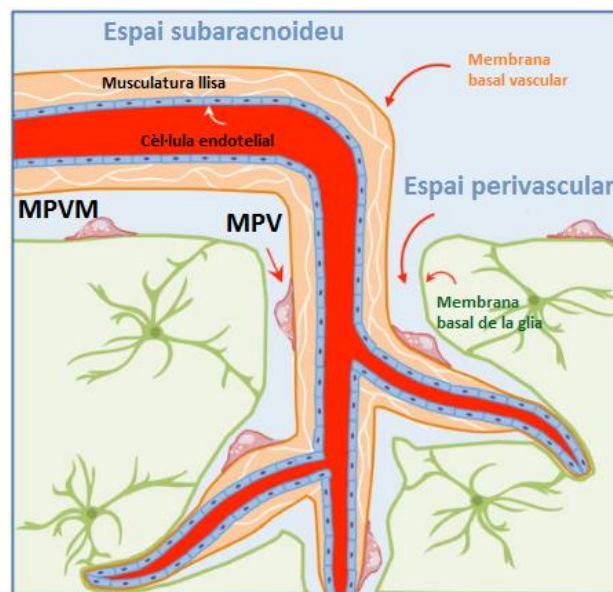
*Llegenda:* AP-1: transcription factor AP-1 (activator protein 1); COX2, cyclooxygenase 2, Cx32: connexin-32 (gap junction beta-1 protein), CX3CR1: fractalkine receptor; EAAT: excitatory amino acid transporter, EP2: prostaglandin E2 receptor, ERK: extracellular signal-regulated kinase, HMGB1: high-mobility group box 1; HSP: heat shock protein, iGluR: ionotropic glutamate receptor, IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$ , IL: interleukin, iNOS: inducible nitric oxide synthase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MIP: microtubule interacting protein, MMP: matrix metallo-proteinase, mGluR: metabotropic glutamate receptor, NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B, NO: nitric oxide, NOX: NADPH oxidase, P2X7: P2X purinoreceptor 7, PARP-1: poly(ADP-ribose) polymerase 1, PGE2: prostaglandin E2, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C, PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , TLR4: Toll-like receptor 4, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNFR: tumor necrosis factor receptor, TREM2: triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

Cal destacar que la resposta inflamatòria desencadenada per la micròglia des dels primers minuts fins a diverses hores després del dany són beneficiosos per tal de limitar la progressió del dany isquèmic gràcies a la fagocitosis de restes cel·lulars i de leucòcits infiltrants (Otxoa-de-Amezaga et al. 2019). Malgrat tot, una inflamació perllongada en el temps degut a una micròglia activada pot tenir efectes perjudicials. Recentment s'ha descrit que els macròfags derivats de monòcits que infiltrin després d'una lesió en el SNC interaccionen amb la micròglia i en redueixen la seva activitat inflamatòria evitant d'aquesta manera una activació crònica (Greenhalgh et al., 2018). A mesura que progressa la lesió, la naturalesa de les senyals de l'entorn varien. Tant la micròglia com altres tipus cel·lulars tenen la capacitat d'adaptar-se al

nou entorn i generar una resposta adaptativa. És per aquest motiu que la micròglia no només participa directament en la resposta inflamatòria sinó que també participa en l'alliberament de citocines antiinflamatòries i processos de reparació del teixit (Iadecola and Anrather, 2011). Aquest fenomen rep el nom de polarització fenotípica.

### 3.4.2. Els macròfags associats al cervell

Clàssicament els macròfags associats al cervell (de l'anglès *brain-associated macrophages*, BAMs) com els MPC, MPVM i MPV s'han classificat en base a la seva localització anatòmica (**Figura 18**). Cal destacar que un treball recentment publicat mostra que el nombre d'aquestes cèl·lules en les diferents localitzacions anatòmiques (duramàter, leptomeninges, plexes coroides i al cervell) és variable. (Van Hove *et al.*, 2019).



**Figura 18.** Localització anatòmica dels MPVM i MPV. Suport gràfic adaptat de (Faraco *et al.*, 2017).  
Llegenda; MPVM: Macròfags perivasculars de les meninges, MPV: Macròfags perivasculars.

Tradicionalment s'havia considerat que els BAMs s'originaven en moll de l'os i es produïa un recanvi constant d'aquestes cèl·lules. Estudis recents han demostrat que aquests macròfags tenen un origen comú similar al de la micròglia i diferent del pericit (Guillemin and Brew, 2004; Goldmann *et al.*, 2016). En concret els MPVM i els MPV (les cèl·lules estudiades en la present tesis) provenen de progenitors del sac vitel·lí que migren durant els primers estadis de l'embriogènesi i s'estableixen a les interfícies del SNC. A diferència dels MPC, els MPVM i MPV es mantenen estables en el SNC en condicions d'homeòstasi de la mateixa manera que la micròglia, sense la necessitat de ser reemplaçades per progenitors d'origen hematopoètic (Goldmann *et al.*, 2016).

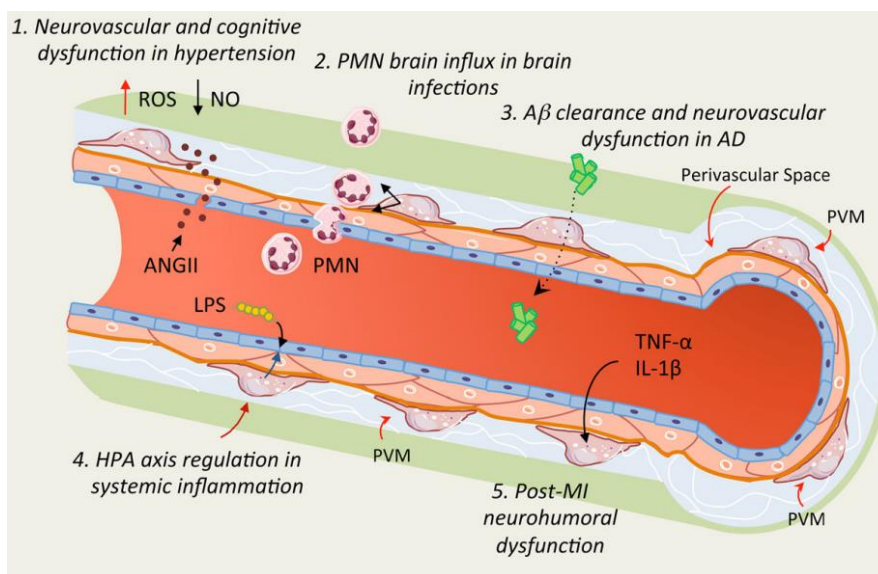
Les funcions principals d'aquests macròfags en condicions d'homeòstasi són les de neteja, regulació de la permeabilitat vascular i vigilància immunològica (Lapenna, De Palma and Lewis, 2018). En humans (Kim *et al.*, 2006) i en rata (Mato *et al.*, 1996) els MPV i els MPVM expressen el receptor CD163 que és un bon marcador d'aquestes cèl·lules, mentre que en ratolí, el receptor de la mannanosa CD206 (Galea *et al.*, 2005) és el més utilitzat per identificar-les. El CD163 està format per nou dominis rics en cisteïna i en condicions fisiològiques la seva



## INTRODUCCIÓ

expressió es troba restringida als macròfags de diferents teixits, en alguna població de monòcits però absent en la micròglia (Polfliet *et al.*, 2006). CD163 participa en la protecció dels teixits davant l'estrès oxidatiu mediat per l'hemoglobina lliure ja que està involucrat en la neteja i l'endocitosis de complexos d'hemoglobina/haptoglobina (Van Gorp, Delputte and Nauwynck, 2010). Tot i això, es coneix poc el paper dels BAMs en condicions patològiques del SNC. En diferents models de neuroinflamació es posa de manifest la seva potencial implicació fisiopatològica (**Figura 19**). Per una banda, els MPV tenen un paper protector en la meningitis bacteriana facilitant la infiltració de neutròfils a través de la BHE (Polfliet *et al.*, 2001), participen en l'eliminació de  $\beta$ -amiloide vascular en models murins de la malaltia d'Alzheimer (Hawkes and McLaurin, 2009), i en la protecció del cervell dels efectes nocius del mal transport de glucosa en ratolins tractats amb dieta rica en greixos per part dels transportadors GLUT1 mitjançant la producció compensatòria de VEGFA (Jais *et al.*, 2016). Per altra banda, aquestes cèl·lules també participen en la disfunció neurovascular amb la producció d'estrès oxidatiu en models murins d'Alzheimer i hipertensió arterial (Faraco *et al.*, 2016). A més a més s'ha observat que en condicions d'isquèmia i reperfusió els MPV tenen la capacitat d'alliberar citocines proinflamatòries (TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) (Iadecola and Anrather, 2011) i que les cèl·lules CD163+ s'acumulen al parènquima cerebral en resposta a estímuls inflamatoris com en el cas de la lesió cerebral traumàtica i l'esclerosi múltiple (Zhang *et al.*, 2011, 2012). En un estudi recent de *high-dimensional single-cell cytometry and fate mapping* s'han identificat diferents subpoblacions de BAMs amb diferents respostes en comparació amb altres cèl·lules mieloides del cervell en l'envelliment, en l'encefalomielitis autoimmune experimental i en la malaltia d'Alzheimer (Van Hove *et al.*, 2019).

Així doncs, aquests macròfags expressen diferents receptors que suggereixen una funció en la immunitat innata a través dels PRRs, la fagocitosis, la resposta a citocines i al reclutament de leucòcits en la fase aguda de la inflamació així com també en la immunitat adaptativa a través de la coestimulació i presentació d'antígens.

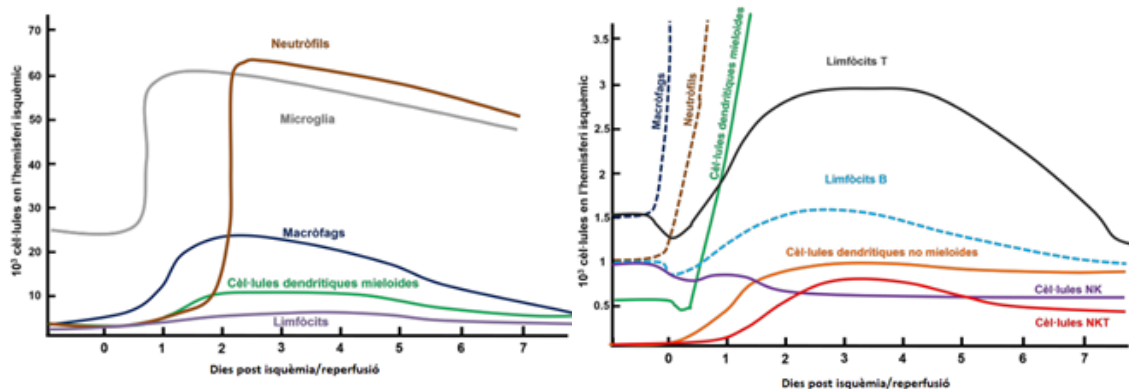


**Figura 19.** Implicació dels MPV en el cervell en condicions patològiques. Suport gràfic extret de (Faraco *et al.*, 2017).

Llegenda; ROS: reactive oxygen species, NO: nitric oxide, PMN: polymorphonuclear cells, ANGII: angiotensin II, AD: Alzheimer's disease, HPA: hypothalamic-pituitary axis, MI: myocardial infarction, PVM: perivascular macrophage.

### 3.5. La infiltració leucocitària

Tal i com s'ha detallat en els apartats anteriors, tant en la isquèmia cerebral com en la reperfusió, es produeixen una sèrie d'esdeveniments cel·lulars i moleculars que segueixen un patró temporal molt ben definit que potencien el reclutament i infiltració de leucòcits al cervell (**Figura 20**). Existeixen diferències en el nombre de cèl·lules infiltrants entre la isquèmia permanent i la isquèmia transitòria (Grønberg *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2014), però en ambdós casos, aquestes cèl·lules poden estar contribuint de forma directa al dany cerebral secundari i en la posterior resolució i recuperació del teixit afectat (Gelderblom *et al.*, 2009).



**Figura 20.** Perfil d'infiltració temporal de les diferents cèl·lules del sistema immune implicades en el procés inflamatori i en la resolució de la lesió després de la isquèmia i reperfusió. Suport gràfic adaptat (Gelderblom *et al.*, 2009).

*Llegenda; NK: natural killers, NKT; natural killers T cells.*

En els següents apartats es detalla la contribució de diferents leucòcits en la isquèmia cerebral estudiats en el present treball de tesi doctoral. Cal tenir en compte que tot i desglossar la informació segons el tipus cel·lular per separat de ben segur existeix una comunicació directa entre aquestes cèl·lules en aquesta patologia.

#### 3.5.1. Els neutròfils

Els neutròfils formen part del sistema immunitari innat i són leucòcits de tipus granulòcit. Tenen un temps de vida mitja curta en circulació i cal que es generin contínuament en la medul·la òssia. En humans representen el 60-70% dels leucòcits circulants mentre que en rosegadors corresponen al 20-30% (O'Connell *et al.*, 2015). Els neutròfils madurs circulants tenen un diàmetre mitjà de 7-12  $\mu\text{m}$  i el seu citoplasma s'enriqueix seqüencialment durant la maduració amb grànuls i vesícules secretores. Aquests grànuls estan plens d'enzims i proteïnes pro-inflamatòries i es poden classificar en tres grups: grànuls primaris que contenen mieloperoxidasa (MPO), defensines i elastasa. Grànuls específics secundaris que contenen lactoferrina, NADPH oxidases entre d'altres i finalment els grànuls terciaris, que contenen MMPs com la MMP9. Els neutròfils tenen la capacitat d'eliminar patògens per múltiples mecanismes i gràcies a una elevada producció d'espècies reactives d'oxigen. Quan aquests localitzen microorganismes (bacteris i fongs), els poden fagocitar i eliminar a través de la fusió dels grànuls esmentats anteriorment amb el fagosoma. També tenen la capacitat de provocar la mort dels microorganismes extracel·lulars alliberant el contingut dels grànuls cap a l'espai

## INTRODUCCIÓ

extracel·lular per un procés que s'anomena degranulació. El tercer mecanisme que tenen els neutròfils per eliminar els microorganismes extracel·lulars és mitjançant l'alliberació de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) formades per una estructura de DNA amb histones citrulinades i enzims (p.e. la MPO i l'elastasa)(Kolaczkowska and Kubes, 2013).

En ratolí, un bon marcador de neutròfils és l'anticòs dirigit contra Ly6G donat que l'anticòs anti-GR-1 àmpliament utilitzat per detectar neutròfils reconeix tant Ly6G com Ly6C que també s'expressa en monòcits.

Tradicionalment s'ha centrat molt l'atenció en el rol dels neutròfils en la isquèmia ja que poden provocar dany en els teixits perifèrics tal com s'ha descrit en la resposta a les infeccions (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

Un elevat recompte de neutròfils en sang de pacients d'ictus s'associa a volums d'infart més grans i un pitjor pronòstic (Buck *et al.*, 2008). En diferents treballs duts a terme en rata i ratolí s'ha observat que els neutròfils s'adhereixen a arterioles i vècules post capil·lars i contribueixen a la formació de coàguls (Nieswandt, Kleinschnitz and Stoll, 2011) i a fenòmens de no reperfusió i desestabilització de la BHE. Moltes evidències suggereixen que els neutròfils migren al focus de la inflamació atrets per les quimiocines secretades pels astròcits i cèl·lules endotelials (CXCL1, CXCL2 i CXCL8 que interactuen amb el receptor CXCR2) i s'acumulen en el parènquima cerebral entre 1 i 3 dies després de la isquèmia i reperfusió (Gelderblom *et al.*, 2009; Jaerve and Müller, 2012). A més a més, l'excessiva producció de ROS, l'alliberament de citocines pro-inflamatòries (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), de quimiocines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8), d'elastasa i MMPs (p.e. la MMP9) així com també l'augment en l'expressió de  $\beta$ 2 integrines en els leucòcits (Mac-1, LFA-1) i molècules d'adhesió (PSGL-1, L-selectina) provoca que els neutròfils infiltrants amplifiquin la resposta inflamatòria i promoguin un dany cerebral secundari (Jin, Yang and Li, 2010; Yang and Rosenberg, 2011).

Per altre banda, la producció de NETs a la llum dels vasos facilita la formació de coàguls tal i com s'ha demostrat tant en la trombosis de venes profundes com en l'embolisme pulmonar (Fuchs, Brill and Wagner, 2012). També, la trombòlisi mitjançada per tPA perd eficàcia en presència de NETs (Ducroux *et al.*, 2018). El tractament amb tPA podria accentuar els efectes negatius dels neutròfils ja que aquest fàrmac trombolític fomentaria la transmigració dels neutròfils al teixit reperfundit a través de l'activació de MMPs. De fet, aquests efectes ajudarien a explicar perquè la neutrofilia estaria associada a un major risc de transformació hemorràgica en pacients isquèmics tractats amb tPA (Uhl *et al.*, 2014; Maestrini *et al.*, 2015). Tot i que clàssicament el nombre de neutròfils presents en el teixit s'ha correlacionat amb la gravetat de la lesió isquèmica (Akopov, Simonian and Grigorian, 1996), es desconeix exactament la varietat de poblacions de neutròfils i els seus diferents fenotips que poden estar involucrats en el dany i/o reparació tissular secundària (Cuartero *et al.*, 2013; Kolaczkowska and Kubes, 2013).

No obstant això, en un estudi s'ha posat en dubte la capacitat dels neutròfils de produir NETs en la isquèmia cerebral i la capacitat d'assolir el parènquima cerebral en suficient nombre per tal de tenir una rellevància fisiopatològica ja que aquests romandrien atrapats en els espais perivasculars i no serien capaços de travessar la làmina basal del parènquima (Enzmann *et al.*, 2013).

### 3.5.2. Els monòcits

Els monòcits es caracteritzen morfològicament per tenir un nucli irregular i vesícules citoplasmàtiques. S'originen en el moll de l'os a partir de progenitors mieloides i surten cap a la sang on es poden mantenir en circulació durant 1-3 dies o bé migrar cap a diferents òrgans i establir-s'hi com a macròfags. En ratolí s'ha demostrat que els monòcits de la sang poden tornar al moll de l'os i que la melsa pot actuar com a reservori des de la qual es poden mobilitzar (Swirski *et al.*, 2009). En humans representen el 10% dels leucòcits circulants mentre que en ratolí representen el 4%. Sota condicions d'infecció i/o inflamació els monòcits poden fagocitar, produir citocines i migrar cap als teixits inflamats atrets pels gradients de citocines i quimiocines alliberades. Un cop reclutats a un teixit es diferencien cap a macròfags o cèl·lules dendrítiques i participen com a cèl·lules de defensa de la immunitat innata (destruint microorganismes i/o promovent la inflamació) i també en l'estimulació de la immunitat adaptativa i en la resolució i reparació tissular (Planas, 2018).

#### 3.5.2.1. Classificació dels monòcits en humans i ratolí

En humans els monòcits de la sang es classifiquen principalment segons l'expressió dels receptors de superfície CD14 (co-receptor de lipopolisacàrids), CD16 (Fc gamma RIII), els receptors de quimiocines CCR2 (receptor de CCL2 anomenada també MCP-1) i CX3CR1 (receptor de fractalquina) (Shi and Pamer, 2011). D'aquesta manera es poden distingir els monòcits clàssics, intermedis i no clàssics cadascun amb funcions diferents (**Taula 4**).

En ratolí també existeix una classificació similar en base a l'expressió de Ly6C, CD43, CD11b, CCR2, CX3CR1 i CD115 (Tsou *et al.*, 2007; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010) (Taula 4). En ambdós casos, existeixen evidències de que els monòcits clàssics immadurs maduren en circulació per donar lloc als no clàssics (Miró-Mur *et al.*, 2016).

**Taula 4:** Classificació dels monòcits humans i de ratolí. Adaptat de (Shi and Pamer, 2011).

	Marcadors		Receptors de quimiocines	Funcions
<b>HUMÀ</b>				
<b>Clàssics</b> 90-95% dels monòcits circulants	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>		CCR2 <sup>hi</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	Activitat fagocítica i baixa producció de citocines.
<b>Intermedis</b>	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>		CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>hi</sup>	Pro-inflamatoris. Produeixen activament IL-1 $\beta$ , IL6 i TNF $\alpha$ (en resposta a LPS)
<b>No clàssics</b> 5-10% dels monòcits circulants	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>		CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>hi</sup>	Antiinflamatoris, i antivirals i constantment patrullant
<b>RATOLÍ</b>				
<b>Clàssics</b> Ly6C <sup>hi</sup> 40% dels monòcits circulants	Ly6C <sup>hi</sup> CD43 <sup>low</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup>	CCR2 <sup>hi</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	Activitat antimicrobiana i pro-inflamatòria. Produeixen TNF $\alpha$
<b>No clàssics</b> Ly6C <sup>low</sup> 40% dels monòcits circulants	Ly6C <sup>low</sup> CD43 <sup>hi</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup>	CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>hi</sup>	Constantment patrullant, juguen un paper en el control de la resposta immune primerenca, la formació de nous vasos i la reparació tissular

*Llegenda: CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CX3CR1: fractalkine receptor, IL: interleukin, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ , LPS: Lipopolysaccharide.*

### 3.5.2.2. Resposta inflamatòria dels macròfags derivats de monòcits

Després de la isquèmia cerebral s'ha observat que els monòcits infiltraven en el teixit isquèmic en les primeres 24h i assoleixen un pic d'infiltració als 4 dies (Gelderblom *et al.*, 2009). Moltes d'aquestes cèl·lules poden sobreviure en el teixit durant setmanes i adopten característiques de macròfags. Clàssicament era molt difícil distingir la micròglia activada dels macròfags derivats de monòcits. Actualment, gràcies al descobriment de marcadors específics de micròglia, la utilització d'animals modificats genèticament amb expressió de proteïnes fluorescents en determinats tipus cel·lulars, la transferència adoptiva de cèl·lules, la generació d'animals quimèrics i la utilització de citometria de flux i immunofluorescència han permès diferenciar aquests dos tipus cel·lulars presents en el teixit isquèmic.

El fenotip dels macròfags activats depèn críticament dels estímuls de l'entorn. Clàssicament s'ha resumit la funció dels macròfags segons la presència de característiques fenotípiques d'activació clàssica tipus M1, o alternativa de tipus M2. Aquesta classificació conceptual i resumida s'ha obtingut en condicions de cultiu estimulants les cèl·lules amb diferents molècules. En un teixit inflammat existeix un ample ventall de fenotips intermedis que van des de l'extrem M1 fins al M2 i poden variar en el temps. Actualment no es coneix exactament tots els factors que contribueixen en aquesta transició fenotípica temporal (Biswas and Mantovani, 2012).

El fenotip clàssic pro-inflamatori M1 es caracteritza per l'expressió de diferents marcadors (p.e. CD16, CD32, CD86, MHC II i iNOS) (Fumagalli *et al.*, 2015). Aquest fenotip està associat per una banda a l'estimulació dels PRRs per la presència de DAMPS, a l'increment de la glicòlisi anaeròbica degut a les condicions d'hipòxia i a l'activació de la via HIF-1 (O'Neill, Kishton and Rathmell, 2016). A més a més es produeix el metabolisme de l'arginina a través de iNOS i es generen espècies reactives d'oxigen i de nitrogen que contribueixen en el dany de proteïnes, lípids i DNA. En conjunt, aquests factors promouen la producció de diferents citocines pro-inflamatòries que s'han anat comentat en apartats anteriors:

- **TNF $\alpha$** : La isquèmia cerebral induïx ràpidament l'expressió TNF $\alpha$  en diferents tipus cel·lulars. Pot ser expressada en neurones, cèl·lules vasculars cerebrals (Liu *et al.*, 1994), astròcits (Botchkina *et al.*, 1997), essent però la micròglia/macròfags activats els principals productors d'aquesta citocina en la isquèmia cerebral (Gregersen, Lambertsen and Finsen, 2000). El TNF $\alpha$  estimula la producció de IL-1 $\beta$ , IL-6 i també més TNF $\alpha$  augmentant d'aquesta manera la resposta inflamatòria (Yenari, Kauppinen and Swanson, 2010).
- **IL-1 $\beta$** : Els principals productors d'aquesta citocina en la isquèmia cerebral són la micròglia activada i els macròfags infiltrats. Existeixen altres tipus cel·lulars que la produeixen com les neurones, astròcits i cèl·lules endotelials (Clausen *et al.*, 2008). Aquesta citocina pirogènica contribueix en la producció de més citocines pro-inflamatòries, agreuja el dany neuronal i potencia l'expressió de molècules d'adhesió en l'endoteli vascular que participaran en la infiltració leucocitària.

Per altra banda, l'activació alternativa o fenotip M2 està relacionat en l'atenuació de la resposta inflamatòria i la reparació tissular i es detallarà en els següents apartats.

### 3.5.2.3. Senyals implicats en la migració leucocitària: Eix CCL2/CCR2

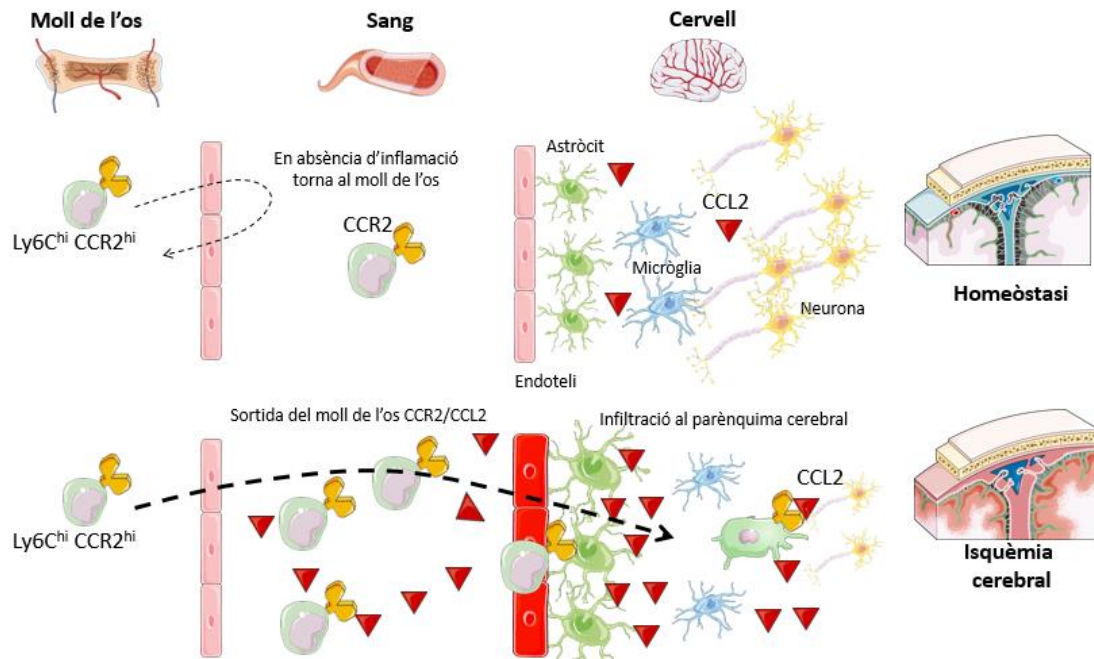
Les quimiocines són els mediadors moleculars principals responsables del reclutament de leucòcits en un teixit inflammat. Son polipèptids petits (8-14 kDa) que s'alliberen en grans quantitats en la isquèmia cerebral. Els principals productors són les cèl·lules residents en el teixit afectat com la micròglia, les cèl·lules endotelials activades, les neurones, astròcits i també els leucòcits reclutats. Es classifiquen en quatre subfamílies: CXC, CC, XC i CX<sub>3</sub>C. Tal i com s'ha mencionat, els neutròfils són atrets principalment per les quimiocines de la família CXC (CXCL1, CXCL2 i CXCL8) secretades principalment per astròcits i en menys proporció per les cèl·lules endotelials activades. En canvi, els monòcits són atrets principalment per les quimiocines de la família CC (CCL2 i CCL3) quan expressen el receptor CCR2 (Jaerve and Müller, 2012).

En condicions d'homeòstasi existeix una expressió basal de CCL2 en astròcits, micròglia, cèl·lules endotelials i neurones així com també del seu receptor (CCR2). En la isquèmia cerebral CCL2 s'expressa ràpidament en astròcits activats (Weiss *et al.*, 1998), micròglia activada (Yan *et al.*, 2007), neurones (Che *et al.*, 2001), cèl·lules endotelials (Rollins *et al.*, 1990) i en els perícits (Duan *et al.*, 2018). S'ha observat que la predisposició genètica de mantenir uns nivells elevats de CCL2 en circulació correlacionen positivament amb un major risc de patir un ictus (Georgakis *et al.*, 2019). A més a més, en mostres de sang de pacients isquèmics s'ha observat la presència elevada de CCL2 en les primeres hores des de l'inici dels símptomes (Worthmann *et al.*, 2010).

En ratolí, durant les primeres hores després de la isquèmia els monòcits pro-inflamatoris Ly6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> s'alliberen ràpidament del moll de l'os i de la melsa cap a la sang i són reclutats al teixit isquèmic atrets pel gradient de CCL2 (Miró-Mur *et al.*, 2016) (**Figura 21**). Clàssicament s'ha associat els macròfags infiltrants amb la inflamació i el dany cerebral després de la isquèmia. De fet, en estudis histopatològics amb mostres de diferents pacients que havien patit un ictus isquèmic es mostra que els macròfags presenten un fenotip pro-inflamatoris i a mesura que progressa el temps i la lesió madura, esdevenen antiinflamatoris (Zrzavy *et al.*, 2018).



## INTRODUCCIÓ



**Figura 21.** Representació de la producció de CCL2 en condicions d'homeòstasi i en la isquèmia cerebral i el reclutament de monòcits  $CCR2^{hi}$ . Suport gràfic adaptat de (Shi and Pamer, 2011).

*Llegenda: CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CCL2: C-C motif chemokine ligand 2*

Actualment no es coneix exactament la funció dels monòcits en l'ictus isquèmic, és per aquest motiu que s'ha utilitzat diferents aproximacions en models animals. S'ha observat que els ratolins deficients en  $CCR2$  presenten un volum d'infart reduït i una funció neurològica millorada en comparació amb els respectius ratolins silvestres (Dimitrijevic *et al.*, 2007), suggerint un paper perjudicial del monòcit  $CCR2^{+}$  en la lesió cerebral. De manera oposada s'ha observat que l'administració d'inhibidors de  $CCR2$  o anticossos bloquejadors de  $CCR2$  provoquen un empitjorament de la lesió cerebral, impedeixen la recuperació funcional espontània tant en models animals d'isquèmia cerebral com de lesió de la medulla espinal i promouen la transformació hemorràgica després de la lesió isquèmica (Gliem *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2015; Wattananit *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2018). També s'ha observat que, un augment de l'expressió de marcadors fenotípics M1 associat a un model de depleció de monòcits/macròfags, es produeix un empitjorament de la lesió isquèmica (Perego *et al.*, 2016). Conjuntament amb els darrers resultats, s'ha suggerit que els monòcits tenen un paper neuroprotector beneficiós a través de la modulació de la resposta inflamatòria de la microglia (Greenhalgh *et al.*, 2018).

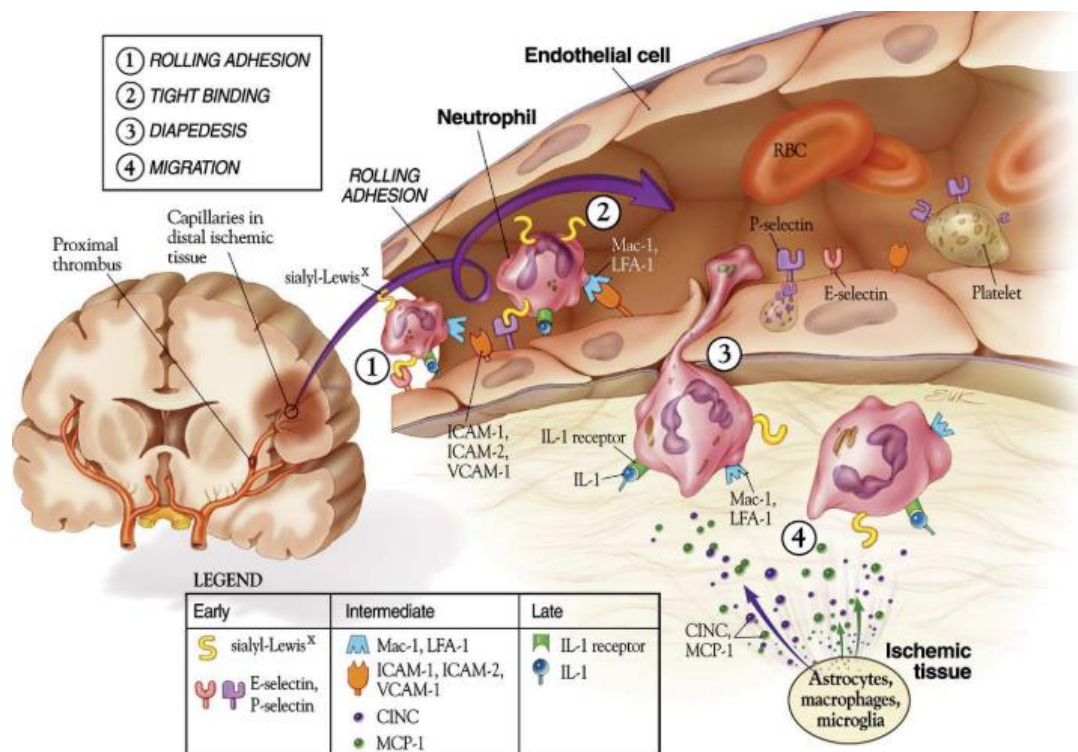
Per entendre la funció dels monòcits  $CCR2^{+}$  en la isquèmia cerebral; els estudis esmentats que afecten la funció global de  $CCR2$  tenen la limitació de que  $CCR2$  no només s'expressa en monòcits sinó que hi ha diferents poblacions de limfòcits (Brühl *et al.*, 2004) i cèl·lules endotelials (Wolf *et al.*, 2012), entre d'altres, que també expressen el receptor  $CCR2$ .

### 3.5.3. Vies d'infiltració de leucòcits al cervell

La integritat de les barreres que separen el cervell de la sang i de les cèl·lules immunes efectores és important pel manteniment adequat d'un bon funcionament del SNC. Tal i com s'ha anat comentant, la isquèmia cerebral està estrictament lligada a la desestabilització de la BHE i la infiltració de leucòcits al cervell. Fins al moment, s'han descrit tres rutes de migració dels leucòcits de la sang cap al parènquima cerebral afectat.

#### 3.5.3.1. Vènules post-capil·lars

Els diferents esdeveniments de la cascada isquèmica promouen l'alliberació de citocines i quimiocines que atreuen els leucòcits al focus de la inflamació (**Figura 22**). L'activació i expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials de les vènules post-capil·lars i la disrupció de la BHE promouen que els leucòcits circulants rodin i s'adhereixin a la superfície del vas i acabin migrant al teixit isquèmic a través de les cèl·lules endotelials per la via paracel·lular o transcel·lular per un procés que s'anomena diapedesi (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006).



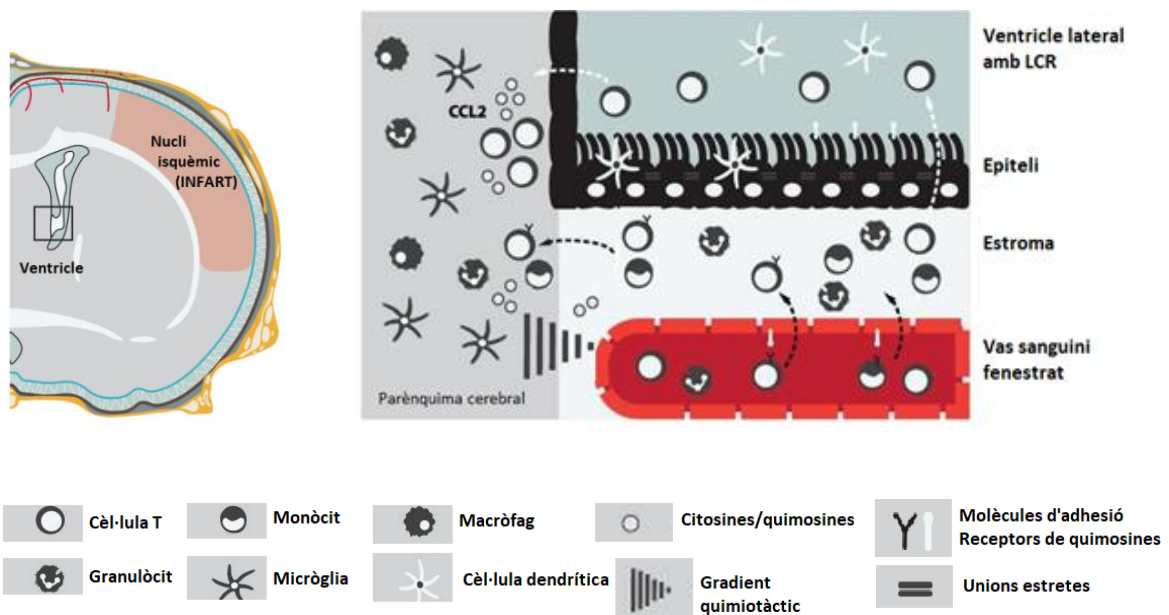
**Figura 22.** Esdeveniments que promouen la migració dels leucòcits circulants en les vènules post-capil·lars en resposta a la isquèmia cerebral. Suport gràfic extret de (Huang, Upadhyay and Tamargo, 2006).

*Llegenda; RBC: red blood cell, Mac-1: macrophage-1 antigen, LFA-1: leukocyte function-associated antigen-1, ICAM: intercellular adhesion molecule, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1, IL: interleukin, CINC: cytokine-induced neutrophil chemoattractant, MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1.*





Els capil·lars que es troben a la base de les cèl·lules epitelials del PC son permeables a molècules i cèl·lules immunes ja que presenten fenestracions. Per aquest motiu, la zona del estroma, s'hi poden trobar diferents cèl·lules immunes com limfòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques (Ransohoff and Engelhardt, 2012). En diferents patologies neuro-inflamatòries com el dany cerebral traumàtic i la isquèmia cerebral, entre d'altres, els PCs tenen la capacitat de respondre als diferents mediadors pro-inflamatoris alliberats per les cèl·lules del parènquima cerebral, expressar molècules d'adhesió, i alliberar quimiocines que permeten l'entrada de cèl·lules immunes a l'estroma a través dels capil·lars fenestrats (Benakis, Llovera and Liesz, 2018; Ghersi-Egea *et al.*, 2018). Concretament s'ha observat que els limfòcits T utilitzen aquesta via d'infiltració (Llovera *et al.*, 2017) tot i que també s'ha observat que els macròfags derivats de monòcits amb un fenotip d'activació alternativa (M2) poden utilitzar-la i promouen la recuperació funcional en un model d'isquèmia cerebral experimental (Ge *et al.*, 2017). Tant en mostres de pacients com en models animals d'isquèmia cerebral en ratolí s'ha observat un augment de la quimiocina CCL2 en la regió ventricular corresponent a l'hemisferi isquèmic que estaria relacionat amb l'atracció d'aquestes cèl·lules cap al teixit lesionat (Benakis, Llovera and Liesz, 2018) (**Figura 24**).



**Figura 24.** Rutes d'infiltració leucocitària en els plexes coroides després de la isquèmia cerebral. Suport gràfic adaptat de (Benakis, Llovera and Liesz, 2018).

*Llegenda; CCL2: C-C Motif Chemokine Ligand 2, LCR: líquid cefaloraquídi.*

Una millor comprensió de les diferents estructures anatòmiques així com les diferents rutes d'infiltració i la funció dels diferents leucòcits infiltrants podria ajudar a explicar els motius pels quals molts assajos clínics destinats a prevenir els efectes negatius dels leucòcits així com el bloqueig i la migració d'aquests després de la isquèmia han fracassat (Planas, 2018).

### 4. REPARACIÓ TISSULAR

De la mateixa manera que en la resposta inflamatòria es produeixen una sèrie d'esdeveniments ben definits, en la resolució de la inflamació també estarien participant un sèrie d'esdeveniments ben orquestrats que es podrien resumir en: l'eliminació de cèl·lules mortes, el desenvolupament d'un ambient antiinflamatori i la producció de factors de supervivència i regeneració tissulars. Diferents evidències han posat de manifest la importància de la polarització dels macròfags cap a un fenotip M2 en la resolució de les lesions tissulars (Lucas *et al.*, 2010; Wynn and Vannella, 2016) així com la seva implicació en promoure un ambient favorable per la progressió tumoral (Mantovani and Locati, 2013). A mesura que ha avançat el coneixement del paper dels macròfags en la resolució tissular s'han posat de manifest diferents esdeveniments rellevants que es poden resumir en els següents punts (Biswas and Mantovani, 2014):

- Importància del reclutament dels macròfags al teixit lesionat a través de la senyalització CCL2/CCR2.
- Activació de les vies de senyalització NFκB i HIF-1α per promoure la secreció de mediadors inflamatoris, antiinflamatoris i factors de creixement que estimularan la proliferació i supervivència de les cèl·lules endotelials.
- Eliminació de les cèl·lules mortes i restes cel·lulars.
- Polarització fenotípica dels macròfags a mesura que progressa la resolució tissular d'un fenotip pro-inflamatori M1 a un fenotip pro-resolutiu M2 .
- Expressió i secreció de proteases que permetran la remodelació de la MEC i el creixement dels nous vasos.
- Promoure la supervivència i migració de les cèl·lules endotelials i permetre la revascularització tissular gràcies al contacte directe amb els macròfags.

#### 4.1. La polarització fenotípica dels macròfags

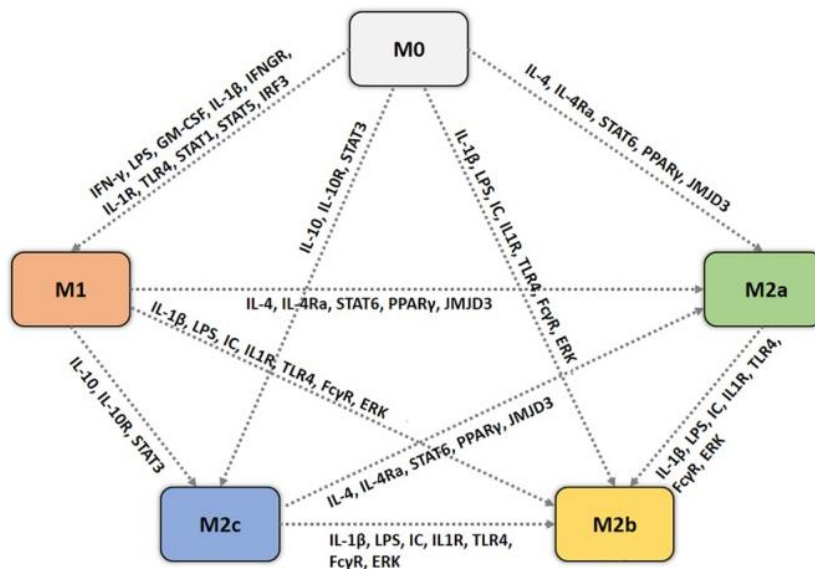
Tant la micròglia activada com els macròfags infiltrants, a part d'un fenotip pro-inflamatori "M1" esmentat anteriorment poden mostrar una activació alternativa o fenotip "M2". Funcionalment, el fenotip M2 participa en l'atenuació de la resposta inflamatòria, en l'augment de la capacitat fagocítica i en l'alliberació de factors tròfics que faciliten la remodelació i regeneració tissular. Existeix una àmplia varietat de marcadors que són característics del fenotip M2. Els mes importants es resumeixen en la **Taula 5**:

**Taula 5:** Resum de marcadors M2 i la seva funció

Marcador M2	Funció
<b>Arginasa 1 (Arg1)</b>	Converteix la L-arginina en prolines i poliamines implicades en la remodelació i regeneració tissular. Aquest enzim competeix pel mateix substrat que l'iNOS (marcador específic del fenotip M1) però amb major afinitat (Muraille, Leo and Moser, 2014).
<b>Ym1 (Chi3l3)</b>	És una lectina secretora que s'uneix a disacàrids sulfatats amb la finalitat d'evitar la degradació dels components de la MEC (Hung <i>et al.</i> , 2002).
<b>FIZZ1 (Retn1b)</b>	Media les interaccions entre els nervis sensitius i les cèl·lules inflamatòries dels pulmons. Bloqueja la supervivència induïda pel factor de creixement nerviós de les neurones del gangli raquidi dorsal (Raes <i>et al.</i> , 2002).
<b>Receptor de mannosa (CD206)</b>	Aquest receptor participa en la unió i en la internalització/fagocitosis de lligands glicosilats amb mannosa. Alguns d'aquests lligands es trobarien en medi extracel·lular d'un teixit danyat (p.e. hidrolases lisosomals, l'activador del plasminogen tissular, mieloperoxidasa entre d'altres) (Durafour <i>et al.</i> , 2012).
<b>CD163</b>	Està involucrat en la neteja i l'endocitosis de complexos d'hemoglobina/haptoglobina i participa en la protecció dels teixits de l'estrès oxidatiu mediat per l'hemoglobina lliure (Van Gorp, Delputte and Nauwynck, 2010).
<b>TREM2</b>	Està involucrat en la neteja de restes cel·lulars, suprimeix la inflamació i participa en la transició del fenotip M1 al M2 en la microglia (Wang <i>et al.</i> , 2015; Zhang <i>et al.</i> , 2018).

Llegenda; iNOS: Inducible nitric oxide synthase, MEC: matriu extracel·lular.

En diferents treballs es proposa l'existència de diferents fenotips dins el perfil general M2 (Mantovani *et al.*, 2004). Aquesta varietat fenotípica és deguda principalment a l'estimulació d'aquestes cèl·lules per diferents senyals presents en el micro-ambient (**Figura 25**).



**Figura 25.** Resum esquemàtic dels estímuls que promouen la transició fenotípica dels macròfags. Suport gràfic obtingut de (Palma *et al.*, 2018).

Llegenda; INF $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , LPS: lipopolysaccharide, GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL: interleukin, R: receptor, IFNGR: interferon-gamma receptor, TLR4: Toll-like receptor 4, STAT: signal transducer and activator of transcription proteins, IRF3: Interferon regulatory factor 3, IC: immune complexes, Fc $\gamma$ R: Fc gamma receptor, ERK: extracellular signal-regulated kinase, PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma, JMJD3: Jumoni domain-containing protein D3.

## INTRODUCCIÓ

A part de transició fenotípica mitjançada pels diferents factors esmentats en la **Figura 25**. S'ha descrit que la glicòlisi anaeròbica en condicions d'hipòxia és el mecanisme utilitzat pels macròfags M1 per obtenir energia i dur a terme una resposta inflamatòria ràpidament. Per contra, en les funcions de remodelació tissular i reparació de ferides per parts dels macròfags tipus M2 és necessari obtenir energia de forma continuada a partir de l'oxidació dels àcids grassos (O'Neill, Kishton and Rathmell, 2016).

Globalment els diferents fenotips M2 es caracteritzen per contribuir de forma complementària en l'atenuació de la resposta inflamatòria tot i tenir diferents funcions i expressar diferents marcadors (**Taula 6**).

**Taula 6:** Resum del perfil fenotípic dels diferents subtipus de macròfags descrits en la literatura. Suport gràfic adaptat de (Biswas and Mantovani, 2010; Palma *et al.*, 2018).

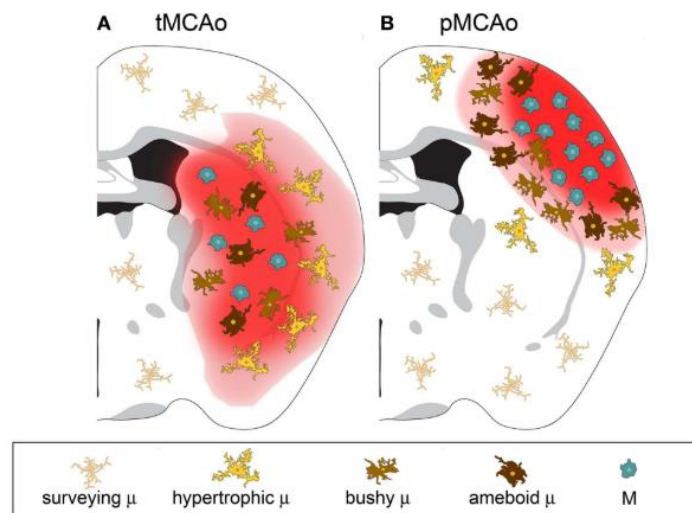
Subtipus de Macròfags	M1	M2A	M2B	M2C
<b>Citocines</b>	IL-1, 6, 10, 18, 23, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$	IL-10, 12, 23, 1Ra	IL-6, 10, 12, 23, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$	IL-10, 12, 23, TGF $\beta$
<b>Quimocines (CC)</b>	CCL-2, 3, 4, 5, 11, 17, 22	CCL-17,18, 22, 24	CCL-1	CCL-16, 18
<b>Quimocines (CXC)</b>	CXCL-1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16	-	-	CXCL-13
<b>Receptors Scavenger</b>	-	MR (CD206)	-	MR (CD206), CD163
<b>Metabolisme</b>	iNOS	FIZZ-1, Ym-1, Arginasa	iNOS	Arginasa
<b>Funció específica</b>	Acció inflamatòria Dany tissular Regulació de cèl·lules Th1	Acció anti-inflamatòria Producció de productes metabòlics derivats de l'arginina Reparació tissular Reclutament de cèl·lules Th2	Immunitat humoral Regulació de les cèl·lules Th2	Acció anti-inflamatòria Immunoregulació Activitat fagocítica i de neteja Reparació i remodelació tissular

*Llegenda; IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, MR: mannose receptor, iNOS: inducible nitric oxide synthase, Th: lymphocyte T helper.*

### 4.1.1. La polarització fenotípica en la isquèmia cerebral

Durant molts anys s'ha considerat que el SNC tenia una limitada capacitat de regeneració. Malgrat tot, aquesta visió ha canviat en els darrers anys després d'observar que en el cervell adult s'hi desencadenen processos de recuperació després d'una lesió (Lo, 2010).

La polarització fenotípica té un paper rellevant en la progressió d'una lesió isquèmica, concretament s'ha observat que tant la micròglia com els macròfags són les principals poblacions cel·lulars encarregades de dirigir la reparació i regeneració en malalties agudes del SNC (Hu *et al.*, 2015). En models experimentals d'isquèmia cerebral s'ha descrit que en la fase aguda tant la micròglia com els macròfags infiltrants es distribueixen regionalment en el teixit lesionat segons la seva capacitat de sobreviure i adaptar-se metabòlicament a un ambient desfavorable i adopten un fenotip M2 que afavoreix la limitació del dany cerebral i la reparació del teixit lesionat (**Figura 26**) (Hu *et al.*, 2012; Fumagalli *et al.*, 2015).



**Figura 26.** Distribució regional de la micròglia i dels macròfags infiltrats en diferents models d'isquèmia cerebral.

*Llegenda:* tMCAo: transient middle cerebral artery occlusion, pMCAo: permanent middle cerebral artery occlusion.  $\mu$ : microglia, M: macrophage.

En condicions *in vitro* s'ha observat que la micròglia M2 és més protectora que els macròfags M2 (Durafourt *et al.*, 2012) i que la interacció entre aquestes cèl·lules és important per modular la resposta antiinflamatòria (Greenhalgh *et al.*, 2018). Malgrat tot, (Hu *et al.*, 2012) proposen que una setmana després del dany les cèl·lules amb un fenotip M1 predominen en el focus de la lesió. A diferència de la transició fenotípica M2-M1 que aquests autors proposen, la resolució i regeneració d'altres teixits es produeix seguint una transició M1-M2. Sembla ser que la proposada transició del fenotip M2-M1 seria un mecanisme comú observable en diferents models de lesions del SNC (p.e. en l'ictus, dany cerebral traumàtic i lesions medul·lars) (Hu *et al.*, 2015), però aquest concepte s'ha de validar. A més a més, no es coneixen els motius exactes que estarien afavorint aquesta hipotètica transició M2-M1 en el SNC.

#### 4.2. Paper del fenotip M2 en la reparació del SNC

Els macròfags i micròglia M2 atenuen la resposta inflamatòria fagocitant cèl·lules mortes i diferents components pro-inflamatoris presents en el teixit. La fagocitosis de cèl·lules mortes promou la producció de les citocines TGF $\beta$  i IL-10 que faciliten la reparació tissular a través d'efectes directes sobre la supervivència cel·lular, la supressió de la presentació antigènica, la generació de cèl·lules Treg, la inhibició de l'expressió de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials i la inhibició de la síntesi de citocines pro-inflamatòries com TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Iadecola and Anrather, 2011). Globalment la micròglia i macròfags amb un fenotip M2 participen en la reparació del SNC promovent la proliferació de precursors neurals, facilitant la plasticitat sinàptica i afavorint la seva integració en circuits neuronals ja existents. També estarien participant en la regeneració axonal i en el seu creixement així com també en la seva remielinització gràcies a l'alliberament de factors de creixement (p.e. IGF-1, TGF $\beta$ , Activin-A) que estimulen la diferenciació dels precursors d'oligodendròcits a cèl·lules madures. Finalment també estarien promovent la formació de nous vasos per tal de restablir el suport nutricional del teixit afectat (Hu *et al.*, 2015).

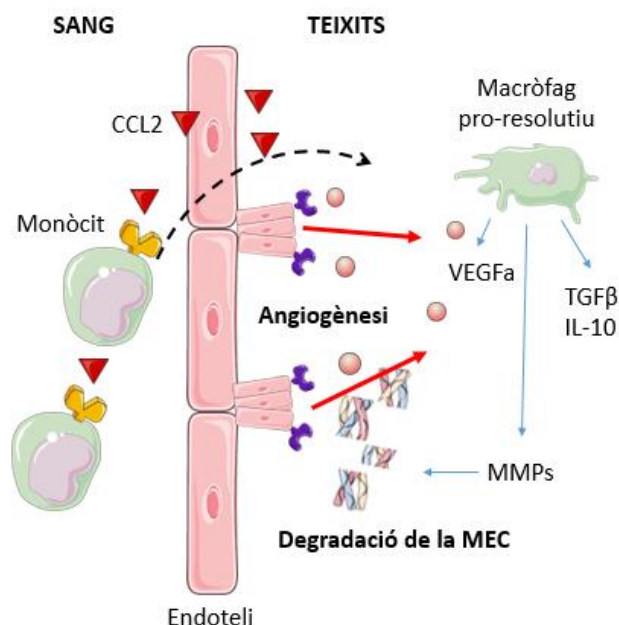


#### 4.2.1. Paper dels macròfags en l'angiogènesi

L'angiogènesi es el procés pel qual es formen nous vasos a partir d'un vas preexistent. Aquest procés és imprescindible en el desenvolupament i també és molt important en la curació i la regeneració d'òrgans i teixits.

En l'estudi de diferents patologies com el càncer, arteriosclerosi i en ferides de la pell s'han reconegut els macròfags com a principals reguladors de l'angiogènesi (Murdoch *et al.*, 2008; Okuno *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018). S'ha posat de manifest que l'atracció de monòcits cap als focus d'inflamació a partir de la via de senyalització CCL2/CCR2 és un procés clau per la regeneració tissular (Nucera, Biziato and de Palma, 2011). A mes a mes s'ha observat una reducció en la formació de vasos quan es provoca la depleció de cèl·lules mieloides en la fase d'inflamació aguda (Lucas *et al.*, 2010). En conjunt aquests resultats suggereixen que els macròfags són ja importants en la fase pro-inflamatòria i que la seva transició a un fenotip antiinflamatori estaria involucrat amb les funcions angiogèniques.

En condicions d'hipòxia, com en una oclusió arterial o bé en tumors, es produeix l'activació de la via HIF-1 $\alpha$ . Tal i com s'ha comentat en l'apartat 3.2.3 d'aquesta mateixa introducció, l'activació d'aquesta via en la fase aguda de la isquèmia cerebral participa en la resposta pro-inflamatòria, però molts dels productes resultants tenen una funció dual a mesura que progressa la lesió. Concretament l'alliberació del factor pro-angiogènic VEGFa promou la supervivència de les cèl·lules endotelials i n'estimula la seva proliferació (Shibuya, 2011). Les MMPs presents en el teixit participen en la remodelació de la MEC i es facilita la migració de les cèl·lules endotelials per tal de formar la nova xarxa vascular (Du et al. 2008) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Rol dels macròfags en l'angiogènesi. Suport gràfic adaptat de (Garg *et al.*, 2009).

Llegenda; CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2, VEGF: Vascular endothelial growth factor, IL: interleukin, TGF: transforming growth factor, MMP: matrix metalloproteinases, MEC: extracellular matrix.

## **HIPÒTESI i OBJECTIUS**





## **HIPÒTESI:**

Les cèl·lules mieloides circulants migren al cervell isquèmic per diferents vies anatòmiques i tenen un paper dual induint inflamació en la fase aguda i promovent reparació tissular en fases subagudes i cròniques.

## **OBJECTIUS:**

L'objectiu general d'aquesta tesi és esbrinar mecanismes implicats en la infiltració de leucòcits de tipus mioide (neutròfils i monòcits/macròfags) al cervell isquèmic i el seu paper en la lesió cerebral.

Els objectius específics es detallen a continuació:

### **1. Identificar les vies d'infiltració de neutròfils al cervell isquèmic**

Tal com s'ha descrit a la introducció, en el moment d'iniciar aquesta tesi no es coneixien del tot les vies d'infiltració dels neutròfils al cervell isquèmic i a més a més hi havia una certa controvèrsia sobre si els neutròfils accedien al parènquima lesionat. Per aquest motiu vam decidir estudiar si els neutròfils podien accedir al parènquima cerebral i quines eren les vies anatòmiques d'accés. Per aquest estudi vam triar un model experimental d'isquèmia permanent sense reperfusió. L'elecció d'aquest model es deu a que volíem saber si i com els neutròfils accedien al nucli isquèmic en absència de flux sanguini. Vam triar el model de ratolí perquè és un model ben establert al nostre laboratori i es disposa de marcadors específics pels neutròfils murins.

### **2. Esbrinar el paper dels macròfags perivasculars residents al cervell en la infiltració leucocitària després de la isquèmia cerebral**

Els espais perivasculars contenen macròfags residents que podrien generar molècules quimioattractants de neutròfils després de la isquèmia cerebral. Malgrat tot, el paper d'aquestes cèl·lules en condicions patològiques és encara força desconegut. Per aquests motius vam voler estudiar la funció d'aquests macròfags en la isquèmia cerebral. Una consideració important a l'hora de decidir el model experimental més adient per aquest estudi va ser l'existència de marcadors específics de macròfags perivasculars. CD163 és una molècula de membrana que en el cervell humà i de rata només s'expressa en macròfags perivasculars i per tant és un bon marcador d'aquestes cèl·lules. No obstant això, CD163 no s'expressa (o té nivells baixos d'expressió) en els macròfags perivasculars de ratolí. Per aquest motiu vam decidir dur a terme aquest estudi en un model d'isquèmia cerebral en rata. Vam escollir un model d'isquèmia/reperfusió ja que tant la isquèmia permanent en rata en un model amb craniotomia com la isquèmia cerebral permanent per la via intraluminal són models molt invasius i de molta gravetat respectivament.

### **3. Esbrinar la funció dels macròfags infiltrants en la lesió isquèmica**

La lesió cerebral atreu els monòcits circulants que una vegada infiltrats al cervell maduren a macròfags tissulars. Com hem vist en la introducció, l'eix CCL2/CCR2 és una via de senyalització important per l'atracció de monòcits als teixits lesionats. Tot i això, no només els monòcits expressen CCR2 sinó que altres cèl·lules també expressen aquest receptor. Per tal d'estudiar la funció específica dels monòcits CCR2<sup>+</sup> vam generar un model murí de deleció de CCR2 en els monòcits. Aquesta condició ens obligava a realitzar l'estudi en ratolí i vam triar el model d'isquèmia permanent distal de l'ACM perquè la seva gravetat és moderada i permet fer estudis a llarg termini.

## **MÈTODES**



A continuació es resumeixen les diferents tècniques i metodologies emprades en el present treball de tesi doctoral. Al tractar-se d'un treball de tesi doctoral en format de compendi de publicacions, el lector trobarà els detalls i les especificacions tècniques concretes en el corresponent apartat de cada treball publicat.

## **1. MODELS ANIMALS D'ISQUÈMIA CEREBRAL**

Tots els procediments experimentals que implicaven animals d'experimentació es van dur a terme sota l'aprovació del comitè ètic de la Universitat de Barcelona (nº CEEA: 405/14, 558/16, 367/17, 146/18 i nº DAMM: 6421, 9300, 9806, 10083 respectivament) i en compliment amb les normes de legislació local, espanyoles i europees. Els animals es van mantenir estabulats en un cicle de 12h llum i 12h de foscor amb lliure accés a la beguda i al menjar.

En el present treball de tesi doctoral es van utilitzar ratolins Balb/c, ratolins modificats genèticament amb fons genètic C57BL6/J així com també rates Sprague-Dawley.

### **1.1 Models d'isquèmia cerebral en ratolí**

#### **1.1.1 Oclusió permanent de l'artèria cerebral mitja en la seva porció distal**

Es va realitzar una petita incisió entre l'orella i l'ull, es va retallar parcialment la part inferior del múscul temporal i es va exposar la superfície temporal del crani. A continuació es va perforar una petita finestra de 1 mm de diàmetre al crani, just sobre l'ACM. Tot seguit es va retirar una petita part de les meninges i es va procedir en la cauterització de l'ACM (**Figura 7**). En un petit grup d'animals Balb/c, amb la finalitat d'excloure els efectes inflamatoris potencialment induïts per l'escalfor del cauteritzador elèctric, l'esmentada porció arterial es va ocloure mitjançant un lligament amb una sutura de seda quirúrgica.

Un cop acabada la cirurgia, es va suturar l'animal i es va col·locar en una gàbia de recuperació amb una font de calor (manta elèctrica) abans de ser estabulat en una gàbia amb lliure accés al menjar i aigua on va restar fins al moment de la finalització de l'experiment.

#### **1.1.2 Oclusió intraluminal permanent de l'artèria cerebral mitja proximal**

El procediment quirúrgic es va iniciar col·locant una sonda làser Doppler al crani del ratolí per registrar la perfusió cortical del territori irrigat per l'ACM. Tot seguit es va realitzar una incisió al coll i es va accedir al territori de l'ACC dreta per tal de cauteritzar l'arteria tiroïdal i occipital. Tot seguit es va lligar un nus a l'ACC amb una sutura de seda i es va introduir un filament de niló amb la punta arrodonida per l'interior de l'ACI fins al l'origen de l'ACM fins al moment de la finalització de l'experiment (**Figura 8A**).

En acabar el procediment quirúrgic, es va suturar l'animal i es va col·locar en una gàbia de recuperació tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior.

### 1.2 Model d'isquèmia cerebral en rata

#### 1.2.1 Oclusió transitòria intraluminal de l'artèria cerebral mitja proximal

El procediment quirúrgic es va iniciar col·locant una sonda làser Doppler al crani de la rata per registrar la perfusió cortical del territori abastit per l'ACM. Tot seguit es va realitzar una incisió al coll i es va accedir al territori de l'ACC dreta. Es va cauteritzar l'artèria occipital i l'arteria tiroide superior i es va lligar un nus a l'artèria pterigopalatina. Tot seguit es va lligar un nus a l'ACC amb una sutura de seda i es va introduir un filament de niló amb la punta arrodonida per l'interior de l'ACI fins al l'origen de l'ACM. Per tal d'evitar una compensació de la circulació contralateral i d'unificar els volums d'infart es va col·locar un pinça a l'ACC contralateral. Transcorreguts 50 minuts des de l'inici de l'oclusió, es va treure la pinça de l'ACC contralateral. Deu minuts mes tard, es va retirar suaument del filament que oclia l'ACM. Finalment, es va deslligar la sutura de l'ACC ipsilateral, es va deixar sortir una mica de sang per assegurar que no hi havia cap coàgul i finalment es va cauteritzar l'ACE per tal d'evitar que sortís sang pel punt d'accés del filament (**Figura 8B**).

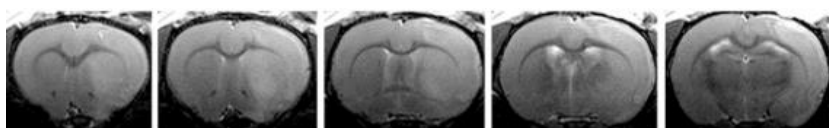
En finalitzar la cirurgia es va desenganxar el làser Doppler, es va suturar la ferida del coll i la del cap i es va col·locar l'animal en una caixa de recuperació amb una manta tèrmica.

## 2. AVALUACIÓ DEL VOLUM D'INFART PER IMATGE DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA

Les mesures del volum d'infart es van realitzar amb ImageJ a partir de les imatges obtingudes a la ressonància magnètica de la Plataforma de Ressonància Magnètica experimental de l'IDIBAPS. Es va utilitzar un escàner d'animals 7.0T BioSpec 70/30 horitzontal (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemanya) equipat amb una antena de superfície per cervell de rata o ratolí en funció de l'espècie d'animal utilitzada.

Durant el procediment d'adquisició d'imatges l'animal es va mantenir sota anestèsia inhalada amb isofluorà i fixat per les orelles i les dents per tal d'evitar que es produïssin interferències en l'adquisició de les imatges degut a la respiració dels animals. En tot moment es va monitoritzar la respiració i es va mantenir la temperatura corporal a 37°C.

En rates es van adquirir mapes de relaxometria T2 utilitzant una seqüència *echo* multi tall amb 25 temps *echo* de 8 a 200 ms. El temps de repetició va ser de 4000 ms. Es van obtenir 18 talls de 1 mm de gruix amb una resolució espacial de 0.156 mm<sup>2</sup>/píxel. Les imatges es van reconstruir amb el programa Paravision 5.1 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemanya), veure **Figura 28**.

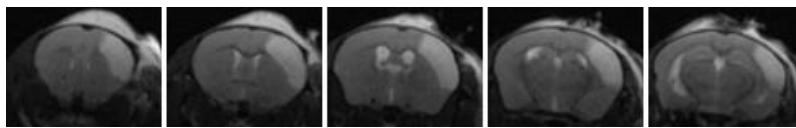


**Figura 28:** Seccions coronals obtingudes mitjançant mapes de relaxometria T2 per avaluar el volum d'infart cerebral en rata.

Es va mesurar l'àrea de l'hemisferi contralateral (HC), la regió infartada (RI) i finalment l'hemisferi ipsilateral no infartat (HINI). El volum final es va obtenir realitzant una correcció per edema i excloent els ventricles seguint la fórmula que es detalla a continuació:

$$\text{Volum infart (VI) (mm}^3\text{)} = RI \times \left( \frac{HC}{RI+HINI} \right) \qquad \text{Volum infart (\%)} = \frac{VI}{RI+HINI}$$

En ratolí, després d'optimitzar les seqüències d'adquisició, es van obtenir imatges potenciades en T2 utilitzant únicament un temps *echo* de 33 ms. Veure **Figura 29**. El temps de repeticó va ser de 2336 ms. Es van obtenir 22 talls de 0,5mm de gruix amb una resolució espacial de 0.078. mm<sup>2</sup>/píxel. Les imatges es van reconstruir amb el programa Paravision 6.1 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemanya). El volum d'infart es va calcular utilitzant la metodologia descrita en el treball de (Gerriets *et al.*, 2004).



**Figura 29:** Seccions coronals obtingudes mitjançant imatges potenciades en T2 per avaluar el volum d'infart cerebral en ratolí.

### 3. VALORACIÓ NEUROLÒGICA

#### 3.1 Valoració neurològica en rata

Transcorregudes 24h de la reperfusió es va sotmetre els animals a un test neurològic senzill (Pérez-Asensio *et al.*, 2010) basat en una escala de 9 punts (on 0=no hi ha dèficit i 9=màxima afectació) que es llista a continuació:

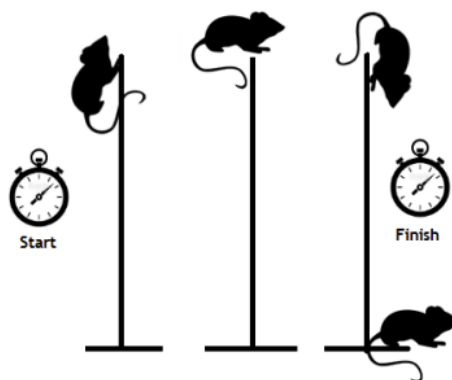
- **Activitat espontània:** Valoració de la capacitat de desplaçament i exploració. S'atribueix una puntuació de 0 si és normal, de 1 si fa desplaçament sense exploració i de 2 si realitza un desplaçament només si s'estimula o no es desplaça en absolut.
- **Tendència a girar cap a l'esquerra:** Com que l'hemisferi dret es troba afectat, esperem trobar canvis en la regió contra lateral de la lesió en la resta del cos. Si no té una tendència a desplaçar-se cap a l'esquerra té una puntuació de 0. Si a l'aixecar l'animal per la base de la cua deriva cap a l'esquerra té una puntuació de 1. Si gira espontàniament a l'esquerra de 2 i finalment, si fa girs sobre si mateixa de 3.
- **Avaluació propioceptiva de l'extremitat anterior esquerra:** Es va mesurar la capacitat de l'animal en percebre que l'experimentador li subjectava l'extremitat anterior i també la capacitat d'enretirar-la després de la subjecció. Si l'animal no permet que se li agafi la pota rep un valor de 0, si ho permet però amb residència té una puntuació de 1. Si no oposa resistència ni aparta la pota rep una puntuació de 2.
- **Reacció a la caiguda:** L'animal s'aixeca per la cua i es valora com posiciona les potes anteriors en tornar-lo a acostar a la superfície on estava. Si col·loca les dues potes anteriors de forma simètrica rep una puntuació de 0. Si ho fa de forma asimètrica de 1. Si la pota esquerra està retreta al cos rep una puntuació de 2.



### 3.2 Valoració neurològica en ratolí

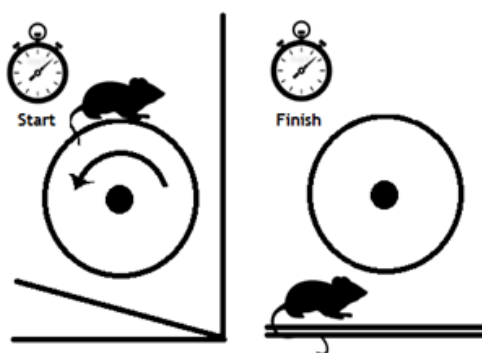
Durant els 5 dies previs a la cirurgia es van entrenar els animals per que aprenguessin a realitzar diferents tests neurològics basats en la coordinació i l'activitat motora tal i com es detalla en el treball de (Balkaya *et al.*, 2013). Tot seguit es van realitzar els tests transcorreguts 1, 4, 8 i 15 dies després de la lesió cerebral.

- **Pole Test:** Consisteix en mesurar el temps que tarden els animals a baixar per un pal de 50 cm de llarg amb un diàmetre de 0,8 cm i amb rugositats per tal d'evitar que rellisquin. Es va quantificar el temps que tardaven en fer un gir sobre si mateixos a la part superior d'un pal i baixar a través d'aquest fins a assolir el terra. Veure **Figura 30**. Es van realitzar 5 assajos separats 5 minuts entre ells i el valor final es va obtenir fent la mitjana del temps dels 5 assajos.



**Figura 30:** Representació esquemàtica del *Pole test*.

- **Rotarod:** Es va quantificar el temps que els animals eren capaços de mantenir l'equilibri en una situació d'acceleració constant (començant a 4 rpm i accelerant 1 rpm cada 8 segons fins a un màxim de 40 rpm) en el *Rotarod* (Rota-Rod/RS Panlab Harvard apparatus). Veure **Figura 31**. Es van realitzar 3 assajos separats entre ells per 15 minuts i el valor final es va obtenir fent la mitjana de temps dels 3 assajos.



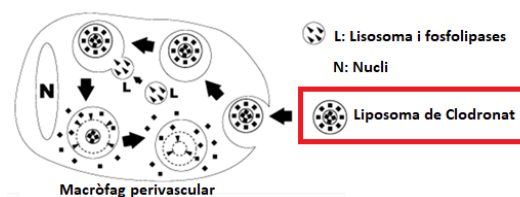
**Figura 31:** Representació esquemàtica del test *Rotarod*.

#### 4. VALORACIÓ DE LA INTEGRITAT DE LA BHE MITJANÇANT L'EXTRAVASACIÓ DE BLAU D'EVANS EN RATA

Per tal de valorar la permeabilitat de la BHE en animals control i isquèmics 22 hores després de la reperfusió es va administrar 4 ml/kg de blau d'Evans (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) (2% pes/vol en salí estèril) a una velocitat de 1ml/min per la vena femoral tal i com es descriu en (Pérez-Asensio *et al.*, 2010). Transcorregudes 2 hores es van sacrificar i perfondre els animals amb salí heparinitzat per retirar el blau d'Evans de dins els vasos. Es va obtenir el cervell i es van realitzar talls coronals de 2 mm de gruix. En primer lloc, es van adquirir fotografies de les seccions per tal de quantificar manualment amb l'ImageJ l'àrea ocupada pel blau d'Evans extravasat al teixit cortical i subcortical. De les seccions coronals de 2mm es va guardar la tercera secció contant des de l'inici del cervell sense tenir en compte els bulbs olfactors i es va separar el còrtex i l'estriat de cada un dels hemisferis per a estudis posteriors de Western Blot.

#### 5. ADMINISTRACIÓ DE LIPOSOMES DE CLODRONAT EN RATA

Per tal d'obtenir informació funcional sobre el paper dels BAMs en la fase aguda de l'ictus es van dur a terme experiments de pèrdua de funció mitjançant l'administració intra cerebroventricular de liposomes que contenen amb clodronat o tampó salí fosfat (PBS) a l'interior. Veure **Figura 32**.



**Figura 32:** Representació esquemàtica de la depleció selectiva dels macròfags perivasculars. Quan s'allibera el clodronat dels liposomes es produeix la mort cel·lular.

L'administració d'aquests liposomes es va realitzar 4 dies abans de la inducció del model d'isquèmia transitòria en rates tal i com es detalla en l'apartat anterior.

Durant 25 minuts es va administrar un volum de 30 µl de solució de liposomes (5 mg/ml), amb una xeringa Hamilton™ connectada a una micro-bomba, en el ventricle lateral esquerre del cervell a les següents coordenades en relació amb Bregma: 0.9 mm posterior, 1.5 mm lateral, i 4,5 mm dorsoventral mentre l'animal estava col·locat en un aparell estereotàctic i anestesià amb isofluorà inhalat.

## 6. CITOMETRIA DE FLUX

### 6.1 Aïllament de cèl·lules infiltrants al cervell isquèmic

Els animals es van eutanasiar per perfusió transcardíaca amb PBS per eliminar les cèl·lules sanguínies dels vasos. Es va extreure el cervell i es van disseccionar les diferents regions d'interès segons el model i experiment. Amb la finalitat d'obtenir suspensions cel·lulars de les mostres de teixits esmentades es van utilitzar els protocols aconsellats pel fabricant de l'aparell *gentleMACS* (Miltenyi Biotec) per a la disgregació mecànica i enzimàtica del teixit. A continuació i per tal d'eliminar la mielina de la mostra del teixit nerviós, es va utilitzar un gradient de densitat, resuspenent la mostra en solucions de Percoll™ isotònic de diferent concentració i es va procedir a realitzar el marcatge amb anticossos específics.

- **Citometria de flux:** Per tal de poder obtenir una quantificació en valors absoluts de les cèl·lules presents a la nostra mostra es va afegir un volum conegut de microesferes fluorescents (Flow-Count Fluorospheres, Becton-Dickinson). Finalment les mostres es van passar per l'equip BD LSRFortessa SORP (BD Biosciences) utilitzant el BD Diva software (BD Biosciences) i es van analitzar els resultats amb el software FlowJo v10 (FlowJo).
- **Separació cel·lular per citometria de flux (de l'anglès, *fluorescence-activated cell sorting (FACS)*):** Les poblacions de cèl·lules desitjades es van recollir en microtubs amb 200 µl de PBS-DEPC tractats prèviament amb FBS amb l'equip (Aria II cell sorter (BD Biosciences). Les cèl·lules obtingudes, es van centrifugar a 400G durant 10 min a 4°C, es va eliminar el sobrenedant per aspiració i es van afegir 350µl de tampó de lisi completat amb 2-β-mercaptoetanol (10 µL/mL). Tot seguit es van congelar a -80°C fins al moment de l'extracció de l'ARN.

### 6.2 Aïllament i processament de cèl·lules de la sang

En el moment de l'eutanàsia es va extreure sang de la vena cava dels animals. Per evitar la formació de coàguls es va impregnar l'agulla i la xeringa amb heparina i es va abocar el contingut de la xeringa en un microtub que contenia EDTA (Micro tube 1,3 MI K3E, Starstedt). Després de la lisi dels eritròcits amb una solució 150 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, 10 mmol/L KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L EDTA durant 10 minuts a 37 °C en agitació suau, es va procedir a la tinció i a la quantificació de les poblacions cel·lulars de la mateixa manera que s'ha descrit en l'apartat anterior.

### 6.3 Aïllament de les cèl·lules del moll de l'os

Després de l'eutanàsia dels animals es van extreure les dues extremitats posteriors. Es va netejar el teixit del voltant de les tíbies i els fèmurs i es va procedir a extreure el contingut del moll de l'os. La suspensió de cèl·lules es va passar per un filtre de 70 µm de porus per eliminar les restes tissulars. Finalment es va realitzar la tinció i quantificació de les poblacions cel·lulars tal i com s'ha detallat en apartats anteriors.

## 6.4 Aïllament i processament de les cèl·lules de la melsa

En el moment de l'eutanàsia es va obtenir la melsa dels animals. Es va disgregar el teixit mecànicament i es va procedir a la lisi dels glòbuls vermells tal i com es detalla en l'apartat anterior. Tot seguit es va realitzar la tinció de la suspensió cel·lular.

## 7. AÏLLAMENT I ADMINISTRACIÓ DE MONÒCITS DEL MOLL DE L'OS

Per tal de poder aïllar i administrar monòcits en la fase aguda de la isquèmia en els animals amb monòcits deficients de CCR2 es van extreure monòcits de l'os del fèmur i la tibia de ratolins adults mitjançant l'*EasyStep Mouse Monocyte Isolation kit*. Es van obtenir les cèl·lules del moll de tal i com es detalla en l'apartat anterior i es va incubar amb un còctel d'anticossos units a microesferes magnètiques. Tot seguit, es va passar la suspensió cel·lular a través d'un imant i es van recuperar els monòcits per selecció negativa. Finalment, es van resuspendre 1,5 milions de cèl·lules en 200µl de PBS i es van injectar per la vena de la cua 6 hores després de la isquèmia cerebral permanent.

## 8. ANÀLISIS DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

### 8.1 Extracció d'ARN de cèl·lules sortejades

Per a efectuar l'extracció de l'àcid ribonucleic total (ARN) es va utilitzar (Pure Link RNA Micro Kit, d'Ambion). Per a l'extracció es va seguir el protocol recomanat pel fabricant. En el pas de la precipitació amb etanol 70% (1:1 v/v), les mostres es van incubar 24h a -20°C per augmentar l'eficiència de la precipitació del ARN. Per eluir l'ARN de la columna es va fer amb H<sub>2</sub>O *RNase-free* del kit. L'ARN obtingut es va guardar immediatament a -80°C.

### 8.2 Extracció d'ARN de teixit total en rata

Després de l'eutanàsia de l'animal mitjançant una perfusió transcardíaca amb PBS heparinitzat es va disseccionar el teixit cortical i subcortical de l'hemisferi isquèmic i les mateixes regions de l'hemisferi contralateral. Tot seguit, les mostres es van guardar a -80°C en microtubs lliures de ARNases.

Per a l'extracció de l'ARN es va utilitzar el mètode del Trizol (Ambion) i es va treballar sota campana prèviament netejada amb RNase Zap (Invitrogen) per tal de prevenir la degradació de la mostra per la presència d'ARNases.

Es van treure les mostres del congelador es va afegir Trizol (Ambion) a les mostres i es va disgregar el teixit amb l'ajuda d'un dissociador mecànic de teixit (Polytron). Es va afegir cloroform i es va centrifugar el contingut a 4°C. Es va recollir el sobrenedant i s'hi va afegir el mateix volum de 2-Propanol per tal de precipitar l'ARN. Tot seguit es va mantenir a 1 hora a -20°C, es van centrifugar el contingut i es va retirar el sobrenedant per decantació. L'ARN present en el pellet es va rentar amb 1 ml d' etanol 80% lliure de ARNases. Es va centrifugar a

## MÈTODES

4°C i es va eliminar l'excés d'etanol per evaporació en un bloc tèrmic a 50°C fins que el pellet va quedar transparent. Es va resuspendre l'ARN en 100 µl d' H<sub>2</sub>O lliure de ARNases. Finalment, les mostres es van congelar a -80 °C fins al moment de la quantificació de l'ARN.

### 8.3 Extracció d'ARN de teixit total en ratolí

També es va extreure l'ARN del teixit cortical provinent dels ratolins prèviament perfosos amb PBS amb heparina. Es va utilitzar el mètode del Trizol detallat en l'apartat anterior però després de l'obtenció del sobrenedant en el pas amb cloroform es va afegir el mateix volum d'etanol al 70% a la mostra i es va procedir a la purificació de la mostra d'ARN amb el *PureLink RNA Mini Kit* (Invitrogen) tal i com es detalla en les especificacions del fabricant.

### 8.4 Quantificació i avaluació de la qualitat de l'ARN

#### 8.4.1 ARN de cèl·lules aïllades per *FACS-cell sorting*

En el segon treball, la puresa de l'ARN de les mostres sortejades es va mesurar al Servei de Genòmica de l'IDIBAPS amb un *PicoChip (BioAnalyzer2100)*. Indirectament es va obtenir també la concentració d'ARN present en la mostra. En el tercer treball, la puresa i quantitat de l'ARN de les mostres de micròglia i monòcits Ly6C<sup>hi</sup> es va mesurar mitjançant *High Sensivity RNA ScreenTape (Agilent2200 TapeStation System)*.

#### 8.4.2 ARN del teixit total

La quantitat i la qualitat de l'ARN es va mesurar amb el micro-espectrofotòmetre ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Es va considerar una bona qualitat de la mostra extreta quan la ratio de les mesures d'absorbància per una banda a 260nm/280 nm era  $\geq 1,80$  i per altra banda a 260 nm/230 nm  $> 1,80$ .

### 8.5 Microarray d'ARN

En la present tesi es va realitzar un estudi de microarray en col·laboració amb la Unitat d'estadística i Bioinformàtica (UEB) de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron (VHIR). Per l'estudi del perfil d'expressió gènica dels BAMs sortejats es va utilitzar el GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array, 3'IVT Pico reagent kit (Affymetrix) del Servei de Genòmica de l'IDIBAPS. Per a l'anàlisi del microarray es van seleccionar aquelles mostres amb valors de *RNA integrity number* (RIN)  $> 9.2$ , per fer comparables les dades, es va utilitzar l'algoritme *robust multi-array average* (RMA). Aquests valors normalitzats van ser la base de tot l'anàlisi. Es van seleccionar aquells gens amb diferències significatives entre els grups isquèmic i control amb un p-valor ajustat  $< 0.01$  i un  $|\logFC| > 2$  per representar els *Heatmaps*. Per tal d'extreure la informació biològica dels resultats, es van agrupar els resultats en categories d'ontologia genètica (GO) i *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

## 8.6 Conversió de l'ARN a ADNc

Després de determinar la concentració de l'ARN es va realitzar la transcripció inversa mitjançant el *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) per tal d'obtenir una còpia d'ADN complementaria (ADNc) a la cadena d'ARN. Per les mostres que provenien de l'extracció del teixit total i de les cèl·lules sortejades es va utilitzar 1 µg i 9 ng d'ARN respectivament fins a un volum final de 10 µl amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases. Com a control negatiu de la retrotranscripció es va utilitzar H<sub>2</sub>O lliure de RNases juntament amb la mix.

El volum final que es va utilitzar per cada reacció va ser de 20 µl (10 µl de MIX i 10 µl de mostra). Tot seguit es va fer una centrifugació breu, es van col·locar les mostres al termociclador i es va seleccionar el programa de PCR recomanat pel fabricant.

Després de la transcripció inversa es van diluir les mostres provinents del teixit total 1/6 amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases i es van guardar a -20°C.

### 8.6.1 Preamplificació del ADNc de les cèl·lules sortejades

Donat el cas que partíem d'unes mostres amb una baixa concentració d'ARN vam realitzar la preamplificació selectiva d'alguns gens d'interès utilitzant un pool de sondes específiques de Taqman, la *TaqMan™ PreAmp Master Mix* i el ADNc com a substrat tal i com recomanava el fabricant.

El volum final que es va utilitzar per cada reacció va ser de 50 µl. Tot seguit es van col·locar les mostres al termociclador i es va seleccionar el programa de PCR recomanat pel fabricant. Després de la preamplificació es van diluir les mostres 1/20 amb tampó Tris/EDTA (10mM/1mM) i es van congelar a -20°C.

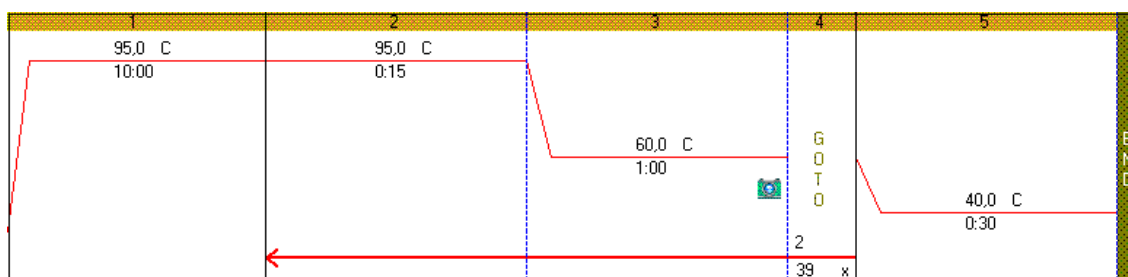
## 8.7 Assajos quantitius d'expressió gènica mitjançant PCR a temps real (RT-PCR)

Per dur a terme els assajos d'expressió gènica mitjançant PCR a temps real es van utilitzar dos sistemes diferents d'amplificació dels gens diana basats en la utilització d'encebadors. Per una banda es va utilitzar el sistema de sondes de Taqman i per altra banda el sistema de SYBER Green, en el que prèviament va ser necessari dissenyar els encebadors IDT (Conde, Espanya) amb l'ajuda del software Primer-Blast de Pubmed. En ambdós casos l'aparell utilitzat per a la detecció de fluorescència resultant de la reacció va ser el iCycler iQTM Multi-color Real Time PCR Detection System (Bio-rad).

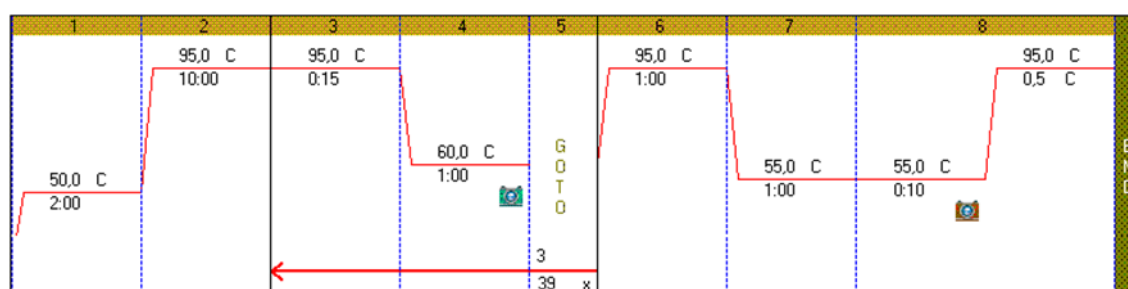
Cada mostra es va carregar per triplicat en una placa de 384 pous (Bio-Rad). Es va carregar també el control negatiu de la retrotranscripció per determinar si l'aigua utilitzada per fer la dilució de les mostres estava contaminada amb ARN i un control negatiu amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases per determinar si s'havia produït alguna contaminació per ADNc alhora de carregar la placa.

## MÈTODES

Els programes utilitzats per a la RT-PCR es detallen en les següents figures:



**Figura 33:** Detall del programa utilitzat per a la RT-PCR amb el sistema de sondes Taqman™.



**Figura 34:** Detall del programa utilitzat per a la RT-PCR amb el sistema de SYBER Green™.

La RT-PCR ens permet quantificar els canvis relatius d'expressió d'un gen d'interès respecte a l'expressió constitutiva d'un gen control (*housekeeping gene*). La unitat de mesura de la RT-PCR és el Ct (*cycle threshold*). Així doncs, els valors de Ct obtinguts tant del gen d'interès com del *housekeeper*, prèviament escollit considerant la més baixa alteració del perfil d'expressió degut al tractament, es van analitzar amb el mètode de doble delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) descrit per (Livak and Schmittgen, 2001).

## 9. WESTERN BLOT

Es va utilitzar la tècnica de Western Blot per tal de detectar l'expressió de proteïnes a partir del seu pes molecular i amb l'ajuda d'anticossos específics.

En primer lloc es van extreure les proteïnes del teixit descrit en l'apartat 4 mitjançant la sonicació en un tampó de lisi que contenia un còctel d'inhibidors de proteases. Es va determinar la concentració proteica de cada mostra mitjançant un test colorimètric utilitzant el reactiu de Bradford. Tot seguit, es van separar les proteïnes per electroforesi en gels de poliacrilamida del 12% i es van transferir en membranes de *polyvinylidene difluoride*. Durant la nit es van incubar les membranes a 4 °C amb l'anticòs primari contra VEGF-A. Tot seguit es van incubar les membranes amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave, (HRP, de l'anglès *horseradish peroxidase*). Com a control de càrrega per validar la quantitat de proteïna es va utilitzar l'anticòs contra la tubulina i el seu respectiu anticòs secundari conjugat amb HRP. La immunoreacció es va desenvolupar amb un mètode quimioluminescent basat en luminol. La quantificació de la intensitat de la banda es va realitzar amb el programari d'anàlisi 1-D de *Quantity One* (Bio-Rad). Tot seguit, es va calcular la relació de la intensitat del senyal de VEGF-A respecte el propi control de càrrega.

## 10. IMMUNOTINCIONS

### 10.1 Immunofluorescència en talls de vibràtom

Per a la visualització de vasos cerebrals funcionals, en el moment de l'eutanàsia es van perfondre els ratolins amb PBS heparinitzat, paraformaldehid (PFA) 4% i gelatina fluorescent prèviament preparada de la següent manera: es van diluir 400 mg de gelatina (Sigma) en 20 ml de PBS a 50°C. Quan la temperatura de la solució va baixar per sota de 40 °C, es va afegir albúmina-FITC (Sigma) 10 mg/ml i la temperatura es va mantenir a 37 °C fins a la perfusió dels ratolins. Després de la perfusió, es van col·locar ratolins amb el cap cap avall sobre gel per refredar ràpidament i solidificar la gelatina. El cervell es va extreure amb cura i es va mantenir en PFA al 4% en tampó fosfat (PB) a 4 °C durant la nit. Alguns dels cervells es van congelar i es van processar per immunofluorescència tal i com es detalla a continuació. En altres cervells es va procedir a l'obtenció de seccions de 100 µm de gruix amb vibràtom. Aquestes seccions es van criopreservar en una solució de glicerol i es van mantenir a -20°C fins al moment en que es va realitzar la immunotinció. També es van obtenir seccions de 1600 µm que es van clarificar seguint el protocol descrit (Lugo-Hernandez *et al.*, 2017) per tal d'observar els vasos cerebrals en cervells isquèmics de ratolí a diferents temps.

Els talls de vibràtom de 100 µm es van rentar amb PBS, es van permeabilitzar amb PBS i Triton X100 al 0,2% i es van bloquejar amb un 3% de sèrum. Tot seguit es van incubar els talls amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C. Posteriorment es van rentar els talls, es va realitzar la incubació amb l'anticòs secundari a temperatura ambient durant dues hores i posteriorment es van tenyir els nuclis amb DAPI. Finalment es van muntar les mostres amb Fluormount-G (SouthernBiotech).

### 10.2 Immunofluorescència en seccions de teixit congelat

Els cervells es van deixar tota la nit en PFA al 4% i el dia següent es van rentar amb tampó fosfat i es van criopreservar en sucrosa al 30% en PB. Tot seguit es van congelar els cervells en isopentà (2-metilbutà) a -40°C i es van guardar a -80°C. Tot seguit es van obtenir talls coronals seriatos al criòstat de 14 µm separats entre ells per 500 µm.

Pel que fa a les mostres de pacients humans que havien patit un ictus fatal es va obtenir el consentiment escrit dels familiars que van fer donació del cervell al Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic – IDIBAPS per poder realitzar l'autòpsia i extracció del cervell en un temps post mortem limitat seguint el protocol del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic – IDIBAPS aprovat pel comitè d'ètica de l'Hospital Clínic (CEIC). Les mostres es van conservar en diferents modalitats: per una banda es van fixar en formol i es van incloure en parafina i per l'altra banda es van col·locar amb *l'optimal cutting temperature compound* (OCT) i es van congelar en nitrogen líquid i es van emmagatzemar a -80°C. D'aquestes últimes mostres es van obtenir talls consecutius al criòstat de 5 µm de gruix i es van guardar a -80°C.

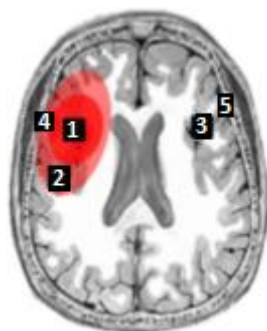


## MÈTODES

Les seccions de teixit congelat es van treure del congelador i es van deixar assecar a temperatura ambient per posteriorment ser fixades amb etanol 70%. Amb la finalitat de bloquejar les unions inespecífiques dels anticossos, les seccions es van incubar amb una solució de bloqueig de PBS amb un 3% de sèrum (en funció de l'hoste del que provingui l'anticòs secundari) i es va procedir amb la incubació de l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C i en càmera humida. A continuació es va realitzar un rentat amb PBS i els talls es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluoròfor (Alexa Fluor, Lifetechnologies) 1,5 hores a temperatura ambient. En cas de marcatges dobles o triples es van afegir els anticossos primaris i secundaris pertinents. Finalment pel marcatge de nuclis es va utilitzar DAPI o ToPro-3 i es van muntar les mostres amb Fluormount-G (SouthernBiotech).

### 10.2.1 Quantificació cel·lular

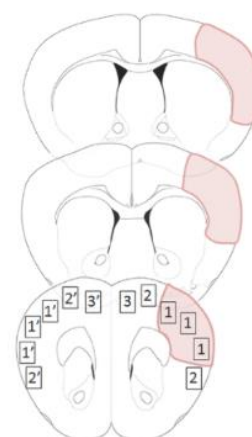
De les mostres procedents de la immunofluorescència del primer treball, es van obtenir 5 fotografies per cada una de les dues seccions presents en el portaobjectes, a 40x amb el microscopi confocal (Leica) i el programa LAS. Les regions analitzades es detallen en la **Figura 35**.



**Figura 35:** Representació esquemàtica de les regions analitzades dels cervells dels pacients que havien patit un ictus. 1) Nucli isquèmic, 2) zona perifèrica, 3) regió contralateral a la lesió, 4) meninges ipsilaterals a la lesió, 5) meninges contra laterals a la lesió.

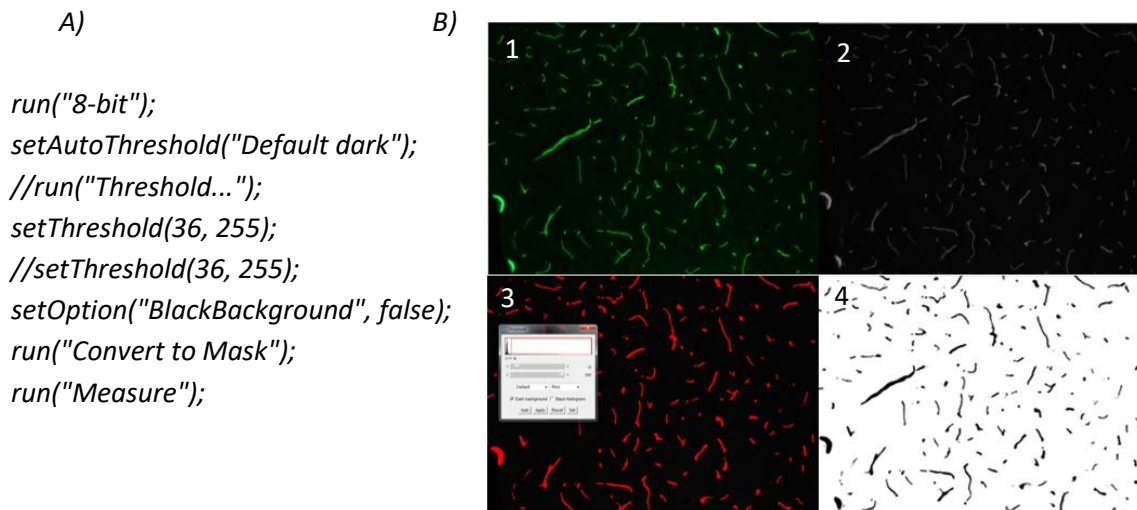
### 10.2.2 Quantificació dels vasos FITC+

En el tercer treball de la present tesi es van quantificar els vasos plens amb gelatina-FITC del cervell dels ratolins després de la isquèmia cerebral. Es van seleccionar tres seccions del cervell de cada animal separades 1 mm entre elles i es van adquirir imatges a 20X tal i com es detalla en la **Figura 36**.



**Figura 36:** Representació esquemàtica de les regions que es van obtenir les fotografies en el teixit cerebral. 1) Nucli isquèmic, 2) regió del voltant del nucli isquèmic delimitat segons la reacció glial, 3) regió perifèrica a la lesió. 1', 2', 3') Fan referència a les regions de l'hemisferi no isquèmic.

Tot seguit mitjançant el programa ImageJ es va aplicar la següent macro en totes les fotografies per tal de segmentar els vasos i poder obtenir el % d'àrea ocupada de vasos en cada imatge tal i com es detalla en la següent imatge:



**Figura 37:** Representació del funcionament de la macro utilitzada per la segmentació dels vasos. A) Macro utilitzada. B) Seqüència d'esdeveniments (1,2,3,4) que es van produir a mesura que la macro avança pel processat de les imatges.

### 10.3 Immunohistoquímica en seccions de parafina

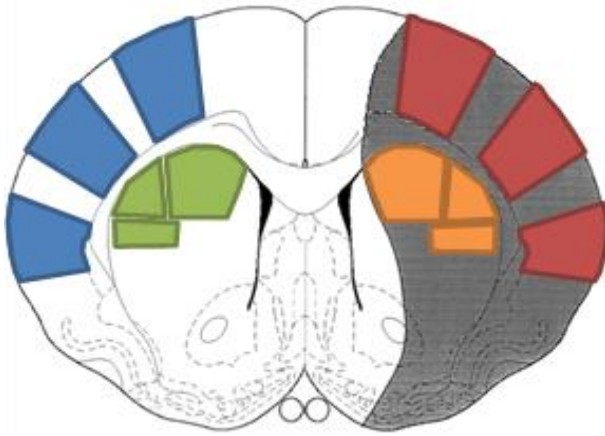
Tant les mostres provinents del teixit dels animals com les dels pacients es van incloure en parafina per tal de mantenir l'estructura anatòmica més ben preservada. Tot seguit es van obtenir seccions de 5  $\mu\text{m}$  al micròtom.

Les seccions de cervell incloses en parafina es van desparafinar amb Xilè, etanol absolut, etanol 96%, etanol 70%, aigua destil·lada i PBS. Es va realitzar un bloqueig de les peroxidases endògenes amb  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un bloqueig dels talls amb un 3% del sèrum corresponent per evitar unions inespecífiques i es va procedir amb la incubació de l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C i en càmera humida. A continuació es va realitzar un rentat amb PBS, els talls es van incubar amb l'anticòs secundari biotinitat i el complex avidina-biotina-HRP (per amplificar la senyal de revelat) durant 1 hora. Tot seguit es va realitzar el revelat amb diaminobencidina, un contrast amb Hematoxilina i finalment es van deshidratar les mostres i es van muntar les preparacions amb una resina amb base de xilè.

#### 10.3.1 Quantificació cel·lular

En el segon treball presentat en aquest treball de tesi doctoral es van quantificar diferents tipus cel·lulars del cervell de rates no operades i rates isquèmiques. Es van seleccionar dues seccions del cervell de cada animal i es van quantificar el nombre de cèl·lules en 3 regions corticals de l'hemisferi no afectat i 3 regions de l'hemisferi isquèmic (blau i vermell respectivament) de cada una de les seccions. A més, també es van seleccionar 3 àrees del cos estriat de cada hemisferi (verd i taronja respectivament) (**Figura 38**).

## MÈTODES



**Figura 38:** Esquema d'una secció del cervell de rata. Amb gris es representa la zona isquèmica. Amb diferents colors, es representen les regions d'interès on es va realitzar el comptatge cel·lular.

Les cèl·lules es van comptabilitzar a 40X en un microscopi (Olympus BX51) equipat amb una platina motoritzada (Prior Pro Scan II) i una càmera digital (Olympus DP71). Tots els equips estaven controlats pel sistema Visiopharm Integrator, amb el newCAST™ stereology software (Visiopharm A/S). La quantificació final es va expressar en nº de cèl·lules/àrea.

## **RESULTATS**



## Resum dels articles

Els resultats que s'han obtingut durant el transcurs d'aquesta tesi es presenten en format de compendi de publicacions.

### Primer article

## NEUTROPHIL RECRUITMENT TO THE BRAIN IN MOUSE AND HUMAN ISCHEMIC STROKE

Isabel Pérez-de-Puig\*, Francesc Miró-Mur\*, Maura Ferrer-Ferrer, Ellen Gelpi, **Jordi Pedragosa**, Carles Justicia, Xabier Urra, Angel Chamorro and Anna M. Planas

\*Aquests autors tenen la mateixa contribució en el treball.

Acta Neuropathologica (2015);129(2):239-57. doi: 10.1007/s00401-014-1381-0

En aquest treball es va estudiar el reclutament de neutròfils en dos models murins d'isquèmia cerebral permanent. Els models experimentals utilitzats van ser: la cauterització distal de l'artèria cerebral mitja (c-MCAo) i l'oclusió intraluminal proximal de l'arteria cerebral mitja (il-MCAo). També es va estudiar el cervell de tres pacients que van patir un ictus isquèmic i que van morir en la fase aguda de la patologia.

Els neutròfils es recluten ràpidament en resposta a una infecció o inflamació tissular. L'ictus desencadena una forta reacció inflamatòria però la presència i la funció dels neutròfils en el cervell isquèmic no estan ben caracteritzades, particularment en els casos amb absència de reperfusió.

Mitjançant citometria de flux es va observar que després de la inducció del model c-MCAo es produeix un reclutament més accentuat de neutròfils en el teixit isquèmic en comparació amb el model il-MCAo. A més a més, es va poder confirmar que el reclutament de neutròfils no és degut a la cirurgia per si sola, sinó que és deguda a la isquèmia cerebral.

Mitjançant microscòpia confocal es va poder identificar la presència de neutròfils a les leptomeninges a partir de les 6 hores posteriors a l'oclusió, mentre que a partir de les 15 hores es localitzaven a la làmina basal cortical i als espais de Virchow-Robin corticals. A les 24 hores també es van observar infiltrats de neutròfils al parènquima cerebral.

Els neutròfils mostraven signes d'activació i mort, donat que presentaven citrulinació de la histona-3, cromatina descondensada, i projeccions extracel·lulars d'ADN i histones que suggerien la producció de trampes extracel·lulars (*Neutrophils Extracellular Traps*, NETs).

En el model c-MCAo es van identificar neutròfils perivasculars a tot el teixit cortical isquèmic. En canvi, en el model il-MCAo es van localitzar els neutròfils als marges de la lesió, però no en el nucli isquèmic, essent principalment intraluminals i menys abundants al teixit subcortical. L'oclusió permanent de tot el territori de l'ACM, l'absència de vasos col·laterals al teixit

## RESULTATS

subcortical, conjuntament amb una xarxa vascular pial col·lapsada a causa d'un pronunciat edema cerebral, van fer pensar que el tràfic de neutròfils en aquest últim model es podria veure compromès.

Finalment, vam detectar neutròfils a les leptomeninges proximals a la lesió i en els espais perivasculars de la zona afectada en el cervell post mortem de pacients que havien patit un ictus isquèmic.

Així doncs, vam concloure que els neutròfils extravasen dels vasos de les leptomeninges i poden arribar al cervell en models animals d'experimentació i en humans amb una oclusió arterial cerebral prolongada. Aquest treball identifica una nova via d'infiltració de neutròfils al cervell isquèmic independent de la vasculatura intracerebral.

### Segon article

## **CNS-BORDER ASSOCIATED MACROPHAGES RESPOND TO ACUTE ISCHEMIC STROKE ATTRACTING GRANULOCYTES AND PROMOTING VASCULAR LEAKAGE**

**Jordi Pedragosa**, Angélica Salas-Perdomo, Mattia Gallizioli, Roger Cugota, Francesc Miró-Mur, Ferran Briansó, Carles Justicia, Fernando Pérez-Asensio, Leonardo Marquez-Kisinousky, Xabier Urrea, Anna Gieryng, Bozena Kaminska, Angel Chamorro and Anna M. Planas

Acta Neuropathologica Communications (2018); 6(1):76. doi: 10.1186/s40478-018-0581-6.

El sistema nerviós central (SNC) conté diferents tipus de cèl·lules immunes situades en compartiments anatòmics específics. Els macròfags resideixen a les fronteres del SNC a diferència de la micròglia que localitza al parènquima cerebral. Els macròfags es localitzen al voltant dels vasos cerebrals, als espais de les leptomeninges i als plexes coroides. Aquesta localització privilegiada els permet interactuar directament amb la vasculatura i desenvolupar funcions de neteja, regulació de la permeabilitat vascular i de vigilància immunològica.

En el present treball vam estudiar els canvis fenotípics i el paper d'aquests macròfags en resposta a la isquèmia cerebral aguda. Basant-nos amb el fet que l'expressió de CD163 és un tret distintiu dels macròfags perivasculars cerebrals i de les meninges en rata i en el cervell humà, vam aïllar aquests macròfags CD163<sup>+</sup> mitjançant *fluorescent activated cell sorting (FACS)* del cervell de rates control i també 16 hores després de l'oclusió transitòria de l'arteria cerebral mitja en rata. El perfil d'expressió gènica d'aquestes cèl·lules CD163<sup>+</sup> va posar de manifest que després de la isquèmia es produeix un augment en l'expressió de gens relacionats amb la via del factor induïble per la hipòxia (HIF-1), així com també la inducció de gens que codifiquen per components de la matriu extracel·lular, i quimioattractants de leucòcits, entre d'altres.

Gràcies a la utilització d'una estratègia de depleció d'aquests macròfags, vam trobar que aquests macròfags participen en el reclutament de granulòcits, produeixen factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), promouen la permeabilitat dels vasos sanguinis pials i corticals i contribueixen a la disfunció neurològica en la fase aguda de la isquèmia i reperfusió.

Finalment, vam poder detectar VEGF al voltant dels vasos sanguinis i colocalitzant amb macròfags perivasculars CD163<sup>+</sup> en el teixit cerebral de pacients que havien patit un ictus isquèmic i que havien mort en la fase aguda de la patologia.

Globalment, els resultats d'aquest treball mostren que la isquèmia cerebral promou ràpidament una reprogramació del perfil d'expressió gènica dels macròfags CD163<sup>+</sup> que es tradueix en un increment de la quimiotaxis de leucòcits al focus de la lesió, la desestabilització de la BHE i un deteriorament neurològic en la fase aguda de l'ictus.

### Tercer article

## A SUBSET OF CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES PROMOTES ANGIOGENESIS AND PARTICIPATES IN FUNCTIONAL RECOVERY AFTER ISCHEMIC STROKE

**Jordi Pedragosa**, Francesc Miró-Mur, Amaia Otxoa-de-Amezaga, Carles Justicia, Francisca Ruíz-Jaén, Peter Ponsaerts, Manolis Pasparakis, and Anna M. Planas

Manuscrit en preparació

La funció exacta dels monòcits pro inflamatoris Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> que infiltrin al cervell després de la isquèmia cerebral no és del tot coneguda. En el present treball vam mostrar que diferents poblacions de monòcits i limfòcits que expressen CCR2 infiltrin al teixit cerebral isquèmic. Per poder estudiar el paper dels monòcits CCR2<sup>+</sup> en aquesta patologia vam generar una colònia de ratolins deficients de CCR2 en el llinatge de cèl·lules mieloides.

Un dia després d'haver provocat la isquèmia cerebral permanent en aquests ratolins vam detectar una menor infiltració de monòcits i una reducció en l'expressió de gens pro-inflamatoris, gens relacionats amb l'activació alternativa dels macròfags (fenotip M2), així com també de gens relacionats amb l'angiogènesi. No obstant això 15 dies després de la isquèmia cerebral, els animals amb monòcits deficients en CCR2 presentaven un augment retardat del perfil inflamatori, com il·lustra l'increment en l'expressió de Il1b en relació als seus respectius animals del genotip control.

A més a més, els ratolins deficients en CCR2 en els monòcits van mostrar una reducció en l'angiogènesi i un empitjorament en la funció neurològica respecte als animals control, tot i no presentar diferències en el volum de lesió.

L'aïllament de monòcits Ly6C<sup>hi</sup> del cervell de ratolins 24 hores després de la isquèmia cerebral mitjançant FACS seguit d'extracció de RNA i RT-PCR va mostrar que aquestes cèl·lules



## RESULTATS

expressaven gens pro-inflamatoris, com Il1b, però també gens marcadors del fenotip M2, com Chil3 i Arg1, i gens proangiogènics com Vegfa.

Mitjançant citometria de flux es va confirmar que un petit grup de monòcits infiltrants Ly6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> eren Arg1<sup>+</sup>, que indicava una possible diversitat fenotípica d'aquestes cèl·lules en el teixit isquèmic.

Per tal d'intentar rescatar l'efecte negatiu de la deficiència en CCR2 en els monòcits, 6 hores post-isquèmia vam administrar monòcits obtinguts del moll de l'os d'animals CCR2<sup>+/-</sup>. Aquest tractament no va promoure la recuperació neurològica que esperàvem, suggerint que els monòcits immadurs de la medul·la òssia no tenen funcions pro-reparadores.

Els resultats d'aquest treball mostren una contribució específica dels monòcits CCR2<sup>+</sup> infiltrats al cervell isquèmic en la reacció inflamatòria aguda, però també la participació d'aquests monòcits en la resolució tissular i posterior recuperació funcional.

L'estudi mostra que existeix una heterogeneïtat en la poblacions de monòcits CCR2<sup>+</sup> que infiltrin al cervell isquèmic, i suggereix la presència de monòcits pro-reparadors. Aquestes cèl·lules no semblen provenir de la medul·la òssia però podrien migrar d'altres reservoris. Per tant, determinades subpoblacions de monòcits pro-reparadors podrien ser importants alhora de dissenyar teràpies cel·lulars basades en monòcits per a la recuperació d'ictus.

## NEUTROPHIL RECRUITMENT TO THE BRAIN IN MOUSE AND HUMAN ISCHEMIC STROKE

Isabel Pérez-de-Puig\*, Francesc Miró-Mur\*, Maura Ferrer-Ferrer, Ellen Gelpi,  
**Jordi Pedragosa**, Carles Justicia, Xabier Urra, Angel Chamorro and Anna M. Planas

\*Aquests autors tenen la mateixa contribució en el treball.

Acta Neuropathologica (2015);129(2):239-57. doi: 10.1007/s00401-014-1381-0



## Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke

Isabel Perez-de-Puig · Francesc Miró-Mur · Maura Ferrer-Ferrer · Ellen Gelpi · Jordi Pedragosa · Carles Justicia · Xabier Urrea · Angel Chamorro · Anna M. Planas

Received: 10 October 2014 / Revised: 20 December 2014 / Accepted: 21 December 2014 / Published online: 30 December 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Neutrophils are rapidly recruited in response to local tissue infection or inflammation. Stroke triggers a strong inflammatory reaction but the relevance of neutrophils in the ischemic brain is not fully understood, particularly in the absence of reperfusion. We investigated brain neutrophil recruitment in two murine models of permanent ischemia induced by either cauterization of the distal portion of the middle cerebral artery (c-MCAo) or intraluminal MCA occlusion (il-MCAo), and three fatal cases of human ischemic stroke. Flow cytometry analyses revealed progressive neutrophil recruitment after c-MCAo, lesser neutrophil

recruitment following il-MCAo, and absence of neutrophils after sham operation. Confocal microscopy identified neutrophils in the leptomeninges from 6 h after the occlusion, in the cortical basal lamina and cortical Virchow–Robin spaces from 15 h, and also in the cortical brain parenchyma at 24 h. Neutrophils showed signs of activation including histone-3 citrullination, chromatin decondensation, and extracellular projection of DNA and histones suggestive of extracellular trap formation. Perivascular neutrophils were identified within the entire cortical infarction following c-MCAo. After il-MCAo, neutrophils prevailed in the margins but not the center of the cortical infarct, and were intraluminal and less abundant in the striatum. The lack of collaterals to the striatum and a collapsed pial anastomotic network due to brain edema in large hemispheric infarctions could impair neutrophil trafficking in this model. Neutrophil extravasation at the leptomeninges was also detected in the human tissue. We concluded that neutrophils extravasate from the leptomeningeal vessels and can eventually reach the brain in experimental animal models and humans with prolonged arterial occlusion.

I. Perez-de-Puig and F. Miró-Mur equally contributed to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00401-014-1381-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Perez-de-Puig · M. Ferrer-Ferrer · J. Pedragosa · C. Justicia · A. M. Planas  
Department d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

F. Miró-Mur · M. Ferrer-Ferrer · J. Pedragosa · C. Justicia · X. Urrea · A. Chamorro · A. M. Planas (✉)  
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 161, planta 6,  
08036 Barcelona, Spain  
e-mail: ampfat@iibb.csic.es; anna.planas@iibb.csic.es

E. Gelpi  
Neurological Tissue Bank of the Biobanc-Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

X. Urrea · A. Chamorro  
Functional Unit of Cerebrovascular Diseases, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

**Keywords** Leptomeninges · Perivascular · Brain · Ischemia · Rodent · Human

### Introduction

The only treatment showing efficacy in acute ischemic stroke is thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (tPA) when it is administered within the first 4.5 h after symptom onset. However, a majority of stroke patients arrive to the hospital later than 4.5 h and cannot be treated with tPA [16]. It is estimated that spontaneous recanalization of the occluded vessel occurs in only one quarter



of the stroke population by 24 h of clinical onset [46] and in up to half of the patients by 1 week [39, 51]. However, the benefits derived from such a protracted recanalization are negligible. In sharp contrast with these data that illustrate that the archetypical stroke patient in the clinic suffers long lasting or permanent ischemia, most experimental studies are performed using experimental models of transient brain ischemia [29].

Acute ischemic stroke is a hypoxic-ischemic disorder associated with a sterile inflammatory reaction [7]. Ischemic injury triggers an immune response that promotes immune cell migration and infiltration to the brain parenchyma according to an orchestrated temporal pattern [23, 30]. Neutrophils have received special attention for many years as these cells have a remarkable destructive potential, either through the direct neurotoxic effects from the release of proteolytic enzymes [1, 48], or through indirect effects that result from intravascular neutrophil accumulation, capillary blood flow obstruction and the no-reflow phenomenon [14, 15]. Experimental studies showed that neutrophils migrate to cerebral ischemic regions during the first few hours after the onset of ischemia. However, they have not determined the exact anatomic location of neutrophil infiltration within the neurovascular unit and brain parenchyma [4, 15, 22, 24, 52]. More recently, it has been disputed whether neutrophils are able to cross the multiple physical barriers in the blood–brain barrier (BBB) that separate the intracerebral vessel lumen from the brain parenchyma after ischemia/reperfusion, or whether neutrophils penetrate the parenchyma in sufficient numbers to be of clinical significance [18]. Alternatively, it has been posited that the neurovascular unit is the site of neutrophil action after CNS ischemia/reperfusion [18].

So far, interventions aiming to prevent neutrophil recruitment to the ischemic brain have not shown benefits in human stroke [34]. In experimental animals, several lines of evidence support a pathogenic role of neutrophils in ischemia/reperfusion but not in permanent ischemia [9, 10, 21, 32, 45, 53]. However, increased numbers of neutrophils have been detected after permanent brain ischemia and infiltration into the parenchyma was found to begin 12 h after the onset of the arterial occlusion [8, 22, 52]. Remarkably, increasing data attest that neutrophils cross talk and shape the maturation and effector functions of other leukocytes, show diverse phenotypes [12, 19], and could play an important role in several pathological conditions [31, 36, 40]. In this study, we investigated the route of entry of neutrophils to the brain while the circulation remained arrested in experimental models of permanent occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) in mice. In addition, we assessed the anatomical localization of neutrophil infiltration in fatal cases of human stroke.

## Methods

### Animals

Adult (3–4 months old) Balb/C male mice ( $n = 89$ ) were purchased from Charles River (Lyon, France). Animal work was carried out according to the local regulations and in compliance with the Spanish laws (Real Decreto 53/2013) following the Directives of the European Community and with approval of the Ethics Committee (CEEA) of University of Barcelona.

### Brain ischemia

Focal brain ischemia was induced by permanent right MCAo in mice, either by cauterization of the distal portion of the MCA (c-MCAo) ( $n = 43$ ), or by intraluminal MCA occlusion (il-MCAo) ( $n = 28$ ). c-MCAo restricts blood flow within a limited portion of the cortex, whereas il-MCAo affects the entire MCA territory causing striatal and cortical infarctions. A detailed description of the experimental procedures is provided in the Supplementary Materials. In brief, c-MCAo was carried out under isoflurane anesthesia as reported [43]. Two mice were excluded from the study due to unsuccessful surgery. None of the mice died during the study. For sham operation ( $n = 7$ ), all surgical procedures were carried out but the MCA was not cauterized and the mice were killed at 24 h. To exclude any effects of cauterization, in a small group of mice ( $n = 3$ ) we carried out MCA ligation (8/0 black-braided silk suture) and the mice were studied at 24 h. il-MCAo was performed under isoflurane anesthesia introducing a filament through the right internal carotid artery up to the level where the MCA branches out, as reported [13] with modifications. Cerebral perfusion was assessed with laser Doppler flowmetry (Perimed AB, Järfälla Sweden). Three mice died before 24 h after il-MCAo. Sham-operated mice ( $n = 4$ ) were subjected to surgery but the filament was only briefly introduced into the internal carotid artery and was immediately removed, and mice were killed after 24 h. Control mice ( $n = 4$ ) were naive mice not subjected to surgery or anesthesia.

### Isolation of cells from tissues

Mice were anesthetized and transcardially perfused with 40 mL saline. The ischemic brain tissue (ipsilateral to the MCAo) and the identical regions of the non-ischemic hemisphere (contralateral) were dissected out and analyzed separately. For the c-MCAo model the cortex was dissected out, whereas for the il-MCAo model the dissected tissue included the cortex and the striatum. The tissue was processed to obtain cells as described in Supplementary Materials.

**Table 1** Antibodies for immunofluorescence

Antibody	Species	Reference	Supplier	Dilution
<b>Anti-mouse</b>				
Ly6G (clone 1A8)				
Recognizes neutrophils	Rat monoclonal	127601	BIOLEGEND	1:200
Ly6G/C (NIMP-R14)				
Recognizes neutrophils and a subset of monocytes/macrophages	Rat monoclonal	ab2557	ABCAM	1:100
Elastase				
Recognizes neutrophils and precursors, and certain monocytes express low levels	Rabbit polyclonal	ab68672	ABCAM	1:50
Histone-3 citrulline				
Citrullination is a histone modification typical of neutrophil extracellular traps	Rabbit polyclonal	ab5103	ABCAM	1:400
pan-Laminin				
Recognizes the laminin protein family widely expressed in basal laminae	Rabbit polyclonal	Z0097	DAKO	1:100
$\alpha$ 4-Laminin				
Recognizes a laminin protein specific of the endothelial basal lamina	Goat polyclonal	AF3837	R&D	1:20
PDGFR $\beta$				
This PDGF receptor is mainly expressed in pericytes	Goat polyclonal	AF1042	R&D	1:100
vWF				
Labels the vascular endothelium	Sheep polyclonal	ab11713	ABCAM	1:100
Glut-1				
Mainly labels the vascular endothelium	Rabbit polyclonal	07-1401	MILLIPORE	1:200
CD31				
Mainly labels the endothelial cells	Mouse monoclonal	sc-46694	SANTA CRUZ	1:50
$\beta$ -Catenin				
Is involved in cell–cell adhesion, labels endothelial cell junctions	Mouse monoclonal	61015	BD	1:500
Caspase-3				
Apoptosis effector protein	Rabbit polyclonal	ab52293	ABCAM	1:100
<b>Anti-human</b>				
Neutrophil elastase				
Recognizes neutrophils and precursors, and certain monocytes express low levels	Mouse monoclonal	M0752	SEROTEC	1:200
Myeloperoxidase				
Enzyme found mainly in neutrophil primary granules and monocyte lysosomes	Rabbit polyclonal	A 0398	DAKO	1:100
pan-Laminin				
Recognizes the laminin protein family widely expressed in basal laminae	Rabbit polyclonal	Z0097	DAKO	1:200
vWF				
Labels the vascular endothelium	Sheep polyclonal	ab11713	ABCAM	1:100

## Flow cytometry

Isolated brain cells were processed as described in the Supplementary Materials and incubated with the following primary antibodies: rat anti-mouse CD11b (clone M1/70, Alexa Fluor 647, BD Pharmingen), CD45 (clone 30-F11, FITC, BD Pharmingen), and Ly6G (clone 1A8, PE-Cy7, BD Pharmingen). Isotype controls were rat IgG2b $\kappa$  (clone A95-1, Alexa Fluor 647 or FITC, BD Pharmingen), rat IgG2a (FITC, Hycult Biotech), and rat IgG2a $\kappa$  (clone R35-95, PE-Cy7, BD Pharmingen). Data acquisition was carried out in a BD FACS Canto II cytometer (BD Biosciences) using the FACS Diva software (BD Biosciences). Data analysis

was carried out with FlowJo software (version 7.6.5, TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Flow-Count Fluorospheres (Beckman-Coulter) were used for absolute cell number quantification.

## Immunofluorescence

Mice were anesthetized with isoflurane and perfused intracardially with saline followed by paraformaldehyde (PFA, 4 %) in phosphate buffer (pH 7.4). The brain was removed, post-fixed with PFA overnight, cryoprotected in 30 % sucrose, frozen, and 14- $\mu$ m-thick sections were obtained in a cryostat. The sections were fixed with ethanol, blocked



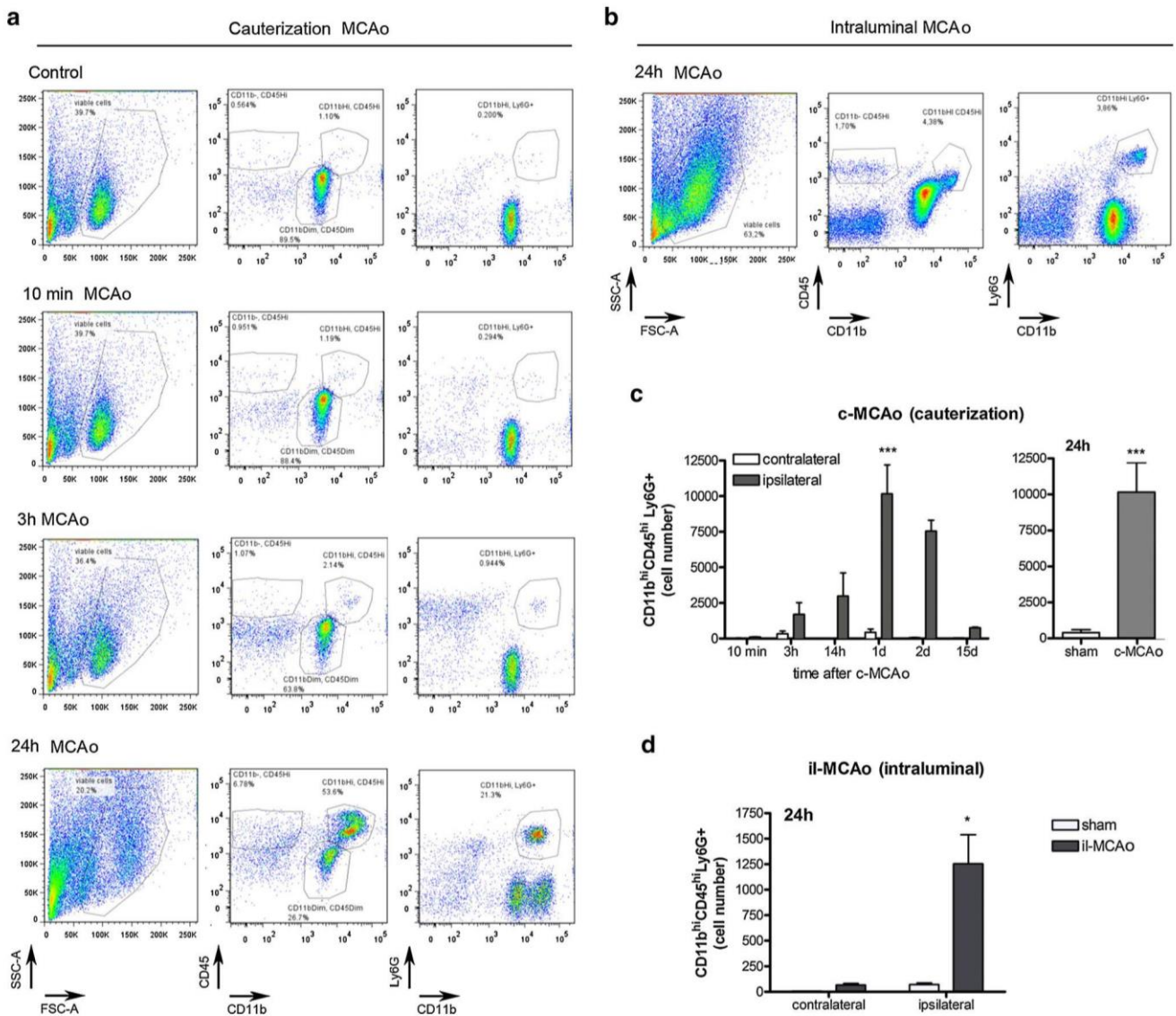
**Table 2** Clinical data of the stroke patients

Case	Age	Gender	Admission NIHSS	Vascular territory	Intracranial occlusion site	Acute revascularization therapy	Hemorrhagic transformation (HT)	Etiology	Exitus (days after onset)	Exitus to necropsy timelapse	Acute infection
1	79	Man	4	Left MCA infarct	Left M2	None	Parieto-occipital parenchymal hematoma type 2	Large vessel disease	5 days	4 h	No
2	86	Woman	1	Vertebro-basilar infarct	Basilar artery	None	No	Cardio-embolic	3 days	3 h	Yes pneumonia
3	89	Woman	9	Vertebro-basilar infarct	No vessel imaging	None	No	Cardio-embolic	1 day	3 h	Yes

with normal serum and incubated overnight at 4 °C with combinations of primary antibodies (see Table 1). We generally combined antibodies made in different species to avoid cross-reactions. Then, sections were incubated for 2 h at room temperature with secondary antibodies (Alexa Fluor-488, -546, -647, LifeTechnologies). Immunoreaction controls were always carried out by omission of the primary antibodies. Sections were counterstained with either 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or ToPro-3 (Invitrogen) to visualize the cell nuclei and they were observed under a confocal laser microscope (Leica, SP5 or TCS SPE).

#### Postmortem tissue of stroke patients

The brains of three patients suffering from acute stroke who died between 1 and 5 days after stroke onset at the Stroke Unit of the Hospital Clinic of Barcelona were used in this study, after obtaining written consent from their families for tissue removal after death for diagnostic and research purposes at the Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clinic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). The study had the approval of the Ethics Committee of this Hospital. The patients included two women and one man, and had a mean age of 84.7 years (ranging from 79 to 89 years). A summary of the characteristics of the patients is shown in Table 2. All patients had radiologically confirmed ischemic infarcts. These infarcts affected the territory of the middle cerebral artery in one case and the cerebellum in two cases (Supplementary Fig. 1). The elapsed time from stroke onset to death ranged from 1 to 5 days, and the time from death to autopsy ranged from 3 to 4 h. An expert neuropathologist (EG) dissected the ischemic core, the peripheral region, the leptomeninges, and a portion of non-ischemic tissue obtained from an unaffected region distant to the infarction (Supplementary Fig. 2). Samples of the tissue from each region were either formalin fixed, paraffin embedded and sectioned in a microtome at 5 µm, or embedded in OCT and immediately frozen in liquid nitrogen for later sectioning in a cryostat at 5 µm. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, or were used for immunohistochemistry applying a rabbit polyclonal antibody against myeloperoxidase (Table 1), and processed with the avidin–biotin peroxidase (ABC, Vector, Vectastain, Palex Medical S.A., Sant Cugat del Vallés, Spain) method. Cryostat sections were processed for immunofluorescence as described above with the antibodies listed in Table 1. For cell counting, we obtained 5–6 immunofluorescence pictures for each brain region using the ×40 objective in two different sections. The numbers of immunoreactive cells located either within the vessel lumen (intravascular), surrounding the



**Fig. 1** Identification of neutrophils in the brain after ischemia by flow cytometry. Flow cytometry gates of brain cells for representative mice after cauterization (c-MCAo) (a) and intraluminal (il-MCAo) occlusion (b), at the indicated time points and in a control non-ischemic brain (top of panel a). Cell populations are first identified by side and forward scatter (SSC and FSC) (left graphs), followed by the expression of CD11b and CD45, which shows a progressive increase of myeloid cells (CD11b<sup>hi</sup>CD45<sup>hi</sup>) (middle graphs) in the ischemic brain tissue. Separation of the latter population by CD11b and Ly6G allows the identification of neutrophils (CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>+</sup>) (graphs on the right of each panel). The percentage of cells in each gate is indicated in the graphs. a After illustrating the gating strategy from left to right, the panel on the right shows from top to bottom the increase in neutrophils (gate CD11b<sup>hi</sup> Ly6G<sup>+</sup>) with time after c-MCAo. b Neutrophils are also found in the il-MCAo model (right

panel). c Quantification of brain tissue neutrophil numbers obtained after 10 min (n = 2), 3 (n = 5) and 15 (n = 9) hours, and 1 (n = 8), 2 (n = 3), and 15 (n = 2) days after c-MCAo are shown for the ipsilateral and contralateral hemispheres. Two-way ANOVA by time and hemisphere followed by the Bonferroni post hoc test shows significant increases at 1 day in the ipsilateral versus the contralateral hemisphere (\*\*\*) (p < 0.001). The increase in neutrophil number seen 24 h after c-MCAo (n = 8) in the ipsilateral hemisphere was not detected after sham operation (n = 5) (Mann–Whitney test, \*\*p < 0.005). d Quantification of brain tissue neutrophil numbers obtained in the ipsilateral and contralateral hemispheres 1 day after il-MCAo (n = 8) or sham operation (sham) (n = 2). Two-way ANOVA by surgery (MCAo vs sham) and hemisphere followed by Bonferroni post hoc test shows a significant increase of neutrophils in the ipsilateral hemisphere after il-MCAo (\*p < 0.05)

vascular endothelium (perivascular), or in the parenchyma (extravascular) were counted in each picture. The average count in all pictures was taken as representative for each region per subject.

Statistical analyses

Cell numbers at different time points were compared with two-way ANOVA. For the il-MCAo model, comparisons



between two groups were carried out with the Mann–Whitney *U* test. Cell numbers in human samples were compared with the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s Multiple Comparison test. Data were analyzed using GraphPad software.

## Results

### Neutrophils reach the ischemic territory after permanent ischemia in mice

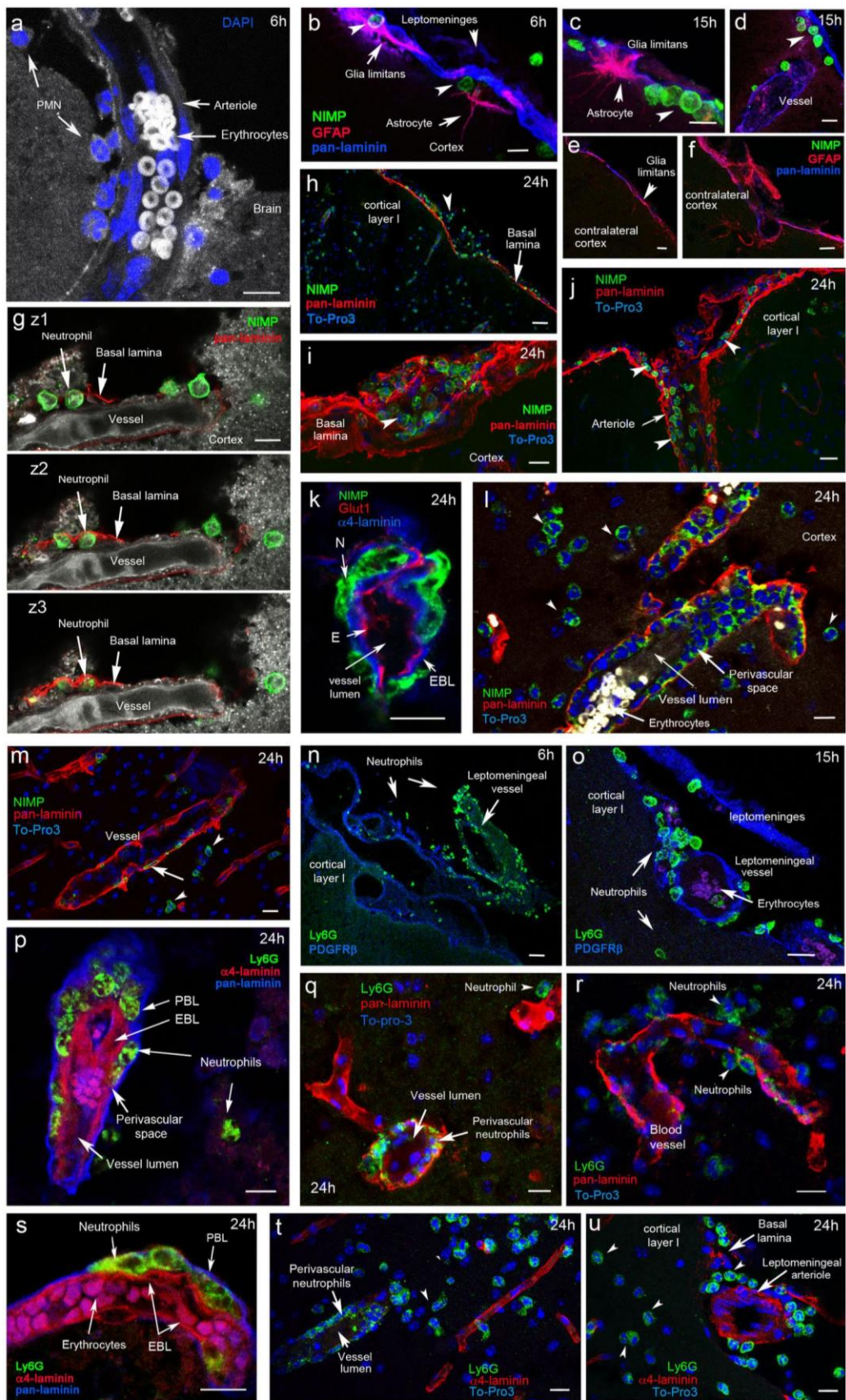
The presence of neutrophils in the ischemic brain has been reported in experimental models of permanent ischemia [8, 22, 52]. After intracardiac perfusion of the mice, isolation of cells from the brain, and flow cytometry analysis, we found neutrophils in the ipsilateral hemisphere 24 h after permanent ischemia (Fig. 1). Given that blood within the branches of the occluded vessels is not washed out after intracardiac perfusion of the animals, we first asked whether the stagnated blood was the source of neutrophils in the infarcted tissue. To answer this question we carried out flow cytometry in brain tissue samples at different time points after induction of permanent ischemia by c-MCAo (Fig. 1a). The number of neutrophils (CD45 + CD11b + Ly6G + cells) in the ipsilateral hemisphere increased with time reaching a peak at 24 h (Fig. 1c). This finding was not observed in the contralateral hemisphere or after sham operation (Fig. 1c). For the intraluminal ischemia model (il-MCAo), FACS analysis of the ischemic tissue at 24 h also showed increased numbers of neutrophils compared with the contralateral hemisphere and compared with tissue of sham-operated mice (Fig. 1d). Comparatively, neutrophils were less abundant after il-MCAo than after c-MCAo. c-MCAo requires invasive surgery involving partial craniectomy and causing a hole in the leptomeninges to access the MCA for direct occlusion. Although surgery might contribute to the local presence of neutrophils in the leptomeninges, sham operation, where all the surgical procedures excepting cauterization of the MCA were carried out, induced a negligible presence of neutrophils at 24 h (Fig. 1c). To ensure that MCA cauterization was not the cause of neutrophil recruitment, we carried out direct occlusion of the MCA by means of a ligature. This procedure induced a large cortical infarction that was visually apparent when the brain was removed from the skull at 24 h, and abundant neutrophils were detected in the ipsilateral hemisphere by FACS (mean  $\pm$  SEM number of cells per ischemic cortex = 21,234  $\pm$  7,524, *n* = 3). Overall, this experiment showed that ischemia triggered neutrophil recruitment after direct occlusion of the MCA in the absence of reperfusion.

**Fig. 2** Neutrophils in the brain after cauterization of the MCA (c-MCAo). **a** Polymorphonuclear cells (PMNs) on the brain surface and reaching the Virchow–Robin space of an occluded cortical arteriole containing erythrocytes (*white*) in the vessel lumen. All the cell nuclei are stained with DAPI and the characteristic multi-lobular nucleus of PMNs is apparent surrounding the cortical arteriole. **b–m** NIMP-R14+ cells (*green*) and **n–u** Ly6G+ cells (*green*). **b–f** NIMP-R14+ leukocytes cross the glia limitans (GFAP *red*, pan-laminin *blue*) in the ipsilateral hemisphere at 6 h (**b**) and 15 h (**c, d**), but they are not seen in the contralateral hemisphere (**e, f**). **g** NIMP-R14+ cells located underneath the parenchymal basal lamina (*red* pan-laminin) along the vessel wall in cortical layer I after 6 h of ischemia. Images  $z_1$ – $z_3$  are confocal 1- $\mu$ m-thick sections along the *z* axis. **h–j** NIMP-R14+ cells (*arrowheads*) are seen on the parenchymal basal lamina of the ischemic cortex and along the vessels in the superficial cortical layers (**h**). A detail of the cells on the parenchymal cortical basal lamina is shown in (**i**) and the cellular invasion to the perivascular space of the cortical arterioles located in the core of infarction is illustrated in (**j**). *Red* is pan-laminin; *blue* shows all the cell nuclei with To-Pro3. **k** NIMP-R14+ cells lie on the endothelial basal lamina (EBL, *blue*,  $\alpha$ 4-laminin) that surrounds the endothelium (E, *red*, Glut-1). **l–m** NIMP-R14+ cells accumulate in perivascular spaces (*arrows*) and extravasate to the parenchyma of the infarcted core (*arrowheads*) while erythrocytes (*white* in **l**) remain in the vessel lumen. *Red* is pan-laminin. **n–o** Ly6G+ neutrophils surrounding and outside a large leptomeningeal vessel (**n**), and extravasated from a leptomeningeal vessel (**o**). Erythrocytes (*purple*) are contained inside the vessel lumen. *Blue* is PDGFR $\beta$ . **p, s** Neutrophils in the infarcted core located in the perivascular space between the endothelial (*red*,  $\alpha$ 4-laminin, EBL) and the parenchymal (*blue*, pan-laminin, PBL) basal laminae of blood vessels containing erythrocytes (*purple*) 24 h after MCAO. **q–r** Neutrophils surround the basal lamina of blood vessels (*red*, pan-laminin) in perivascular spaces and are free in the parenchyma of the infarcted core (*arrowheads*). **t–u** Neutrophils in perivascular spaces of a cortical vessel (**t**) and a leptomeningeal arteriole (**u**), and free (*arrowheads*) in the infarcted parenchyma. *Red* is  $\alpha$ 4-laminin and *blue* is To-Pro3. The time after c-MCAo is indicated in each panel. Number of mice at 6 h, 15 h and 24 h are 3, 3, and 6, respectively. *Bar scale* **a–g, i, k, m, p–u** 10  $\mu$ m; **j, o** 20  $\mu$ m; **h, n** 50  $\mu$ m

Neutrophils leave the circulation at the leptomeninges and invade perivascular spaces after c-MCAo

By confocal laser microscopy we found polymorphonuclear cells extravasated from leptomeningeal vessels, in the subpial space and on the parenchymal basal lamina of the ischemic cortex, and entering the Virchow–Robin spaces surrounding cortical vessels of the ischemic region 6 h after c-MCAo (Fig. 2a). We then studied these cells by immunofluorescence using NIMP-R14 (Fig. 2b–l) and Ly6G (Fig. 2m–t) antibodies. The NIMP-R14 antibody is widely used to study neutrophils, but in fact it recognizes Ly6G and also Ly6C, which is expressed not only by neutrophils but also by a subpopulation of monocytes and, therefore, can label infiltrating macrophages in addition to neutrophils. In contrast, the Ly6G+ cells are taken as neutrophils. Nonetheless, in the flow cytometry study we observed a subpopulation of Ly6G+ cells in the ischemic brain that were CD45+ but CD11b– (Fig. 1a) and, therefore, did not







conform to the typical neutrophil phenotype. Although in immunofluorescence the Ly6G antibody could recognize both Ly6G+ CD11b+ (neutrophils) and Ly6G+ CD11b– cells, only 4.5 % of the total Ly6G+ cells were CD11b– at 24 h post-ischemia according to the FACS analysis. This result showed that the majority of the Ly6G+ cells detected by immunofluorescence at 24 h should be neutrophils.

NIMP-R14+ cells were detected extravasated from leptomeningeal vessels of the ipsilateral hemisphere from 6 h following c-MCAo. NIMP-R14+ cells were seen around the cortical glia limitans in the proximity of the ischemic territory, and surrounding superficial cortical blood vessels located in the ischemic region (Fig. 2b–d), but not in the contralateral hemisphere (Fig. 2e, f). In the ischemic cortical territory, NIMP-R14+ cells were located in the perivascular spaces between the parenchymal basal lamina and the endothelium (Fig. 2g, k), and in many instances the shape of the cell nucleus was compatible with that of polymorphonuclear cells (e.g., Fig. 2g–z1). At 24 h, NIMP-R14+ cells were abundant in the leptomeninges and on the parenchymal cortical basal lamina of the ipsilateral hemisphere (Fig. 2h, i) and invading the cavities of cortical arterioles located in the infarcted core (Fig. 2j). They were also seen extravasated to the infarcted parenchyma (Fig. 2l, m), while erythrocytes remained in the vessel lumen in the absence of overt hemorrhagic transformation (Fig. 2l).

With the antibody against Ly6G (Fig. 2n–u) we identified positive cells outside leptomeningeal vessels and adjacent to the parenchymal basal lamina of the ischemic cortex (Fig. 2n, o). Ly6G+ cells were also seen in perivascular spaces of cortical vessels located between the parenchymal basal lamina (pan-laminin) and the endothelial basal lamina expressing  $\alpha$ 4-laminin (Fig. 2p, s). The parenchyma basal lamina seemed to contain the Ly6G+ cells during the early hours after MCAo, as previously reported [18]. After 24 h, Ly6G+ cells were seen perivascularly and also extravasated to the parenchyma of the infarcted core, near the vessels (Fig. 2q, t, u) and mainly in superficial cortical layers (Fig. 2u). Adhesion of intravascular NIMP-R14+ or Ly6G+ cells to post-capillary venules was occasionally observed, and these cells egressed to perivascular spaces and across the basal lamina (Supplementary Fig. 3a–d). In addition, we detected NIMP-R14+ and Ly6G+ cells in the lumen of occluded capillaries (Supplementary Fig. 3e–f), presumably corresponding to neutrophils stagnated in the vessels of the ischemic region.

Neutrophils after permanent intraluminal occlusion of the MCA (il-MCAo)

For comparative purposes we also studied the permanent il-MCAo model by confocal laser microscopy. Immunofluorescence showed NIMP-R14+ cells surrounding veins and arteries of the leptomeninges and on the cortical

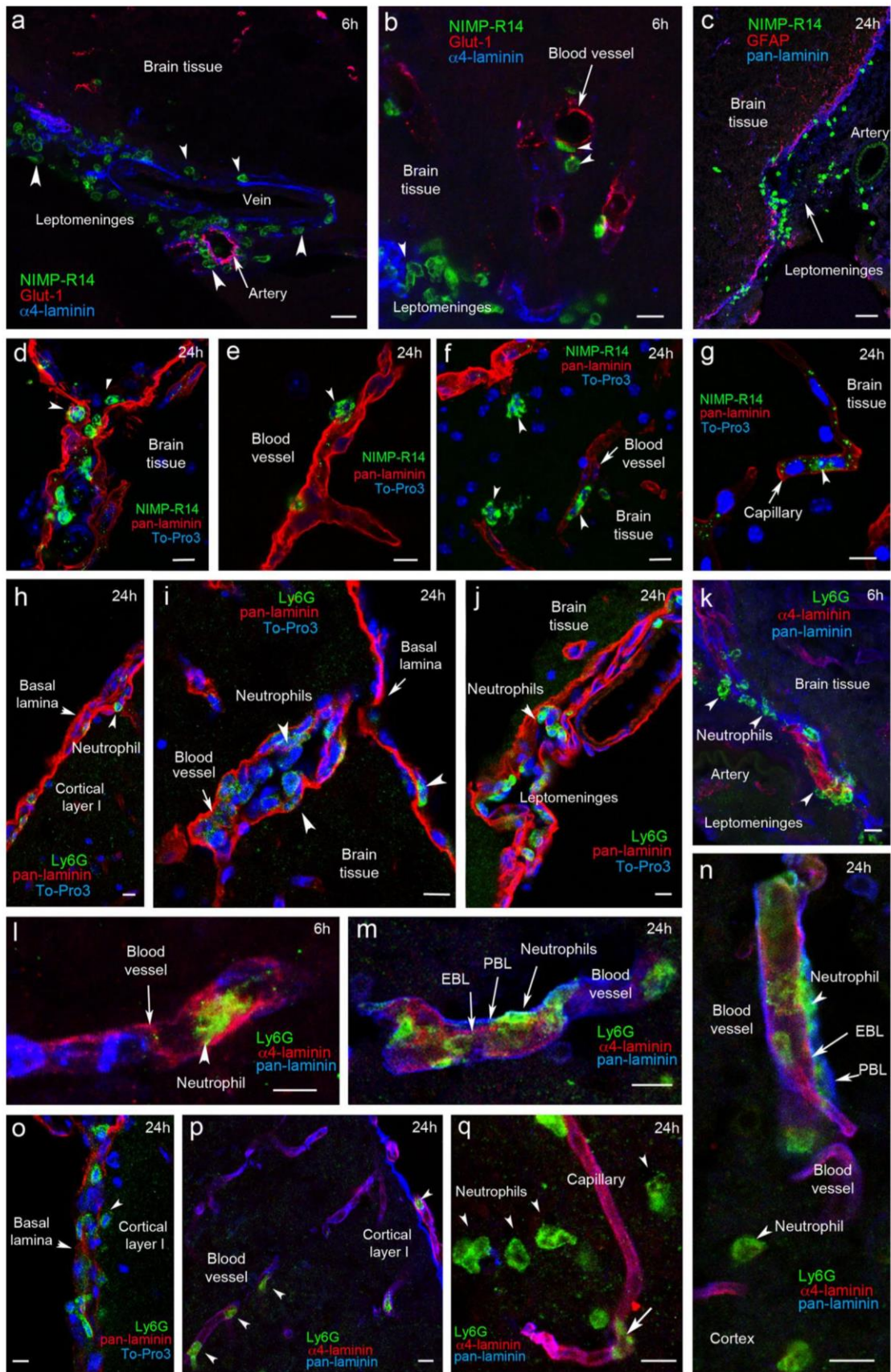
**Fig. 3** Neutrophils in the brain after permanent intraluminal MCAo (il-MCAo). **a–g** NIMP-R14+ cells (green) and **h–q** Ly6G+ cells (green). **a–b** NIMP-R14+ cells (arrowheads) are seen in the leptomeninges outside a vein (blue,  $\alpha$ 4-laminin) and an arteriole (red, Glut-1) at the ventral part of the brain and in the infarcted brain parenchyma. **c** A similar phenomenon is observed in this region after staining the glia limitans (red GFAP, blue pan-laminin). **d–g** NIMP-R14+ cells (blue are the nuclei; To-Pro3) are seen adjacent to the basal lamina (red, pan-laminin) of an arteriole in the dorsal cortex (**d**), nearby a small blood vessel (**e**), extravasated in the cortical parenchyma at the ventral part of the brain (**f**), and in the capillary lumen (**g**), where spread and punctuate staining is seen suggesting intravascular degranulation. **h–j** Ly6G+ neutrophils on the parenchymal basal lamina of the dorsal cortex (**h**), in perivascular spaces and lumen of a cortical arteriole (**i**), and in the ventral leptomeninges (**j**). Red (pan-laminin) shows the basal laminae, and blue shows the cell nuclei (To-Pro3). **k–n** Ly6G+ neutrophils are seen in the ventral leptomeninges (**k**), trapped in the lumen of a blood vessel in the ischemic striatum (**l**), and in perivascular spaces between the endothelial basal lamina (EBL red,  $\alpha$ 4-laminin) and the parenchymal basal lamina at the margins of the infarcted cortical region (PBL blue, pan-laminin) in the ventral part of the brain. **o** Ly6G+ neutrophils at the cortical parenchymal basal lamina (red pan-laminin) and in cortical layer I within the dorsal part of the brain at the margins of infarction. Cell nuclei are shown in blue (To-Pro3). **p–q** Neutrophils (arrowheads) along blood vessels in the dorsal cortex (**p**) and extravasated in the parenchyma in the ventral part of the brain (**q**). Red is  $\alpha$ 4-laminin and blue is pan-laminin. The time after il-MCAO is indicated in each panel. Number of mice at 6 and 24 h are 5 and 8, respectively. Bar scale in **a** 20  $\mu$ m, **b** 15  $\mu$ m, **c** 30  $\mu$ m, **d–q** 10  $\mu$ m

parenchymal basal lamina (Fig. 3a–c) from 6 h onwards, and in the perivascular spaces of large cortical vessels mainly at the margins of the ischemic core from 15 h (Fig. 3d). At 24 h, the NIMP-R14+ cells were observed not only perivascularly but also free in the cortical parenchyma in infarcted zones at the boundary of the infarcted core (Fig. 3e, f). However, in the infarcted striatum, NIMP-R14+ cells were less abundant and were mainly located in the lumen of capillaries (Fig. 3g). Although in some instances it was apparent that the nuclear morphology of the NIMP-R14+ cells was in compliance with that of neutrophils (e.g., arrowheads in Fig. 3d, e); we carried out a study using the neutrophil-specific Ly6G antibody. Ly6G+ cells were seen on the cortical parenchymal basal lamina (Fig. 3h, o), the perivascular spaces of cortical vessels (Fig. 3i), and extravasated from leptomeningeal vessels (Fig. 3j, k). Some Ly6G+ cells were trapped in brain capillaries (Fig. 3l), while others were found in the cortical perivascular spaces between the endothelial basal lamina ( $\alpha$ 4-laminin+) and the parenchymal basal lamina (Fig. 3m, n). Some Ly6G+ cells were seen in the cortical infarcted parenchyma (Fig. 3n, q).

Comparative regional location of neutrophils between the c-MCAo and the il-MCAo models

In the c-MCAo model, the distal portion of the MCA is occluded resulting in a cortical infarction (Fig. 4a).







Neutrophils were seen in the leptomeninges of the ipsilateral cortex and in the infarcted tissue, but were not detected in neighboring non-infarcted tissue (Fig. 4b, c). In the il-MCAo model, the MCA is occluded at its origin in the circle of Willis and the resulting infarction affects the cortex and the striatum (Fig. 4d). In this model, neutrophils were seen within the infarcted cortex and were more prominent at the boundaries of the cortical infarction than in the core. They were seen in cortical perivascular spaces and extravasated to the parenchyma in ventral and dorsal parts of the cortex (Fig. 4e–h). In the striatum, which lacks collateral flow, most Ly6G+ cells were located in the vessel lumen and extravasation to the infarcted parenchyma was very rare (Fig. 4i). Occasionally, a few neutrophils were seen in the choroid plexus and the surrounding white matter (Fig. 4j).

#### Neutrophils showed signs of activation in the ischemic brain

Neutrophils have granules containing proteases, such as neutrophil elastase (Supplementary Fig. 4). Upon activation, these enzymes are released to the extracellular environment after neutrophil degranulation. As part of their antimicrobial function, neutrophils are known to project extracellular traps (NETs) releasing enzymes, histones, and DNA out of the cells, and die through a distinctive process called NETosis [2]. Prior to releasing NETs, neutrophil enzymes access the cell nucleus and promote chromatin decondensation [42] involving histone modifications. Histone citrullination is believed to be a hallmark of NET formation [49]. To identify signs of NET formation in the ischemic brain, we used an antibody against citrullinated histone 3 (Cit-H3). No Cit-H3-positive reactions were seen in the control brain or in the contralateral hemisphere (not shown). However, in both experimental MCAo models some neutrophils showed Cit-H3-positive labeling (Fig. 4). Cit-H3 neutrophils became apparent after 24 h of ischemia but were rare at earlier time points. Cit-H3 + neutrophils were located in perivascular spaces (Fig. 4a), in the brain parenchyma nearby blood vessels (Fig. 5b), and in the lumen of capillaries (Fig. 4c). In the c-MCAo model, we estimated that about 15–20 % of the neutrophils were Cit-H3+ at 24 h, and were found in all of the different locations described above. However, in the il-MCAo model, most of the Cit-H3+ neutrophils were located intravascularly, particularly in the striatum.

By examining the DNA in the Cit-H3-positive neutrophils (Ly6G+) we found some evidence of NET formation in the ischemic cortex at 24 h (Fig. 4d–h). Certain Ly6G+ neutrophils showed the presence of DNA (DAPI) and Cit-H3 surrounding the cell body, suggesting projection of DNA and histones to the extracellular milieu (Fig. 4d).

**Fig. 4** Regional localization of neutrophils in the experimental MCAo models. The macroscopic appearance of the infarction is illustrated with MRI brain images (T2 maps) of mice 24 h after c-MCAo (a) and il-MCAo (d) showing a *pale area* corresponding to the infarcted region. *Squares* in the MRI images indicate the approximate zones from where the microscopic images were obtained. *Green* is Ly6G; *red* is pan-laminin in all panels excepting in panel j, which is Glut-1; *blue* illustrates the nuclei stained with ToPro-3. For the c-MCAo model ( $n = 6$ ), a cortical zone at the margin of infarction is shown in (b). The *dashed line* is drawn to indicate the margins of infarction as assessed from the apparent difference in intensity of blood vessel basal lamina staining with pan-laminin. Ly6G+ neutrophils are abundant at the leptomeninges (*arrow*), and are only seen in the cortex (*arrowhead*) within the infarcted region. c Cortical infarcted region showing abundant Ly6G+ neutrophils in the leptomeninges (*arrow*) and in the cortex (*arrowhead*). For the il-MCAo model ( $n = 8$ ), neutrophils are seen in the leptomeninges and mainly in marginal zones of the infarcted tissue as illustrated with images corresponding to the dorsal (e), lateral (f), and ventral (g, h) parts of the cortex, where neutrophils are seen associated to the parenchymal basal lamina or vessels (*arrows*), and are also seen free in the parenchyma (*arrowheads*). Neutrophils in the striatum (i) are mainly seen inside the vasculature (*i1, i2*) and only very rarely they are free in the infarcted striatal parenchyma (*arrowhead* in *i3*). Occasionally, neutrophils (*arrowheads*) are seen in the choroid plexus (*arrow*) (*j1*) and surrounding white matter (*j2*) in mice with very large infarctions. *Bar scale* 30  $\mu\text{m}$  (excepting in *e1, e3, g1, i2, i3, and j2* 15  $\mu\text{m}$ )

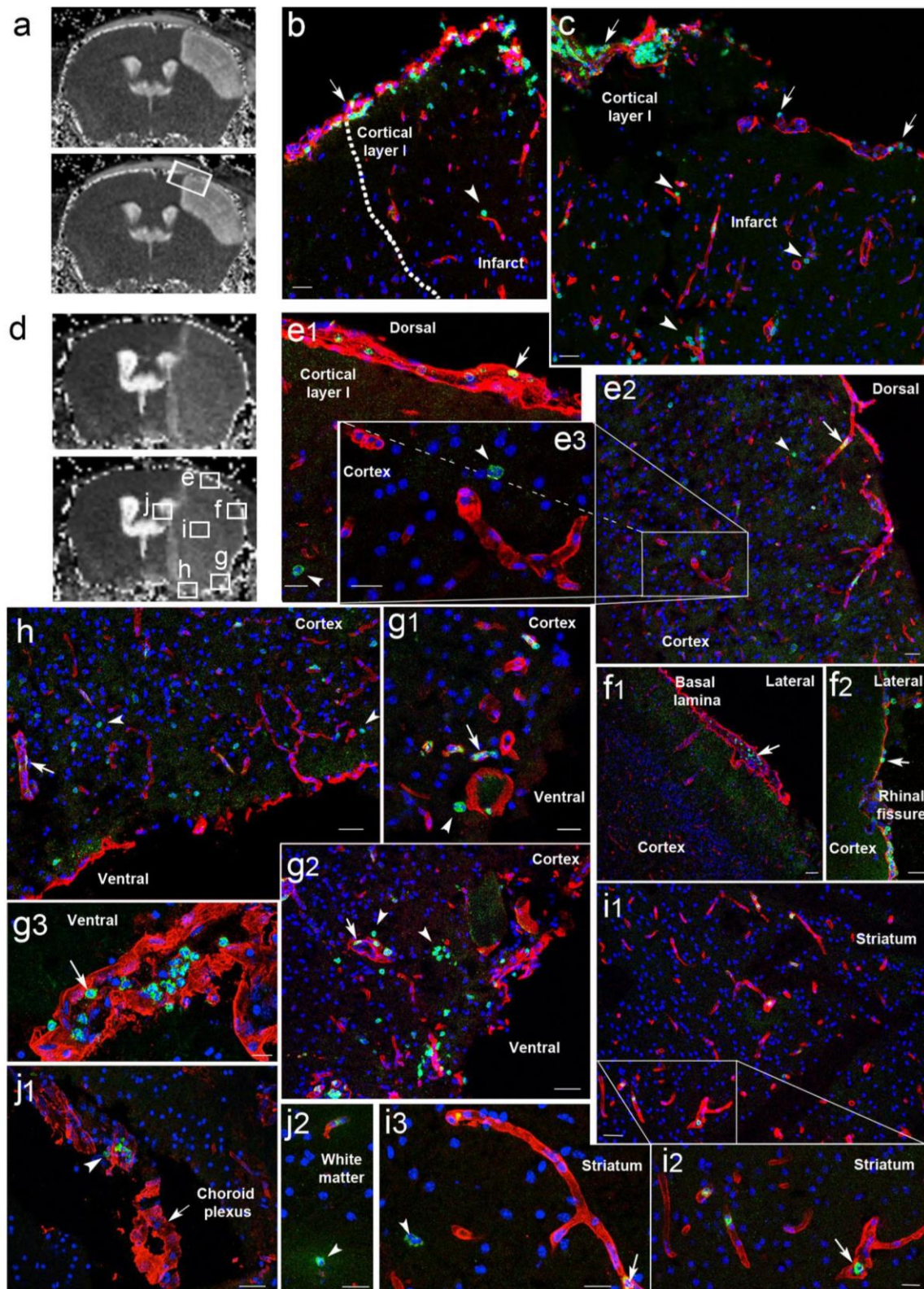
Other Cit-H3+ neutrophils lost their typical lobular nuclei and showed diffuse DNA staining indicative of chromatin decondensation (Fig. 4e). Extracellular DNA and histones were also observed adjacent to neutrophils located inside the capillary lumen (Fig. 4f). Occasionally NET-like structures were seen surrounding pericytes (PDGFR $\beta$ +) (Supplementary Fig. 5), suggesting that NETs might damage components of the BBB. Altogether, the confocal images strongly supported that after prolonged ischemia some neutrophils can expel DNA and other intracellular components out of the cells indicative of NET formation.

We searched for some evidence of caspase-dependent apoptosis by immunostaining for active caspase-3. Caspase-3+ cells were detected in the ischemic tissue but they did not co-localize with neutrophil markers (not shown). Although we cannot exclude that neutrophils undergoing cell death might down-regulate the typical membrane markers preventing their identification, our results provide evidence of NETosis and do not support that caspase-dependent apoptosis is involved in neutrophil death during the first 24 h of ischemia.

#### Neutrophils in the postmortem brain of stroke patients

We investigated the brain of three stroke patients that died within 1–5 days after stroke onset (see Table 2 for clinical case description and Supplementary Fig. 1 for illustration of intracranial occlusion sites). In all of the patients, conventional histological staining (hematoxylin and eosin) of





paraffin-embedded brain sections showed the presence of polymorphonuclear cells with typical features of neutrophils in the leptomeninges surrounding the ischemic tissue

(Fig. 6a, e, g), but not in the leptomeninges located in distant non-affected areas (Fig. 6b). In the ischemic tissue, polymorphonuclear cells were found in perivascular spaces



of brain vessels (Fig. 6c, d, f, h) and, to a lesser extent, free in the infarcted parenchyma (Fig. 6d, f, h), particularly at the boundaries of the infarcted tissue. Immunostaining of paraffin sections with myeloperoxidase (MPO) showed positive cells in the leptomeninges and the ischemic tissue, where they were seen inside the vessels, in perivascular spaces, and to a lesser extent, in the parenchyma (Supplementary Fig. 6).

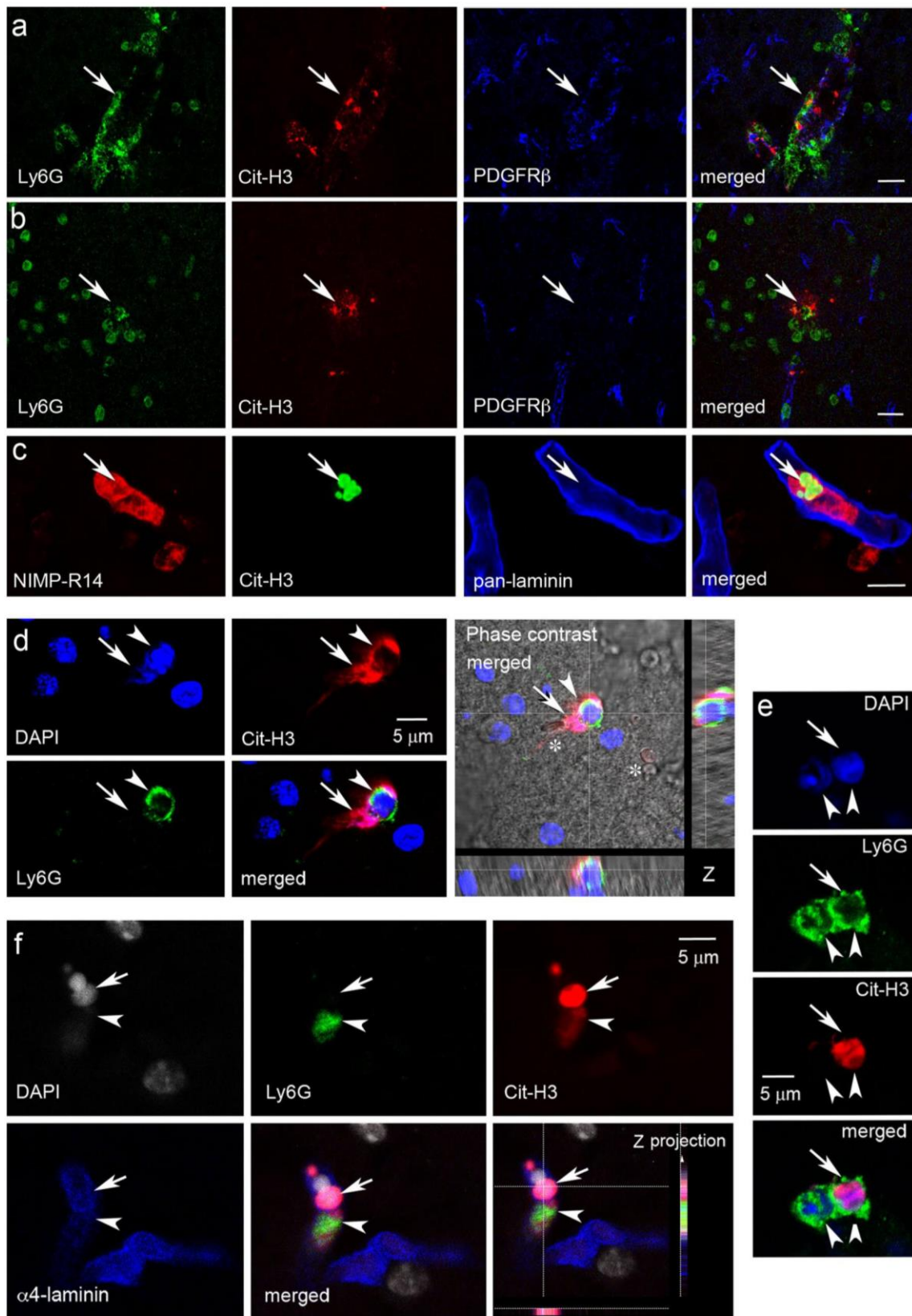
Cryostat sections were stained for neutrophil elastase (NE) together with laminin. We observed NE + cells in three different locations, i.e., intravascular (Fig. 7a), perivascular (Fig. 7b), and extravascular (Fig. 7c, d). MPO and NE co-localized in the same cells (Fig. 7e). We counted the numbers of NE+ cells in each of the above locations (Fig. 7f–h) within different brain regions: the core of infarction, the periphery, and a control non-affected region distant from the infarction, and in the leptomeninges surrounding ischemic and non-affected zones. The number of intravascular NE+ cells (Fig. 7f) was higher in the infarcted tissue and surrounding the leptomeninges than in the corresponding non-affected regions, but differences were only statistically significant for the leptomeninges (Fig. 7f). NE+ cells were also seen in perivascular spaces (Fig. 7g) and, to a lesser extent, free in the parenchyma within the infarct (Fig. 7h); but differences did not reach statistical significance when compared to the non-affected (control) regions presumably due to the small number of patients and intra-group variability. Extravasated NE+ cells were detected in the leptomeninges surrounding the ischemic tissue, with statistically significant differences compared to distant leptomeninges (Fig. 7h).

## Discussion

Neutrophils play an essential function in building up a rapid innate immune response against invading pathogens, but can also damage the tissues due to their high proteolytic enzyme content and capacity of generating reactive oxygen intermediates [27] and activating the complement system [41]. Therefore, neutrophil activation must be tightly regulated to avoid uncontrolled release of its intracellular content. Leukocyte access to the brain is prevented by the BBB, but under pathological conditions leukocytes can adhere to activated post-capillary venules and infiltrate the brain parenchyma across the BBB [17]. However, in ischemic stroke, blood flow is arrested and peripheral leukocytes cannot reach the ischemic territory through the circulation, unless they accessed it through collateral blood vessels, peripheral regions, or after the occluded vessels are reperfused. This is why it is generally believed that neutrophils play a more prominent role in ischemia/reperfusion than in permanent ischemia. In this study we found that

**Fig. 5** Some neutrophils show histone-3 citrullination (Cit-H3) 24 h after MCAo. **a–b, d–e** c-MCAo model ( $n = 6$ ) and **c, f** il-MCAo model ( $n = 8$ ). **a–c** Cit-H3+ neutrophils are seen at perivascular locations (**a**) and extravascular (**b**) in the infarcted cortex, but they are located inside blood capillaries in the infarcted striatum (**c**). The shape of the vessels (*blue*) is apparent after staining PDGFR $\beta$  (**a, b**), which labels the surrounding pericytes, or pan-laminin (**c**) labeling the basal lamina. **d** Illustrates a neutrophil (*green*, Ly6G+) (*arrowhead*) showing histone-3 citrullination (*red*, Cit-H3) extending outside the cell body together with DNA (*blue*, DAPI) (*arrow*). The phase contrast image merged with the fluorescence images and z-projections is shown on the right to illustrate co-localization of markers in the same cell. The neutrophil extracellular projections were occasionally directed towards isolated dense elements with a shape and size compatible with isolated erythrocytes (*asterisk*) free in the parenchyma. **e** Two neutrophils (*green*, Ly6G+) (*arrowheads*), one of them (*left*) shows a polymorphonuclear structure with DAPI staining (*blue*), while the other (*right, arrow*) shows a diffuse nuclear structure indicative of chromatin decondensation and is positive for Cit-H3 (*red*). **f** A neutrophil (*green*, Ly6G+) (*arrowhead*) inside a capillary (*blue*,  $\alpha$ 4-laminin) is positive for Cit-H3 (*red*) and shows most of the DNA (*white*, DAPI) and Cit-H3 outside the cell (*arrow*) forming structures suggestive of intravascular NETosis. Bar scale **a, b** 20  $\mu$ m; **c** 10  $\mu$ m; **d–f** 5  $\mu$ m

the numbers of neutrophils present in the ischemic territory increased with time after permanent MCAo in rodents, in agreement with previous studies [8, 22]. Although we found evidence of neutrophil adhesion to the walls of post-capillary venules, we report that a major pathway through which neutrophils can invade the ischemic tissue during the arterial occlusion is via leaving the circulation at the leptomeningeal vessels. Neutrophils were seen in perivascular spaces of cortical arterioles. Inflammatory cells in the subarachnoid space are able to cross the pia matter and access the subpial space under certain pathological conditions [28]. From the subpial space the cells can reach the parenchymal basal lamina of the cortex and the perivascular spaces of cortical arterioles, since the Virchow–Robin space is communicated to the subpial space [28, 37, 54]. A previous intravital microscopy study showed the presence of rolling and adherent leukocytes in pial venules and in arterioles of the ischemic tissue after permanent focal cerebral ischemia in mice [33]. Our study identified neutrophils in these locations but has the limitation that the results were obtained from static microscopic images. In vivo imaging studies will be required to provide a full demonstration of the impact of this trafficking pathway in neutrophil recruitment after stroke. The presence of polymorphonuclear cells in the subarachnoid space, as assessed by classic histology, was reported after permanent intraluminal MCAo in rats [22], and a previous study in mice found Ly6G+ neutrophils in the leptomeninges and perivascular spaces after ischemia/reperfusion in mice [18]. Our results confirm the latter findings showing that the perivascular spaces are a niche for neutrophils after brain ischemia, and extend the





findings to the situation of permanent ischemia showing that neutrophil extravasation at the leptomeninges provides a pathway for neutrophil recruitment to the ischemic cortical territory in the absence of reperfusion.

Typically, bacterial meningitis causes massive neutrophil infiltrates in the leptomeninges and intraparenchymal vasculitis is characterized by perivascular neutrophil infiltration [28, 35]. Although the effect is comparatively much more modest after stroke, some underlying molecular mechanism could be similar. Indeed, neutrophils sense the presence of pathogens but they also respond to danger signals and chemoattractants under sterile inflammation [7]. After stroke, chemokines and danger signals are released to the extracellular space [6, 30]. Interstitial fluid can drain through the perivascular spaces of cortical arterioles towards the leptomeninges and out of the brain [5, 11, 25, 50]. However, perivascular drainage appears to be mediated by arterial vessel pulsations [26] and it was found to be impaired during experimental ischemia [3]. This finding suggests that during ischemia the perivascular spaces of cortical arterioles might accumulate signals capable of attracting neutrophils. We found neutrophils in perivascular spaces of cortical ischemic regions but not in the infarcted striatum. The anatomy of the periarterial spaces in the basal ganglia differs from that in the cerebral cortex [44], and the terminal vessels supplying blood to the subcortical regions lack collateral blood flow with adjacent arteries. In contrast, pial arterioles on the cortical surface form a rich anastomotic network. Regional differences in the anatomic structure of the specific vascular beds may condition the process of interstitial fluid drainage and the regional capacity to allow trafficking of inflammatory cells during the arterial occlusion.

Neutrophils progressively accumulated in the perivascular spaces as the duration of ischemia increased and the parenchymal basal lamina seemed to act as a containment barrier preventing the free passage of the neutrophils to the parenchyma, as was previously reported after ischemia/reperfusion [18]. However, after long periods of ischemia, we detected neutrophils extravasated to the cortical parenchyma, as previously described by classical histology after 12 h of permanent intraluminal MCAo in rats [22]. Although isolated erythrocytes were occasionally detected in the parenchyma within the infarcted core at 24 h likely due to capillary damage, the presence of neutrophils in the cortical parenchyma was observed in the absence of hemorrhagic transformation. Activated neutrophils cause vascular damage by generating oxidative stress [27] and complement activation [47], and neutrophil elastase enhances vascular permeability and is involved in ischemic brain damage [48]. It is feasible that perivascular neutrophils accessed the parenchyma after some of them suffered NETosis, involving the loss of their typical nuclear morphology,

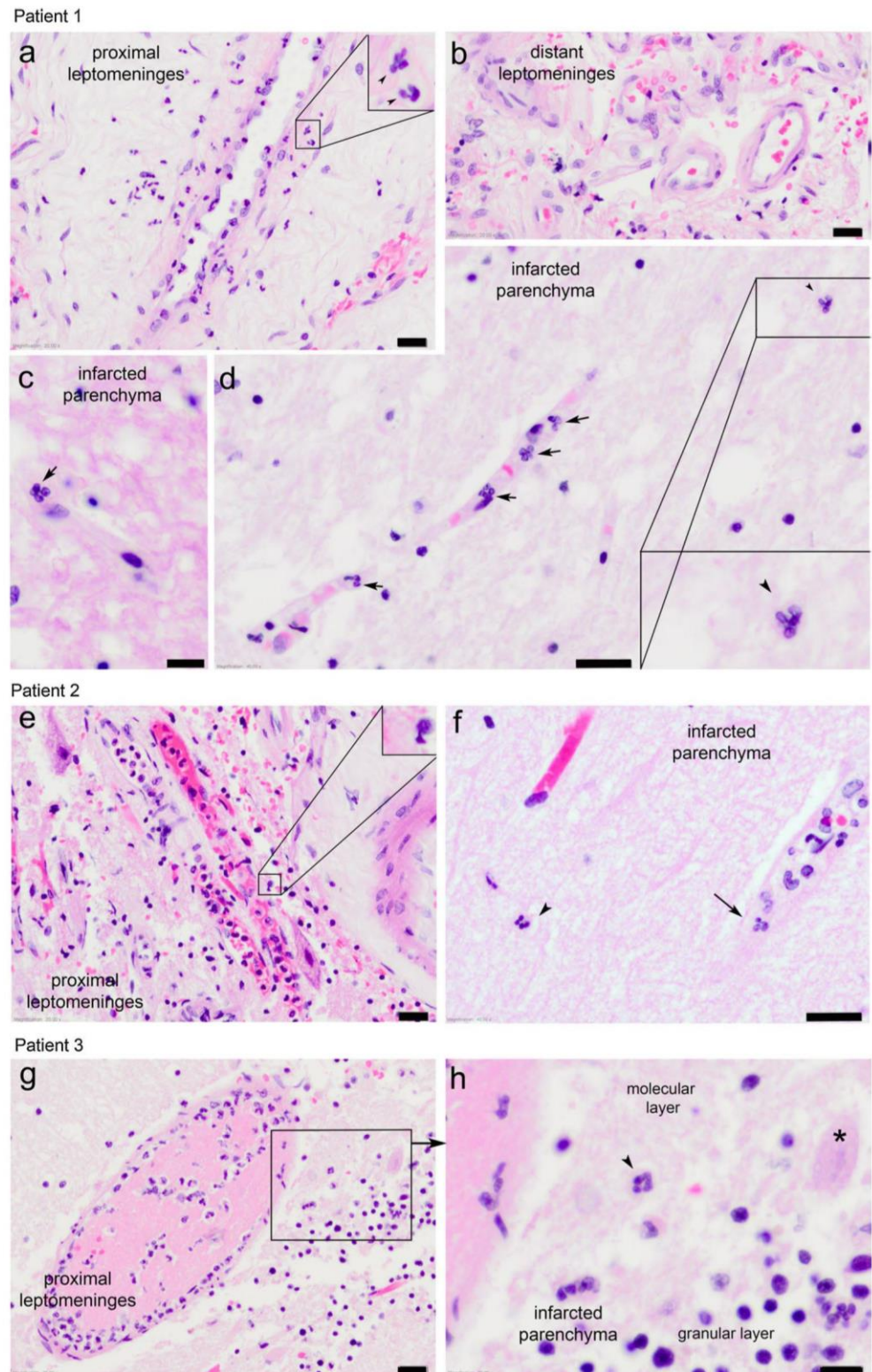
release of their content and cell death [2, 42]. Although the triggers of such changes are currently unknown, sustained hypoxia, or extravasation of plasma components or erythrocytes might play a role. Neutrophils were also found in the capillary lumen within the ischemic area in the cortex and striatum, likely remaining in the blood stagnated in the vessels after the arterial occlusion. After prolonged periods of ischemia, these intraluminal neutrophils also showed signs of NETosis. NETs formed in the blood promote coagulation and thrombosis [20, 38]. Therefore, intravascular NETosis might induce secondary microthrombosis. These events might be relevant for delayed restoration of reperfusion when the duration of ischemia is long enough to allow intravascular NETosis to take place, and could contribute to the no-reflow phenomenon.

In this study, neutrophils were more abundant after c-MCAo than after il-MCAo. Although this observation could suggest that the surgery was involved in attracting neutrophils, such an effect was not seen after sham operation, pointing to brain ischemia as the driver of neutrophil recruitment. Experimental stroke models normally involve surgery causing mechanical injuries to the tissues or arteries that could contribute to neutrophil recruitment. Alternatively, neutrophils can strongly respond to post-surgical local infection. However, neutrophils were found in the ischemic brain after taking high precaution in sterilizing surgical material and working under clean conditions, and they were focally localized in the ischemic zone. Furthermore, the mild functional deficits [43] and good general status of the mice after c-MCAo argue against the possibility of meningeal infection. Several differences in the ischemia models might account for the differences in neutrophil infiltration. il-MCAo induces occlusion of the entire MCA tree, while only the distal portion of the MCA is occluded in the c-MCAo model. Therefore, the leptomeningeal branches of the proximal portion of the MCA are patent after c-MCAo and can supply neutrophils to the anastomotic network of pial arteries near the cortical infarction. In contrast, in the il-MCAo model, the access of neutrophils to the leptomeninges of the ischemic territory would be limited to possible anastomoses of pial arterioles with branches from the external carotid artery and with collateral vessels from other arterial trees. Another important difference between these experimental models is the intracranial pressure that can develop after il-MCAo due to edema, which is comparatively negligible after c-MCAo as a consequence of partial craniectomy. It is possible that increased edema and intracranial pressure in this model would impair neutrophil trafficking to the core of the cortical ischemic region.

In human stroke, we identified the presence of polymorphonuclear cells in the leptomeninges proximal to infarction and in perivascular spaces of the ischemic tissue, but

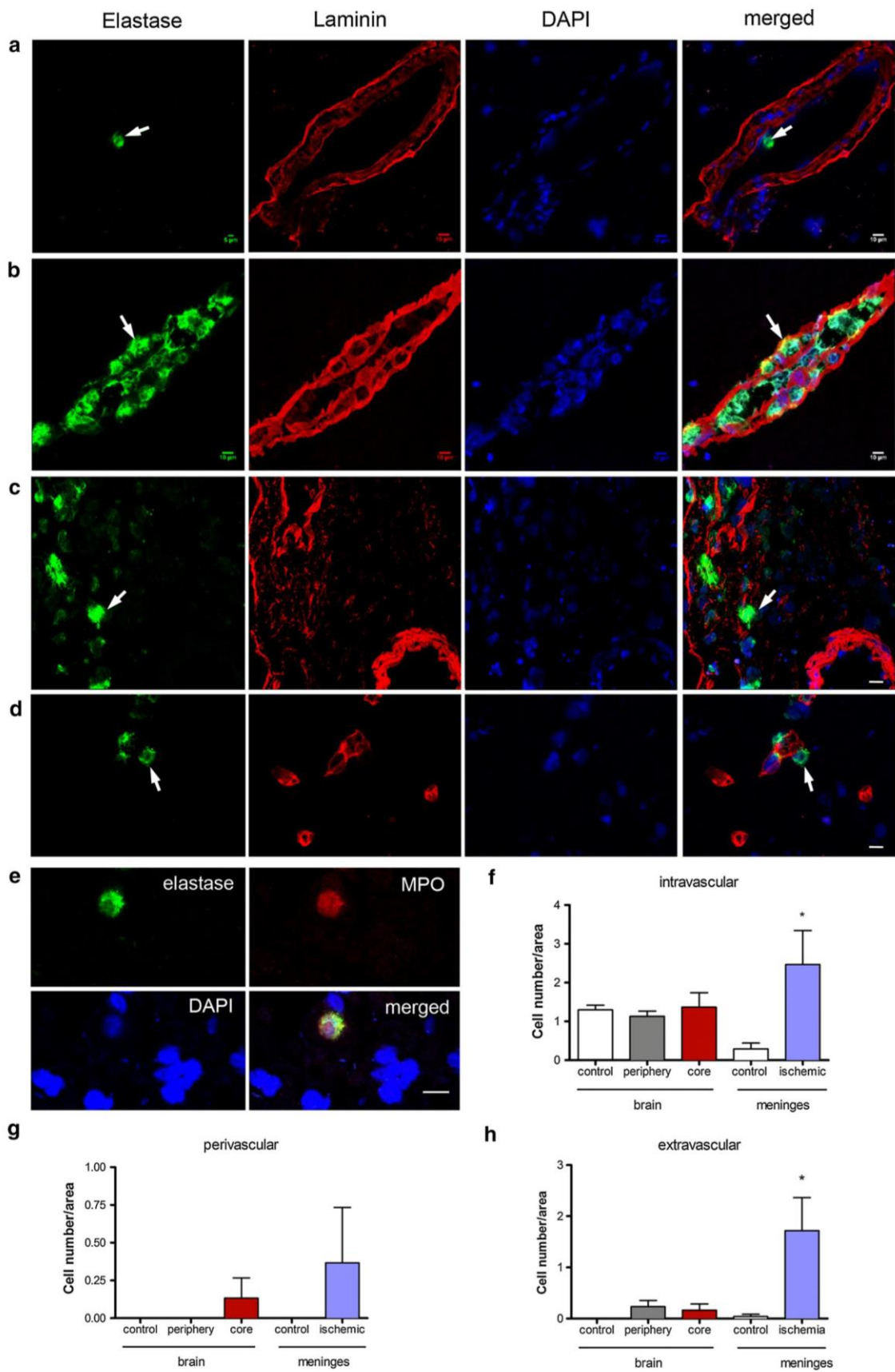


**Fig. 6** Polymorphonuclear cells in human stroke. Representative hematoxylin and eosin paraffin sections of the 3 stroke patients: **a–d** patient 1; **e, f** patient 2; **g, h** patient 3. **a** Leptomeninges nearby the infarcted region. Dark purple cells morphologically compatible with polymorphonuclear cells (PMNs) are abundant in the leptomeninges adjacent to the infarction. **b** PMNs are not apparent in the leptomeninges adjacent to non-affected tissue and distant from the infarction. **c, d** PMNs are seen in the vessels (*arrows*) and in marginal zones of the infarcted parenchyma (*arrowhead*) in the temporal lobe. **e** PMNs are seen in the leptomeninges proximal to the infarcted core in the cerebellum. **f** PMNs are seen associated to blood vessels (*arrow*) and extravasated from the vasculature (*arrowhead*). **g** PMNs located inside and surrounding a large meningeal vessel in the cerebellum. The *inset* is magnified in **h** showing the adjacent infarcted cerebellar parenchyma where an extravasated PMN is seen in the molecular cell layer. The *asterisk* indicates a red hypoxic Purkinje cell. *Insets* illustrate the cells in more detail after magnification of the area inside the box in each picture ( $\times 2$  in **d**;  $\times 2.5$  in **a**;  $\times 3$  in **e**). *Bar scale* (**a, b, d–g**) 20  $\mu\text{m}$ ; (**c, h**) 10  $\mu\text{m}$



not in the non-affected territories. Cells with the characteristic morphology of neutrophils carrying the typical enzymes MPO and neutrophil elastase were seen in perivascular spaces of the infarcted tissue and to a lower

extent extravasated from the vessels, but their numbers were comparatively more discrete than in the surrounding leptomeninges. In the human cases we have some evidence of permanent arterial occlusions but we are not certain





◀ **Fig. 7** Neutrophil elastase positive cells in human stroke. **a–d** Staining is shown for neutrophil elastase (green), laminin (red), DAPI (blue), and the merged images. **a** Unaffected non-ischemic brain region showing an intravascular elastase + cell (arrow). **b** Infarcted core region showing perivascular elastase + cells (arrow). **c** Elastase + cells extravasated at the meninges proximal to the ischemic tissue (arrow). **d** Elastase + cells extravasated from a vessel (arrow). **e** Double staining with neutrophil elastase and myeloperoxidase (MPO) show colocalization in the same cell. **a** is from patient number 2; **b** is from patient number 3; **c–e** are from patient number 4. **f–h** Quantification of the number of neutrophil elastase + cells per area in brain sections according to their intravascular, perivascular, or extravascular localization shows the values corresponding to a control non-affected region, the periphery of infarction, and the core of infarction, as well as the zone of the leptomeninges proximal to the core (ischemic) or to a non-affected region (control). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM for  $n = 3$  patients. There was a non-significant trend to higher neutrophil elastase + cell numbers/area in the core region versus the corresponding control region. A significant increase in neutrophil elastase + cell numbers/area was found in the meninges adjacent to the ischemic tissue versus the meninges adjacent to the non-affected brain tissue. \* $p < 0.05$ . Bar scale 10  $\mu$ m

about the precise status of blood flow at the time of death since imaging studies for research purposes cannot often be performed in critical stroke patients. This fact may be an important confounding factor given that, from the animal results, we would only expect substantial neutrophil infiltration to the parenchyma through the leptomeninges pathway after prolonged periods of ischemia. Nevertheless, the majority of patients that do not recanalize in the acute phase of stroke have long-lasting occlusions [39, 46, 51]. Although the small number of stroke patients and the heterogeneity of the infarcted territories are limitations of this study, we detected neutrophils in the leptomeninges proximal to the infarction in all the patients. This finding is a proof of concept that our experimental results could be relevant to human stroke.

In summary, we showed that during MCAo, neutrophils reached cortical brain territories devoid of blood flow after extravasating from leptomeningeal vessels surrounding the infarcted tissue and reaching the cortical parenchymal basal lamina as well as the perivascular spaces of cortical arterioles. After prolonged periods of ischemia, neutrophils became activated showing signs of NET formation inside the vessel lumen and around the blood vessels suggesting that the neurovascular unit is a target of action of neutrophils in stroke. The presence of neutrophils in the leptomeninges surrounding the infarcted regions was confirmed in postmortem human brain tissue supporting that this pathway is also relevant for neutrophil recruitment in human ischemic stroke.

**Acknowledgments** Supported by the Spanish Ministries of Economy (SAF2011-30492) and Health (FIS PI12/01437), and FP7 EU projects ERANET-NEURON (PRI-PIMNEU-2011-1342) and InMIND (grant agreement no 278,850). We acknowledge Alba

Hernández, Unai Perpiñá and Ana Guerrero for technical assistance. We thank the Cytometry and Image Platforms of IDIBAPS, and Dr. Maria Calvo and Anna Bosch of the Confocal Microscopy Unit of the *Serveis Científico-Tècnics* of the University of Barcelona for technical advice and support. We are indebted to the Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clinic-IDIBAPS for sample and data procurement, and to patient's relatives for giving consent to this study. We thank Dr. Vanessa Brait for helpful comments and editing.

**Conflict of interest** The authors declare no disclosures.

## References

- Allen C, Thornton P, Denes A, McColl BW, Pierozynski A, Monestier M, Pintaux E, Rothwell NJ, Allan SM (2012) Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA. *J Immunol* 189:381–392
- Amulic B, Hayes G (2011) Neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 21:R297–R298
- Arbel-Ornath M, Hudry E, Eikermann-Haerter K, Hou S, Gregory JL, Zhao L, Betensky RA, Frosch MP, Greenberg SM, Bacskai BJ (2013) Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol* 126:353–364
- Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE (1991) Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 29:336–345
- Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JA, Perry VH, Weller RO (2008) Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:131–144
- Chamorro A, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R (2012) The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8:401–410
- Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826–837
- Chu HX, Kim HA, Lee S, Moore JP, Chan CT, Vinh A, Gelderblom M, Arumugam TV, Broughton BR, Drummond GR, Sobey CG (2014) Immune cell infiltration in malignant middle cerebral artery infarction: comparison with transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:450–459
- Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA (1991) Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J Neurosurg* 75:623–627
- Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97:209–216
- Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM (1992) Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol* 2:269–276
- Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí AL, Lizasoain I, Moro MA (2013) N2 Neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone. *Stroke* 44:3498–3508
- de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C, Durduran T, Chamorro Á, Planas AM (2014) Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke* 45:1453–1459

14. del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:879–894
15. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22:1276–1283
16. Dirks M, Niessen LW, Huijsman R, van Wijngaarden J, Minkman MM, Franke CL, van Oostenbrugge RJ, Koudstaal PJ, Dippel DW, PROMoting ACute Thrombolysis in Ischemic Stroke (PRACTISE) Investigators (2007) Promoting thrombolysis in acute ischaemic stroke. *Int J Stroke* 2:151–159
17. Engelhardt B, Ransohoff RM (2005) The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 26:485–495
18. Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng YJ, Ghavam-pour S, Hannocks MJ, Prinz V, Dirnagl U, Endres M, Prinz M, Beschorner R, Harter PN, Mittelbronn M, Engelhardt B, Sorokin L (2013) The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 125:395–412
19. Fridlender ZG, Albelda SM (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33:949–955
20. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15880–15885
21. Garcia JH, Liu KF, Bree MP (1996) Effects of CD11b/18 monoclonal antibody on rats with permanent middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 148:241–248
22. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ (1994) Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 144:188–199
23. Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40:1849–1857
24. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ (1986) Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17:246–253
25. Hawkes CA, Härtig W, Kacza J, Schliebs R, Weller RO, Nicoll JA, Carare RO (2011) Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 121:431–443
26. Hawkes CA, Jayakody N, Johnson DA, Bechmann I, Carare RO (2014) Failure of perivascular drainage of  $\beta$ -amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Brain Pathol* 2:396–403
27. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN (1987) Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253:H699–H703
28. Hutchings M, Weller RO (1986) Anatomical relationships of the pia mater to cerebral blood vessels in man. *J Neurosurg* 65:316–325
29. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR (2010) Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1412–1419
30. Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17:796–808
31. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A (2013) Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol* 35:377–394
32. Jiang N, Chopp M, Chahwala S (1998) Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 788:25–34
33. Kataoka H, Kim SW, Plesnila N (2004) Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:668–676
34. Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA; ASTIN Study Investigators (2003) Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke* 34:2543–2548
35. Malipiero U, Koedel U, Pfister HW, Levéen P, Bürki K, Reith W, Fontana A (2006) TGFbeta receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain* 129:2404–2415
36. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11:519–531
37. Marín-Padilla M, Knopman DS (2011) Developmental aspects of the intracerebral microvasculature and perivascular spaces: insights into brain response to late-life diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:1060–1069
38. Massberg S, Gahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16:887–896
39. Meves SH, Muhs A, Federlein J, Buttner T, Przuntek H, Postert T (2002) Recanalization of acute symptomatic occlusions of the internal carotid artery. *J Neurol* 249:188–192
40. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM (2009) Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 30:522–530
41. Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev Immunol* 6:173–182
42. Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30:513–521
43. Pérez-de Puig I, Miró F, Salas-Perdomo A, Bonfill-Teixidor E, Ferrer-Ferrer M, Márquez-Kisinousky L, Planas AM (2013) IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1955–1966
44. Pollock H, Hutchings M, Weller RO, Zhang ET (1997) Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain: their relationship to lacunes. *J Anat* 191:337–346
45. Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ (1999) CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 30:1110–1117
46. Rha JH, Saver JL (2007) The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 38:967–973
47. Rørvig S, Honore C, Larsson LI, Ohlsson S, Pedersen CC, Jacobsen LC, Cowland JB, Garred P, Borregaard N (2009) Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol* 86:1439–1449
48. Stowe AM, Adair-Kirk TL, Gonzales ER, Perez RS, Shah AR, Park TS, Gidday JM (2009) Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion. *Neurobiol Dis* 35:82–90
49. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA (2009) Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 184:205–213
50. Weller RO, Kida S, Zhang ET (1992) Pathways of fluid drainage from the brain—morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol* 2:277–284

51. Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D (1995) Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke* 26:430–433
52. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH (1994) Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125:3–10
53. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probst J, Manning AM, Anderson DC (1995) Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 26:1438–1442
54. Zhang ET, Inman CB, Weller RO (1990) Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow–Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat* 170:111–123



**CNS-BORDER ASSOCIATED MACROPHAGES  
RESPOND TO ACUTE ISCHEMIC STROKE  
ATTRACTING GRANULOCYTES AND PROMOTING  
VASCULAR LEAKAGE**

**Jordi Pedragosa**, Angélica Salas-Perdomo, Mattia Gallizioli, Roger Cugota, Francesc Miró-Mur, Ferran Briansó, Carles Justicia, Fernando Pérez-Asensio, Leonardo Marquez-Kisinousky, Xabier Urra, Anna Gieryng, Bozena Kaminska, Angel Chamorro and Anna M. Planas

Acta Neuropathologica Communications (2018);

6(1):76. doi: 10.1186/s40478-018-0581-6.





RESEARCH

Open Access



# CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage

Jordi Pedragosa<sup>1,2</sup>, Angélica Salas-Perdomo<sup>1</sup>, Mattia Gallizioli<sup>1,2</sup>, Roger Cugota<sup>1,7</sup>, Francesc Miró-Mur<sup>2,3</sup>, Ferran Briansó<sup>4,5</sup>, Carles Justicia<sup>1,2</sup>, Fernando Pérez-Asensio<sup>1</sup>, Leonardo Marquez-Kisinousky<sup>1</sup>, Xabier Urra<sup>2,6</sup>, Anna Gieryng<sup>6</sup>, Bozena Kaminska<sup>6</sup>, Angel Chamorro<sup>2,6</sup> and Anna M. Planas<sup>1,2\*</sup> 

## Abstract

The central nervous system (CNS) contains several types of immune cells located in specific anatomic compartments. Macrophages reside at the CNS borders surrounding the brain vessels, in leptomeningeal spaces and the choroid plexus, where they interact with the vasculature and play immunological surveillance and scavenging functions. We investigated the phenotypic changes and role of these macrophages in response to acute ischemic stroke. Given that CD163 expression is a hallmark of perivascular and meningeal macrophages in the rat and human brain, we isolated CD163<sup>+</sup> brain macrophages by fluorescence activated cell sorting. We obtained CD163<sup>+</sup> cells from control rats and 16 h following transient middle cerebral artery occlusion, after verifying that infiltration of CD163<sup>+</sup> peripheral myeloid cells is negligible at this acute time point. Transcriptome analysis of the sorted CD163<sup>+</sup> cells identified ischemia-induced upregulation of the hypoxia inducible factor-1 pathway and induction of genes encoding for extracellular matrix components and leukocyte chemoattractants, amongst others. Using a cell depletion strategy, we found that CNS border-associated macrophages participate in granulocyte recruitment, promote the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), increase the permeability of pial and cortical blood vessels, and contribute to neurological dysfunction in the acute phase of ischemia/reperfusion. We detected VEGF expression surrounding blood vessels and in some CD163<sup>+</sup> perivascular macrophages in the brain tissue of ischemic stroke patients deceased one day after stroke onset. These findings show ischemia-induced reprogramming of the gene expression profile of CD163<sup>+</sup> macrophages that has a rapid impact on leukocyte chemotaxis and blood-brain barrier integrity, and promotes neurological impairment in the acute phase of stroke.

**Keywords:** Perivascular macrophages, Subpial macrophages, Hypoxia, Leukocytes, Brain, Ischemia

## Introduction

The central nervous system (CNS) contains different subsets of myeloid cells under steady-state conditions. Microglia reside in the brain parenchyma whereas macrophages

remain at the CNS borders. CNS border-associated macrophages (BAMs) include cells resident in the perivascular spaces of brain vessels, lining the meninges, and the choroid plexus. BAMs carry out scavenger functions and are fully competent to present antigen to lymphocytes [6, 12, 27, 34, 37]. BAMs derive from hematopoietic progenitors that populate the brain at embryonic stages and are not replaced by bone-marrow derived cells under physiological conditions [18, 19]. Little is known about the function of BAMs under pathological conditions but several lines of evidence support their involvement in the

\* Correspondence: [anna.planas@iibb.csic.es](mailto:anna.planas@iibb.csic.es)

<sup>1</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain  
<sup>2</sup>Àrea de Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



pathogenesis of brain diseases [13]. Perivascular macrophages are protective during bacterial meningitis [44], and participate in the clearance of vascular Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) deposition in mouse models of Alzheimer's disease [23, 36, 54]. However, these cells also mediate oxidative stress and cerebrovascular dysfunction induced by A $\beta$  [39]. They contribute to endothelial, neurovascular, and cognitive dysfunction in several models of hypertension [14, 41], and exacerbate the clinical symptoms in a model of experimental allergic encephalomyelitis [43]. A recent study in the mouse using high-dimensional single-cell cytometry and fate mapping identified different subsets of BAMs and showed differential responses of BAMs compared to other brain myeloid cell populations during aging, experimental autoimmune encephalomyelitis, and in a model of Alzheimer's disease [37].

Ischemic stroke is a frequent disease and one of the main causes of death and permanent disability worldwide [15]. Lack of adequate blood supply to a brain region causes brain damage and triggers sterile inflammation and innate immune responses [5, 26] that are considered as putative targets for therapeutic intervention [4]. While the responses of microglia to ischemic stroke have been extensively studied [33], those of BAMs remain largely unknown. Nevertheless, BAMs might be important in cerebrovascular diseases because they are located at the interface between the blood vessels, the brain parenchyma, and the immune system. In humans [28] and rats [34], perivascular and meningeal macrophages have been classically characterised by the expression of CD163, a membrane scavenger receptor belonging to the cysteine-rich superfamily [31] that is involved in the response to inflammation [10]. In this study, we investigated the phenotype and function of CD163<sup>+</sup> BAMs in the acute phase of cerebral ischemia/reperfusion in rats.

## Materials and methods

An extended version of the methods is available in the Additional file 1.

### Experimental brain ischemia

Focal brain ischemia was induced in adult male Sprague-Dawley rats (280–320 g body weight) by 1-h intraluminal occlusion of the right middle cerebral artery (MCAo) with reperfusion. Briefly, rats were anaesthetised with isoflurane and cortical cerebral perfusion was measured with a laser-Doppler flowmeter (PF4001 Master, Perimed). Body temperature was maintained at 37.5 °C during surgery with a heating blanket connected to a rectal probe. The MCA was occluded with a filament (Doccol #403912PK10Re). Rats were excluded from the study if the mean drop in cerebral perfusion during ischemia did not reach at least 65% of the basal value. Overall mortality after ischemia was <10%. A neurological test on a nine-point scale (0 = no deficit to 9 = highest handicap)

was performed at 24 h. We scored: (i) spontaneous activity (moving/exploring = 0, moving without exploration = 1, no moving or only when pulled by the tail = 2); (ii) circling to the left (none = 0, circling when elevated by the tail and pushed or pulled = 1, spontaneous circling = 2, circling without displacement = 3); (iii) resistance to left (contralateral) forepaw stretching (full resistance = 0, rats offer some resistance but they allow stretching = 1, rats offer no resistance = 2), and (iv) the parachute reflex (symmetrical = 0, asymmetrical = 1, contralateral forelimb retracted = 2). The brain was imaged 24 h after MCAo with MRI in a 7.0 T horizontal animal scanner (BioSpec, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). Brain lesions were evaluated by T2 mapping and lesion volume was measured with ImageJ.

### Drug administration

Anesthetized rats (isoflurane) received an i.c.v. injection of 30  $\mu$ l liposomes containing either clodronate (5  $\mu$ g/ $\mu$ l), or PBS as the vehicle ([ClodronateLiposomes.com](http://ClodronateLiposomes.com), Haarlem, The Netherlands) in the left ventricle. Treatment was randomly allocated according to a randomization list generated at the beginning of each set of experiments. Each treatment received a code that did not reveal its identity. Drug administration and all further interventions and measurements were carried out in a blinded fashion. Ischemia was induced 4 days after drug administration.

### Flow cytometry

Fresh brain tissue was processed with the Neural Tissue Dissociation Kit (P) (#130–092–628, Miltenyi Biotec). A 30–0% percoll gradient was used to remove myelin and cell debris to obtain a single-cell suspension. The pellet was washed and stained with the life/death fixable cell staining Aqua (ThermoFisher Scientific), and cells were immunostained with anti-CD11b (clone OX-42, Alexa Fluor647; AbDSerotec or PerCP-Cy5.5; BioLegend) at 1:40 dilution, anti-CD163 (clone ED2, FITC or PE, AbDSerotec) diluted 1:20, anti-CD45 (clone OX-1 labelled with PE-Cy7, BioLegend, or Alexa Fluor 488 AbDSerotec) diluted 1:50, anti-granulocytes (clone REA535, APC-Vio770, Miltenyi Biotec) diluted 1:50, anti-CD3 (clone G4.18, PE, BD Pharmingen) diluted 1:100, anti-CD4 (clone OX-35, BV711, BD Biosciences) diluted 1:200, anti-CD8 (clone OX-8, Vioblue, Miltenyi-Biotec) diluted 1:200, anti-CD161 (clone 3.2.3, APC, Biolegend) diluted 1:200, anti- $\gamma$  $\delta$ TCR (clone V65, APC-Vio770, Miltenyi-Biotec) diluted 1:100, and anti-CD25 (clone OX-39, FITC, BD Pharmingen) diluted 1:100. We used Flow-count Fluorospheres (Beckman-Coulter) for absolute cell counting. Data were acquired in a BD LSRFortessa SORP flow cytometer (BD Biosciences) using the BD Diva software (BD Biosciences) and were analysed with FlowJo v10 software (FlowJo).



### Cell sorting

CD163<sup>+</sup> macrophages and microglia were isolated from the control rat brain and from the brain 16 h post-ischemia using fluorescence activated cell sorting (FACS). Briefly, the right brain hemisphere was processed with the Neural Tissue Dissociation Kit and a percoll gradient, as described above for flow cytometry, and single cells were immunostained with CD11b and CD163. CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells corresponding to brain resident macrophages and CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> cells were collected in RNase-free PBS using Aria II cell sorter (BD Biosciences). We verified the purity of the sorted cell populations by flow cytometry in independent experiments.

### RNA extraction

RNA was extracted from samples of FACS-sorted CD163<sup>+</sup> macrophages and FACS-sorted CD163<sup>-</sup> microglia with PureLink™ RNA Micro Kit (#12183016, Invitrogen). On-column DNase step was performed to avoid genomic DNA contamination. RNA purity was assessed by RNA Pico Chip BioAnalyzer 2100 (Agilent). RNA was also extracted from brain tissue samples with the PureLink™ RNA Mini Kit (#12183018A, Invitrogen) using Trizol® Reagent (Life Technologies). In this case, we assessed the RNA quantity and quality using a ND-1000 micro-spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

### qRT-PCR

Total RNA was reverse-transcribed using a mixture of random primers (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems). For brain tissue, 1000 ng of total RNA were reverse-transcribed and the final product was diluted 6 times in RNase-free water. For RNA of sorted cells, cDNA was pre-amplified (TaqMan® Pre Amp Master Mix (2×) #4384266) with a pool of TaqMan probes, and the final pre-amplified product was diluted 20 times with tris-EDTA (TE) buffer pH 8.0 (#BP2473, Fisher Bioreagents). Quantitative real-time RT-PCR analysis was carried out with Taqman system (#4304437, Life Technology) using the iCycler iQTM Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### RNA microarray and bioinformatics

Six RNA samples obtained from sorted CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells (from three control rats and three ischemic rats at 16 h post-ischemia) with RIN values > 9.2 were selected for RNA microarray study with GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array, 3'IVT Pico reagent kit (Affymetrix). The images were processed with the Expression Console software (Affymetrix) to check the array quality. Genes selected as being differentially expressed were clustered to look for common patterns of expression. Bioinformatics

analyses of functional and biological significance were carried out.

### Immunohistochemistry of paraffin embedded brain sections

Rats were anesthetized with isoflurane and perfused through the heart with saline followed by 4% PFA. Careful extraction of the brain from the skull allowed keeping most of the pia meningeal layer attached to the brain tissue. The brain was kept in 4% PFA overnight at 4 °C, washed in phosphate buffer and embedded in paraffin. Immunohistochemistry was carried out in 5 µm-thick paraffin section with the following primary antibodies: a mouse monoclonal antibody against CD163 (clone ED2, which recognizes the rat CD163 cell surface glycoprotein [7]) (# MCA342GA, 0.5 mg/mL, AbD Serotec, Bio-Rad) diluted 1:50, and rabbit polyclonal antibodies against Iba-1 (# 019-19,741, 0.5 mg/mL, Wako Chemicals USA, Inc.) diluted 1:500, and against myeloperoxidase (MPO) (# A0398, 3.3 mg/mL, Dako), diluted 1:100, using the EnVision™ Detection System; (# K5007, Dako). Following incubation with biotinylated secondary antibodies (anti-rabbit made in goat # BA-1000; and anti-mouse made in horse # BA2001; both from VECTOR and used at 1:200 dilution), the immunoreaction was visualized with the avidin-biotin peroxidase method (ABC, Vector, Palex Medical S.A., Sant Cugat del Vallès, Spain) and diaminobenzidine. Cell counting was performed in a blinded fashion.

### Evans blue technique

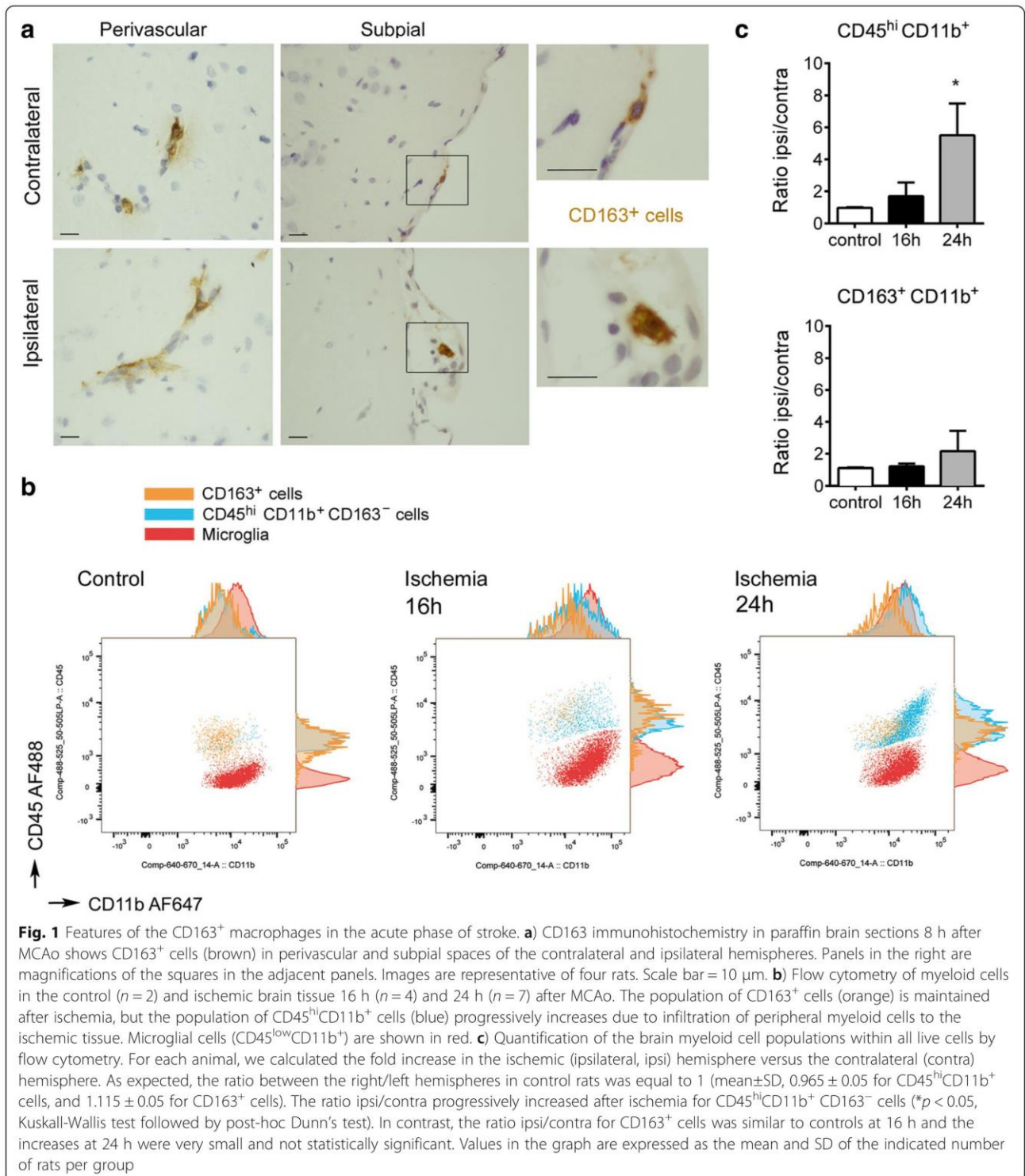
A solution of 2% Evans blue (Sigma-Aldrich) (*w/v* in saline) was administered *i.v.* (4 mL/kg of body weight) 22 h after ischemia. Two hours later, rats were anesthetized and perfused with saline. We obtained images of 1-mm thick coronal sections of fresh brain that were analysed with ImageJ software.

### Western blotting

Proteins were separated by electrophoresis in 12% polyacrilamide gels and were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon-P, # IPVH00010, MilliporeSigma) and incubated overnight at 4 °C with a goat polyclonal antibody anti-VEGF-A (#AF564, R&D) diluted 1:500, followed by a secondary anti-goat HRP antibody diluted 1:2000. β-tubulin was used as the loading control.

### Post-mortem tissue of stroke patients

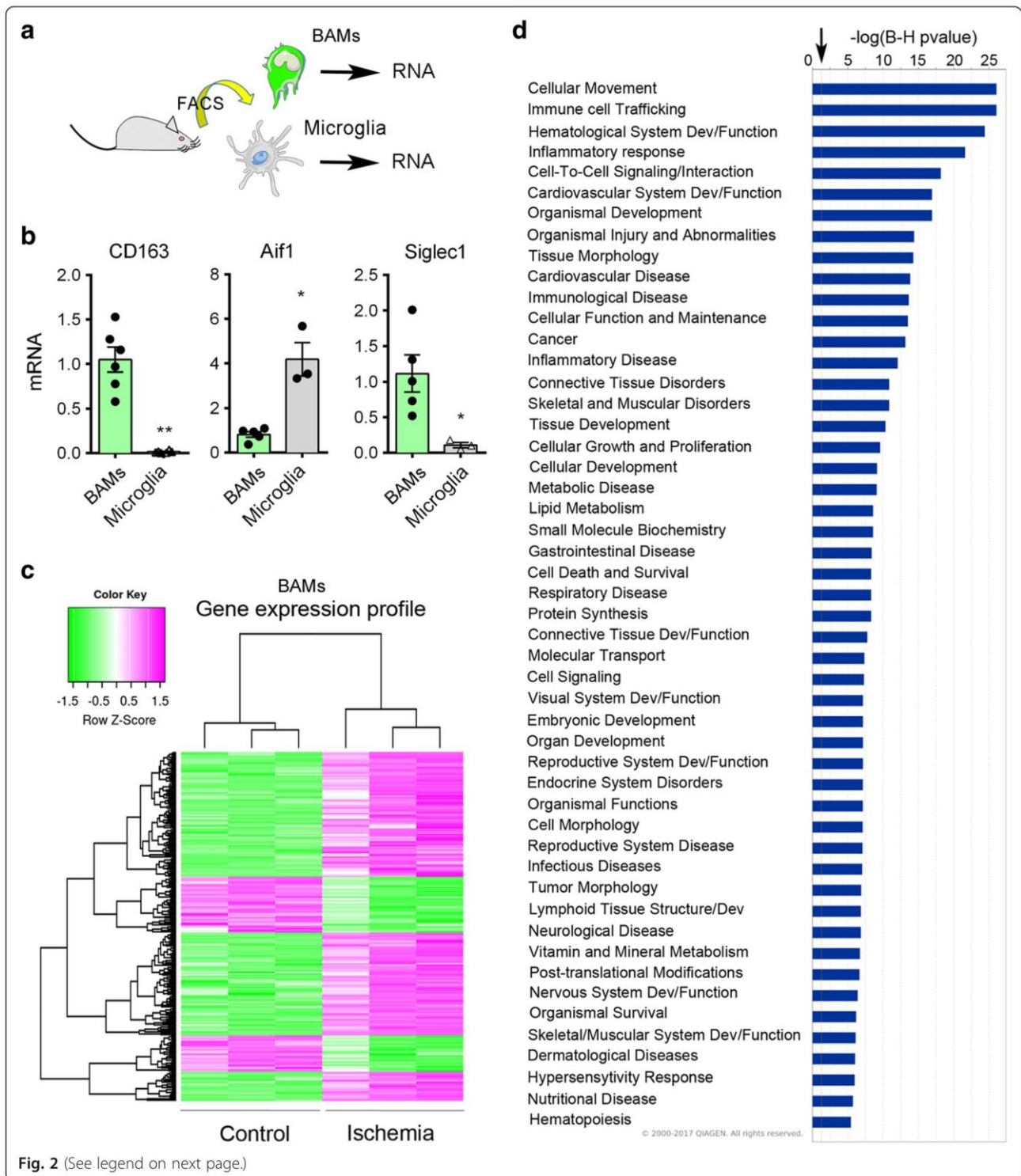
We studied the brain of three stroke patients (female; 63, 81 and 89 years old) deceased on day 1 after ischemic stroke onset. Two patients had right MCA infarcts and the third had a vertebro-basilar infarction, with a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) severity score of 20, 13, and 9, respectively. Only the first of these patients received mechanical thrombectomy, whereas the other



two patients did not receive any revascularization therapy. None of the patients received tPA. The mean ± SD time lapse from exitus to necropsy was 4.3 ± 3.2 h. Expert neuropathologists obtained ischemic tissue that was embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound and immediately frozen in liquid nitrogen for later sectioning

in a cryostat at 5 μm. The sections were processed for immunofluorescence using the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody anti-CD163 (clone EDHu-1, 1 mg/mL, # MCA1853, Serotec, Bio-Rad) diluted 1:200; rabbit polyclonal antibody anti-VEGFA (0.9 mg/mL, # ab46154, Abcam) diluted 1:100; and sheep polyclonal





(See figure on previous page.)

**Fig. 2** Gene expression profile of CD163<sup>+</sup> macrophages after brain ischemia. **a**) We isolated CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> BAMs and CD11b<sup>+</sup> CD163<sup>-</sup> microglia by FACS from control rat brain and obtained RNA for gene expression analysis. Colors for cells in the drawings are arbitrary. **b**) By qRT-PCR we validated that sorted macrophages, but not sorted microglial cells, express *Cd163*. The expression of *Aif1* (*Iba-1*) is higher in microglia than macrophages, whereas the expression of *Siglec1* (*CD169*) is lower in microglia. Values are expressed as fold versus the mean value of CD163<sup>+</sup> macrophages and are the mean±SD of  $n = 3-6$  samples per group. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , two-tailed Mann-Whitney test. **c**) RNA was extracted from CD163<sup>+</sup> cells immunosorted from the control and the ischemic rat brain at 16 h of reperfusion ( $n = 3$  per group) to study ischemia-induced changes in gene expression profile using Affymetrix microarrays. The global heat map, where each lane represents macrophage gene expression from the brain of different control or ischemic rats, shows results of the microarray analysis with  $|\log_{2}FC| > 2$  and  $FDR < 0.01$ . **d**) Top diseases/functions associated to gene expression profile changes were obtained with ingenuity pathway analysis (IPA) gene ontology algorithms showing category scores. The minimum significance level ( $-\log(p\text{-value})$ ) from Fisher's exact test is indicated by the threshold (arrow). Inflammatory and immune functions are highlighted suggesting the involvement of CD163<sup>+</sup> macrophages in such responses after brain ischemia

antibody anti-vWF (# ab11713, 6.8 mg/mL, Abcam) diluted 1:100. Sections were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies followed by incubation for 2 h at room temperature with secondary antibodies (Life Technologies): Alexa Fluor-488 (# A11017 anti-mouse made in goat, and # A21206 anti-rabbit made in donkey), Alexa Fluor-546 (# A10036 anti-mouse made in donkey, and # A10040 anti-rabbit made in donkey) and Alexa Fluor-647 (# A21448 anti-sheep made in donkey), all diluted 1:500. 0.3% Sudan black in 70% ethanol was used to reduce tissue autofluorescence. Immunoreaction controls were carried out by omission of the primary antibodies, and by substituting the primary anti-VEGFA antibody by rabbit immunoglobulin fraction (# 0903, 20 mg/mL, Dako) diluted 1:2200. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen) to visualize the cell nuclei and they were observed under a confocal laser microscope (Zeiss LSM 880). Confocal images were processed with ImageJ software to display the pictures.

### Statistical analyses

Comparisons between two groups were carried out with two-tailed Mann-Whitney or unpaired Student t-test after testing for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Multiple comparisons were carried out with the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test. Two-way ANOVA was used to compare group differences by treatment (clodronate vs. vehicle) and condition (ischemia vs. control). The Bonferroni's Multiple Comparison tests was used for post-hoc analysis. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism software. The sample size in experiments designed to investigate the effect of drug treatment on stroke outcome was  $n = 16$ , as calculated using G\*power 3.1 software (Düsseldorf University) with an estimated effect size  $d$  of 0.9, alpha level of 0.05, and statistical power of 0.8.

## Results

### Features of CD163<sup>+</sup> cells in the control brain and in the acute phase of stroke

The CD163<sup>+</sup> rat brain cells studied in this work include perivascular macrophages and subpial macrophages that

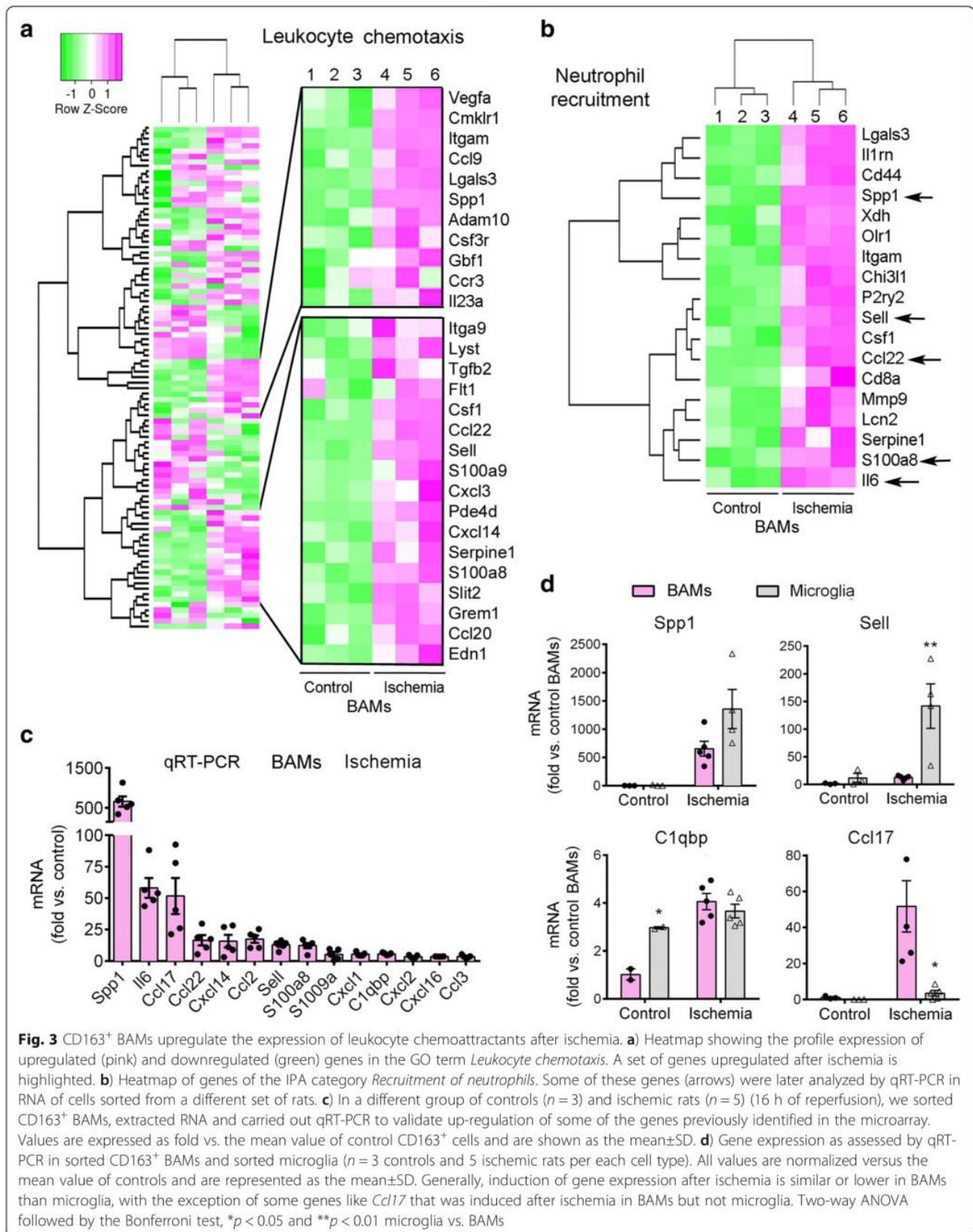
remained attached to the glial limitans after removing the brain from the skull (Fig. 1a). Flow cytometry of control brain tissue showed a higher level of CD45 expression in CD163<sup>+</sup> macrophages than in microglia (CD45<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup> cells) (Fig. 1b). Ischemia induces macrophage infiltration to the brain peaking after several days [17, 47, 49, 52, 53]. We examined the CD163<sup>+</sup> cells and the CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid cells in the control brain tissue and the brain tissue at 16 h and 24 h post-ischemia. Following ischemia, the population of CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid cells progressively increased. In contrast, the population of CD163<sup>+</sup> cells remained similar to controls at 16 h and showed a tendency to increase in the ipsilateral hemisphere at 24 h (Fig. 1b,c). These results showed that most peripheral myeloid cells infiltrating the brain tissue in the first hours post-ischemia did not express CD163.

### Ischemia-induced changes in the gene expression profile of CD163<sup>+</sup> BAMs

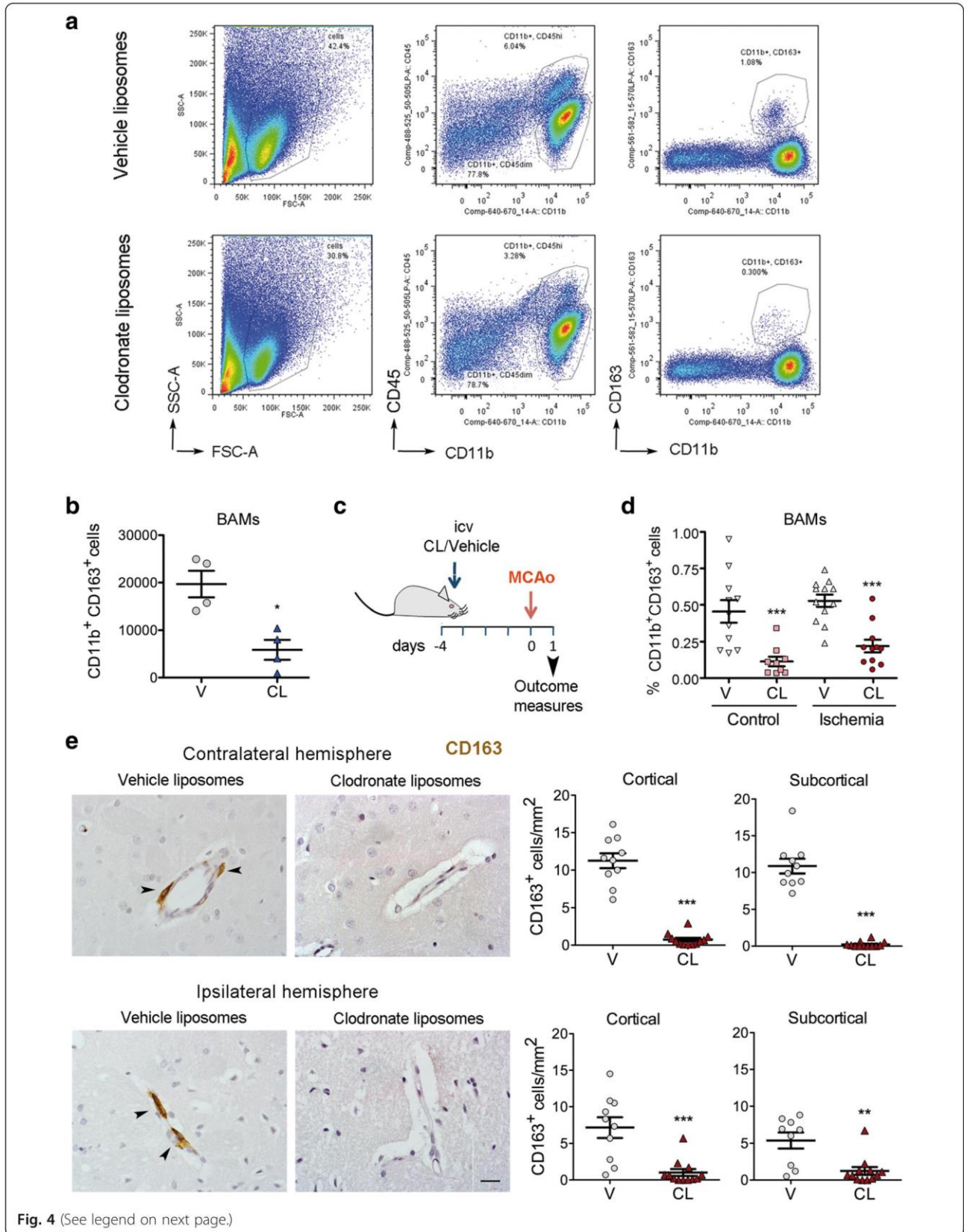
To characterize the general phenotype of CD163<sup>+</sup> macrophages and compare it with that of microglia, we isolated the CD163<sup>+</sup> cells and the CD163<sup>-</sup> microglia from the control rat brain by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Fig. 2a, see gates used for cell sorting in Additional file 1: Figure S1a). We checked the purity (mean ± SD,  $n$  rats) of the sorted cells by flow cytometry and found that  $92.0 \pm 4.2\%$  ( $n = 4$ ) of the sorted cells were CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells. We also verified by flow cytometry that the CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> cell population was enriched in CD45<sup>dim</sup>CD11b<sup>+</sup> microglia ( $92.9 \pm 2.4\%$ ,  $n = 2$ ). We then performed additional cell sorting experiments for RNA extraction and gene expression studies (Fig. 2a). By qRT-PCR we detected *Cd163* mRNA expression in the sorted CD163<sup>+</sup> population but not in the sorted microglia, as expected, whereas the expression of *Aif1* (*Iba-1*) was higher in microglia than in the CD163<sup>+</sup> cells, and *Siglec1* (*CD169*) expression was detected in CD163<sup>+</sup> cells but not in microglia (Fig. 2b).

We aimed to investigate whether ischemia changed the gene expression profile of the resident CD163<sup>+</sup> macrophages. We isolated the CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells by FACS as above in groups of control non-ischemic rats and rats









**Fig. 4** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 4** Treatment with clodronate liposomes depleted BAMs in control and ischemic rats. **a**) Flow cytometry plots of CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells in the brain of control rats treated i.c.v. with either vehicle liposomes (V) or clodronate liposomes (CL) 5 days before the analysis. **b**) CL reduced the numbers of brain CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells (\* $p < 0.05$ ,  $n = 4$  per group). **c**) Rats received CL or V in the left ventricle 4 days before occlusion of the right MCA and the brain was analyzed by flow cytometry 1 day after ischemia. **d**) Flow cytometry analysis of CD11b<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> cells of the ischemic hemisphere ( $n = 12$  V;  $n = 11$  CL) and the corresponding hemisphere of control rats ( $n = 11$  V;  $n = 9$  CL) and shows reduction after treatment with CL versus V in both groups. \*\*\*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA by treatment and condition. **e**) Immunohistochemistry and cell counting in brain shows reduced numbers of CD163<sup>+</sup> cells in the contralateral and ipsilateral (infarcted core) cortical and subcortical regions of the CL group ( $n = 12$ ) compared to the V group ( $n = 10$ ). \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ . Scale bar: 20  $\mu$ m

subjected to ischemia plus 16 h of reperfusion (Additional file 1: Figure S1b). We chose to study this time point after ischemia given that myeloid cell infiltration was still very mild and the majority of CD163<sup>+</sup> cells were resident macrophages (Fig. 1b,c). We obtained RNA from the sorted cells, and processed it with Affymetrix microarrays. Unsupervised clustering analysis showed that the samples clustered according to the groups (Additional file 1: Figure S2a), and principal component analysis precisely separated the ischemic from the control samples (Additional file 1: Figure S2b). We selected the genes showing statistically significant differences between ischemic and control groups (adjusted  $p$ -value < 0.01) and filtered for  $|\log_{2}FC| > 2$ . According to the above criteria, the expression of 1493 genes was up-regulated whereas the expression of 594 genes was down-regulated in CD163<sup>+</sup> macrophages after ischemia, as graphically illustrated in the volcano plot (Additional file 1: Figure S2c). The global heat map illustrates differentially expressed genes in these groups (Fig. 2c). The top 25 up-regulated genes (Additional file 1: Table S1) included genes related to the extracellular matrix, such as *Vcan* (versican), *Sdc1* (syndecan), *Fn1* (fibronectin-1), *Spp1* (osteopontin), *Sema3c* (semaphorin 3c), *Mmp7* (matrix metalloproteinase 7, MMP-7), and *Mmp14* (MMP-14) supporting a role of CD163<sup>+</sup> macrophages in extracellular matrix remodelling. Also, we detected up-regulation of genes involved in nicotinamide adenine dinucleotide metabolism (*Cd38*), and inflammatory and immune responses, like *Tspo*, *Cd8a*, and *Itgax* (CD11c). The sorted CD163<sup>+</sup> cells expressed genes recently identified in BAMs of the mouse brain, such as *Mrc1* (CD206), *Mertk*, *Adgre1* (F4.80), *Fcgr3a* (CD16), *C5ar1* (CD88), *Lyve1*, *RT1-ba* (MHC class II antigen), *Cd44*, *Cd38* [37], and *Tmem119*, *Csf1r*, and *Cxcr4* [29]. However, the expression of most of these genes did not significantly change after ischemia, with the exception of increased expression of *Cd38* (Additional file 1: Figure S3A) and *Cd44* (Fig. 3b). Neither control nor ischemic CD163<sup>+</sup> BAMs showed expression of genes encoding for typical microglial proteins, like *Sall1*. Among the top genes down-regulated after ischemia we found the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptor *Gria2*, genes related to subcellular organization, like *Syne2* and *Fam65b*, and genes of the extracellular matrix, such as *Adam23*, certain growth factor

receptors, like *Egfr*, and genes related to immune responses particularly associated to inhibition of leukocyte activation, such as *Siglec5* (Additional file 1: Table S2).

The analysis of biological significance was based on enrichment analysis on different annotation databases to highlight biological categories in which the selected genes appear to be over-represented after brain ischemia. The GO analysis identified over-representation, enriched KEGG entities and clusters for terms related to *acute inflammatory response*, *cytokine activity*, *chemokine activity*, *response to hypoxia*, *extracellular space*, *extracellular matrix*, *metalloproteinases*, *collagen degradation*, *blood vessel remodelling*, *angiogenesis*, and *response to oxidative stress*, amongst others (see Additional file 1: Figure S3 for heat maps of genes in GO-terms representative of the inflammatory response). Down-regulated KEGG pathways included: *ATPase*, *Ca<sup>++</sup> transporting*; *ATPase*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting*; *Cd7 molecule*; *KIT ligand*; *beta-2-adrenergic receptor*; and *epidermal growth factor receptor (Egfr) pathway*. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) identified top canonical pathways (Additional file 1: Figure S4A) and top associated disease/functions (Fig. 2d). Amongst the highly up-regulated pathways, *hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signalling* highlighted the response to ischemic conditions (Additional file 1: Figure S4), illustrated by up-regulation of *Hif1a* and vascular endothelial growth factor-A (*Vegfa*) genes (Fig. 3a, Additional file 1: Figure S3). The term *lipopolysaccharide (LPS)* was amongst the top upstream regulators, suggesting acquisition of pro-inflammatory features reminiscent of the response to LPS. However, ischemia-induced CD163<sup>+</sup> macrophage activation showed a distinctive metabolic and inflammatory signature. For instance, regarding arginine metabolism [38], inducible nitric oxide synthase (iNOS, *Nos2*) was not overrepresented whereas arginase-1 (*Arg1*) was one of the top up-regulated genes (Additional file 1: Table S1). This effect is expected to suppress excessive nitric oxide production and promote L-arginine consumption impairing lymphocyte activation in response to antigen [3, 8].

#### Ischemia induces the expression of leukocyte chemoattractants in CD163<sup>+</sup> BAMs

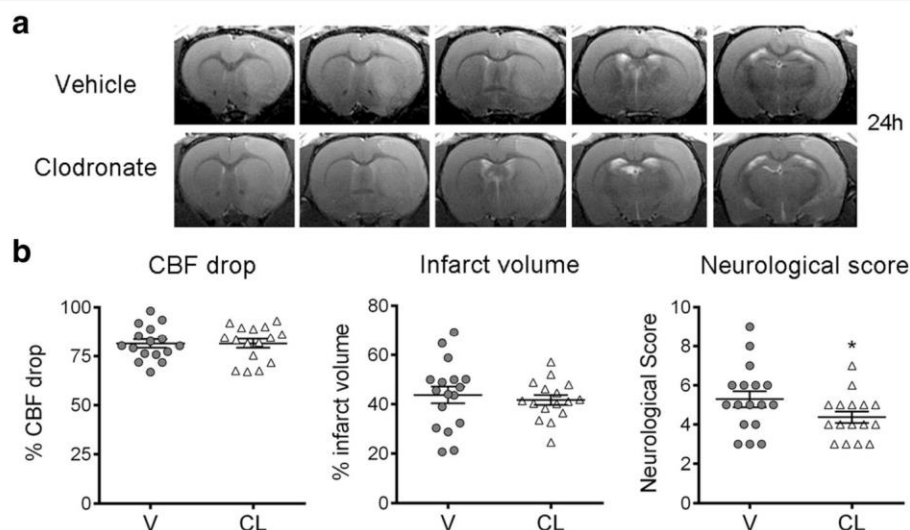
The above gene pathway analyses in CD163<sup>+</sup> macrophages highlighted the response to wounding, inflammation, and



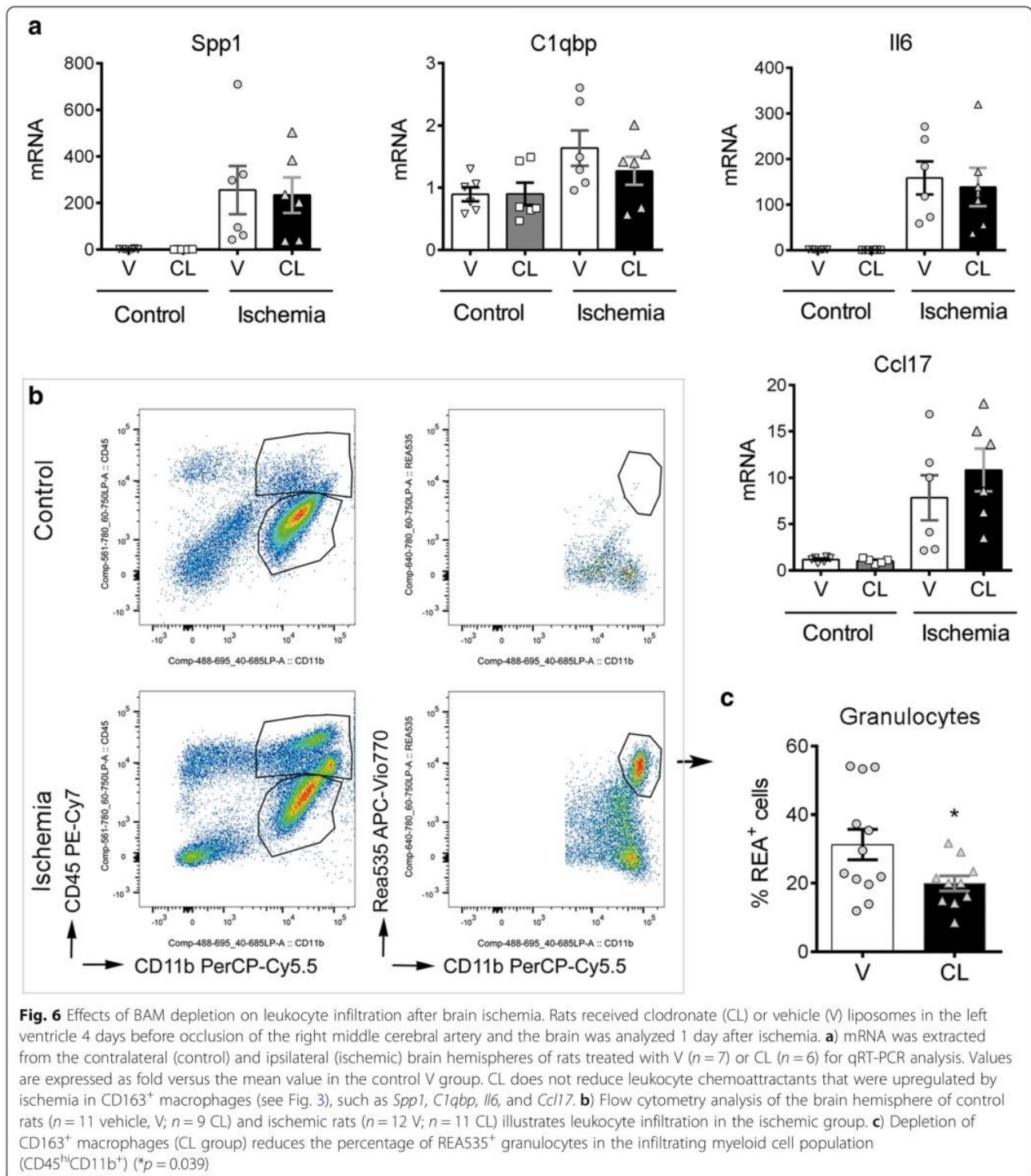
chemotaxis after ischemia. A heatmap representation is shown for the GO term *Leukocyte chemotaxis* where several genes up-regulated by ischemia are detailed (Fig. 3a). The IPA analysis identified over-representation of the term *Neutrophil recruitment* (Fig. 3b). The analyses showed up-regulation of genes such as *Spp1*, interleukin-6 (*Il6*), C-X-C motif chemokine ligands 14 (*Cxcl14*), *S1008a*, and L-selectin (*Sell*), amongst others. Ischemia also up-regulated genes encoding for chemokines involved in recruiting T helper type 2 (Th2) lymphocytes, like *Ccl22* and *Ccl17* [56] (Fig. 3, Additional file 1: Table S1). For validation purposes, some of the up-regulated genes related to leukocyte chemotaxis were studied by qRT-PCR using RNA of CD163<sup>+</sup> macrophages sorted from different groups of control and ischemic rats 16 h post-ischemia (Fig. 3c). We compared the expression of these genes in FACS-sorted CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> cells versus sorted CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> cells enriched in microglia (Additional file 1: Figure S1). CD163<sup>+</sup> macrophages seemed to work in consonance with microglia to promote leukocyte recruitment to the ischemic brain since most of the genes that we studied by qRT-PCR showed similar (e.g. *Spp1*, *C1qbp*) or weaker (e.g. *Sell*) expression in CD163<sup>+</sup> macrophages compared to microglia. However, ischemia up-regulated certain genes, such as *Ccl17*, preferentially in CD163<sup>+</sup> macrophages (Fig. 3d). Altogether, these results suggested the possibility that CD163<sup>+</sup> macrophages participated in the recruitment of leukocytes after brain ischemia.

### Selective depletion of BAMs but not microglia in control and ischemic brain

To obtain functional information on the role of BAMs in the acute phase of stroke, we carried out loss-of-function experiments by intracerebroventricular (i.c.v.) administration of liposomes containing clodronate [14, 23, 42, 43]. Macrophages scavenge the liposomes and the intracellular accumulation of the toxin clodronate induces macrophage cell death [46, 55]. Liposomes containing either clodronate or vehicle (PBS) were administered in the left ventricle and the brain was analyzed 5 days later. Flow cytometry studies of the brain cells showed that clodronate liposomes induced a strong reduction (65–70%) of the CD163<sup>+</sup> population in both hemispheres (Fig. 4a,b). We then checked that CD163<sup>+</sup> cell depletion was maintained after brain ischemia. We occluded the right MCA four days after administration of clodronate or vehicle liposomes to the left ventricle and studied the brain tissue 24 h post-ischemia (Fig. 4c). CD163<sup>+</sup> cells were also reduced in the ischemic tissue after clodronate treatment, as assessed by flow cytometry (Fig. 4d). Immunohistochemistry (Fig. 4e) showed depletion of CD163<sup>+</sup> macrophages located in the perivascular spaces and on the glia limitans under the pia matter. Of note, we verified that i.c.v. clodronate liposome treatment did not significantly affect the number of parenchymal microglia compared to the vehicle group in the control and ischemic brain tissue, as shown by immunohistochemistry (Iba1<sup>+</sup>) (Additional file 1: Figure S5a), and flow cytometry (CD45<sup>dim</sup>CD11b<sup>+</sup>) (Additional file 1: Figure S5b). In both



**Fig. 5** Depletion of BAMs does not reduce infarct volume but attenuates the neurological deficit. **a** T2w MRI 24 h post-ischemia of representative rats per treatment group, i.e. clodronate (CL,  $n = 16$ ) or vehicle (V,  $n = 17$ ) liposomes. **b** Ischemia induced a similar drop of cortical perfusion (CBF) during MCAo, as assessed by laser Doppler, in both groups. The neurological score shows a small but significant improvement in the CL group. (Mann-Whitney test, \*  $p = 0.046$ ) There are no differences between groups in total infarct volume (**b**), as well as the volume of infarcted cortical and subcortical regions (not shown), as assessed by T2w MRI. Treatment, ischemia, neurological evaluation, MRI, and infarct volume measures were carried out in a blinded fashion



hemispheres of the clodronate group we observed the presence of CD163<sup>-</sup> Iba1<sup>+</sup> perivascular cells (Fig. 4e, Additional file 1: Figure S5b) that might correspond to peripheral myeloid cells. The effect of i.c.v. administration of clodronate was local and it did not modify blood cell counts (Additional file 1: Figure S6).

**BAM depletion ameliorated the stroke-induced neurological dysfunction**

To find out whether BAM depletion affected the extent of brain damage we measured the size of the brain lesion and assessed the neurological function 24 h post-ischemia in rats treated with clodronate or vehicle liposomes, as







(See figure on previous page.)

**Fig. 7** Depletion of BAMs reduces granulocyte infiltration in the ischemic cortex. Rats received clodronate (CL) or vehicle (V) liposomes in the left ventricle 4 days before occlusion of the right middle cerebral artery and the brain was analyzed 1 day after ischemia. **a)** Myeloperoxidase (MPO) immunohistochemistry (brown, arrows) of the core of infarction in paraffin sections (counterstained with hematoxylin in blue) of ischemic rats treated with V or CL. Scale bar: 20  $\mu$ m. Blind cell counting showed that CL ( $n = 12$ ) reduces the numbers of MPO<sup>+</sup> cells in the ischemic cortex compared to the V ( $n = 8$ ) ( $*p = 0.05$ ), but differences in subcortical regions were not statistically significant (CL  $n = 12$ , V  $n = 10$ ,  $p = 0.12$ ). **b)** An independent group of rats treated with V or CL was studied by flow cytometry 24 h postischemia after dissection of cortical and subcortical brain regions. The numbers of REA535<sup>+</sup> granulocytes was determined. Values are expressed as number of cells per gram of brain tissue. The number of REA535<sup>+</sup> cells decreased in both regions after BAM depletion. However, differences between treatment groups were statistically significant in cortical regions ( $*p = 0.038$ ), whereas only a trend was observed in subcortical regions ( $p = 0.085$ )

above. One-hour ischemia induced large brain lesions and BAM depletion did not cause a major effect in the volume of infarction (Fig. 5). However, rats depleted of BAMs showed a mild but significant improvement of the neurological score (Fig. 5), suggesting that BAM activity has negative consequences for the neurological status in the acute phase of stroke.

#### BAM depletion alters leukocyte recruitment after brain ischemia

We then investigated by qRT-PCR whether depletion of BAMs altered the RNA expression of cytokines and chemokines in the brain tissue 24 h after ischemia. The brain of rats treated with clodronate liposomes did not show a significant reduction in the mRNA expression of the leukocyte chemoattractants and chemokines that we examined (Fig. 6a). This result is compatible with ischemia-induced expression of these genes in other cells in addition to CD163<sup>+</sup> macrophages, including microglia and potentially astrocytes or other neural cells. In spite of this, depletion of CD163<sup>+</sup> cells reduced the percentage of infiltrating REA535<sup>+</sup> granulocytes in the ischemic hemisphere, as determined by flow cytometry (Fig. 6b,c) whereas the numbers of other leukocytes were not affected (Additional file 1: Figure S7). To validate this finding, we carried out immunohistochemistry with anti-myeloperoxidase antibodies in an independent group of rats. Blind cell counting showed less infiltrating granulocytes after BAM depletion, particularly in cortical regions (Fig. 7a). To further investigate possible regional differences we carried out a second flow cytometry study in an independent group of ischemic rats where we dissected out cortical and subcortical regions and analysed them separately. BAM depletion reduced REA535<sup>+</sup> granulocyte numbers in the ischemic cortex, whereas subcortical regions only showed a non-significant trend (Fig. 7b). In contrast to the effect on granulocyte recruitment, BAM depletion did not significantly modify the numbers of T cells, NK cells, or myeloid mononuclear cells infiltrating the ischemic tissue (Additional file 1: Figure S8).

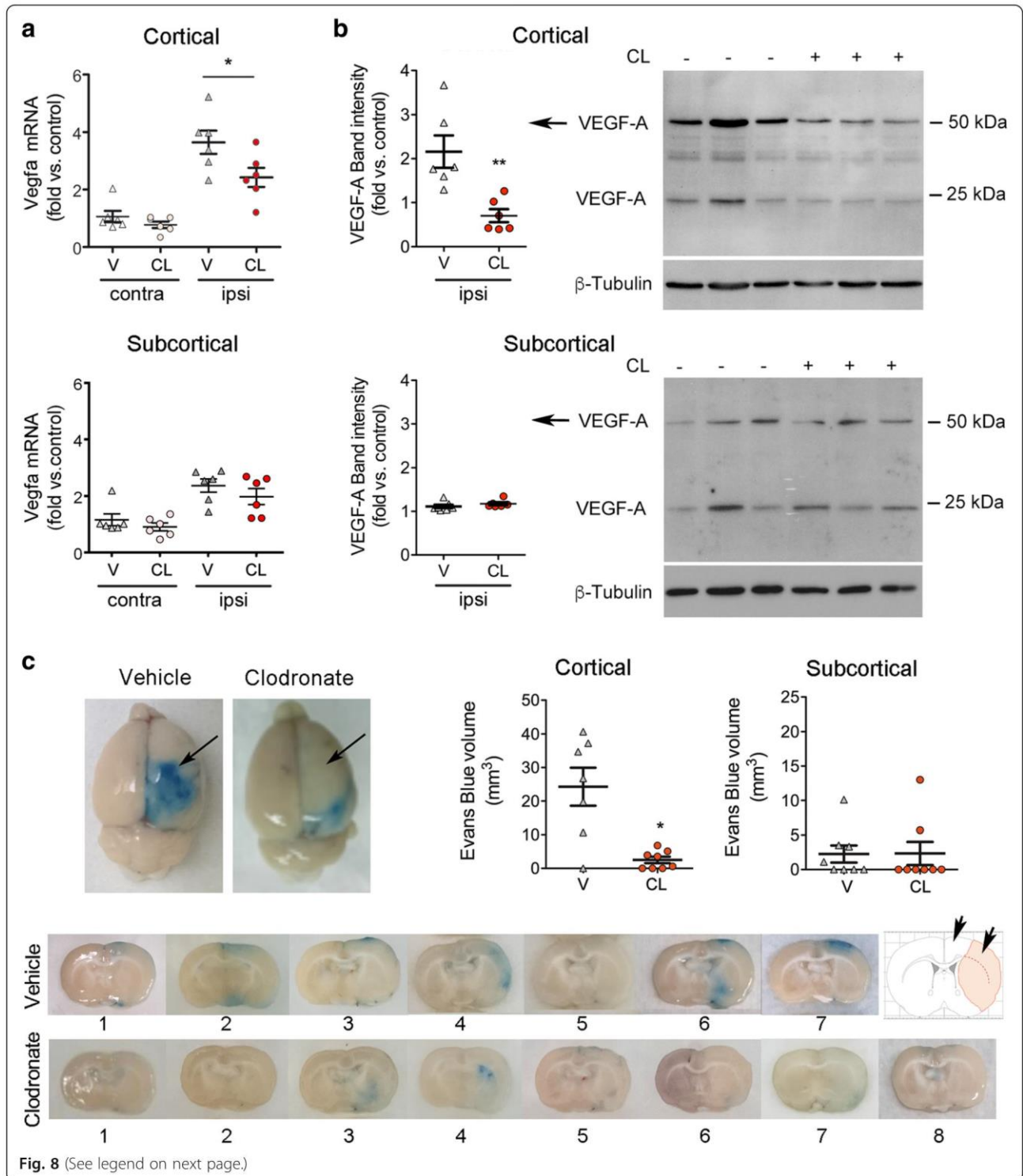
#### BAMs increase cortical vascular permeability 24 h after ischemia

The microarray analysis of sorted CD163<sup>+</sup> macrophages identified over-representation of genes involved in the

post-ischemic response to hypoxia, such as the HIF-target gene *Vegfa* (Fig. 3a, Additional file 1: Figure S3a). BAM depletion reduced the expression of *Vegfa* mRNA in the cerebral cortex 24 h post-ischemia, whereas this effect was milder in subcortical regions (Fig. 8a). Ischemia induced the expression of VEGF<sub>164</sub> protein (Fig. 8b), a VEGF-A isoform (similar to human VEGF<sub>165</sub>) that is secreted and has the capacity to bind to the extracellular matrix [45]. In agreement with the mRNA results, BAM depletion reduced the cortical expression of VEGF<sub>164</sub> (Fig. 8b).

Given that hypoxia-induced VEGF in the brain produces acute vascular leakage [48], we studied whether BAM depletion affected vascular permeability. Notably, ischemia-induced Evans blue extravasation from the ipsilateral pial vessels and cortex was minimal in rats depleted of BAMs (Fig. 8c), which showed a reduced volume of tissue with Evans blue extravasation in the cortex but not in subcortical regions. These results suggest that depletion of BAMs prevented ischemia-induced leakage of pial and cortical vessels.

We then investigated whether these findings might be relevant to acute ischemic stroke in humans. To this end, we studied CD163<sup>+</sup> macrophages in post-mortem brain tissue of three patients with fatal ischemic stroke deceased 24 h after symptom onset. VEGF immunoreaction was detected surrounding blood vessels and we found some CD163<sup>+</sup> perivascular macrophages positive for VEGF (Fig. 9). We observed that VEGF immunoreactivity was more prominent in the two patients that did not receive any revascularization therapy than in the patient that received mechanical thrombectomy. This effect is likely attributable to persistent ischemic conditions in the former. The described perivascular VEGF immunoreaction was mainly found at the periphery of the infarcted core. In the infarcted core, we also observed VEGF immunoreactivity in parenchymal CD163<sup>-</sup> cells with a pattern of expression that varied across the tissue and between patients. Altogether, these results are compatible with the possibility that human CD163<sup>+</sup> perivascular macrophages secreted VEGF in acute ischemic stroke.





(See figure on previous page.)

**Fig. 8** Depletion of BAMs attenuates ischemia-induced pial and cortical vascular permeability. BAMs were depleted by i.c.v. administration of clodronate liposomes (CL) 4 days prior to ischemia. For treatment control, rats received vehicle liposomes (V). **a)** *Vegfa* mRNA was studied in cortical and subcortical regions of the ipsilateral (ipsi, ischemic) and the contralateral (contra) brain hemispheres. Ischemia-induced expression of *Vegfa* mRNA at 24 h is attenuated in the cortex of the CL rats versus the V rats ( $n = 6$  per group) (Mann-Whitney test,  $p = 0.041$ ). **b)** Western blotting of cortical and subcortical brain tissue (ipsilateral) 24 h post-ischemia shows the VEGF<sub>164</sub> isoform of VEGF-A detected as two bands corresponding to the homodimeric and monomeric forms at approximately 54 kDa and 24 kDa. Quantification of signal intensity of the 54-kDa band shows reduced expression in the cortex of rats receiving CL vs. rats receiving V ( $n = 6$  per group) (Mann-Whitney test,  $**p = 0.002$ ). **c)** Ischemia increases the permeability of pial vessels (arrows), as assessed by Evans blue extravasation 24 h post-ischemia, and BAM depletion attenuates the effect. Images of one representative coronal brain section per rat of each treatment group show Evans blue extravasation in the ipsilateral hemisphere. Rats receiving clodronate show negligible Evans blue in the cortex (arrows in the schematic representation at the right hand side). The volume of tissue showing Evans blue extravasation is reduced in the cortex, but not in subcortical zones, of the CL group ( $n = 8$ ) versus the V group ( $n = 7$ ) (Mann-Whitney test,  $*p = 0.014$ )

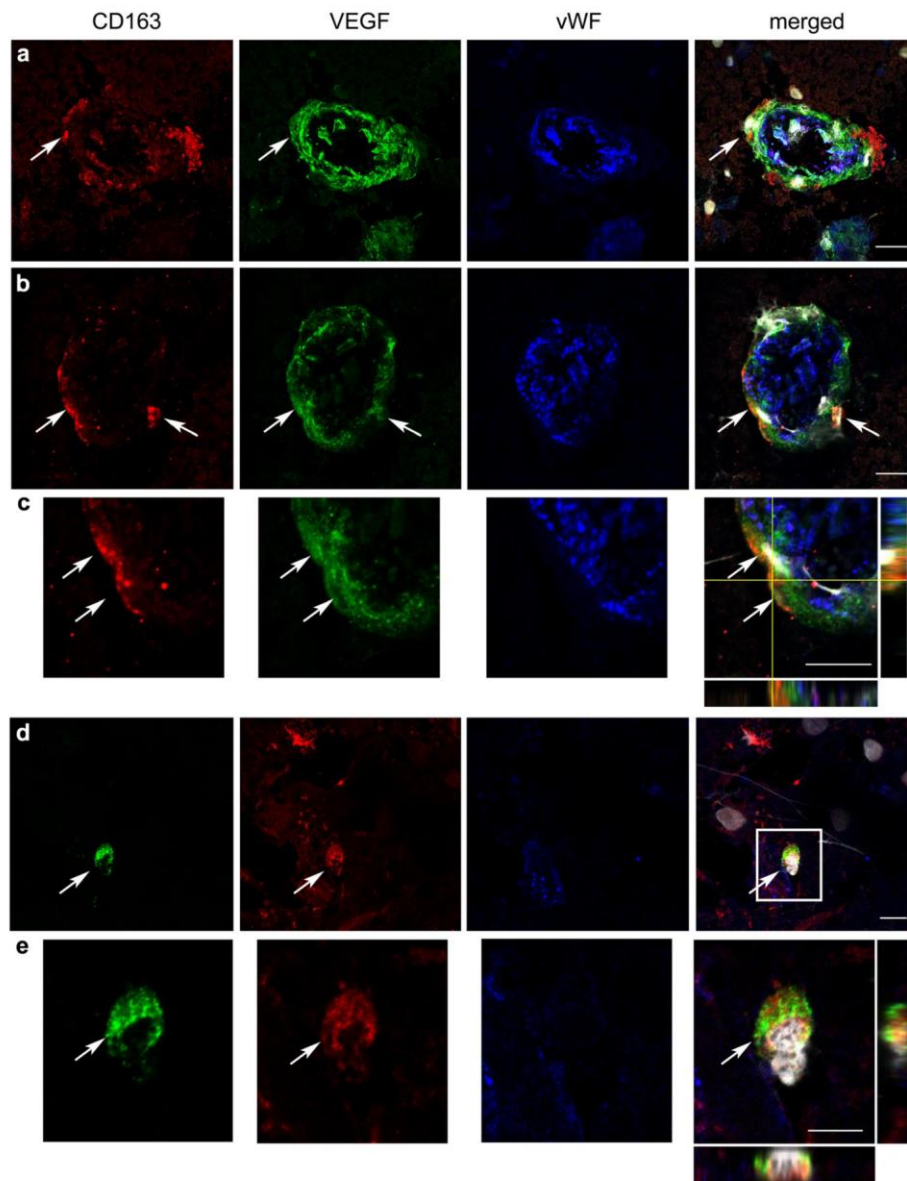
## Discussion

BAMs are players at the interface between the nervous system and the immune system [6, 12, 27, 29, 34, 37, 53]. However, the precise functions of these cells under pathological conditions remain largely unknown. This study provides evidence for a role of BAMs increasing vascular permeability, facilitating granulocyte recruitment, and contributing to neurological dysfunction in the acute phase of ischemic stroke. BAMs express typical myeloid cell markers like microglia but their differential phenotypic features were less known until recently published studies provided an extensive description of the phenotype of BAMs in the mouse brain [29, 37]. We verified that rat CD163<sup>+</sup> BAMs expressed genes encoding for proteins identified in these latter works. However, the expression of most of these BAM genes did not significantly change 16 h post-ischemia versus controls, with the exception of increased expression of *Cd38* and *Cd44*. Although CD44 expression was previously considered as a marker of brain infiltrating cells [29], we detected the expression of *Cd44* in CD163<sup>+</sup> BAMs obtained from the control rat brain, in agreement with the finding of CD44<sup>+</sup> BAMs in the control mouse brain [37]. Furthermore, the expression of *Cd44* increased after ischemia, as described for CD44 expression in mouse BAMs in EAE [37]. In addition, we found that rat CD163<sup>+</sup> BAMs express *Siglec1* (CD169) and low levels of *Aif1* (Iba-1), in contrast to microglial cells that do not express *Siglec1* and express comparatively higher levels of *Aif1*.

Brain ischemia causes necrotic neuronal cell death with release of danger signals that activate the microglia [26], but the response of BAMs is currently unknown. We found that these cells respond to ischemic conditions by showing changes in the gene expression profile enabling adaptation to hypoxia and acquisition of novel cellular functions involved in extracellular matrix-vascular interactions and inflammatory responses. BAMs upregulated the expression of genes regulating neutrophil chemotaxis as part of the re-programming process induced by ischemia. The anatomic

location of these cells confers them the capacity to participate in the communication network between the brain environment and the vasculature. Brain ischemia induces neutrophil extravasation from leptomeningeal vessels and neutrophil accumulation in perivascular spaces of the affected brain region [9, 40]. Our study suggests that CD163<sup>+</sup> macrophages attract granulocytes to the leptomeningeal and perivascular spaces in response to brain ischemia. These findings are in consonance with a study showing that perivascular macrophage depletion reduced brain neutrophil infiltration in a model of vesicular stomatitis viral infection [51]. Furthermore, perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection [1]. Other works reported the involvement of mononuclear cells in neutrophil attraction. For instance, specific subsets of monocytes are key regulators of neutrophil extravasation in the lung [30].

Functional analysis of genes over-represented in CD163<sup>+</sup> BAMs after brain ischemia versus controls highlighted the activation of neovascularization processes and the HIF-1 pathway. This finding is consistent with the observed up-regulation of the HIF-1 $\alpha$  target gene *Vegfa*, a potent modulator of angiogenesis [2, 32] and regulator of the cellular redox status [11]. We observed the expression of VEGF in the post-mortem human brain tissue of stroke patients deceased 24 h after stroke onset, and detected VEGF surrounding some brain vessels and CD163<sup>+</sup> perivascular macrophages, suggesting that the findings in rats might be valid in acute ischemic stroke patients. Acute production of VEGF is associated with increases in vascular permeability [48]. In our study, BAM depletion in the rats decreased the ischemia-induced expression of *Vegfa* mRNA and the secreted protein isoform, VEGF<sub>164</sub>, in the cerebral cortex. Furthermore, BAM depletion reduced Evans blue extravasation from pial and cortical vessels, whereas these effects were less marked in subcortical regions. We argue that the greater cortical effect might be due to the activity of subpial macrophages increasing the permeability of pial vessels in the acute



**Fig. 9** CD163<sup>+</sup> macrophages and neighboring vessels express VEGF in human ischemic stroke. VEGF around the vessels and in surrounding CD163<sup>+</sup> macrophages in human ischemic stroke. Immunofluorescence staining of post-mortem brain tissue of patients deceased 24 h after ischemic stroke ( $n = 3$ ). Confocal microscope images show CD163<sup>+</sup> macrophages (red in **a-c**, green in **d-e**), vascular endothelium (von Willebrand factor, vWF; blue), and cell nuclei (white) that are stained with DAPI. The presence of VEGF immunoreactivity (green in **a-c**, red in **d-e**) is observed surrounding the endothelial layer of blood vessels and in CD163<sup>+</sup> macrophages. Images in **c** and **e** are magnifications of the indicated part of **b** and **d**, respectively. Orthogonal projections show co-localization of VEGF and CD163 staining in some cells. The arrows point to CD163<sup>+</sup> perivascular macrophages positive for VEGF. Scale bar: 10  $\mu$ m

phase of stroke. While we were preparing this manuscript, a study reported pathogenic actions of CD163<sup>+</sup> macrophages in atherosclerosis where these cells showed activation of HIF1 $\alpha$  and VEGF expression and increased vascular permeability and inflammatory cell recruitment [20]. Interestingly, perivascular macrophages are involved in maintaining vascular barrier function in the periphery under physiological conditions [21, 24]. Here we show that an ischemic stroke challenge changes the homeostatic

function of CD163<sup>+</sup> macrophages by inducing cellular activation of the HIF pathway and generation of VEGF and inflammatory mediators. This effect in the very acute phase of stroke does not exclude putative vasculoprotective effects of perivascular macrophages in chronic phases after stroke.

Our study did not find any differences in infarct volume 24 h post-ischemia in rats depleted of BAMS, in spite that they showed reduced granulocytes in the ischemic brain. Previous studies reported reduced infarct



volume after ischemia/reperfusion in rats depleted of neutrophils [35]. However, the effects were not entirely reproduced in a model of severe ischemia/reperfusion in rats [22], or in a model of ischemia/reperfusion plus thrombolytic treatment in spontaneous hypertensive rats where only one out of two different neutrophil depletion strategies reduced the lesion size [16]. Also, neutrophil depletion reduced infarct size in hyperlipidemic ApoE<sup>-/-</sup> mice but not in normolipidemic wild-type mice [25]. Therefore, it was unlikely that the moderate reduction of granulocyte recruitment induced by BAM depletion in our model of severe ischemia/reperfusion was sufficient to cause major differences in the size of the severe brain lesion induced by our ischemia model. Nevertheless, we found some improvement of the neurological function in the absence of BAMs that was attributable to attenuated granulocyte recruitment and preservation of pial and cortical vascular integrity after ischemia.

A limitation of our study is that it only addressed the function of BAMs in the acute phase of stroke. We restricted our study to the first hours after stroke to avoid the putative confounding effect of massive macrophage infiltration that takes place in the days that follow stroke [5, 17, 47, 49, 52]. Moreover, our BAM depleting strategy is transient and repopulation of these cells by peripheral macrophages could follow at later time points. Long-term studies using different experimental approaches are required to understand the consequences of BAM activity for the evolution of the brain lesion and the repair processes, particularly regarding extracellular matrix and vascular remodelling. Another limitation is that we could not separate perivascular from subpial macrophages since all of them express CD163 in the rat brain. Depleting the CD163<sup>+</sup> macrophage population had more effects in cortical rather than in subcortical regions after ischemia. We suspect that subpial macrophages may play a role by producing VEGF and regulating vascular permeability and extravasation of granulocytes from pial vessels. These effects could exacerbate the brain lesion by impairing the integrity of the collateral circulation [50]. Finally, we conducted our experimental study in young male rats, while stroke mainly affects old people of both sexes. Studies in aged animals and females are required to find out whether BAMs show a similar response in these conditions.

## Conclusions

In summary, this study provides evidence for a role of BAMs in granulocyte chemoattraction and vascular permeability following acute ischemic stroke. The study also suggests that targeting these potentially negative responses of brain resident macrophage might help to preserve cortical blood supply and improve the neurological function in the acute phase of cerebral ischemia/reperfusion.

## Additional file

**Additional file 1:** Extended methods, additional tables and figures. (DOCX 6178 kb)

## Abbreviations

AB: Amyloid- $\beta$ ; AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; BAMs: CNS border-associated macrophages; CNS: Central nervous system; Cxcl: C-X-C motif chemokine ligand; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; Egfr: Epidermal growth factor; FACS: Fluorescence activated cell sorting; HIF-1: Hypoxia inducible factor-1; IL: Interleukin; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; LPS: Lipopolysaccharide; MCA: Middle cerebral artery; MCAo: MCA occlusion; PBS: Phosphate-buffered saline; Th2: T helper type 2; VEGF: Vascular endothelial growth factor

## Acknowledgements

We are indebted to Dr. Ellen Gelpí for expert neuropathological analysis of human brain tissue, and to Clara Castellví and Alba Hernández for help in image analysis and immunofluorescence, respectively. We acknowledge technical support of the Imaging, Cytomics and Genomics core facilities of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), the Confocal Microscopy Unit of the Serveis Científic-Tècnics of the School of Medicine-University of Barcelona, and the Bioinformatics and Biostatistics Unit of Vall d'Hebron Research Institute. We thank the Neurological Tissue Bank of the Biobank-Hospital Clínic-IDIBAPS for sample and data procurement, and patient's relatives for giving consent to the use of brain samples for research purposes.

## Funding

Supported by the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (SAF2014-56279-R and SAF2017-87459-R). JP and MG were supported by a PhD fellowship from the Catalan Research Agency (AGAUR) and the ITN program of the European Community (NeuroInflammation, FP7-PEOPLE-2013-ITN-n° 607962), respectively. FMM is recipient of an ICT award by the *Pla estratègic de recerca i innovació en salut* (PERIS) of the *Departament de Salut, Generalitat de Catalunya*.

## Availability of data and materials

The RNA microarray data are accessible from the GEO repository of the National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (code: GSE106931) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Other datasets during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Authors' contributions

JP and AS performed most experimental animal studies and data analyses; MG carried out cell sorting with input from AG. RC did RNA extraction and validation analyses; FMM designed and supervised flow cytometry studies; FB did the microarray data analysis; CJ supervised the MRI studies; FPA contributed to initial ischemia experiments; LMK performed Western blotting studies; XU and AC facilitated access to human material and provided clinical data; BK contributed in writing; AMP designed the study, analysed data, and wrote the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Animal work was conducted with the approval of the ethical committee of the University of Barcelona (CEEA) and the *Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural, Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya*. Studies complied with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985), and the Spanish National law (Real Decreto 53/2013). Animal work is reported according to the ARRIVE guidelines.

The brain tissue of three ischemic stroke patients who died at the Stroke Unit of Hospital Clínic de Barcelona 24 h after stroke onset was used in this study. We obtained written consent from the families for tissue removal after death for diagnostic and research purposes at the Neurological Tissue bank of the Biobank-Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi



i Sunyer (IDIBAPS). The study had the approval of the Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona (CEIm).

#### Consent for publication

Not applicable

#### Competing interests

The authors declare that no conflict of interest exists.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Àrea de Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Fundació Clínic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Statistics and Bioinformatics Unit (UEB), Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Laboratory of Molecular Neurobiology, Neurobiology Center, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland. <sup>7</sup>Present address: Institute of Neuroimmunology and Institute for Multiple Sclerosis Research, University Medical Centre Göttingen, D-37073 Göttingen, Germany.

Received: 2 August 2018 Accepted: 4 August 2018

Published online: 09 August 2018

#### References

- Abtin A, Jain R, Mitchell AJ, Roediger B, Brzoska AJ, Tikoo S et al (2014) Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol* 15:45–53
- Beck H, Plate KH (2009) Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117:481–496
- Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5:641–654
- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM (2016) Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol* 15:869–881
- Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R (2012) The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8:401–410
- Coles JA, Myburgh E, Brewer JM, McMenamin PG (2017) Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog Neurobiol* 156:107–148
- Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589–599
- El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M et al (2008) Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol* 9:1399–1406
- Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng YJ, Ghavampour S, Hannocks MJ et al (2013) The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 125:395–312
- Etzerodt A, Moestrup SK (2013) CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 18:2352–2363
- Evangelista AM, Thompson MD, Bolotina VM, Tong X, Cohen RA (2012) Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free Radic Biol Med* 53:2327–2334
- Fabrick BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Döpp ED, Van Den Heuvel MM et al (2005) CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51:297–305
- Faraco G, Park L, Anrather J, Iadecola C (2017) Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)* 95:1143–1152
- Faraco G, Sugiyama Y, Lane D, Garcia-Bonilla L, Chang H, Santisteban MM et al (2016) Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension. *J Clin Invest* 126:4674–4689
- Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA et al (2014) Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the global burden of disease study 2010. *Lancet* 383:245–254
- Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R (2009) Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 156:673–679
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA et al (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40:1849–1857
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K et al (2016) Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17:797–805
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzone E, Crozet L et al (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 518:547–551
- Guo L, Akahori H, Harari E, Smith SL, Polavarapu R, Karmali V et al (2018) CD163<sup>+</sup> macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest* 128:1106–1124
- Gupta P, Lai SM, Sheng J, Tetlak P, Balachander A, Claser C et al (2016) Tissue-resident CD169(+) macrophages form a crucial front line against *Plasmodium* infection. *Cell Rep* 16:1749–1761
- Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC (2005) Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci* 6:49
- Hawkes CA, McLaurin J (2009) Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1261–1266
- He H, Mack JJ, Güç E, Warren CM, Squadrito ML, Kilarski WW et al (2016) Perivascular macrophages limit permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:2203–2212
- Herz J, Sabellek P, Lane TE, Gunzer M, Hermann DM, Doeppner TR (2015) Role of neutrophils in exacerbation of brain injury after focal cerebral ischemia in hyperlipidemic mice. *Stroke* 46:2916–2925
- Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17:796–808
- Kida S, Sterat PV, Zhang E-T, Weller RO (1993) Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol* 85:646–652
- Kim WK, Alvarez X, Fisher J, Bronfin B, Westmoreland S, McLaurin J et al (2006) CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am J Pathol* 168:822–834
- Korin B, Ben-Shaanan TL, Schiller M, Dubovik T, Azulay-Debby H, Boshnak NT et al (2017) High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. *Nat Neurosci* 20:1300–1309
- Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J et al (2010) In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18073–18078
- Law SK, Mickletham KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y et al (1993) A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 23:2320–2325
- Lee HS, Han J, Bai HJ, Kim KW (2009) Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *FEBS J* 276:4622–4635
- Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY (2017) The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 157:247–272
- Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U et al (1996) Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3269–3274
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T et al (1994) Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25:1469–1475

36. Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP et al (2011) Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:11159–11171
37. Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, Schreiner B, Utz SG, Leung BP et al (2018) High-dimensional single-cell mapping of central nervous system immune cells reveals distinct myeloid subsets in health, aging, and disease. *Immunity* 48:380–395
38. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J (2016) A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16:553–565
39. Park L, Uekawa K, Garcia-Bonilla L, Koizumi K, Murphy M, Pistik R et al (2017) Brain perivascular macrophages initiate the neurovascular dysfunction of Alzheimer A $\beta$  peptides. *Circ Res* 121:258–269
40. Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C et al (2015) Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 129:239–257
41. Pires PW, Girgla SS, McClain JL, Kaminski NE, van Rooijen N, Dorrance AM (2013) Improvement in middle cerebral artery structure and endothelial function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after macrophage depletion. *Microcirculation* 20:650–661
42. Polfiet MM, Goede PH, van Kesteren-Hendriks EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK (2001) A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 116:188–195
43. Polfiet MM, van de Veerdonk F, Döpp EA, van Kesteren-Hendriks EM, van Rooijen N, Dijkstra CD et al (2002) The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 122:1–8
44. Polfiet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth AM, van der Poll T, Döpp EA, Renardel de Lavalette C et al (2001) Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol* 167:4644–4650
45. Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114:853–865
46. Russell RG, Rogers MJ (1999) Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 25:97–106
47. Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183:25–33
48. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH (2002) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125: 2549–2557
49. Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 28:382–386
50. Shuaib A, Butcher K, Mohammad AA, Saqqur M, Liebeskind DS (2011) Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: a potential therapeutic target. *Lancet Neurol* 10:909–921
51. Steel CD, Kim WK, Sanford LD, Wellman LL, Burnett S, Van Rooijen N et al (2010) Distinct macrophage subpopulations regulate viral encephalitis but not viral clearance in the CNS. *J Neuroimmunol* 226:81–92
52. Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002) The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932:110–119
53. Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M et al (2003) Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117:531–539
54. Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S (2010) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20816–20821
55. van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK (1996) Apoptosis of macrophages induced by liposome mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193:93–99
56. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T et al (2000) Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 68: 568–574

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





Tercer article:

# **A SUBSET OF CCR2<sup>+</sup> MONOCYTES PROMOTES ANGIOGENESIS AND PARTICIPATES IN FUNCTIONAL RECOVERY AFTER ISCHEMIC STROKE**

**Jordi Pedragosa**, Francesc Miró-Mur, Amaia Otxoa-de-Amezaga, Carles Justicia,  
Francisca Ruíz-Jaén, Peter Ponsaerts, Manolis Pasparakis, and Anna M. Planas

Manuscrit en preparació





**A subset of CCR2<sup>+</sup> monocytes promotes angiogenesis and functional recovery after ischemic stroke in mice**

Jordi Pedragosa<sup>1,2</sup>, Francesc Miró-Mur<sup>2,3</sup>, Amaia Otxoa-de-Amezaga<sup>1,2</sup>, Carles Justicia<sup>1,2</sup>, Francisca Ruíz-Jaén<sup>1,2</sup>, Peter Ponsaerts<sup>4</sup>, Manolis Pasparakis<sup>5</sup>, and Anna M. Planas<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Area of Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Fundació Clínic, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Laboratory of Experimental Hematology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

<sup>5</sup> CECAD Research Center, Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany

Corresponding author:

Anna M. Planas, PhD  
IIBB-CSIC, IDIBAPS,  
Rosselló 161, planta 6,  
08036-Barcelona, Spain.  
e-mail: [anna.planas@iibb.csic.es](mailto:anna.planas@iibb.csic.es)  
Tel: +34-93 363 83 27

## ABSTRACT

Inflammatory Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes infiltrate the brain after stroke but their function is not entirely clear. We report that CCR2<sup>+</sup> cells infiltrating the ischemic brain tissue include complex populations of monocytes and lymphocytes. To underscore the role of CCR2<sup>+</sup> monocytes we generated mice with selective deletion of CCR2 in myeloid cells. One day after ischemia these mice showed lower monocyte infiltration and reduced expression of pro-inflammatory genes and genes related to M2 alternatively macrophage activation and angiogenesis. However, they showed a delayed inflammatory rebound illustrated by increased expression of *Il1b* 15 days post-ischemia that was not detected in wild type mice. Furthermore, mice with CCR2-deficient monocytes showed reduced angiogenesis and worse behavioural performance, despite no differences in lesion volume. Ly6C<sup>hi</sup> monocytes sorted from the brain 24h post-ischemia expressed pro-inflammatory genes, like *Il1b*, but also M2 genes *Chil3* and *Arg1* and pro-angiogenic *Vegfa*. By flow cytometry we confirmed that a subset of infiltrating Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes were Arginase-1<sup>+</sup>, showing that CCR2<sup>+</sup> monocytes comprise cells with diverse phenotypes. Administration of CCR2<sup>+/+</sup> bone-marrow monocytes to mice with CCR2-deficient monocytes 6h post-ischemia did not improve the behavioural performance suggesting that immature bone-marrow monocytes lack pro-reparative functions. The results show the specific contribution of infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes to the acute inflammatory reaction after ischemic stroke and subsequent lesion resolution and functional recovery. The study unravels heterogeneity in the population of CCR2<sup>+</sup> monocytes infiltrating the ischemic brain and suggests that pro-reparative monocyte subsets, likely absent in bone marrow, could be critical in monocyte-based cell therapies for stroke recovery.

## Keywords

Monocytes, macrophages, inflammation, repair, permanent middle cerebral artery occlusion

## INTRODUCTION

Stroke-induced acute inflammation is a multifaceted response to sterile tissue injury. Excessive inflammation is believed to exacerbate the brain lesion, but on the other hand inflammation is involved in triggering mechanisms that promote clearance of the damaged tissue and set an adequate environment for subsequent tissue repair (Karin and Clevers, 2016). Diverse types of leukocytes are attracted to the injured brain in an orchestrated fashion and they play complex functions (Gelderblom et al., 2009). Inflammation-induced pro-resolving mechanisms are mediated, at least in part, by infiltrating monocyte/macrophages (Nakamutra and Shichita, 2019). Mouse monocytes are classified as 'classical' essentially corresponding to Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, and 'non-classical' corresponding to Ly6C<sup>low</sup> monocytes (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Classical Ly6C<sup>hi</sup> monocytes express the chemokine receptor CCR2 and are involved in inflammatory responses after tissue injury (Epelman et al., 2014; Xiong et al., 2015). In contrast, non-classical Ly6C<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes patrol the vasculature and exert vasculoprotective functions (Thomas et al., 2015). After brain ischemia, Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes are the first monocyte subsets reaching the brain tissue where they acquire features of macrophages (Miró-Mur-et al., 2016). Macrophages are plastic cells that depending on the stimuli in the local environment mature acquiring different phenotypes and functions (Sica and Mantovani 2012; Vanella and Wynn, 2017).

The CCL2 chemokine, also termed monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), is a potent chemoattractant signal for monocytes to the ischemic brain tissue (Schilling et al., 2009). Astrocyte-derived CCL2 promotes leukocyte infiltration across the blood-brain barrier (BBB) (Weiss et al., 1998). In addition to astrocytes, microglia express CCL2 after ischemia (Gourmalia et al., 1997; Che et al., 2001; Yan et al., 2007), and endothelial cells (Rollins et al., 1990; Sica et al., 1990), pericytes (Duan et al., 2018), perivascular macrophages (Pedragosa et al., 2018), and neurons (Che et al., 2001, Howe et al., 2017) can also produce CCL2. Interestingly, genetic predisposition to elevated circulating levels of CCL2 is associated with higher risk of stroke (Georgakis et al., 2018). Constitutive CCR2-deficient mice showed reduced ischemic lesions and improved neurological function compared to wild type mice (Dimitrijevic et al., 2007), thus suggesting that CCR2<sup>+</sup> monocytes were detrimental. However, studies administering CCR2 drug inhibitors or blocking antibodies challenged this view because they found more inflammation, worse neurological deficits, impaired recovery, and more haemorrhagic transformation (Gliem et al., 2012; Chu et al., 2015; Wattananit et al., 2016; Fang et al., 2018), suggesting that monocytes exert beneficial functions by promoting neuroprotection and vasculoprotection. However, globally targeting CCR2 may affect other cells besides monocytes since CCR2 expression has been reported in the endothelium (Wolf et al., 2012) and several lymphocyte subsets, including regulatory T cells (Brühl et al., 2004) and Th17 cells (Kara et al., 2015).

The objective of this study was to identify the subsets of CCR2<sup>+</sup> cells in the ischemic brain tissue and the specific function of CCR2<sup>+</sup> monocytes. To this end, we used reporter knock-in Ccr2<sup>rfp/+</sup>Cx3cr1<sup>gfp/+</sup> mice showing infiltration of CCR2<sup>+</sup> monocytes and lymphocytes. To underscore the specific function of CCR2<sup>+</sup> monocytes we generated mice with selective deletion of CCR2 in myeloid cells. This strategy reduced the acute inflammatory response but evoked delayed inflammation, reduced angiogenesis, and impaired functional recovery. Our results show that infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes induce an acute response associated to

subsequent mechanisms critical for recovery after ischemic stroke. The results also suggest that the infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocyte population is heterogeneous and comprises subsets of cells with pro-angiogenic features.

## **METHODS**

### Mice

Ccr2-deficient mice (CCR2<sup>rfp/rfp</sup>) (B6.129(Cg)Ccr2<sup>tm2.1lfc/J</sup>, #SN17586), Cx3cr1-deficient mice (Cx3cr1<sup>Gfp/Gfp</sup>) (B6.129P2(Cg)-Cx3cr1<sup>tm1Litt/J</sup>, #SN5582), Cx3cr1cre<sup>ERT2</sup> mice (B6.129P2(C)-Cx3cr1<sup>tm2.1(cre/ERT2)Jung/J</sup>, #SN020940), reporter ROSA26-tdTomato mice (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup>, #SN007909), and LysMCre mice (Lyz2<sup>tm1(cre)lfo</sup>, #SN4781) were initially purchased from the Jackson Laboratory. We also used reporter DsRed mice with expression of fluorescent DsRed driven by the actin promoter (Casanova-Acebes et al., 2013). Ccr2<sup>fl/fl</sup> mice (Willenborg et al., 2012) were generated by the insertion of 2 loxP sites flanking the entire coding sequence of Ccr2 followed by an eGFP cassette. In these mice, Cre-mediated recombination causes functional knockout of Ccr2 and activates the expression of eGFP. In all the studies we used littermate mice either cre<sup>+</sup> (with Ccr2-deficient monocytes) or cre<sup>-</sup> (corresponding control genotype). For experiments, we used heterozygous Ccr2<sup>rfp/+</sup>Cx3cr1<sup>GFP/+</sup> mice and Cx3cr1cre<sup>ERT2</sup>:ROSA26-tdT mice. Colonies of these mice were maintained under SPF conditions at the animal house of the School of Medicine of the University of Barcelona, except for Ccr2<sup>rfp/rfp</sup> mice, Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup> mice, and DsRed mice that were maintained at the animal house of the Faculty of Psychology of the University of Barcelona under conventional housing conditions in a controlled environment (temperature and humidity, under a 12h light/dark cycle) where the mice were free of nasty pathogens. Animal work was conducted following the Catalan and Spanish laws (Real Decreto 53/2013) and the European Directives. We obtained approval by the ethical committee (Comité Ètic d'Experimentació Animal, CEEA) of the University of Barcelona and the local regulatory bodies of the *Generalitat de Catalunya*.

### Brain Ischemia

Surgery for induction of ischemia was carried out in adult (3-5 month old) male and female mice under isoflurane anaesthesia (Isovet, BBraun) and mice received analgesia (buprenorphine, 140 µL of a 0.015 mg/mL solution, via s.c.). Permanent occlusion of the middle cerebral artery (MCAo) was induced by coagulation of the distal portion of the right MCA together with ligation of the ipsilateral common carotid artery. This experimental model induces a focal cortical lesion in the ipsilateral hemisphere. The mouse brain was studied with MRI (7T, BioSpec, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) using T2w turbo RARE fast spin-echo sequences. Images were obtained using ParaVision 6.0 software (Bruker). Infarct volume was measured with ImageJ and was corrected for edema (Gerriets et al., 2004).

### Behavioural tests

For the Pole test, we used a size of 0.8 cm in diameter and 50 cm in length with stretch marks in order to avoid sliding. Mice received preoperative training during the week prior to surgery and the tests were performed at different time points after ischemia following a published procedure (Balkaya et al., 2013). Briefly, the score was obtained from the average of five trials

per day with a 5-min inter-trial period during the training and testing sessions. The best average of the five trials obtained during the training days was used as the basal score.

For the Rotarod test, mice were habituated to Rotarod (Rota-Rod/RS Panlab Harvard apparatus), and training during the week prior to ischemia and testing after ischemia were conducted essentially as described (Balkaya et al., 2013), with the following modifications. We carried out three trials on an accelerating rod, starting at 4 rpm with an increasing acceleration of 1 rpm each 8 seconds with 15 minutes of rest between the trials. The latency before failing was taken as the average of the three trials. The best training day average was taken as the basal score.

### Flow Cytometry

Mouse blood and brain tissue were processed for flow cytometry as described (Miro-Mur et al., 2016). Fc receptors were blocked by previous incubation for 10 min with CD16/CD32 (#553142, clone 2.4G2, BD Pharmingen) in FACS buffer (PBS, 2 mM EDTA, 2% FBS) at 4 °C. Live/dead Aqua cell stain (#L34957, Molecular Probe, Invitrogen) was used to determine cell viability. Cells from CCR2-rfp<sup>+/-</sup> CX3CR1-gfp<sup>+/-</sup> double knock-in reporter mice were stained with the following mix of primary antibodies: CD11b (#557657, clone M1/70, APC-Cy7, BD Pharmingen), CD45 (#564225, clone 30-F11, Brilliant Violet 786, BD Horizon), Ly6G (#560601, clone 1A8, PE-Cy7, BD Pharmingen), F4/80 (#65-4801, clone BM8, PerCP-Cy5.5, Tonbo Biosciences), Ly6C (#48-5932-82, clone HK1.4, eFluor-450, eBioScience), CD115 (#135509, clone AFS98, APC, Biolegend), CD3 (#557869, clone 17A2, Alexa Fluor 647, BD Pharmingen), CD45R (#560472, clone RA3-6B2, V450, BD Biosciences), CD161 (#65-5941, NK1.1, clone PK136; PerCP-Cy5.5, Tonbo Biosciences) and  $\gamma\delta$ TCR (#25-5711-82, clone GL3, PE-Cy7, eBiosciences). Live brain cells from CCR2<sup>fl/fl-eGFP</sup> LysMcre mice were stained with anti-CD11b, anti-CD45, anti-Ly6G, anti-CD115 and anti-Ly6C. Blood, BM and spleen cells from LysMcre:Rosa26-tdT mice were stained with the antibodies against CD11b, CD45, Ly6G, CD115 and CD192 (CCR2) (#FAB5538F, clone 475301, Fluorescein, R&D systems). All antibodies incubations were done in FACS buffer and mouse BD Fc block for 20 min at 4°C. Intracellular staining for Arginase-1 was carried out with the antibody anti-Arg1 (#IC5868P, sheep polyclonal, PE, R&D systems) after fixation/permeabilization (#554714, BD Cytofix/Cytoperm). Data was acquired in a BD LSRII cytometer using the FACS software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data analyses were performed with FlowJo software (version X, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### Cell sorting

Microglia and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were isolated from the brain of adult CX3CR1cre<sup>ERT2</sup>-ROSA26-tdT mice using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Cortical brain tissues were collected in cold HBSS buffer (w/o Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, #14175-053, Thermo Fisher Scientific) in GentleMACS C tubes (#130-092-628, Miltenyi Biotec). The brain cortex tissue was enzymatically dissociated using the Neural Tissue Dissociation Kit (P) (#130-092-628, Miltenyi Biotec). Programs m\_brain\_01, m\_brain\_02 and m\_brain\_03 of the gentleMACS™ Dissociator (#130-096-427, Miltenyi Biotec) were progressively applied and samples incubated at 37° for 30 min. The digested tissue was subsequently filtered twice with 70  $\mu$ m and 40  $\mu$ m cell strainers



(#352340, Falcon) and washed with HBSS (w/  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , #14025-092, Thermo Fisher Scientific). Cells were separated from myelin and debris by 30% isotonic percoll gradient (#17-0891-01, GE Healthcare) in Myelin Gradient Buffer (3.56 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.78 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 2 g/L D(+)-glucose, pH 7.4). Samples were centrifuged at 950  $\times g$  for 30 min without acceleration or brake. Cells were collected from the interface, washed once with FACS Stain Buffer (#554656, BD Biosciences), stained in presence of mouse BD Fc block, live/dead Aqua cell stain and the anti-CD11b, anti-CD45, anti-Ly6G and anti-Ly6C antibodies for 20 min at 4°C, and processed for FACS in a FACS Aria III sorter (BD Biosciences). Sorted CX3CR1<sup>hi</sup> microglia and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were recovered in PBS-DEPC at 4°C, centrifuged and lysed in 0.3 ml of Lysis buffer (#46-6001, Invitrogen) supplemented with 1 %  $\beta$ -mercaptoethanol.

#### Isolation and administration of reporter monocytes

We isolated adult mouse monocytes from the bone marrow of DsRed or CCR2<sup>rfp/rfp</sup> mice were isolated with a kit (EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit; #19861, STEMCELL Technologies). We crushed bones with a scalpel and flushed the cells from the femur and tibia in RPMI 1640 (#21875-034, GIBCO) supplemented with 2% FBS (FBS; Gibco-BRL) using a syringe with a 25-gauge needle. We removed cell debris by filtering the suspension through a 70- $\mu\text{m}$  mesh nylon strainer and we centrifuged at 300 $\times g$  for 5 min. After discarding the supernatant, we resuspended the cells in 2mL of PBS containing 2% FBS with 2mM EDTA supplemented with 5% Normal Rat Serum. Then, we incubated the cell suspension with Selection Cocktail in a tube at 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  at 4°C during 5 min. RapidSpheres™ were added to the sample (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) for 3 min in the refrigerator. Finally, the tube with the sample was placed in the magnet and monocytes were obtained by negative selection. 1.5 million cells were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of PBS and were injected in the mouse tail-vein 6 hours after pMCAo. Administration was carried out after randomizing the mice and in a blinded fashion.

#### RNA extraction and process

RNA was extracted from samples of FACS-sorted Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and FACS-sorted CX3CR1<sup>hi</sup> microglia with PureLink™ RNA Micro Kit (#12183016, Invitrogen) by following manufacture indications with the exception of a minor modification. RNA was precipitated with 70% ethanol overnight at -20 °C. To avoid genomic DNA contamination a DNase step was performed. RNA quantity and purity were assessed with the High Sensitivity RNA ScreenTape® (The Agilent 2200 TapeStation system) and we obtained a range of RNA from 200-1600 pg/ $\mu\text{L}$ . We also extracted RNA from the cortical brain tissue using Trizol® Reagent (Life Technologies) followed by the PureLink™ RNA Mini Kit (#12183018A, Invitrogen). In this case, we assessed the RNA quantity and quality using a ND-1000 micro-spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Total RNA was reverse-transcribed using a mixture of random primers (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, #4387406). For RNA obtained from brain tissue, 1,000 ng of total RNA were reverse-transcribed and the final product was diluted 6 times in RNase-free water. For samples of FACS-sorted cells, cDNA was pre-amplified (TaqMan® Pre Amp Master Mix (2 $\times$ ) #4384266) in order to obtain enough cDNA for real-time-PCR. The preamplification step was carried out using a pool of TaqMan probes

and the final pre-amplified product was diluted 20 times with tris-EDTA buffer pH 8.0 (#BP2473, Fisher Bioreagents).

Real-time quantitative RT-PCR analysis was carried out with Taqman system (#4304437, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) or by SYBR green I dye detection (#11761500, Invitrogen) using the iCycler iQTM Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad). Primers are listed in Supplementary Table S1. For Taqman system, the qPCR conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and finally 1 min at 60 °C. For SYBR green system, PCR primers were designed with Primer-Blast software of PubMed to bridge the exon-intron boundaries within the gene of interest to exclude amplification of contaminating genomic DNA, and were purchased from IDT (Conda, Spain). Optimized thermal cycling conditions for SYBR green assays were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 sec at 95 °C and 1 min at 60 °C and finally 1 min at 95 °C, 1 min and 10 s at 55 °C. Data were collected after each cycle and were graphically displayed (iCycler iQTM Real-time Detection System Software, version 3.1, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Quantification was performed by normalizing cycle threshold (Ct) values with the HPRT1 or GAPDH or Rpl14 housekeeping gene Ct, and analysis was carried out with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

#### Administration of FITC-albumin

For visualization of patent brain vessels, at the time of euthanasia we injected a fluorescent dye to the mice following a reported protocol, with modifications (Steinman et al., 2017). Mice were anesthetized with isoflurane and were perfused through the heart with 20 mL of PBS containing 0.1% heparin at room temperature (RT) and then with 20 mL of 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) at RT diluted in phosphate buffer (PB) pH 7.4, at 5 mL/min. This was followed by perfusion with 20 mL of a fluorescent gel previously prepared as follows: 400 mg of gelatin (Sigma, # G1890) were diluted in 20 mL of PBS at 50°C. When the temperature of the solution dropped below 40 °C, 10 mg of FITC-albumin (Sigma, #A9771) was added, and the temperature was maintained at 37 °C until perfusion of the mice. After perfusion, mice were placed with the head down on ice to rapidly cool and solidify the gel. The brain was carefully removed from the skull after 15 min of cooling, and it was post-fixed in 4% PFA in PB at 4°C overnight.

#### Immunofluorescence

Mice were transcardially perfused via the left ventricle with 40 mL of cold saline followed by 20 mL of cold 4% PFA diluted in PB pH 7.4. The brain was removed, fixed overnight with the same fixative, and immersed in 30% sucrose in PB for cryoprotection for at least 48h until the brains were completely sunk to the bottom of the tube. Then brains were frozen in isopentane at -40 °C. Cryostat brain sections (14- $\mu$ m thick) were fixed in ethanol 70%, blocked with 3% normal serum, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit polyclonal antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:400, #Z0334, Dako) or pan-laminin (1:100, #Z0097, Dako); goat polyclonal antibodies against PDGFR $\beta$  (1:100, #AF1042; R&D) or Arginase-1 (1:100, #SC-18354, Santa Cruz Biotech.); rat monoclonal antibody against CD68 (1:100, #MCA195, BioRad) or CD31 (1:50, #550274, BD Pharmingen). To amplify the signal of the DsRed cells we used a goat polyclonal anti-DsRed antibody (#sc-33354, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1:100. The secondary antibodies were: Alexa Fluor 488, 546, or

647 (Molecular Probes; Life Technologies S.A.) diluted 1:500. Cell nuclei were stained with DAPI or To-Pro3 (Invitrogen). Images were obtained in a confocal microscope (TCS SPE-II microscope from Leica Microsystems). Images were not further processed except for enhancing global signal intensity in the entire images for image presentation purposes using LAS software (Leica), ImageJ, or Adobe Photoshop.

After immunofluorescence, we sampled a representative zone of the infarcted brain tissue by analysing three sections separated from each other by a thickness of 1-mm (starting at 1.7 mm from Bregma). We estimated the density of FITC-albumin<sup>+</sup> vessels by measuring the % of FITC<sup>+</sup> area in 12 different regions-of-interest (ROIs) per section. ROIs were as follows: 3 ROIs within the infarcted core, 2 ROIs in the periphery, 1 ROI in the distant non-affected cortex, and corresponding mirror ROIs in the contralateral hemisphere. The area of each ROIs was 0.4 mm<sup>2</sup>. Images were obtained with the 20x objective of a microscope (Olympus BX51) with motorized stage (Prior Pro Scan II) and equipped with a digital camera (Olympus DP71). FITC<sup>+</sup> vessel segmentation was achieved by manual thresholding using ImageJ. Results of the measures of the different ROIs per mouse were averaged to obtain values representative of each animal. Quantification was carried out in a blinded fashion using a coding system that did not reveal the identity of the experimental groups.

#### Free-floating immunostaining and brain clearing

To obtain a global view of vessel density in the affected tissue we perfused the mice with FITC-albumin hydrogel as described above and the brain was sectioned in two coronal parts at the level of +1.5 mm from Bregma. The anterior part was cut in 100- $\mu$ m thick coronal brain sections with a vibratome (VT1200S, LEICA), and we carried out free-floating immunostaining. The posterior coronal section (1.6 mm-thick) was clarified as described (Lugo-Hernández et al., 2017). Basically, the tissue was dehydrated in different gradients (30%, 60%, 80% and 100%) of tetrahydrofuran (Sigma-Aldrich) and clarified with dibenzyl ether (DBE) (Sigma-Aldrich). After this process, the thickness of the tissue was reduced to 0.7 mm. For image acquisition the cleared brain tissue was dipped in DBE and studied in a confocal microscope (Zeiss LSM 880). Image series with the field size resolution of 512x512 pixels were acquired along the tissue thickness with a motorized stage with 3.2  $\mu$ m steps in the Z direction to produce a final “Z stack”. We used a 10X 0.4 NA objective and a master pinhole size set to 1.0 AU, and the tissue was excited using a 488 nm laser. The images were acquired in a bidirectional sweep system at 9  $\mu$ m/s with a line average of 2. For section alignment we carried out a 9 % overlap correction. In order to compare the 3D images of the different samples, we generated the maximum intensity projection of a 451- $\mu$ m thick slice equal for each sample.

#### Statistics

Two-group comparisons were carried out with two-tailed Mann–Whitney test or *t*-test, as required after testing for normality. Multiple groups were compared with one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, or two-way ANOVA, followed by post-hoc analysis. Correction for multiple *t*-test comparisons was carried out. The specific tests used in each experiment, p values, and n values are stated in the Figure Legends. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 8.2.0. In experiments designed to study differences in stroke outcome between genotypes, sample size was calculated using G\*power 3.1 software (University of

Düsseldorf) with an alpha level of 0.05 and a statistical power of 0.95. The effect size  $d$  was estimated at 1.3, 1.1, and 1.8 for a change of 30% based on prior information on mean and SD infarct volume, rotarod time, and pole time, respectively, for wild type mice subjected to ischemia by the same researcher. According to this information we estimated a sample size of 15-20 mice per group.

## RESULTS

### Complex populations of peripheral leukocytes with various levels of CCR2 and/or CX3CR1 expression infiltrate the ischemic brain

We characterized the subpopulations of monocytes infiltrating the ischemic brain tissue in heterozygous  $Ccr2^{rfp/+}Cx3cr1^{gfp/+}$  double knock-in reporter mice using flow cytometry and confocal microscopy. Circulating leukocytes express different degrees of CCR2 and CX3CR1.  $Ly6C^{hi}$  monocytes are  $CCR2^+$  and show bright red fluorescence (RFP) whereas  $Ly6C^{low}$  monocytes express CX3CR1 and thus show green fluorescence (GFP) (Saederup et al., 2010).  $CD45^{dim}CD11b^{dim}$  microglia express higher levels of CX3CR1 than monocytes and do not express CCR2, thus they showed very bright green fluorescence and did not show red fluorescence (Fig. 1, Supplementary Fig. S1 and S2). At day 4 post-ischemia, infiltrating red cells dominated in the core and borders of infarction whereas microglia predominated at the border and periphery of the lesion (Fig. 1A). Infiltrating leukocytes with diverse mixtures of either red fluorescence or low green fluorescence, or both, with or without CD68 expression, were detected in the ischemic tissue (Fig. 1B). Fluorescent leukocytes persisted 15 days post-ischemia, where among other cells we observed very bright  $RFP^+$  leukocytes with morphology compatible with lymphocytes (Supplementary Fig. S3). These cells were prominent within the ischemic tissue and at the meningeal zone suggesting that  $CCR2^+$  leukocytes reached the injured brain tissue for long after stroke onset. Four and 15 days post-ischemia, we identified subsets of  $RFP^+$  leukocytes positive for Arginase-1 ( $Arg1$ ), a marker of alternative macrophage polarization, whereas  $Arg1^+$  immunofluorescence was not detected in microglia (Supplementary Fig. S4). Altogether, these results show brain invasion by a complex population of leukocytes composed of several subtypes of cells with different phenotypes and expressing CCR2 and/or CX3CR1 with various intensity degrees.

In order to further characterize the phenotype of the fluorescent cells, we studied the ischemic brain tissue by flow cytometry from 3h to 15 days post-ischemia (Fig. 1C, D, Supplementary Fig. S1 and S2). Leukocyte infiltration progressively increased with maximal peaks of neutrophils ( $CD45^{hi}CD11b^+Ly6G^+$ ) at day 1, monocytes ( $CD45^{hi}CD11b^+Ly6G^-Ly6C^+$ ) and macrophages ( $CD45^{hi}CD11b^+Ly6G^-F4/80^+$ ) at day 4, and maximal numbers of lymphoid cells ( $CD45^{hi}CD11b^-$ ), particularly T cells ( $CD45^{hi}CD11b^-CD3^+$ ), at day 15 (Fig. 1C). The majority of infiltrating  $Ly6C^{hi}$  monocytes was double-positive for RFP and showed low levels of GFP at all-time points, whereas  $Ly6C^{low}$  monocytes showed a time-dependent shift towards  $GFP^+$  and they lost RFP expression, and similar results were found for  $F4/80^+$  macrophages (Fig. 1D). Infiltrating neutrophils were  $RFP^-$  and the vast majority of these cells did not express GFP either (Supplementary Fig. S2). In addition to myeloid cells, several lymphocytic populations express CCR2 or CX3CR1 (Ruth et al., 2001; Bakos et al., 2017). Accordingly, we detected  $RFP^+$

lymphoid cells in the ischemic brain tissue. Most B cells (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45R<sup>+</sup>) were double negative for RFP and GFP, but we detected RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> infiltrating T cells from the first hours post-ischemia and becoming particularly prominent at day 15 (Fig. 1D). Furthermore, about one-half of the infiltrating  $\gamma\delta$  lymphocytes (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup> $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>) and NK cells (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) were also RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>. Therefore, the group of CCR2<sup>+</sup> leukocytes infiltrating the ischemic brain tissue is a heterogeneous and dynamic population of leukocytes including monocytes and lymphoid cells.

### **CCR2-deficiency in monocytes reduces monocyte infiltration to the ischemic brain tissue without affecting the recruitment of other leukocytes**

To investigate the function of infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes we induced selective CCR2 deletion in myeloid cells by crossing LysMcre<sup>+</sup> mice with floxed Ccr2 (Ccr2<sup>fl/fl</sup>) mice that express reporter eGFP (Fig. 2A) (Willenborg et al., 2012). CCR2 deficiency is restricted to mononuclear myeloid cells (CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) (Fig. 2B) since the highest LysMcre recombination takes place in myeloid cells (Supplementary Fig. S5) but it is low in microglia (Goldmann et al., 2013), and the expression of CCR2 is low in neutrophils and microglia (Supplementary Fig. S1 and S2). We induced ischemia in Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup> mice and Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>-</sup> littermates, which were used as the control genotype (Fig. 2A). Studying the brain tissue by flow cytometry (Fig. 2C) showed ischemia-induced strong infiltration of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes to the injured tissue at day 1, whereas Ly6C<sup>lo</sup> monocytes were minority at this time point (Fig. 2C, D). Compared with mice of the control genotype, Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup> mice showed reduced brain infiltration of Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo</sup> monocytes 24h post-ischemia (Fig. 2D). Absence of CCR2 in monocytes did not cause significant modification in the infiltration of neutrophils (Fig. 2D) or lymphocytes (Supplementary Fig. S6).

Brain *Ccl2* mRNA expression increased 24h post-ischemia and declined afterwards showing that the CCL2/CCR2 axis was mainly involved in monocyte recruitment during the acute phase of stroke but it was dispensable at chronic phases. Up-regulation of *Ccl2* mRNA expression in the ischemic brain tissue was not affected in Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup> mice (Fig. 2E). These experiments showed that CCR2<sup>+</sup> monocytes rapidly infiltrate the ischemic brain tissue in response to chemoattraction through the CCL2/CCR2 axis, and mice with CCR2-deficient monocytes showed reduced monocyte infiltration to the ischemic brain tissue.

### **Absence of CCR2<sup>+</sup> monocytes impairs stroke neurological outcome**

We then investigated whether reduced infiltration of monocytes affected stroke outcome. The volume of infarction was similar in Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup> mice than the corresponding Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>-</sup> controls (Fig. 3A, B). Given that we found no significant differences between male and female mice in infarct volume after ischemia we pooled mice of both sexes in the following studies. In another group of mice, we studied infarct volume by MRI and the neurological function up to 15 days post-ischemia. In this experiment, again we did not observe differences in the volume of the lesion 1 or 15 days post-ischemia (Fig. 3C). However, the neurological function was more impaired in the mice with CCR2-deficient monocytes, as



shown by the poorer performance in the Pole test (Fig. 3D) and the Rotarod test (Fig. 3E). These results illustrate a beneficial role of CCR2<sup>+</sup> monocytes in brain ischemia.

### **Effect of CCR2<sup>+</sup> monocytes in mRNA expression of genes related to inflammation and angiogenesis**

Ischemia induced an acute inflammatory reaction highlighted by increased mRNA expression of cytokines, like *Il1b* and *Il6*, one day post-ischemia that decreased in the following days (Fig. 4A,B). Pro-inflammatory gene expression was accompanied by the expression of genes that are considered hallmarks of M2 alternative macrophage activation (Loke et al., 2002), such as *Chil3* (YM1) and *Arg1* (Fig. 4A,B). Compared to the control genotype, the mice with CCR2-deficient monocytes showed reduced mRNA expression of *Il1b* and *Il6*, but also *Arg1* and *Chil3* one day post-ischemia (Fig. 4A,C). However, these mice showed a delayed exacerbated inflammatory response, highlighted by increased mRNA expression of *Il1b*, amongst other genes, 15 days post-ischemia (Fig. 4A,C).

Given that monocyte-derived macrophages participate in tissue repair and regeneration in different organs (Mantovani et al., 2013; Das et al., 2015), we evaluated the mRNA expression in brain tissue of different growth and pro-regenerative factors. Ischemia generally increased most of the factors studied (Fig. 4A,B). Angiogenesis is an important process to heal the injured tissues. The expression of angiopoietin gene *Angpt2* increased one day post-ischemia and the effect was attenuated in mice with CCR2-deficient monocytes, whereas *Angpt1* expression was higher in the latter group (Fig. 4A,C). The vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling pathway is a potent stimulator of angiogenesis (Shibuya et al., 2011; Eming et al., 2014). Expression of *Vegfa* and the VEGF receptors, *Flk1* (*Kdr*, VEGFR2), and *Flt4* (VEGFR3) increased 1 and/or 4 days post-ischemia (Fig. 4A, B), but the effect was attenuated in mice with CCR2-deficient monocytes suggesting a reduced angiogenic capacity (Fig. 4A,C). Macrophages can induce pro-angiogenic functions by signalling to pericytes (Minutti et al., 2019). Ischemia reduced the mRNA expression of *Pdgfbr* and *Pdgfb* mRNA and increased the expression of *Acta* mRNA, encoding for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (Fig. 4A,B). The ischemia-induced changes in pericyte-related genes were less prominent in mice with CCR2-deficient monocytes (Fig. 4A,C). Altogether, the gene expression study suggested a contribution of CCR2<sup>+</sup> monocytes to angiogenesis after brain ischemia. Also, the observation of differences between genotypes in gene expression of both pro-inflammatory and pro-repair genes indicated that there could be different functionally heterogeneous subsets of infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes.

### **Gene expression in Ly6C<sup>hi</sup> vs. microglia**

Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes are pro-inflammatory (Miró-Mur et al., 2016). However, expression of VEGFR-1 has been detected in monocytes (Sawano et al., 2001), and there are subsets of pro-angiogenic VEGFA<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Willenborg et al., 2012). In order to obtain information about the features of the infiltrating Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, we isolated them from the ischemic brain tissue one-day post-ischemia by fluorescence-activating cell sorting (FACS). We obtained RNA from the sorted cells and studied gene expression. For comparative purposes, we also sorted microglia from the same ischemic brains, and obtained control microglia from naïve mice. We conducted this study using a lineage-tracing strategy in Cx3cr1cre<sup>ERT2</sup>:Rosa26-

tdT mice. Ischemia was induced after three-weeks of washout following tamoxifen administration to allow turnover of circulating fluorescent monocytes while fluorescent microglial cells persist because they are long living cells (Parkhurst et al., 2013). The flow cytometry gating strategy for cell sorting is shown in Supplementary Fig. S7. We validated that *Ccr2* expression was higher in the sorted Ly6C<sup>hi</sup> monocytes than microglia whereas the typical microglia marker *Tmem119* was virtually undetectable in Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Fig. 5A). Ly6C<sup>hi</sup> monocytes showed higher expression of *Il1b* than microglia from the ischemic brain and a tendency to higher *Il6*, but not *Tnfa* (Fig. 2A). Notably, Ly6C<sup>hi</sup> monocytes showed considerable higher expression than microglia of the M2 genes *Chil3* and *Arg1* (Fig. 5A). Furthermore, Ly6C<sup>hi</sup> monocytes overexpressed *Vegfa* and its receptor *Flt1* compared to microglia (Fig. 5A), suggesting that subsets of infiltrating CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> monocytes may have pro-angiogenic features. Given the observed expression of *Arg1* mRNA in Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, we studied Arginase-1 (Arg-1) expression by intracellular flow cytometry one-day post-ischemia. A subset of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (15%) was positive for Arg-1 in the ischemic brain tissue but not in the blood (Fig. 2B) showing that the population of infiltrating Ly6C<sup>hi</sup> monocytes includes cells with diverse phenotypes.

### **Involvement of CCR2<sup>+</sup> monocytes in angiogenesis**

Down-regulation of pro-angiogenic gene expression in the ischemic tissue of mice with CCR2-deficient monocytes (Fig. 4) and expression of *Vegfa* mRNA in Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Fig. 5) led us hypothesize that infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes may promote angiogenesis. To identify whether the ischemic tissue contained patent vessels post-ischemia, we perfused the mice through the heart with a FITC-albumin-based gel at the time of euthanasia and examined FITC<sup>+</sup> vessels at different time points post-ischemia (Fig. 6A). Ischemia caused a reduction of patent vessels in the core of the lesion at day 1, but this effect was attenuated at day 8 due to the presence of FITC<sup>+</sup> vessels within the core of the lesion. Of note, this latter effect seemed to be attenuated in mice with CCR2-deficient monocytes. The lesion core contained CD68<sup>+</sup> macrophages and was surrounded by a GFAP<sup>+</sup> astroglial scar (Fig. 6B). FITC<sup>+</sup> vessels were CD31<sup>+</sup> and were surrounded by a prominent basal lamina (pan-laminin<sup>+</sup>) and PDGFβR<sup>+</sup> scaffold-like structures (Fig. 6C, D). We measured FITC<sup>+</sup> vessel density in different regions of the brain of *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMCre<sup>+</sup>* mice and *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMCre<sup>-</sup>* mice 8 days post-ischemia. Notably, mice with CCR2-deficient monocytes showed reduce density of FITC<sup>+</sup> patent vessels in the core region compared to the control genotype. These results show that the presence of CCR2<sup>+</sup> monocytes promotes local angiogenesis.

### **Effects of administration of bone marrow monocytes in the outcome of ischemia**

To find out whether bone marrow monocytes from CCR2<sup>+/+</sup> mice could rescue the detrimental effects of monocyte CCR2-deficiency, we administered monocytes obtained from the bone marrow of CCR2<sup>+/+</sup> mice to *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMCre<sup>+</sup>* mice 6 hours post-ischemia (Fig. 7A). Immature monocytes initially released from the bone marrow are predominantly Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> cells (Nahrendorf et al. 2007; Miró-Mur et al., 2016). To study whether the injected monocytes were present in the brain long after administration, we injected CCR2<sup>+/+</sup> monocytes obtained

from the bone marrow of reporter DsRed mice and studied the brain 8 days later. We found DsRed<sup>+</sup> cells in the ischemic brain tissue, where they displayed the typical morphology of macrophages and were mainly associated with the vascular basal lamina and PDGFβR<sup>+</sup> cells forming scaffold-like structures (Fig. 7B). We also found endogenous Ccr2<sup>-/-</sup> monocytes (Ccr2<sup>egfp/egfp</sup>) of the recipient mice but, compared to the injected DsRed cells, eGFP<sup>+</sup> monocytes were smaller and their morphology was more similar to monocytes than macrophages (Fig. 7B). This difference could be attributable to later infiltration of CCR2<sup>-/-</sup> monocytes, which are unable to respond to the rapid release of CCL2 shortly after stroke onset.

We then studied whether administration of CCR2<sup>+/+</sup> bone marrow monocytes to Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMCre<sup>+</sup> mice modified stroke outcome. For treatment control, Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMCre<sup>+</sup> mice received administration of bone marrow monocytes obtained from mice of the same genotype. We administered the cells 6 hours after induction of ischemia, measured infarct volume at day 1, and conducted behavioural tests at days 1, 4 and 8 post-ischemia (Fig. 7A). Neither infarct volume nor performance in the Pole test and the Rotarod test differ between treatment groups (Fig. 7C). The treatment did not change gene expression in the ischemic tissue 8 days post-ischemia (Fig. 7E). Overall this treatment regimen with a single administration of bone marrow CCR2<sup>+/+</sup> monocytes was unable to rescue the effects of monocyte CCR2-deficiency after ischemic stroke.

## DISCUSSION

This study shows that complex populations of CCR2<sup>+</sup> leukocytes, including monocytes and lymphocytes, infiltrate the ischemic brain tissue. By selectively deleting CCR2 expression in monocytes using genetically modified mice we found that CCR2<sup>+</sup> monocytes enhanced the expression of pro-inflammatory cytokines during the first day post-stroke. In spite of this effect, CCR2<sup>+</sup> monocytes promoted resolution of inflammation and limited the functional impairment during 15 days post-ischemia. This latter finding is in agreement with previous studies showing a detrimental effect of CCR2 blockade in ischemic stroke (e.g. Gliem et al., 2012; Chu et al., 2015; Wattananit et al., 2016; Fang et al., 2018). Our study demonstrates that this effect is attributable to CCR2<sup>+</sup> monocytes rather than other populations of CCR2<sup>+</sup> leukocytes that also infiltrate the ischemic brain tissue.

Inflammation is regarded as a detrimental response that exacerbates brain damage after stroke and it is considered as a target for therapeutic intervention (Iadecola and Anrather, 2011; Chamorro et al., 2016). However, inflammation triggers subsequent processes involved in cell migration, proliferation, matrix deposition and tissue remodelling (Eming et al., 2014). The experimental model of cortical ischemia used in this study by permanent distal occlusion of the middle cerebral artery induced a sharp peak of pro-inflammatory cytokine expression 1 day post-ischemia that decreased at day 4. CCR2<sup>+</sup> monocytes infiltrating the ischemic lesion partly contributed to this effect but they also exerted long term benefits. In line with this finding, systemic injection of low-dose lipopolysaccharide induces a Ly6C<sup>hi</sup> monocyte response that protects the brain after transient middle cerebral artery occlusion in mice (Garcia-Bonilla et al., 2018). It is possible that a certain degree of acute inflammation in the injured brain

tissue was necessary to initiate secondary processes involved in lesion resolution and repair. The effect of acute inflammation is different from chronic inflammation that delays healing (Barrientos et al., 2008). Accordingly, several stroke co-morbidities chronically raise the inflammatory status and worsen stroke outcome (Drake et al., 2011). The mice with CCR2-deficient monocytes showed an attenuated acute inflammatory response but a delayed increase in pro-inflammatory mediators that may impair tissue repair.

Damage resolution in different organs involves the action of macrophages (van Amerongen et al., 2007). Permanent ischemia causes a strong reduction of blood supply to the ipsilateral cortex and loss of patent vessels in the core of infarction. However, eight days post-ischemia we detected an increase in patent blood vessels in the infarcted core where macrophages were located. This effect was attenuated in mice with CCR2-deficient monocytes, suggesting the participation of these cells in angiogenesis. Accompanying the expression of inflammatory molecules, we found that CCR2<sup>+</sup> monocytes contributed to the tissue expression of genes involved in angiogenesis and repair. Mice with CCR2-deficient monocytes showed reduced ischemia-induced upregulation of *Vegfa* and its receptors, which play crucial functions in angiogenesis (Shibuya et al., 2011; Eming et al., 2014). Likewise, pericytes are critically involved in angiogenesis (Bergers and Song, 2005) and exert repair functions. For instance, pericytes promote differentiation of oligodendrocyte precursors favouring remyelination (de la Fuente et al., 2017). Macrophages signal to pericytes inducing the differentiation to collagen-producing myofibroblasts involved in tissue re-vascularization and wound healing (Minutti et al., 2019). Pericytes express low levels of  $\alpha$ -SMA (Skalli et al., 1989; Smyth et al., 2018; Alarcón-Martínez et al., 2018) and  $\alpha$ -SMA induction in pericytes is taken as a marker of pericyte-myofibroblast transition (Yang et al., 2019; Minutti et al., 2019). Ischemia reduced the mRNA expression of *Pdgfbr* and *Pdgfb* mRNA and increased the expression of *Acta* mRNA, and these effects were mediated, at least in part, by CCR2<sup>+</sup> monocytes. Therefore, it is possible that brain CCR2<sup>+</sup> monocytes favoured pericyte differentiation to pro-angiogenic fibroblasts. Furthermore, infiltrating Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, or some subset of these cells, may display proangiogenic features because they express *Vegfa*. Indeed, gene expression in Ly6C<sup>hi</sup> cells sorted from the ischemic brain tissue showed expression of *Il1b*, *Arg1*, *Chil3*, *Vegfa* and *Flt1*. However, it is possible that these various genes were expressed in different subsets of CCR2<sup>+</sup> monocytes. In agreement with this view, a subset of the CCR2<sup>+</sup> monocytes expressing strong levels of VEGF-A was reported and was found to play a crucial role inducing vascular sprouts (Willeborg et al., 2012). Also, previous studies showed that monocytes express VEGFR1 (Flt1) and expression of this receptor is upregulated during differentiation to macrophages (Sawano et al., 2001). Therefore, our results are compatible with the possibility that infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes contained different functional subsets of cells with some of them being involved in angiogenesis and tissue repair.

In the ischemic tissue we detected subpopulations of CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> monocytes that may correspond to 'intermediate' monocytes. Several lines of evidence suggest that classical monocytes can be reprogrammed *in situ* at the lesion site. In a model of sterile hepatic injury, classical pro-inflammatory CCR2<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>low</sup> monocytes phenotypically convert into non-classical or alternative CX3CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>low</sup> monocytes (Dal-Secco et al., 2015). We also observed that the initial prevalence of infiltrating Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>low/-</sup> monocytes in the acute phase

of stroke shifted towards predominant Ly6C<sup>lo</sup> populations with different degrees of CCR2 and CX3CR1 expression at later phases. Furthermore, tissue macrophages, not microglia, expressed *Arg1* and *Chil3*, which are markers of alternatively polarized macrophages involved in lesion resolution (Loke et al., 2002). Despite the strong evidence of pro-reparative functions of some subset of CCR2<sup>+</sup> monocytes, administration of bone marrow monocytes from CCR2<sup>+/+</sup> mice 6 hours post-ischemia to mice with CCR2-deficient monocytes did not restore the alterations found in these mice. Several factors may contribute to explain this result. First, the number of infiltrating monocytes after a single administration might be insufficient for complete restoration of the function. Second, we obtained monocytes from the bone marrow, which contains mainly immature Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> monocytes (Nahrendorf et al. 2007; Miró-Mur et al., 2016). The observed phenotypic heterogeneity in the population of brain infiltrating CCR2<sup>+</sup> monocytes may include minor subsets of cells with pro-repair capacity that are absent in monocytes directly extracted from the bone marrow. Thus, immature bone-marrow monocytes may require some maturation process possibly acquired in the circulation or other organs acting as reservoirs of specific monocyte subsets with reparative capacity.

In conclusion, this study shows that a complex population of CCR2<sup>+</sup> leukocytes infiltrates the ischemic brain tissue, including myeloid and lymphoid cells. Selective deletion of CCR2 in monocytes reduces ischemia-induced acute brain inflammation but causes a delayed inflammatory response, reduces angiogenesis and impairs the neurological function. We identified pro-inflammatory and pro-angiogenic traits in CCR2<sup>+</sup> monocytes infiltrating the ischemic brain tissue suggesting that these cells comprise heterogeneous subsets of cells with diverse phenotypes and functions. Unravelling the phenotypic heterogeneity within the CCR2<sup>+</sup> monocyte population infiltrating the ischemic brain tissue can open new avenues to design monocyte-based therapies for functional recovery after ischemic stroke.

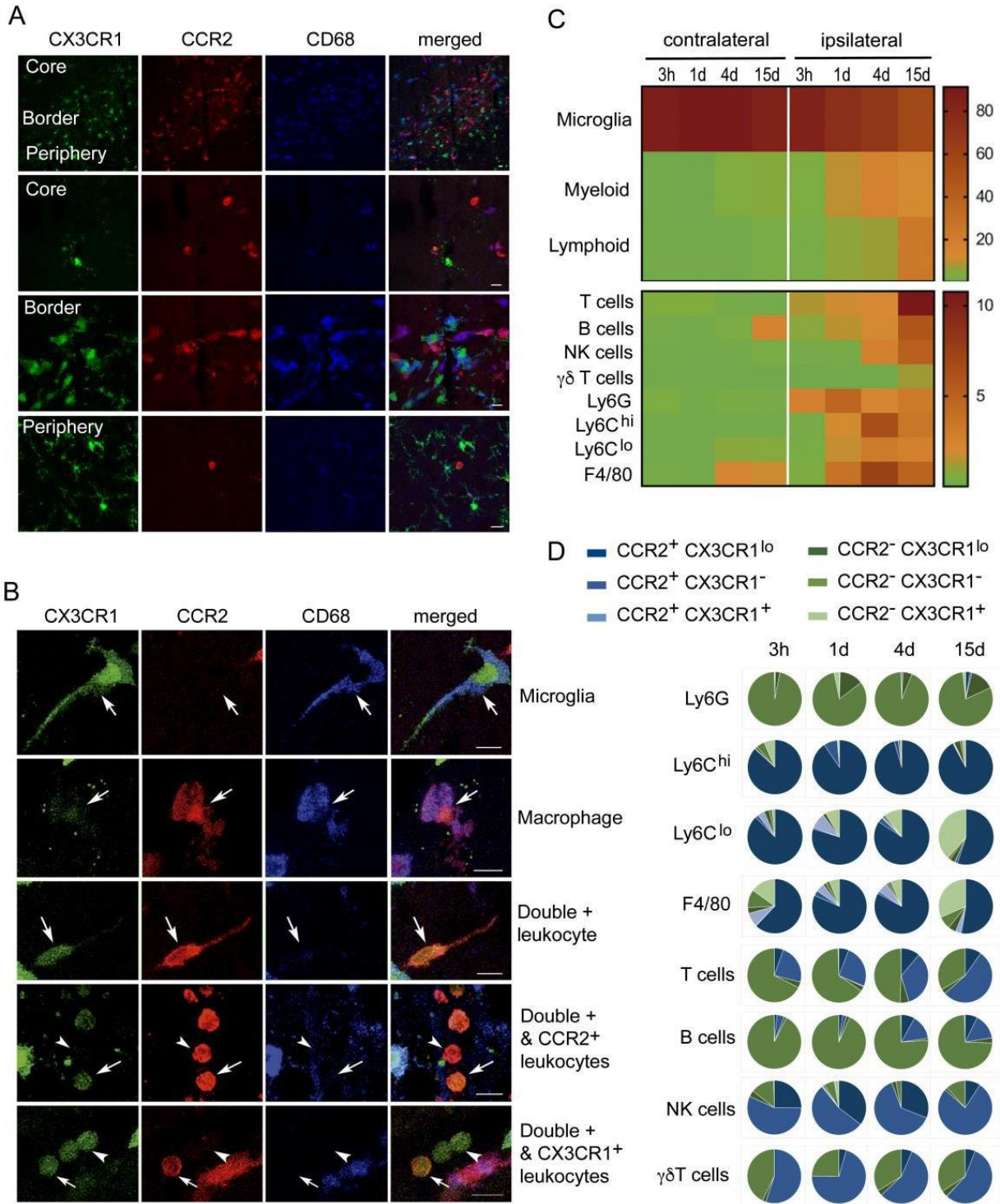
#### **ACKNOWLEDGMENTS**

Supported by a grant from the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (SAF2017-87459-R) co-funded by the *Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (FEDER), and help of AGAUR, *Generalitat de Catalunya* (2017-SGR-645). JP had a predoctoral fellowship of AGAUR. FMM was supported by the *Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut* (PERIS) program of the Health Department of the *Generalitat de Catalunya*. AOda had a predoctoral fellowship from the MINECO-FPI program (BES-2015-074419). FRJ was supported by *Redes Temáticas de Investigación Colaborativa Sanitaria* (RETICS-INVICTUS PLUS RD16/0019/0014) of the *Instituto de Salud Carlos III* co-funded by FEDER. We thank Clara Castellví and Marina Purroy for technical help in behavioural tests and image acquisition, respectively. Part of this work was performed at the *Centre de Recerca Biomèdica Cellex*, Barcelona. The *Centres de Recerca de Catalunya* (CERCA) Program of the *Generalitat de Catalunya* supports the *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS). We thank the Cytomics and Image platforms of IDIBAPS, and the Microscopy Unit-Campus Clínic of the *Serveis Científico-Tècnics* of the University of Barcelona for technical support.



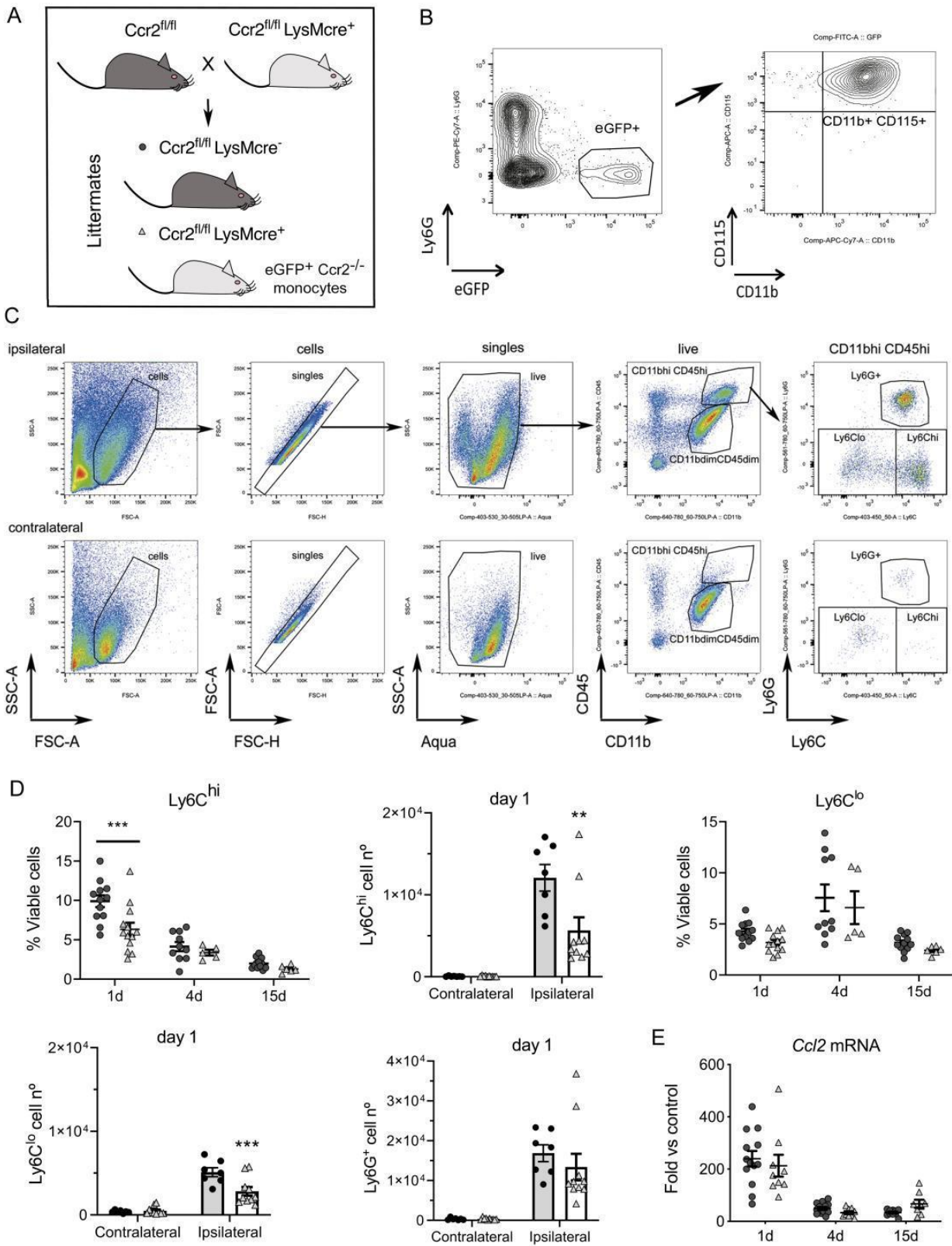
FIGURES

Figure 1



**Fig.1. A complex population of CCR2<sup>+</sup> and or CX3CR1<sup>+</sup> leukocytes infiltrate the ischemic brain tissue.** We induced ischemia in the CCR2-rfp<sup>+/-</sup> CX3CR1-gfp<sup>+/-</sup> double knock-in reporter mice. A) Confocal microscopy of brain tissue four days post-ischemia (n=3) shows red cells concentrated in the core of infarction whereas green cells predominated in the infarct periphery. The highest density of fluorescent cells consisting of a mixed population of green and red cells is seen at the borders of infarction where some of the fluorescent cells co-localize with CD68 immunostaining. Microglia cells are very bright GFP<sup>+</sup> cells mainly located at the infarct periphery. B) Examples of individual cells with different morphologies showing single positive (either RFP or GFP fluorescence) and double positive cells. Besides very intense green microglial cells, in the ischemic hemisphere there are RFP<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> cells, compatible with monocyte-derived macrophages. Other infiltrating cells are CD68<sup>-</sup> and exhibit different degrees of RFP fluorescence intensity (from high to low) and/or GFP (low or absent). C,D) Flow cytometry results of cell populations in the contralateral and ipsilateral cortex at different time points post-ischemia ranging from 3 hours to 15 days (n=3-4 mice per group). Gating strategy is shown in Supplementary Fig. S1 and S2. The percentage of the different myeloid and lymphoid cells is shown as a heatmap in (C), and the frequency of CCR2 and CX3CR1 within each cell population and time point is shown as pie charts in (D). Most Ly6C<sup>hi</sup> cells are CCR2<sup>+</sup> CX3CR1<sup>lo</sup>. Of note, leukocytes, other than Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, also express CCR2. Scale bar: 10 μm.

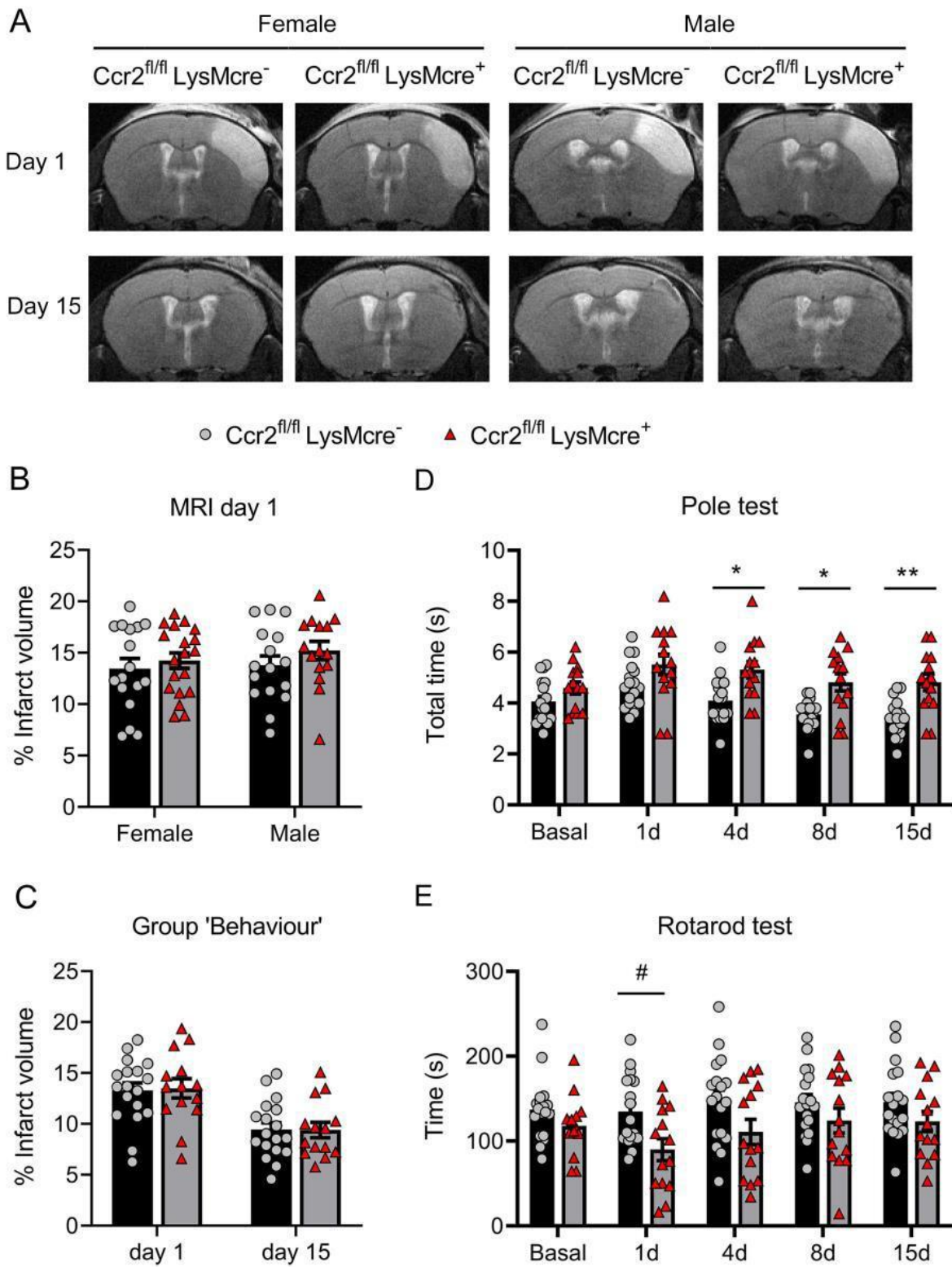
Figure 2



**Fig. 2. CCR2-deficiency in monocytes reduces monocyte infiltration to the ischemic tissue.**

We conditionally targeted *Ccr2* gene expression by Cre-mediated recombination crossing *LysMcre<sup>+</sup>* mice with floxed CCR2 mice (*Ccr2<sup>fl/fl</sup>*) that express reporter eGFP (Willenborg et al., 2012). A) The study was conducted in littermate *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup>* and *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>-</sup>* mice. B) We verified that blood eGFP<sup>+</sup> cells in the Cre<sup>+</sup> mice were CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. C) Gating strategy to study monocytes and neutrophils in the contralateral and ipsilateral brain hemispheres after ischemia. D) We studied monocyte subsets infiltrating the brain tissue at different time points after induction of ischemia, i.e. 1, 4 and 15 days by flow cytometry in mice of both genotypes (n=5-12 mice per time point and genotype). Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo</sup> monocytes increased after ischemia in the ipsilateral (ischemic) but not the contralateral hemisphere. The % of CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> cells is lower in *Ccr2<sup>fl/fl</sup>LysMcre<sup>+</sup>* mice one day post-ischemia (Two-way ANOVA by genotype and time point followed by Sidak's multiple comparisons test, \*\*\*p<0.001). The number of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes decreases in the ipsilateral hemisphere in Cre<sup>+</sup> mice at day 1 (Two-way ANOVA by genotype and brain region followed by Sidak's multiple comparisons test; \*\*\*p<0.001). The % of CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>lo</sup> cells also tend to decrease in cre<sup>+</sup> mice (Two-way ANOVA by genotype and time point, genotype effect p=0.06), and the absolute cell number at day 1 is lower in Cre<sup>+</sup> mice (Two-way ANOVA by genotype and brain region followed by Sidak's multiple comparisons test; \*\*\*p<0.001). However, the numbers of infiltrating neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>) are no different between genotypes. E) *Ccl2* mRNA expression in the ischemic brain tissue at different time points after ischemia shows the highest increase at day 1 versus 4 or 15 days, but there are no differences between genotypes (n=8-14 mice per time group and genotype). Values are expressed as fold versus non-ischemic contralateral hemisphere of the control genotype.

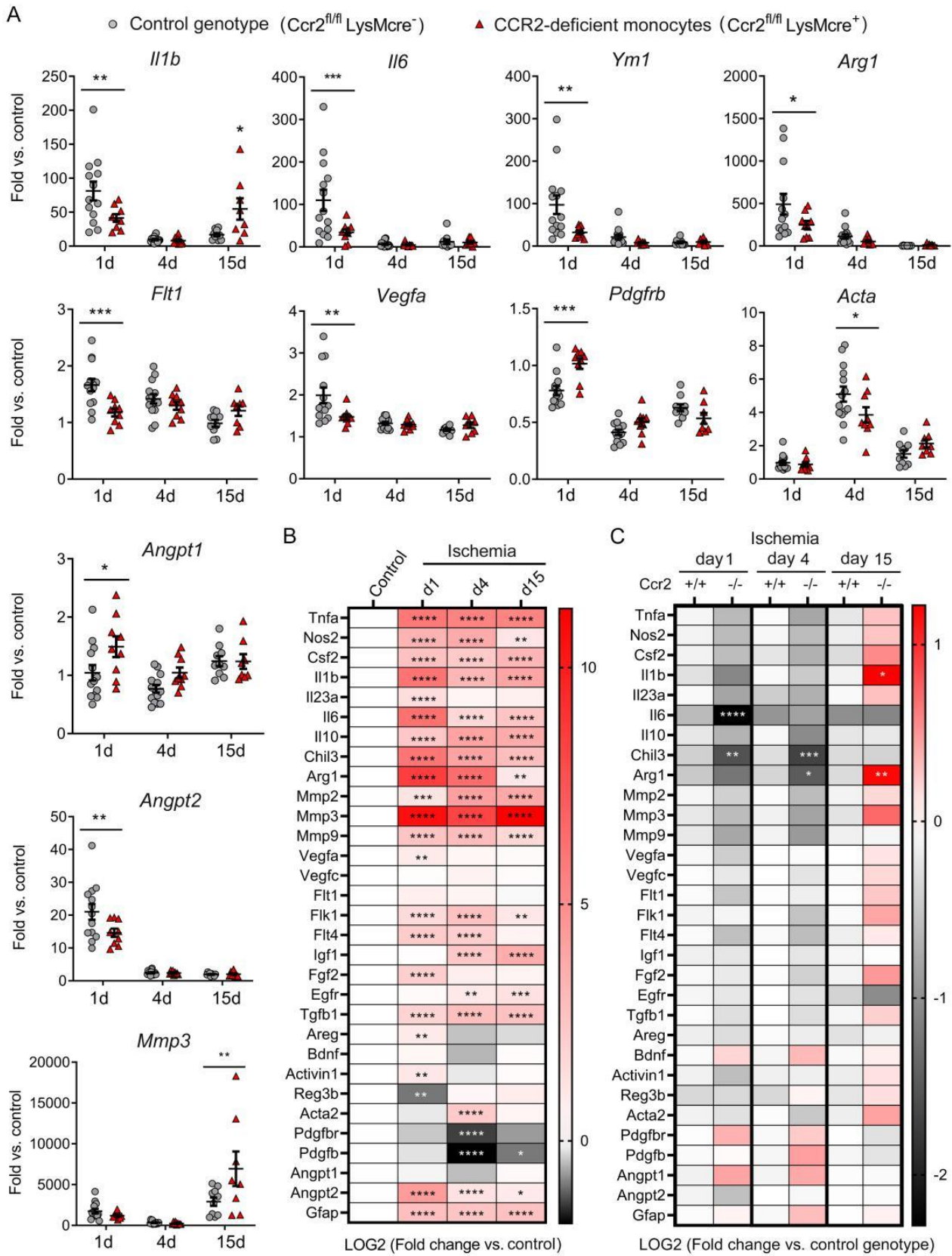
Figure 3





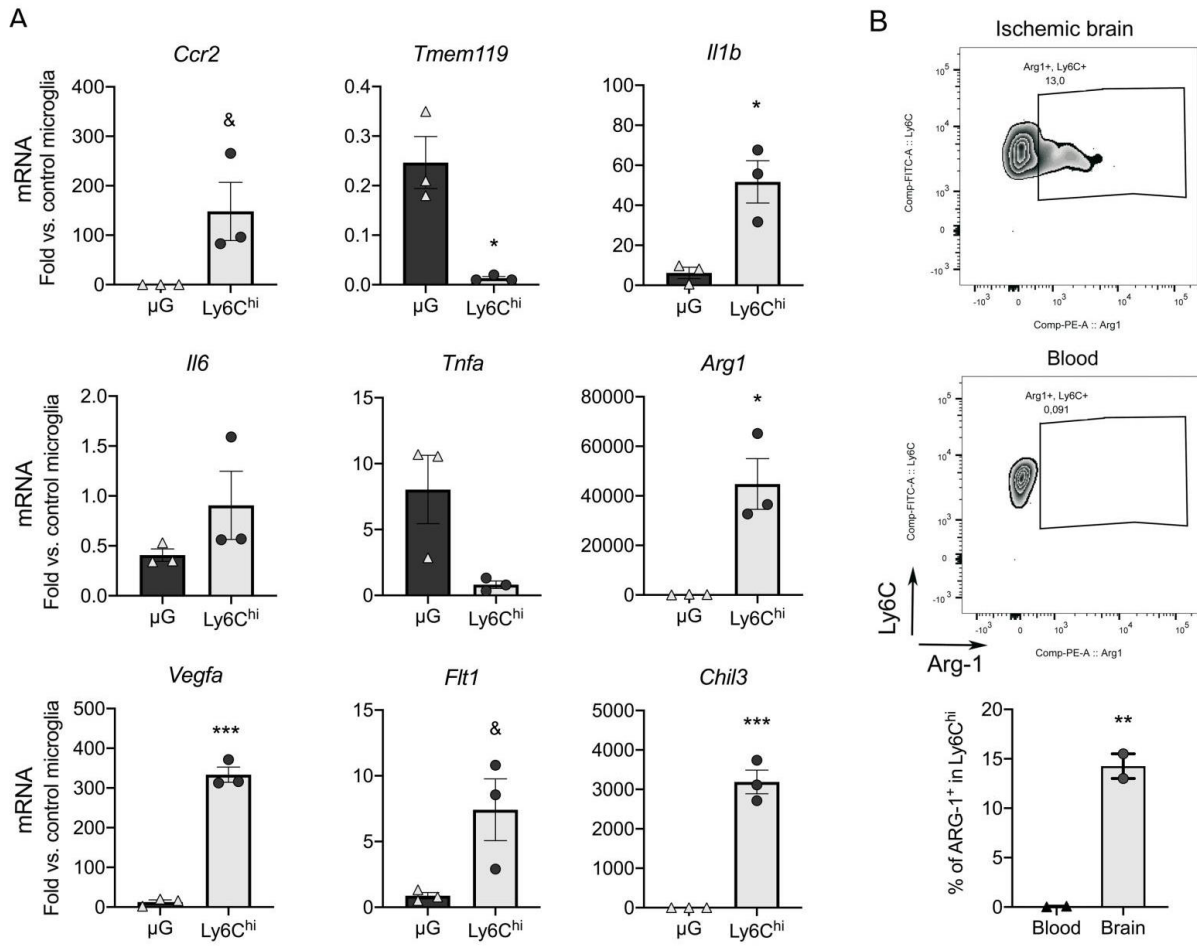
**Fig. 3. CCR2<sup>+</sup> monocytes mediate prevent neurological impairment after ischemic stroke.** We compared stroke outcome in mice with CCR2-deficient monocytes ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice) and corresponding control littermate mice ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$  mice). A) MRI images (T2w) show infarct volume in female and male mice of both genotypes at different time points for each mouse. B) MRI infarct volume 1 day post-ischemia in  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$  female (n=16) and male (n=17) mice and  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  female (n=15) and male (n=19) mice. There were no differences in infarct volume between sexes or genotypes; two-way ANOVA by genotype ( $p=0.212$ ) and sex ( $p=0.465$ ). C) In an independent group of mice we pooled male and female mice of each genotype (n=18  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$  mice; n=14  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice) and studied infarct volume by MRI twice, at 1 and 15 days post-ischemia and conducted behavioural tests in the same mice at both time points (Group 'Behaviour'). Again we found no significant differences in infarct volume due to genotype; two-way ANOVA by genotype ( $p=0.932$ ) and time ( $p<0.001$ ) with a subject matching design (subject effect  $p<0.001$ ). D,E) The latter group of mice showed differences in behaviour between groups because the mice with CCR2-deficient monocytes showed worse performance. D) These mice needed more time to complete the Pole test (s, seconds) than the control genotype; two-way ANOVA by genotype ( $p=0.001$ ) and time ( $p<0.001$ ) with a subject matching design (subject effect  $p<0.001$ ) and no interaction between factors, followed by Sidak's multiple comparisons test that showed significant differences between genotypes at day 4 (\* $p=0.020$ ), day 8 (\* $p=0.015$ ), and day 15 (\*\* $p=0.004$ ). E) Also, mice with CCR2-deficient monocytes run less time (s, seconds) in the Rotarod test than the control genotype, two-way ANOVA by genotype ( $p=0.036$ ) and time ( $p=0.024$ ) and subject matching (subject effect  $p<0.001$ ) with no interaction between factors, followed by the Sidak's multiple comparisons test that highlighted significant differences between genotypes at day 1 (#  $p=0.05$ ).

**Figure 4**



**Fig. 4. Myeloid CCR2-deficiency alters gene expression in the ischemic brain tissue.** Gene expression assessed by qRT-PCR in the ischemic cortex of mice with CCR2-deficient monocytes ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$ ) and corresponding control littermate mice ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$ ) respectively, at day 1 (n=9 and n=13), 4 (n=9 and n=14), and 15 (n=9 and n=10) post-ischemia. A) Expression of individual genes after ischemia in mice of both genotypes. Values are expressed as fold versus the mean value (n=15) of non-ischemic cortex of control genotype. Two-way ANOVA by genotype and time followed by Sidak's multiple comparisons test. B, C) Given that we studied multiple genes (n=31) in the same samples, we carried out a global statistical analysis adjusting for multiple comparisons using the Holm-Sidak method. (B) Global heatmap of gene expression values in the control genotype ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$ ) showing changes induced by ischemia at different time points versus non-ischemic control. Symbols indicate adjusted p value. Values are expressed as Log2 of fold change versus control. (C) Global heatmap showing the differences between genotypes at each time point post-ischemia according to multiple t-test. Values are Log2 of fold change versus corresponding control genotype at each time point. The analysis identified the largest and more robust changes between CCR2-deficient mice and the corresponding controls. The observed differences between genotypes for the VEGF- and pericyte-related genes were not as strong as for pro-inflammatory and M2 genes since the statistical significance found in individual gene analysis was not sustained after adjusting for multiple comparisons, which was attributable to the comparatively smaller magnitude of the former changes. \*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\*p<0.01, \* p<0.05.

**Figure 5**

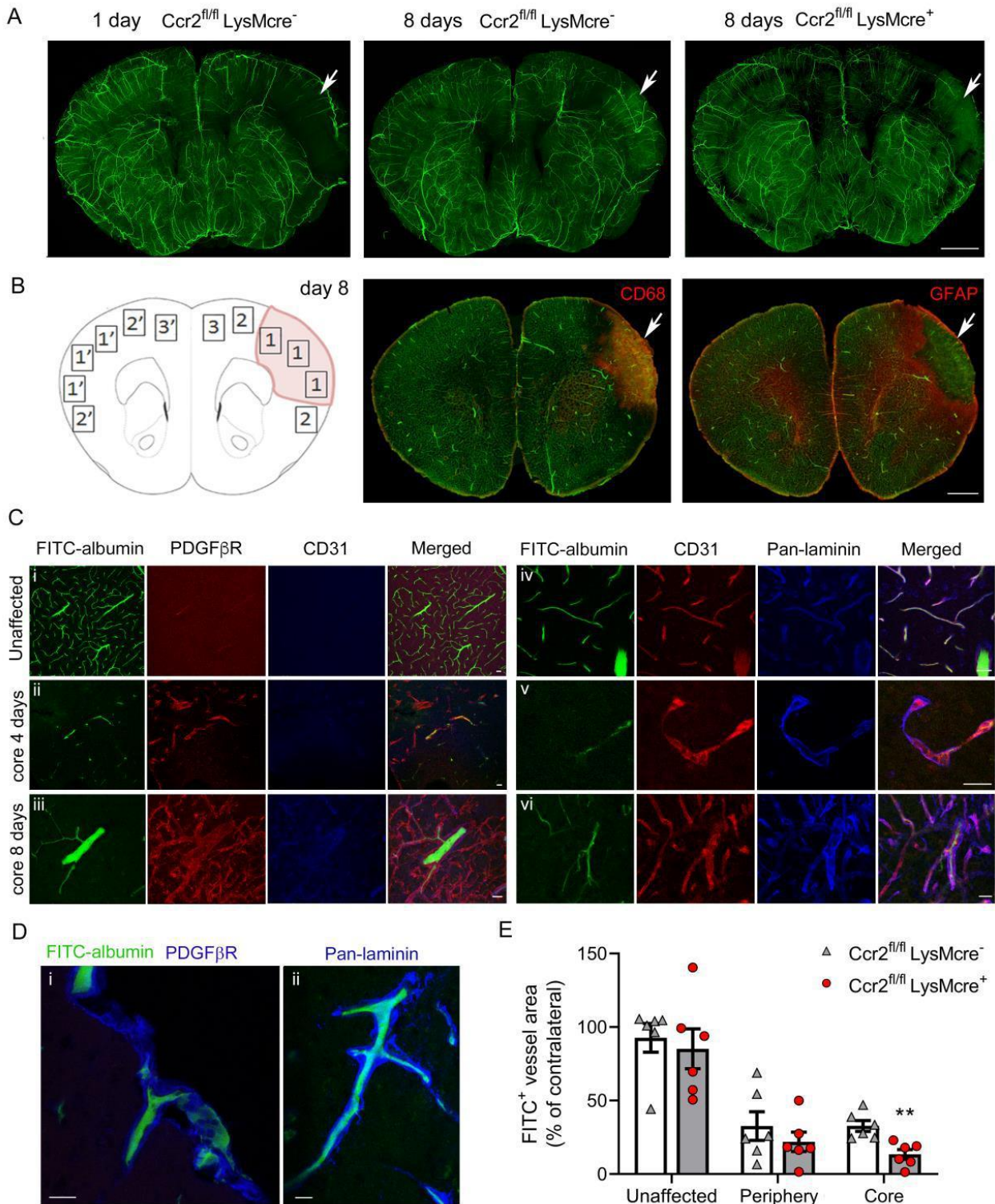


**Fig. 5. Brain infiltrating Ly6C<sup>hi</sup> monocytes express pro-inflammatory and pro-repair genes.**

We sorted Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and microglia ( $\mu$ G) from the cerebral cortex 1 day post-ischemia (n=3 mice), and control microglia from the cortex of control mice (n=3 mice). The study was performed in CX3CR1cre-Rosa26-tdT mice with a gating strategy shown in Supplementary Fig. S7. A) RNA was extracted from the sorted cells and gene expression was studied by qRT-PCR (n=3 samples per group). We checked the expression of *Ccr2* and *Tmem119* as markers of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and microglia, respectively. Expression of *Il1b* is higher in Ly6C<sup>hi</sup> monocytes compared to microglia in the ischemic brain. Ly6C<sup>hi</sup> monocytes express higher levels of genes involved in tissue repair, such as the markers of alternative macrophage polarization *Chi3* and *Arg1*, as well as pro-angiogenic *Vegfa* and to a lower extent its receptor *Flt1*. Values are expressed as fold versus control microglia. B) With intracellular flow cytometry we did not detect Arg-1<sup>+</sup> cells in blood Ly6C<sup>+</sup> monocytes, but we found Arg-1<sup>+</sup> cells within the Ly6C<sup>+</sup> monocytes in the ischemic brain tissue 24h post-ischemia (n=2 per group). Comparisons were carried out with *t*-test in all graphs, except for *Tnfa* mRNA analysed with Mann-Whitney test because data did not follow normality (Shapiro-Wilk test). &p=0.05; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

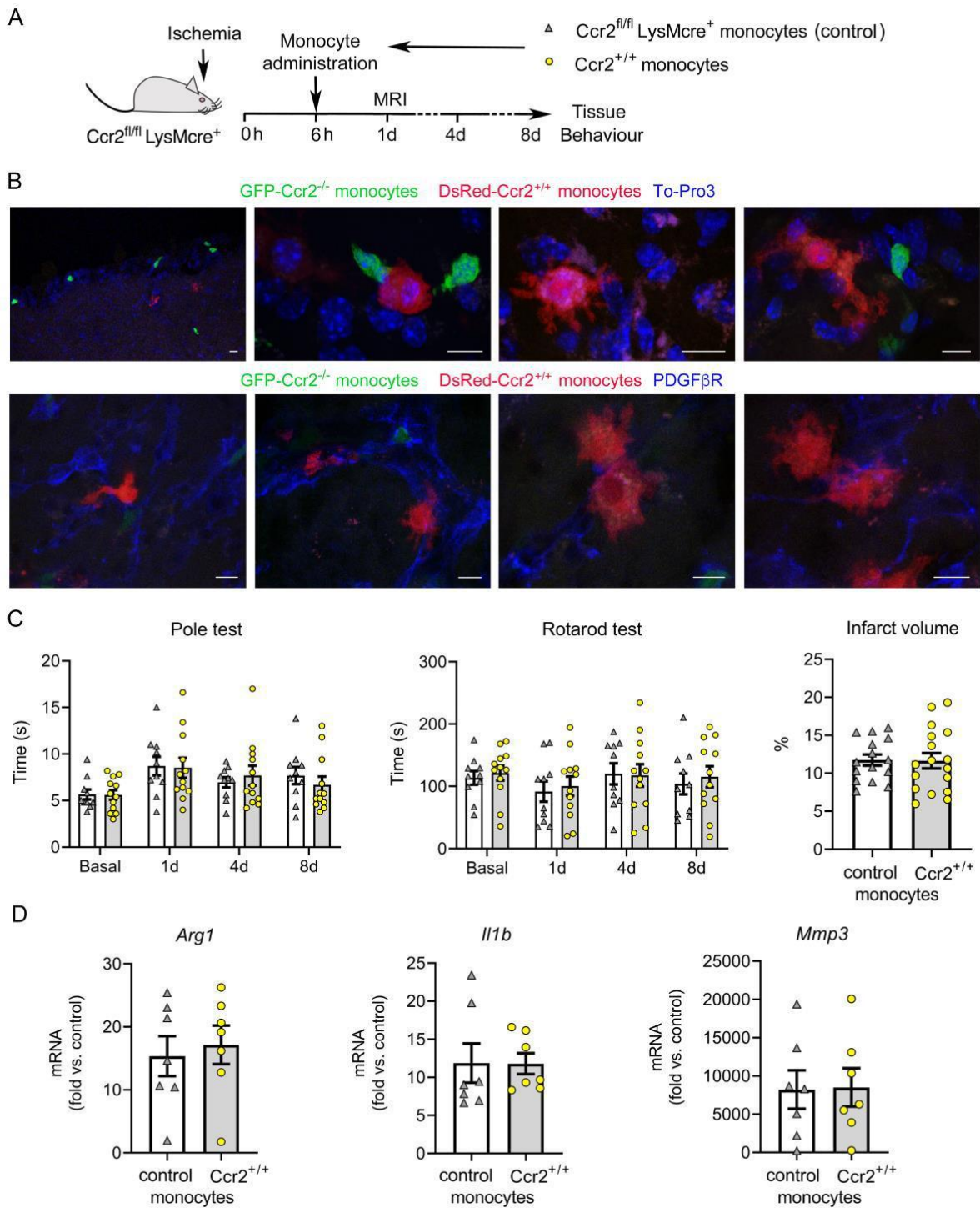


**Figure 6**



**Fig. 6. CCR2<sup>+</sup> monocytes promote angiogenesis.** Mice were perfused through the heart with FITC-albumin gel to visualize patent vessels (green) and the brain was studied by immunofluorescence. A) Z-projection of a 3D-image of clarified brains. The effect of ischemia is observed (arrow) in the ipsilateral hemisphere showing a cortical zone devoid of patent vessels at 24h. Patent vessels are seen in the core of the lesion (arrows) 8-days post-ischemia suggesting angiogenesis that is less apparent in *Ccr2<sup>fl/fl</sup> LysMcre<sup>+</sup>* mice than corresponding *Ccr2<sup>fl/fl</sup> LysMcre<sup>-</sup>* mice of the control genotype. B) Schematic drawing of the regions-of-interest (ROI) used for vessel quantification 8 days post-ischemia: 1: Core; 2: Periphery; 3: Unaffected cortex in the ipsilateral hemisphere. ROIs 1', 2' and 3' are mirror ROIs in the contralateral hemisphere. The core ROI was defined as the CD68<sup>+</sup> zone containing macrophages. The periphery was defined as the GFAP<sup>hi</sup> area of astroglyosis limiting the core of infarction. The unaffected ROI was outside the GFAP<sup>hi</sup> zone. C) Tissue sections were stained with PDGFβR (red), CD31 (blue) or pan-laminin (blue) to characterize the zone surrounding the vessels. i/ contralateral hemisphere; ii/ FITC<sup>+</sup> patent vessel in the infarcted core 4-days post-ischemia; iii/ thick patent vessel in the core 8-days post-ischemia; iv/ periphery region 8-days post-ischemia; v/ string vessel-like structure in the ischemic core 4-days post-ischemia; vi/ thick basal laminae and vessel walls with some patent vessels in the core 8-days post-ischemia. D) Details of FITC<sup>+</sup> patent vessels immunostained with PDGFβR or pan-laminin (blue) in the core region 8 days post-ischemia. i/ vessel penetrating the cortex from the brain surface; ii/ vessel in the cortex. E) We measured the density of fluorescent vessels in the different ROIs (% of FITC<sup>+</sup> area per ROI of 0.4 mm<sup>2</sup> obtained with the x20 objective) in brain sections of mice of the control genotype (*Ccr2<sup>fl/fl</sup> LysMcre<sup>-</sup>*) and mice with CCR2-deficient monocytes (*Ccr2<sup>fl/fl</sup> LysMcre<sup>+</sup>*) (n=6 mice per group) 8-days post-ischemia. The latter group showed a significant reduction in the density of patent vessels within the core of infarction (Two-way ANOVA with subject matching design followed by Sidak's multiple comparisons test, \*\*p=0.008). Values of each ROI are expressed as % of corresponding contralateral ROIs. Scale bar: A,B=1 mm; C,D=20 μm.

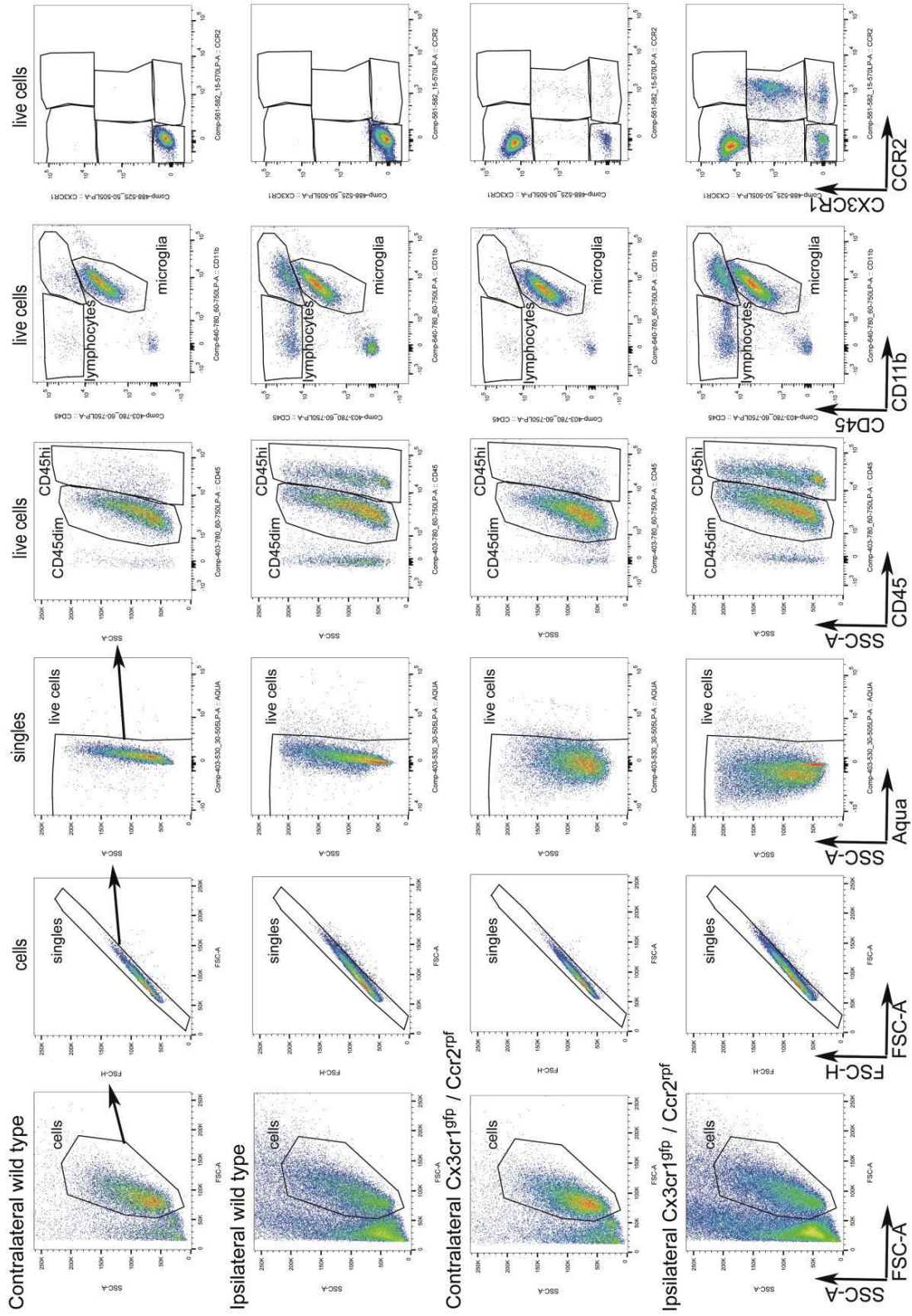
**Figure 7**



**Fig. 7. Administration of bone marrow monocytes is not protective.** A) Mice with CCR2-deficient monocytes ( $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$ ) received i.v administration of bone marrow monocytes through the tail vein 6h post-ischemia. CCR2<sup>+</sup> monocytes were obtained from reporter DsRed mice for microscopic visualization. B) DsRed monocytes (red) are seen in the core of the lesion 8 days post-ischemia (n=5). The images also show endogenous eGFP<sup>+</sup> monocytes ( $Ccr2^{gfp/gfp}$ ) (green) of the recipient  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice. Images in the first row are stained with To-Pro3 (blue) to illustrate the cell nuclei. Images in the second row are stained with PDGFβR (blue). DsRed monocytes interact with PDGFβR<sup>+</sup> cells, which form scaffold-like structures. C) Effect of CCR2<sup>+</sup> monocyte administration on stroke outcome in  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  recipient mice. For treatment controls, we administered monocytes obtained from donor mice of the same genotype as the recipient mice. The size of the lesion was evaluated by T2w MRI at 24h and behavioural tests were conducted at 1d, 4d and 8d post-ischemia. There were no differences in behavioural performance in the Pole test or the Rotarod test in  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice injected with either  $Ccr2^{+/+}$  (n=17) or  $Ccr2^{-/-}$  (n=15) monocytes, as analyzed with two-way ANOVA by treatment and time with a subject-matching design. Likewise, MRI infarct volume (%) 24h post-ischemia showed no differences between groups. D) Gene expression 8 days post-ischemia in the ipsilateral infarcted region of  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice that received administration of either  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  monocytes (n=7) (treatment control) or  $Ccr2^{+/+}$  monocytes (n=7) shows no differences between group (Mann-Whitney test). Scale bar: 10 μm.



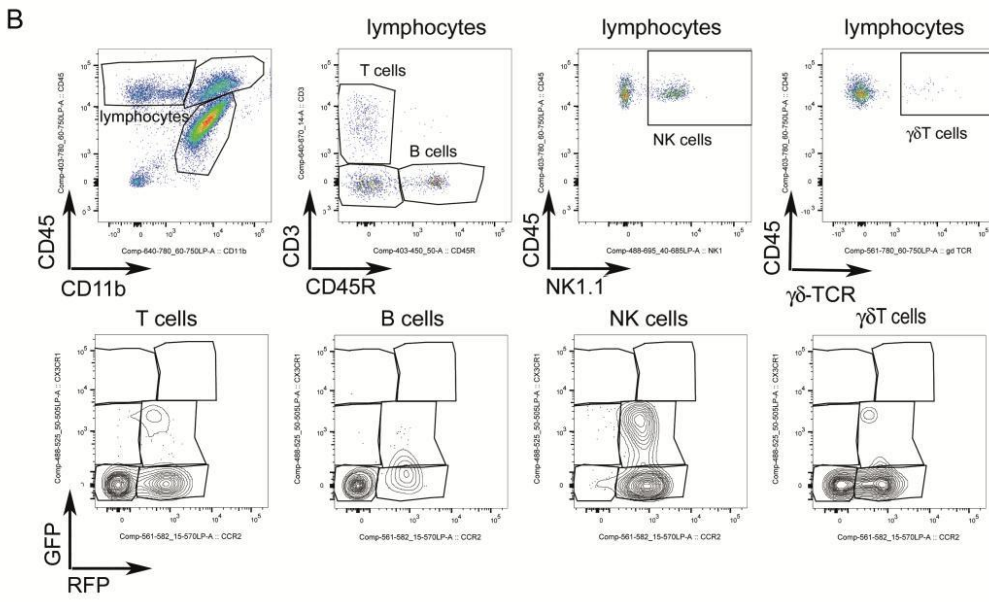
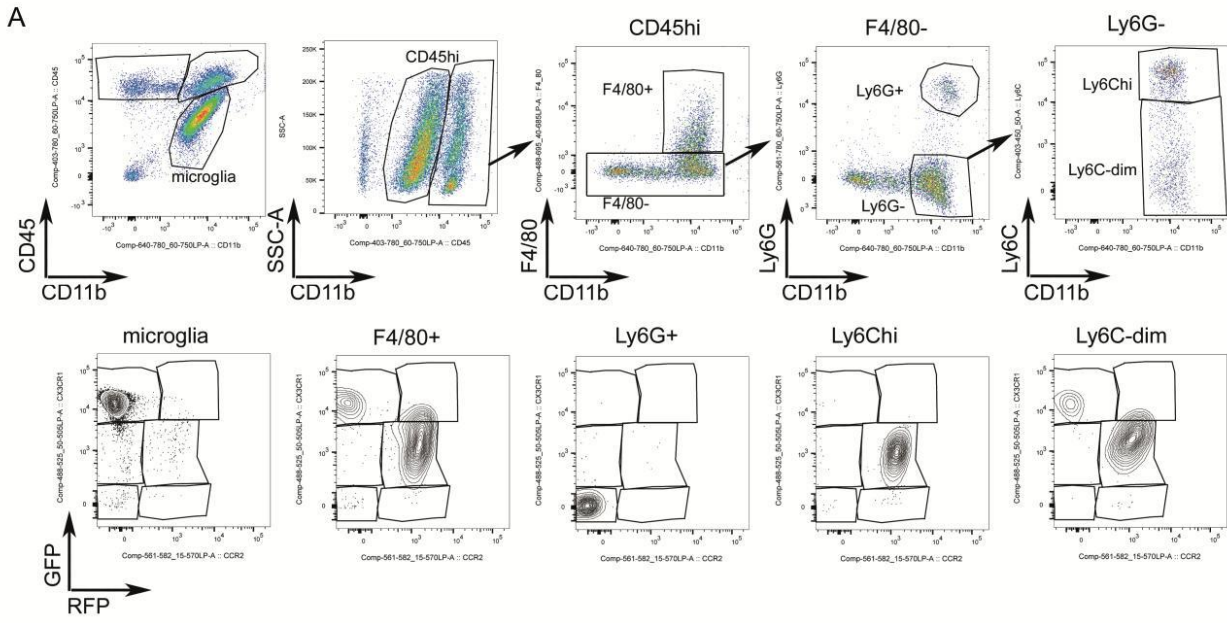
**Supplementary-S1**





**Supplementary Fig. S1 Gating strategy to identify the different cell populations expressing CCR2<sup>rfp</sup> and/or CX3CR1<sup>gfp</sup> in the ischemic brain tissue of Ccr2<sup>rfp/+</sup>Cx3cr1<sup>gfp/+</sup> transgenic mice.** We studied the contralateral and ipsilateral (ischemic) cerebral cortex of wild type mice and double-transgenic Cx3cr1<sup>gfp/+</sup>Ccr2<sup>rfp/+</sup> mice 4 days post-ischemia. CD45<sup>hi</sup> cells increase in tissue from the ipsilateral vs. the contralateral hemisphere. GFP<sup>+</sup> cells (CX3CR1) cells and RFP<sup>+</sup> (CCR2) cells are not seen in the wild type mice. Double-transgenic mice show CX3CR1-gfp<sup>hi</sup> microglia in the contralateral hemisphere. In addition to microglia, other CX3CR1-gfp<sup>+</sup> cells and CCR2-rfp<sup>+</sup> cells become apparent in the ipsilateral hemisphere.

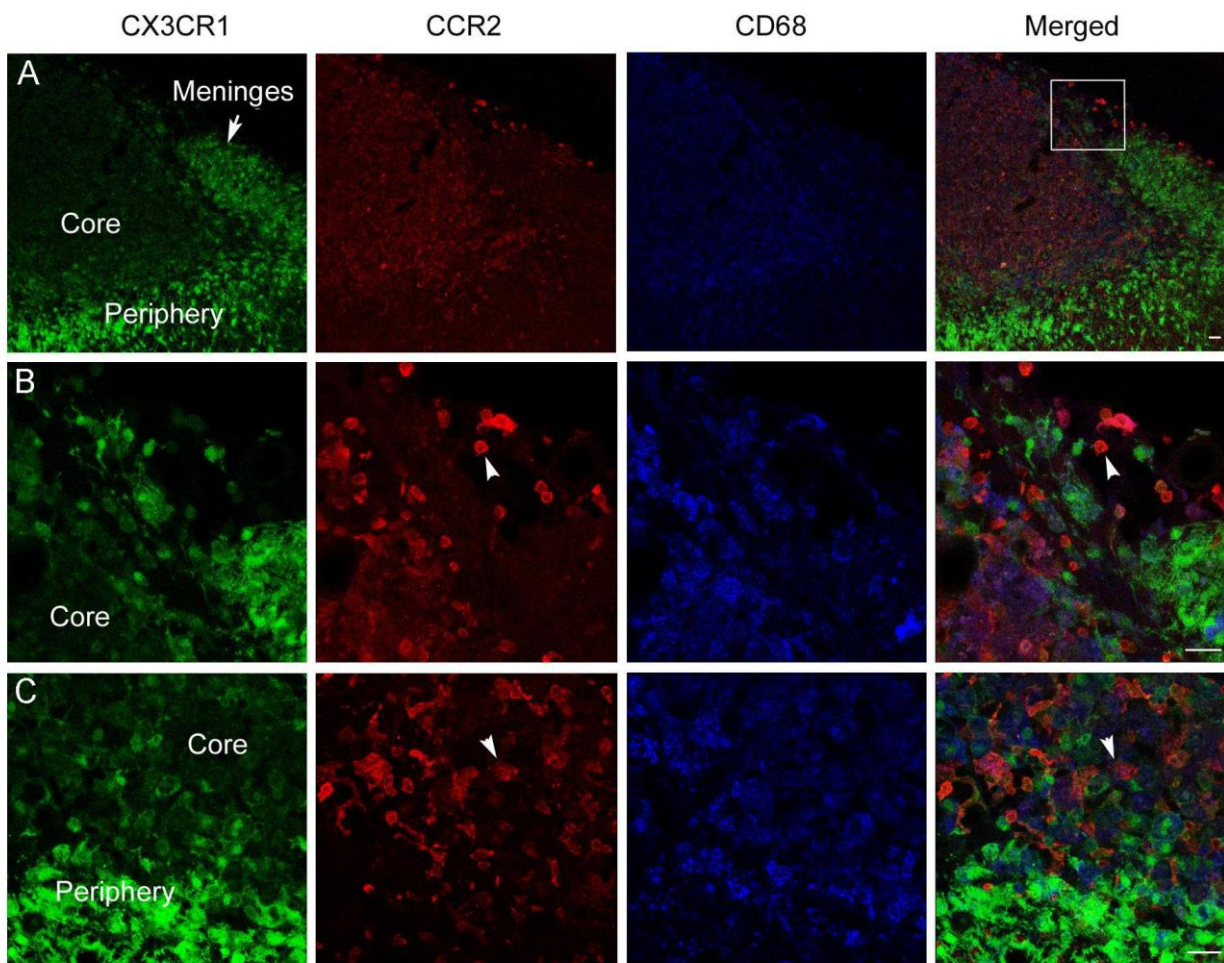
# Supplementary-S2



**Supplementary Fig. S2. CCR2 and CX3CR1 expression in different cells subsets as assessed with GFP and RFP fluorescence.** Following Supplementary Fig 1, GFP and RFP fluorescence in the ischemic brain tissue (4 days post-ischemia) is shown in the gates of: A) myeloid cells, including microglia, F4/80 macrophages, neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>), and monocytes (Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>+</sup>); B) lymphocytes, including B and T cells, NKs cells and  $\gamma\delta$ -TCR cells. Microglia are GFP<sup>hi</sup>; F4/80<sup>+</sup> macrophages are RFP<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>; Ly6G<sup>+</sup> neutrophils are RFP<sup>-</sup> GFP<sup>-</sup>; and Ly6C<sup>+</sup> monocytes show different degrees of RFP and GFP. Lymphocytes show major subsets of CCR2<sup>+</sup> cells and a few GFP<sup>+</sup> cells.

Supplementary-S3

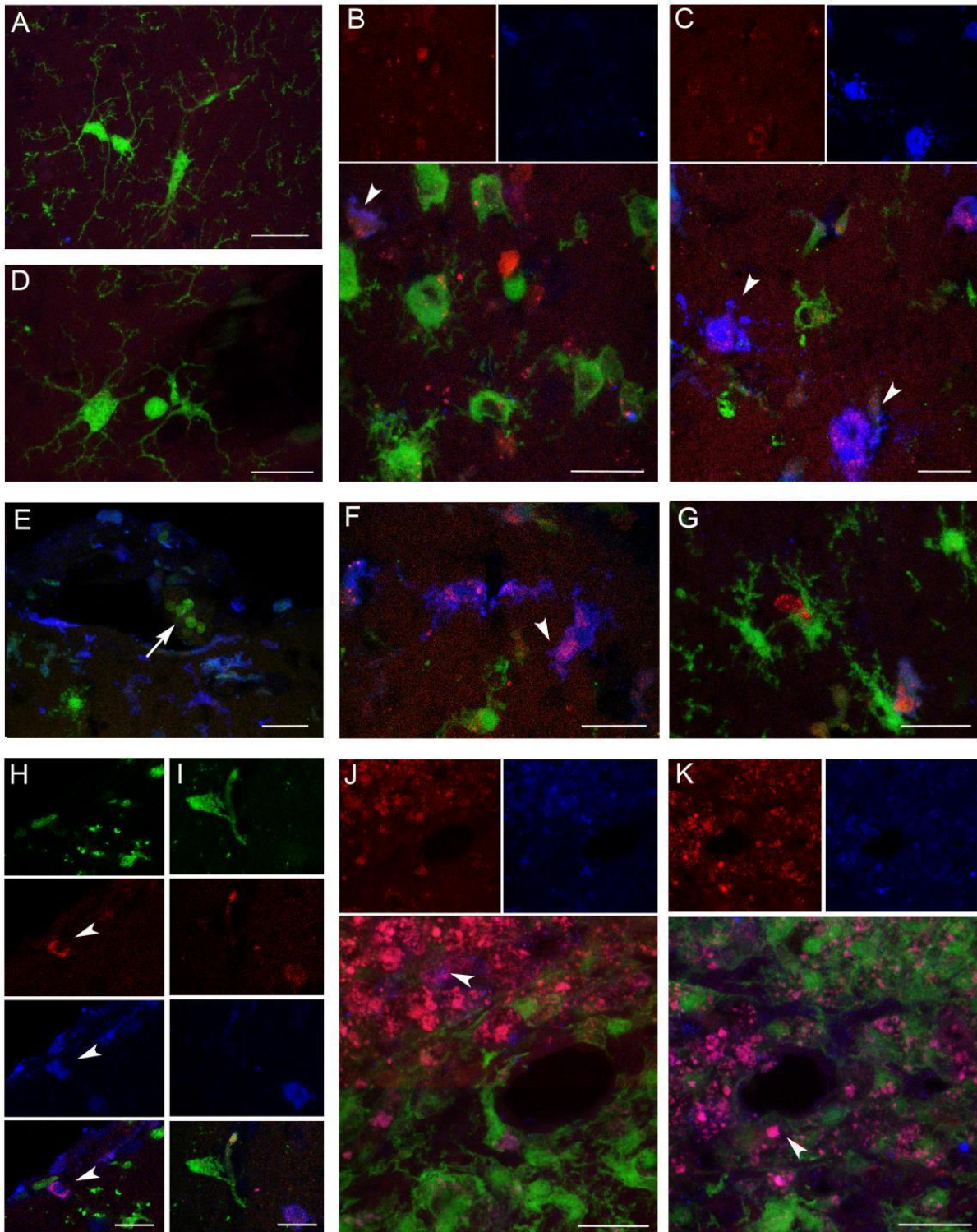
15 days post-ischemia



**Supplementary S3. Infiltrating leukocytes 15 days post-ischemia.** Subpopulations of leukocytes infiltrating the ischemic brain tissue at day 15 in *Ccr2<sup>rfp/+</sup>Cx3cr1<sup>gfp/+</sup>* mice (n=3). A dense layer of very bright *gfp*<sup>+</sup> microglia (green) surrounds and clearly delimitates the ischemic core, which is packed with high density of cells with *rfp* fluorescence (red), *gfp*<sup>low</sup>, and positive for CD68 (blue). Microglial cells are located at the border of the lesion. They show large cell bodies with short and thick ramifications. Infiltrating small, round, and very bright *rfp*<sup>+</sup> leukocytes are prominent within the core of the lesion, at the interface between the infarcted core and also within the peripheral microglial layer, and at the leptomeninges. Scale bar= 20  $\mu$ m.

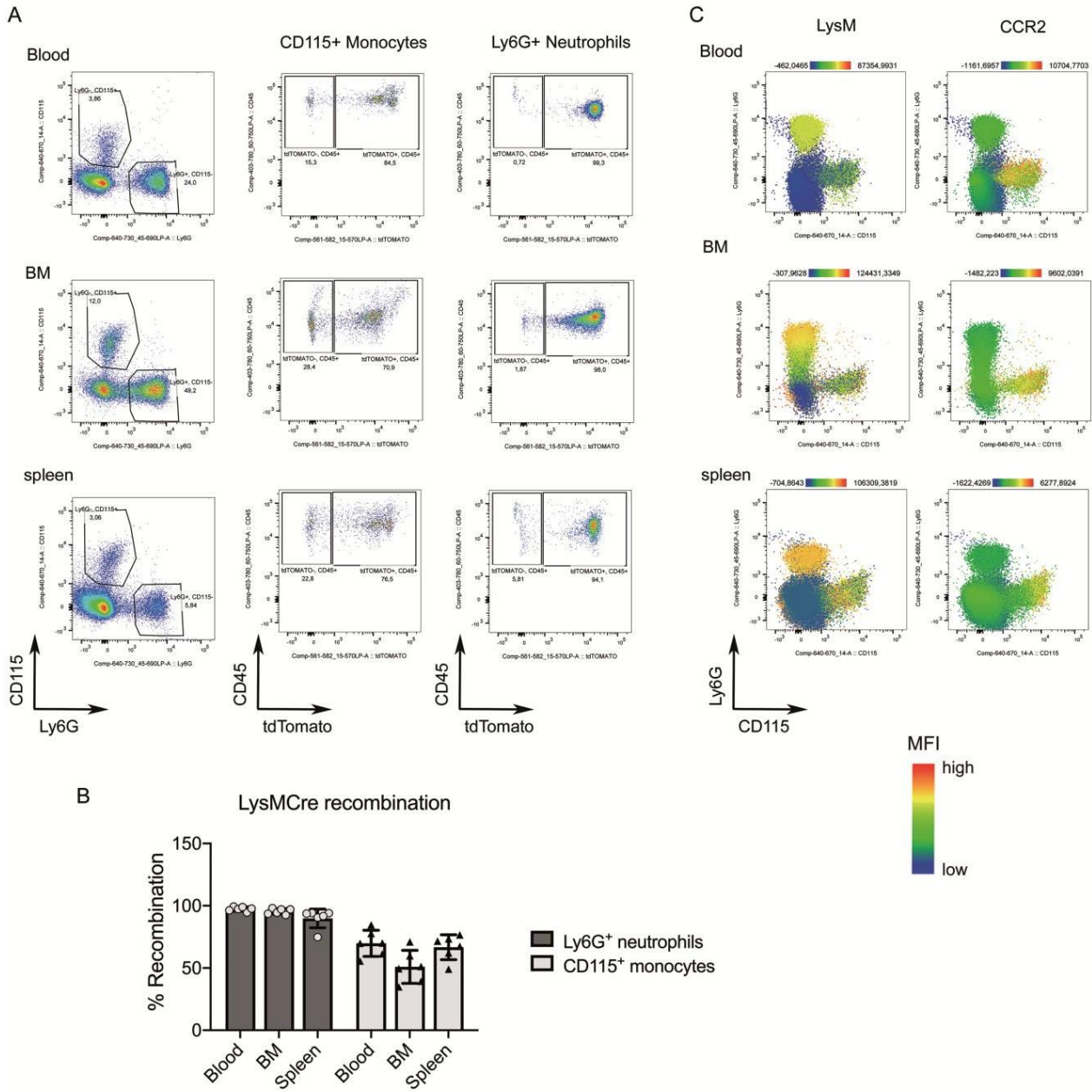


Supplementary-S4



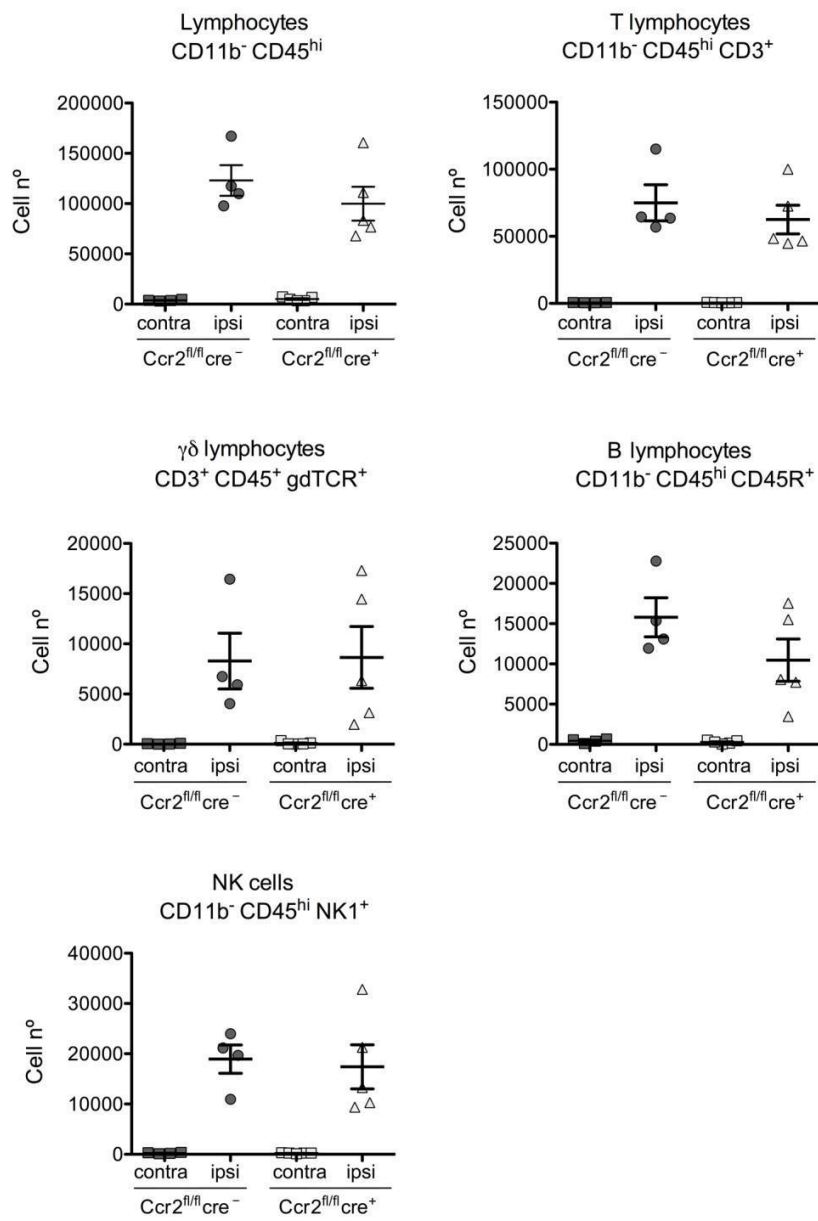
**Supplementary Fig. S4. Subsets of infiltrating monocytes, but not microglia, express Arginase-1.** Expression of Arg-1 in the  $Cx3cr1^{gfp/+}Ccr2^{rfp/+}$  transgenic mice 4 days (A-I) and 15 days (J-K) post-ischemia. Microglial ( $CX3CR1^{hi}$ , intense green fluorescence) cells do not express Arg-1 (blue), neither in the control tissue (A) nor at the periphery of the lesion (D). In the border (B) and core (C-I) of the lesion Arg-1<sup>+</sup> cells are detected in cells with rfp fluorescence (arrowheads) whereas most gfp<sup>+</sup> cells do not express Arg-1 (arrows). At 15 days Arg-1<sup>+</sup> cells are found in the core of the lesion in cells expressing rfp (red) (J-K). Scale bar: 20  $\mu$ m.

# Supplementary-S5



**Supplementary Fig. S5. Cre-recombination and CCR2 expression in different myeloid cells as assessed in LysMcre:Rosa26-tdT mice.** A) Gating strategy to assess the efficiency of LysMcre recombination in monocytes (CD115<sup>+</sup>) and neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>) of LysMcre:Rosa26-tdT mice in blood, bone marrow (MB) and spleen. B) Quantification of LysMcre recombination in monocytes and neutrophils in the above organs (n=5). C) In spite of very high LysMcre-recombination in Ly6G<sup>+</sup> neutrophils, the expression of CCR2 in these cells is very low. In contrast, CCR2 expression is high in monocytes. Colour code shows the value of MFI: mean fluorescence intensity.

## Supplementary-S6

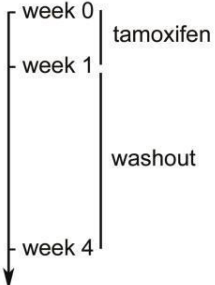




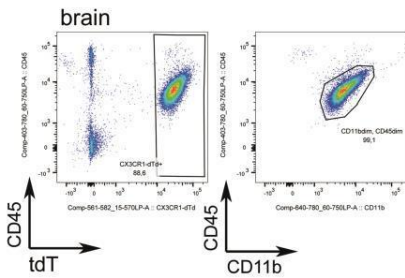
**Supplementary Fig. S6. Cell counts for infiltrating lymphoid cells in the brain tissue of mice with CCR2-deficient monocytes one-day post-ischemia.** Ischemia was induced in littermate  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^+$  mice (mice with CCR2-deficient monocytes, n=5) and  $Ccr2^{fl/fl}LysMcre^-$  mice (control genotype, n=4) and the contralateral (contra) and ipsilateral (ipsi, ischemic) cerebral cortex was studied 1 day later by flow cytometry. Graphs show absolute cell numbers for the different lymphoid cell populations. Lymphocytes infiltrate the ipsilateral brain hemisphere after ischemia but we found no statistically significant differences between genotypes (Two-way ANOVA by genotype and brain region).

# Supplementary-S7

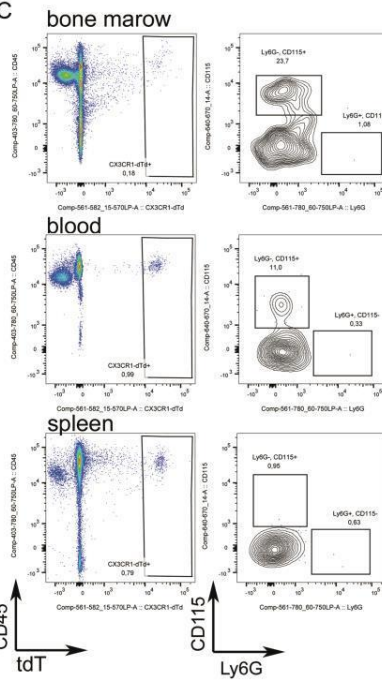
**A** Cx3cr1cre<sup>ERT2</sup>:Rosa26-tdT mice



**B**

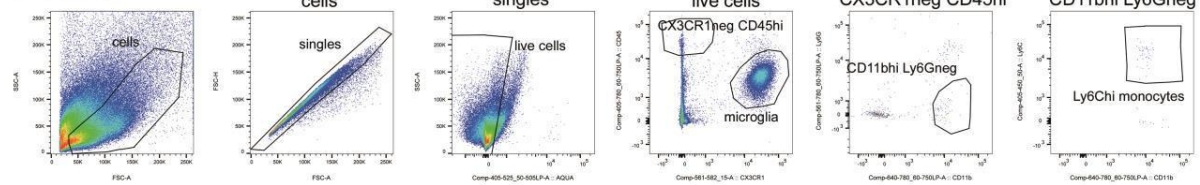


**C**

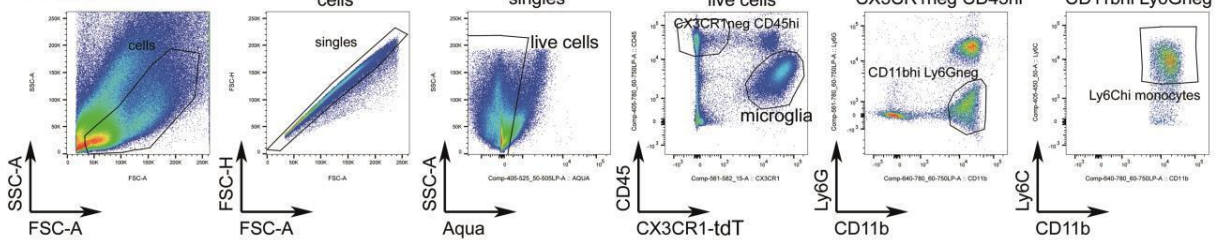


**D**

Control brain



Ischemic brain



microglia = CD45<sup>dim</sup> CX3CR1-tdT<sup>+</sup>

Ly6C<sup>hi</sup> monocytes = CX3CR1-tdT<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup>

**Supplementary Fig. S7 Strategy for FACS cell sorting microglia and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes.** A) We used Cx3cr1cre<sup>ERT2</sup>:Rosa26-tdT mice that received tamoxifen during one week, followed by 3 weeks of washout prior to FACS cell sorting. B) Flow cytometry plots showing that all red fluorescent (tdT) cells of the ischemic brain are CD11b<sup>dim</sup>CD45<sup>dim</sup> microglial cells (99.1%). C) Very few tdT<sup>+</sup> cells (<1%) are detected in the bone marrow, blood and spleen, and the gates for monocytes (CD115<sup>+</sup>) and neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>) show absence of tdT<sup>+</sup> cells. D) Sorting strategy from the ischemic and control brain tissue for microglia (CD45<sup>dim</sup> Cx3cr1-tdT<sup>+</sup> cells), and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (CX3CR1-tdT<sup>negative</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11b<sup>hi</sup> Ly6G<sup>negative</sup> Ly6C<sup>hi</sup>).

## REFERENCES

- Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kılıç K, Can A, Di Polo A, Dalkara T. Capillary pericytes express  $\alpha$ -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife*. 2018;7. pii: e34861
- Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(3):330-8. doi: 10.1038/jcbfm.2012.185.
- Bakos E, Thaiss CA, Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, Kaushansky N, Ben-Nun A, Becker-Herman S, Shachar I. CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2017;198:4659-4671.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16:585-601
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7:452-464.
- Brühl H, Cihak J, Schneider MA, Plachý J, Rupp T, Wenzel I, Shakarami M, Milz S, Ellwart JW, Stangassinger M, Schlöndorff D, Mack M. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. *J Immunol*. 2004;172:890-898.
- Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-35. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040.
- Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res*. 2001;902(2):171-7.
- Chu HX, Broughton BR, Ah Kim H, Lee S, Drummond GR, Sobey CG. Evidence that Ly6Chi monocytes are protective in acute ischemic stroke by promoting M2 macrophage polarization. *Stroke* 2015; 46:1929–1937.
- Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczkowska E, Wong CH, Petri B, Ransohoff RM, Charo IF, Jenne CN, Kubes P. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*. 2015;212:447-456.
- Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, Roy S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol*. 2015;185:2596-606.
- De La Fuente AG, Lange S, Silva ME, Gonzalez GA, Tempfer H, van Wijngaarden P, Zhao C, Di Canio L, Trost A, Bieler L, Zaubmair P, Rotheneichner P, O'Sullivan A, Couillard-Despres S, Errea O, Mäe MA, Andrae J, He L, Keller A, Bätiz LF, Betsholtz C, Aigner L, Franklin RJM, Rivera FJ. Pericytes Stimulate Oligodendrocyte Progenitor Cell Differentiation during CNS Remyelination. *Cell Rep*. 2017;20(8):1755-1764. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.007.

de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C, Durduran T, Chamorro Á, Planas AM. Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke*. 2014;45(5):1453-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.004111.

Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke* 2007;38:1345–1353.

Drake C, Boutin H, Jones MS, Denes A, McColl BW, Selvarajah JR, Hulme S, Georgiou RF, Hinz R, Gerhard A, Vail A, Prenant C, Julyan P, Maroy R, Brown G, Smigova A, Herholz K, Kassiou M, Crossman D, Francis S, Proctor SD, Russell JC, Hopkins SJ, Tyrrell PJ, Rothwell NJ, Allan SM. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1113-22.

Duan L, Zhang XD, Miao WY, Sun YJ, Xiong G, Wu Q, Li G, Yang P, Yu H, Li H, Wang Y, Zhang M, Hu LY, Tong X, Zhou WH, Yu X. PDGFR $\beta$  Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2. *Neuron*. 2018;100:183-200.e8.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6:265sr6.

Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama WM, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 2014;40:91-104.

Fang W, Zhai X, Han D, Xiong X, Wang T, Zeng X, He S, Liu R, Miyata M, Xu B, Zhao H. CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice. *Theranostics*. 2018;8(13):3530-3543. doi: 10.7150/thno.24475.

Garcia-Bonilla L, Brea D, Benakis C, Lane D, Murphy M, Moore J, Racchumi G, Jiang X, Iadecola C, Anrather J. Endogenous protection from ischemic brain injury by preconditioned monocytes. *J Neurosci*. 2018;38(30):6722-6736.

Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*. 2009;40(5):1849-57. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534503.

Gliem M, Mausberg AK, Lee JI, Simiantonakis I, van Rooijen N, Hartung HP, Jander S. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol*. 2012;71:743-752.

Georgakis MK, Gill D, Rannikmae K, Traylor M, Anderson CD, Lee JM, Kamatani Y, Hopewell JC, Worrall BB, Bernhagen J, Sudlow CL, Malik R, Dichgans M. Genetically Determined Levels of



Circulating Cytokines and Risk of Stroke: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1. *Circulation*. 2019;139(2):256-268.

Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2004 Feb;35(2):566-71.

Geusens P, Emans PJ, de Jong JJ, van den Bergh J. NSAIDs and fracture healing. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25:524-31.

Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, Brendecke SM, Kierdorf K, Staszewski O, Datta M, Luedde T, Heikenwalder M, Jung S, Prinz M. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci*. 2013;16:1618-26. doi: 10.1038/nn.3531.

Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol*. 1997;74(1-2):35-44.

Howe CL, LaFrance-Corey RG, Goddery EN, Johnson RK, Mirchia K. Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):238.

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808

Kara EE, McKenzie DR, Bastow CR, Gregor CE, Fenix KA, Ogunniyi AD, Paton JC, Mack M, Pombal DR, Seillet C, Dubois B, Liston A, MacDonald KP, Belz GT, Smyth MJ, Hill GR, Comerford I, McColl SR. CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells. *Nat Commun*. 2015;6:8644.

Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*. 2016;529:307-15

Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*. 2002 Jul 4;3:7.

Lugo-Hernandez E, Squire A, Hagemann N, Brenzel A, Sardari M, Schlechter J, Sanchez-Mendoza EH, Gunzer M, Faissner A, Hermann DM. 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(10):3355-3367. doi: 10.1177/0271678X17698970.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229:176-185.

Minutti CM, Modak RV, Macdonald F, Li F, Smyth DJ, Dorward DA, Blair N, Husovsky C, Muir A, Giampazolias E, Dobie R, Maizels RM, Kendall TJ, Griggs DW, Kopf M, Henderson NC, Zaiss DM. A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. *Immunity*. 2019;50:645-654.e6.

Miró-Mur F, Pérez-de-Puig I, Ferrer-Ferrer M, Urrea X, Justicia C, Chamorro A, Planas AM. Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain Behav Immun*. 2016;53:18-33.

Nakamura K, Shichita T. Cellular and molecular mechanisms of sterile inflammation in ischaemic stroke. *J Biochem*. 2019 Jun 1;165(6):459-464. doi: 10.1093/jb/mvz017.

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037-47.

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013;155:1596-1609.

Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urrea X, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol*. 2015;129:239-57.

Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol*. 1990 van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*. 2007; 170:818–829.

Ruth JH, Rottman JB, Katschke KJ Jr, Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Pope RM, Koch AE. Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2750-60.

Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou C-L, et al. (2010) Selective Chemokine Receptor Usage by Central Nervous System Myeloid Cells in CCR2-Red Fluorescent Protein Knock-In Mice. *PLoS ONE* 5:e13693.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001;97(3):785-91.

Schilling M, Strecker JK, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2009;161:806-12.

Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2:1097-105.

Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990;144(8):3034-8.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643.

Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, López-Bravo M, Joven J, Ardavín C, Rodríguez-Fernández JL, Sánchez-Torres C, Mellado M, Corbí AL. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol.* 2014;192(8):3858-67.

Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem.* 1989;37:315-21.

Smyth LCD, Rustenhoven J, Scotter EL, Schweder P, Faull RLM, Park TIH, Dragunow M. Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *J Chem Neuroanat.* 2018;92:48-60.

Steinman J, Koletar MM, Stefanovic B, Sled JG. 3D morphological analysis of the mouse cerebral vasculature: Comparison of in vivo and ex vivo methods. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186676. doi: 10.1371/journal.pone.0186676.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20:2768-78.

Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1306-16.

van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol.* 2007; 170:818–829.

Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:593-617. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034356.

Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, Memanishvili T, Monni E, Tatarishvili J, Miskinyte G, Ge R, Ahlenius H, Lindvall O, Schwartz M, Kokaia Z. Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J Neurosci.* 2016;36(15):4182-95

Weiss JM, Downie SA, Lyman WD, Berman JW. Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. *J Immunol.* 1998;161(12):6896-903.

Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, Simonavicius N, Schneider C, Lang M, Stürzl M, Croner RS, Konrad A, Manz MG, Moch H, Aguzzi A, van Loo G, Pasparakis M, Prinz

M, Borsig L, Heikenwalder M. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell*. 2012;22:91-105.

Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, Brachvogel B, Hammerschmidt M, Nagy A, Ferrara N, Pasparakis M, Eming SA. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012;120(3):613-25. doi: 10.1182/blood-2012-01-403386.

Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44:450-462

Xiong H, Carter RA, Leiner IM, Tang YW, Chen L, Kreiswirth BN, Pamer EG. Distinct Contributions of Neutrophils and CCR2+ Monocytes to Pulmonary Clearance of Different *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Infect Immun*. 2015;83:3418-27.

Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:1213-24.

Yang J, Wang M, Zhu F, Sun J, Xu H, Chong Lee Shin OL, Zhao Z, Pei G, Zhu H, Cao C, He X, Huang Y, Ma Z, Liu L, Wang L, Ning Y, Liu W, Xu G, Wang X, Zeng R, Yao Y. Putative endothelial progenitor cells do not promote vascular repair but attenuate pericyte-myofibroblast transition in UUO-induced renal fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):104.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.

Zhou W, Liesz A, Bauer H, Sommer C, Lahrmann B, Valous N, Grabe N, Veltkamp R. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. *Brain Pathol*. 2013;23(1):34-44.





## **DISCUSSIÓ**



### Discussió del primer article:

Els neutròfils formen part del sistema immunitari innat i participen ràpidament en la defensa no específica davant la presència de patògens invasors. Després d'una infecció, les cèl·lules danyades alliberen senyals que promouen l'atracció de les cèl·lules del sistema immunitari cap al focus de la lesió i es desencadena una resposta inflamatòria mitjançada per cèl·lules i factors solubles per tal de controlar aquesta situació. Els neutròfils participen directament en l'alliberació d'enzims proteolítics, en la producció de ROS i en l'activació del sistema del complement per combatre la infecció així com també en l'atracció d'altres cèl·lules del sistema immunitari que desencadenaran una resposta de defensa específica (Kolaczowska and Kubes, 2013). Tot i que els neutròfils es consideren beneficiosos davant d'una situació d'infecció, una activació inadequada pot provocar un dany tissular secundari no desitjat (Nathan, 2006).

Durant molts anys el SNC dels mamífers s'havia considerat immunoprivilegiat degut a l'absència de vasos limfàtics cerebrals i per la presència de la BHE. En condicions fisiològiques la BHE limita l'accés dels leucòcits al parènquima cerebral. No obstant això, diferents experiments han fet canviar aquest punt de vista i han revelat la presència de vasos limfàtics en la duramàter i que existeix una interacció activa entre el sistema nerviós i el sistema immunològic (Kamel and Iadecola, 2012; Louveau *et al.*, 2015; Ahn *et al.*, 2019). Aquest fet es s'ha demostrat després d'estudiar el SNC en condicions patològiques, com per exemple en malalties autoimmunes on s'observa que els leucòcits es poden adherir a les vècules post-capil·lars activades i infiltrar cap al parènquima cerebral a través de la BHE (Engelhardt and Ransohoff, 2005).

A diferència de les malalties autoimmunes, en la isquèmia cerebral, la interrupció del flux sanguini impedeix que els leucòcits assoleixin el territori isquèmic a través de la circulació, exceptuant el cas en que existeixi una circulació colateral o que es produeixi la reperfusió del vas taponat.

En el present treball s'ha observat que després de després de l'oclusió permanent de l'artèria cerebral mitja en ratolins es produeix un increment en el nombre de neutròfils en el territori isquèmic però no en la regió contra lateral, en concordança amb estudis previs (Garcia *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 2014). A més a més, el nostre estudi demostra que quan el flux sanguini cerebral no es restableix els neutròfils extravasen a nivell de leptomeninges, a partir d'on envaeixen els espais de Virchow-Robin dels vasos corticals. A través d'aquesta via els neutròfils poden arribar fins al territori isquèmic.

La meningitis bacteriana provoca una infiltració massiva de neutròfils en les leptomeninges. També, en condicions de vasculitis cerebral els neutròfils acaben infiltrant al parènquima cerebral després d'haver-se acumulat en els espais perivasculars (Malipiero *et al.*, 2007). Les cèl·lules afectades per la isquèmia cerebral alliberen senyals de perill i quimiocines atractants de leucòcits (Moskowitz, Lo and Iadecola, 2010; Chamorro *et al.*, 2012). És probable que els mecanismes que controlen l'extravasació i migració dels neutròfils cap als espais de Virchow-Robin en la isquèmia cerebral siguin similars als que succeeixen en la meningitis bacteriana però de magnitud inferior donat que la isquèmia provoca una inflamació en condicions estèrils.

## DISCUSSIÓ

En condicions fisiològiques i gràcies a l'activitat pulsàtil de les artèries (Hawkes *et al.*, 2014) es produeix el drenatge del líquid intersticial a través dels espais perivasculars de les arterioles corticals cap a les leptomeninges i finalment cap a fora del cervell (Cserr, Harling-Berg and Knopf, 1992; Carare *et al.*, 2008). Després d'un ictus, el drenatge del líquid intersticial i la capacitat pulsàtil de les artèries es veuen compromesos (Arbel-Ornath *et al.*, 2013). Aquest fet suggereix que durant la isquèmia cerebral es produeix l'acumulació en els espais perivasculars de senyals capaços d'atreure neutròfils.

Quan la isquèmia afecta l'escorça cerebral i l'estriat, s'ha observat que els neutròfils s'acumulen en els espais perivasculars dels vasos corticals de la regió isquèmica però ho fan en menor grau en els espais perivasculars dels vasos de les regions subcorticals no afectades. A l'escorça cerebral les arterioles formen una xarxa d'anastomosis vascular complexa que determina la circulació colateral, que en canvi no s'observa a l'estriat. A més a més, l'anatomia vascular dels vasos de l'estriat varia respecte a la dels vasos corticals (Pollock *et al.*, 1997). Aquests fets condicionen el procés de drenatge del líquid intersticial i també podrien afectar la migració dels neutròfils durant l'oclusió arterial.

En un estudi previ en un model d'isquèmia cerebral amb reperfusió es va observar que a mesura que transcorria el temps després de la isquèmia cerebral es produïa l'acumulació de neutròfils en els espais perivasculars (Enzmann *et al.*, 2013). En aquest estudi, però, els neutròfils quedaven confinats a l'espai perivascular, entre la làmina basal del parènquima cerebral i la làmina basal vascular, i no infiltraven al parènquima cerebral (Enzmann *et al.*, 2013). D'acord amb aquests resultats en isquèmia/reperfusió, en la isquèmia permanent en el present treball també hem observat infiltrats de neutròfils a nivell de les leptomeninges i en els espais de Virchow-Robin dels vasos perforants. En canvi, a diferència dels resultats de Enzmann *et al.*, 2013, el present treball ha identificat neutròfils extravasats en parènquima del teixit cortical isquèmic. Aquests resultats van en la mateixa direcció que els descrits en un model d'isquèmia cerebral permanent en rata (Chu *et al.*, 2014). Podem suggerir, per tant, que en funció de la durada de l'episodi isquèmic, els neutròfils poden extravasarse cap al parènquima cerebral. Tot i que no es coneix la via precisa d'arribada de neutròfils als espais de les leptomeninges, hi ha bàsicament dues possibilitats. La primera és que extravasïn a nivell dels vasos de les leptomeninges. La segona possibilitat seria que els neutròfils migressin a través de les connexions descrites recentment que comuniquen el moll de l'os del crani amb les leptomeninges (Herisson *et al.*, 2018). Des de les leptomeninges, els neutròfils poden viatjar pels espais perivasculars atrets per quimiocines on participarien en la destrucció de la lamina basal per accedir al parènquima cerebral (Otxoa-de-Amezaga, Gallizioli, *et al.*, 2019).

Respecte a la capacitat d'infiltrar al parènquima cerebral, en el present treball s'ha suggerit que els neutròfils poden activar-se en els espais perivasculars on resten atrapats i poden accedir al parènquima cerebral isquèmic després d'haver danyat les barreres parenquimals tant a nivell de superfície pial, com de les lamines basals dels vasos sanguinis un cop iniciat el procés de degranulació i/o formació de NETs. Encara que els mecanismes que desencadenen el procés de NETosi no són del tot coneguts, els factors com la hipòxia, producció de ROS i presència de citocines podrien estar-hi implicats (Fuchs, Brill and Wagner, 2012).

També hem observat una major infiltració de neutròfils en el model d'oclusió distal de l'ACM en comparació amb el model d'oclusió proximal de l'ACM. Tot i que aquesta observació podria suggerir que la cirurgia per si podria estar implicada en l'atracció de neutròfils, en els animals operats sense l'oclusió de l'artèria (*sham*) no s'ha observat aquesta infiltració. Aquests resultats mostren que és la isquèmia cerebral qui promou el reclutament de neutròfils.

Les diferències en els models d'isquèmia poden ajudar a explicar també les diferències pel que fa a la infiltració de neutròfils en els diferents models. Per una banda en l'oclusió proximal de l'ACM provoca una afectació de tot el territori de l'ACM a diferència del model d'oclusió distal on només una regió de l'ACM i les seves col·laterals estan obstruïdes. Per tant, en el model d'oclusió distal hi continua havent una proporció de vasos colaterals que poden subministrar neutròfils a la xarxa d'artèries pials properes a l'infart cortical. Una altra diferència important entre aquests models experimentals és la pressió intracerebral que es pot desenvolupar després de la isquèmia degut a l'edema. En el model d'oclusió distal de l'ACM s'ha realitzat una craniotomia parcial que pot ajudar a disminuir la pressió intracoronar a diferència del model d'oclusió proximal de l'ACM. L'augment en de la pressió intracoronar degut a l'edema i a l'absència de la craniotomia pensem que podrien estar impeding el tràfic de neutròfils en el teixit isquèmic cortical del model d'oclusió proximal.

Finalment, hem identificat cèl·lules polimorfonuclears amb marcadors específics de neutròfils (p.e. MPO i elastasa) en teixit post mortem de pacients d'ictus isquèmic. Els neutròfils es troben a les meninges proximals al nucli isquèmic, així com també en els espais perivasculars i ocasionalment extravasats en el parènquima cerebral afectat. Limitacions d'aquest estudi inclouen que el nombre de pacients estudiat és petit, que hi ha heterogeneïtat pel que fa a les regions cerebrals afectades en els diferents pacients, així com la falta d'informació de la perfusió cerebral en el moment de la mort. No obstant això, els resultats obtinguts en l'ictus en humans són importants perquè donen validesa als resultats obtinguts en els models experimentals.

### Discussió del segon article:

Els macròfags associats a les interfícies del cervell (*Border-associated macrophages*, BAMs) són una població de macròfags residents que difereixen de la micròglia i dels perícits. Es localitzen a les leptomeninges, espais de Virchow-Robin i espais perivasculars dels vasos cerebrals però no es troben en el parènquima cerebral (Guillemin and Brew, 2004). Degut a la seva localització, aquestes cèl·lules podrien jugar un paper de comunicació entre el parènquima cerebral i el sistema immunitari (Lassmann *et al.*, 1993; Holder *et al.*, 2014). No obstant això, les funcions exactes d'aquestes cèl·lules encara es desconeixen sobre tot en condicions patològiques.

En el present treball s'ha posat de manifest la participació dels BAMs en l'increment de la permeabilitat vascular, el reclutament de granulòcits i la seva contribució en la disfunció neurològica en la fase aguda de l'ictus isquèmic. A més a més, s'ha verificat que els BAMs CD163<sup>+</sup> provinents del cervell de rata presenten uns trets fenotípics similars als BAMs de ratolí (Korin *et al.*, 2017; Mrdjen *et al.*, 2018; Van Hove *et al.*, 2019). L'expressió de la majoria dels gens que caracteritzen fenotípicament aquestes cèl·lules no varia significativament 16 hores post-isquèmia, a excepció de l'augment de Cd38 i Cd44. Tot i que un treball precedent



## DISCUSSION

considerava que l'expressió de CD44 era un marcador de cèl·lules infiltrants en el cervell (Korin *et al.*, 2017), en el present treball s'ha detectat que els BAMs CD163<sup>+</sup> obtinguts del cervell de les rates control expressen Cd44, tal i com s'ha descrit en els BAMs del cervell de ratolins control (Mrdjen *et al.*, 2018). L'augment de l'expressió de Cd44 que observem en els BAMs després de la isquèmia, també s'havia observat en els BAMs de ratolins sotmesos a un model d'encefalomielitis autoimmune (Mrdjen *et al.*, 2018). A més, hem detectat que els macròfags CD163<sup>+</sup> de rata expressen Siglec1 (CD169) i uns nivells baixos d'Aif1 (Iba-1), en comparació amb les cèl·lules microglials que no expressen Siglec1 i que en canvi expressen nivells més elevats d'Aif1.

Els senyals de perill alliberats per les cèl·lules que moren per necrosi en la isquèmia cerebral provoquen l'activació de la micròglia (Iadecola and Anrather, 2011). A diferència de la micròglia, la resposta concreta dels BAMs en aquesta situació patològica no està ben caracteritzada. En el present treball s'ha observat que els BAMs responen a les condicions d'isquèmia promovent canvis en el perfil d'expressió gènica que permeten la seva adaptació a les condicions d'hipòxia i adquireixen noves funcions cel·lulars implicades amb la interacció amb els components de la matriu extracel·lular i els vasos, promovent respostes inflamàtores i promovent la quimiotaxi de neutròfils. La ubicació anatòmica d'aquestes cèl·lules els confereix la capacitat de participar en la xarxa de comunicació entre l'entorn cerebral i la vasculatura. Tal i com s'ha descrit en el primer treball presentat en la present tesis i més recentment en el nostre grup (Otxoa-de-Amezaga, Gallizioli, *et al.*, 2019), la isquèmia cerebral induïx l'extravasació de neutròfils des dels vasos de les leptomeninges i aquests s'acumulen en els espais perivasculars de la regió cerebral afectada. El present treball mostra que els macròfags CD163<sup>+</sup> atreuen els granulòcits cap a les leptomeninges i als espais perivasculars en resposta a la isquèmia cerebral. Aquests resultats estan en consonància amb un estudi que demostra que la depleció de macròfags perivasculars redueix la infiltració de neutròfils cerebrals en un model d'encefalitis promoguda per una infecció viral (Steel *et al.*, 2010). A més, també està descrit que els macròfags perivasculars participen en el reclutament de neutròfils durant la infecció bacteriana de la pell (Abtin *et al.*, 2014).

L'anàlisi funcional dels gens més expressats en els BAMs CD163<sup>+</sup> després d'isquèmia cerebral respecte els respectius controls ha posat de manifest l'activació de processos de neovascularització i de la via HIF-1. Aquest descobriment és coherent amb l'increment de l'expressió del gen Vegfa regulat pel factor de transcripció HIF-1 $\alpha$ , descrit com a potent factor modulador de l'angiogènesi i regulador de l'estat redox cel·lular (Beck and Plate, 2009; Evangelista *et al.*, 2012). En el teixit cerebral humà post mortem de pacients que havien mort a les 24 hores després d'haver patit un ictus s'ha pogut detectar l'expressió de VEGF al voltant d'alguns vasos cerebrals i en alguns macròfags perivasculars CD163<sup>+</sup>. És per aquest motiu que suggerim que les nostres troballes en models experimentals d'ictus podrien ser vàlides en pacients amb ictus isquèmics aguts.

La producció aguda de VEGF està associada amb un augment de la permeabilitat vascular (Geiseler and Morland, 2018). En el present estudi, s'ha observat que la depleció de BAMs atenua l'expressió de Vegfa induïda per la isquèmia en l'escorça cerebral, així com també disminueix la isoforma de la proteïna segregada, VEGF164, en animals sense BAMs. A més a més, hem trobat que l'extravasació del blau d'Evans de vasos pials i corticals induïda per la

isquèmia es veu reduïda en els animals deplecionats de BAMs, mentre que aquests efectes no son tant accentuats a les regions subcorticals. Aquest major efecte de la permeabilitat dels vasos corticals podria ser degut a l'activitat dels macròfags subpials, de la mateixa manera com succeeix en l'arteriosclerosi, on els macròfags CD163<sup>+</sup> mostren també un augment en l'activació d'HIF1 $\alpha$  i expressió de VEGF i promouen un increment en la permeabilitat vascular i el reclutament de cèl·lules inflamatòries (Guo *et al.*, 2018).

Els macròfags perivasculars estan implicats en el manteniment de la funció de barrera vascular a la perifèria en condicions fisiològiques (Gupta *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016). No obstant, davant una situació d'isquèmia cerebral, es produeix un canvi en la funció homeostàtica dels macròfags CD163<sup>+</sup> degut a la inducció de la via HIF i a la generació de VEGF i mediadors inflamatoris. Tot i que aquest efecte es produeix en la fase més aguda de la isquèmia cerebral, no podem excloure que els macròfags perivasculars tinguin un paper vasculoprotector en les fases més cròniques després de la isquèmia cerebral.

En el nostre estudi no hem observat diferències en el volum d'infart 24 h post-isquèmia en les rates deplecionades de BAMs, tot i presentar un nombre reduït de granulòcits en el cervell isquèmic. No obstant, el paper dels neutròfils en els diferents models d'isquèmia no està clar. Mentre que alguns estudis mostren que la depleció de neutròfils en rates redueix el volum d'infart (Matsuo *et al.*, 1994), aquest efecte no s'ha reproduït en un model greu d'isquèmia i reperfusió en rates (Harris *et al.*, 2005). El nostre model d'isquèmia i reperfusió també produeix una lesió greu i és possible que la moderada reducció en el nombre de granulòcits induïda per la depleció dels BAMs no sigui suficient per provocar diferències importants en la mida de la lesió cerebral. En canvi, sí que hem observat una millora de la funció neurològica en absència de BAMs que es podria atribuir al menor reclutament de granulòcits i major preservació de la integritat vascular pial i cortical després de la isquèmia.

Una de les limitacions del nostre estudi ha estat que només vam estudiar la funció dels BAMs en les primeres hores després de la isquèmia cerebral per evitar possibles factors de confusió relacionats amb la infiltració massiva de macròfags que es produeix durant els dies posteriors de la lesió isquèmica (Gelderblom *et al.*, 2009; Chamorro *et al.*, 2012). A més, l'estratègia de depleció de BAMs utilitzada en el present treball és transitòria ja que es podria produir una repoblació d'aquestes cèl·lules a partir de macròfags perifèrics durant els dies posteriors. Es per aquest motiu que es requereixen estudis a llarg termini amb diferents estratègies experimentals per comprendre les conseqüències de l'activitat dels BAMs en l'evolució de la lesió cerebral i els processos de reparació, particularment pel que fa a la remodelació de la matriu extracel·lular i vascular. Una altre limitació del present treball és que no va ser possible separar els macròfags perivasculars dels macròfags pials ja que la piamàter es troba fortament adherida a la superfície cortical i ambdues poblacions expressen CD163 en el cervell de rata. Finalment, el nostre estudi experimental s'ha realitzat en rates masculines joves, mentre que l'ictus afecta principalment persones d'edat avançada d'ambdós sexes. Els estudis realitzats en animals envellits i en femelles són també necessaris per comprovar si els BAMs mostren una resposta similar en aquestes condicions.

### Discussió del tercer article:

En aquest treball s'ha posat de manifest que després de la isquèmia cerebral es produeix la infiltració de diferents poblacions de leucòcits CCR2<sup>+</sup>, que consten de monòcits i limfòcits. El treball mostra que la infiltració de monòcits CCR2<sup>+</sup> en el teixit isquèmic promou l'expressió de citocines pro-inflamatòries durant el primer dia després de la isquèmia. Malgrat aquest efecte en la fase aguda, els monòcits CCR2<sup>+</sup> promouen la resolució de la inflamació i participen en la recuperació de la funció neurològica durant els 15 dies següents a la isquèmia cerebral. Aquestes últimes observacions van en la mateixa direcció tal i com es descriu en estudis previs on s'utilitzen principalment estratègies farmacològiques per inhibir la funció de CCR2 (Gliem *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2015; Wattananit *et al.*, 2016). En el present treball s'ha demostrat que malgrat el fet que en la lesió isquèmica es produeixi la infiltració de diferents tipus cel·lulars que expressen CCR2, els efectes observats son atribuïbles als monòcits CCR2<sup>+</sup>.

La inflamació es considera una resposta perjudicial que agreuja el dany cerebral després d'un ictus i es considera un bon objectiu per intervenir terapèuticament (Iadecola and Anrather, 2011; Chamorro *et al.*, 2016). Tot i això, aquesta inflamació inicial, desencadena processos posteriors implicats en la migració cel·lular, proliferació, reorganització de la matriu extracel·lular i remodelació tissular (Eming, Martin and Tomic-Canic, 2014).

En el model experimental utilitzat en aquest estudi s'ha observat que durant les primeres 24 hores després de la isquèmia cerebral cortical es produeix un increment en l'expressió de citocines pro-inflamatòries i una disminució d'aquestes 4 dies després. També hem observat que els monòcits que infiltren en el teixit isquèmic contribueixen en la formació d'un ambient pro-inflamatori inicial que al llarg del temps té efectes beneficiosos. De fet, en la mateixa direcció dels nostres resultats, hi ha treballs que demostren que la injecció sistèmica d'una dosi baixa de LPS indueix una resposta protectora per part dels monòcits Ly6C<sup>hi</sup> en el cervell després de la isquèmia cerebral transitòria en ratolí (Garcia-Bonilla *et al.*, 2018). En conjunt, aquests resultats suggereixen la possibilitat de que un cert grau d'inflamació aguda en el teixit cerebral afectat podria ser necessària per iniciar processos secundaris relacionats amb la resolució i regeneració tissular.

Està descrit que la inflamació aguda difereix de la crònica pel fet que aquesta última s'associa a un retard en la cicatrització tissular i un mal pronòstic després de l'ictus (Barrientos *et al.*, 2008; Drake *et al.*, 2011). Nosaltres hem observat que els animals amb els monòcits deficients en CCR2 presenten una resposta inflamatòria atenuada en la fase aguda i un increment retardat de l'expressió de citocines pro-inflamatòries que podrien interferir amb la reparació tissular. De fet, en diferents treballs s'ha demostrat la implicació dels macròfags en la resolució i regeneració de diferents òrgans i teixits lesionats (Van Amerongen *et al.*, 2007; Mantovani *et al.*, 2013).

En el model d'isquèmia cerebral permanent utilitzat en el present treball s'ha observat una forta reducció del subministrament sanguini en el còrtex afectat. No obstant això, vuit dies després de la isquèmia cerebral s'ha detectat un increment de vasos sanguinis capaços de rebre sang dins el territori del nucli isquèmic on també s'hi localitzen els macròfags. La reducció en l'expressió de Vegfa i els seu receptor conjuntament amb la disminució de vasos presents en el teixit isquèmic vuit dies després de la isquèmia en els ratolins amb monòcits

deficients en CCR2 suggereix que els monòcits CCR2<sup>+</sup> podrien participar en processos d'angiogènesis, tal i com s'ha descrit en altres condicions (Shibuya, 2011; Eming, Martin and Tomic-Canic, 2014).

Altres cèl·lules importants en l'angiogènesi són els perícits que també estan involucrats en funcions de reparació tissular (Bergers and Song, 2005) promovent la diferenciació de precursors d'oligodendròcits i afavorint la re-mielinització (De La Fuente *et al.*, 2017). Diferents treballs demostren que els macròfags promouen la diferenciació dels perícits a miofibroblasts que produeixen col·lagen i que estarien implicats en la revascularització dels teixits i la curació de ferides (Minutti *et al.*, 2019). Els perícits expressen uns nivells baixos de  $\alpha$ -SMA (Skalli *et al.*, 1989; Alarcon-Martinez *et al.*, 2018; Smyth *et al.*, 2018) i la inducció de  $\alpha$ -SMA en els perícits s'utilitza com a marcador de la transició a miofibroblasts (Minutti *et al.*, 2019). En el present treball s'ha observat que la isquèmia cerebral provoca una disminució de l'expressió del ARNm del Pdgfr i del Pdgfr, i un increment en l'expressió d'Acta mitjançada en part pels monòcits CCR2<sup>+</sup>. Per tant, és possible que els monòcits CCR2<sup>+</sup> infiltrats en el cervell isquèmic afavorissin l'angiogènesi gràcies a la producció de Vegf i la diferenciació dels perícits a fibroblasts pro-angiogènics.

A més a més, en el present treball s'ha observat que les cèl·lules Ly6C<sup>hi</sup> obtingudes del cervell isquèmic expressen Il1b, Arg1, Chil3, Vegfa i VEGFR1 (Flt1). Tot i això, és possible que les mateixes cèl·lules no expressin a l'hora tots aquests gens sinó que hi hagi diferents subpoblacions de monòcits CCR2<sup>+</sup>. S'ha descrit que els monòcits expressen Flt1 i que l'expressió d'aquest receptor està regulada durant la diferenciació a macròfags (Sawano *et al.*, 2001). També s'ha descrit que hi ha una subpoblació de monòcits CCR2<sup>+</sup> que expressen uns nivells elevats de VEGF-A (Willenborg *et al.*, 2012). Aquestes cèl·lules juguen un paper crucial en l'angiogènesi. Per tant, els resultats del present estudi són compatibles amb la possibilitat de que algun subgrup de monòcits CCR2<sup>+</sup> que infiltrin en el parènquima cerebral estigui involucrat en funcions d'angiogènesi i reparació tissular.

En el teixit isquèmic s'ha detectat subpoblacions de monòcits CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> que podrien correspondre a monòcits "intermedis". Diferents treballs suggereixen un canvi fenotípic dels monòcits pro-inflamatoris CCR2<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>low</sup> a un fenotip no-clàssic o alternatiu (CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>) en un teixit lesionat (Dal-Secco *et al.*, 2015). Nosaltres hem observat que en la fase aguda de la isquèmia, els monòcits Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>low/-</sup> que infiltrin en les primeres hores esdevenen Ly6C<sup>lo</sup> amb diferents graus d'expressió de CCR2 i CX3CR1 en fases més tardanes. A més a més, hem observat que a diferència de la micròglia, els macròfags expressen Arg1 i Chil3 que són marcadors de macròfags activats alternativament que estan involucrats en la resolució de les lesions (Loke *et al.*, 2002).

Malgrat les fortes evidències de les funcions pro-reparadores dels monòcits CCR2<sup>+</sup> no hem pogut restablir les alteracions descrites en els ratolins amb monòcits deficients en CCR2 mitjançant l'administració de monòcits CCR2<sup>+</sup> provinents de la medul·la òssia de ratolins donants. Existeixen diferents factors que podrien ajudar a explicar aquests resultats. Per una banda, el fet d'administrar una sola vegada els monòcits podria ser insuficient per restablir la seva funció ja que no ha estat possible detectar un increment dels gens inflamatoris després de l'administració dels monòcits CCR2<sup>+</sup> en la fase aguda de la isquèmia. Per altra banda, el fet

## DISCUSSION

d'haver observat una heterogeneïtat fenotípica en les poblacions de monòcits CCR2<sup>+</sup> podria fer pensar que en les poblacions de monòcits immadurs provinents de la medul·la òssia (Miró-Mur *et al.*, 2016) no hi ha les poblacions de monòcits amb aquesta capacitat pro-regenerativa. Per tant, suggerim que els monòcits immadurs de medul·la podrien requerir algun procés de maduració en circulació o bé que les monòcits amb aquesta capacitat reparadora poden provenir d'altres reservoris. És per aquest motiu que creiem que descobrir l'heterogeneïtat fenotípica de les poblacions de monòcits CCR2<sup>+</sup> que infiltren al teixit cerebral isquèmic pot obrir noves vies per dissenyar teràpies basades amb monòcits per promoure la recuperació funcional després d'un ictus isquèmic.

### Discussió global:

En la present tesi s'ha mostrat que durant la progressió d'una lesió isquèmica en el cervell es veuen implicades una gran varietat de tipus cel·lulars amb funcions diferents.

En primer lloc s'ha demostrat que els neutròfils tenen la capacitat d'activar-se en els espais perivasculars on resten atrapats i poden accedir al parènquima cerebral isquèmic, possiblement després d'haver danyat les barreres parenquimals tant a nivell de superfície pial com les lamines basals dels vasos sanguinis un cop iniciat el procés de degranulació i/o formació de NETs. Tenint en compte aquesta via d'infiltració de neutròfils al parènquima cerebral i considerant el fet que diferents treballs suggereixen un paper deleteri dels neutròfils en el teixit isquèmic, aquests resultats poden ajudar a tenir en compte noves estratègies terapèutiques en l'ictus isquèmic ja que els nostres resultats suggereixen que aquesta via d'infiltració de neutròfils també té lloc en pacients d'ictus.

El següent pas en el desenvolupament d'aquesta tesi va ser estudiar els macròfags perivasculars donat que la ubicació d'aquestes cèl·lules les feia candidates a intervenir en la infiltració de neutròfils als espais perivasculars. Hem trobat que els macròfags perivasculars alliberen factors quimioatracients de neutròfils després de la isquèmia i estan implicats en la infiltració de neutròfils al cervell isquèmic.

També hem identificat un paper dels macròfags perivasculars en la producció de VEGFA i trencament de la BHE en la fase aguda de l'ictus. No obstant això, els macròfags perivasculars podrien tenir altres efectes a més llarg termini, considerant la importància que té el VEGFA en processos d'angiogènesi. Per limitacions de la tècnica emprada en aquest estudi per depleccionar els macròfags perivasculars, no es va poder fer estudis a llarg termini perquè es produïa una repoblació espontània de les cèl·lules. Com que el nostre estudi es limita a la fase aguda de l'ictus, seria oportú dissenyar una estratègia per estudiar l'efecte de la delecio crònica d'aquests BAMs en la lesió isquèmica per tal de conèixer la seva funció en diferents moments de la patologia i la seva possible contribució a processos d'angiogènesi.

El que sí que hem pogut demostrar és la contribució dels macròfags infiltrants CCR2<sup>+</sup> en processos d'angiogènesi i reparació tissular, mitjançats, al menys en part, per la producció de VEGF. Així, l'estudi de la funció dels monòcits CCR2<sup>+</sup> en la isquèmia cerebral ha demostrat que aquestes cèl·lules participen en la resposta inflamatòria aguda, però també tenen la capacitat de promoure la reparació tissular, la formació de nous vasos i millorar la funció neurològica dels animals. El nostre estudi suggereix que aquestes funcions podrien venir determinades per

subpoblacions específiques de monòcits CCR2<sup>+</sup> donada la heterogeneïtat fenotípica i possiblement funcional dins d'aquest grups de monòcits CCR2<sup>+</sup>. Aquests resultats suggereixen que la utilització de poblacions concretes de monòcits podrien ser una bona teràpia cel·lular per promoure la recuperació funcional després de l'ictus.

Globalment els resultats d'aquesta tesis permeten posar de manifest que al llarg de la progressió d'una lesió isquèmica la interacció de diferents cèl·lules del sistema immune amb les diferents cèl·lules del cervell és molt important per tal d'orquestrar la resposta immune i promoure una reparació tissular.





## **CONCLUSIONS**



Globalment aquesta tesi demostra :

1. En la isquèmia permanent, els neutròfils extravasen des de les leptomeninges, migren pels espais perivasculars i infiltren al teixit cortical isquèmic.
2. Els macròfags perivasculars participen en l'atracció de neutròfils cap al focus de la lesió isquèmica a les 24h de reperfusió.
3. Els macròfags perivasculars generen VEGFa i promouen el trencament de la BHE en la fase aguda de la isquèmia.
4. Diferents poblacions de monòcits i limfòcits CCR2+ infiltren al parènquima cerebral isquèmic.
5. Els monòcits CCR2+ tenen un efecte pro-inflamatori en les primeres hores post-isquèmia, però al cap d'una setmana promouen l'angiogènesi, afavoreixen la resolució de la inflamació i frenen el deteriorament neurològic.
6. La població de monòcits CCR2+ és heterogènia i conté subgrups de cèl·lules amb funcions reparadores. Aquestes no estan representades en els monòcits immadurs del moll de l'os.
7. La identificació funcional de la diversitat fenotípica dins de la població de monòcits CCR2+ pot ser important per poder dissenyar teràpies cel·lulars basades en monòcits.



## **BIBLIOGRAFIA**





**A**

Abbott, N. J., Rönnbäck, L. and Hansson, E. (2006) 'Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier', *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), pp. 41–53. doi: 10.1038/nrn1824.

Abtin, A. *et al.* (2014) 'Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection', *Nat Immunol*, 15(1), pp. 45–53. doi: 10.1038/ni.2769.

Ahn, J. H. *et al.* (2019) 'Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid', *Nature*, 572(7767), pp. 62–66. doi: 10.1038/s41586-019-1419-5.

Akopov, S. E., Simonian, N. A. and Grigorian, G. S. (1996) 'Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage', *Stroke*, 27(10), pp. 1739–1743. doi: 10.1161/01.STR.27.10.1739.

Alarcon-Martinez, L. *et al.* (2018) 'Capillary pericytes express  $\alpha$ -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection', *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.34861.

Amaro, S. *et al.* (2015) 'Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human ischemic stroke', *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 77(5), pp. 775–783. doi: 10.1002/ana.24378.

Van Amerongen, M. J. *et al.* (2007) 'Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice', *American Journal of Pathology*, 170(3), pp. 818–829. doi: 10.2353/ajpath.2007.060547.

Arbel-Ornath, M. *et al.* (2013) 'Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models', *Acta Neuropathologica*, 126(3), pp. 353–364. doi: 10.1007/s00401-013-1145-2.

Ashwal, S. *et al.* (2007) 'Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging', *Pediatric Research*, 61(1), pp. 9–14. doi: 10.1203/01.pdr.0000251612.16069.4b.

Aspelund, A. *et al.* (2015) 'A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules', *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press, 212(7), pp. 991–999. doi: 10.1084/jem.20142290.

**B**

Balkaya, M. *et al.* (2013) 'Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(3), pp. 330–338. doi: 10.1038/jcbfm.2012.185.

Balkaya, M. G. *et al.* (2018) 'Behavioral outcome measures to improve experimental stroke research', *Behavioural Brain Research*. Elsevier, 352, pp. 161–171. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.039.

Barrientos, S. *et al.* (2008) 'Growth factors and cytokines in wound healing', *Wound Repair and Regeneration*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 16(5), pp. 585–601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.

Beck, H. and Plate, K. H. (2009) 'Angiogenesis after cerebral ischemia', *Acta Neuropathologica*, 117(5), pp. 481–496. doi: 10.1007/s00401-009-0483-6.

Beek, J., Elward, K. and Gasque, P. (2003) 'Activation of Complement in the Central Nervous System', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 992(1), pp. 56–71. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03138.x.

Benakis, C., Llovera, G. and Liesz, A. (2018) 'The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 175628641878370. doi: 10.1177/1756286418783708.

Bennett, M. L. *et al.* (2016) 'New tools for studying microglia in the mouse and human CNS', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), pp. 1738–1746. doi: 10.1073/pnas.1525528113.

## BIBLIOGRAFIA

- Bergers, G. and Song, S. (2005) 'The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance', *Neuro-Oncology*, 7(4), pp. 452–464. doi: 10.1215/s1152851705000232.
- Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2010) 'Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 11(10), pp. 889–896. doi: 10.1038/ni.1937.
- Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2012) 'Orchestration of metabolism by macrophages', *Cell Metabolism*, pp. 432–437. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.013.
- Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2014) *Macrophages: Biology and role in the pathology of diseases, Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*. doi: 10.1007/978-1-4939-1311-4.
- Botchkina, G. I. *et al.* (1997) 'Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia', *Molecular Medicine*, 3(11), pp. 765–781. doi: 10.1007/bf03401714.
- Brühl, H. *et al.* (2004) 'Dual Role of CCR2 during Initiation and Progression of Collagen-Induced Arthritis: Evidence for Regulatory Activity of CCR2 + T Cells', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 172(2), pp. 890–898. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.890.
- Buck, B. H. *et al.* (2008) 'Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke', *Stroke*, 39(2), pp. 355–360. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490128.
- ### C
- Carare, R. O. *et al.* (2008) 'Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(2), pp. 131–144. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x.
- Castillo, J. (2001) 'Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral', *Revista de Neuro-Psiquiatria*, 10 March, pp. 354–381. Available at: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RNP/article/view/1499/1527> (Accessed: 14 June 2019).
- Chamorro, Á. *et al.* (2012) 'The immunology of acute stroke', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 8(7), pp. 401–410. doi: 10.1038/nrneuro.2012.98.
- Chamorro, Á. *et al.* (2014) 'Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): A randomised, double-blind phase 2b/3 trial', *The Lancet Neurology*, 13(5), pp. 453–460. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70054-7.
- Chamorro, Á. *et al.* (2016) 'Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation', *The Lancet Neurology*, 15(8), pp. 869–881. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00114-9.
- Chavez, J. C. *et al.* (2009) 'Pharmacologic Interventions for Stroke', *Stroke*, 40(10), pp. 558–563. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.559914.
- Che, X. *et al.* (2001) 'Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice', *Brain Pathology*, 902(2), pp. 171–177. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02328-9.
- Chu, H. X. *et al.* (2014) 'Immune Cell Infiltration in Malignant Middle Cerebral Artery Infarction: Comparison with Transient Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Nature Publishing Group, 34(3), pp. 450–459. doi: 10.1038/jcbfm.2013.217.
- Chu, H. X. *et al.* (2015) 'Evidence That Ly6Chi Monocytes Are Protective in Acute Ischemic Stroke by Promoting M2 Macrophage Polarization', *Stroke*. Lippincott Williams and Wilkins, 46(7), pp. 1929–1937. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009426.

Clausen, B. H. *et al.* (2008) 'Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice', *Journal of Neuroinflammation*, 5(1), p. 46. doi: 10.1186/1742-2094-5-46.

Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J. and Knopf, P. M. (1992) 'Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance.', *Brain Pathology*, 2(4), pp. 269–276. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1341962> (Accessed: 3 September 2019).

Cuartero, M. I. *et al.* (2013) 'N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: Modulation by the ppar $\gamma$  agonist rosiglitazone', *Stroke*, 44(12), pp. 3498–3508. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002470.

## D

Dal-Secco, D. *et al.* (2015) 'A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury', *Journal of Experimental Medicine*, 212(4), pp. 447–456. doi: 10.1084/jem.20141539.

DePaula-Silva, A. B. *et al.* (2019) 'Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation', *Journal of Neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/s12974-019-1545-x.

DeVries, A. C. *et al.* (2001) 'Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: Will it prove useful?', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon, 25(4), pp. 325–342. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00017-3.

Dimitrijevic, O. B. *et al.* (2007) 'Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice', *Stroke*, 38(4), pp. 1345–1353. doi: 10.1161/01.STR.0000259709.16654.8f.

Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A. (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view', *Trends in Neurosciences*, 22, pp. 391–397. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441299>.

Drake, C. *et al.* (2011) 'Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier, 25(6), pp. 1113–1122. doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.008.

Duan, L. *et al.* (2018) 'PDGFR $\beta$  Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2', *Neuron*. Elsevier Inc., 100(1), pp. 183–200. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.030.

Ducroux, C. *et al.* (2018) 'Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke', *Stroke*, 49(3), pp. 754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896.

Durafourt, B. A. *et al.* (2012) 'Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages', *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 60(5), pp. 717–727. doi: 10.1002/glia.22298.

## E

Eming, S. A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014) 'Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation', *Science Translational Medicine*, 6(265), pp. 265–265. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.

Engelhardt, B. and Ransohoff, R. M. (2005) 'The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms', *Trends in Immunology*, 26(9), pp. 485–495. doi: 10.1016/j.it.2005.07.004.

## BIBLIOGRAFIA

Enzmann, G. *et al.* (2013) 'The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury.', *Acta neuropathologica*, 125(3), pp. 395–412. doi: 10.1007/s00401-012-1076-3.

Evangelista, A. M. *et al.* (2012) 'Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration', *Free Radical Biology and Medicine*. NIH Public Access, 53(12), pp. 2327–2334. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.546.

## F

Fang, W. *et al.* (2018) 'CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice', *Theranostics*, 8(13), pp. 3530–3543. doi: 10.7150/thno.24475.

Faraco, G. *et al.* (2016) 'Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 126(12), pp. 4674–4689. doi: 10.1172/JCI86950.

Faraco, G. *et al.* (2017) 'Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease', *Journal of Molecular Medicine*. NIH Public Access, 95(11), pp. 1143–1152. doi: 10.1007/s00109-017-1573-x.

Farr, T. D. and Whishaw, I. Q. (2002) 'Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke', *Stroke*, 33(7), pp. 1869–1875. doi: 10.1161/01.STR.0000020714.48349.4E.

Fassbender, K. *et al.* (2017) 'Mobile stroke units for prehospital thrombolysis, triage, and beyond: benefits and challenges', *The Lancet Neurology*, 16(3), pp. 227–237. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30008-X.

Feil, S., Valtcheva, N. and Feil, R. (2009) 'Inducible Cre Mice', in Wurst, W. and Kühn, R. (eds). Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 343–363. doi: 10.1007/978-1-59745-471-1\_18.

Felten, D. L., O'Banion, M. K. and Maida, M. S. (2016) 'Vasculature', in *Netter's Atlas of Neuroscience*, pp. 93–124. doi: 10.1016/B978-0-323-26511-9.00007-2.

Fisher, M. *et al.* (2009) 'Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations', *Stroke*, 40(6), pp. 2244–2250. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.

Fonarow, G. C. *et al.* (2011) 'Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: Patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes', *Circulation*, 123(7), pp. 750–758. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.974675.

Ford, A. L. *et al.* (1995) 'Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared.', *The Journal of Immunology*, 154(9), pp. 4309–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722289>.

Frijns, C. J. M. and Kappell, L. J. (2002) 'Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease', *Stroke*, 33(8), pp. 2115–2122. doi: 10.1161/01.STR.0000021902.33129.69.

Fuchs, T. A., Brill, A. and Wagner, D. D. (2012) 'Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), pp. 1777–1783. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242859.

Fumagalli, S. *et al.* (2015) 'The ischemic environment drive s microglia and macrophage function', *Frontiers in Neurology*, 6(MAR), pp. 1–19. doi: 10.3389/fneur.2015.00081.

## G

- Galea, I. *et al.* (2005) 'Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain', *GLIA*. John Wiley & Sons, Ltd, 49(3), pp. 375–384. doi: 10.1002/glia.20124.
- Garcia-Bonilla, L. *et al.* (2018) 'Endogenous protection from ischemic brain injury by preconditioned monocytes', *Journal of Neuroscience*, 38(30), pp. 6722–6736. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0324-18.2018.
- Garcia, J. H. *et al.* (1994) 'Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat).', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 144(1), pp. 188–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8291608> (Accessed: 3 September 2019).
- Garg, K. *et al.* (2009) 'Angiogenic potential of human macrophages on electrospun bioresorbable vascular grafts', *Biomedical Materials*, 4(3), p. 031001. doi: 10.1088/1748-6041/4/3/031001.
- Ge, R. *et al.* (2017) 'Choroid plexus-cerebrospinal fluid route for monocyte-derived macrophages after stroke', *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), p. 153. doi: 10.1186/s12974-017-0909-3.
- Geiseler, S. and Morland, C. (2018) 'The Janus Face of VEGF in Stroke', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 19(5), p. 1362. doi: 10.3390/ijms19051362.
- Gelderblom, M. *et al.* (2009) 'Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(5), pp. 1849–57. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534503.
- Georgakis, M. K. *et al.* (2019) 'Genetically Determined Levels of Circulating Cytokines and Risk of Stroke: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1', *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 139(2), pp. 256–268. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035905.
- Gerriets, T. *et al.* (2004) 'Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging', *Stroke*. Lippincott Williams & Wilkins, 35(2), pp. 566–571. doi: 10.1161/01.STR.0000113692.38574.57.
- Gherzi-Egea, J. F. *et al.* (2018) 'Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 337–361. doi: 10.1007/s00401-018-1807-1.
- Ginhoux, F. *et al.* (2013) 'Origin and differentiation of microglia', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi: 10.3389/fncel.2013.00045.
- Ginhoux, F. and Prinz, M. (2015) 'Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies', *Cold Spring Harbor perspectives in ...*, pp. 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
- Gliem, M. *et al.* (2012) 'Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models', *Annals of Neurology*, 71(6), pp. 743–752. doi: 10.1002/ana.23529.
- Goldmann, T. *et al.* (2016) 'Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces', *Nature Immunology*, 17(7), pp. 797–805. doi: 10.1038/ni.3423.
- Gorina, R. *et al.* (2011) 'Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways', *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 59(2), pp. 242–255. doi: 10.1002/glia.21094.
- Van Gorp, H., Delputte, P. L. and Nauwynck, H. J. (2010) 'Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy', *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd, 47(7–8), pp. 1650–1660. doi: 10.1016/j.molimm.2010.02.008.



## BIBLIOGRAFIA

- Greenhalgh, A. D. *et al.* (2018) 'Peripherally derived macrophages modulate microglial function to reduce inflammation after CNS injury', *PLoS biology*, 16(10), p. e2005264. doi: 10.1371/journal.pbio.2005264.
- Gregersen, R., Lambertsen, K. and Finsen, B. (2000) 'Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(1), pp. 53–65. doi: 10.1097/00004647-200001000-00009.
- Grønberg, N. V. *et al.* (2013) 'Leukocyte infiltration in experimental stroke.', *Journal of neuroinflammation*, 10, p. 115. doi: 10.1186/1742-2094-10-115.
- Guillemin, G. J. and Brew, B. J. (2004) 'Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification.', *Journal of leukocyte biology*, 75(3), pp. 388–397. doi: 10.1189/jlb.0303114.
- Gülke, E., Gelderblom, M. and Magnus, T. (2018) 'Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, pp. 1–14. doi: 10.1177/1756286418774254.
- Guo, L. *et al.* (2018) 'CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis', *Journal of Clinical Investigation*, 128(3), pp. 1106–1124. doi: 10.1172/JCI93025.
- Gupta, P. *et al.* (2016) 'Tissue-Resident CD169+ Macrophages Form a Crucial Front Line against Plasmodium Infection', *Cell Reports*. The Author(s), 16(6), pp. 1749–1761. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.010.
- ## H
- Harari, O. A. and Liao, J. K. (2010) 'NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke', *Annals of the New York Academy of Sciences*. NIH Public Access, pp. 32–40. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05735.x.
- Harris, A. K. *et al.* (2005) 'Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke', *BMC Neuroscience*, 6. doi: 10.1186/1471-2202-6-49.
- Hawkes, C. A. *et al.* (2014) 'Failure of Perivascular Drainage of  $\beta$ -amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy', *Brain Pathology*, 24(4), pp. 396–403. doi: 10.1111/bpa.12159.
- Hawkes, C. A. and McLaurin, J. (2009) 'Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of  $\beta$ -amyloid in cerebral amyloid angiopathy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(4), pp. 1261–1266. doi: 10.1073/pnas.0805453106.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) 'The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease', *Pharmacological Reviews*, pp. 173–185. doi: 10.1124/pr.57.2.4.
- He, H. *et al.* (2016) 'Perivascular Macrophages Limit Permeability', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(11), pp. 2203–2212. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307592.
- Herisson, F. *et al.* (2018) 'Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration', *Nature Neuroscience*. Springer US, 21(9), pp. 1209–1217. doi: 10.1038/s41593-018-0213-2.
- Holder, G. E. *et al.* (2014) 'Expression of the Mannose Receptor CD206 in HIV and SIV Encephalitis: A Phenotypic Switch of Brain Perivascular Macrophages with Virus Infection', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. NIH Public Access, 9(5), pp. 716–726. doi: 10.1007/s11481-014-9564-y.

Van Hove, H. *et al.* (2019) 'A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment', *Nature Neuroscience*. Springer US, 22(6), pp. 1021–1035. doi: 10.1038/s41593-019-0393-4.

Howells, D. W. *et al.* (2010) 'Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, pp. 1412–1431. doi: 10.1038/jcbfm.2010.66.

Hu, X. *et al.* (2012) 'Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia', *Stroke*, 43(11), pp. 3063–3070. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.

Hu, X. *et al.* (2015) 'Microglial and macrophage polarization - New prospects for brain repair', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 56–64. doi: 10.1038/nrneuro.2014.207.

Huang, J., Upadhyay, U. M. and Tamargo, R. J. (2006) 'Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia', *Surgical Neurology*, 66(3), pp. 232–245. doi: 10.1016/j.surneu.2005.12.028.

Hung, S. *et al.* (2002) 'Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 72(1), pp. 72–82. doi: 10.1189/JLB.72.1.72.

## I

Iadecola, C. and Anrather, J. (2011) 'The immunology of stroke: from mechanisms to translation.', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 17(7), pp. 796–808. doi: 10.1038/nm.2399.

Iadecola, C. and Nedergaard, M. (2007) 'Glial regulation of the cerebral microvasculature', *Nature Neuroscience*, pp. 1369–1376. doi: 10.1038/nn2003.

Iloff, J. J. *et al.* (2012) 'A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ ', *Science Translational Medicine*, 4(147), pp. 147–111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.

## J

Jaerve, A. and Müller, H. W. (2012) 'Chemokines in CNS injury and repair', *Cell and Tissue Research*, 349(1), pp. 229–248. doi: 10.1007/s00441-012-1427-3.

Jais, A. *et al.* (2016) 'Myeloid-Cell-Derived VEGF Maintains Brain Glucose Uptake and Limits Cognitive Impairment in Obesity.', *Cell*. Cell Press, pp. 1338–1340. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.010.

Ji, H. H., Sang, W. H. and Seung, K. L. (2005) 'Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke', *Free Radical Biology and Medicine*, 39(1), pp. 51–70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.035.

Jin, R., Yang, G. and Li, G. (2010) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells.', *Journal of leukocyte biology*, 87(May), pp. 779–789. doi: 10.1189/jlb.1109766.

Johnson, W. *et al.* (2016) 'Stroke: A global response is needed', *Bulletin of the World Health Organization*, pp. 634A-635A. doi: 10.2471/BLT.16.181636.

Justicia, C. *et al.* (2016) 'Uric Acid Is Protective After Cerebral Ischemia/Reperfusion in Hyperglycemic Mice', *Translational Stroke Research*, 8(3), pp. 294–305. doi: 10.1007/s12975-016-0515-1.

## K

Kamel, H. *et al.* (2019) 'Tailoring the Approach to Embolic Stroke of Undetermined Source: A Review', *JAMA Neurology*. American Medical Association, 76(7), pp. 855–861. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.0591.

## BIBLIOGRAFIA

Kamel, H. and Iadecola, C. (2012) 'Brain-immune interactions and ischemic stroke: Clinical implications', *Archives of Neurology*, pp. 576–581. doi: 10.1001/archneurol.2011.3590.

Kassem-Moussa, H. and Graffagnino, C. (2002) 'Nonocclusion and spontaneous recanalization rates in acute ischemic stroke: A review of cerebral angiography studies', *Archives of Neurology*. American Medical Association, pp. 1870–1873. doi: 10.1001/archneur.59.12.1870.

Kim, W.-K. *et al.* (2006) 'CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood.', *The American journal of pathology*, 168(3), pp. 822–834. doi: 10.2353/ajpath.2006.050215.

Kim, Y. R. *et al.* (2007) 'fMRI of delayed albumin treatment during stroke recovery in rats: Implication for fast neuronal habituation in recovering brains', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications/Sage UK: London, England, 27(1), pp. 142–153. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600317.

Knight, R. A. *et al.* (1994) 'Magnetic resonance imaging assessment of evolving focal cerebral ischemia: Comparison with histopathology in rats', *Stroke*, 25(6), pp. 1252–1261. doi: 10.1161/01.STR.25.6.1252.

Kohno, K. *et al.* (1995) 'Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction', *Magnetic Resonance Imaging*, 13(1), pp. 73–80. doi: 10.1016/0730-725X(94)00080-M.

Kolaczkowska, E. and Kubes, P. (2013) 'Neutrophil recruitment and function in health and inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 13(3), pp. 159–175. doi: 10.1038/nri3399.

Korin, B. *et al.* (2017) 'High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 20(9), pp. 1300–1309. doi: 10.1038/nn.4610.

Krueger, M. *et al.* (2015) 'Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(2), pp. 292–303. doi: 10.1038/jcbfm.2014.199.

## L

De La Fuente, A. G. *et al.* (2017) 'Pericytes Stimulate Oligodendrocyte Progenitor Cell Differentiation during CNS Remyelination', *Cell Reports*, 20(8), pp. 1755–1764. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.007.

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A. and Hofer, M. (2009) 'Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches.', *Journal of translational medicine*, 7, p. 97. doi: 10.1186/1479-5876-7-97.

Lapenna, A., De Palma, M. and Lewis, C. E. (2018) 'Perivascular macrophages in health and disease', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 689–702. doi: 10.1038/s41577-018-0056-9.

Lasky, L. A. (1992) 'Selecting: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation', *Science*, 258(5084), pp. 964–969. doi: 10.1126/science.1439808.

Lassmann, H. *et al.* (1993) 'Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation', *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(1), pp. 19–24. doi: 10.1002/glia.440070106.

Lee, J. W. *et al.* (2004) 'Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : Its protein stability and biological functions', *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, pp. 1–12. doi: 10.1038/emm.2004.1.

Lee, R. M. K. W. (1995) 'Morphology of cerebral arteries', *Pharmacology and Therapeutics*, 66(1), pp. 149–173. doi: 10.1016/0163-7258(94)00071-A.

Liu, T. *et al.* (1994) 'Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons', *Stroke*, 25(7), pp. 1481–1488. doi: 10.1161/01.STR.25.7.1481.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Llovera, G. *et al.* (2017) 'The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 134(6), pp. 851–868. doi: 10.1007/s00401-017-1758-y.

Lo, E. H. (2010) 'Degeneration and repair in central nervous system disease'. doi: 10.1038/nm.2226.

Loke, P. *et al.* (2002) 'IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype.', *BMC immunology*, 3, p. 7. doi: 10.1186/1471-2172-3-7.

Longa, E. Z. *et al.* (1989) 'Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.', *Stroke*, 20(1), pp. 84–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2643202> (Accessed: 17 June 2019).

Louveau, A. *et al.* (2015) 'Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels', *Nature*, 523(7560), pp. 337–341. doi: 10.1038/nature14432.

Lucas, T. *et al.* (2010) 'Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair', *The Journal of Immunology*, 184(7), pp. 3964–3977. doi: 10.4049/jimmunol.0903356.

Lugo-Hernandez, E. *et al.* (2017) '3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(10), pp. 3355–3367. doi: 10.1177/0271678X17698970.

## M

Maestrini, I. *et al.* (2015) 'Higher neutrophil counts before thrombolysis for cerebral ischemia predict worse outcomes', *Neurology*, 85(16), pp. 1408–1416. doi: 10.1212/WNL.0000000000002029.

Malipiero, U. *et al.* (2007) 'Bacterial Meningitis: The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Innate Immunity and Secondary Brain Damage', *Neurodegenerative Diseases*, 4(1), pp. 43–50. doi: 10.1159/000100358.

Mantovani, A. *et al.* (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends in Immunology*. Elsevier Current Trends, pp. 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Mantovani, A. *et al.* (2013) 'Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling', *Journal of Pathology*, 229(2), pp. 176–185. doi: 10.1002/path.4133.

Mantovani, A. and Locati, M. (2013) 'Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), pp. 1478–1483. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.

Marsh, B. J., Williams-Karnesky, R. L. and Stenzel-Poore, M. P. (2009) 'Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke', *Neuroscience*. NIH Public Access, pp. 1007–1020. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.067.

Mato, M. *et al.* (1996) 'Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), pp. 3269–3274. doi: 10.1073/pnas.93.8.3269.

Matsuo, Y. *et al.* (1994) 'Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion.', *Stroke*, 25(7), pp. 1469–1475. doi: 10.1161/01.STR.25.7.1469.

Mergenthaler, P. *et al.* (2013) 'Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function', *Trends in Neurosciences*. NIH Public Access, pp. 587–597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.

## BIBLIOGRAFIA

- Mergenthaler, P., Dirnagl, U. and Meisel, A. (2004) 'Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models', in *Metabolic Brain Disease*, pp. 151–167. doi: 10.1023/B:MEBR.0000043966.46964.e6.
- Mestas, J. and Hughes, C. C. W. (2004) 'Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology', *The Journal of Immunology*, 172(5), pp. 2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.
- Minutti, C. M. *et al.* (2019) 'A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation', *Immunity*. Elsevier Inc., 50(3), pp. 645–654.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.008.
- Miró-Mur, F. *et al.* (2016) 'Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation', *Brain, Behavior, and Immunity*. Academic Press, 53, pp. 18–33. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.010.
- Mortazavi, M. M. *et al.* (2014) 'The choroid plexus: A comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations', *Child's Nervous System*, 30(2), pp. 205–214. doi: 10.1007/s00381-013-2326-y.
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H. and Iadecola, C. (2010) 'The science of stroke: Mechanisms in search of treatments', *Neuron*, pp. 181–198. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.002.
- Mrdjen, D. *et al.* (2018) 'High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease', *Immunity*, 48(2), pp. 380–395.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.011.
- Muraille, E., Leo, O. and Moser, M. (2014) 'Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?', *Frontiers in Immunology*, pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2014.00603.
- Murdoch, C. *et al.* (2008) 'The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis', *Nature Reviews Cancer*, 8(8), pp. 618–631. doi: 10.1038/nrc2444.
- N**
- Nathan, C. (2006) 'Neutrophils and immunity: challenges and opportunities', *Nature Reviews Immunology*, 6(3), pp. 173–182. doi: 10.1038/nri1785.
- Neuhaus, A. A. *et al.* (2014) 'Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke', *JAMA Neurology*. American Medical Association, pp. 634–639. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6299.
- Nieswandt, B., Kleinschnitz, C. and Stoll, G. (2011) 'Ischaemic stroke: A thrombo-inflammatory disease?', *Journal of Physiology*, 589(17), pp. 4115–4123. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212886.
- Nucera, S., Biziato, D. and de Palma, M. (2011) 'The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration', *International Journal of Developmental Biology*, 55(4–5), pp. 495–503. doi: 10.1387/ijdb.103227sn.
- O**
- O'Connell, K. E. *et al.* (2015) 'Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research.', *Comparative medicine*. American Association for Laboratory Animal Science, 65(2), pp. 96–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926395> (Accessed: 8 August 2019).
- O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J. and Rathmell, J. (2016) 'A guide to immunometabolism for immunologists', *Nature Reviews Immunology*, pp. 553–565. doi: 10.1038/nri.2016.70.
- Okuno, Y. *et al.* (2011) 'Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing', *Blood*. The American Society of Hematology, 117(19), pp. 5264–5272. doi: 10.1182/blood-2011-01-330720.

Otxoa-de-Amezaga, A., Gallizioli, M., *et al.* (2019) 'Location of Neutrophils in Different Compartments of the Damaged Mouse Brain After Severe Ischemia/Reperfusion', *Stroke*, 50(6), pp. 1548–1557. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.023837.

Otxoa-de-Amezaga, A., Miró-Mur, F., *et al.* (2019) 'Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 137(2), pp. 321–341. doi: 10.1007/s00401-018-1954-4.

## P

Palma, A. *et al.* (2018) 'Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States.', *Frontiers in physiology*. Frontiers Media SA, 9, p. 1659. doi: 10.3389/fphys.2018.01659.

Parkhurst, C. N. *et al.* (2013) 'Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor', *Cell*. Elsevier Inc., 155(7), pp. 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.

Peisker, T. *et al.* (2017) 'Acute stroke therapy: A review', *Trends in Cardiovascular Medicine*, pp. 59–66. doi: 10.1016/j.tcm.2016.06.009.

Perego, C. *et al.* (2016) 'Macrophages are essential for maintaining a M2 protective response early after ischemic brain injury', *Neurobiology of Disease*. Elsevier B.V., 96, pp. 284–293. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.017.

Pérez-Asensio, F. J. *et al.* (2010) 'Antioxidant CR-6 protects against reperfusion injury after a transient episode of focal brain ischemia in rats', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Nature Publishing Group, 30(3), pp. 638–652. doi: 10.1038/jcbfm.2009.237.

Planas, A. M. (2018) 'Role of Immune Cells Migrating to the Ischemic Brain', *Stroke*, 49(9), pp. 2261–2267. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021474.

Polfliet, M. M. J. *et al.* (2001) 'Meningeal and Perivascular Macrophages of the Central Nervous System Play a Protective Role During Bacterial Meningitis', *The Journal of Immunology*, 167(8), pp. 4644–4650. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4644.

Polfliet, M. M. J. *et al.* (2006) 'The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production', *Immunobiology*, 211(6–8), pp. 419–425. doi: 10.1016/j.imbio.2006.05.015.

Pollock, H. *et al.* (1997) *Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain : their relationship to lacunes*, *J. Anat.* Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1467691/pdf/joa\\_1913\\_0337.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1467691/pdf/joa_1913_0337.pdf) (Accessed: 3 September 2019).

Prinz, M. and Priller, J. (2014) 'Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(5), pp. 300–312. doi: 10.1038/nrn3722.

Prinz, V. and Endres, M. (2010) 'Modeling Focal Cerebral Ischemia in Rodents: Introduction and Overview', in *Neuromethods*, pp. 17–27. doi: 10.1007/978-1-60761-750-1\_3.

## R

Raes, G. *et al.* (2002) 'Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 71(4), pp. 597–602. doi: 10.1189/JLB.71.4.597.



## BIBLIOGRAFIA

Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012) 'The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 12(9), pp. 623–35. doi: 10.1038/nri3265.

Roberts, T. P. L. and Mikulis, D. (2007) 'Neuro MR: Principles', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 823–837. doi: 10.1002/jmri.21029.

Røhl, L. *et al.* (2001) 'Viability thresholds of ischemic penumbra of hyperacute stroke defined by perfusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient', *Stroke*, 32(5), pp. 1140–1146. doi: 10.1161/01.STR.32.5.1140.

Rollins, B. J. *et al.* (1990) 'Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE', *American Journal of Pathology*, 136(6), pp. 1229–1233. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1877579/pdf/amjpathol00114-0036.pdf> (Accessed: 15 August 2019).

Romanos, E. *et al.* (2007) 'Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(1), pp. 14–20. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600312.

## S

Sandoval, K. E. and Witt, K. A. (2008) 'Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke', *Neurobiology of Disease*. Elsevier Inc., 32(2), pp. 200–219. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.005.

Sawano, A. *et al.* (2001) 'Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans', *Blood*, 97(3), pp. 785–791. doi: 10.1182/blood.V97.3.785.

Schafer, D. P. and Stevens, B. (2015) 'Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), p. a020545. doi: 10.1101/cshperspect.a020545.

Schallert, T. *et al.* (2000) 'CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury', *Neuropharmacology*. Pergamon, 39(5), pp. 777–787. doi: 10.1016/S0028-3908(00)00005-8.

Serra-Pérez, A. *et al.* (2010) 'Extended Ischemia Prevents HIF1 $\alpha$  Degradation at Reoxygenation by Impairing Prolyl-hydroxylation', *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), pp. 18217–18224. doi: 10.1074/jbc.M110.101048.

Shi, C. and Pamer, E. G. (2011) 'Monocyte recruitment during infection and inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 762–774. doi: 10.1038/nri3070.

Shibuya, M. (2011) 'Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies', *Genes and Cancer*, 2(12), pp. 1097–1105. doi: 10.1177/1947601911423031.

Skalli, O. *et al.* (1989) ' $\alpha$ -Smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37(3), pp. 315–321. doi: 10.1177/37.3.2918221.

Smyth, L. C. D. *et al.* (2018) 'Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells', *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 92, pp. 48–60. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.06.001.

Sommer, C. J. (2017) 'Ischemic stroke: experimental models and reality', *Acta Neuropathologica*, pp. 245–261. doi: 10.1007/s00401-017-1667-0.

Sotak, C. H. (2002) 'The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain - A review', *NMR in Biomedicine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 561–569. doi: 10.1002/nbm.786.

Soulet, D. and Serge, R. (2008) 'Microglia', *Current Biology*, 18(12), pp. R506-508. doi: 10.1016/B978-0-12-385157-4.00184-6.

Steel, C. D. *et al.* (2010) 'Distinct macrophage subpopulations regulate viral encephalitis but not viral clearance in the CNS', *Journal of Neuroimmunology*, 226(1-2), pp. 81-92. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.034.

Swirski, F. K. *et al.* (2009) 'Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites', *Science*, 325(5940), pp. 612-616. doi: 10.1126/science.1175202.

## T

Tamura, A. *et al.* (1981) 'Focal cerebral ischaemia in the rat: I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 1(1), pp. 53-60. doi: 10.1038/jcbfm.1981.6.

Taniguchi, K. and Karin, M. (2018) 'NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 18(5), pp. 309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142.

Thomalla, G. *et al.* (2018) 'MRI-Guided thrombolysis for stroke with unknown time of onset', *New England Journal of Medicine*, 379(7), pp. 611-622. doi: 10.1056/NEJMoa1804355.

Townsend, N. *et al.* (2015) 'Cardiovascular disease in Europe - Epidemiological update 2015', *European Heart Journal*. Narnia, pp. 2696-2705. doi: 10.1093/eurheartj/ehv428.

Truelsen, T. *et al.* (2006) 'Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data', *European Journal of Neurology*, 13(6), pp. 581-598. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01138.x.

Tsou, C. L. *et al.* (2007) 'Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 117(4), pp. 902-909. doi: 10.1172/JCI29919.

## U

Uhl, B. *et al.* (2014) 'Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), pp. 1495-1504. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303721.

Urra, X. and Chamorro, A. (2013) 'Emerging issues in acute ischemic stroke.', *Journal of neurology*, 260(6), pp. 1687-92. doi: 10.1007/s00415-013-6919-x.

## V

Villa, A. *et al.* (2018) 'Identification of new molecular targets for PET imaging of the microglial anti-inflammatory activation state', *Theranostics*, 8(19), pp. 5400-5418. doi: 10.7150/thno.25572.

## W

Wang, Y. *et al.* (2015) 'TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model', *Cell*. Cell Press, 160(6), pp. 1061-1071. doi: 10.1016/J.CELL.2015.01.049.

Wattanait, S. *et al.* (2016) 'Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice', *Journal of Neuroscience*, 36(15), pp. 4182-4195. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4317-15.2016.

## BIBLIOGRAFIA

Weiss, J. M. *et al.* (1998) 'Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(12), pp. 6896–903. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/161/12/6896> (Accessed: 15 August 2019).

Willenborg, S. *et al.* (2012) 'CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair', *Blood*, 120(3), pp. 613–625. doi: 10.1182/blood-2012-01-403386.

Wolf, M. J. *et al.* (2012) 'Endothelial CCR2 Signaling Induced by Colon Carcinoma Cells Enables Extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK Pathway', *Cancer Cell*, 22(1), pp. 91–105. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.023.

Wolfe, C. D. A. *et al.* (2011) 'Estimates of Outcomes Up to Ten Years after Stroke: Analysis from the Prospective South London Stroke Register', *PLoS Medicine*. Public Library of Science, 8(5), p. e1001033. doi: 10.1371/journal.pmed.1001033.

Worthmann, H. *et al.* (2010) 'The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome', *Cerebrovascular Diseases*, 30(1), pp. 85–92. doi: 10.1159/000314624.

Wynn, T. A. and Vannella, K. M. (2016) 'Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis', *Immunity*. Elsevier Inc., 44(3), pp. 450–462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.

## Y

Yan, Y. P. *et al.* (2007) 'Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(6), pp. 1213–1224. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600432.

Yanamadala, V. and Friedlander, R. M. (2010) 'Complement in neuroprotection and neurodegeneration', *Trends in Molecular Medicine*. NIH Public Access, pp. 69–76. doi: 10.1016/j.molmed.2009.12.001.

Yang, Y. and Rosenberg, G. A. (2011) 'Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease', *Stroke*, 42(11), pp. 3323–3328. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.608257.

Yenari, M. A., Kauppinen, T. M. and Swanson, R. A. (2010) 'Microglial Activation in Stroke: Therapeutic Targets', *Neurotherapeutics*, 7(4), pp. 378–391. doi: 10.1016/j.nurt.2010.07.005.

Yona, S. *et al.* (2013) 'Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis', *Immunity*, 38(1), pp. 79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.

## Z

Zhang, E. T., Inman, C. B. and Weller, R. O. (1990) 'Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum.', *Journal of anatomy*, 170, pp. 111–23. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257067/pdf/janat00040-0112.pdf> (Accessed: 18 June 2019).

Zhang, Youwen *et al.* (2018) 'TREM2 modulates microglia phenotypes in the neuroinflammation of Parkinson's disease', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), pp. 797–802. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.226.

Zhang, Z. *et al.* (2011) 'Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains', *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier, 237(1–2), pp. 73–79. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.06.006.

Zhang, Z. *et al.* (2012) 'Lesional Accumulation of CD163+ Macrophages/microglia in Rat Traumatic Brain Injury', *Brain Research*. Elsevier, 1461, pp. 102–110. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.038.

Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* (2010) 'Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood', *Blood*. American Society of Hematology, pp. e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.

del Zoppo, G. J. *et al.* (2007) 'Microglial Activation and Matrix Protease Generation During Focal Cerebral Ischemia', *Stroke*, 38(2), pp. 646–651. doi: 10.1161/01.STR.0000254477.34231.cb.

Zrzavy, T. *et al.* (2018) 'Dominant role of microglial and macrophage innate immune responses in human ischemic infarcts', *Brain Pathology*. Wiley-Blackwell, 28(6), pp. 791–805. doi: 10.1111/bpa.12583.