UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DPTO. BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA Y LOS PROCESOS DEGENERATIVOS PROVOCADOS POR LA INYECCIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE NEURAMINIDASA EN RATA

Pablo Granados Durán

Málaga, 2014

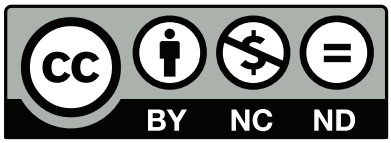
Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Publicaciones y Divulgación Científica

AUTOR: Pablo Granados Durán

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):
Http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/3.0/es
Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.
No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

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

Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DPTO. BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA Y LOS PROCESOS DEGENERATIVOS PROVOCADOS POR LA INYECCIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE NEURAMINIDASA EN RATA

Autor: Pablo Granados Durán

Directores: Dr. Pedro Fernández-Llebrez y Del Rey

Dr. Jesús Mateos Grondona

Málaga, 1 de Noviembre de 2014

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El **Dr. D. Pedro Fernández-Llebrez y Del Rey**, catedrático del Área de Fisiología Animal en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA

que D. Pablo Granados Durán ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada *"Análisis de la reacción inflamatoria y los procesos degenerativos provocados por la inyección intracerebroventricular de neuraminidasa en rata"*. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autoriza su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado
en Málaga, a 1 de Noviembre de 2014.

Fdo.: Pedro Fernández-Llebrez y del Rey

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dr. D. Jesús Mateos Grondona, profesor titular del Área de Fisiología Animal en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA

Que D. Pablo Granados Durán ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada *"Análisis de la reacción inflamatoria y los procesos degenerativos provocados por la inyección intracerebroventricular de neuraminidasa en rata"*. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado
en Málaga, a 1 de Noviembre de 2014.

Fdo.: Jesús Mateos Grondona

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

Yo, **Pablo Granados Durán**, declaro ser el autor del presente trabajo de investigación realizado en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, bajo la dirección del Dr. Pedro Fernández-Llebrez del Rey y del Dr. Jesús Mateos Grondona.

Y para que así conste, firmo el presente documento
en Málaga a 1 de Noviembre de 2014.

Fdo.: Pablo Granados Durán

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

El presente trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2010-19087
- Junta de Andalucía, Consejería de Sanidad, SAS 08-0029
- Junta de Andalucía, Proyecto de excelencia, P07-CVI-03079
- Junta de Andalucía, Proyecto de excelencia, P11-CVI-07637

Así mismo, como doctorando disfruté de una Beca de Formación de Personal Universitario (FPU) durante la realización del mismo (AP2007-03642).

Parte de los resultados obtenidos han sido publicados en los siguientes trabajos:

- **Grondona J.M., Granados-Duran P., Fernandez-Llebrez P., y Lopez-Avalos M.D.** (2013). A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochemistry and cell biology.* 139, 205-220.

Y se han presentado en los siguientes congresos:

- IV Reunión de la Red Glial Española. Madrid, 2008.
- IX Jornadas Andaluzas Salud Investiga. Cádiz, 2010.
- V Reunión de la Red Glial Española. Málaga, 2010.
- XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de NeuroCiencia. Salamanca, 2011.
- XIV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Torremolinos, 2011.
- VIII FENS forum of Neuroscience. Barcelona, 2012.
- IX FENS forum of Neuroscience. Milán, 2014.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

AGRADECIMIENTOS

Publicaciones y
Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

El trabajo que aquí presento no habría sido posible sin la ayuda y colaboración de muchos profesionales a los que he tenido el placer de conocer y de los que he podido aprender muchísimo. Agradezco enormemente su colaboración:

A los técnicos del SCAI, muy en especial a ***Manoli Vega,*** *por su inestimable ayuda en el uso del programa Visilog y la cuantificación de área inmunorreactiva; a* ***David Navas****, por su ayuda con la microscopía confocal y por estar siempre dispuesto a echar una mano; a* ***Casimiro Cárdenas****, por su disponibilidad y ayuda en cultivos celulares; y a* ***Gregorio Martín****, por su asistencia en el uso de la microscopia electrónica.*

A la ***Dra. Martina Álvarez*** *y la técnico* ***María José Lozano****, del laboratorio de anatomía patológica de la Facultad de Medicina de Málaga, por su ayuda en la puesta a punto de varios anticuerpos y la realización de algunas tinciones inmunohistoquímicas en sus equipos.*

Al personal del Estabulario de la Universidad de Málaga, en especial a ***Ricardo González,*** *por su amabilidad y consejos.*

A los doctores ***B. Paul Morgan*** *y* ***Timothy Hughes*** *de la Universidad de Cardiff, Reino Unido, por la cesión de varios ejemplares de ratas deficientes en la expresión del factor C6 del complemento y los anticuerpos contra el factor C9 y C3, así como a* ***Ruth Lewis*** *y* ***Archana Makam****, por todo lo que me enseñaron y por su ayuda durante mi estancia en su laboratorio. También al* ***Dr. Paul Tamburini****, de Alexion Pharmaceuticals, por su colaboración y la cesión del inhibidor del factor C5 del complemento.*

A la ***Dra. Carmen Pedraza*** *de la facultad de Psicología, por su disponibilidad y ayuda en el análisis estadístico.*

Al ***Dr. Antonio Alonso*** *y el equipo de inmunología del Hospital Carlos Haya, tanto por su ayuda, como por las muestras cedidas para este trabajo.*

Al ***Dr. Francisco de Borja Fernández*** *y la* ***Dra. Ana Carmen Durán,*** *del departamento de Biología Animal, por permitirnos el uso del criostato de su laboratorio.*

A la ***Dra. Ana Grandes*** *y a* ***José Rufián,*** *del Área de Genética, por permitirnos el uso del ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad) para la obtención de fotografías de Western blot.*

A la técnico ***Elvira Gil,*** *del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, por su ayuda en la puesta a punto de algunas tinciones inmunohistoquímicas.*

A mi tutora en el Máster, la ***Dra. Antonia Gutiérrez****, así como a las compañeras del Área de Biología Celular:* ***Raquel****,* ***Eli****,* ***Laura****,* ***Vane****,* ***Ale****,* ***Diana*** *y* ***Mercedes****, por su ayuda en todo lo que hemos necesitado.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Más personalmente, quisiera agradecer su amistad y apoyo a todos los compañeros que durante estos años han supuesto tanto para mí: una familia en Málaga.

A los doctores del Área de Fisiología Animal, no sólo por sus inestimables enseñanzas en el laboratorio, sino por ser amigos y compañeros además de profesores:

*A **Manolo**, con el que tuve el placer y orgullo de dar mis primeros pasos en un labo. Gracias por todo lo que me has enseñado y por darme la oportunidad de hacer algo que me encanta, dar rienda suelta a mi gusanillo docente. Mis clases de prácticas junto a ti y los demás son uno de mis mejores recuerdos de estos años.*

*A **Marga**, gracias por tu ayuda y consejos durante todo este tiempo, no pude tener mejor directora en la Tesina de Máster, contigo cualquiera saca una notaza!*

*A **Juan**, gracias por tu cercanía y ayuda siempre que la he necesitado, ELISAs incluidos!*

*A **Mariado**, mi "tercera codirectora". Siempre pensé que me habría encantado realizar una tesis bajo tu dirección, y gracias a tu enorme y desinteresada ayuda, en cierta forma, lo he cumplido. Gracias por todo el esfuerzo, por tantas horas de trabajo de las que no aparecen en certificados ni currículos, por estar ahí siempre que lo he necesitado. Gracias por enseñarme tanto, dentro y fuera del laboratorio.*

*A mis directores: **Pedro**, (el dire), y **Jesús** (el có). Gracias por todos vuestros consejos, por todo el trabajo compartido. Por haber creído en mis capacidades y haberme dado la oportunidad de aprender realizando este trabajo.*

*A **José Esteban Casares**, gran amigo y compañero, una de las personas de las que más he aprendido en un laboratorio y a la que admiro profundamente, como profesional y como persona. Muchas gracias.*

*A mis compis de fisio: **Mamme Gómez** y **Rick Visser**, los veteranos que tan buena senda nos marcaron, gracias por toda vuestra ayuda; a **Patri Ribera**, **Elena Cano**, **Inma Ruz** y **Patri Segado** (my tender), por tantísimos buenos ratos en la facultad; y a **Marina**, **Alejandro**, **Alba**, **Andrés**, **Isa** y **Carlos**, los mejores alumnos internos que se pueda tener.*

*A los compis de Biología Celular: **Ana**, no podría expresar en palabras todo lo que has supuesto para mí en estos años en la facultad. Eres una gran amiga, gracias por estar ahí siempre que te he necesitado, por tantísimas risas, tantas sobremesas, tantos buenos ratitos de los nuestros. **Eva**, mi "castaña wapa", gracias por tu amistad, tu comprensión y cariño, por tantos momentos inolvidables vividos juntos, en el trabajo y fuera de él. **Ángel**, gracias por tus consejos y tu sentido del humor, es un*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

placer trabajar cerca de ti. ***Dani****, mi compi, qué decir… "ai love llú, mai doctor".* ***Pedrillo****,* ***Rosa****,* ***Pilar****,* ***Leo****,* ***Iván*** *y* ***Fabi****, gracias por vuestra ayuda y amistad durante este tiempo; y a los compis que nos visitaron:* ***Carmen****,* ***Lourdes****,* ***Fernando****,* ***Raúl*** *y* ***Fran****.*

A los compañeros de Fisiología Vegetal: ***Sergio****,* ***Elena****,* ***Sara****,* ***Fatyha****,* ***Karima****,* ***Bea****,* ***Rafa****,* ***Jose****,* ***Candela****,* ***Nieves****,* ***Lourdes****,* ***Carolina****,* ***María Jesús****… con vecinos así es un placer trabajar.*

A los compis de Cardiovascular: ***Rita****,* ***Víctor****,* ***Juan Antonio*** *y los doctores* ***Ramón Muñoz-Chápuli*** *y* ***José María Pérez Pomares****, gracias por ayudarme en todo lo que he necesitado.*

A las nuevas compañeras de fisio, ***Silvia****,* ***Rosi*** *y* ***María del Mar****. Me ha encantado compartir con vosotras el día a día del labo en la parte final de mi trabajo.*

Agradecer también a ***Toño****,* ***Emily*** *y el* ***Dr. Rasaiah*** *su ayuda en las traducciones.*

Por último, agradecer todo el apoyo a mis amigos y familia durante estos años de trabajo, los que están ahí, en los momentos buenos y los malos.

A la pandi: ***Cristy****,* ***Rocío****,* ***Víctor****,* ***Germán****,* ***Antonio****,* ***Agus*** *y* ***Rebe****.*

A los que estuvieron siempre: ***Kike****,* ***Javi el peteño*** *y* ***Mauro****.*

Y a toda mi familia, en especial a mis ***padres*** *y* ***hermano****, por darme el apoyo y la libertad de ser lo que he querido, por animarme a intentar las cosas aun cuando parecen difíciles, por hacer que cada paso que he dado en la vida haya sido más fácil gracias a su esfuerzo, trabajo y cariño.*

A todos, Gracias.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

A mis abuelos,

Juan, Marina, Miguel y Rocío.

Publicaciones y
Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

ÍNDICES

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

Índice general ..... *Pág. iii*

Índice de figuras ..... *Pág. ix*

Índice de tablas ..... *Pág. xii*

Índice de siglas y abreviaturas ..... *Pág. xiii*

1. *INTRODUCCIÓN* ***Pág. 01***

1.1 RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EL SISTEMA INMUNE *Pág. 03*

1.1.1 Características especiales del sistema nervioso central respecto al sistema inmune ..... *Pág. 03*

1.1.1.1 La barrera hematoencefálica ..... *Pág. 04*

1.1.1.2 La célula microglial ..... *Pág. 06*

1.1.1.3 El líquido cefalorraquídeo ..... *Pág. 06*

1.1.1.4 El sistema linfoide y la presentación de antígeno en el sistema nervioso central ..... *Pág. 06*

1.1.2 El sistema del complemento en el sistema nervioso central ..... *Pág. 07*

1.1.2.1 Componentes del sistema del complemento y su síntesis en el sistema nervioso ..... *Pág. 08*

1.1.2.2 Activación del sistema del complemento ..... *Pág. 11*

1.1.2.3 Funciones del sistema del complemento e importancia en el sistema nervioso ..... *Pág. 14*

1.2 LA NEUROINFLAMACIÓN *Pág. 16*

1.2.1 Causas de inflamación en el sistema nervioso central ..... *Pág. 17*

1.2.1.1 Causas sépticas ..... *Pág. 17*

1.2.1.2 Causas asépticas ..... *Pág. 18*

1.2.2 Papel de las células residentes del sistema nervioso central en la neuroinflamación ..... *Pág. 19*

1.2.2.1 Microglía ..... *Pág. 19*

1.2.2.2 Astrocitos ..... *Pág. 21*

1.2.2.3 Oligodendrocitos ..... *Pág. 22*

1.2.2.4 Neuronas ..... *Pág. 22*

1.2.2.5 Macrófagos residentes ..... *Pág. 22*

1.2.2.6 Mastocitos ..... *Pág. 23*

1.2.3 Participación de células foráneas al sistema nervioso central en la neuroinflamación ..... *Pág. 24*

1.2.3.1 Células dendríticas ..... *Pág. 24*

1.2.3.2 Neutrófilos ..... *Pág. 24*

1.2.3.3 Monocitos/macrófagos ..... *Pág. 25*

1.2.3.4 Linfocitos ..... *Pág. 26*

1.2.4 Principales moléculas implicadas en la neuroinflamación ..... *Pág. 28*

1.2.5 Relaciones entre neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas ..... *Pág. 30*

1.2.6 Inflamación parenquimal (encefalitis) vs. inflamación en el líquido cefalorraquídeo (meningitis y ventriculitis) ..... *Pág. 33*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.3 LA NEURAMINIDASA COMO CAUSA ASÉPTICA DE NEUROINFLAMACIÓN *Pág. 34*

1.3.1 Características y actividad del enzima ..... *Pág. 34*

1.3.2 La neuraminidasa como factor de virulencia en virus y bacterias ..... *Pág. 36*

1.3.3 Destrucción del epitelio ependimario por neuraminidasa ..... *Pág. 37*

1.3.3.1 El epitelio ependimario ..... *Pág. 38*

1.3.3.2 Modelo de destrucción del epitelio ependimario ..... *Pág. 43*

2. *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS* ***Pág. 45***

2.1 OBJETIVO 1 *Pág. 47*

2.2 OBJETIVO 2 *Pág. 49*

3. *MATERIAL Y METODOLOGÍA* ***Pág. 53***

3.1 MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES Y OPERACIONES *Pág. 55*

3.1.1 Animales ..... *Pág. 55*

3.1.2 Administración de anestésicos y analgésicos ..... *Pág. 55*

3.1.3 Inyección intracerebroventricular ..... *Pág. 55*

3.1.3.1 Inyección intracerebroventricular de neuraminidasa ..... *Pág. 56*

3.1.3.2 Inyección intracerebroventricular de inhibidor de C5 ..... *Pág. 57*

3.1.3.3 Inyección intracerebroventricular de C5a ..... *Pág. 57*

3.1.4 Posoperatorio ..... *Pág. 57*

3.1.5 Inhibición sistémica del complemento ..... *Pág. 57*

3.1.6 Perfusión vascular para la fijación de tejidos ..... *Pág. 58*

3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS *Pág. 59*

3.2.1 Extracción de cerebro de rata ..... *Pág. 59*

3.2.2 Obtención de explantes de pared ventricular ..... *Pág. 60*

3.2.3 Obtención de células ependimarias aisladas ..... *Pág. 62*

3.2.4 Preparación de extractos proteicos ..... *Pág. 63*

3.2.5 Extracción de muestras de sangre ..... *Pág. 63*

3.2.5.1 Obtención de sueros ..... *Pág. 63*

3.2.5.2 Obtención y tratamiento de glóbulos rojos para pruebas hemolíticas ..... *Pág. 64*

3.2.6 Extracción de líquido cefalorraquídeo ..... *Pág. 65*

3.2.7 Activación del sistema del complemento en suero y líquido cefalorraquídeo ..... *Pág. 66*

3.2.8 Obtención de otros tejidos ..... *Pág. 66*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3 ENSAYOS HEMOLÍTICOS *Pág. 67*

3.3.1 Ensayo hemolítico sobre placa de difusión radial ... *Pág. 68*

3.3.2 Ensayo hemolítico sobre glóbulos rojos en suspensión ... *Pág. 70*

3.3.3 Ensayo de la actividad hemolítica de la neuraminidasa ... *Pág. 72*

3.4 ENSAYOS *IN VITRO* *Pág. 73*

3.4.1 Ensayos *in vitro* con explantes de pared ventricular ... *Pág. 73*

3.4.2 Ensayos *in vitro* con células ependimarias aisladas ... *Pág. 74*

3.4.3 Ensayos de la actividad citolítica de la neuraminidasa sobre células ependimarias ... *Pág. 75*

3.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS *Pág. 76*

3.5.1 Procesado histológico ... *Pág. 76*

3.5.1.1 Obtención de cortes en microtomo ... *Pág. 76*

3.5.1.2 Obtención de cortes en vibratomo ... *Pág. 76*

3.5.1.3 Obtención de cortes en criostato ... *Pág. 77*

3.5.1.4 Obtención de cortes en ultramicrotomo ... *Pág. 77*

3.5.2 Tinciones histológicas generales ... *Pág. 78*

3.5.2.1 Hematoxilina-eosina ... *Pág. 78*

3.5.2.2 Azul de toluidina ... *Pág. 78*

3.5.3 Tinciones histológicas específicas ... *Pág. 78*

3.5.3.1 Técnicas inmunohistoquímicas ... *Pág. 78*

3.5.3.1.1 Recuperación antigénica ... *Pág. 79*

3.5.3.1.2 Inmunohistoquímica mediante complejo avidina-biotina-peroxidasa ... *Pág. 79*

3.5.3.1.3 Amplificación de señal mediante tiramina biotinilada ... *Pág. 81*

3.5.3.1.4 Inmunohistoquímica de fluorescencia ... *Pág. 82*

3.5.3.2 Histoquímica de lectinas ... *Pág. 83*

3.5.3.3 Tinción con Fluoro-Jade B ... *Pág. 84*

3.5.4 Obtención y procesamiento de imágenes ... *Pág. 85*

3.6 CUANTIFICACIÓN DE ÁREA INMUNORREACTIVA Y RECUENTO CELULAR *Pág. 85*

3.6.1 Cuantificación de área inmunorreactiva ... *Pág. 85*

3.6.1.1 Material histológico e inmunohistoquímica para cuantificación de área inmunorreactiva ... *Pág. 86*

3.6.1.2 Obtención de fotografías y procesamiento de imágenes ... *Pág. 87*

3.6.1.3 Procesamiento de los datos de cuantificación de área inmunorreactiva ... *Pág. 89*

3.6.2 Recuentos celulares ... *Pág. 90*

3.6.2.1 Material histológico e inmunohistoquímica para recuento celular ... *Pág. 90*

3.6.2.2 Obtención de fotografías y recuento celular ... *Pág. 91*

3.6.2.3 Cálculo del área ocupada por los plexos coroideos ... *Pág. 92*

3.6.2.4 Procesamiento de los datos de recuento celular ... *Pág. 92*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.7 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE INMUNODETECCIÓN *Pág. 92*

3.7.1 ELISA de captura contra el complejo terminal del complemento de rata ..... *Pág. 92*

3.7.1.1 Diseño y puesta a punto del ELISA contra el complejo terminal del complemento ..... *Pág. 92*

3.7.1.2 Detección del complejo terminal del complemento en suero y LCR de rata ..... *Pág. 93*

3.7.2 Cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico ..... *Pág. 95*

3.7.3 Inmunoprecipitación ..... *Pág. 96*

3.7.4 *Western blot* ..... *Pág. 97*

3.7.4.1 Preparación de las muestras para *Western blot* ..... *Pág. 97*

3.7.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) ..... *Pág. 98*

3.7.4.3 Electrotransferencia de proteínas desde gel a membrana de PVDF ..... *Pág. 99*

3.7.4.4 Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF ..... *Pág. 99*

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS *Pág. 100*

4. *RESULTADOS* ***Pág. 101***

4.1 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN RATAS INYECTADAS INTRACEREBROVENTRICULARMENTE CON NEURAMINIDASA *Pág. 103*

4.1.1 Inyección de neuraminidasa ..... *Pág. 103*

4.1.1.1 Actividad de la neuraminidasa *in vitro* e *in vivo* ..... *Pág. 103*

4.1.1.2 Descripción espacio-temporal del efecto provocado por la neuraminidasa ..... *Pág. 106*

4.1.2 Detección inmunohistoquímica y cuantificación de marcadores de inflamación ..... *Pág. 109*

4.1.2.1 Expresión de marcadores locales de inflamación ..... *Pág. 109*

4.1.2.1.1 Inmunohistoquímica con anti-ICAM1 ..... *Pág. 109*

4.1.2.1.2 Inmunohistoquímica con anti-IBA1 ..... *Pág. 111*

4.1.2.1.3 Inmunohistoquímica con anti-GFAP ..... *Pág. 113*

4.1.2.2 Cuantificación de células inmunocompetentes ..... *Pág. 114*

4.1.2.2.1 Inmunohistoquímica con anti-MPO ..... *Pág. 115*

4.1.2.2.2 Inmunohistoquímica con anti-IL1β y anti-CD163 ..... *Pág. 117*

4.1.2.2.3 Inmunohistoquímica con anti-CD3ε ..... *Pág. 121*

4.1.2.2.4 Inmunohistoquímica con anti-PAX5 ..... *Pág. 123*

4.1.2.3 Colocalización de marcadores de inflamación ..... *Pág. 125*

4.2 ANÁLISIS DE LA DEGENERACÍON EN LOS TRACTOS MIELÍNICOS DE RATAS INYECTADAS INTRACEREBROVENTRICULARMENTE CON NEURAMINIDASA *Pág. 129*

4.2.1 Descripción espacio-temporal de la degeneración en tractos mielínicos ..... *Pág. 129*

4.2.1.1 Estudio a microscopia óptica ..... *Pág. 129*

4.2.1.2 Estudio a microscopia electrónica ..... *Pág. 134*

4.2.2 Análisis inmunohistoquímico de la degeneración en tractos mielínicos ..... *Pág. 136*

4.2.2.1 Inmunohistoquímica con anti-MBP ..... *Pág. 136*

4.2.2.2 Inmunohistoquímica con anti-Olig2 ..... *Pág. 138*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.3 Análisis de muerte celular en los tractos mielínicos afectados ... *Pág. 139*

4.2.3.1 Marcaje con Fluoro-Jade B ... *Pág. 139*

4.2.3.2 Inmunohistoquímica con anti-CASP3 ... *Pág. 140*

4.3 IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LOS EVENTOS PROVOCADOS POR LA INYECCIÓN DE NEURAMINIDASA *Pág. 142*

4.3.1 Presencia de MAC sobre el epéndimo de ratas inyectadas con neuraminidasa ... *Pág. 142*

4.3.1.1 Detección inmunohistoquímica de C5b-9 en el epéndimo ... *Pág. 142*

4.3.1.2 Detección inmunohistoquímica de C9 en el epéndimo ... *Pág. 143*

4.3.2 Activación del sistema del complemento por neuraminidasa ... *Pág. 144*

4.3.2.1 Análisis de la actividad del complemento mediante ensayos hemolíticos ... *Pág. 145*

4.3.2.1.1 Ensayo hemolítico de difusión radial en gel ... *Pág. 145*

4.3.2.1.2 Ensayo hemolítico mediante glóbulos rojos en suspensión ... *Pág. 148*

4.3.2.2 Detección de la formación de TCC mediante ELISA ... *Pág. 151*

4.3.2.3 Detección mediante *Western blot* de fragmentos de C3 activado *in vitro* ... *Pág. 152*

4.3.3 Análisis de las posibles vías de activación del complemento ... *Pág. 154*

4.3.3.1 Detección de anticuerpos y C1q en la superficie ependimaria ... *Pág. 154*

4.3.3.2 Detección de lectina de unión a manosa (MBL) en la superficie ependimaria ... *Pág. 155*

4.3.4 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo en ausencia de proteínas del complemento ... *Pág. 156*

4.3.4.1 Ensayos *in vitro* con explantes de pared ventricular ... *Pág. 156*

4.3.4.2 Ensayos *in vitro* con cultivos primarios de células ependimarias aisladas ... *Pág. 159*

4.3.4.3 Inyección ICV de neuraminidasa en ratas con inhibición sistémica de C5 ... *Pág. 160*

4.3.4.3.1 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas tratadas con inhibidor de C5 ... *Pág. 160*

4.3.4.3.2 Detección inmunohistoquímica de MAC en el epéndimo de ratas tratadas con inhibidor de C5 ... *Pág. 162*

4.3.4.4 Inyección ICV de neuraminidasa en ratas $C6^{-/-}$ ... *Pág. 162*

4.3.4.4.1 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas $C6^{-/-}$ ... *Pág. 162*

4.3.4.4.2 Detección inmunohistoquímica de MAC en el epéndimo de ratas $C6^{-/-}$ ... *Pág. 163*

4.3.5 Implicación del sistema del complemento en la inflamación ... *Pág. 163*

4.3.5.1 Análisis de la inflamación tras la inyección ICV de C5a en ratas ... *Pág. 163*

4.3.5.2 Análisis de la inflamación en ratas con inhibición sistémica de C5 y ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa ... *Pág. 163*

4.3.6 Implicación del sistema del complemento en la degeneración de tractos mielínicos ... *Pág. 165*

4.3.6.1 Detección de MAC en los tractos degenerados ... *Pág. 165*

4.3.6.2 Análisis de la degeneración en tractos mielínicos tras la inyección ICV de anafilotoxina C5a en ratas ... *Pág. 165*

4.3.6.3 Análisis de la degeneración de tractos mielínicos en ratas con inhibición sistémica de C5 y ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa ... *Pág. 166*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. *DISCUSIÓN* ***Pág. 169***

5.1 LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE NEURAMINIDASA PROVOCA DAÑO EPENDIMARIO, INFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DE TRACTOS MIELÍNICOS *Pág. 171*

5.1.1 Desialización de la superficie ependimaria y penetración de la neuraminidasa en el parénquima periventricular ..... *Pág. 171*

5.1.2 Muerte y desprendimiento de algunas células del epitelio ependimario ..... *Pág. 172*

5.1.3 Inflamación ventricular y meníngea posterior a la muerte ependimaria ..... *Pág. 175*

5.1.4 Degeneración de ciertos tractos mielínicos tras la inyección de neuraminidasa ..... *Pág. 185*

5.2 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN EL DAÑO EPENDIMARIO, INFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN PROCOVADOS POR LA NEURAMINIDASA *Pág. 189*

5.2.1 La neuraminidasa provoca la activación de la vía alternativa del complemento y la deposición de complejos de ataque a la membrana sobre el epitelio ependimario ..... *Pág. 189*

5.2.2 Repercusión de la inhibición total o parcial del sistema del complemento *in vivo* e *in vitro* sobre la capacidad lesiva de la neuraminidasa ..... *Pág. 192*

5.2.3 Implicación del sistema del complemento en el comienzo de la reacción inflamatoria .... *Pág. 194*

5.2.4 Implicación del sistema del complemento en la degeneración de tractos mielínicos ..... *Pág. 195*

6. *CONCLUSIONES / CONCLUSIONS* ***Pág. 197***

7. *BIBLIOGRAFÍA* ***Pág. 201***

8. *APÉNDICES* ***Pág. xvii***

8.1 APÉNDICE 1: SOLUCIONES, TAMPONES Y TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS *Pág. xix*

8.2 APÉNDICE 2: RELACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES *Pág. xxxi*

8.3 APÉNDICE 3: DESARROLLO DEL ELISA DE CAPTURA *Pág. xxxiii*

8.4 APÉNDICE 4: RESUMEN EN INGLÉS / ABSTRACT IN ENGLISH *Pág. xxxv*

9. *ANEXOS* ***Pág. xlvii***

9.1 ANEXO 1: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN (GRONDONA Y COL. 2013) *Pág. xlix*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Fig. I-01. Vía de activación clásica del sistema del complemento ..... Pág. 11
Fig. I-02. Vía de activación alternativa del sistema del complemento ..... Pág. 12
Fig. I-03. Activación, desactivación y degradación del factor C3 del complemento ..... Pág. 13
Fig. I-04. Vía de activación de las lectinas del sistema del complemento ..... Pág. 13
Fig. I-05. Vía lítica o terminal del sistema del complemento ..... Pág. 14
Fig. I-06. Acción enzimática de la neuraminidasa ..... Pág. 35
Fig. I-07. Ventrículos laterales y epéndimo de rata ..... Pág. 38
Fig. I-08. Modelo de destrucción de epitelio ependimario mediante inyección ICV de neuraminidasa ..... Pág. 44

Material y metodología

Fig. M-01. Inyección estereotáxica intracerebroventricular ..... Pág. 56
Fig. M-02. Esquema temporal del protocolo de inhibición sistémica y perfusión vascular de los animales tratados ..... Pág. 58
Fig. M-03. Colocación de la aguja de perfusión en el corazón de una rata ..... Pág. 59
Fig. M-04. Procedimiento de disección y obtención de explantes de pared ventricular ..... Pág. 61
Fig. M-05. Protocolo para la obtención de células ependimarias a partir de explantes de pared del ventrículo lateral ..... Pág. 62
Fig. M-06. Obtención de glóbulos rojos no tratados, desializados y opsonizados ..... Pág. 65
Fig. M-07. Esquema de la colocación de una rata en un aparato estereotáxico preparado para la extracción de LCR ..... Pág. 66
Fig. M-08. Esquema del ensayo hemolítico de actividad remanente del complemento ..... Pág. 67
Fig. M-09. Esquema del ensayo hemolítico en placa de difusión radial ..... Pág. 69
Fig. M-10. Esquema del ensayo hemolítico con glóbulos rojos en suspensión ..... Pág. 71
Fig. M-11. Esquema del complejo antígeno-anticuerpos-ABC en inmunohistoquímica ..... Pág. 79
Fig. M-12. Esquema de la amplificación con tiramina biotinilada en inmunohistoquímica ..... Pág. 82
Fig. M-13. Esquema de la respuesta inflamatoria celular ..... Pág. 86
Fig. M-14. Regiones seleccionadas para la cuantificación de área inmunorreactiva ..... Pág. 88
Fig. M-15. Proceso de cuantificación de área inmunorreactiva ..... Pág. 89
Fig. M-16. Regiones estudiadas mediante recuento celular ..... Pág. 91
Fig. M-17. Esquema del ELISA de captura desarrollado contra el TCC presente en suero de rata ..... Pág. 93
Fig. M-18. Validación del ELISA de captura contra el TCC presente en suero de rata ..... Pág. 93
Fig. M-19. Inmunoprecipitación de C1q y MBL ..... Pág. 97

Resultados

Fig. R-01. Control de la actividad de la neuraminidasa sobre cortes de tejido ..... Pág. 103
Fig. R-02. Actividad de la neuraminidasa sobre el epéndimo in vivo ..... Pág. 104
Fig. R-03. Penetración de la neuraminidasa en el parénquima nervioso ..... Pág. 105
Fig. R-04. Visión general de la región inyectada ..... Pág. 106
Fig. R-05. Efecto de la neuraminidasa sobre la pared ventricular I ..... Pág. 107
Fig. R-06. Efecto de la neuraminidasa sobre la pared ventricular II ..... Pág. 108
Fig. R-07. Marcaje inmunohistoquímico con anti-ICAM1 ..... Pág. 110

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fig. R-08. *Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-ICAM1 a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa* ..... *Pág. 111*

Fig. R-09. *Marcaje inmunohistoquímico con anti-IBA1* ..... *Pág. 112*

Fig. R-10. *Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-IBA1 a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa* ..... *Pág. 112*

Fig. R-11. *Marcaje inmunohistoquímico con anti-GFAP* ..... *Pág. 113*

Fig. R-12. *Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-GFAP a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa* ..... *Pág. 114*

Fig. R-13. *Recuento celular relativo de poblaciones inmunocompetentes infiltradas* ..... *Pág. 115*

Fig. R-14. *Tinción inmunohistoquímica con anti-MPO* ..... *Pág. 116*

Fig. R-15. *Recuento de células MPO+* ..... *Pág. 117*

Fig. R-16. *Tinción inmunohistoquímica con anti-IL1β* ..... *Pág. 118*

Fig. R-17. *Recuento de células IL1β+* ..... *Pág. 119*

Fig. R-18. *Tinción inmunohistoquímica con anti-CD163* ..... *Pág. 120*

Fig. R-19. *Recuento de células CD163+* ..... *Pág. 121*

Fig. R-20. *Tinción inmunohistoquímica con anti-CD3ε* ..... *Pág. 122*

Fig. R-21. *Recuento de células CD3ε+* ..... *Pág. 123*

Fig. R-22. *Tinción inmunohistoquímica con anti-PAX5* ..... *Pág. 124*

Fig. R-23. *Recuento de células PAX5+* ..... *Pág. 124*

Fig. R-24. *Doble inmunofluorescencia con marcadores de fagocitos I* ..... *Pág. 125*

Fig. R-25. *Doble inmunofluorescencia con marcadores de fagocitos II* ..... *Pág. 126*

Fig. R-26. *Doble inmunofluorescencia con marcadores de inflamación* ..... *Pág. 127*

Fig. R-27. *Doble inmunofluorescencia utilizando ICAM1 y marcadores de inflamación* ..... *Pág. 128*

Fig. R-28. *Doble inmunofluorescencia con marcadores de linfocitos T* ..... *Pág. 129*

Fig. R-29. *Tractos mielínicos afectados tras la inyección ICV de neuraminidasa* ..... *Pág. 130*

Fig. R-30. *Degeneración de tractos mielínicos en corte semifino* ..... *Pág. 131*

Fig. R-31. *Evolución temporal de la degeneración en los tractos mielínicos* ..... *Pág. 132*

Fig. R-32. *Recuperación de zonas degeneradas y gliosis subependimaria* ..... *Pág. 133*

Fig. R-33. *Degeneración de tractos mielínicos a microscopía electrónica de transmisión I* ..... *Pág. 134*

Fig. R-34. *Degeneración de tractos mielínicos a microscopía electrónica de transmisión II* ..... *Pág. 135*

Fig. R-35. *Tinción inmunohistoquímica con anti-MBP* ..... *Pág. 137*

Fig. R-36. *Variación del área MBP+ en los tractos mielínicos afectados* ..... *Pág. 137*

Fig. R-37. *Tinción inmunohistoquímica con anti-Olig2* ..... *Pág. 138*

Fig. R-38. *Variación del número de células Olig2+ respecto al área total de recuento* ..... *Pág. 139*

Fig. R-39. *Detección de degeneración neuronal mediante Fluoro-Jade B* ..... *Pág. 140*

Fig. R-40. *Detección de procesos apoptóticos mediante anti-CASP3* ..... *Pág. 141*

Fig. R-41. *Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas inyectadas con neuraminidasa* ..... *Pág. 143*

Fig. R-42. *Detección de C9 sobre el epitelio ependimario de ratas inyectadas con neuraminidasa* ..... *Pág. 144*

Fig. R-43. *Placa de hemólisis por difusión radial tras el periodo de lisis* ..... *Pág. 145*

Fig. R-44. *Recta patrón para actividad hemolítica vs. diámetro de halo* ..... *Pág. 146*

Fig. R-45. *Actividad hemolítica de sueros y LCR tratados o no con neuraminidasa* ..... *Pág. 149*

Fig. R-46. *Hemólisis provocada por neuraminidasa* ..... *Pág. 150*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fig. R-47. Efecto de la concentración de neuraminidasa sobre las células ependimarias ..... Pág. 150

Fig. R-48. Cantidad relativa de TCC en suero tratado con neuraminidasa ..... Pág. 151

Fig. R-49. Cantidad relativa de TCC en LCR tratado con neuraminidasa ..... Pág. 152

Fig. R-50. Detección de fragmentos derivados de la activación, desactivación y degradación del factor C3 por tratamiento in vitro con neuraminidasa ..... Pág. 153

Fig. R-51. Detección de inmunoglobulinas en el epéndimo y en el parénquima nervioso de ratas inyectadas con neuraminidasa ..... Pág. 155

Fig. R-52. Detección de C1q mediante Western blot en extractos de epitelio ependimario ..... Pág. 155

Fig. R-53. Detección de MBL mediante Western blot en extractos de epitelio ependimario ..... Pág. 156

Fig. R-54. Visualización del movimiento ciliar ependimario bajo el microscopio invertido ..... Pág. 157

Fig. R-55. Explantes de pared ventricular tratados con neuraminidasa y complemento ..... Pág. 158

Fig. R-56. Técnica de exclusión del azul tripano aplicada a células ependimarias aisladas ..... Pág. 159

Fig. R-57. Viabilidad de las células ependimarias en distintos medios ..... Pág. 160

Fig. R-58. Efecto de la inyección ICV del inhibidor de C5 ..... Pág. 161

Fig. R-59. Efecto de la inyección ICV de neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas con inhibición sistémica de C5 ..... Pág. 161

Fig. R-60. Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas tratadas para la inhibición sistémica de C5 ..... Pág. 162

Fig. R-61. Efecto de la inyección ICV de neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas $C6^{-/-}$ ..... Pág. 162

Fig. R-62. Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas $C6^{-/-}$ ..... Pág. 163

Fig. R-63. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de C5a en ratas ..... Pág. 164

Fig. R-64. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de neuraminidasa sobre ratas con inhibición sistémica de C5 ..... Pág. 164

Fig. R-65. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de neuraminidasa en ratas $C6^{-/-}$ ..... Pág. 165

Fig. R-66. Inmunohistoquímica con anti-C5b-9 y anti-IgG de rata en tractos mielínicos afectados por la degeneración ..... Pág. 166

Fig. R-67. Efecto de la inyección ICV de C5a sobre los tractos mielínicos ..... Pág. 166

Fig. R-68. Degeneración de tractos mielínicos en ratas con inhibición sistémica de C5 inyectadas con neuraminidasa ..... Pág. 167

Fig. R-69. Degeneración de tractos mielínicos en ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa ..... Pág. 167

Discusión

Fig. D-01. Efectos de la inyección ICV de NA en el ventrículo de rata ..... Pág. 183

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla I-01. Proteínas que componen el sistema del complemento ..... Pág. 08

Tabla I-02. Síntesis y expresión de proteínas del complemento en el sistema nervioso central humano ..... Pág. 09

Tabla I-03. Factores reguladores del sistema del complemento y su principal función ..... Pág. 10

Tabla I-04. Receptores del sistema del complemento y su principal localización tisular ..... Pág. 10

Material y metodología

Tabla M-01. Diseño de la placa hemolítica de difusión radial ..... Pág. 70

Tabla M-02. Condiciones experimentales del ensayo de hemólisis sobre glóbulos rojos en suspensión ..... Pág. 72

Tabla M-03. Situaciones experimentales del ensayo con explantes de pared ventricular ..... Pág. 73

Tabla M-04. Situaciones experimentales del ensayo con células ependimarias aisladas ..... Pág. 75

Tabla M-05. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica ..... Pág. 80

Tabla M-06. Anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados en inmunohistoquímica ..... Pág. 83

Tabla M-07. Relación de lectinas utilizadas en tinción histoquímica ..... Pág. 83

Tabla M-08. Niveles Bregma antero-posterior aproximados de los cortes seleccionados para cada marcador inmunohistoquímico ..... Pág. 87

Tabla M-09. Límites de binarización empleados en la cuantificación de área inmunorreactiva ..... Pág. 88

Tabla M-10. Situaciones experimentales analizadas mediante ELISA de captura para determinar la formación de TCC ..... Pág. 94

Tabla M-11. Situaciones experimentales empleadas para la detección de fragmentos derivados de C3 mediante Western blot ..... Pág. 98

Tabla M-12. Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados en Western blot ..... Pág. 100

Resultados

Tabla R-01. Resultados del ensayo hemolítico en placa de difusión radial ..... Pág. 147

Tabla R-02. Registro del movimiento ciliar de explantes ..... Pág. 157

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

Cualquier número.

ABC Complejo avidina-biotina, del inglés *Avinin-Biotin complex.*

αMEM Medio esencial mínimo alfa, del inglés *Minimum Essential Medium alpha*.

ANOVA Análisis de varianza, del inglés *Analysis of variance*.

AP Antero-posterior.

BCA Ácido bicinconínico, del inglés *Bicinchoninic acid*.

BCR Receptor de linfocito B, del inglés *B cell receptor.*

BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*.

BHE Barrera hematoencefálica.

biot. Biotinilado.

BSA Albumina de suero bobino, del inglés *Bovine serum albumin*.

C# Factor # del complemento.

C1-inh Inhibidor del factor 1 del complemento.

C1q Factor del complemento 1q.

C1qR Receptor del factor 1q del complemento.

C3aR Receptor de anafilotoxina C3a.

C4b-BP Proteína de unión al factor 4b del complemento, del inglés *Complement factor 4b binding protein*.

C5aR Receptor de anafilotoxina C5a.

C5-inh Inhibidor del factor 5 del complemento.

CASP3 Caspasa 3.

CCL# Ligando # de la familia de quimiocinas C-C.

CCR# Receptor # de la familia de quimiocinas C-C.

CD# Cúmulo de diferenciación número #, del inglés *Cluster of differentiation number #*.

CR# Receptor del complemento número #, del inglés *Complement receptor #*.

CRegs Reguladores del complemento, del inglés *Complement regulators*.

CSL Lectina cerebelar soluble, del inglés *Cerebellar soluble lectin*.

CX3CL# Ligando # de la familia de quimiocinas C-X3-C.

CX3CR# Receptor # de la familia de quimiocinas C-X3-C.

CXCL# Ligando # de la familia de quimiocinas C-X-C.

CXCR# Receptor # de la familia de quimiocinas C-X-C.

DAB Diaminobenzidina.

DAF Factor acelerador de la degradación, del inglés *Decay-accelerating factor*.

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbecco, del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*.

DNasa I Desoxirribonucleasa I.

DV Dorso-ventral.

EAE Encefalomielitis autoinmune experimental.

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*.

ELISA Ensayo de inmuno-absorbencia ligado a enzima, del inglés *Enzime linked inmuno-sorbent assay*.

Endo-F3 Endoglucosidasa F3.

FAS Receptor de muerte en superficie celular Fas, del inglés *Fas cell surface death receptor*.

FASL Ligando de Fas, del inglés *Fas ligand*.

Fc Fragmento cristalizable (de un anticuerpo), del inglés *Fragment crystallizable*.

g Aceleración de la gravedad.

GFAP Proteína glial fibrilar ácida, del inglés *Glial fibrillary acidic protein*.

GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*.

GR Glóbulos rojos no tratados.

GR-DS Glóbulos rojos desializados.

GR-OP Glóbulos rojos opsonizados.

H1N1 Hemaglutinina 1 - neuraminidasa 1 (cepa gripal).

H_2Od Agua destilada.

HBSS Solución salina tamponada de Hank, del inglés *Hank's balanced salt solution*.

HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico, del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane-sulfonic acid*.

HDS Diferencias honestamente significativas, del inglés *Honestly significant differences*.

HRF/C8bp Factor de restricción homóloga / proteína de unión al factor 8 del complemento, del inglés *Homologous restriction factor / complement factor 8 binding protein*.

IBA1 Molécula adaptadora de unión a calcio iónico, del inglés *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*.

iC# Factor # inactivo del complemento.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ICAM1 Molécula de adhesión intercelular 1, del inglés *Intercellular adhesion molecule 1*.

ICV Intracerebroventricular.

IFNα Interferón alfa.

IFNγ Interferón gamma.

Ig Inmunoglobulina.

IHQ Inmunohistoquímica.

IL# Interleucina #.

IP Intraperitoneal.

IV Intravenosa.

LCR Líquido cefalorraquídeo.

LFA Lectina de *Limax flavus*, del inglés *Limax flavus agglutinin*.

LPS Lipopolisacárido.

LTα Linfotoxina alfa.

M1 Macrófago activado de tipo 1 (activación clásica).

M2 Macrófago activado de tipo 2 (activación alternativa).

MAC Complejo de ataque a la membrana, del inglés *Membrane attack complex*.

MAC-IP Proteína inhibidora del complejo de ataque a la membrana, del inglés *Membrane attack complex inhibitory protein*.

MAG Glucoproteína asociada a mielina, del inglés *Myelin-associated glycoprotein*.

MASP Serin-proteasa asociada a MBL, del inglés *MBL-associated serine protease*.

MBL Lectina de unión a manosa, del inglés *ManŸžăŜ-binding lectin*.

MBP Proteína básica de la mielina, del inglés *Myelin basic protein*.

MC Medio de cultivo.

MCP Proteína cofactor de membrana, del inglés *Membrane cofactor protein*.

M-CSF Factor estimulante de colonias de macrófagos, del inglés *Macrophage colony-stimulating factor*.

MHC Complejo principal de histocompatibilidad, del inglés *Major histocompatibility complex*.

ML Medio-lateral.

MPO Mieloperoxidasa.

NA Neuraminidasa.

NCAM Molécula de adhesión celular neural, del inglés *Neural cell adhesion molecule*.

NGF Factor de crecimiento nervioso, del inglés *Nerve growth factor*.

NK Asesino natural, del inglés *Natural killer*.

NLR Receptor tipo NOD, del inglés *NOD-like receptor*.

NMDA Ácido N-metil-D-aspártico, del inglés *N-methyl-D-aspartate*.

NTF# Neurotrofina número #.

OAP Omisión de anticuerpo primario.

Olig2 Factor de transcripción 2 de oligodendrocitos.

P Valor p.

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida, del inglés *Polyacrylamide gel electrophoresis*.

PAX5 Factor de transcripción PAX5, del inglés *Paired box protein 5*.

PB Tampón fosfato, del inglés *Phosphate buffer*.

PBS Tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate buffered saline*.

PBST Tampón fosfato salino con Tween® 20, del inglés *Phosphate buffered saline with Tween® 20*.

PBT PB + BSA + Tritón X-100.

PFA Paraformaldehído.

PNA Lectina de cacahuete, del inglés *Pea-nut agglutinin*.

PVDF Polifluoruro de vinilideno, del inglés *Polyvinylidene difluoride*.

ref. Referencia.

RGB Rojo, verde y azul, del inglés *Red green blue*.

RIPA Ensayo de radio-inmuno-precipitación, del inglés *Radio immunoprecipitation assay*.

SDS Dodecil sulfato sódico, del inglés *Sodium dodecyl sulfate*.

SEM Error estándar de la media, del inglés *Standard error of the mean*.

Sh Suero humano.

SNA Lectina de *Sambucus nigra*, del inglés *Sambucus nigra agglutinin*.

SNC Sistema nervioso central.

Sr Suero de rata.

TC Tampón para complemento.

TCC Complejo terminal del complemento, del inglés *Terminal complement complex*.

TCR Receptor de linfocito T, del inglés *T cell receptor*.

Tc Linfocito T citotóxico, del inglés *T cytotoxic cell*.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TGFβ Factor de crecimiento transformante beta, del inglés *Transforming growth factor beta*.

Th# Linfocito T colaborador tipo #, del inglés *T cell helper type #*.

THC Complemento hemolítico total, del inglés *Total haemolytic complement*.

TLR Receptor tipo Toll, del inglés *Toll-like receptor*.

TNF Factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumor necrosis factor*.

Tris Tris(hidroximetil)aminometano.

TSA Amplificación de señal por tiramida, del inglés *Tyramide signal amplification*.

TUNEL Marcado del extremo libre con dUTP mediante desoxi-transferasa terminal, del inglés *TDT-mediated x-dUTP nick end labeling*.

VCAM Molécula de adhesión celular vascular, del inglés *Vascular cell adhesion molecule*.

Vim Vimentina.

vs. *Versus*.

ZO-1 Proteína 1 de *zonula occludens*.

ZSV Zona subventricular.

Zym Zimosan, del inglés *Zymosan*.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

1. INTRODUCCIÓN

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

1.1 RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EL SISTEMA INMUNE

El sistema nervioso y el inmune son dos de los sistemas más complejos del organismo. Esto es debido a que ambos están formados por numerosos tipos celulares y por una gran diversidad de moléculas, lo que da lugar a la generación de múltiples relaciones, tanto físicas como químicas, entre ellas. No es de extrañar que la neuroinmunología sea un campo de estudio con un desarrollo relativamente reciente, pues era necesaria la consolidación previa de una serie de conocimientos sobre ambos sistemas que sirvieran de base para el estudio de la relación entre ellos. Actualmente, son muchos los trabajos que intentan esclarecer la relación entre el sistema nervioso y el inmune.

El sistema nervioso central (SNC) ha sido considerado desde antiguo como un sistema especial desde el punto de vista inmunológico. Esto ha sido así debido fundamentalmente a su aislamiento y su permeabilidad selectiva para el intercambio de células y sustancias con el sistema circulatorio, principal seno y vía de difusión del sistema inmune. Sin embargo, el auge de los estudios en el campo de la neuroinmunología en las últimas décadas ha mostrado que una amplia comunicación bidireccional se produce entre el sistema inmune y el SNC.

Tradicionalmente, el estudio inmunológico en el seno del SNC se ha centrado en las funciones inmunes de las células gliales. El descubrimiento de la microglía a finales del siglo XIX por parte de Víctor Babeş (Babeş, 1892) y su descripción más detallada, incluyendo la función fagocítica, por parte de Pío del Río Hortega (Del Rio-Hortega, 1932) a principios del siglo XX, supuso el inicio de esta corriente investigadora que se desarrolló durante el resto del siglo.

Las relaciones entre las células neuronales y el sistema inmune fueron menos estudiadas en aquellos años. Sin embargo, hallazgos posteriores indicaron que las neuronas del SNC participan activamente en la regulación inmune mediante la interacción con células gliales y linfocitos infiltrados (Tian y col., 2009).

Las evidencias que describen las influencias mutuas entre sistema inmune y SNC son cada vez más abundantes en la literatura. Los altos niveles de interleucina 1 (IL1), IL2, y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, del inglés, *tumor necrosis factor*) registrados en el SNC, se han asociado con el desarrollo de epilepsia y episodios convulsivos (Orozco y col., 2013). Incluso se han descrito evidencias de que las citocinas y quimiocinas puede afectar a los procesos cognitivos y emocionales a través del sistema nervioso, como ha sido observado en el trastorno depresivo mayor (Capuron y col., 2002; Duman y col., 1997). Estas interacciones ilustran la importancia de la estrecha, aunque controlada, relación entre sistema inmune y SNC.

1.1.1 Características especiales del sistema nervioso central respecto al sistema inmune

Desde principios del siglo XX, el estudio del SNC dejó patente ciertas características especiales desde el punto de vista inmunológico. Durante décadas se asumió que el SNC y la retina disfrutaban de

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

un **privilegio inmunitario**. Esto se concluyó fundamentalmente a partir de dos hechos: 1) la inyección no traumática de un inmunógeno en el parénquima del SNC no provocaba la respuesta inmunitaria adaptativa esperada en los tejidos periféricos expuestos posteriormente a dicho inmunógeno; y 2) la inmunización periférica con el mismo inmunógeno sí conducía, sin embargo, a una rápida respuesta inmune adaptativa tras su inoculación en el SNC (Ransohoff y col., 2012). Esta característica del SNC fue atribuida tradicionalmente a su separación del ambiente hemal mediante barreras. Sin embargo, pronto se advirtió que este aislamiento no era absoluto.

Si bien el aislamiento inmunológico del SNC pudieran tener un obvio propósito de protección, los perjuicios que conlleva para la capacidad defensiva del tejido neural, como el retraso en la respuesta inmune (Galea y col., 2007), siguen siendo actual tema de debate. En una revisión de 2012 sobre la inmunología innata en el SNC, Ransohoff plantea dos posibilidades clave para explicar por qué este sistema resulta ser un entorno inmunológico especial: 1) por un lado, las reacciones inflamatorias en el parénquima nervioso pueden dañar las delicadas células posmitóticas que no se autoregeneran, tales como neuronas y oligodendrocitos, lo que sugiere que la falta de la respuesta inmune adaptativa podría conferir una ventaja de supervivencia a dichas células; y 2) la entrada de patógenos en el SNC siempre implica su tránsito a través de un tejido periférico del organismo, el cual iniciará una respuesta inmune en los ganglios linfáticos o el bazo. Por lo tanto, una vez aislado del medio externo, sería redundante dotar el SNC con la capacidad de generar respuestas inmunes adaptativas paralelas.

La presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la microglía y el sistema ventricular, combinado con la ausencia de un sistema linfático obvio, los bajos niveles constitutivos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) de clase I y II, y el limitado número de células presentadoras de antígeno profesionales en condiciones normales, confieren al SNC su carácter especial desde el punto de vista inmunológico (Bechmann y col., 2007; Galea y col., 2007). A continuación analizaremos brevemente estos aspectos.

1.1.1.1 La barrera hematoencefálica

La primera evidencia experimental de una barrera de separación hematoencefálica fue descrita por Paul Ehrlich, quien observó que el azul tripano inyectado en el sistema circulatorio conseguía teñir todos los órganos del cuerpo excepto el cerebro y la médula espinal (Ehrlich, 1885). Experimentos posteriores de Edwin Goldmann mostraron que la inyección del colorante directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) conseguía teñir todos los tipos celulares del cerebro (Goldmann, 1913), lo que sugería la existencia de una barrera para el tinte entre el SNC y la circulación periférica, y no una baja afinidad del tejido nervioso por el azul tripano, como Ehrlich postuló inicialmente en sus trabajos (Ehrlich, 1904). Fue Lewandowsky en 1900 quien acuñara el término *barrera hematoencefálica* que utilizamos actualmente (Lewandowsky, 1900).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La BHE limita la entrada de células, moléculas e iones desde la sangre al SNC. Esta limitación afecta igualmente a células y moléculas del sistema inmune, reduciendo, por ejemplo, la difusión de anticuerpos hacia el parénquima en más de un 98% (Wilson y col., 2010). La base anatómica de esta barrera se encuentra en las uniones estrechas que se establecen entre las células endoteliales y en su baja actividad pinocítica. Las células del propio SNC contribuyen a la construcción de esta barrera, fundamentalmente a través de los astrocitos, cuyas prolongaciones, llamadas pies astrocitarios, conforman un tapiz que aísla parcialmente los vasos sanguíneos (pericitos y lámina basal incluidos) del ambiente neural (Alvarez y col., 2011; Neuwelt y col., 2008; Neuwelt y col., 2011). Esta barrera es crucial, pues proporciona un entorno adecuado para permitir la correcta función nerviosa, así como proteger al SNC de lesiones y e infecciones.

Existen ciertas áreas del SNC situadas fuera de la BHE y que, por tanto, están inmersas en un ambiente hemal. Son los llamados órganos circunventriculares neurohemales. Ejemplos son: los plexos coroideos, la eminencia media, la neurohipófisis, la glándula pineal, el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lámina terminal y el área postrema. En estas áreas las uniones estrechas que conforman la barrera están desplazadas de los vasos sanguíneos a las células gliales (astrocitos, tanicitos o células ependimarias). Estas son regiones constantemente vigiladas por una población de células macrofágicas cuya misión es impedir el libre tránsito de sustancias y células entre los compartimentos (Krisch y col., 1978). Por tanto, existe una separación nítida entre los órganos circunventriculares neurohemales y el resto del tejido nervioso.

Las barreras hematoencefálica y sangre-LCR fueron las responsables de la aparición del concepto de privilegio inmune del SNC, debido a que producían una separación de las respuestas inmunes cerebral y sistémica (Engelhardt y col., 2009; Wilson y col., 2010). Estas barreras provocan una penetración muy limitada de anticuerpos, mediadores inflamatorios y células inmunes desde la circulación sistémica hacia el parénquima nervioso. Tanto es así, que las posibles vías de penetración de los leucocitos hacia el SNC tienen localizaciones muy concretas (Alvarez y col., 2007b; Muldoon y col., 2013; Ransohoff y col., 2003), incluyendo: 1) de la sangre al espacio subaracnoideo a través de los vasos leptomeníngeos, 2) de la sangre al espacio perivascular del parénquima a través de la BHE, 3) de la sangre al LCR a través de los plexos coroideos, y 4) de la sangre al LCR a través de los espacios meníngeos y el epitelio ependimario ventricular.

En condiciones normales, el tráfico de leucocitos es relativamente bajo y las células inmunes raramente entran en el parénquima (Engelhardt y col., 2011; Wilson y col., 2010). Sin embargo, este tráfico puede aumentar considerablemente en estados patológicos, contribuyendo a la rápida inflamación del tejido nervioso (Engelhardt y col., 2011).

La entrada de células eferentes de la respuesta inmune sistémica se ve, no obstante, obstaculizada incluso en casos de infección, ya que los linfocitos tienen que ser activados antes de que puedan cruzar la BHE (Prendergast y col., 1998; Wekerle y col., 1987). Además, una vez en el parénquima nervioso, el medio sigue siendo inherentemente hostil a los linfocitos activados. Estos

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

expresan el receptor FAS (del inglés, *Fas cell surface death receptor*) en su superficie, cuya interacción con el ligando de FAS (FASL, del inglés *Fas ligand*), expresado en todas las células en el SNC, da como resultado la inducción de su muerte por apoptosis (Bechmann y col., 1999; Flügel y col., 2000).

1.1.1.2 La célula microglial

Otro aspecto inmunológico único del SNC es el origen y el significado de la célula microglial. Esta población celular constituye hasta un 12% de la masa del cerebro (Block y col., 2005). Son una línea celular mieloide que se distingue de los macrófagos periféricos por su menor expresión de CD45 (Aloisi, 2001). Derivan de las células hematopoyéticas embrionarias que viajan y se asientan en el parénquima nervioso fetal antes del desarrollo definitivo de la vascularización y la hematopoyesis del embrión (Ginhoux y col., 2010; Ritter y col., 2006). Una vez establecida la BHE, la microglía se mantiene gracias a progenitores residentes en el SNC independientes de las células sanguíneas (Ajami y col., 2007) y a su propio potencial proliferativo tras su activación (Graeber y col., 2011).

Las células de la microglía suponen el principal representante de la función inmune en el SNC (Ransohoff y col., 2010). Llevan a cabo el papel de macrófagos residentes, evitando en gran medida la necesidad de extravasación celular a través de la BHE y contribuyendo a la respuesta inmune a través de la secreción de múltiples factores (Ransohoff y col., 2012). Analizaremos más profundamente sus funciones en el apartado dedicado a la neuroinflamación (epígrafe 1.2.2.1).

1.1.1.3 El líquido cefalorraquídeo

El LCR representa otra de las singularidades del SNC. Este convierte al cerebro en el único órgano corporal con una circulación fluida interna "aislada" del torrente sanguíneo. En circunstancias normales, este fluido es esencialmente acelular, y las bajas cantidades de inmunoglobulinas (Ig) presentes en él proceden de la circulación sistémica a través de los tejidos circundantes por difusión (Neuwelt y col., 1978). Sin embargo, en situaciones patológicas (es decir, ante infecciones, lesiones, enfermedades desmielinizantes e incluso tumores) se induce la invasión del LCR por multitud de células inmunocompetentes, la mayoría procedentes del torrente sanguíneo, así como la producción de Igs que inundan el LCR, siendo este utilizado como canal de comunicación durante la reacción inflamatoria. Son cada vez más los trabajos que sugieren un papel crucial del LCR en el desarrollo de las respuestas inmunes locales del SNC (Muldoon y col., 2013). Además de esto, y como veremos en el siguiente epígrafe, el LCR asume en gran medida las funciones del sistema linfático que el cerebro no posee.

1.1.1.4 El sistema linfoide y la presentación de antígeno en el sistema nervioso central

La ausencia de vasos linfáticos convencionales en el parénquima del SNC (Weller y col., 2010) que faciliten el drenaje de antígenos y células inmunes a los ganglios linfáticos periféricos contibuye al

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

retraso de la respuesta inmune en el tejido nervioso. A esto se suman otras dos circunstancias: 1) la escasez de células dendríticas u otra población celular residente en el parénquima del SNC que se ajuste a la definición operativa de célula dendrítica (esto es, absorción y procesamiento de antígenos, migración a los nódulos linfáticos y presentación de antígeno a los linfocitos T ingenuos) (Muldoon y col., 2013; Ransohoff y col., 2012), y 2) los bajos niveles del MHC expresados en condiciones fisiológicas por las neuronas (Neumann y col., 1995). Ambos hechos limitan la capacidad del SNC para el procesamiento y presentación de antígenos, y retrasan la respuesta inmune en dicho sistema.

Sin embargo, estudios fisiológicos más recientes revelan discrepancias con algunas de estas ideas. Se ha comprobado que a pesar de no existir un sistema de conductos para el drenaje linfático, este se lleva a cabo de manera significativa desde el cerebro a los ganglios linfáticos cervicales (Weller y col., 1996). Por un lado, mediante el LCR que se evacúa a través de la lámina cribosa y la mucosa nasal a los ganglios linfáticos del cuello (estudiado en ratas y ovejas, y en menor medida, en los seres humanos (Weller y col., 2009)). Se ha descrito la influencia de este flujo de LCR en la inmunología del SNC (Kiwic y col., 1998). Por otro lado, la que parece una vía más importante en los seres humanos es el drenaje de fluido intersticial y solutos del parénquima cerebral a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos. Trazadores moleculares inyectados en la materia gris, discurren fuera del cerebro a lo largo de la membrana basal de las paredes de los capilares y las arterias cerebrales (Weller y col., 2009).

A pesar de que la población de células presentadoras de antígeno residentes en el SNC sea reducida, y que ni estas ni los linfocitos parezcan migrar a los ganglios linfáticos desde el cerebro por vía perivascular (Weller y col., 2009), la contribución de estas células al inicio de la respuesta inmune del SNC y su papel como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T en los ganglios linfáticos parece clara (Karman y col., 2004).

1.1.2 El sistema del complemento en el sistema nervioso central

El **sistema del complemento** está formado por un conjunto de moléculas, en su mayoría glucoproteínas, que se relacionan entre sí conformando una cascada de activación enzimática que desencadena distintas acciones protectoras, señalizadoras y reguladoras del sistema inmune (Sarma y col., 2011). Es el principal mediador humoral de las reacciones inmunes innatas (Padilla y col., 2005).

En los últimos años se ha demostrado que muchos de estos factores están presentes en el SNC. Las neuronas y las células gliales expresan reguladores y receptores del complemento, y prácticamente todos los componentes de su cascada de activación, tanto de forma basal, como en respuesta a lesiones o infecciones (Veerhuis y col., 2011).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.1.2.1 Componentes del sistema del complemento y su síntesis en el sistema nervioso

En la actualidad hay descritas aproximadamente 38 proteínas formando parte del sistema del complemento (tabla I-01), unas 24 solubles y 14 de membrana (Barnum, 1995; Carroll, 1998; Song y col., 2000). Muchos de estos factores son polimórficos, existiendo diferentes versiones alélicas en la población (Hauptmann, 1979). Además de los **efectores**, proteínas que conforman las cascadas de activación enzimática y que dan lugar a la formación de anafilotoxinas (C3a y C5a), opsoninas (C3b, iC3b y C4b) y el complejo de ataque a la membrana (C5b-9 o MAC, del inglés, *membrane attack complex*), existen factores **reguladores** y **receptores** de membrana que modulan la actuación del sistema del complemento y evitan su ataque a las células propias del organismo.

	Efectores	Reguladores	Receptores
Solubles	*C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, Factor B, Factor D, MBL, MASP*	*C1-Inh, C4b-BP, Factor H, Factor J, Factor I, Properdina, Proteína S, Clusterina, Carboxipeptidasa N*	-
De membrana	-	*DAF, MCP, CD59, HRF/C8bp*	*CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, C3aR, C5aR, C1qR*

Tabla I-01. Proteínas que componen el sistema del complemento. *Clasificación según su localización y su función principal (Barnum, 1995; Porcel y col., 1993).*

El **hígado** es el principal órgano de síntesis para la mayoría de los componentes del complemento a nivel sistémico (DiScipio y col., 1988; Perlmutter y col., 1986). Los hepatocitos producen más del 90% de los factores hallados en el suero (Alper y col., 1976) y sintetizan todos los componentes, con la posible excepción del factor D, los receptores para ligandos C3 (CR1, CR2, CR3 y CR4) y la properdina (factor P). Los monocitos/macrófagos y los fibroblastos siguen estrechamente a los hepatocitos respecto al número de componentes sintetizados (Colten y col., 1979; Hetland y col., 1988), aunque la cantidad fabricada por estos es entre 10 y 20 veces más baja (a menos que estas células hayan sido activadas o estimulados por lipopolisacáridos (LPS), citocinas o factores de crecimiento). Los neutrófilos sintetizan principalmente C3 (Botto y col., 1992) y properdina (Kemper y col., 2010), mientras que los linfocitos y los eritrocitos expresan predominantemente receptores para fragmentos de C3 y complementan la síntesis de algunas moléculas reguladoras (Fearon y col., 1990; Lublin y col., 1990).

A pesar de que la BHE no es absoluta y algunas macromoléculas pueden atravesarla a través de rutas extracelulares (Broadwell y col., 1993), la penetración de factores del complemento al parénquima nervioso por esta vía es despreciable a menos que se interrumpa la integridad de la barrera (Veerhuis y col., 2011). Por lo tanto, la **síntesis local** de componentes del complemento por parte de las células residentes en el SNC es crucial para el correcto funcionamiento de este sistema de defensa. La síntesis

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de estos factores en el SNC se demostró mediante la detección de ARN mensajero por hibridación *in situ* en el tejido cerebral humano (Rozovsky y col., 1994; Veerhuis y col., 1998).

Los astrocitos son la principal línea celular productora de factores y reguladores del complemento en el SNC (tabla I-02), seguidos de la microglía, las neuronas, los oligodendrocitos y las células ependimarias (Barnum, 1995; Gasque y col., 2000; Veerhuis y col., 2011).

Línea celular	Efectores	Reguladores	Receptores
Astrocitos	*C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, Factor B, Factor D*	*Factor H, Factor I, Clusterina, Proteína S, C1-Inh, C4b-BP, DAF, MCP, CD59*	*CR1, CR2, C3aR, C5aR*
Microglía	*C1q, C2, C3, C4*	*C1-Inh, Clusterina*	*CR1, CR3, CR4, C3aR, C5aR*
Neuronas	*C3, C4*	*Clusterina, Proteína S, Factor H, C1-Inh, MCP, CD59*	*CR1*, C3aR*
Oligodendrocitos	*C3*	*Factor H, Clusterina, Proteína S, DAF, MCP, C4b-BP, CD59, C1-Inh*	*CR1*
Ependimocitos	*C3*	*DAF, CD59, MCP**	*CR1**
Células de Schwann	-	*DAF, MCP, CD59*	*CR1*

Tabla I-02. Síntesis y expresión de proteínas del complemento en el sistema nervioso central humano. **sólo en condiciones inflamatorias. (Barnum, 1995; Gasque y col., 2000).*

Debido a la multitud de efectos que puede ejercer el sistema del complemento, y a su capacidad de actuar inespecíficamente, existen mecanismos para limitar su activación y controlar su actuación en el organismo con el objetivo de proteger a las células propias de sus efectos.

La activación del sistema del complemento se ve limitada gracias a la corta **vida media** de los factores enzimáticos que genera. Las C3 convertasas de la vía alternativa y de la vía clásica, por ejemplo, tienen una vida media de 1,5 y 3 min respectivamente a 37 °C, y la vida media de los factores activados de la cascada enzimática no supera los 10 min (Lim, 1990).

Otra forma de control del complemento son los factores **reguladores**. Se conocen alrededor de 13 proteínas reguladoras en humanos, la mayoría solubles, aunque algunas de membrana (Mollnes y col., 1988). La tabla I-03 muestra resumidamente la principal función de cada una.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Regulador	Efecto principal
C1-inh	*Impide la formación del complejo C1, disociando C1q de C1r y C1s.*
C4b-BP	*Impide la interacción de C4b con C2.*
Factor J	*Impide la unión de C1r y C1s a C1q.*
Factor I	*Escinde a C3b y C4b desactivándolos.*
Factor H	*Acelera la desactivación de las convertasas de la vía alternativa y de C3b.*
Properdina (Factor P)	*Estabiliza los complejos convertasa de la vía alternativa.*
Proteína S (vitronectina)	*Impide la unión del complejo C5b67 a la membrana.*
Clusterina (SP40/40)	*Actúa de forma similar a la proteína S.*
Carboxipeptidasa N	*Desactiva a las anafilotoxinas C5a y C3a.*
DAF (CD55)	*Acelera la disociación de los complejos C3 y C5 convertasa.*
MCP (CD46)	*Actúa como cofactor del factor I en la degradación de C3b y C4b.*
HRF/C8bp	*Impide la inserción de C8 en el complejo C5b67.*
CD59 (protectina)	*Impide la polimerización de C9 sobre el complejo C5b-8.*

Tabla I-03. Factores reguladores del sistema del complemento y su principal función.

Receptor	Localización principal
CR1 (CD35)	*Células del sistema fagocítico mononuclear, neutrófilos, linfocitos, eritrocitos y la mayoría de las células del SNC.*
CR2 (CD21)	*Linfocitos B, células dendríticas foliculares, astrocitos y algunas células epiteliales.*
CR3 (Mac-1; CD11b/CD18)	*Fagocitos mononucleares, neutrófilos, linfocitos T citotóxicos, mastocitos, NK y microglía.*
CR4 (p150/95; CD11c/CD18)	*Células dendríticas, fagocitos mononucleares, neutrófilos, linfocitos T citotóxicos, mastocitos, NK y microglía.*
CR5	*Neutrófilos y trombocitos.*
C1qR	*Linfocitos B, fibroblastos, monocitos/macrófagos, neutrófilos y plaquetas.*
C3aR	*Leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, monocitos/macrófagos, células musculares lisas, neuronas, microglía y algunos linfocitos T.*
C5aR (CD88)	*Monocitos/macrófagos, células musculares lisas, neutrófilos, trombocitos y microglía.*

Tabla I-04. Receptores del sistema del complemento y su principal localización tisular.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Algunas de las funciones del complemento se llevan a cabo mediante la unión de factores solubles a **receptores de membrana** presentes en distintos tipos celulares. Los receptores más conocidos son los que actúan reconociendo a fragmentos derivados de C3 y C5. Por otra parte, algunos de los reguladores mencionados, como el factor acelerador de la degradación (DAF, del inglés, *decay-accelerating factor*), la proteína cofactor de membrana (MCP, del inglés, *membrane cofactor protein*) o CD59, actúan como receptores de los factores sobre los que ejercen su acción reguladora. La tabla I-04 muestra algunos de los receptores más importantes y su principal localización.

1.1.2.2 Activación del sistema del complemento

Los factores solubles del sistema del complemento conforman tres vías de activación enzimática posibles. Estas confluyen en la escisión del factor C3 (la proteína más abundante del complemento (Sarma y col., 2011)) para la formación del complejo C5 convertasa, con el que comienza la vía terminal del complemento, también llamada vía común o vía lítica.

La **vía de activación clásica** (fig. I-01) se inicia con la participación de dos moléculas de IgG o una de IgM unidas a la superficie de patógenos u otros antígenos extraños (las Ig libres no inician la activación) (Gaboriaud y col., 2004). El complejo C1, un complejo multimérico formado por una unidad C1q, dos C1r y dos C1s, se une a la porción Fc de las IgG o IgM cuando forman un complejo antígeno-anticuerpo. Al formarse el complejo por la unión de C1q, se produce la activación de C1r y C1s, que adquieren actividad esterasa. C1s escinde a continuación a los factores C4 y C2, dando lugar a los fragmentos C4a y C2b, que quedan en la fase fluida, y C4b y C2a, de mayor tamaño, que se anclan en la superficie celular para formar la C3 convertasa de la vía clásica: el complejo C4b2a (Sarma y col., 2011). Este puede escindir moléculas C3 en C3a y C3b. C3b puede unirse al complejo C3 convertasa para formar el complejo C5 convertasa de la vía clásica: C4b2a3b (Sarma y col., 2011).

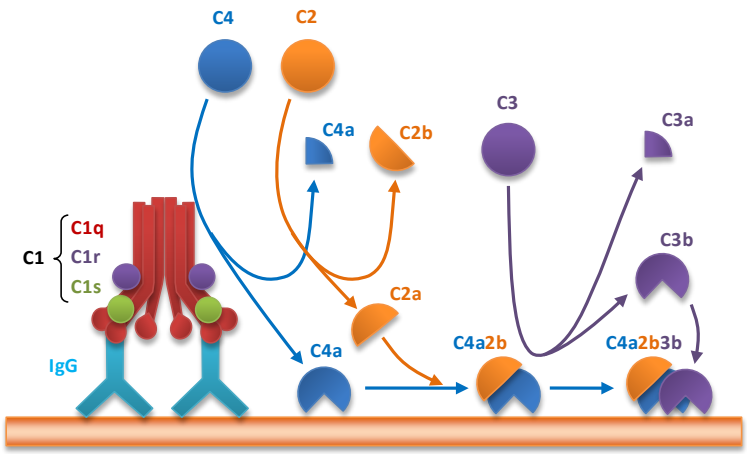


Figura I-01. Vía de activación clásica del sistema del complemento. *La unión del complejo C1 a IgG o IgM unidas a antígeno da lugar a la escisión de C2 y C4. Se forma el complejo C4a2b con capacidad C3 convertasa, produciéndose moléculas C3b que se añaden al complejo, conformando la C5 convertasa de la vía clásica, C4a2b3b.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La **vía de activación alternativa** (fig. I-02) se inicia por la hidrólisis espontánea del factor C3 del complemento en el medio, con la participación de los factores B y D. El factor C3b resultante debe anclarse rápidamente a la superficie de algún patógeno o elemento extraño (Pangburn y col., 1981), siendo, en caso contrario, desactivado por los factores I y H (fig. I-03) tanto solubles como asociados a la membrana de las células propias (Pangburn, 2000; Sarma y col., 2011).

C3b unido a una superficie capta al factor B y a continuación al factor D. Este último escinde al factor B para formar la C3 convertasa de la vía alternativa: el complejo C3bBb. Este complejo se estabiliza por la presencia de properdina (Kemper y col., 2010). Al igual que en la vía clásica, la C3 convertasa escinde al factor C3 en C3a y C3b, uniéndose C3b al conjunto para formar el complejo C5 convertasa de la vía alternativa: C3bBb3b (Sarma y col., 2011).

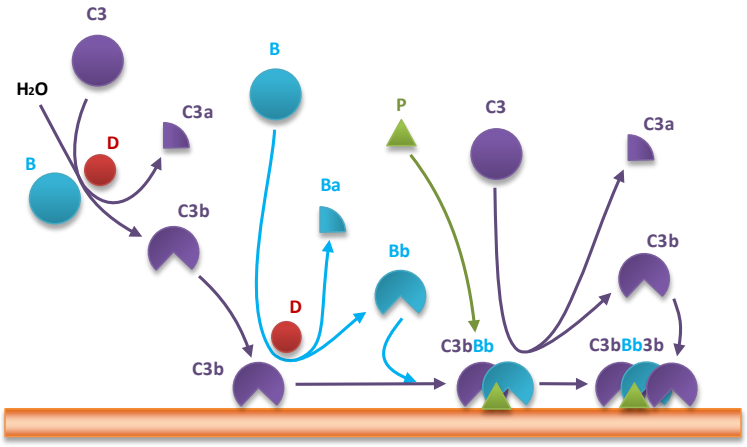


Figura I-02. Vía de activación alternativa del sistema del complemento. *La hidrólisis espontanea de C3 con la participación de los factores B y D da lugar a la formación del complejo C3bBb, que queda estabilizado por la properdina (P). Este complejo escinde más factores C3 dando lugar a moléculas C3b que se añaden al complejo, conformando la C5 convertasa de la vía alternativa, C3bBb3b.*

La **vía de las lectinas** (fig. I-04) se activa cuando una lectina de unión a manosa (MBL, del inglés, *mann2åŜ-binding lectin*) se une a polisacáridos ricos en este carbohidrato en la superficie de ciertos patógenos como levaduras, bacterias y parásitos (Sarma y col., 2011). MBL circula en el suero en forma de complejo, asociada a serin-proteasas (MASP, del inglés, *MBL-associated serine protease*) (Wallis, 2007). La unión del complejo a la superficie de los patógenos induce cambios conformacionales que resultan en la autoactivación de MASP2. MASP2 activada actúa de forma análoga a C1s de la vía clásica, escindiendo los factores C4 y C2 y dando lugar a la formación de la C3 convertasa de la vía de las lectinas (la misma que en la vía clásica): el complejo C4b2a (Sarma y col., 2011).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

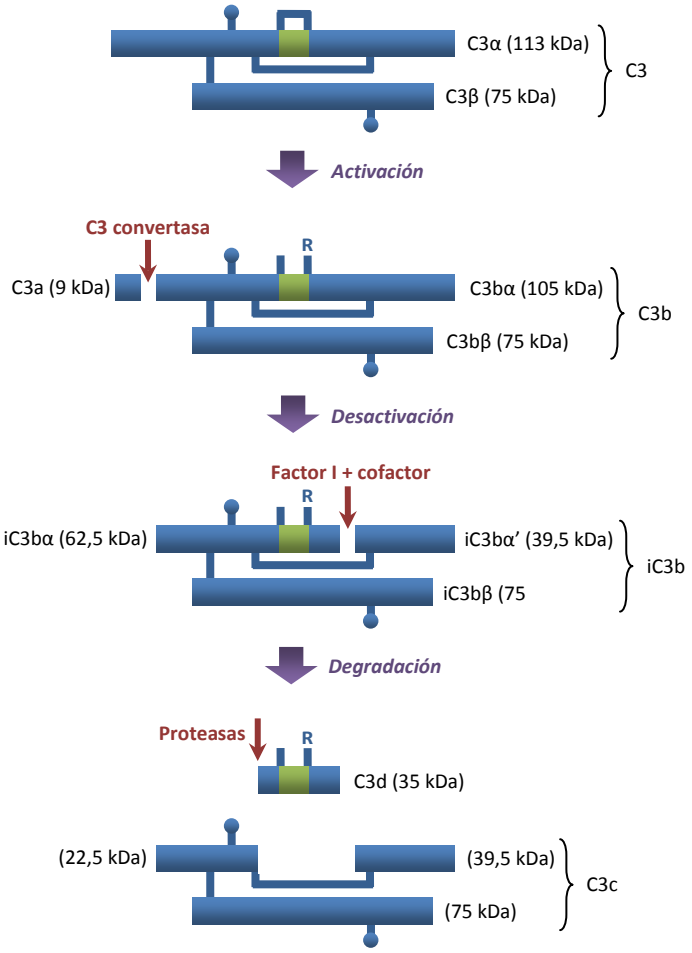


Figura I-03. Activación, desactivación y degradación del factor C3 del complemento. *(Basado en Laursen y col., 1994; Orth y col., 2010). El factor C3 circulante en suero y LCR está compuesto por dos cadenas polipeptídicas (C3α y C3β) unidas covalentemente por un puente disulfuro. La activación del factor por parte del complejo C3 convertasa librera un fragmento de 9 kDa (anafilotoxina C3a) de la cadena α, provocando la aparición del factor C3b activado, el cual, en ausencia de membranas susceptibles a su anclaje, es rápidamente desactivado por el factor I y su cofactor mediante un corte proteolítico en la cadena α. Posteriormente, factor I + cofacto, y diversas proteasas presentes en el medio llevan a cabo la degradación proteolítica del factor iC3b dando lugar a la aparición de los factores derivados C3d y C3c.* ***R****: radical glucídico.*

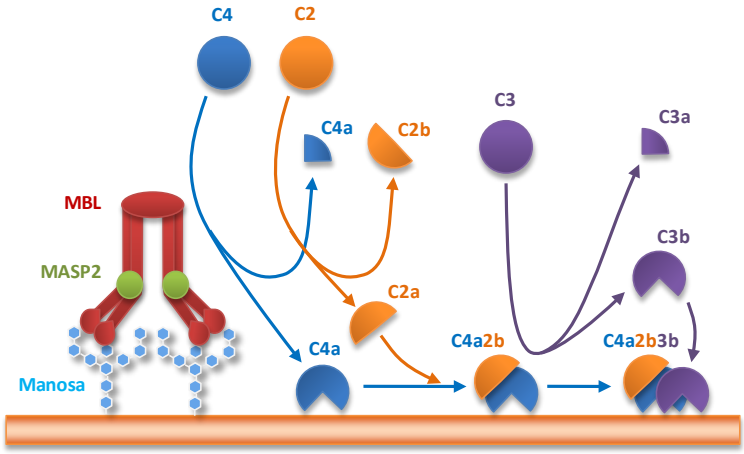


Figura I-04. Vía de activación de las lectinas del sistema del complemento. *La unión del complejo MBL-MASP2 a polisacáridos ricos en manosa da lugar a la escisión de C2 y C4. Se forma el complejo C4a2b con capacidad C3 convertasa, produciéndose moléculas C3b que se añaden al complejo, conformando la misma C5 convertasa que en la vía clásica, C4a2b3b.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tanto el complejo C4b2a de la vía clásica y de las lectinas, como el C3bBb de la vía alternativa pueden escindir más moléculas C3 para liberar C3a y C3b, amplificando la señal de activación. C3b actúa opsonizando a las células patógenas, ayudando así a su fagocitosis. Además, C3b puede unirse a los complejos C3 convertasa para formar los complejos C5 convertasa: C4b2a3b (en vía clásica y de lectinas) y C3bBb3b (en vía alternativa) (Sarma y col., 2011). Comienza así la **vía lítica, común o terminal** del complemento (fig. I-05).

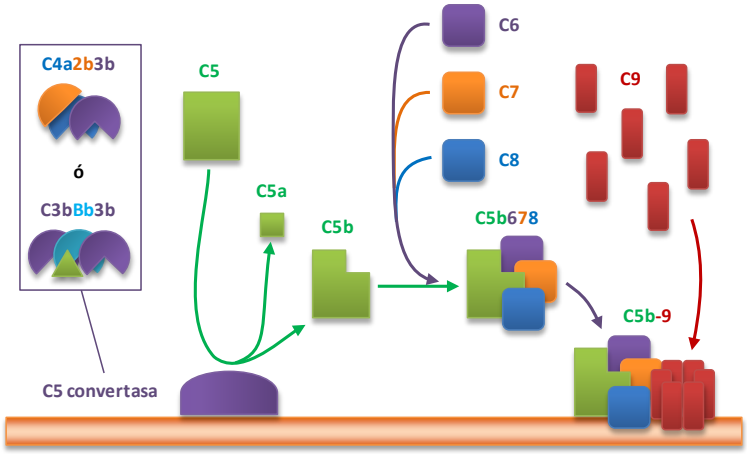


Figura I-05. Vía lítica o terminal del sistema del complemento. *El complejo C5 convertasa (tanto el formado por la vía clásica, alternativa o de lectinas) escinde el factor C5 dando lugar a C5a y C5b. C5b en fase fluida se una a C6, C7 y C8 para adquirir capacidad de unirse a la membrana y fijar así moléculas C9 que forman el poro del complejo de ataque a la membrana C5b-9.*

Estos complejos anclados a la membrana escinden al factor C5 para formar C5a y C5b. La formación del MAC (también llamado complejo terminal del complemento —TCC, del inglés, *terminal complement complex*— generalmente en su forma soluble) se inicia por la unión de los factores C6 y C7 a C5b, apareciendo así el complejo estable soluble C5b67 con capacidad de unión a la membrana. Una vez anclado, se adhiere un factor C8 y finalmente, entre 10 y 18 moléculas de factor C9, que conforman el poro transmembranal del complejo, siendo este el responsable de la lisis celular (Ricklin y col., 2010).

1.1.2.3 Funciones del sistema del complemento e importancia en el sistema nervioso

El sistema del complemento cumple diversas funciones, principalmente encuadradas en la respuesta inmune innata, pero también algunas relacionadas con la respuesta inmune adaptativa, la señalización inflamatoria y la fisiología general del sistema inmune. Las funciones más importantes para la respuesta inmune son las siguientes (García y col., 2003):

La **acción citolítica** es quizás la principal función mediada por el complemento en la respuesta inmune innata. La formación de los MAC en la superficie de las células diana conlleva la creación de poros que permiten el libre intercambio de agua e iones entre el interior y el exterior, dando como resultado la lisis celular. Multitud de bacterias (la mayoría Gram-negativas) y parásitos son susceptibles

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

a este ataque, como por ejemplo los géneros *Bacteridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* o *Vibrio* (Taylor, 1992).

La proteólisis de los factores C3 y C5 genera, además de los factores C3b y C5b, dos fragmentos de menor tamaño que no participan en la cascada de activación del complemento, sino que permanecen en la fase fluida y llevan a cabo funciones de señalización inflamatoria: son las **anafilotoxinas** C3a y C5a (Klos y col., 2009). Estos fragmentos peptídicos, actuando a través de sus receptores C3aR y C5aR, desencadenan la activación de los mastocitos, basófilos y neutrófilos que en consecuencia, liberan histamina y citocinas proinflamatorias. Entre estas se encuentran sustancias vasoactivas que incrementan la permeabilidad vascular, lo que facilita la afluencia de leucocitos y moléculas del sistema inmune al foco inflamatorio (Wetsel, 1995). Además de su acción anafilotóxica, C5a tiene **función quimiotáxica**, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a la región inflamada (Isfort y col., 2011; Suarez y col., 1987).

Las moléculas C3b e iC3b son además **opsoninas**, es decir, tienen la capacidad de marcar a bacterias (generalmente Gram-positivas) y partículas extrañas para su fagocitosis. Tanto los neutrófilos como los monocitos/macrófagos y algunas células dendríticas, presentan en su superficie receptores del complemento CR1, CR3 y CR4, capaces de unirse a estos factores y facilitar así la fagocitosis de las bacterias y partículas opsonizadas (Brown, 1992).

Al igual que otras proteínas del sistema inmune, tales como citocinas proinflamatorias o complejos de histocompatiblidad (Boulanger, 2009), los factores del complemento también tienen funciones no inmunes en el SNC. Así, por ejemplo, se ha descrito que C3a y su receptor C3aR juegan un papel regulador positivo de la neurogénesis adulta (Bogestal y col., 2007; Shinjyo y col., 2009) o que C1q aumenta la supervivencia neuronal *in vitro* y es neuroprotector en respuesta a ciertos agentes tóxicos, tales como el β-amiloide y el amiloide P sérico (Pisalyaput y col., 2008).

Pero su función más importante en el SNC no deja de ser la de formar parte de la respuesta inmune innata. En este sentido, se ha descrito la participación del sistema del complemento en multitud de patologías e infecciones que afectan al sistema nervioso. Además de su función protectora, la actividad del sistema del complemento ha sido, cada vez más, relacionada con ciertas patologías y enfermedades neurodegenerativas del SNC (Veerhuis y col., 2011). Su activación excesiva o descontrolada se ha descrito como perjudicial para las células del SNC. Las células neuronales son consideradas habitualmente las víctimas inocentes de la activación del complemento, ya sea debido a factores que sortean la BHE o a los que son sintetizados por las células gliales activadas (Veerhuis y col., 2011). Los oligodendrocitos también son susceptibles al ataque del complemento, fenómeno que se ha detectado en la esclerosis múltiple (Schwab y col., 2002).

Se han descrito en la literatura numerosos casos de activación del complemento en patologías (degenerativas o no) del SNC. Así, estudios del tejido cerebral de pacientes con isquemia cerebral aguda o ictus isquémico revelaron depósitos de C1q, C3c y C4d en todas las lesiones isquémicas (Veerhuis y

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

col., 2011). La asociación entre los factores del complemento y los depósitos de β-amiloide en la enfermedad de Alzheimer fue descrita por primera vez en los años 80 (Eikelenboom y col., 1982; Ishii y col., 1984), existiendo en la actualidad numerosas evidencias de que las placas seniles activan al sistema del complemento *in vivo* (Eikelenboom y col., 1984; Fonseca y col., 2004; McGeer y col., 1989; Rogers y col., 1992). Se ha comprobado que los cuerpos de Pick, inclusiones filamentosas de la proteína Tau en neuronas de pacientes con la enfermedad del mismo nombre, pueden provocar reacciones inflamatorias y activación del complemento (Veerhuis y col., 2011). Sin embargo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, aunque se ha descrito cierta asociación entre los cuerpos de Lewy y la activación del complemento (Yamada y col., 1992), dicha relación sigue sin estar clara (Veerhuis y col., 2011). En la esclerosis múltiple ha sido ampliamente descrita la deposición de proteínas del complemento y de IgG en la materia blanca lesionada (Frohman y col., 2006). Esto ha dado lugar a la hipótesis de la posible participación del complemento en la degradación mielínica de esta enfermedad, así como en otras enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Alexander y col., 2008; Charbel Issa y col., 2011).

Otros componentes del sistema del complemento que actúan en el SNC son las anafilotoxinas, sobretodo C5a. Como ya se ha mencionado, esta molécula es un potente mediador inflamatorio que recluta y activa multitud de células del sistema inmune. Su receptor, C5aR (CD88), se encuentra en todas las células del linaje mieloide (Wetsel, 1995) y algunas de otros linajes (Zwirner y col., 1999). También se expresa en todas las células del SNC, tanto neuronas como células gliales, aumentando su expresión durante procesos inflamatorios, lo que sugiere un papel funcional para C5a en el tejido nervioso (Gasque y col., 1997). La generación excesiva o descontrolada de esta molécula puede contribuir a la lesión del tejido y a la patología de algunas enfermedades cerebrales (Woodruff y col., 2010). Paradójicamente, esta anafilotoxina también puede ejercer un papel neuroprotector en estas enfermedades, bien directamente (O'Barr y col., 2001), o a través de acciones mediadas por glutamato, Ca^{++} o la activación de quinasas (Mukherjee y col., 2001; Osaka y col., 1999). Por ejemplo, C5a regula positivamente la expresión del receptores de glutamato en las células de la microglía (pero no en astrocitos) dando lugar a un aumento de la captación de glutamato, y por lo tanto, la protección de las neuronas cercanas a la toxicidad del glutamato en el medio (Humayun y col., 2009).

1.2 LA NEUROINFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica, generalmente local, de los tejidos del organismo a los procesos infecciosos, lesiones y traumas. Debido a su carácter inmunológico especial y a su aislamiento, en el SNC, esta respuesta debe ser iniciada a partir de las células residentes (células propias del sistema nervioso: neuronas y células gliales) o ser llevada a cabo por células inmunes periféricas tras su infiltración e incorporación al tejido nervioso. Además de este componente celular, multitud de moléculas y factores, procedentes tanto de células residentes como reclutadas, participan en la respuesta inflamatoria del SNC.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En el SNC, la neuroinflamación consistiría en una compleja serie de reacciones que tienen el fin de neutralizar a los patógenos invasores y reparar las regiones dañadas, restaurando así la homeostasis del tejido. Esta cursaría necesariamente con la invasión de células del sistema inmune procedentes del torrente sanguíneo, lo que diferencia este fenómeno de la llamada activación microglial, la respuesta inmune innata del SNC sin participación de células foráneas (Graeber y col., 2011). Si bien la neuroinflamación es considerada como un mediador de daño secundario en el sistema nervioso y puede tener efectos negativos durante el proceso de recuperación después de la lesión, la respuesta inmune local tiene indudables efectos beneficiosos sobre el tejido traumatizado. Tales efectos incluyen la eliminación de los desechos celulares, la secreción de factores neurotróficos y la activación de proteasas para la remodelación de la matriz extracelular (Harry y col., 2008).

1.2.1 Causas de inflamación en el sistema nervioso central

Las causas que pueden provocar el desarrollo de procesos inflamatorios en el seno del SNC son diversas y se clasifican principalmente en dos grupos: **causas sépticas** (infecciones víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias) y **causas asépticas** (lesiones mecánicas, sustancias irritantes o moléculas antigénicas). Sean de un tipo o de otro, estos estímulos desencadenan, en última instancia, las mismas manifestaciones celulares, moleculares y vasculares de cara a la inflamación. Sin embargo, aunque la respuesta inflamatoria final pueda ser similar para todas estas situaciones, los eventos iniciales que provocan y controlan la respuesta pueden ser muy diferentes (Rock y col., 2010).

1.2.1.1 Causas sépticas

Los microorganismos que consiguen invadir el SNC deben sortear, además de las defensas clásicas del huésped, la BHE que lo aísla del resto del organismo. Se han descrito diversas estrategias para conseguirlo, las más comunes: la infección de las células que forman parte de la barrera, la colonización del LCR o la migración a través de nervios periféricos.

Las **infecciones víricas** suponen uno de los tipos de infección más comunes del SNC. Estos pueden alcanzar el SNC por cuatro vías principales (Zhang y col., 1999): la infección de células endoteliales, la infección de células móviles del sistema inmune que penetran en el SNC, a través de rutas intraneuronales periféricas y a través de los órganos circunventriculares neurohemales. Generalmente, estas infecciones producen inflamaciones con infiltrado de células principalmente mononucleadas.

La correlación entre ciertas enfermedades neurodegenerativas y las infecciones víricas en el SNC podría estar provocada por la fuerte inducción de interferones tipo 1 que estas producen a través de receptores de reconocimiento de patrones presentes en las células del SNC (Savarin y col., 2008). Si bien los interferones tienen reconocida actividad antiviral, también juegan un papel complejo en la regulación del sistema inmune y nervioso (Amadori, 2007; Traynor y col., 2007), de forma que expresiones prolongadas de interferón alfa (IFNα) se han relacionado con procesos de

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

neurodegeneración (Akwa y col., 1998). Las bacterias y otros microorganismos, por su parte, no inducen la expresión de cantidades sustanciales de IFNα (Scott y col., 2005).

Las formas de **infección bacteriana** más comunes en el SNC son las meningitis y los abscesos cerebrales y espinales (Klein y col., 2010). Estas infecciones suelen ser agudas y causadas por microorganismos piógenos. Se ha comprobado que el sistema del complemento desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria dentro del compartimento intratecal ante la meningitis bacteriana (Stahel y col., 1997).

Las **infecciones micóticas** del SNC son menos habituales en individuos sanos, produciéndose con mayor frecuencia en individuos inmunodeprimidos o debilitados (Jain y col., 2007). Incluso en estos casos, la infección del SNC suele ser secundaria y estar ligada a una infección primaria, generalmente pulmonar (Murthy, 2007). El conocimiento de la morfología del hongo puede ayudar a predecir la localización de la infección, pues los micelares (formadores de hifas) tienen predilección por el parénquima cerebral, mientras que las levaduras y otros hongos unicelulares, suelen dar lugar a meningitis (Mathur y col., 2012).

Al igual que las infecciones micóticas, las **infecciones parasitarias** del SNC están ligadas a estados inmunosuprimidos o debilitados. Las más comunes son: toxoplasmosis, malaria, amebiasis, hidatidosis y triquinosis (Bia y col., 1986).

1.2.1.2 Causas asépticas

La mayor parte de los procesos inflamatorios en el SNC son provocados por la invasión de microorganismos patógenos, sin embargo, muchos estímulos estériles (es decir, no asociados a la presencia de microorganismo) como traumas mecánicos, isquemias, toxinas, minerales, cristales, productos químicos y antígenos libres, también desencadenan la respuesta inflamatoria (Rock y col., 2010).

Entre los **compuestos químicos** encontramos moléculas que pueden ser inorgánicas, como por ejemplo, el dióxido de sílice (Mossman y col., 1998), el óxido de hierro (Billings y col., 1993), el pirofosfato cálcico (Ea y col., 2004) y el amianto (Mossman y col., 1998); u orgánicas, como el urato monosódico (Nuki y col., 2006), el ácido hialurónico (Davis y col., 2011), el β-amiloide (Weiner y col., 2006) o el colesterol (Galkina y col., 2009). Por ejemplo, en el SNC, la enfermedad de Alzheimer está asociada con la deposición del péptido β-amiloide en agregados que pueden estimular a las células microgliales a producir mediadores proinflamatorios, principalmente IL1β. Estos contribuyen al daño neuronal y la patogénesis de la enfermedad (Halle y col., 2008; Weiner y col., 2006).

Un ejemplo de **antígeno libre** capaz de provocar reacción inflamatoria aguda estéril es el zimosan (Zym, del inglés, *zymosan*), un preparado a partir de la pared celular de levaduras que se compone de complejos proteína-carbohidratos. Estos complejos se acoplan a receptores basurero y a receptores de

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

reconocimiento de patrones, y pueden estimular la inflamación neutrofílica en ausencia de la vía de IL1 (Chen y col., 2007).

Otro tipo de partículas asépticas proinflamatorias son las **células necróticas** y sus desechos**,** procedentes principalmente de lesiones y **traumas mecánicos**. Cuando las células mueren por necrosis, estimulan una respuesta inflamatoria aguda en su entorno (Chen y col., 2007; Majno y col., 1960). Esta respuesta es independiente de la causa específica de la muerte celular. Cuando esta necrosis es provocada por un microorganismo patógeno la respuesta inflamatoria tiene el claro objetivo de combatir la infección. Sin embargo, en situaciones de muerte celular estéril, la respuesta inflamatoria, y en particular la infiltración de neutrófilos en el tejido nervioso, puede aumentar la cantidad de lesiones, siendo contraproducente. En estas circunstancias, experimentos con anticuerpos neutralizantes anti-IL1α inhibieron significativamente la respuesta inflamatoria neutrofílica causada por necrosis. Por el contrario, anticuerpos anti-IL1β no inhibieron esta respuesta (Chen y col., 2007). IL1α estaría jugando, por tanto, un papel clave en este proceso. Otros experimentos mostraron que la liberación de IL1α parecía proceder del interior de las células muertas (Eigenbrod y col., 2008). Tales hallazgos condujeron a proponer la hipótesis de que el sistema inmune innato ha desarrollado mecanismos para poner de manifiesto la lesión de las células mediante la detección en el medio extracelular de un conjunto de moléculas que sólo se exponen después de la muerte celular. Ejemplos de estas son: IL1α (Eigenbrod y col., 2008), IL33 (Moussion y col., 2008), el ADN (Barrat y col., 2005; Ishii y col., 2001), las proteínas S100 (Foell y col., 2007) o las proteínas de choque térmico (Osterloh y col., 2008).

1.2.2 Papel de las células residentes del sistema nervioso central en la neuroinflamación

1.2.2.1 Microglía

Como ya se ha comentado, la **microglía** supone una población celular mieloide, derivada del saco vitelino durante una estrecha ventana de tiempo antes de la vascularización y hematopoyesis en el embrión (Ransohoff y col., 2012). Su principal función es análoga a la de los macrófagos en otros tejidos, siendo el principal efector de la inmunidad innata en el sistema nervioso y desempeñando un papel crucial en la respuesta inmunológica a través de la secreción de múltiples factores. Algunos autores señalan, sin embargo, la incapacidad de las células microgliales y astrogliales para sostener por sí mismas la respuesta inmune del SNC (Muldoon y col., 2013).

Su nivel de actividad está estrechamente relacionado con su morfología, habiéndose identificado en ellas distintos estados de activación, análogos a los estados M1 y M2 de los macrófagos (Michelucci y col., 2009). De esta forma, encontramos que la mayor parte de la microglía en reposo en el animal adulto muestra una morfología ampliamente ramificada y con un pequeño cuerpo celular. Estas células presentan una movilidad muy reducida y carecen de capacidad fagocítica. Además, no se detecta en

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ellas expresión de MHC de clase I y II, CD80, CD86 y CD40 (Aloisi y col., 1998). Se han descrito como células a la espera de señales que provoquen su activación (Aloisi, 2001; Christensen y col., 2006).

Una pequeña parte de las células microgliales en condiciones fisiológicas de reposo presentan una morfología ameboidea. Esta forma les permite la libre circulación por todo el tejido neural, siendo este un estado asociado a etapas fetales, en las cuales se producen elevadas tasas de apoptosis y, por tanto, de desechos que deben ser eliminados del medio. En esta fase las células tienen capacidad fagocítica, aunque no poseen las funciones proinflamatorias y de presentación de antígenos propias de la microglía activada (Ferrer y col., 1990; Gehrmann y col., 1995).

Una vez activadas, las células sufren varios cambios morfológicos, caracterizados por el engrosamiento y la retracción de las ramificaciones y el retorno a un estado ameboide en el que incrementan de tamaño, adquiriendo capacidad fagocítica y una gran movilidad. También se producen cambios en su expresión génica y fenotípica, como la exposición de MHC de clase I y II (lo que les confiere capacidad para actuar como células presentadoras de antígeno), CD45, integrinas y receptores Fc en su superficie (Eikelenboom y col., 1994; McGeer y col., 1995). También aumentan la expresión de la molécula adaptadora de unión a calcio iónico (IBA1, del inglés, *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) (Mori y col., 2003; Patro y col., 2010; Wirenfeldt y col., 2009). Adquieren la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos Th1, productores de interferón gamma (IFNγ) y linfocitos Th2, productores de IL4 (Aloisi, 2001; Carson y col., 1998), así como jugar un papel en la activación y la lisis celular mediada por los linfocitos Tc infiltrados en el SNC (Mack y col., 2003; Olson y col., 2004). Además, secretan factores citotóxicos, moléculas de reclutamiento de macrófagos (quimiocinas CCL3 y CCL4) y de monocitos (quimiocinas CXCL8 y CCL2), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*) y moléculas de señalización proinflamatoria (Lue y col., 2001).

Por otro lado, a diferencia de los macrófagos del tejido periférico, la microglía posee un fuerte potencial proliferativo (Graeber y col., 2011). Al ser activadas, estas células proliferan rápidamente con el fin de aumentar su número ante situaciones de infección y daño celular (Aloisi, 2001).

Las células microgliales subependimarias son especialmente activas. Debido a su localización, bajo el epitelio ependimario que separa el parénquima nervioso del ventrículo, estas células suponen uno de los primeros frentes de respuesta a agentes lesivos e infecciosos procedentes del LCR. Además, se ha comprobado su activación y colaboración en las tareas de limpieza de restos celulares mediante fagocitosis en situaciones de daño celular periventricular (Carbonell y col., 2005).

La microglía puede ser activada por gran variedad de factores que incluyen: agonistas de los receptores de glutamato, citocinas proinflamatorias, factores de necrosis celular, LPS y aumento en las concentraciones de potasio extracelular (indicativo de lesión celular). La inflamación sistémica y la neurodegeneración crónica también conducen a la activación de la microglía (Palin y col., 2008; Perry, 2004; Perry y col., 2007) aunque no está claro si este fenómeno aporta más beneficios o perjuicios al

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

SNC. Las neuronas expresan de forma constitutiva inhibidores de la activación microglial en su superficie, es concebible por tanto, que la pérdida neuronal menoscabe esta supresión (Hanisch y col., 2007). Si esto es así, la respuesta microglial a la neurodegeneración sería una activación innecesaria que podría representar más perjuicio que beneficio, lo que apoya la idea de la importancia que tiene el control de la neuroinflamación en el seno del SNC.

Ante la ausencia de células dendríticas presentadoras de antígeno en el SNC sano, la microglía parece ser el primer y principal sensor de señales de peligro. Esto lo realizan a través de receptores de reconocimiento de patrones tipo Toll (TLR, del inglés, *Toll-like receptors*) de su superficie, como TLR3 (reconoce ARN bicatenario) o TLR4 (reconoce LPS) (Glass y col., 2010). Cuando dichos receptores se activan, la microglía secreta mediadores inflamatorios como el TNFα e IL1β que puede actuar sobre los astrocitos para inducir respuestas inflamatorias (Saijo y col., 2009).

La microglía activada puede liberar IL23 e IL1β, ambas, moléculas promotoras de la expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, del inglés, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) por parte de los linfocitos T (Li y col., 2003). GM-CSF es necesaria para reclutar leucocitos mieloides, a través de los cuales se mantiene la inflamación local en el SNC y la supervivencia de los linfocitos (Codarri y col., 2011; Sonderegger y col., 2008).

La microglía fagocítica activada también interactúa con los astrocitos y las células neuronales para coordinar la lucha contra las infecciones, de forma que esta ocurra lo más rápidamente posible con el mínimo daño a las células sanas del cerebro (Gehrmann y col., 1995). A diferencia de los astrocitos, las células microgliales no están conectadas a través de uniones comunicantes y no responden normalmente como una población, sino como entes individuales (Graeber y col., 2011).

1.2.2.2 Astrocitos

Los **astrocitos** son las células gliales más numerosas del cerebro y después de la microglía, las mejor caracterizadas desde el punto de vista inmunológico. Juegan un importante papel en los procesos neuroinflamatorios y en la respuesta inmune innata del SNC (Wyss-Coray y col., 2003). Expresan gran cantidad de proteína glial fibrilar ácida (GFAP, del inglés, *glial fibrillary acidic protein*), usada habitualmente como marcador molecular para su detección (Gomes y col., 1999). Participan activamente en la construcción de la BHE (Neuwelt y col., 2011) y tienen capacidad fagocítica, aunque esta suele estar ligada a labores de limpieza y mantenimiento más que a la respuesta inmune (al-Ali y col., 1996). Sin embargo, regulan la actividad fagocítica de la microglía en la neuroinflamación (DeWitt y col., 1998).

Tras su activación por señales mediadas por TLR y receptores tipo NOD (NLR, del inglés, *NOD-like receptors*), los astrocitos participan en las reacciones inmunes innatas y son la principal fuente de mediadores inflamatorios del SNC, incluyendo varios componentes del sistema del complemento

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Bonifati y col., 2007), citocinas proinflamatorias como IL1β e IL6, y quimiocinas tales como CCL2, CXCL1, CXCL10 y CXCL12 (Majumder y col., 1996; McKimmie y col., 2010; Stoll y col., 1998).

Además también producen citocinas antiinflamatorias como IL10 (Nash y col., 2011) y neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *nerve growth factor*) (Aguado y col., 1998), la molécula de señalización neurotrófica S100β (Mrak y col., 2001), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*) (Hock y col., 2000), la neurotrofina 3 (NTF3) (Blondel y col., 2000) y la neurotrofina 4/5 (NTF4/5), las cuales tienen un efecto trófico sobre las neuronas.

1.2.2.3 Oligodendrocitos

Los **oligodendrocitos** no son comúnmente asociados con las reacciones inmunológicas y es aceptado que su papel en la inmunidad del SNC es en gran medida secundario (Graeber y col., 2011). A pesar de estar en íntimo contacto con las neuronas y ser fundamentales para su mantenimiento morfofuncional, hay poca información sobre su citotoxicidad en situaciones de pérdida neuronal (Roth y col., 2005). Su principal función en el SNC es la formación de las capas de mielina mediante sus prolongaciones, lo que permite el aislamiento eléctrico de los axones neuronales y, por tanto, la óptima propagación del potencial de acción. Por esta razón se piensa que su principal papel en la inflamación tiene lugar en la fase de reparación y remielinización.

1.2.2.4 Neuronas

Como ya se ha comentado, las **neuronas** del SNC participan activamente en la regulación inmune mediante la interacción con células gliales y linfocitos T infiltrados (Tian y col., 2009), principalmente mediante la regulación de la microglía (Polazzi y col., 2002). Su papel fundamental es el de un regulador negativo, liberando neurotransmisores y factores neurotróficos que mantienen a la microglía en un estado de reposo (Neumann, 2001; Pocock y col., 2007). Por ejemplo, el BDNF, el NGF y la NTF3 secretados por las neuronas activas pueden inhibir la expresión MHC de clase II en la microglía (Neumann y col., 1998).

Por otra parte, las neuronas expresan otros factores implicados en la regulación de la respuesta inmune, como MHC de clase I (Neumann y col., 1997), fractalquina (Harrison y col., 1998), factores y reguladores del complemento como C3, C4, CD59 y C3aR (Gasque y col., 2000), o citocinas como IL1α y TNFα ante procesos lesivos (Tchélingérian y col., 1996).

1.2.2.5 Macrófagos residentes

Se han descrito dos poblaciones principales de macrófagos residentes en el SNC: los macrófagos perivasculares y los macrófagos intraventriculares.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los **macrófagos perivasculares** son relativamente abundantes en el SNC. Estos pueden ser distinguidos de la microglía por sus altos niveles de expresión de CD45 y MHC clase II, tanto en roedores como en seres humanos (Fabriek y col., 2005; Kida y col., 1993). Son células grandes y redondeadas que se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales, entre la membrana basal endotelial y las células gliales. No deben ser confundidas con los pericitos, células perivasculares contráctiles con cierta capacidad fagocítica (Bergers y col., 2005). La ubicación de estos macrófagos les facilita la detección de patógenos, ayudando así a la respuesta inmune innata y adaptativa del SNC (Fabriek y col., 2005). Se les ha atribuido una alta expresión de MHC de clase II, CD80, CD86 y CD40 en pacientes con trastornos neurodegenerativos (Chastain y col., 2011). Su activación está mediada por citocinas procedentes de linfocitos Th1, IFNγ y TNFα (Fabriek y col., 2005). Su eliminación experimental *in vivo* suprime los signos clínicos de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), sin embargo, la afluencia de linfocitos T CD4+ no se ve afectada, lo que sugiere que estos macrófagos no son críticos para el reclutamiento e infiltración de linfocitos T en el SNC (Bauer y col., 1995; Tran y col., 1998).

Los **macrófagos intraventriculares** abarcan tres clases de acuerdo a su localización, aunque son considerados una misma entidad celular: los **macrófagos supraependimarios**, los **macrófagos en flotación** libre del LCR y los macrófagos de los plexos coroideos, también llamados **células epiplexus** o células de Kolmer (Kolmer, 1921), siendo esta última la clase predominante (Ling y col., 1998). Dichas células parecen tener su origen en la circulación sistémica, pero penetran al SNC mediante transporte interepitelial y emperipolesis (Carpenter y col., 1970; Ling, 1983), estableciéndose de forma permanente en el ventrículo, donde pueden también proliferar (Lu y col., 1993). Estos fagocitos mononucleares expresan integrina β2, MHC de clase I y II, y otros marcadores de macrófagos (Lu y col., 1994). Su morfología estrellada y su estrecha relación con el epitelio de los plexos coroideos les confieren una importante función de control en el paso de células y sustancias a través de los plexos hacia el LCR. Esto les permite colaborar rápidamente en la reacción inflamatoria junto con otras células fagocíticas del SNC como la microglía (Engelhardt y col., 2001).

1.2.2.6 Mastocitos

Los **mastocitos** son células mieloides que, si bien son característicos de tejidos expuestos al medio externo, también se encuentran de forma dispersa en el cerebro, la médula espinal y las meninges, interviniendo en los procesos inflamatorios del SNC. Su participación en los procesos inflamatorios se caracteriza por la liberación de TNFα e IL1β (Malaviya y col., 1996), así como triptasa e histamina (Roznieckí y col., 1995; Tuomisto y col., 1983). En el SNC probablemente contribuyen a la respuesta inflamatoria local y parecen tener efectos tanto neuroprotectores como perjudiciales tras procesos lesivos en el cerebro (Lindsberg y col., 2010).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.3 Participación de células foráneas al sistema nervioso central en la neuroinflamación

A pesar de que el SNC presenta células inmunocompetentes residentes, la infiltración de células periféricas del sistema inmune es fundamental para la defensa contra las infecciones de cierto calibre, así como para la reparación y limpieza posterior de regiones dañadas por diversos traumas (Hauwel y col., 2005; Held y col., 2004; Trifilo y col., 2003; Tsunoda y col., 2004). Bajo condiciones inflamatorias, la BHE permite la entrada de un gran número de células del sistema inmune periférico. Sin embargo, esto requiere un alto grado de control debido a que la reacción inflamatoria procedente del torrente sanguíneo puede causar un daño importante en el tejido nervioso si es excesiva o inapropiada.

1.2.3.1 Células dendríticas

Las **células dendríticas** desempeñan un papel crítico en la iniciación de las respuestas inflamatorias sistémicas mediadas por linfocitos T a través de la presentación de antígenos que estas realizan mediante las moléculas MHC de clase II de su superficie. En el SNC se ha descrito la presencia de células que expresan marcadores típicos de células dendríticas (como por ejemplo, CD11b o CD11c) en las cubiertas meníngeas y los plexos coroideos (Prodinger y col., 2011). Sin embargo, no hay pruebas de que existan células dendríticas profesionales con capacidad presentadora de antígeno, ni linfocitos T, residentes en el parénquima nervioso sano (Galea y col., 2007).

En el parénquima nervioso inflamado, las células que expresan marcadores de células dendríticas son abundantes, pero estas se observan principalmente después de la pérdida o disfunción de la BHE, lo que sugiere que muchas de ellas proceden de la circulación periférica y sólo algunas corresponden a la microglía residente activada, que expresa tales marcadores inducidos por citocinas liberadas localmente (Almolda y col., 2011; McMahon y col., 2006; Miller y col., 2007). La microglía supondría, por tanto, el principal iniciador de la respuesta inmune en el SNC (Saijo y col., 2009) asumiendo las funciones de las células dendríticas, aunque esto sigue siendo actualmente tema de debate.

1.2.3.2 Neutrófilos

Los **neutrófilos** son células mieloides consideradas la primera línea de defensa ante las infecciones. Esto queda ilustrado por las complicaciones derivadas de la deficiencia en este tipo celular (Borregaard, 2010; Nathan, 2006). Los neutrófilos son rápidamente movilizados de la médula ósea mediante señales de quimiocinas tipo CXC (Mantovani y col., 2011). Su activación puede llevarse a cabo tanto a través de TLR y NLR como de citocinas TNFα o IFNγ. Los linfocitos T también pueden contribuir al reclutamiento de más neutrófilos mediante IL17 (Infante-Duarte y col., 2000). Una vez activados, los neutrófilos expresan moléculas de adhesión CD15 y CD11b que les confieren la capacidad de extravasar el endotelio y migrar hacia los tejidos dañados (Mantovani y col., 2011). Una vez allí, liberan gran cantidad de factores como citocinas (principalmente IL1), quimiocinas, factores angiogénicos, factores

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

estimulantes de colonias, enzimas líticas y péptidos antimicrobianos (Ransohoff y col., 2012; Roberge y col., 1994).

En el SNC, los neutrófilos están implicados en la mayoría de las afecciones inflamatorias, siendo de las primeras poblaciones celulares que invaden el tejido nervioso afectado (Määttä y col., 1998; McColl y col., 1998). Estos pueden ser reclutados a través de distintos mediadores proinflamatorios, como la anafilotoxina C5a del sistema del complemento (Isfort y col., 2011; Suarez y col., 1987) o el TNFα producido por los mastocitos meníngeos (Sayed y col., 2010). A su vez, los neutrófilos contribuirían al reclutamiento de linfocitos T del sistema circulatorio mediante la producción de quimiocina CXCL10 (Molesworth-Kenyon y col., 2005). Los neutrófilos, junto con los mastocitos, también promueven la supervivencia y la proliferación de los linfocitos B (Mantovani y col., 2011).

1.2.3.3 Monocitos/macrófagos

Los **macrófagos** son células móviles ameboides procedentes de la diferenciación de los monocitos en los tejidos. A diferencia de la microglía, los macrófagos periféricos no han mantenido un fuerte potencial proliferativo (Graeber y col., 2011). Su función principal como parte de la respuesta inmune innata es fagocitar y digerir patógenos y restos celulares, así como estimular la respuesta inmune específica mediante la presentación de antígenos y la estimulación de los linfocitos.

A pesar de la existencia de la microglía y los macrófagos residentes, numerosos monocitos y macrófagos circulantes se extravasan desde ciertos vasos sanguíneos e invaden el SNC en caso de daño o infección (Prat y col., 2002).

Se han descrito dos tipos de macrófagos activados, llamados M1 y M2 (Geissmann y col., 2010; Gordon y col., 2005). Los **macrófagos M1**, o macrófagos activados clásicamente, son activados principalmente a través de TLRs (por ejemplo, en respuesta a LPS) y el IFNγ producido por linfocitos Th1 (Glass y col., 2010). Son más agresivos contra los microorganismos patógenos y pueden fagocitar y digerir células infectadas más eficientemente. Secretan altos niveles de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias como IL1β e IL12, pero niveles bajos de antiinflamatorias como IL10 (Mosser y col., 2008). Los macrófagos M1 son una de las principales fuentes de IL1 que actúa promoviendo la inflamación neutrofílica. Los **macrófagos M2**, o macrófagos activados alternativamente, son activados principalmente por IL4 e IL13 producidas por linfocitos Th2 (Glass y col., 2010), y están relacionados con la fase de reparación del tejido, eliminación de desechos (mediante la expresión de receptores basurero, como CD163) y la terminación de la reacción inflamatoria (Graeber y col., 2011). Secretan gran cantidad de citocinas antiinflamatorias como IL10, pero expresan bajos niveles de proinflamatorias, como IL12 (Mosser y col., 2008). Se ha descrito que los macrófagos M2 mejoran la supervivencia y la regeneración de las neuronas después de una lesión (Cui y col., 2009).

Esta separación de funciones lleva a pensar que las dos subpoblaciones de macrófagos contribuyen diferencialmente a la destrucción y reparación en el SNC (Kerschensteiner y col., 2009).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.3.4 Linfocitos

Los **linfocitos** son las células del sistema inmune tradicionalmente ligadas a la respuesta adaptativa. Son agranulocitos mononucleares que en general presentan un gran núcleo y escaso citoplasma. Encontramos tres grupos principales: los linfocitos T, los linfocitos B y los linfocitos "asesinos naturales" (NK, del inglés, *natural killers*).

Los **linfocitos T** son leucocitos que maduran en el timo. Presentan receptores de linfocitos T (TCR, del inglés, *T cell receptor*) en su superficie. Son de vital importancia en la lucha contra los patógenos que el sistema inmune innato no puede eliminar por sí solo, por ello, su intervención suele ser posterior en el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Harrison y col., 2008).

Existen varios subtipos de linfocitos T, los cuales pueden ser diferenciados por la presencia de distintos marcadores en su superficie. El 95% de los linfocitos T inmunocompetentes procedentes del timo poseen CD3 en su membrana (un complejo proteico compuesto por una cadena CD3γ, una cadena CD3δ y dos cadenas CD3ε). Esta población CD3+ se puede subdividir en otras dos: los linfocitos T colaboradores (Th, del inglés, *T cell helper*), caracterizados por ser CD4+; y los linfocitos T citotóxicos (Tc, del inglés, *T cell cytotoxic*), caracterizados por ser CD8+ (Harrison y col., 2008; Seder y col., 2003).

Los **linfocitos T colaboradores** (CD4+) no atacan a los patógenos o células infectadas directamente, sino que ayudan a activar a otras células inmunes, incluyendo los linfocitos Tc. Reconocen antígenos presentados mediante moléculas de superficie MHC de clase I, y se distinguen varios subtipos en función de las citocinas que secretan (Korn y col., 2009; Santana y col., 2003). Al igual que ocurre con los macrófagos M1 y M2, se ha sugerido que parte del equilibrio neuroinmunológico puede depender en gran medida de la proporción entre las subpoblaciones de linfocitos Th (Hendrix y col., 2007). Según esto, células de la clase **Th1** y **Th17**, que producen principalmente citocinas proinflamatorias como IFNγ, TNFα, linfotoxina alfa (LTα) e IL17, son las responsables en gran medida de los efectos destructivos de la inflamación en el SNC. Las células de la clase **Th2** por su parte, productoras de citocinas antiinflamatorias como IL4 y IL10, serían las principales responsables de la protección y reparación del SNC (Kerschensteiner y col., 2009).

Los **linfocitos T citotóxicos** (CD8+) sí pueden destruir directamente las células infectadas con patógenos intracelulares como virus o bacterias. Esto pueden realizarlo de dos formas, mediante la liberación de citotoxinas, perforinas y granzimas que provocan la necrosis celular, o mediante la vía FAS-FASL, provocando la apoptosis de la célula diana (Barry y col., 2002; Russell y col., 2002). Estas células también producen citocinas proinflamatorias como IFNγ y TNFα, que sirven para bloquear la replicación viral, así como para promover la activación de otros elementos del sistema inmune (Phillips y col., 2010).

Los **linfocitos B** son el otro gran grupo dentro de los linfocitos. Estos se generan en la médula ósea y maduran fundamentalmente en el bazo (Fidler, 1979). Se pueden distinguir molecularmente de los linfocitos T y NK por la presencia, entre otros, del receptor de linfocitos B (BCR, del inglés, *B cell*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

receptor) en su superficie (Rheingold y col., 2003). Este consiste en un complejo formado por un anticuerpo específico con dominio transmembranal y un componente para la transducción de señal intracelular.

Entre las funciones de los linfocitos B se encuentran la presentación de antígenos mediante MHC de clase II, la producción de citocinas o la organización del tejido linfoide (Hodgkin y col., 1995). Pero su principal y más importante función es la producción de anticuerpos. Cada linfocito B maduro está ligado a la producción de un solo tipo de anticuerpo específico. Este forma parte de su receptor BCR. Su unión al antígeno correspondiente da la señal al linfocito B para activarse. Este proceso está generalmente mediado por un linfocito Th. La activación puede llevar a la conversión del linfocito B en una **célula B de memoria**, o a una **célula plasmática** productora de anticuerpos.

Numerosos estudios relacionan cada vez más la presencia de linfocitos B en el SNC con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple. Estas células han sido comúnmente halladas en numerosas lesiones de la sustancia blanca (Hauser y col., 1986). Los infiltrados de linfocitos B en el SNC suelen ser principalmente perivasculares o meníngeos, encontrándose raramente en el parénquima nervioso (Nyland y col., 1982).

Los **linfocitos NK** son grandes células granulosas, de acción citotóxica, originarias de la médula ósea. Comparten progenitor con los linfocitos T, pero que no expresan CD3 ni TCR en su superficie. En su lugar, se caracterizan por ser CD56+ y CD16+ (Farag y col., 2002). Su presencia en el SNC así como su relación con desordenes y procesos inflamatorios en el tejido nervioso están empezando a ser estudiados en los últimos años (Poli y col., 2013). La inhibición de su infiltración se ha asociado con el agravamiento de ciertas enfermedades neuroinflamatorias, lo que sugiere que dichas células podrían tener una función inmunomoduladora (Kerschensteiner y col., 2009).

En condiciones normales, el número de linfocitos que se detectan en el parénquima nervioso es muy bajo. Incluso en contextos patológicos, una vez solventada la causa de daño o infección, los linfocitos infiltrados son rápidamente eliminados del sistema nervioso (Bechmann y col., 1999; Flügel y col., 2000). No obstante, el LCR de individuos sin ninguna enfermedad neurológica inflamatoria contiene ciertas cantidades de linfocitos T (Engelhardt y col., 2005). En humanos, estas células son principalmente linfocitos T de memoria, la mayoría, CD4+ (Kivisakk y col., 2003; Kivisakk y col., 2006).

La migración de linfocitos T en el SNC está regulada por quimiocinas producidas en el tejido nervioso y sus receptores correspondientes en los linfocitos, como CXCL12/CXCR4. Sin la inflamación del mismo, la migración de linfocitos Th fuera de los vasos sanguíneos se ve limitada al espacio perivascular que se encuentra alrededor de los mismos (Siffrin y col., 2009). Los linfocitos Tc, en cambio, presentan un mayor grado de movilidad (McCandless y col., 2006; Siffrin y col., 2009). El bloqueo de CXCR4 mediante antagonistas permite que las células Th escapen de su confinamiento perivascular y penetren más profundamente en el parénquima nervioso (McCandless y col., 2008). Estos mecanismos aseguran

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que la inmunovigilancia dentro del SNC sano se produzca a un ritmo más lento y con un mayor control que en la periferia (Wraith y col., 2012).

No obstante, debido a que la respuesta inmune innata del SNC suele ser insuficiente para controlar cierto tipo de infecciones como las de origen vírico (Savarin y col., 2008), la infiltración de linfocitos en el sistema nervioso es abundante en estos procesos.

Las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 o CCL20 son producidas por los neutrófilos en respuesta a TNFα con el fin de reclutar linfocitos Th1 y Th17 respectivamente (Ishii y col., 2010; Morita y col., 2001). Si bien el tráfico de linfocitos en el SNC es independiente de antígeno, la retención de estas células en el parénquima nervioso y la función antiviral (caracterizada por la producción de IFNγ) es dependiente del reconocimiento del antígeno en moléculas MHC por parte de los linfocitos infiltrados (Bergmann y col., 2006; Chen y col., 2005; Griffin, 2003).

La extravasación de linfocitos Th y linfocitos B parece estar basada en la expresión de ligandos a las moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM1, del inglés, *intercelular adhesion molecule 1*) y moléculas de adhesión celular vascular (VCAM, del inglés, *vascular cell adhesion molecule*) en dichas células, mientras que en el caso de linfocitos Tc, la infiltración parece ser dependiente de integrinas y VCAM (Ifergan y col., 2011a; Ifergan y col., 2011b).

1.2.4 Principales moléculas implicadas en la neuroinflamación

Además del componente celular, el componente molecular del sistema inmune también está presente en el SNC, desde la producción de factores para la comunicación celular, como citocinas y quimiocinas, a factores del sistema del complemento o péptidos antimicrobianos. Dentro de la BHE existe un sistema inmune innato separado del periférico, pero completo y funcional, que puede ser activado en caso de infección o lesión (Nguyen y col., 2002).

Un punto clave en la relación que mantienen el SNC y el sistema inmune es la comunicación química que se establece entre las células inmunes infiltradas y sus homólogos en el SNC (Kerschensteiner y col., 2003). De hecho, la expresión de muchas de estas moléculas es compartida por ambos sistemas, teniendo en ocasiones efectos sobre ambos. Se han descrito numerosos factores neurotróficos con efecto sobre el sistema inmune, así como citocinas y quimiocinas con efecto sobre las células del SNC (Kerschensteiner y col., 2009). Esto sugiere que la expresión de factores inmunológicos, por ejemplo por parte de la microglía, no tiene por qué ser sinónimo de un proceso inflamatorio, pues estas moléculas pueden tener funciones específicas en el SNC independientes de su papel en la respuesta inmune (Graeber, 2010).

Los **factores neurotróficos** son factores proteicos esenciales para el SNC. Median en procesos tales como la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal y dendrítico, la estructura y plasticidad sináptica, la expresión de neurotransmisores y la potenciación a largo plazo (Lewin y col., 1996; Thoenen

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y col., 2002). Además de estas funciones sobre neuronas y células gliales, se han descrito funciones sobre las células del sistema inmune, tales como la migración, activación, diferenciación y la presentación de antígenos locales (Flugel y col., 2001; Neumann y col., 1998; Torcia y col., 1996; Villoslada y col., 2000).

Las **citocinas** son proteínas de pequeño tamaño excretadas al medio con el fin de mediar en la comunicación intercelular. Su función principal es la regulación del mecanismo de la inflamación, habiendo citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Su síntesis en el SNC no se debe únicamente a la activación de células gliales o células inmunes reclutadas (Jacque y col., 1994). Por un lado, varias funciones centrales de las neuronas son moduladas por citocinas tales como IL1, TNFα, IL2 e IL6. Por otra parte, como ya se ha comentado, se ha demostrado que las neuronas son capaces de sintetizar algunas de estas citocinas en condiciones traumáticas específicas. Por ejemplo, una lesión en el hipocampo induce la síntesis de IL1α y TNFα (Tchélingérian y col., 1996). La expresión de otras interleucinas, interferones y factores necróticos tumorales ha sido también descrita en el SNC (Knoblach y col., 1999; Krumbholz y col., 2005; Liu y col., 2005; Neumann y col., 1997). Algunas de las citocinas más importantes en el contexto de la inflamación del SNC y relevantes para nuestro estudio son IL1β, TNFα e IFNγ.

IL1β es una potente interleucina proinflamatoria secretada fundamentalmente por macrófagos, neutrófilos (Roberge y col., 1994) y células microgliales (Bianco y col., 2005). Al igual que IL1α, se sintetiza en forma inactiva y requiere un corte proteolítico (realizado por la caspasa 1 intracelularmente u otras proteasas en el medio extracelular) para adquirir su actividad (Fantuzzi y col., 1997; Thornberry y col., 1992). Su liberación puede producirse en respuesta a TNFα, IL1, IL18 o la activación de TLRs (Dinarello y col., 1987; Franchi y col., 2009). La inyección de IL1β por sí misma es suficiente para inducir la inflamación (Masters y col., 2009). En el SNC puede despolarizar y excitar las neuronas (Xia y col., 1999) y colaborar en la fosforilación del receptor de ácido N-metil-D-aspártico (NMDA) neuronal (Zhang y col., 2008). La abundancia de IL1β en el medio se ha relacionado con efectos tóxicos para las neuronas, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que puede dar lugar a la neurodegeneración (Cacquevel y col., 2004; Rothwell y col., 1993).

TNFα, es un factor implicado en la estimulación de la fase aguda de la inflamación. Es producido principalmente por macrófagos activados (M1), pero también por otros leucocitos como linfocitos T CD4+ y NK. En el SNC puede actuar inhibiendo el crecimiento de las neuritas y su ramificación (Neumann y col., 2002), así como favoreciendo la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Butler y col., 2004).

Los **interferones** son esenciales en la respuesta a infecciones virales y desempeñan un papel complejo en la respuesta inmune (Amadori, 2007; Traynor y col., 2007). **IFNγ** es un importante activador de los macrófagos. Se ha comprobado que induce la expresión de MHC de clase I en las neuronas (Neumann y col., 1997) y promueve la diferenciación neuronal de las células madre neurales adultas (Wong y col., 2004). **IFNα** se induce principalmente ante infecciones virales (Scott y col., 2005), y su

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

expresión sostenida en el SNC se ha relacionado con el inicio de procesos neurodegenerativos (Akwa y col., 1998).

Las **quimiocinas** son una subfamilia de citocinas caracterizadas por su función quimiotáxica, es decir, su capacidad para guiar la migración de células inmunes por todo el organismo, siendo fundamentales para la infiltración de células inmunes foráneas en el SNC (Kerschensteiner y col., 2009).

El sistema CCL2/CCR2 tiene como principal función reclutar monocitos, células T de memoria y células dendríticas. CXCL1 es expresado fundamentalmente por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, y tiene la función de reclutar neutrófilos (Schumacher y col., 1992). El sistema CXCL12/CXCR4 tiene la misión de reclutar linfocitos (Bleul y col., 1996). La fractalquina (CX3CL1) y su receptor (CX3CR1) muestran un patrón de expresión peculiar: mientras el ligando es predominantemente expresado por las neuronas del SNC, el receptor se expresa principalmente en monocitos y células dendríticas del sistema inmune y en células microgliales del SNC (Harrison y col., 1998). Este patrón de expresión sugiere que la fractalquina podría recibir señales neuronales que retrasmite directamente al sistema inmunológico.

Además de esta función quimiotáxica para células del sistema inmune, las quimiocinas juegan un papel esencial en el desarrollo y funcionamiento del SNC, habiéndose descrito tales funciones en tres familias de quimiocinas: CC, CXC y CX3C (Cardona y col., 2006; Cho y col., 2008; Tsai y col., 2002).

Como ya se ha mencionado, los factores del **sistema del complemento** están presentes en el SNC de forma constitutiva, constituyendo una de las principales armas de defensa de la inmunidad innata en el tejido nervioso (Gasque y col., 2000).

1.2.5 Relaciones entre neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas

Es una idea plenamente aceptada en la comunidad científica que la respuesta inflamatoria no siempre es beneficiosa para el SNC. Por ejemplo, la presencia del cráneo como envoltura rígida del cerebro hace que las características clásicas de una respuesta inflamatoria, como el edema y la expansión tisular, produzcan un peligroso incremento en la presión intracraneal (Wilson y col., 2010). Sin embargo, es el proceso de la infiltración celular inmunitaria lo que mayores problemas parece acarrear al SNC.

La inflamación ha sido asociada con muchas enfermedades neurodegenerativas y un creciente número de otras patologías del sistema nervioso (Glass y col., 2010). Hace ya dos décadas que se describió la relación entre la **enfermedad de Alzheimer** y la respuesta inmune innata (Akiyama, 1994), caracterizada en su caso por activación microglial y astrogliosis alrededor de las placas seniles (Akiyama y col., 2000). Estudios posteriores han documentado componentes inflamatorios en la **enfermedad de Parkinson** (Block y col., 2007; McGeer y col., 2008; Nagatsu y col., 2005), habiéndose descrito la activación microglial, astrogliosis e infiltración de linfocitos (Damier y col., 1993); la **esclerosis lateral**

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

amiotrófica, cuya activación glial está marcada por la elevada producción de moléculas potencialmente citotóxicas (McGeer y col., 2002); y la **esclerosis múltiple**. Esta última es una enfermedad autoinmune compleja, que se caracteriza por la inflamación, desmielinización y degeneración axonal en el SNC. Conlleva la infiltración de linfocitos y células plasmáticas productoras de anticuerpos en la región perivascular de la materia blanca de todo el SNC y un aumento de las poblaciones de microglía y astrocitos de la región afectada (Lassmann y col., 2001). También se ha descrito la deposición de anticuerpos y factores del sistema del complemento alrededor de las lesiones desmielinizantes (Frohman y col., 2006). Esta marcada participación del sistema inmune adaptativo la distingue claramente de otras enfermedades neurodegenerativas. En condiciones fisiológicas, tras un trauma o infección que provocase desmielinización puntual de ciertos nervios, la remielinización inherente al proceso de reparación posterior puede llevarse a cabo de forma normal. Sin embargo, en los casos de inflamación crónica como la esclerosis múltiple, el proceso de remielinización está gravemente deteriorado, lo que conduce a la degeneración axonal y la eventual muerte de la neurona (Trapp y col., 2008).

Aunque la inflamación puede no ser el principal factor iniciador de las enfermedades neurodegenerativas, son cada vez más las evidencias de que procesos inflamatorios que afectan a la microglía y los astrocitos contribuyen a la progresión de estas enfermedades (Glass y col., 2010).

Bajo condiciones fisiológicas, la microglía presenta un fenotipo inactivo que está asociado a la producción de factores antiinflamatorios y neurotróficos (Streit, 2002). Cuando se activan, estas células pasan a un estado proinflamatorio con el que colaboran en la lucha contra infecciones y agentes perniciosos. Una vez resuelta la infección y reparado el daño, la microglía vuelve a su estado basal desactivado. La persistencia de estímulos inflamatorios puede provocar el mantenimiento del estado activado, resultando en la producción de factores neurotóxicos que amplifican los daños de la enfermedad subyacente (Glass y col., 2010). En otras ocasiones, no es la permanencia del estímulo, sino un fallo en los mecanismos fisiológicos de retroalimentación negativa que atenúan la respuesta a inductores y amplificadores de la inflamación, lo que provoca la persistencia y exacerbación de la respuesta inflamatoria (Glass y col., 2010).

Cuando la microglía es activada por patógenos, toxinas, restos celulares u otros factores, libera una amplia gama de productos proinflamatorios tales como eicosanoides, metaloproteinasas, proteasas (Rosenberg, 2002), y radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Deng y col., 2007) capaces de dañar a las células cercanas. También produce moléculas proinflamatorias como TNFα (Sriram y col., 2007) e IL1β (Simi y col., 2007), citocina, esta última, cuya toxicidad para las neuronas ha sido descrita tanto *in vitro* como *in vivo* (Cacquevel y col., 2004; Northrop y col., 2011; Rothwell y col., 1993). IFNγ y TNFα se han descrito también como directamente tóxicos para los oligodendrocitos (Merrill y col., 1993; Vartanian y col., 1995).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La activación microglial puede ser también una respuesta a la pérdida de neuronas, así como a la disfunción nerviosa provocada por patologías cerebrales (Graeber, 2010). El ataque microglial directo a las neuronas (neuronofagia) está estrictamente controlado, siendo un fenómeno muy raro y, con toda probabilidad, un suceso secundario (Graeber y col., 2010). Además, en neuropatologías humanas, la observación de que la microglía no ataca indiscriminadamente a las células nerviosas *in vivo* sugiere que la neurotoxicidad por microglía activada en ausencia de granulocitos o linfocitos T es poco probable o, al menos, poco común. Por tanto, si bien la activación microglial puede estar asociada con la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, algunos autores piensan que probablemente esta sea la respuesta a la pérdida neuronal y no la causa (Graeber y col., 2011).

Los resultados obtenidos a partir de imágenes cerebrales *in vivo* de la microglía activada han fomentado el interés por el papel de estas células y la neuroinflamación incluso en enfermedades psiquiátricas con componente degenerativo, como la **esquizofrenia** (Cagnin y col., 2001). En esta enfermedad, el deterioro progresivo de la conectividad neuronal se produce en presencia de neuroinflamación (Bernstein y col., 2009). Extensos estudios epidemiológicos sugieren que la esquizofrenia está asociada con infecciones gripales en la madre durante la gestación del individuo (Brown y col., 2004), y que su incidencia aumenta en pacientes que sufrieron infecciones cerebrales en la infancia (Westergaard y col., 1999).

Diversas infecciones respiratorias con virus neurovirulentos como los del **sarampión**, **paperas**, **rubeola** o **varicela** podrían causar cierto grado de neuroinflamación y pérdida neuronal que se acumularía con el tiempo (Majde, 2010). Estos virus podrían penetrar en el SNC a través de la conexión entre las fosas nasales y el bulbo olfatorio, como ya se ha descrito en el virus de la **gripe** (Majde y col., 2007). De hecho, la anosmia y otros trastornos de la olfacción se han detectado de forma temprana en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Hawkes, 2006). Aunque las infecciones víricas citadas no causen síntomas neurológicos clásicos (como convulsiones), las cefaleas, fiebres y somnolencia asociadas a estos episodios podrían estar relacionados con la inflamación cerebral (Majde, 2010). Además, algunos de estos virus presentan, como se verá más adelante, el enzima neuraminidasa en su cápside (Ebert y col., 2005; Takano y col., 1993), una sialidasa que podría estar relacionada con la muerte del epitelio ependimario, la inflamación y los procesos degenerativos posteriores.

Se ha descrito la asociación directa entre ciertos virus y algunos síndromes neurodegenerativos humanos, como la demencia por VIH (Sasseville y col., 1997), la leucoencefalopatía multifocal progresiva (Khalili y col., 2006) y posiblemente la esclerosis lateral amiotrófica (Ravits, 2005). El hecho de que no se hayan documentado asociaciones virales directas y definitivas con las enfermedades neurodegenerativas más comunes podría ser un simple reflejo del efecto “golpe y fuga” que los virus podrían estar teniendo en la patología (Atkins y col., 2000), provocando daños y activación glial al principio, pero no persistiendo a largo plazo en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las células infiltradas del sistema inmune también pueden causar daños en el tejido nervioso. Por ejemplo, los granulocitos neutrófilos ejercen una acción defensiva que puede resultar muy destructiva para el tejido circundante, debido a que su acción citotóxica es inespecífica (Fujishima y col., 1995). De hecho, la desactivación de los neutrófilos mediante el uso de anticuerpos bloqueantes (Liu y col., 2006; Romson y col., 1983) o de las señales que conducen a su reclutamiento (Abulafia y col., 2009; Kelly y col., 1996) reduce considerablemente la intensidad de la lesión que el proceso inflamatorio provoca en los tejidos. También son dañinos, aunque en menor grado, los macrófagos en estado M1 (Rock y col., 2010) (no así los que están en estado M2, que se han relacionado con la reparación del tejido (Graeber y col., 2011)). Es por ello que cualquier reacción inflamatoria en el SNC debe ser altamente regulada para minimizar el daño neuronal, sobre todo si tenemos en cuenta la nula o extremadamente baja tasa de renovación de estas células (Galea y col., 2007).

Aunque la inducción de la inflamación sea específica de cada enfermedad neurodegenerativa, una vez desencadenada, parece haber una convergencia considerable en la transducción de señales y los mecanismos efectores que conducen a la amplificación, neurotoxicidad y muerte neuronal. La activación de la microglía (en especial a través de TLRs) y de los astrocitos parece ser uno de los puntos comunes de la inflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas, así como la producción de moléculas amplificadoras y efectoras, como las citocinas TNFα, IL1β e IL6 (Glass y col., 2010).

Si bien son abundantes los trabajos que demuestran la relación entre la degeneración neuronal y la activación inflamatoria de la microglía y células inmunes foráneas, muchos autores siguen discrepando entre cuál de estos dos factores es causa del otro en el marco de las enfermedades neurodegenerativas. Sea como fuere, la mayoría coincide en que la activación de la microglía juega un papel importante en la fisiopatología de estas enfermedades, por lo que la supresión de la activación microglial es actualmente una de las propuestas en estudio para intentar prevenir la progresión de la neurodegeneración (Bi y col., 2011).

1.2.6 Inflamación parenquimal (encefalitis) vs. inflamación en el líquido cefalorraquídeo (meningitis y ventriculitis)

La infiltración de células foráneas del sistema inmune al parénquima nervioso es un fenómeno altamente controlado y restringido, incluso ante la presencia de agentes infecciosos que pudiesen haber colonizado el tejido neural. En la mayoría de los casos, la microglía y los astrocitos asumen la defensa del cerebro (Andersson y col., 1992; Anthony y col., 1997; Perry y col., 1995), evitándose en la medida de lo posible la extravasación masiva de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo (encefalitis). En estas circunstancias, el riesgo de aparición de enfermedades degenerativas autoinmunes es relativamente bajo. Sólo en caso de que la infección progrese y escape al control de las células inmunocompetentes residentes, tiene lugar la extravasación de células sanguíneas y la consecuente encefalitis. Este fenómeno es generalmente causado por virus, cuya rápida proliferación hace necesaria

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la participación de leucocitos sanguíneos para su control. Los más comunes son el virus de las paperas, el herpes simple, el citomegalovirus, la varicela, el enterovirus o el virus de la coriomeningitis linfocítica (Ziai y col., 2008).

Sin embargo, como vimos en apartados anteriores, los microorganismos patógenos pueden alcanzar el SNC por distintas vías, entre ellas, la infección del LCR tanto interior (ventrículos cerebrales) como exterior (espacio subaracnoideo) a través de los plexos coroideos o la lámina cribosa olfatoria. En estos casos, y en contraste con la infección del parénquima cerebral, la presencia de agentes patógenos en los ventrículos y los espacios meníngeos provoca una invasión masiva de células inflamatorias desde los vasos sanguíneos coroideos y meníngeos, dando lugar a ventriculitis y/o meningitis respectivamente (Casarsa y col., 2003; Engelhardt y col., 2001; Marques y col., 2007). Estos fenómenos están generalmente asociados a las infecciones bacterianas, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y especies de *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Acinetobacter* (Ziai y col., 2008).

A pesar de que la cantidad de células inflamatorias infiltradas puede ser muy alta en casos de ventriculitis y meningitis, estas rara vez invaden el parénquima nervioso. Esto podría deberse en gran medida a la existencia del epitelio ependimario, que actuaría como una barrera de protección contra la invasión de células inflamatorias desde el LCR hacia el parénquima cerebral (Bacher y col., 2002; Canova y col., 2006; Kim y col., 2004). Es por ello que cualquier alteración de estas barreras durante la inflamación de ventrículos y meninges puede implicar un alto riesgo de invasión del parénquima cerebral por células inflamatorias y, por lo tanto, la posibilidad del desarrollo de procesos neurodegenerativos posteriores.

1.3 LA NEURAMINIDASA COMO CAUSA ASÉPTICA DE NEUROINFLAMACIÓN

Diversos estudios han mostrado que el enzima neuraminidasa (NA), una sialidasa presente en la superficie de ciertos virus y bacterias, tiene la capacidad de producir daños celulares e inflamación en el SNC en condiciones asépticas, esto es, utilizándola de forma purificada (Gomez-Roldan y col., 2008; Grondona y col., 1998; Grondona y col., 1996).

A continuación analizaremos las principales características de este enzima, así como las cualidades que le convierten en un importante factor de virulencia de muchos virus y bacterias y su relación con diversas patologías del SNC.

1.3.1 Características y actividad del enzima

La neuraminidasa, también llamada sialidasa o N-acetilneuraminato glucohidrolasa (CE 3.2.1.18) se ha encontrado en algunas células de mamíferos y en multitud de bacterias y virus patógenos, habiendo pocos informes de su detección y aislamiento en microorganismos no infecciosos (Kabayo y col., 1977). Su aparición y evolución ha estado estrechamente ligada a la de los ácidos siálicos en los

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

deuteróstomos, los cuales están presentes en la superficie de muchas de sus células, jugando un papel crucial para el sistema inmune (Varki y col., 2012).

La estructura de la NA puede variar dependiendo de si su origen es eucariota, vírico o bacteriano, aunque su actividad enzimática es esencialmente la misma. El enzima de origen viral es un tetrámero que contiene al menos ocho puentes disulfuro conservados en todas las cepas, y cuya actividad se ve incrementada por su unión a Ca^{++} (Chong y col., 1991). Los enzimas de origen bacteriano son casi siempre monómeros que contienen un solo puente disulfuro. Los hay que no se unen a iones (de unos 42 kDa, como los de *Clostridium sp.* y *Salmonella sp.*) y los que requieren la unión a un ion metálico para funcionar (de unos 82 kDa, como los de *Vibrio sp.*) (Crennell y col., 1993). La comparación de las estructuras vírica y bacteriana muestra una notable similitud en la disposición espacial de los residuos catalíticos, a pesar de existir diferencias en otras regiones del enzima (Crennell y col., 1993).

De forma general, se trata de un enzima exoglucosidasa de un peso molecular medio de 60 kDa que hidroliza el enlace de unión de residuos terminales de ácido siálico con cadenas glucídicas. Actúa preferentemente sobre aquellos residuos unidos mediante enlaces α2-3, aunque también tiene cierta afinidad por otro tipo de enlaces (NA bacteriana: α2-3 > α2-8 = α2-6; NA vírica: α2-3 > α2-8) (Drzeniek, 1967; Drzeniek y col., 1970). Libera así el ácido siálico terminal, dejando expuesto el siguiente azúcar de la cadena de oligosacáridos.

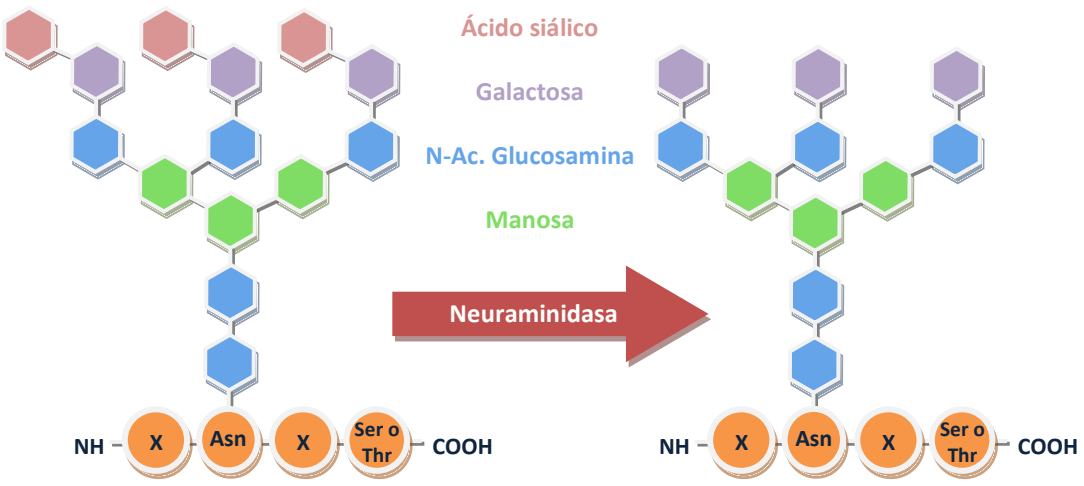


Figura I-06. Acción enzimática de la neuraminidasa. *Estructura típica del oligosacárido unido a la asparagina en glucoproteínas de membrana antes y después de la actuación del enzima. (Modificado de Albert y col., 1994). **X**: cualquier aminoácido, **Asn**: asparagina, **Ser**: serina, **Thr**: treonina.*

En el caso concreto del ventrículo cerebral, el enzima escinde los residuos de ácido siálico terminales de los oligosacáridos de glucolípidos y glucoproteínas que conforman el glucocálix de las células, tanto ependimarias como del parénquima nervioso subyacente. En la mayoría de las cadenas glucídicas pegadas a proteínas, el ácido siálico terminal está unido a un residuo de galactosa mediante enlace α2-3 (Kornfeld y col., 1985), por ello, al retirar este residuo, las cadenas glucídicas del glucocálix

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ependimario exponen un residuo terminal de galactosa. La actuación de este enzima sobre el glucocálix de las células ependimarias puede ser demostrada mediante tinciones histoquímicas con distintas lectinas (epígrafe 3.5.3.2).

1.3.2 La neuraminidasa como factor de virulencia en virus y bacterias

La NA es un enzima presente en multitud de bacterias y virus patógenos. De hecho, es un componente esencial para su patogenicidad y supervivencia (Jang y col., 2009; Kelly y col., 1970; O'Toole y col., 1971). Tanto es así, que una sola mutación en el complejo hemaglutinina-neuraminidasa de la superficie del virus de la parotiditis es suficiente para menoscabar profundamente su capacidad patogénica, siendo esto de mucho interés para el diseño de nuevas vacunas (Malik y col., 2007). Algunos de los principales compuestos antivirales son inhibidores de la actividad de la NA, como por ejemplo oseltamivir (Lew y col., 2000) o zanamivir (Jackson y col., 2011). Pero a pesar de las múltiples evidencias del importante papel de la NA en el proceso neuroinflamatorio provocado por ciertos patógenos, se sabe poco sobre su mecanismo exacto de acción y los eventos a los que da origen su administración.

En el caso de los virus, como el de la gripe, se han descrito tres funciones importantes de este enzima relacionadas con el proceso infeccioso (Bhatia y col., 2007):

1) Escinde el ácido siálico celular de los receptores a los que están unidas las partículas virales recién formadas en la célula huésped (Moscona, 2005). Sin su actuación, los virus recién formados se mantendrían unidos a la célula en la que se produjeron.

2) Evita la agregación de las partículas víricas recién liberadas, favoreciendo la difusión y dispersión de los nuevos viriones (Englund, 2002; Gubareva y col., 2000).

3) Promueve la penetración viral a través de la mucina rica en ácido siálico que cubre y protege los distintos epitelios a través de los cuales muchos virus se replican y propagan (Matrosovich y col., 2004; Moscona, 2005).

Como ya hemos visto en otros apartados, son cada vez más los trabajos y publicaciones que relacionan síndromes neurodegenerativos con procesos inflamatorios previos provocados por infecciones o daños en el SNC. Algunos de los microorganismos patógenos cuya respuesta inflamatoria se asocia con estas enfermedades, secretan o presentan NA en sus superficies, como por ejemplo: el virus de la gripe (Ebert y col., 2005; Molgaard y col., 1986; Takahashi y col., 2001), la bacteria *Clostridium perfringens* (Finsterer y col., 2007) o el virus de la parotiditis (Takano y col., 1993).

Por otra parte, el ácido siálico es comúnmente un residuo terminal en la fracción glucídica de numerosas glucoproteínas, glucolípidos y oligosacáridos involucrados en gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta inmune (Katoh y col., 2010; Schauer, 2000). En muchos casos la eliminación de este residuo por parte de las sialidasas se acompaña de una pérdida de actividad biológica (Braunstein y col., 1971; Morell y col., 1971), lo que influye enormemente en muchos

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

procesos, tales como la diferenciación y crecimiento celular, la apoptosis o la señalización y la comunicación entre las células. Esta pérdida de función se produce en muchos casos a través de un cambio conformacional de las glucoproteínas, lo que enmascara o elimina los sitios funcionales de estas moléculas (Miyagi y col., 2007).

Un ejemplo de ello son los gangliósidos, glucoesfingolípidos que contienen ácido siálico, altamente expresados en el SNC (Tettamanti y col., 1973). Alteraciones en su expresión se han relacionado con trastornos neuronales, incluyendo convulsiones, degeneración axonal y degeneración mielínica (Yamashita y col., 2005). Una de las funciones de estos glucolípidos parece ser la de estabilizar y garantizar la correcta interacción entre la mielina y el axón en las fibras nerviosas. Esto se realiza mediante la participación de una lectina endógena de unión a gangliósidos, la glucoproteína asociada a la mielina (MAG, del inglés, *myelin-associated glycoprotein*), que actúa como puente entre la mielina y el ácido siálico de los gangliósidos cerebrales GD1a y GT1b (Collins y col., 1997; Sheikh y col., 1999; Yang y col., 1996). Cabría pensar por tanto, que la eliminación del ácido siálico de los gangliósidos por parte de la NA podría alterar su funcionamiento desembocando en procesos degenerativos, aunque esto no ha sido comprobado experimentalmente.

La capacidad antigénica de la NA para desencadenar respuestas inmunes independientes de su actividad enzimática ha sido estudiada principalmente en virus. Los anticuerpos desarrollados contra el enzima no bloquean la unión del virus a las células, a pesar de bloquear en ocasiones su actividad enzimática, por lo tanto, estos no se consideran "neutralizantes" en el sentido clásico. Ello ha dado lugar a la idea general de que la NA no tiene una capacidad antigénica importante en comparación con otros factores proteicos de los virus infecciosos (Air, 2012).

Otro punto importante en la patogenicidad de la NA es la sensibilización que provoca la eliminación del ácido siálico a la lisis mediada por el sistema del complemento en ciertos tipos celulares. Esto se ha comprobado, por ejemplo, en las células de carcinoma humano (Donin y col., 2003), los eritrocitos (Lauf, 1975; Pangburn y col., 1978), en células de ganglios linfáticos de conejo (Ray y col., 1975), o en patógenos como *Neisseria meningitidis* (Jarvis y col., 1987). Además, la desactivación de C3b por parte de los factores H e I se produce de manera más eficiente en la superficie celulares ricas en ácido siálico (Kazatchkine y col., 1979; Meri y col., 1990; Pangburn y col., 1978). De esta manera, la alta expresión de ácido siálico superficial se ha correlacionado positivamente con una menor activación del sistema del complemento (Donin y col., 2003).

1.3.3 Destrucción del epitelio ependimario por neuraminidasa

Existen varias patologías que pueden provocar la interrupción de las uniones intercelulares en el epéndimo, causando liberación de células ependimarias al LCR. Estos casos suelen acabar con el desarrollo de una hidrocefalia por obstrucción del acueducto cerebral, como es el caso de los ratones hyh (*hydrocephalus with hop gait*) (Bronson y col., 1990; Perez-Figares y col., 1998). Estos presentan una

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mutación puntual en el gen de la proteína de unión sensible a N-etilmaleimida, implicada en la translocación de N-cadherina y b-catenina. El fallo de las uniones celulares lleva a un desprendimiento del epéndimo (Batiz y col., 2006; Jimenez y col., 2001; Paez y col., 2007; Wagner y col., 2003).

La inyección intracerebroventricular (ICV) de NA, la cual elimina el ácido siálico terminal del glucocálix, provoca la muerte ependimaria a nivel de los ventrículos laterales de las ratas inyectadas. Esto produce el desprendimiento del epitelio, lo que a su vez induce un colapso y obliteración del acueducto cerebral y, en última instancia, la hidrocefalia (Grondona y col., 1996). A continuación se describirán las características principales de este epitelio, con el objetivo de comprender la importancia y los efectos de su destrucción.

1.3.3.1 El epitelio ependimario

El SNC de los cordados deriva del engrosamiento de las paredes del tubo neural. En el adulto, los restos de la luz de este tubo forman un complejo de cavidades y canales que constituyen el sistema ventricular y el canal central de la médula espinal. Tanto los ventrículos cerebrales como el canal central medular, están tapizados por un epitelio llamado epéndimo.

En los ventrículos, este epitelio tiene su **origen embriológico** en las células de la glía radial, apareciendo entre los estadios E14 y E16 de los roedores (Das, 1979; Spassky y col., 2005), aunque su maduración se produce en la primera semana posnatal. Debido a que derivan de las células de la glía radial, las cuales actúan como células madre en etapas embrionarias, se sugirió que las células ependimarias podrían tener la capacidad de actuar como células madre neurogliales (Johansson y col., 1999). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los ependimocitos maduros son células posmitóticas sin capacidad de división (Spassky y col., 2005).

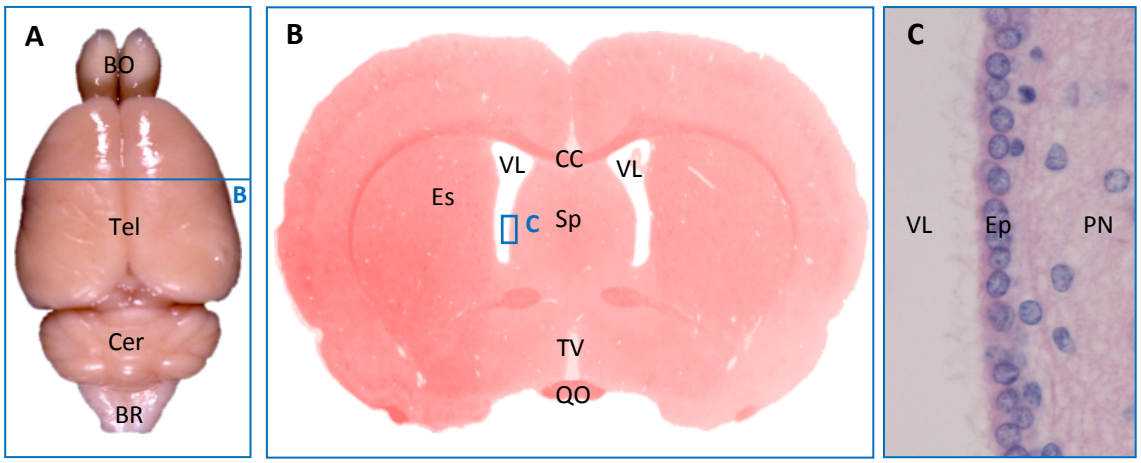


Figura I-07. Ventrículos laterales y epéndimo de rata. A: *vista dorsal del encéfalo de rata.* ***B:*** *corte coronal del cerebro de rata al nivel marcado en A.* ***C:*** *detalle del epitelio ependimario de la pared ventricular.* ***BO****: bulbo olfatorio,* ***Tel****: telencéfalo,* ***Cer****: cerebelo,* ***BR****: bulbo raquídeo,* ***Sp****: séptum,* ***Es****: estriado,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***CC****: cuerpo calloso,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***QO****: quiasma óptico,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La región más extensa del epéndimo la conforma un epitelio simple cúbico o cilíndrico, multiciliado y con microvellosidades. Este tapiza la mayor parte de la frontera parénquima-LCR. Sin embargo, existen zonas de la pared ventricular cuyas células ependimarias presentan características diferentes, conformando un epitelio especializado. Un ejemplo de ello lo constituyen las células ependimarias de algunos órganos circunventriculares neurohemales como los plexos coroideos, la eminencia media, el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lámina terminal y el área postrema. En todos ellos, los capilares sanguíneos están fenestrados y el parénquima nervioso se halla inmerso en un ambiente hemal, lo cual implica que en estas regiones el epitelio ependimario representa la principal barrera entre el ambiente neural y hemal. Es por esta función de barrera que una de las diferencias más notables entre estos epitelios especializados y el epitelio ependimario ventricular es la sustitución (o adición) de sus típicas uniones tipo gap por uniones estrechas latero-apicales. Estas aíslan eficazmente el LCR de ese parénquima hemal (Johanson y col., 2011). Así ocurre, por ejemplo, en los plexos coroideos, estructuras suspendidas en el LCR con diversos puntos de anclaje a la pared del lateral, tercer y cuarto ventrículos. Su amplia superficie está constituida por una monocapa de células ependimarias especializadas en la producción de LCR mediante la translocación de sustancias desde el torrente sanguíneo (Wolburg y col., 2010).

En los órganos circunventriculares no neurohemales la BHE persiste. En estas regiones el epéndimo muestra algunas diferenciaciones características pero no uniones estrechas. En este grupo encontramos el receso colicular, el órgano subcomisural y probablemente zonas ependimarias de la habénula y el suelo del cuarto ventrículo (Leonhardt, 1980).

La porción ventral del tercer ventrículo está tapizada por ependimocitos especializados, llamados tanicitos, células de aspecto similar a los ependimocitos en su región apical, pero que no son multiciliadas y se caracterizan por presentar largas prolongaciones basales (Horstmann, 1954).

Como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte del sistema ventricular está tapizado por un epitelio cúbico simple (o cilíndrico en algunas regiones) multiciliado. La unidad celular básica de este epitelio sería la célula ependimaria multiciliada o ependimocito.

Los **ependimocitos** son células gliales cuboidales de gran tamaño, pudiendo llegar a los 15 µm de diámetro en mamíferos (Westergaard, 1969). Presentan un núcleo esférico regular, sin invaginaciones, centrado y muy grande en relación al tamaño total de la célula, así como eucromático, indicativo de una gran actividad transcripcional. Esto, sumado a la gran cantidad de mitocondrias de su citoplasma y la alta presencia de enzimas oxidativas, las define como células muy activas metabólicamente (Mitro A, 1977). Presentan además gran número de microfilamentos en su citoplasma, entre ellos, filamentos intermedios de vimentina (Hirano y col., 1967).

La superficie apical de estas células, que está en contacto con el LCR, presenta multitud de microvellosidades, así como un penacho de **cilios** que conforman una roseta de hasta 60 en el caso de la rata (Brightman y col., 1963). Estos tienen como principal objetivo contribuir a la movilidad del LCR

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Cathcart y col., 1964; Worthington y col., 1963). Su batido coordinado podría estar facilitado por la comunicación celular a través de las uniones tipo gap o a través de la inervación basal (Del Bigio, 2010). El cometido de las **microvellosidades** parece ser el de aumentar la superficie a través de la cual se produce un intercambio de sustancias entre el citoplasma y el LCR (Del Bigio, 1995).

Existe una **lámina basal** rudimentaria entre las células ependimarias y la capa de astrocitos periventriculares (Leonhardt y col., 1975). La membrana basal de los ependimocitos se caracteriza por presentar ciertas prolongaciones o extensiones que conectan a distintas células y estructuras subyacentes al epitelio ependimario, como astrocitos o vasos sanguíneos.

A pesar de que no se conoce ninguna molécula que sea exclusivamente expresada por el epitelio ependimario multiciliado, sí que existen **marcadores** que nos permiten identificar estas células de forma bastante específica en tu entorno anatómico. Entre los más usados encontramos los marcadores vimentina y βIV-tubulina.

La **vimentina** (Vim) es una proteína estructural que forma filamentos intermedios de tipo III. Su función principal es la de posicionar el núcleo, retículo endoplasmático y mitocondrias en el citoplasma (Katsumoto y col., 1990). Se expresa en la mayoría de las células mesenquimales. Es fuertemente expresada en el epitelio ependimario de los roedores (Andres y col., 2001; Doetsch y col., 1997; Lauro y col., 1991) no así en cambio, en el de humanos y otros primates (Sarnat, 1992a).

Otro marcador frecuentemente utilizado para poner de manifiesto las células ependimarias es la **βIV-tubulina**, presente en los cilios de estas (Coskun y col., 2008) y otras muchas células ciliadas del organismo (Jensen-Smith y col., 2003), así como en algunas otras células del sistema nervioso, como los oligodendrocitos (Terada y col., 2005).

Al igual que otras muchas células epiteliales, las células ependimarias presentan un **glucocálix** que cubre su parte apical, en contacto con el LCR. Dicho glucocálix está formado por las porciones glucídicas de las glucoproteínas y glucolípidos presentes en la membrana plasmática. En el epitelio ependimario, el último residuo de estas cadenas glucídicas es una molécula de **ácido siálico** (ácido N-acetil-neuramínico), seguido de un residuo de galactosa (Grondona y col., 1996; Varki, 1992). Entre sus funciones, encontramos la de conferir carga eléctrica negativa a la superficie ependimaria, lo que podría contribuir a evitar el apelmazamiento de los cilios así como la obliteración de las paredes del ventrículo en sus regiones más estrechas (Pérez-Fígares y col., 2001). Estas células también son ricas en gangliósidos, glucolípidos con residuos de ácido siálico (Graus y col., 1984; Yates y col., 1999). Además, la presencia de este residuo ácido podría entorpecer la deposición del MAC del complemento e incrementar la afinidad por el factor H, que previene la activación del sistema del complemento por la vía alternativa (Lauf, 1975; Pangburn, 2000).

Respecto a la adhesión celular, los ependimocitos presentan varios tipos de complejos de unión. Las **uniones en hendidura (tipo gap)** son nexos comunicantes entre células ependimarias contiguas y también entre ependimocitos y astrocitos subependimarios (Zahs, 1998). Estas uniones están formadas

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

principalmente por la proteína conexina-43 (Chanson y col., 2007; Rash y col., 2001). A esta conexina se asocia también la aquaporina-4 (Li y col., 2009), que además de estar en estas uniones, se encuentra repartida por la membrana basolateral (Jung y col., 1994), jugando un importantísimo papel en el equilibrio hídrico y osmótico del LCR y del medio intercelular (Amiry-Moghaddam y col., 2003).

Las células ependimarias presentan también **uniones adherentes** (*zonula adherens*) bien desarrolladas (Alvarez y col., 2007a; Lippoldt y col., 2000), así como frecuentes **desmosomas**. Este tipo de uniones está mediado por cadherinas, moléculas de adhesión transmembrana dependientes de calcio. En las células ependimarias de mamíferos se expresan N-cadherina (cadherina neural, o tipo 2) (Shen y col., 2008) y E-cadherina (cadherina epitelial, o tipo 1) (Karpowicz y col., 2009). Estas interaccionan con las cadherinas de la célula contigua por su lado extracelular y con p120-catenina y β-catenina en su región intracelular (Redies y col., 1996).

Se ha descrito que todo el epitelio ventricular expresa las proteínas ocludina y ZO-1, típicas de las **uniones estrechas** (*zonula occludens*) (Del Bigio, 2010). Sin embargo, estas no llegan a formar uniones estrechas funcionales en el epéndimo multiciliado (Brightman y col., 1969; Cupedo y col., 1985; Nakamura y col., 1993), lo cual sí ocurre en el epéndimo especializado de los órganos circunventriculares neurohemales como los plexos coroideos (Del Bigio, 1995; Rodriguez y col., 1996). El patrón puntiforme de la inmunorreactividad a la proteína ZO-1 indica la discontinuidad de las uniones estrechas entre las células ependimarias en ratas y ratones (Petrov y col., 1994; Smith y col., 1992). La lectina cerebelar soluble (CSL, del inglés, *cerebellar soluble lectin*), una proteína endógena de unión a manosa, está presente en los cilios y uniones estrechas entre las células ependimarias, lo que sugiere que las interacciones entre hidratos de carbono y lectina podrían desempeñar un papel importante en el mantenimiento de las uniones estrechas y, por lo tanto, en la impermeabilidad e integridad de la capa ependimaria (Perraud y col., 1988).

Además de las uniones mencionadas, la superficie del epéndimo presenta **moléculas de adhesión celular**. Se ha descrito la presencia de ICAM1 y VCAM1. Se piensa que estas moléculas podrían mediar la adhesión de las células inflamatorias a la superficie ependimaria, pues su expresión aumenta durante los procesos infecciosos (Deckert-Schluter y col., 1994). También se ha descrito la expresión de la molécula de adhesión celular neural (NCAM, del inglés, *neural cell adhesion molecule*) en algunas regiones ependimarias de ratones, ratas y humanos (Filiz y col., 2002; Wagner y col., 2003).

El epitelio ependimario expresa también **moléculas reguladoras del sistema del complemento** (CRegs, del inglés, *complement regulators*). La principal es la CD59 o proteína inhibidora del complejo de ataque a la membrana (MAC-IP, del inglés, *membrane attack complex inhibitory protein*), glucoproteína transmembrana que inhibe la polimerización del factor C9 sobre el complejo C5b-8 (Canova y col., 2006; Gasque y col., 2000). Pero también expresan DAF (CD55) a bajo nivel, así como MCP (CD46) y CR1 (CD35), estas dos últimas, sólo en condiciones inflamatorias (Canova y col., 2006). Además, es muy probable que en su superficie apical se encuentre el factor H, molécula reguladora del complemento

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que tiene la capacidad de unirse al ácido siálico de la membrana celular, acelerando la desactivación del complejo C3 convertasa de la vía alternativa del complemento (Pangburn y col., 2000).

Las células ependimarias presentan una amplia variedad de funciones en el SNC. Además de su tradicionalmente atribuido papel como barrera de permeabilidad selectiva entre el parénquima nervioso y el LCR, este epitelio realiza funciones tróficas, de transporte molecular y de comunicación celular, e interviene en el movimiento del LCR, la regulación de la neurogénesis de la zona subventricular o la respuesta inmune (Del Bigio, 2010).

Este epitelio constituye una verdadera barrera morfofuncional entre el LCR que ocupa los ventrículos y el parénquima nervioso, controlando el tránsito de metabolitos en ambos sentidos y, por tanto, el equilibrio químico de los espacios extracelulares y ventriculares (Kuchler y col., 1994; Rodriguez y col., 2005). De esta forma, regula la homeostasis del LCR y ofrece protección al tejido nervioso frente a sustancias presentes en el mismo.

El epéndimo fetal desempeña un papel importante en gran número de procesos durante el desarrollo del sistema nervioso. Uno de ellos es el transporte de nutrientes antes del desarrollo de las redes capilares (Sarnat, 1992b), función que conserva en gran medida en el animal adulto, colaborando en la difusión de péptidos (Chodobski y col., 2001), nucleósidos (Redzic y col., 2005) y vitaminas (Spector y col., 2006) entregados a través del LCR y los plexos coroideos hacia el parénquima nervioso.

El LCR es fundamentalmente producido por el epéndimo especializado de los plexos coroideos (70% v/v, 30% v/v creado por la pared ventricular) como un filtrado selecto a partir del plasma que circula por su interior (Sakka y col., 2011). Esto crea una corriente de presión desde los ventrículos laterales hacia el resto del sistema ventricular que, sin embargo, no es suficiente para asegurar la correcta circulación del LCR. Es por ello que el epitelio ependimario multiciliado de las paredes ventriculares juega un papel fundamental en la circulación de este fluido, además de contribuir al control de su composición (Bruni, 1998). Dicha función mecánica la lleva a cabo a través del batido de sus cilios, creando corrientes continuas en la superficie del epitelio que impulsan al LCR a través de las cavidades ventriculares (Milhorat, 1969; Roth y col., 1985). Estas corrientes se dirigen hacia la región anterior en la mitad dorsal de los ventrículos y hacia la región posterior en la mitad ventral, lo que favorece la circulación no turbulenta del líquido en el interior de los ventrículos y facilita su paso de uno a otro a través de sus conexiones. Además, el movimiento del LCR en la superficie ependimaria ha sido relacionado con la migración de neuroblastos en la zona subventricular (ZSV) (Sawamoto y col., 2006). Diversos factores que impiden el correcto funcionamiento de los cilios derivan en una dilatación progresiva de los ventrículos e hidrocefalia (Banizs y col., 2005; Ibanez-Tallon y col., 2004) lo que demuestra la importancia del movimiento ciliar en la estabilidad del sistema ventricular.

Se ha comprobado que el epitelio ependimario juega también un papel importante en la neurogénesis de animales adultos (Lim y col., 2000; Peretto y col., 2004), así como en la correcta

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfatorio y en la elección del linaje neuronal (Gomez-Roldan y col., 2008).

Además de las funciones mencionadas, el epitelio ependimario está involucrado en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en los ventrículos (Kim y col., 2004) y, quizás, en el parénquima nervioso circundante durante procesos infecciosos del SNC (Bacher y col., 2002; Ritchie y col., 2002).

Normalmente existe un tráfico altamente regulado de células y moléculas del sistema inmune a través de la BHE. Tanto el epéndimo como los plexos coroideos contribuyen a esta labor con el fin de controlar el estado inmunológico del LCR (Prendergast y col., 2009).

Tanto el epéndimo como los plexos coroideos y los órganos circunventriculares son vulnerables al ataque de ciertos patógenos y sustancias tóxicas. Algunos virus de transmisión sanguínea y agentes parasitarios tienen predilección por estos epitelios, lo que les facilita la entrada al SNC. Es por ello que la integridad de los epitelios ependimarios resulta esencial para la preservación y el mantenimiento de todo el sistema nervioso.

1.3.3.2 Modelo de destrucción del epitelio ependimario

En 1996, el grupo de investigación del Área de Fisiología Animal de la Universidad de Málaga demostró que una única inyección ICV de NA de *Clostridium perfringens* en rata provocaba la muerte y el desprendimiento de gran parte del epitelio ependimario multiciliado. Esto iba seguido de un proceso inflamatorio agudo en ventrículos y meninges, y un cuadro hidrocefálico por estenosis del acueducto de Silvio (Grondona y col., 1996). Además, se comprobó que entre dos y cinco meses después de la inyección, algunas ratas parecían desarrollar un síndrome desmielinizante central agudo (resultados sin publicar).

Posteriormente a estos experimentos, y con el fin de investigar la neurogénesis subventricular en ausencia de epitelio ependimario, se desarrolló un modelo experimental en el que se conseguía, mediante una dosis menor de NA, provocar un daño ependimario parcial limitado al ventrículo inyectado, manteniéndose intacto el ventrículo contralateral (Gomez-Roldan y col., 2008). Este modelo ha sido utilizado también por otros autores fuera de la Universidad de Málaga (Carbonell y col., 2005; Luo y col., 2008). Se comprobó que el daño del epitelio ependimario se producía inmediatamente después de la inyección (entre la primera y la segunda hora posinyección) y siempre antes del comienzo de la respuesta inflamatoria (a partir de la cuarta hora posinyección), lo que indicó que la muerte ependimaria no era consecuencia de la actividad de las células inflamatorias, sino de la presencia de NA en el LCR.

Es importante recordar que muchas de las especies víricas y bacterianas que invaden el SNC y provocan la muerte de las células ependimarias presentan NA en su cápside o superficie, como enzima que participa en el mecanismo invasivo (Müller, 1976). Por tanto, existe la posibilidad de que la

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

destrucción del epéndimo sea un efecto colateral de este enzima más que un efecto directo de la invasión vírica. Se pensó posible que, de alguna manera, la pérdida del ácido siálico, muy abundante en el glucocálix de las células ependimarias, debía de estar relacionada con la muerte ependimaria por necrosis.

Como barrera física entre tejido nervioso y sistema ventricular, la pérdida ependimaria supondría un daño grave e irreversible en el SNC que produciría alteraciones en la homeostasis del LCR y que podría permitir un mayor acceso al parénquima nervioso por parte de posibles patógenos y células inflamatorias desde el LCR, lo que podría causar, a largo plazo, el desarrollo de síndromes neurodegenerativos.

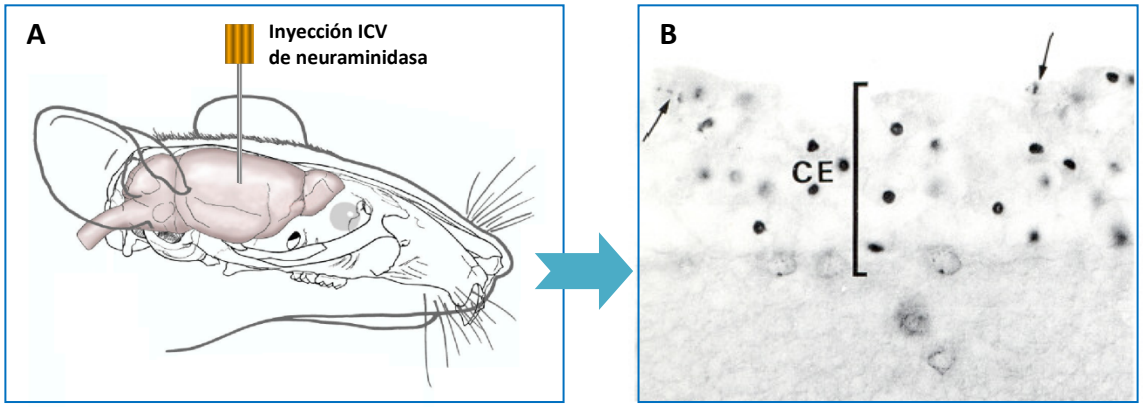


Figura I-08. Modelo de destrucción de epitelio ependimario mediante inyección ICV de neuraminidasa. ***A:*** *esquema de la inyección intracerebroventricular de neuraminidasa en rata.* ***B:*** *imagen de la muerte y desprendimiento celular provocado en el epitelio ependimario (tomado de Grondona y col., 1996).* ***CE****: células ependimarias,* ***flechas****: fragmentos celulares.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

El modelo de inyección ICV de NA descrito ha sido utilizado como herramienta mediante la que analizar distintos fenómenos y procesos del SNC, como el efecto de la eliminación del ácido siálico en la polimerización de la fibra de Reissner, o la neurogénesis subventricular en ausencia de epitelio ependimario. Sin embargo, a excepción de la muerte ependimaria, los acontecimientos inflamatorios y degenerativos provocados por la inyección de NA en el ventrículo no han sido estudiados en profundidad.

El presente trabajo pretende ser una primera aproximación al estudio de los procesos lesivos ligados a este modelo: la muerte y desprendimiento de parte del epitelio ependimario, la inflamación ventricular y meníngea, y la degeneración de tractos mielínicos; analizando además, la posible implicación del sistema del complemento. Un mayor conocimiento de estos procesos permitiría proponer este modelo, en un futuro, como un modelo de inflamación aséptica en el SNC.

Se plantearon, por tanto, dos objetivos generales en esta Tesis Doctoral, un primero más descriptivo, no sujeto a hipótesis experimentales, y un segundo más analítico, que pretende corroborar una hipótesis experimental concreta (expuesta más adelante). A continuación se describen ambos, junto con sus objetivos específicos.

2.1 OBJETIVO 1

DESCRIBIR LOS ACONTECIMIENTOS LESIVOS, INFLAMATORIOS Y DEGENERATIVOS QUE TIENEN LUGAR A DIFERENTES TIEMPOS TRAS UNA ÚNICA INYECCIÓN ICV DE NEURAMINIDASA.

Como hemos visto anteriormente, gran parte de los microorganismos que invaden el SNC lo hacen a través de las meninges o los ventrículos cerebrales. Algunos trabajos ponen de manifiesto una relación directa entre la infección del LCR por ciertos virus, entre los que destacan los mixovirus (paperas, gripe, sarampión), la muerte ependimaria y el desarrollo de hidrocefalia (Johnson y Johnson, 1969; Margolis y Kilham, 1969; Takano y col., 1993; Paez y col., 2007). Otros trabajos demuestran la relación entre las infecciones víricas durante la gestación o la infancia y el desarrollo de patologías neurodegenerativas en la vida adulta. Tal es el caso de la relación entre el virus de Epstein-Barr (causante de la mononucleosis infecciosa) y la esclerosis múltiple (Marrie y Wolfson, 2002; Ascherio, 2008), el virus de la gripe en madres gestantes con la esquizofrenia en el hijo adulto (Ebert y Kotler, 2005; Fatemi y col., 2008) o el sarampión y la panencefalitis esclerosante subaguda (Schneider-Schaulies y col., 2003; Rima y Duprex, 2005). En la mayoría de los casos, es la reacción inflamatoria que sigue al proceso infeccioso la que estaría directamente relacionada con la neurodegeneración (Lucas y col., 2006).

El hecho de que los mismos agentes infecciosos se hayan relacionado con la pérdida del epitelio ependimario y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas sugiere que puede existir una relación entre ambos procesos. Se sabe que tras una infección del SNC, las células inflamatorias del sistema inmune no siempre alcanzan el parénquima nervioso (Ransohoff y Brown, 2012). Por otra parte, está documentado que el epitelio ependimario forma una barrera física entre el LCR y el tejido neural

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Brightman y Palay, 1963). Es posible que la alteración del epitelio ependimario, tras determinados tipos de infecciones, pudiera favorecer la extensión al parénquima nervioso tanto del agente patógeno como de los elementos inflamatorios y que ello pudiera provocar, posteriormente, el desarrollo de determinadas enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, es esencial conocer los posibles mecanismos por los que los agentes infecciosos (virus y bacterias) provocan la muerte de las células ependimarias y el curso de la reacción inflamatoria subsiguiente a la pérdida parcial de la barrera ependimaria.

Algunos de los microorganismos relacionados con el desarrollo de ciertas enfermedades del SNC secretan o presentan en su superficie el enzima NA, como por ejemplo el virus de la gripe (Molgaard y Gresham, 1986; Takahashi y Yamada, 2001; Ebert y Kotler, 2005), la bacteria *Clostridium perfringens* (Finsterer y Hess, 2007) o el virus de la parotiditis (Takano y col., 1993). En vista del modelo de destrucción ependimaria mediante la inyección de NA en el ventrículo cerebral de rata (Grondona y col., 1996), cabría pensar que este enzima jugase un papel fundamental en la muerte ependimaria provocada por dichos patógenos.

El presente objetivo pretende estudiar el curso de la reacción inflamatoria y los procesos degenerativos que ocurren como consecuencia de la presencia de NA en los ventrículos cerebrales. La comprensión de estos procesos resultaría de gran interés, especialmente para el diseño de terapias encaminadas a la protección del epitelio ependimario en aquellos procesos infecciosos que pudieran comprometer su estabilidad. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

2.1.1 Describir el inicio y el curso de la reacción inflamatoria.

2.1.1.1 Estudiar la extensión del efecto producido por la inyección de neuraminidasa.

Se realizó un estudio del alcance de la eliminación del ácido siálico y de la lesión ependimaria mediante histoquímica de lectinas y marcadores inmunohistoquímicos, así como el análisis morfológico mediante tinciones con hematoxilina-eosina.

2.1.1.2 Estudiar la expresión de marcadores moleculares relacionados con el inicio de la reacción neuroinflamatoria.

Se analizó la expresión de la molécula de adhesión ICAM1 en las paredes de los vasos y de marcadores de microgliosis y astrogliosis como IBA1 y GFAP en las regiones del SNC afectadas por el enzima.

2.1.1.3 Analizar la progresión espacio-temporal de la inflamación mediante el estudio de las poblaciones celulares residentes y reclutadas al SNC.

Se realizaron recuentos de las principales poblaciones de células inmunocompetentes infiltradas y residentes implicadas en la reacción inflamatoria en diferentes tiempos experimentales mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.1.2 Determinar la naturaleza de los fenómenos degenerativos observados.

2.1.2.1 Analizar espacio-temporalmente la degeneración (y posible regeneración) de los tractos mielínicos afectados.

Se estudió el material histológico obtenido a distintos tiempos posinyección a microscopia óptica mediante tinciones generales y a microscopía electrónica de transmisión.

2.1.2.2 Analizar la degeneración de los tractos mielínicos mediante marcadores inmunohisto-químicos celulares y moleculares.

Se emplearon técnicas inmunohistoquímicas para realizar un conteo de oligodendrocitos y la cuantificación de área inmunorreactiva al marcador MBP. Además, se analizó la presencia de marcadores de necrosis y apoptosis en los tractos afectados y en los núcleos neuronales de origen y destino.

2.2 OBJETIVO 2

ESTUDIAR EL PAPEL DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LOS PROCESOS LESIVOS, INFLAMATORIOS Y DEGENERATIVOS PROVOCADOS POR LA NEURAMINIDASA.

Las evidencias experimentales sobre las que se basa nuestra hipótesis experimental son las siguientes:

1) Todos los componentes de las vías de activación del complemento están presentes en el LCR (Stahel y col., 1998; Gasque y col., 2000; Casarsa y col., 2003).

2) Las células ependimarias expresan en su superficie reguladores del complemento como DAF (CD55) y CD59, que incrementan su expresión en caso de infecciones tales como meningitis (Canova y col., 2006).

3) La superficie de las células ependimarias es rica en ácido siálico (Grondona y col., 1996). Su presencia protege contra la deposición del complejo de ataque del complemento e incrementa la afinidad por el factor H, que previene la activación de dicho sistema por la vía alternativa (Lauf, 1975; Pangburn, 2000).

4) La eliminación del ácido siálico de la superficie de células cancerosas humanas y de eritrocitos las hace más susceptibles al ataque del complemento (Pangburn, 2000; Donin y col., 2003). Del mismo modo, el ácido siálico en la superficie bacteriana previene la formación de MAC sobre su cápsula, suponiendo un factor de virulencia para estos patógenos (Marques y col., 1992).

5) La NA por sí misma es capaz de promover la activación de la ruta alternativa del complemento humano, tanto en fase fluida como sobre la superficie de membranas (Fujita y col., 1999).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Sobre la base de estos resultados se ha planteado la siguiente hipótesis experimental:

La muerte de las células ependimarias como consecuencia de la inyección de NA en la cavidad ventricular está causada por la acción del sistema del complemento sobre dicho epitelio.

Más concretamente, dicha muerte estaría causada por: 1) la mayor vulnerabilidad de las células ependimarias al ataque del complemento tras ser desprovistas del ácido siálico de su glucocálix; y 2) la activación del sistema del complemento en el LCR por parte de la NA. Ambos hechos permitirían la fijación de MAC del complemento sobre la superficie de las células.

Para corroborar la hipótesis planteada, el presente objetivo pretende ayudar a conocer el papel del sistema del complemento en la destrucción del epitelio ependimario y el inicio de la reacción inflamatoria cuando este es dañado por agentes como la NA, presente en la superficie de algunos patógenos del SNC. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

2.2.1 Estudiar la implicación del sistema del complemento en la muerte ependimaria provocada por la inyección ICV del enzima neuraminidasa.

2.2.1.1 Detectar indicios de la fijación de los factores del complemento del LCR sobre las células ependimarias.

Se analizó la presencia de complejos de ataque a la membrana sobre las células ependimarias mediante técnicas inmunohistoquímicas.

2.2.1.2 Estudiar *in vitro* e *in vivo* la posible activación del sistema del complemento de rata por el enzima neuraminidasa.

Se realizaron ensayos hemolíticos para detectar la activación del complemento de rata por NA in vitro. Se diseñó un ELISA para medir su activación mediante la detección de complejos de ataque a la membrana. Se analizaron las posibles vías de activación in vivo y la generación de fragmentos activados del sistema del complemento mediante Western blot.

2.2.1.3 Estudiar *in vivo* e *in vitro* la repercusión de la inhibición total o parcial del sistema del complemento en la capacidad lesiva de la neuraminidasa sobre las células ependimarias.

Se evaluó la viabilidad celular de las células ependimarias, tanto aisladas como en explantes de pared ventricular, en distintas situaciones de incubación con complemento y NA. Además, se estudió el efecto de la inyección de NA en ratas tratadas para la inhibición sistémica de C5 y en ratas deficientes en la expresión de C6.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2.2 Analizar la implicación del sistema del complemento en el comienzo de la reacción inflamatoria y los procesos degenerativos posteriores.

2.2.2.1 Estudiar la similitud de las reacciones inflamatorias provocadas por la neuraminidasa y por la anafilotoxina C5a del complemento.

Se estudió la reacción inflamatoria provocada por la inyección de anafilotoxina C5a en el ventrículo lateral. Se analizó, además, la reacción inflamatoria causada por la inyección de NA en dos modelos animales: ratas con inhibición de C5 y ratas deficientes en C6.

2.2.2.2 Detectar indicios de la actuación de los factores del complemento en los tractos mielínicos afectadas por la degeneración.

Se analizó la presencia de complejos de ataque a la membrana mediante técnicas inmunohistoquímicas en los tractos afectados por la degeneración. Se analizó, además, el efecto producido en los tractos mielínicos en dos modelos animales: ratas inyectadas con anafilotoxina C5a y ratas deficientes en C6 inyectadas con NA.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

A continuación se describen los materiales y métodos empleados en la presente Tesis Doctoral. Los protocolos correspondientes a la obtención de tampones y otras soluciones, así como los métodos rutinarios de laboratorio se describen en el apéndice 1. Las referencias de los productos comerciales empleados se recogen en el apéndice 2.

3.1 MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES Y OPERACIONES

3.1.1 Animales

Para realizar este estudio se utilizaron ratas Wistar macho con un peso comprendido entre los 200 y los 250 g (Charles River Laboratories, ref. Crl:WI 003). Además, se utilizó una cepa de ratas deficientes del factor C6 del complemento cedidas por el Dr. B. Paul Morgan, del Instituto de Medicina de la Universidad de Cardiff, Reino Unido. Estas ratas son homocigóticas seleccionadas ($C6^{-/-}$) para una deleción natural de 31 pares de bases en el gen del factor C6 del complemento, que segrega con herencia autosómica recesiva (Bhole y col., 2004; Ramaglia y col., 2007). Esto les impide la formación del complejo C5b-9 y, por tanto, producir la lisis celular mediada por el complemento (Leenaerts y col., 1994; van Dixhoorn y col., 1997).

Todos los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Universidad de Málaga bajo un régimen alimenticio *ad libitum*, fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad, temperatura ambiental de 20 - 24 °C y humedad constante. Su manipulación estuvo sujeta en todo momento a la normativa estatal publicada en el Real Decreto 1201/2005 y la normativa de la Unión Europea para el uso de animales de experimentación 86/609/EEC. El número de animales, así como el estrés y el sufrimiento al que fueron sometidos, fue reducido al máximo.

3.1.2 Administración de anestésicos y analgésicos

Antes de una intervención quirúrgica o inyección intracerebroventricular (ICV), el animal fue anestesiado mediante una inyección intraperitoneal (IP) con solución de 2,2,2-tribromoetanol (apéndice 1) a una dosis de 0,2 g/kg de peso animal. Se verificó que el animal estuviera anestesiado mediante el pinzamiento de la membrana interdigital y de la cola antes del comienzo de cualquier intervención. En aquellos casos en los que fue requerido, el tratamiento anestésico se prolongó en el tiempo mediante la administración IP de dosis menores de anestésico (0,05 g/kg de peso animal).

3.1.3 Inyección intracerebroventricular

Se inocularon distintas sustancias en el ventrículo lateral derecho de las ratas mediante un aparato esterotáxico (Stoelting, ref. 51600) y una bomba inyectora motorizada (KD Scientific, modelo KDS-210-CE). La cabeza del animal quedaba firmemente sujeta mediante dos barras de oído laterales y

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

una pieza de hocico frontal. El punto de inyección fue determinado mediante un atlas estereotáxico (Paxinos y col., 1997), con el fin de minimizar el daño en los tejidos circundantes al ventrículo inyectado. Las coordenadas respecto al Bregma (punto de unión de las suturas sagital y fronto-parietal del cráneo) fueron las siguientes:

Eje antero-posterior (AP) = -0,5 mm

Eje medio-lateral (ML) = -1,4 mm

Eje dorso-ventral (DV) = -3,5 mm

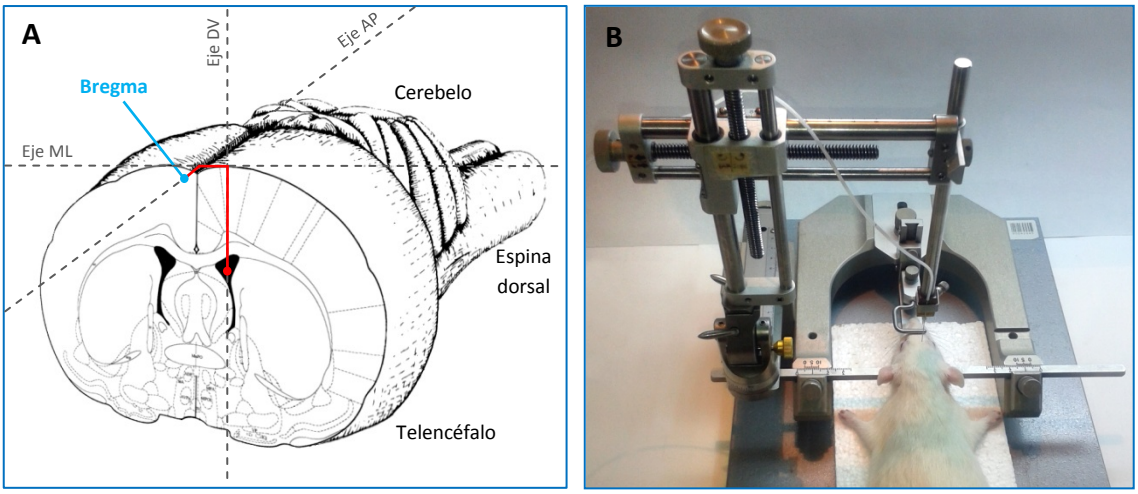


***Figura M-01. Inyección estereotáxica intracerebroventricular. A**: esquema que ilustra la localización del punto de inyección (rojo; AP = -0,5 mm; ML = -1,4 mm; DV = -3,5 mm) en el cerebro de rata, a partir del punto Bregma (azul; AP = 0,0 mm; ML = 0,0 mm; DV = 0,0 mm). **B**: colocación de una rata anestesiada en el aparato estereotáxico previamente a la inyección intracerebroventricular.*

Tras realizar una incisión sagital en la piel del cráneo se localizó el Bregma y se determinó la ubicación exacta del punto de inyección. En dicho punto se practicó una perforación del cráneo mediante una fresadora manual de punta fina (Proxxon, modelo GG12) y se introdujo la aguja de inyección metálica (calibre de 27 Gauge). Todas las dosis administradas tuvieron un volumen total de 20 µl y se administraron a una velocidad constante de 2 µl/min. Con el fin de verificar la exactitud de las coordenadas elegidas, se realizó una prueba previa inyectando una rata con azul tripano al 0,04% en PBS estéril.

3.1.3.1 Inyección intracerebroventricular de neuraminidasa

Se inyectaron 20 µl de enzima NA de *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics, ref. 11585886001) a una concentración de 25 mU/µl (500 mU totales), diluida en suero salino estéril (NaCl 0,9%). Para discriminar el posible efecto provocado por el proceso de inyección del debido a la acción del enzima, algunas ratas se inyectaron con suero salino estéril (*sham-operated rats*) para ser empleadas como controles.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

También se realizaron inyecciones con NA de origen vírico, con el fin de comprobar si los efectos provocados eran los mismos que los de la NA de origen bacteriano. Para ello se utilizó NA procedente del virus de la gripe, cepa H1N1 (Sino Biological, ref. 11058-VNAHC).

3.1.3.2 Inyección intracerebroventricular de inhibidor de C5

La inhibición sistémica del complemento se realiza mediante el tratamiento con un inhibidor de C5, un anticuerpo con capacidad de bloquear la escisión de este factor. Para asegurar su efecto inhibidor también en el LCR, la administración periférica fue acompañada de administración ICV (epígrafe 3.1.5).

3.1.3.3 Inyección intracerebroventricular de C5a

Se realizó una inyección ICV de anafilotoxina C5a (Sigma, ref. C5788) en algunos animales con el fin de comparar la inflamación provocada por esta con la producida por la NA. Se inyectaron 20 µl de C5a diluida en suero salino estéril (NaCl 0,9%) a una concentración de 0,25 µg/µl (basada en el protocolo de Casarsa y col., 2003) a un ritmo constante de 2 µl/min durante aproximadamente 10 min.

3.1.4 Posoperatorio

Tras la inyección, se limpió la herida con un antiséptico y se cerró mediante grapas de sutura. Posteriormente se devolvieron los animales a sus jaulas y se mantuvieron en las mismas condiciones iniciales hasta ser sacrificados a los distintos tiempos de estudio.

En aquellos casos en los que el tiempo transcurrido entre la operación y el sacrificio del animal superase la recuperación anestésica, se llevaron a cabo los cuidados oportunos con el fin de garantizar el bienestar animal. Dichos animales se mantuvieron sobre una manta térmica hasta su recuperación. En los casos en los que fue necesario (detección de signos de dolor como pelo erizado, irritabilidad, pérdida de apetito, etc), se administró el analgésico buprenorfina en dosis única por vía subcutánea a 0,05 mg/kg de peso animal.

3.1.5 Inhibición sistémica del sistema del complemento

Con el fin de comprobar el efecto que tendría la inyección ICV de NA sin la participación de las proteínas del complemento del LCR, un grupo animales recibieron un tratamiento de inhibición sistémica del sistema del complemento mediante la administración de un inhibidor de C5 (C5-inh). Este consiste en un anticuerpo monoclonal anti-C5 de rata (clon 18A, Alexion Pharmaceutical; Peckham y col., 2007) que bloquea su escisión y, de esta forma, detiene la cascada de activación enzimática que culminaría con la formación de los MAC (C5b-9).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El tratamiento, descrito por Costa y col. (2006), fue aplicado a un grupo de 12 animales (fig. M-02). Este consistió en la inyección de C5-inh (20 mg/kg de animal) por vía intravenosa (IV) a través de la vena safena, seguida de una inyección IP del mismo anticuerpo (10 mg/kg de animal) 6 h después. Según estos autores, este protocolo consigue una inhibición del 50 - 60% del factor C5 entre 2 y 12 h tras la inyección IV, produciéndose el máximo de inhibición aproximadamente una hora después de la inyección IP. A dicho tiempo se realizaron las inyecciones ICV, que fueron de dos tipos:

Inhibidor de C5 (control): inyección ICV de 20 µl de C5-inh (0,38 µg/µl) a un ritmo constante de 2 µl/min. Se probaron distintas concentraciones de inhibidor (deducidas de Costa y col., 2006) y se eligió esta por ser la más concentrada que mostró no tener efectos adversos sobre el epitelio ependimario. Esta inyección se aplicó a ratas control con tratamiento de inhibición sistémica, pero que no recibirían dosis de NA (fig. M-02).

Mezcla neuraminidasa/inhibidor de C5: inyección ICV de 20 µl de una mezcla de NA (25 mU/µl) y C5-inh (0,38 µg/µl) a un ritmo constante de 2 µl/min. Con este refuerzo de inhibidor mediante ICV se intentó compensar el hecho de que la respuesta del sistema del complemento ante sus señales de activación es prácticamente inmediata (Pangburn, 1983) y los ventrículos cerebrales constituyen un sistema dinámico en el que existe un aporte permanente de LCR nuevo que entra desde los plexos coroideos y fluye hacia el tercer ventrículo a través de los forámenes de Monro (Migliore y col., 1963).

Los animales fueron sacrificados y fijados mediante perfusión vascular una vez transcurrido el tiempo experimental correspondiente.

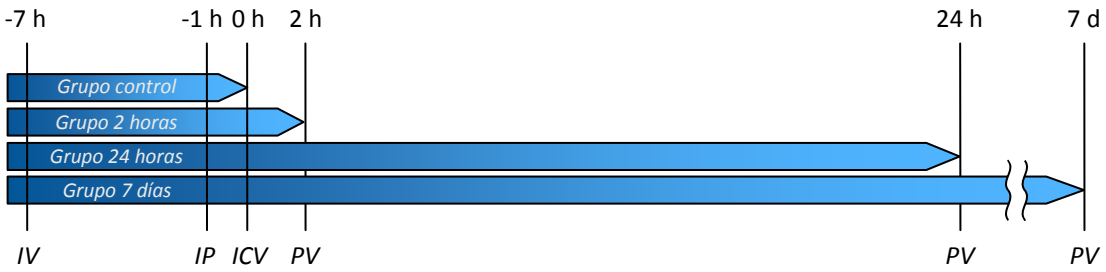


Figura M-02. Esquema temporal del protocolo de inhibición sistémica y perfusión vascular de los animales tratados. *Para cada grupo, n=3. Primera banda: ratas control no inyectadas con NA. Segunda banda: ratas sacrificadas 2 h posinyección ICV. Tercera banda: ratas sacrificadas 24 h posinyección ICV. Cuarta banda: ratas sacrificadas 7 días posinyección ICV.* ***IV****: inyección intravenosa,* ***IP****: inyección intraperitoneal,* ***ICV****: inyección intracerebroventricular,* ***PV****: perfusión vascular.*

3.1.6 Perfusión vascular para la fijación de tejidos

Tras ser anestesiados, los animales se perfundieron mediante la introducción de una cánula de tipo Abbocath-T (16 Gauge) en el ventrículo izquierdo (fig. M-03), la cual estaba conectada por un sistema de tuberías en T a dos goteros conteniendo suero salino 0,9% y solución fijadora. Ambos depósitos se situaron a una altura de 100 cm sobre el animal para alcanzar la presión óptima de perfusión. En primer lugar, se introdujeron unos 200 ml de suero salino con el fin de eliminar la sangre

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

del sistema vascular para, a continuación, dejar pasar unos 200 ml del fijador correspondiente. Las soluciones fijadoras usadas fueron:

- Fijador de Bouin: ácido pícrico 15 g/L, formaldehido al 10% y ácido acético al 5% (material para corte en microtomo).
- Paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1 M (material para corte en microtomo o vibratomo).
- Fijador de Karnovsky: PFA al 2% y glutaraldehído al 2,5% en PB 0,1 M (material para corte en ultramicrotomo).

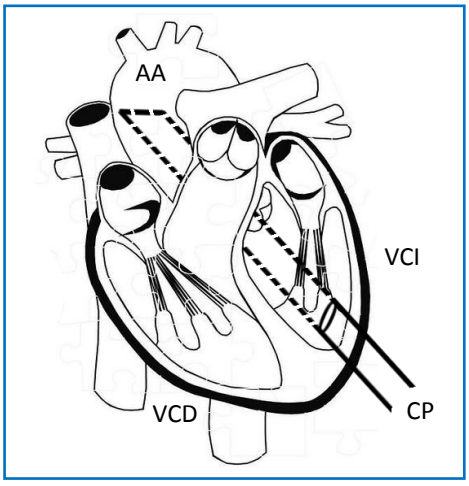


Figura M-03. Colocación de la aguja de perfusión en el corazón de una rata. *La cánula se introduce por el ventrículo izquierdo para alcanzar finalmente la aorta.* ***AA****: arteria aorta,* ***VCI****: ventrículo cardiaco izquierdo,* ***VCD****: ventrículo cardiaco derecho,* ***CP****: cánula de perfusión.*

3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.2.1 Extracción de cerebro de rata

En primer lugar se separó la cabeza del animal realizando un corte por el cuello al nivel de la vértebra atlas. Accediendo desde el foramen craneal posterior, se fueron retirando piezas del cráneo con cuidado de no dañar el tejido nervioso. Una vez expuesto el encéfalo, se retiraron las meninges y se extrajo el cerebro de la caja craneal cortando los pares craneales y la conexión con los bulbos olfatorios. Los cerebros destinados a la inclusión en parafina se sumergieron en fijador para su posfijación durante 24 h. Los destinados a la obtención de secciones de criostato se conservaron temporalmente en PBS. Los cerebros utilizados para la obtención de muestras en fresco se lavaron con solución salina tamponada de Hank (HBSS, del inglés, *Hank's balanced salt solution*) antes de proceder a su disección.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.2 Obtención de explantes de pared ventricular

Tras el anestesiado y decapitación de la rata, se extrajo el cerebro (epígrafe 3.2.1) en el laboratorio de cultivos celulares y se lavó con HBSS estéril sin calcio y sin magnesio. Seguidamente, en una campana de flujo laminar y bajo una lupa binocular (Leica, modelo MZ6), fue cortado transversalmente con un bisturí, usando el quiasma óptico como referencia (fig. M-04 A). Desechamos la porción caudal y continuamos con la porción rostral, que contiene la mayor parte de los ventrículos laterales.

Mediante unas tijeras de disección de tipo Vannas (Moria, modelo MC52) se realizaron dos cortes parasagitales: el primero desde la superficie del telencéfalo hasta la región dorsal del ventrículo lateral, y el segundo desde la región ventral del ventrículo lateral hasta la superficie ventral del encéfalo (líneas punteadas en fig. M-04 B). De esta manera, de cada hemisferio cerebral se obtuvieron dos fragmentos, uno con la pared septal del ventrículo lateral y otro con la pared estriatal, caracterizada esta última por una apariencia estriada.

Con el fin de minimizar la variabilidad entre explantes, y puesto que no todas las regiones de la pared ventricular poseen las mismas características (Gomez-Roldan y col., 2008), la pared estriatal fue la elegida para la obtención de las muestras. Mediante las tijeras de disección aislamos las regiones ependimarias estriatal y septal (línea punteada en la fig. M-04 C y E respectivamente), de las que a continuación se obtuvieron explantes de pared ventricular conteniendo la menor cantidad posible de parénquima nervioso. Dichos explantes estaban formados por una capa de epitelio ependimario, el subepéndimo y una porción de parénquima nervioso, y su grosor final fue de aproximadamente 1 mm. Los explantes de cada una de las secciones del cerebro se dividieron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm^2. En las piezas obtenidas para la realización del ensayo *in vitro* con explantes se conservó una fracción mayor de parénquima bajo el epitelio con el fin de facilitar su manejo y su orientación de cara al corte histológico.

Durante el procedimiento de disección fue muy importante no tocar la superficie de las células ependimarias con el fin de evitar dañarlas, especialmente con herramientas de metal, por lo que los explantes obtenidos se manejaron con pipetas Pasteur de plástico. Finalmente, los explantes se lavaron con medio DMEM-F12 (tres lavados de 10 min) y se usaron inmediatamente en los experimentos.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

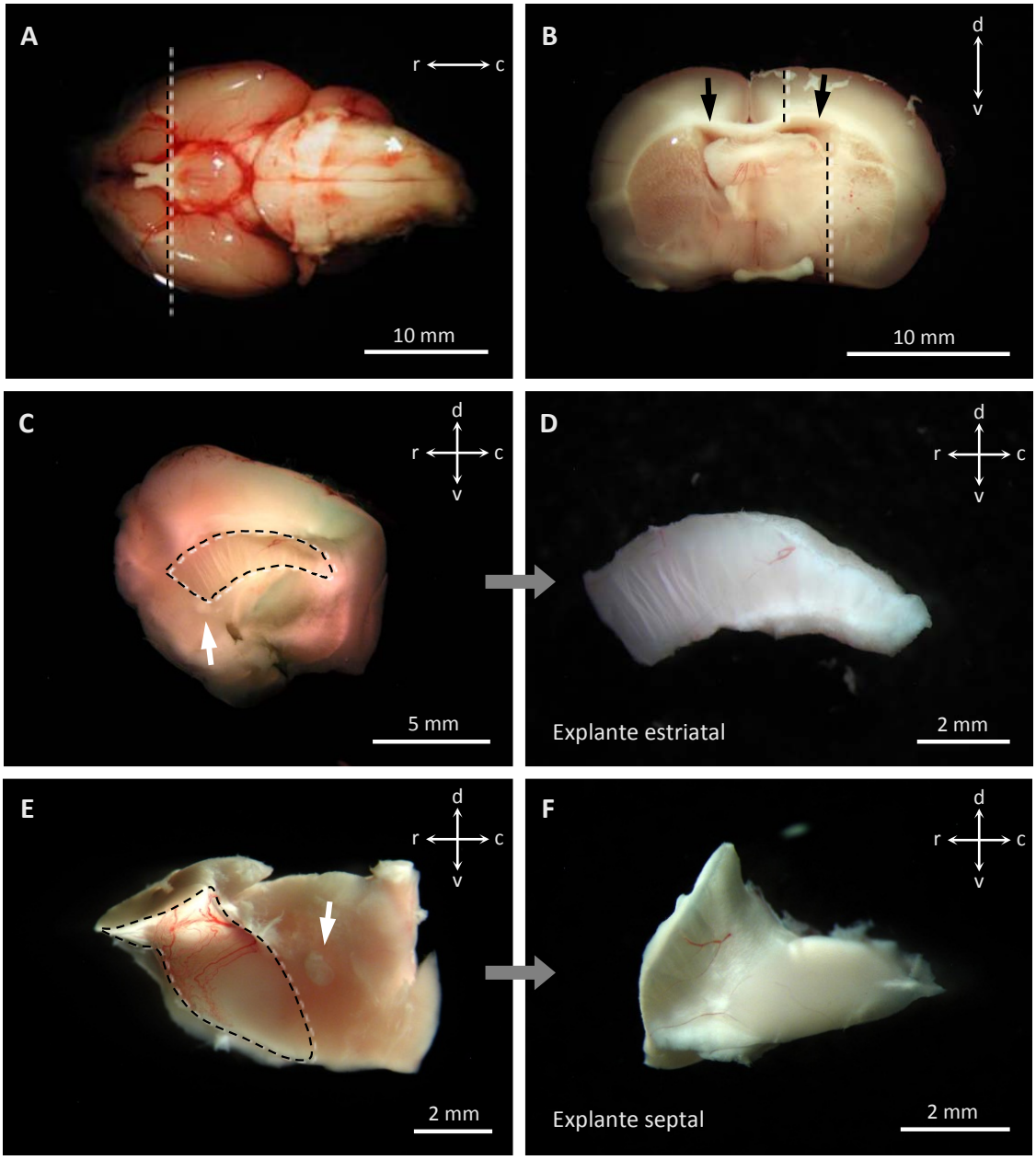


Figura M-04. Procedimiento de disección y obtención de explantes de pared ventricular. ***A****: vista ventral del cerebro de rata. La línea punteada indica el plano de la sección que pasa por el quiasma óptico.* ***B****: vista caudal del fragmento rostral obtenido tras el corte transversal. Se observa la región caudal de los ventrículos laterales (flechas). Las líneas discontinuas indican la posición de los cortes parasagitales.* ***C****: fragmento que contiene la pared estriatal del ventrículo lateral (área enmarcada por la línea de puntos). La flecha señala la comisura anterior.* ***D****: explante estriatal obtenido a partir del fragmento mostrado en la figura C.* ***E****: fragmento de tabique septal que contiene la pared septal del ventrículo lateral (área enmarcada por la línea de puntos). La flecha señala la comisura anterior.* ***F****: explante septal obtenido a partir del fragmento mostrado en E. Cruz de orientación:* ***r****: rostral,* ***c****: caudal,* ***d****: dorsal,* ***v****: ventral.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.3 Obtención de células ependimarias aisladas

El primer paso para el aislamiento de células ependimarias es la obtención de explantes de pared ventricular tal como se explica en el epígrafe anterior (3.2.2). El proceso descrito a continuación se llevó a cabo con los explantes procedentes de varias ratas. Este método ha sido recientemente publicado por nuestro laboratorio (anexo 1, Grondona y col., 2013) y ha sido objeto de una patente (ref. ES 2402308B2).

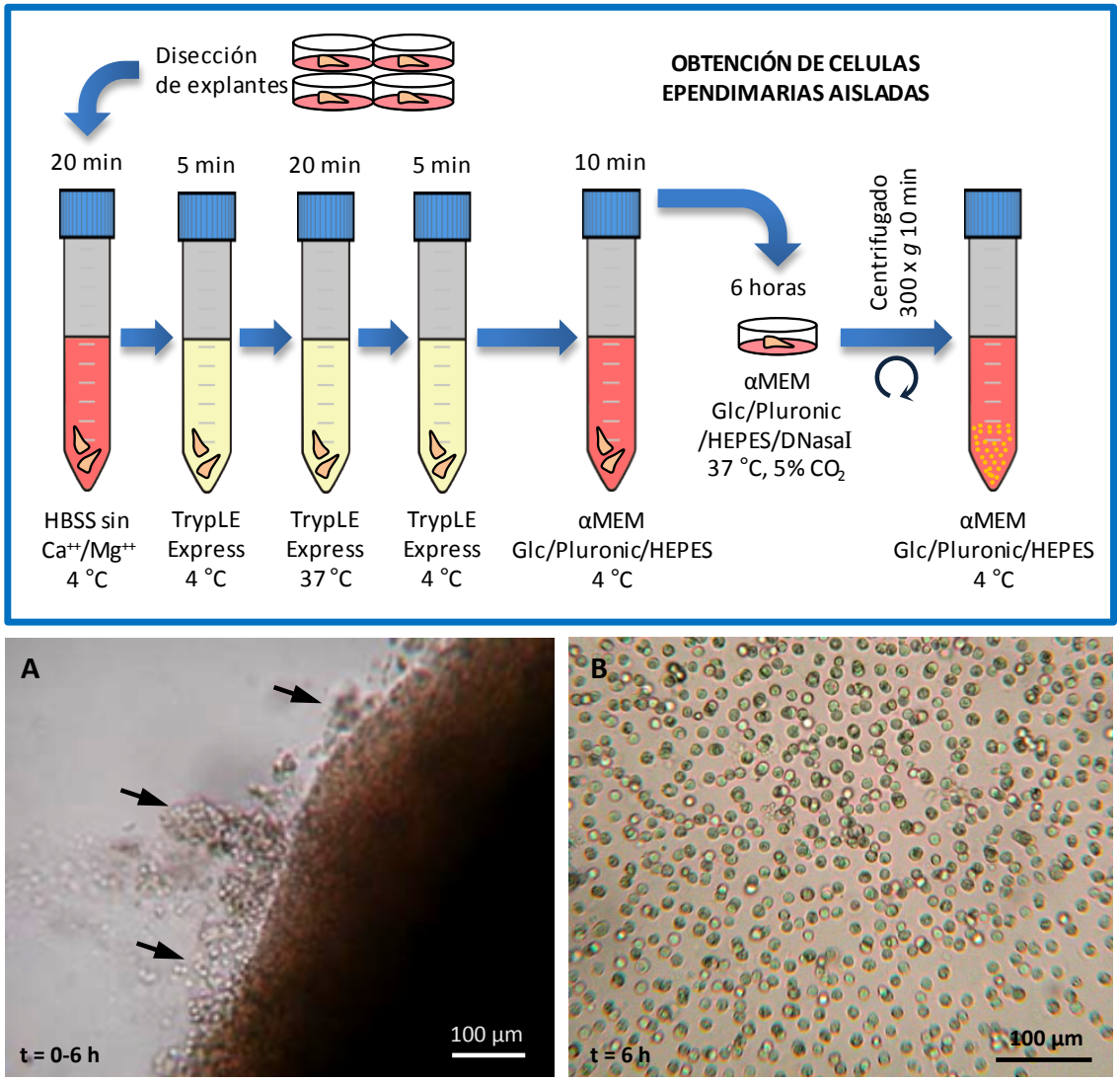


Figura M-05. Protocolo para la obtención de células ependimarias a partir de explantes de pared del ventrículo lateral. *Los explantes obtenidos fueron incubados en tubos con medios enzimáticos como muestra la figura, para después ser depositados en placa de 6 pocillos durante 6 h. En este tiempo las células ependimarias del explante comienzan a despegarse y caer al medio.* ***A****: detalle de un explante después del tratamiento enzimático (entre 0 y 6 h). Los agregados celulares (****flechas****) en la parte superior de la superficie ependimarias del explante darán lugar más tarde a pequeños clústeres libres o células ependimarias individuales. El movimiento activo de tales células o racimos indicó que eran las células ependimarias.* ***B****: a las 6 h, un gran número de células ependimarias se encuentran libres en el medio de cultivo y se depositan en el fondo. Este medio es recogido y centrifugado para la obtención de las células en un volumen definido.*

Una vez obtenidos los explantes (dos de cada rata), se pasaron a tubos estériles (2 explantes/tubo) con 4 ml de HBSS sin calcio y sin magnesio a 4 °C durante 20 min. A continuación se

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

incubaron en TrypLE™ Express durante 5 min a 4 °C (2 ml de solución enzimática/explante). El TrypLE™ Express es una solución enzimática de marca registrada (composición exacta confidencial) que contiene EDTA y un solo enzima recombinante que, como la tripsina, escinde los enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de la lisina y la arginina. Posteriormente, los tubos se incubaron 20 min a 37 °C con agitación suave cada 10 min, y luego se enfriaron en hielo durante 5 min. Después de la solución enzimática, los explantes se lavaron en medio αMEM suplementado con 0,2% Pluronic F-127 (evita la adhesión celular al plástico), 0,3% D-glucosa y 0,01 M HEPES, durante 5 min a temperatura ambiente (2 ml/explante) con el fin de eliminar los restos del enzima. Cada explante se situó en un pocillo de una placa de 6 pocillos con 3 ml del mismo medio de lavado, al que se le añadió desoxirribonucleasa de tipo I (DNasa I) al 0,01%. Esta placa se incubó durante 6 h a 37 °C en una estufa con 5% de CO_2. Durante este tiempo se desprenden un gran número de células ependimarias, que quedan en el fondo del pocillo girando sobre sí mismas debido al batido ciliar. Este medio fue recogido y centrifugado (300 × *g*, 10 min) con el fin de eliminar parte de los restos celulares y obtener un precipitado de células ependimarias, que fue de nuevo resuspendido en medio αMEM suplementado.

3.2.4 Preparación de extractos de proteínas

Se obtuvieron extractos a partir de explantes de pared ependimaria con el fin de analizar la presencia de ciertas proteínas mediante *Western blot*.

Una vez extraídas las muestras de tejido fresco (epígrafe 3.2.2), estas se pesaron, se pusieron en frío y se trocearon con unas tijeras para obtener pequeños fragmentos de no más de 1 mm^3. Estos fragmentos se homogeneizaron en frío, y se les añadió 30 µl de tampón de extracción de proteínas (apéndice 1) por cada mg de tejido. Una vez homogeneizada, a la muestra se le aplicó sonicación a 50 W (tres veces durante 30 segundos, en frío), y se centrifugó (5600 × *g,* 5 min, 4 °C) para quedarnos con el sobrenadante. Tras determinar la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, del inglés, *bicinchoninic acid*) (epígrafe 3.7.2), los extractos se alicuotaron y congelaron a -80 °C hasta su uso.

3.2.5 Extracción de muestras de sangre

3.2.5.1 Obtención de sueros

En el caso de suero humano, la sangre obtenida mediante punción digital fue recogida en un tubo estéril. Una vez coagulada, fue centrifugada (1500 × *g*, 10 min, 4 °C) y el suero obtenido se conservó a -80 °C hasta su utilización.

El mismo proceso fue llevado a cabo para la obtención de suero de rata. En este caso, la sangre fue obtenida por punción del seno retroorbitario del animal, previamente anestesiado, mediante un

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

capilar heparinizado (Brand, ref. 749311). En los casos en los que el animal fue sometido a extracciones de sangre superiores a 2 - 3 ml, se realizó una inyección con suero fisiológico estéril templado (1,5 ml/100 g de peso, vía subcutánea) con el fin de evitar cambios en la volemia y deshidratación. Para comprobar el grado de deshidratación se evaluó la velocidad de retracción de un pliegue de piel cogido en la zona lateral del tórax.

3.2.5.2 Obtención y tratamiento de glóbulos rojos para pruebas hemolíticas

La obtención de glóbulos rojos de conejo se llevó a cabo mediante la punción de la vena auricular marginal. Para evitar la coagulación se añadió EDTA (1,5 mg/ml de sangre) a los tubos de recogida. Posteriormente, la sangre se centrifugó (1500 × *g,* 10 min) y el precipitado se resuspendió en suero salino 0,9%. Seguidamente se volvió a centrifugar de forma suave (700 × *g*, 6 min) para obtener glóbulos rojos lavados. Se pipeteó directamente del precipitado para obtener soluciones de glóbulos rojos al 4% (v/v) en tampón para complemento (TC). Este tampón, conocido en inglés como CFD (*complement fixation diluent*), se utiliza como diluyente estándar en ensayos de hemólisis mediada por el sistema del complemento, pues preserva el estado preactivo de sus factores.

Los glóbulos rojos obtenidos sufrieron distintos tratamientos antes de su posterior utilización en pruebas hemolíticas en suspensión (epígrafe 3.3.2):

- Glóbulos rojos no tratados (GR):

La solución de glóbulos rojos al 4% (v/v) fue diluida 1/2 en TC para obtener una solución de glóbulos rojos no tratados al 2% (v/v) (fig. M-06 A).

- Glóbulos rojos desializados (GR-DS):

En este caso, los glóbulos rojos al 4% (v/v) se incubaron una hora en agitación a 37 °C con enzima NA a 0,5 U/ml. Posteriormente se volvió a centrifugar de forma suave (700 × *g*, 6 min), y se pipeteó directamente del precipitado para obtener una solución de glóbulos rojos desializados al 2% (v/v) en TC (fig. M-06 B). La eliminación del ácido siálico se comprobó mediante histoquímica de lectinas sobre un frotis de glóbulos rojos.

- Glóbulos rojos opsonizados con anticuerpos (GR-OP):

Las hemolisinas o anticuerpos anti-eritrocitarios son inmunoglobulinas con la capacidad de inducir la lisis mediada por la vía clásica del complemento tras su fijación a la superficie celular. La opsonización de una muestra de glóbulos rojos con dichos anticuerpos aumenta considerablemente la sensibilidad de estos al ataque del sistema del complemento, lo que supone una herramienta con la que analizar la capacidad lítica de una muestra dada. Una vez obtenidos y lavados los glóbulos rojos de conejo, se preparó un tubo con 10 ml de anticuerpos anti-eritrocitos de conejo (amboceptor, Siemens, ref. ORLC25) diluidos 1:500 en TC, y otro tubo con 10 ml de glóbulos rojos al 4% (v/v) también en TC. El contenido de ambos tubos se mezcló, obteniéndose así 20 ml de solución de glóbulos rojos al 2% (v/v) y

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

amboceptor 1:1000 (fig. M-06 C), y se incubó en agitación durante una hora a 37 °C para facilitar la opsonización.

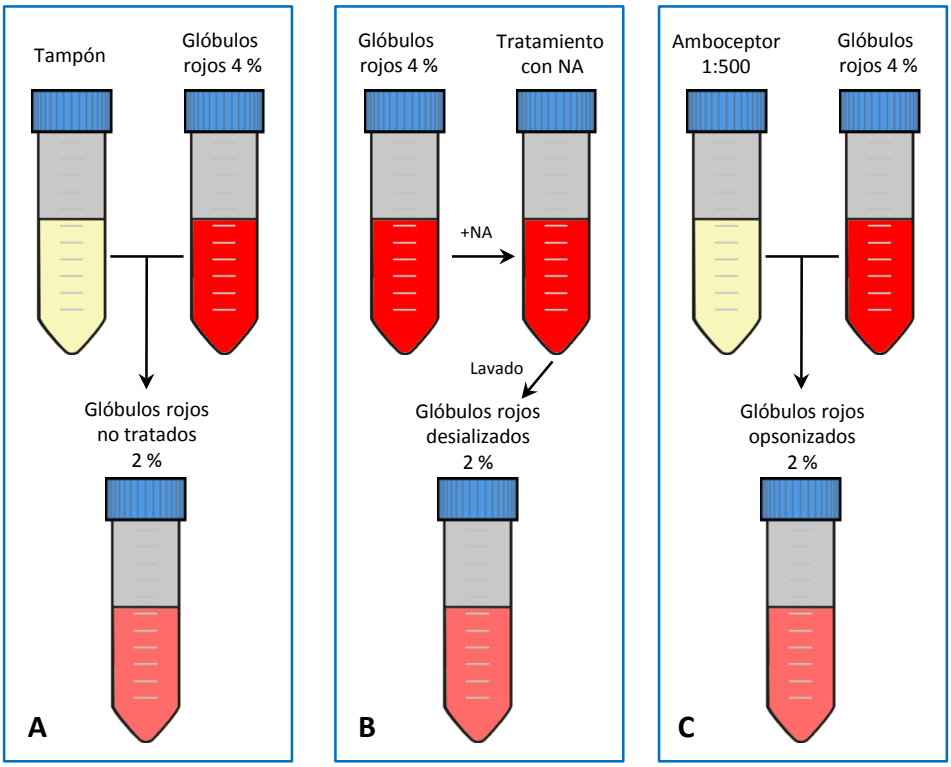


Figura M-06. Obtención de glóbulos rojos no tratados, desializados y opsonizados. A: *la solución de glóbulos rojos lavados al 4% (v/v) fue diluida 1/2 en TC para obtener una solución de glóbulos rojos no tratados al 2% (v/v).* ***B:*** *incubación de glóbulos rojos con NA. Tras la incubación los glóbulos rojos desializados fueron lavados y resuspendidos al 2% (v/v).* ***C:*** *una solución de glóbulos rojos al 4% (v/v) fue incubada 1/2 con una solución de amboceptor 1:500 para obtener glóbulos rojos opsonizados al 2% (v/v) en amboceptor 1:1000.*

3.2.6 Extracción de líquido cefalorraquídeo

Los animales, previamente anestesiados, se colocaron en un aparato estereotáxico sujetos por barras laterales, con la cabeza inclinada formando un ángulo aproximado de 75° con la columna vertebral (fig. M-07). Una vez preparada la aguja y la bomba, se introdujo la aguja en la zona de unión cráneo-atlas hasta la cisterna magna, a unos 7 - 8 mm de profundidad, 1 mm desviado del plano sagital del animal y con una inclinación paralela al eje rostro-caudal de la cabeza. Se activó la bomba (KD Scientific, modelo KDS-210-CE) en modo extracción, a una velocidad máxima de 2 µl/min, y se comprobó la obtención de LCR limpio (ausencia de glóbulos rojos). Se extrajo el LCR en fracciones de 20 µl, realizando pausas de 5 min entre ellas y manteniendo la anestesia del animal, hasta extraer un total de 80 - 100 µl. El LCR extraído se recogió en un tubo estéril y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

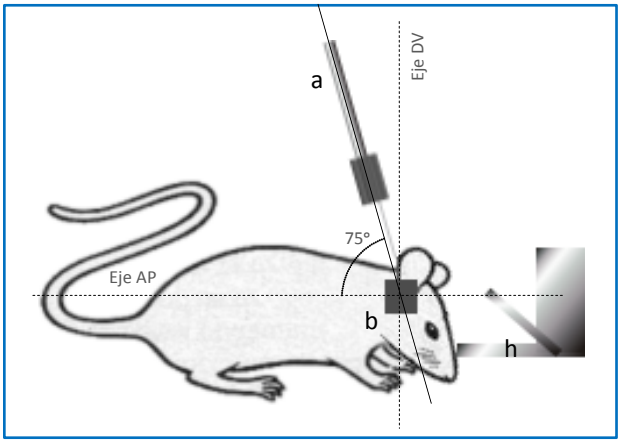


Figura M-07. Esquema de la colocación de una rata en un aparato estereotáxico preparado para la extracción de LCR. *Una vez fijadas las barras de oído (**b**), la pieza de hocico (**h**) utilizada para sujetar los incisivos se emplea en su lugar para mantener la cabeza del animal en ángulo con su columna vertebral. El soporte con la aguja (**a**) se coloca paralelo al plano de la cabeza del animal, en ángulo de unos 75° con la columna vertebral, introduciéndose la punta por el foramen craneal hasta la cisterna magna.*

La obtención de muestras de LCR humano fue llevada a cabo por técnicos del Servicio de Inmunología del Hospital Carlos Haya. Estas muestras se conservaron en frío inmediatamente después de ser obtenidas con el fin de preservar la actividad del sistema del complemento. Las muestras usadas para este estudio pertenecían a dos pacientes cuyos resultados en las pruebas analíticas correspondientes (principalmente búsqueda de marcadores de esclerosis múltiple y de agentes infecciosos) fueron negativos, considerándose como controles normales con alta probabilidad de no sufrir ninguna alteración del sistema del complemento.

3.2.7 Activación del sistema del complemento en suero y líquido cefalorraquídeo

Como control positivo de la actividad del complemento en diferentes experimentos, se indujo la activación *in vitro* de este en muestras de suero y LCR mediante la incubación con zimosan (Sigma, Z-4250). El zimosan es un preparado comercial a partir de la pared celular de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que contiene complejos proteína-carbohidratos, los cuales activan el sistema del complemento y permiten inducir la inflamación estéril experimental.

Las muestras de suero y LCR se incubaron con zimosan a 0,01 g/ml durante una hora a 37 °C en agitación. Posteriormente fueron centrifugadas (9000 × *g,* 10 min) para eliminar el zimosan y obtener el sobrenadante con el complemento activado.

3.2.8 Obtención de otros tejidos

Además de los ya descritos, se realizó la extracción de ciertos tejidos de rata con el fin de ser usados como control positivo para algunas técnicas inmunohistoquímicas y de inmunodetección.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Muestras de amígdala palatina fueron usadas como control positivo de los anticuerpos anti-IgG de rata y anti-PAX5. El timo se usó como control para tinciones con anti-CD3ε.

Como control positivo para los anticuerpos anti-C5b-9 se usaron cortes de ganglio linfático humano inflamado o cuyo sistema del complemento había sido previamente activado (cortesía del Dr. Antonio Alonso, Servicio de Inmunología del Hospital Carlos Haya de Málaga).

3.3 ENSAYOS HEMOLÍTICOS

Durante el desarrollo de este trabajo se planteó la posibilidad de que la NA pudiera por sí misma activar el sistema del complemento en el LCR de rata. El método más sencillo para investigar esta posibilidad consistió en medir la actividad remanente del complemento tras la incubación conjunta de LCR con el enzima. Para ello se usaron pruebas de hemólisis.

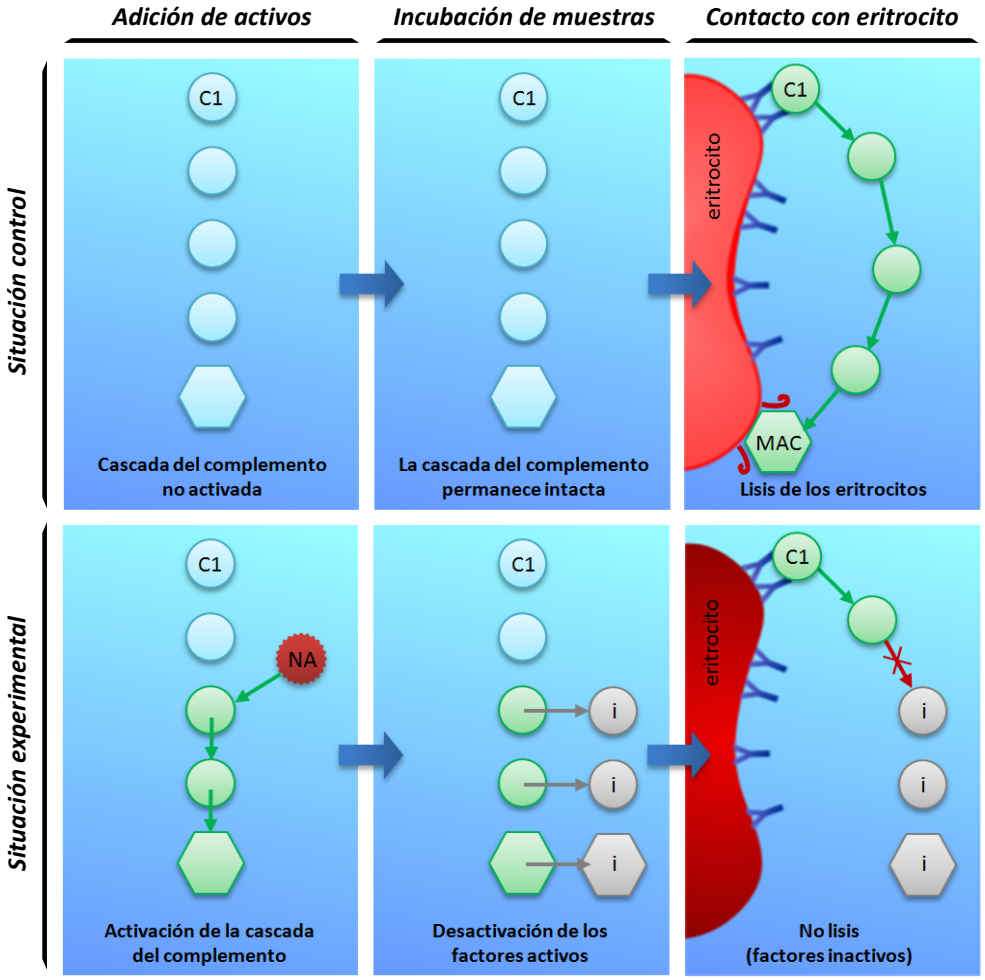


Figura M-08. Esquema del ensayo hemolítico de actividad remanente del complemento. *En la situación control, la muestra de suero o LCR no es expuesta a ningún agente activador, con lo que los factores del complemento conservan su capacidad lítica sobre glóbulos rojos opsonizados. En la situación experimental, en cambio, la exposición de la muestra de suero o LCR a un agente activador del complemento (en nuestro caso la NA) provocaría la activación y la consecuente desactivación de los factores, eliminando la capacidad de lisar posteriormente a los glóbulos rojos opsonizados.* ***C1****: complejo C1 del complemento,* ***er****: eritrocito,* ***NA****: neuraminidasa,* ***i****: forma inactiva del factor,* ***MAC:*** *complejo de ataque a la membrana.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Este diseño experimental se fundamenta en dos propiedades de la cascada de activación del complemento: 1) al tratarse de una vía de activación con actividad proteolítica, una vez activada, no es posible volver a activarla; y 2) la vida media de los factores activos es muy corta en ausencia de membranas donde poder anclarse, por lo que pasan rápidamente a un estado inactivo.

De esta manera, las muestras de LCR o suero preincubadas con NA no deberían producir hemólisis por haber sufrido activación y desactivación previa del complemento; mientras que los correspondientes controles no incubados con NA sí deberían producir hemólisis, ya que el complemento no se habría activado previamente y mantendría su capacidad lítica intacta (fig. M-08).

3.3.1 Ensayo hemolítico sobre placa de difusión radial

La primera opción para llevar a cabo el análisis de actividad remanente del complemento incubado con NA fue el uso de una placa de hemólisis total por difusión radial en gel "*Total Haemolytic Complement*" (THC) (The Binding Site, ref. RC001.1). Este ensayo hemolítico es una adaptación de la prueba de inmunodifusión radial, consistente en la aparición de un anillo de precipitación visible provocado por la unión antígeno-anticuerpo en una matriz de gel.

El THC se basa en el siguiente principio: en un gel de agarosa se encuentran inmersos glóbulos rojos de oveja opsonizados por anticuerpos anti-eritrocitarios (hemolisinas). Dichos glóbulos rojos inducen la activación de la vía clásica del complemento en muestras de suero normal, produciéndose como consecuencia la lisis de los mismos. Esto da lugar a un halo de lisis visible, cuyo diámetro podemos medir e interpolar en una recta patrón "diámetro de halo / porcentaje de actividad lítica". La fig. M-09 muestra el procedimiento seguido en el ensayo sobre placa de hemólisis de difusión radial.

El objetivo de este ensayo hemolítico en placa fue dilucidar si la incubación conjunta de LCR de rata y NA provocaba la pérdida de actividad del complemento en el LCR (tabla M-01: pocillo 9), lo cual indicaría que dicho complemento había sido previamente activado por la NA. El LCR humano de dos pacientes fue usado como control, pues la placa está diseñada para detectar la actividad del complemento humano (tabla M-01: pocillos 11 y 13). Cada una de estas situaciones tuvo su correspondiente control incubado en las mismas condiciones pero sin NA (tabla M-01: pocillos 8, 10 y 12), en los cuales se esperaría que sí hubiera hemólisis (complemento no activado previamente).

Las incubaciones con NA (25 mU/µl) se realizaron a 37 °C durante 30 min. Después las muestras se dejaron enfriar a 4 °C durante 5 min. En los controles correspondientes la NA se sustituyó por su diluyente, NaCl 0,9%.

Como control positivo se usó suero humano control (tabla M-01: pocillo 4) que fue también incubado con NA (tabla M-01: pocillo 7) con el objeto de comprobar el efecto de esta sobre una muestra con mayor concentración en proteínas del complemento que el LCR. A su vez, con este suero se realizaron controles de los otros factores que podrían influir en la detección de la actividad del

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

complemento: control de dilución 1/2 (tabla M-01: pocillo 5), control de la temperatura de incubación a 37 °C (tabla M-01: pocillo 6) y control de la presencia de NA a 25 mU/µl (tabla M-01: pocillo 14).

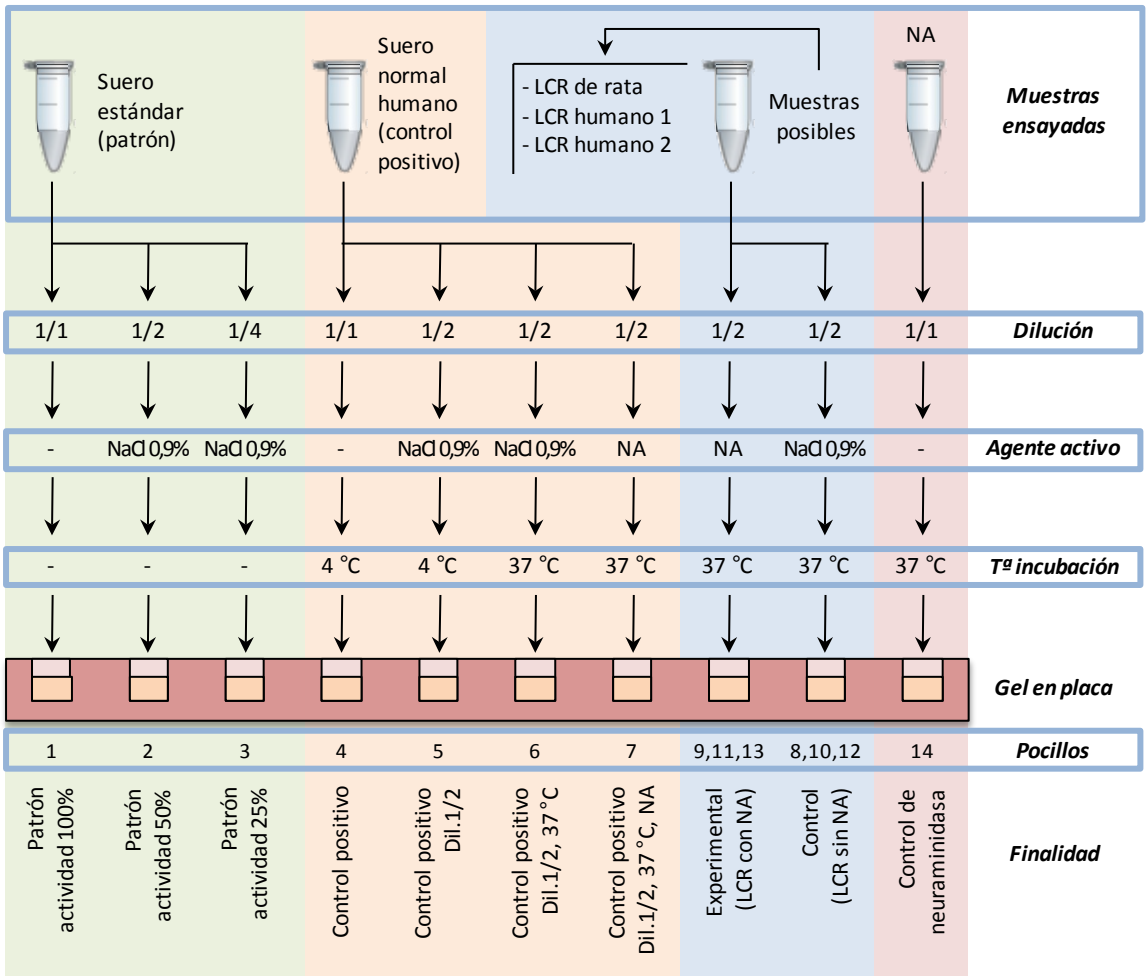


Figura M-09. Esquema del ensayo hemolítico en placa de difusión radial. *Las muestras de suero estándar (proporcionado en el kit) fueron diluidas en NaCl 0,9% para obtener el patrón. El suero normal humano se diluyó y se incubó con distintos agentes y temperaturas para obtener controles, así como una muestra de enzima NA. El LCR de rata y humano fueron diluidos con NA (experimentales) o sin NA (controles).*

La recta patrón se realizó con un suero humano estándar de actividad conocida incluido en el kit de análisis, siendo la actividad: 100% en el suero sin diluir, 50% en el suero diluido 1/2, y 25% en el suero diluido 1/4 (tabla M-01: pocillos 1, 2 y 3 respectivamente).

Una vez se tuvieron preparadas todas las diluciones, se dispensaron 5 µl de cada muestra a cada pocillo de la placa de hemólisis según se indica en la tabla M-01. A continuación la placa se sometió primero a un periodo de difusión (14 h a 4 °C), y después a una fase de lisis (30 min a 37 °C). Finalmente se tomaron medidas de los halos de lisis resultantes mediante el análisis digital de fotografías de la placa.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Poc.	Finalidad	Muestra	Incubación 30 min a 37 °C
1	*Patrón (actividad 100%)*	*Suero **estándar** sin diluir*	*No*
2	*Patrón (actividad 50%)*	*Suero **estándar** diluido **1/2** en NaCl 0,9%*	*No*
3	*Patrón (actividad 25%)*	*Suero **estándar** diluido **1/4** en NaCl 0,9%*	*No*
4	*Control positivo*	***Suero humano control** sin diluir*	*No*
5	*Control positivo dil. 1/2*	*Suero humano control **diluido** 1/2 en NaCl 0,9%*	*No*
6	*Control positivo dil. 1/2, 37 °C*	*Suero humano control diluido 1/2 en NaCl 0,9%*	***Sí***
7	*Control positivo dil. 1/2, 37 °C, NA*	*Suero humano control diluido 1/2 en **NA 50 mU/µl***	*Sí*
8	*Control del pocillo 9*	*LCR de rata diluido 1/2 en **NaCl 0,9%***	*Sí*
9	*Experimental*	*LCR de rata diluido 1/2 en **NA 50 mU/µl***	*Sí*
10	*Control del pocillo 11*	*LCR humano 1 diluido 1/2 en **NaCl 0,9%***	*Sí*
11	*Experimental*	*LCR humano 1 diluido 1/2 en **NA 50 mU/µl***	*Sí*
12	*Control del pocillo 13*	*LCR humano 2 diluido 1/2 en **NaCl 0,9%***	*Sí*
13	*Experimental*	*LCR humano 2 diluido 1/2 en **NA 50 mU/µl***	*Sí*
14	*Control de neuraminidasa*	*Solución de **NA** 25 mU/µl*	*Sí*

Tabla M-01. Diseño de la placa hemolítica de difusión radial.

3.3.2 Ensayo hemolítico sobre glóbulos rojos en suspensión

Los resultados del ensayo hemolítico en placa de gel revelaron su escasa sensibilidad para detectar la actividad del complemento en el LCR. Por ello, se decidió emplear una técnica hemolítica más sensible, con glóbulos rojos en suspensión líquida. De igual forma, se analizó la actividad remanente del sistema del complemento en las muestras tras su incubación con NA mediante el mismo principio explicado anteriormente (fig. M-08).

Tradicionalmente, las pruebas hemolíticas del complemento utilizan como sustrato glóbulos rojos opsonizados por anticuerpos. En nuestros experimentos, las muestras de suero y LCR son incubadas con NA, por lo que este enzima estará posteriormente presente durante el ensayo hemolítico, pudiendo entonces eliminar ácido siálico de la superficie de los glóbulos rojos. Es sabido que esta eliminación aumenta la sensibilidad de los glóbulos rojos a la lisis mediada por el complemento. Por ello, se decidió replicar el ensayo utilizando glóbulos rojos no tratados y glóbulos rojos previamente desializados.

Cada situación experimental descrita en la tabla M-02 se ensayó, por tanto, sobre glóbulos rojos no tratados (GR), sobre glóbulos rojos desializados mediante incubación previa con NA (GR-DS) y sobre glóbulos rojos opsonizados con amboceptor, un anticuerpo anti-eritrocitario (GR-OP) (epígrafe 3.2.5.2).

Suero y LCR humanos fueron usados como control positivo del experimento, por tener estos mayor actividad del complemento. Estas muestras, junto con las de rata, fueron procesadas en cuatro

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

situaciones posibles: sin tratar a 4 °C (control no incubado), tratadas con NA a 5 mU/µl (situación experimental), sin tratar a 37 °C (control de calentamiento) y tratadas con zimosan a 37 °C (control positivo de la activación) (fig. M-10).

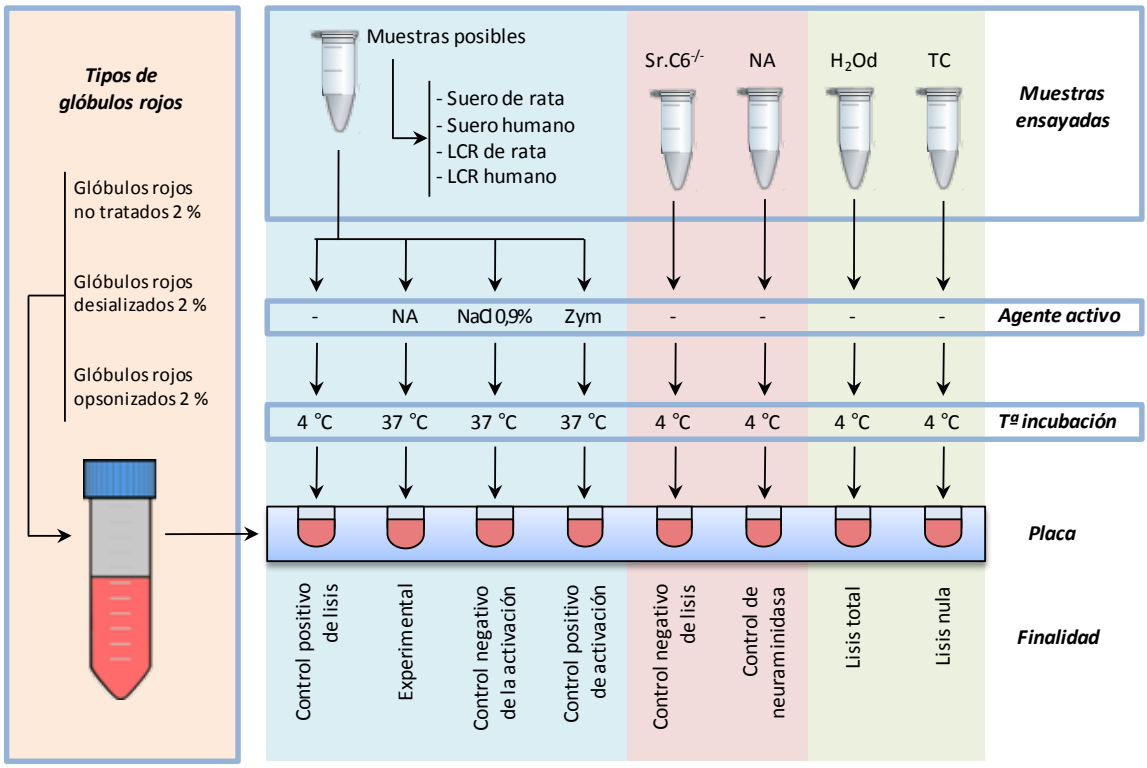


Figura M.10. Esquema del ensayo hemolítico con glóbulos rojos en suspensión. *Cada una de las posibles muestras ensayadas fue usada: sin tratar (control no incubado), incubada con neuraminidasa (**NA**) (pocillo experimental), incubada con NaCl 0,9% (control del calentamiento) y con zimosan (**Zym**) (control positivo activado). Muestras de NA y suero de rata deficiente de C6 (**Sr.C6$^{-/-}$**) fueron usadas como control. La referencia de lisis total se obtuvo con agua destilada (**H_2Od**), y la de lisis nula con tampón para complemento (**TC**). A su vez, cada una de estas situaciones descritas fue ensayada sobre tres tipos de glóbulos rojos: no tratados (**GR**), desializados (**GR-DS**) y opsonizados (**GR-OP**).*

A su vez, para cada situación experimental se ensayaron cuatro diluciones distintas de la correspondiente muestra (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), con el fin de obtener un perfil de la especificidad de la reacción de hemólisis en casa caso.

En placas de 96 pocillos de fondo cóncavo, se prepararon las diluciones de las muestras (suero y LCR, activados o no) con TC. Como control de lisis total (100% de lisis) se utilizó agua destilada, y como control de lisis nula (0% lisis) se empleó el TC. El volumen final de muestra en cada pocillo fue de 100 µl. A continuación se añadió a cada pocillo 50 µl de la solución de glóbulos rojos 2% (v/v) correspondiente (no tratados, desializados u opsonizados con amboceptor 1:1000).

Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min, fueron centrifugadas en un centrífuga de placas (700 × *g,* 5 min), y 90 µl del sobrenadante de cada pocillo fueron transferidos a una nueva placa de 96 pocillos para la lectura de la absorbancia de la hemoglobina a 570 nm en un lector de placas (BioTek Instruments, modelo ELx800) mediante el software Gen5™ 1.05 (BioTek Instruments).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Este experimento se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente tal como se indica en el epígrafe 3.8.

En resumen, las situaciones experimentales ensayadas fueron las siguientes:

Nº	Muestra / tratamiento		Abreviatura	Finalidad del pocillo
1	Suero de rata	*Sin tratar*	**Sr**	*Control positivo de lisis*
2		*Incubado con NA*	**Sr.NA**	*Experimental*
3		*Incubado con NaCl 0,9%*	**Sr.NaCl**	*Control negativo de lisis*
4		*Activado con zimosan*	**Sr.Zym**	*Control positivo de activación*
5	Suero humano	*Sin tratar*	**Sh**	*Control positivo de lisis*
6		*Incubado con NA*	**Sh.NA**	*Experimental*
7		*Incubado con NaCl 0,9%*	**Sh.NaCl**	*Control negativo de lisis*
8		*Activado con zimosan*	**Sh.Zym**	*Control positivo de activación*
9	LCR de rata	*Sin tratar*	**LCRr**	*Control positivo de lisis*
10		*Incubado con NA*	**LCRr.NA**	*Experimental*
11		*Incubado con NaCl 0,9%*	**LCRr.NaCl**	*Control negativo de lisis*
12		*Activado con zimosan*	**LCRr.Zym**	*Control positivo de activación*
13	LCR humano	*Sin tratar*	**LCRh**	*Control positivo de lisis*
14		*Incubado con NA*	**LCRh.NA**	*Experimental*
15		*Incubado con NaCl 0,9%*	**LCRh.NaCl**	*Control negativo de lisis*
16		*Activado con zimosan*	**LCRh.Zym**	*Control positivo de activación*
17	*Suero de rata C6$^{-/-}$*		**Sr.C6$^{-/-}$**	*Control negativo de lisis*
18	*Neuraminidasa*		**NA**	*Control de neuraminidasa*
19	*Agua destilada*		**H_20d**	*Lisis total (100%)*
20	*Tampón para complemento*		**TC**	*Lisis nula (0%)*

Tabla M-02. Condiciones experimentales del ensayo de hemólisis sobre glóbulos rojos en suspensión. *Cada una de estas situaciones fue a su vez aplicada sobre tres tipos de glóbulos rojos: no tratados, desializados y opsonizados.*

3.3.3 Ensayo de la actividad hemolítica de la neuraminidasa

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos hemolíticos anteriormente descritos, se realizó un ensayo complementario con el fin de dilucidar si el enzima NA pudiera tener cierta capacidad hemolítica por sí mismo. Para ello, se incubaron soluciones de glóbulos rojos no tratados al 2% con diluciones seriadas 1/2 de NA vírica y bacteriana, partiendo de 25 mU/µl. Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos de fondo cóncavo, que fue incubada a 37 °C durante 30 min, y posteriormente centrifugada (700 × *g*, 5 min) en una centrífuga de placas. El sobrenadante de cada pocillo se transfirió a una nueva placa de fondo plano para la lectura de la absorbancia de la hemoglobina a 570 nm. El

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

experimento se realizó por triplicado y los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente como se indica en el epígrafe 3.8.

3.4 ENSAYOS *IN VITRO*

La utilización de modelos *in vitro*, más sencillos que el organismo completo, puede ayudar a desentrañar el papel desempeñado por cada uno de los elemento de un sistema complejo. En nuestro caso, una de las preguntas que se nos planteaba era el papel que el LCR, las uniones intercelulares y el subepéndimo pudieran estar teniendo en la acción de la NA sobre el epéndimo. Con el objetivo de responder a esta pregunta se procedió a estudiar el efecto de la NA en dos modelos *in vitro* de células ependimarias: 1) los explantes de pared de ventrículo lateral, en los que se preserva la citoarquitectura del epitelio pero se elimina el entorno LCR, y 2) las células ependimarias aisladas en cultivo primario, en donde estas, además, no están sometidas a la influencia del subepéndimo ni a las interacciones célula-célula.

3.4.1 Ensayos *in vitro* con explantes de pared ventricular

En este experimento se trató de analizar el efecto de la NA sobre el epitelio ependimario de explantes, en presencia y ausencia del sistema del complemento. Los explantes de la pared del ventrículo lateral se obtuvieron según el método explicado con anterioridad (epígrafe 3.2.2). Con el fin de que los explantes fueran lo más parecidos posible entre sí, todos ellos se disecaron a partir de la pared estriatal del ventrículo lateral. Cada explante se colocó en un pocillo de una placa de 96 pocillos en un volumen de 50 µl de medio de cultivo DMEM/F-12. Antes de comenzar el experimento, se verificó la movilidad ciliar en cada explante mediante la observación al microscopio invertido (Leica, modelo MD-IL). Las condiciones experimentales utilizadas están recogidas en la tabla M-03.

Medio del explante	Neuraminidasa (mU/µl)	Complemento de rata (% v/v en suero de rata)
Medio de cultivo (MC)	*0*	*0%*
MC + NA	*5*	*0%*
MC + Suero	*0*	*50%*
MC + NA + Suero	*5*	*50%*

Tabla M-03. Situaciones experimentales del ensayo con explantes de pared ventricular. *El medio de cultivo usado como base fue DMEM/F-12. A los medios indicados se les añadió NA y/o suero de rata, de manera que el volumen final de todos los pocillos fuese de 50 µl.* ***MC****: medio de cultivo,* ***NA****: neuraminidasa.*

Puesto que con este diseño experimental se pretendió estudiar la acción del sistema del complemento, el medio de cultivo no podía ser suplementado con sueros ajenos al ensayo. Por ello, se comprobó previamente la viabilidad del epitelio ependimario en medio sin suero hasta un tiempo muy

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

superior a la duración de los ensayos. Es sabido que explantes de epéndimo procedentes de cerebro bovino sobreviven en medios no suplementados con suero hasta dos meses (Perez-Martin y col., 2003). Además, los explantes se lavaron en medio de cultivo antes de su uso con el fin de eliminar los factores del complemento que pudieran estar adheridos en ellos.

El sistema del complemento está formado por un conjunto de factores proteicos termolábiles y de muy corta vida media. Por este motivo, el suero (fuente de complemento) utilizado en estos ensayos se obtuvo inmediatamente antes de la realización de los mismos. Además, la cantidad de suero añadido se calculó para que el complemento no fuera limitante. El medio "MC + suero" permitió comprobar que la concentración elegida no causaba alteraciones en el epitelio por sí sola.

En cuanto a la concentración de NA utilizada *in vitro*, se procuró que fuese lo más parecida posible a la concentración a la que se estima que actúa *in vivo* durante la ICV. Dicha estimación se realizó teniendo en cuenta que la NA inyectada sufre tres procesos básicos de dilución: 1) al mezclarse con el LCR presente en el ventrículo; 2) por el aclaramiento debido al flujo de LCR que lleva el encima del ventrículo lateral al tercer ventrículo y de este al cuarto; y 3) por el aporte de LCR nuevo procedente de los plexos coroideos. La dilución aproximada que el enzima sufriría en el ventrículo lateral de ratas Wistar macho (200 - 300 g) se calculó teniendo en cuenta: el volumen del ventrículo lateral (unos 10,3 µl (Consiglio y col., 2000; Nirogi y col., 2009)) y la tasa de circulación y producción de nuevo LCR (unos 3,75 µl/min (Yaksh, 1999)). De esta forma se estimó que la NA introducida a razón de 50 mU/min desarrollaría una actividad media de unos 4 - 5 mU/µl sobre la pared ventricular.

De cada situación experimental reflejada en la tabla M-03 se realizaron cinco réplicas. Una vez añadido el suero y el enzima correspondiente a cada pocillo los explantes se mantuvieron en una estufa de cultivos a 37 °C y 5% de CO_2. Se valoró visualmente la movilidad ciliar de los explantes a distintos tiempos (0 h, 1 h y 2 h). Finalmente (a las 2 h) estos se procesaron para su estudio histológico (fijación en Bouin e inclusión en parafina). Los cortes obtenidos se analizaron mediante tinción hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica (IHQ).

3.4.2 Ensayos *in vitro* con células ependimarias aisladas

La finalidad de este ensayo fue comprobar si la tasa de viabilidad de las células ependimarias aisladas se veía alterada por la presencia de NA y/o proteínas del complemento en el medio.

Las situaciones experimentales ensayadas se muestran en la tabla M-04. Las células ependimarias se incubaron en presencia de NA y suero (fuente de complemento) simultáneamente, así como con ambos factores por separado. Para comprobar que el efecto observado en los pocillos con suero se debía específicamente al complemento, se incluyó además un control consistente en la adición de un inhibidor del complemento (inhibidor de C5).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medio de ensayo	Neuraminidasa (mU/µl)	Complemento de rata (% v/v en suero de rata)	Inhibidor de C5 (µg/µl)
Medio de cultivo (MC)	*0*	*0%*	*0,0*
MC + NA	*5*	*0%*	*0,0*
MC + Suero	*0*	*50%*	*0,0*
MC + C5-inh	*0*	*0%*	*0,4*
MC + NA + Suero	*5*	*50%*	*0,0*
MC + NA + Suero + C5-inh	*5*	*50%*	*0,4*

Tabla M-04. Situaciones experimentales del ensayo con células ependimarias aisladas. *El medio de cultivo usado como base fue αMEM + Glc + HEPES. A los medios indicados se les añadió NA, suero de rata (fuente de complemento) y/o inhibidor de C5 (Alexion Pharmaceuticals), de manera que el volumen final de todos los pocillos fuese de 1600 µl y el número final de células de aproximadamente 10 000 células/ml.* ***MC****: medio de cultivo,* ***NA****: neuraminidasa,* ***C5-inh****: inhibidor de C5.*

Una vez aisladas (epígrafe 3.2.3), las células ependimarias se contaron en una cámara de recuento Blaubrand® (Neubauer mejorada) (Brand, ref. 717810) y resuspendidas en medio fresco a una densidad tal que su concentración fuese 40 000 células/ml. Después de la adición de los distintos reactivos, momento en que se inició el experimento, la densidad celular resultante en cada pocillo fue de 10 000 células/ml, en un volumen final de 1600 µl.

Para evaluar la viabilidad celular, se tomaron muestras (200 µl, aproximadamente 2000 células) de cada situación experimental a distintos tiempos: 0 (antes de añadir los reactivos), 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. A cada muestra se le añadió 200 µl de una solución de azul tripano 0,4% (colorante azoico empleado para la tinción vital por exclusión) y se incubó durante 5 min. Tras ser centrifugadas (500 × *g*, 5 min), el precipitado de células obtenido fue resuspendido en 100 µl de PFA 4% y depositado en un portaobjetos para su recuento bajo el microscopio óptico. Se hizo un recuento a lo largo de transectos, contando las células sin teñir (vivas en el momento de la fijación) y teñidas de azul (muertas) hasta un total de 200 células para cada una de las muestras tomadas.

Los datos obtenidos a tiempo 0 (inmediatamente antes de añadir los diferentes compuestos al medio) en cada experimento fueron considerados como el 100% de viabilidad celular, con el fin de normalizar los datos de los distintos experimentos al estado inicial del cultivo en cada caso. Este experimento se realizó por triplicado empleando células ependimarias procedentes de diferentes aislamientos. El análisis estadístico posterior se realizó tal como se describe en el epígrafe 3.8.

3.4.3 Ensayo de la actividad citolítica de la neuraminidasa sobre células ependimarias

De forma paralela al ensayo hemolítico frente a distintas concentraciones de enzima NA, se realizó un ensayo complementario con células ependimarias aisladas. Para ello, se obtuvieron células ependimarias procedentes de tres ratas distintas por separado (tres réplicas). Estas se incubaron en

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

medio de cultivo αMEM con glucosa y HEPES, con diluciones seriadas 1/2 de NA vírica y bacteriana partiendo de 25 mU/µl en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo contuvo 100 µl de medio con aprox. 1000 células ependimarias. La placa se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación se añadieron 100 µl de una solución de azul tripano 0,4% a cada pocillo. Se incubó 5 min, tras lo cual, la placa fue centrifugada (300 × *g* ,5 min) en una centrífuga de placas. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de PFA 4% por pocillo. Las células blancas y azules se contaron bajo el microscopio invertido realizando transectos hasta contar unas 300 células por pocillo. El porcentaje de células vivas del control sin NA fue considerado el 100% de viabilidad.

3.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.5.1 Procesado histológico

3.5.1.1 Obtención de cortes en microtomo

Los cerebros extraídos tras su fijación por perfusión vascular se conservaron en el correspondiente fijador (posfijación) entre 24 y 48 h a temperatura ambiente (a 4 °C en el caso del PFA) antes de su deshidratación e inclusión en parafina. El volumen de líquido utilizado en cada paso fue de unos 40 ml (unas 50 veces el volumen del tejido). En el caso de explantes de pared ventricular la posfijación duró 24 h a temperatura ambiente y el volumen de líquido fue de 3 ml por explante.

El proceso de inclusión en parafina consistió en la sustitución del agua tisular por etanol mediante lavados de 45 - 60 min en una serie de alcoholes de gradación creciente. Después los tejidos se dejaron toda la noche en etanol-butanol 1:1 a temperatura ambiente. Al día siguiente se realizaron dos lavados de una hora en butanol con el fin de eliminar por completo el etanol del tejido. A continuación estos se pasaron a un recipiente con parafina líquida en una estufa a 60 °C. Esta parafina se renovó cada 3 h, un mínimo de tres veces, hasta eliminar el butanol del tejido. Finalmente se realizaron los bloques de parafina con el tejido en la orientación adecuada para su posterior corte en microtomo (Leica, modelo RM 2245). Se obtuvieron secciones de entre 5 y 10 µm de espesor, que se montaron en portas tratados.

3.5.1.2 Obtención de cortes en vibratomo

En algunos casos, se optó por cortar los cerebros en vibratomo en lugar de la inclusión en parafina. El corte en vibratomo evita la pérdida de ciertos epítopos que se produce por el calentamiento del tejido durante su inclusión en parafina (60 °C). La consistencia del tejido cerebral fijado hizo prescindible la encastración del mismo en un bloque de agarosa (empleado para el corte de tejido fresco), por lo que los cerebros se cortaron directamente en vibratomo (Leica, modelo VT 1000 S) en plano transversal, obteniéndose cortes de 30 µm de espesor (para IHQ) o 200 µm de espesor (para

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inclusión en resina y posterior corte en ultramicrotomo). Los cortes destinados a IHQ se ordenaron en series paralelas y fueron tratados para su criopreservación. Este tratamiento consistió en tres lavados de 10 min en tampón crioprotector (apéndice 1), en el que finalmente se conservaron a -15 °C.

3.5.1.3 Obtención de cortes en criostato

Los cerebros de algunas ratas se procesaron para obtener cortes en criostato. En estos casos, los animales se anestesiaron y sacrificaron por decapitación. Los cerebros sin fijar se lavaron en PBS 0,1 M, encastrados en medio *Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound* y congelados sobre una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido. Posteriormente fueron fijados al soporte de muestras del criostato (Leica, modelo CM 3050 S) y cortados para obtener secciones de 10 - 15 µm de espesor. Estos cortes fueron directamente montados en portaobjetos tratados con poli-L-lisina, y fijados en acetona fría durante 10 min, siguiendo el método de Heijnen y col. (2006) para el estudio inmunohistoquímico de factores del complemento en cortes de congelación. Seguidamente se trataron para su criopreservación. Para ello se realizaron tres lavados de 10 min en tampón crioprotector (apéndice 1) y finalmente fueron conservados a -15 °C en dicho tampón.

3.5.1.4 Obtención de cortes en ultramicrotomo

Las ratas se perfundieron vascularmente con el fijador de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para asegurar una correcta fijación, esta perfusión se prolongó durante al menos una hora. Una vez extraídos, los cerebros se mantuvieron en el mismo fijador a 4 °C durante toda una noche. A partir de estos cerebros se obtuvieron secciones transversales de 200 µm de espesor mediante corte en vibratomo (epígrafe 3.5.1.2), diseccionándose después bajo la lupa las regiones a estudiar en fragmentos no mayores de 3×3 mm. A estos les fue aplicado el siguiente protocolo para su inclusión en resina araldita: tras ser lavados con PB 0,1 M (tres lavados de 5 min), se fijaron en tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% en PB 0,1 M, unas 2 h en oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación. A continuación, se lavaron en agua bidestilada a 4 °C (tres lavados de 5 min), y fueron deshidratados mediante pasos de 5 min en una serie de alcoholes de gradación creciente (etanol 25°, 50° y 70°) a 4 °C. Tras 10 min en el etanol 70°, se realizó un tratamiento de contraste mediante acetato de uranilo al 2% en etanol 70°, durante 3 h a 4 °C. Después se continuó la deshidratación con lavados sucesivos en etanol 70°, 96° y 100° (dos lavados de 8 min). Tras un último paso en etanol 100°, los fragmentos se lavaron en óxido de propileno (dos lavados de 10 min) a temperatura ambiente. Posteriormente se comenzó la inclusión en araldita (apéndice 1): primero se embebió el tejido con la resina mediante incubación toda la noche, en agitación y a temperatura ambiente. Al día siguiente, se inició la polimerización de la araldita en una estufa a 65 - 70 °C, donde permaneció durante tres días como mínimo. Tras este tiempo, el bloque estuvo listo para obtener secciones semifinas (1 µm) y ultrafinas (50 nm aprox.) en el ultramicrotomo (Reichert-Jung, modelo Ultracut-E). Los cortes semifinos se pegaron en portaobjetos en

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

una placa calefactora a 90 °C. Los cortes ultrafinos fueron recogidos y conservados sobre rejillas de cobre de 200 *mesh*.

3.5.2 Tinciones histológicas generales

La tinción histológica general usada para contrastar cortes procedentes de microtomo, vibratomo y criostato fue la tinción hematoxilina-eosina. Para los cortes semifinos procedentes del ultramicrotomo se empleó la tinción con azul de toluidina.

3.5.2.1 Hematoxilina-eosina

Los cortes de parafina fueron desparafinados en xileno (dos lavados de 10 min), hidratados mediante lavados de 5 min en una serie de alcoholes de gradación decreciente (etanol 100°, 96°, 70° y 50°), y finalmente lavados en agua destilada. Los cortes procedentes de vibratomo y criostato se lavaron en PBS 0,1 M con el fin de eliminar el tampón crioprotector, y tras ello se pasaron a agua destilada.

Para la tinción, los cortes fueron sometidos a los siguientes pasos: hematoxilina de Harris durante 25 segundos; etanol 96° con ácido acético glacial (5 gotas/100 ml), agua destilada durante 5 min, solución hidroalcohólica 10° con eosina amarillenta 1% durante 3 segundos y agua destilada durante 5 min. A continuación, los cortes fueron deshidratados mediante lavados de 5 min en una serie de alcoholes de gradación creciente (etanol 70°, 96° y 100°), embebidos en xileno y montados con medio de montaje Eukitt®.

3.5.2.2 Azul de toluidina

Los cortes semifinos montados en portaobjetos se tiñeron con una solución de azul de toluidina al 1% (apéndice 1). Para ello, se puso una gota del colorante sobre los cortes dispuestos en una placa calefactora a 90 °C durante 10 min. Posteriormente fueron lavados en agua destilada para retirar el exceso de colorante hasta obtener el grado de tinción adecuado, secados sobre la placa calefactora y montados con medio Eukitt®.

3.5.3 Tinciones histológicas especificas

3.5.3.1 Técnicas inmunohistoquímicas

Esta técnica se empleó para la detección específica de diversas moléculas en secciones de tejido, las cuales se recogen en la tabla M-05. Esta incluye también los anticuerpos empleados, así como información particular del protocolo seguido en cada caso.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para la detección de los sitios de unión del anticuerpo primario al tejido se utilizó, en la mayoría de los casos, un sistema de amplificación mediante el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, del inglés *Avidin-Biotin complex*) (fig. M-11). En otros casos se utilizó un procedimiento de inmunofluorescencia (tabla M-06).

El control negativo de la técnica IHQ consistió en la omisión del anticuerpo primario (OAP), incubándose los cortes, en su lugar, en la solución PBT empleada como diluyente: PBS 0,1 M, albúmina (BSA, del inglés *Bobine serum albumin*) 0,3% y Triton-X100 0,3%. Como control positivo se utilizaron secciones de tejidos en los que era conocida la expresión del antígeno a detectar.

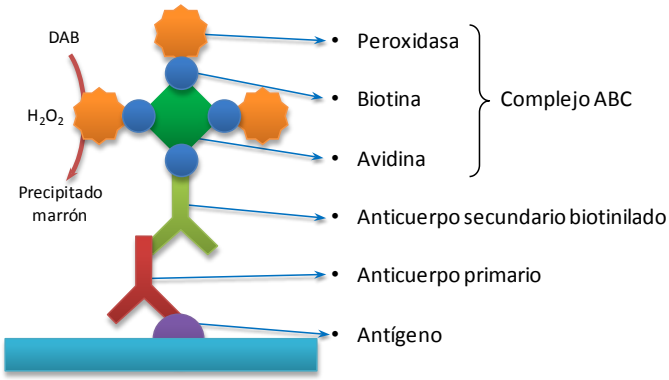


Figura M-11. Esquema del complejo antígeno-anticuerpos-ABC en inmunohistoquímica. *Un anticuerpo primario no conjugado reconoce al antígeno en la muestra. Un anticuerpo secundario biotinilado reconoce la región constante del anticuerpo primario. Se forma un complejo avidina-biotina-peroxidasa sobre la biotina del anticuerpo secundario. Los enzimas peroxidasa transforman el sustrato diaminobenzidina en un precipitado marrón detectable mediante microscopia óptica.*

3.5.3.1.1 Recuperación antigénica

En algunos casos la fijación y el procesamiento histológico del tejido provocan el enmascaramiento de epítopos de interés, los cuales se pueden restablecer mediante un tratamiento de recuperación antigénica realizado inmediatamente antes de la incubación con el anticuerpo primario. Dicho tratamiento consistió en la incubación de los cortes en una solución tamponada a un pH determinado a 95 °C en microondas durante 8 - 10 min (con interrupciones breves cada 2 min para evitar la ebullición). Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Tampón citrato 10 mM pH 6,0.

- Tampón Tris 10 mM con EDTA 1 mM pH 9,0.

Tras este tratamiento, los cortes se lavaron en PBS antes de continuar con el procedimiento de IHQ.

3.5.3.1.2 Inmunohistoquímica mediante complejo avidina-biotina-peroxidasa

Los cortes en parafina fueron desparafinados en xileno e hidratados mediante una serie de alcoholes de gradación decreciente. Los cortes de vibratomo y de criostato se sacaron del crioprotector

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y fueron lavados en PBS 0,1 M. A continuación se sumergieron durante 30 min en solución de inactivación de peroxidasa endógena (apéndice 1), con el fin de eliminar la actividad de este enzima presente en el tejido. Tras varios lavados en PBS, se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo al tejido incubando con solución PBT (diluyente de los anticuerpos) a temperatura ambiente durante una hora. De ahí se pasó directamente a incubar con la solución del anticuerpo primario. En todos los casos los anticuerpos se diluyeron en PBT, y la incubación se prolongó durante toda la noche a temperatura ambiente (en gota y en cámara húmeda).

Al día siguiente, los cortes se lavaron en PBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBT durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, y tras volver a lavar en PBS, los cortes fueron incubados con ABC diluido 1:250 en PBT (apéndice 1) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente la actividad peroxidasa fue revelada mediante incubación en solución de revelado con diaminobencidina (DAB) al 0,05% y H_2O_2 al 0,03% durante 10 min (apéndice 1). Los cortes fueron entonces lavados, deshidratados y montados con medio Eukitt®.

La tabla M-05 recoge los anticuerpos primarios utilizados, sus diluciones y el anticuerpo secundario empleado en cada caso. También se especifica si se realizó algún pretratamiento de recuperación de antígenos.

Antígeno	Anticuerpo primario, referencia (dilución)	Anticuerpo secundario, referencia (dilución)	Recuperación antigénica	Amplificación de señal
C5b-9	*Anti-C5b-9 desarrollado en conejo, Abcam, ref. ab55811 (1:200)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31820 (1:1000)*	*No*	*ABC*
C9	*Anti-C9 desarrollado en conejo, Cortesía Prof. Morgan, Cardiff (1:100)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, Alexa fluor® 488. Pierce, ref. A11070 (1:1000)*	*No*	*No*
CASP3	*Anti-Caspasa 3 desarrollado en ratón, Thermo, ref. MS1123R7 (1:100)*	*UltraVision Quanto HRP Thermo Scientific, TL060QHD*	*PT-Link, tampón Tris-EDTA pH9 95 °C, 20 min*	*UltraVision Quanto HRP*
CD163	*Anti-CD163 desarrollado en ratón, Santa cruz, ref. SC58965 (1:50)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31800 (1:1000)*	*No*	*ABC*
CD3ε	*Anti-CD3ε desarrollado en cabra, Santa cruz, ref. SC1127 (1:200)*	*Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo, (H+L) biotinilado. Vector, ref. BA9500 (1:1000)*	*Microondas, tampón Tris-EDTA pH9 95 °C, 8 min*	*TSA*
CD8α	*Anti-CD8α desarrollado en ratón, Serotec, ref. MCA48R (1:1500)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31800 (1:1000)*	*Microondas, tampón Tris-EDTA pH9 95 °C, 8 min*	*TSA*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GFAP	*Anti-GFAP desarrollado en ratón, Sigma, ref. G3893 (1:1000)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31800 (1:1000)*	*No*	*ABC*
IBA1	*Anti-IBA1 desarrollado en conejo, Wako, ref. 19-19741 (1:500)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31820 (1:1000)*	*No*	*ABC*
ICAM1	*Anti-ICAM1, desarrollado en cabra, RyD system, ref. AF583 (1:40)*	*Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo, (H+L) biotinilado. Vector, ref. BA9500 (1:1000)*	*No*	*ABC*
IgG	*Anti-IgG de rata desarrollado en conejo, (H+L) biotinilado. Thermo, ref. 31834 (1:500)*	*No*	*No*	*ABC*
IL1β	*Anti-IL1β desarrollado en cabra, RyD system, ref. AF501NA (1:200)*	*Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo, (H+L) biotinilado. Vector, ref. BA9500 (1:1000)*	*No*	*ABC*
MBP	*Anti-MBP desarrollado en conejo, Zymed, ref. 18-0038 (1:500)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31820 (1:1000)*	*No*	*ABC*
MPO	*Anti-MPO desarrollado en conejo, Abcam, ref. ab9535 (1:100)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31820 (1:1000)*	*No*	*ABC*
Olig2	*Anti-Olig2 desarrollado en cabra, RyD system, ref. AF2418 (1:100)*	*Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo, (H+L) biotinilado. Vector, ref. BA9500 (1:1000)*	*No*	*TSA*
PAX5	*Anti-PAX5 desarrollado en cabra, Santa cruz, ref. SC1974 (1:200)*	*Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo, (H+L) biotinilado. Vector, ref. BA9500 (1:1000)*	*Microondas, tampón citrato pH6 95 ºC, 8 min*	*TSA*
Vim	*Anti-vimentina desarrollado en ratón, Sigma, ref. V6630 (1:1000)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra, (H+L) biotinilado. Pierce, ref. 31800 (1:1000)*	*No*	*ABC*

Tabla M-05. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica, *con sus correspondientes tratamientos de recuperación antigénica y amplificación de señal aplicados.*

3.5.3.1.3 Amplificación de señal mediante tiramina biotinilada

En algunos casos, la débil señal obtenida por el método ABC estándar requirió la adición de un paso de amplificación con tiramina biotinilada (TSA, del inglés, *Tyramide Signal Amplification*).

La tiramina es una amina biogénica derivada del aminoácido aromático tirosina. Su anillo bencénico es oxidable por peroxidasa en presencia de H_2O_2. Esta reacción permite la unión de la tiramina a anillos fenólicos presentes en el tejido (Schmitt y col., 2004). La tiramina biotinilada se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Adams en 1992 (apéndice 1).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

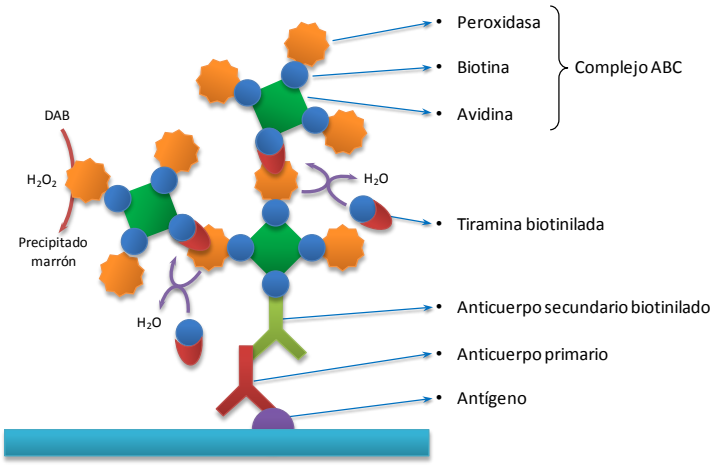


Figura M-12. Esquema de la amplificación con tiramina biotinilada en inmunohistoquímica. *Partiendo de un complejo antígeno-anticuerpos-ABC (fig. M-11), la peroxidasa cataliza la unión de las moléculas de tiramina biotinilada a proteínas cercanas (ej: la propia peroxidasa). Cada una de estas nuevas biotinas ligadas al complejo supone un punto de unión para nuevos complejos ABC. Aumenta así el número de peroxidasas que posteriormente transformaran la DAB en el precipitado marrón.*

Para realizar la amplificación con TSA, se siguió el protocolo de IHQ convencional hasta la incubación con solución ABC. Tras lavar los cortes, se incubaron en una solución de tiramina biotinilada 1:250 en PBT con H_2O_2 al 0,01% en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se lavó con PBS y se incubaron de nuevo con solución ABC a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Finalmente, se continúa con el revelado de la peroxidasa de igual forma que el protocolo estándar.

3.5.3.1.4 Inmunohistoquímica de fluorescencia

La IHQ doble de fluorescencia nos permite poner de manifiesto de forma simultánea la presencia de dos moléculas distintas sobre una misma muestra. De esta forma se puede comprobar si ambas moléculas colocalizan o no en el tejido. En estos casos, los dos anticuerpos primarios han de proceder de especies diferentes, para ser luego identificados mediante anticuerpos secundarios distintos. Se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos de diferente color.

El protocolo seguido fue similar al de la IHQ con ABC expuesto anteriormente, con las siguientes particularidades: los anticuerpos primarios se mezclaron e incubaron simultáneamente; los anticuerpos secundarios ligados a fluorocromo también se incubaron a la vez, y además, se añadió a la solución 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a 0,1 µg/ml, marcador fluorescente de ácidos nucleicos para visualizar los núcleos celulares en un color distinto al de los fluorocromos empleados (el DAPI se une al surco menor de la doble hélice de ADN, por lo que no actúa sobre los ácidos nucléicos alterados en tejidos fijados con la mezcla de Bouin. En estos casos se empleó únicamente para obtener una tinción de contraste azul fluorescente que permitiese visualizar las distintas regiones del tejido en campo oscuro). Finalmente los cortes se montaron con medio de montaje para fluorescencia (apéndice 1), una mezcla acuosa de

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

glicerol y Mowiol, un agente antidesvanecimiento para prevenir del blanqueamiento de los fluorocromos. Los portaobjetos se conservaron en oscuridad y a 4 °C hasta su observación.

En la tabla M-06 se recogen los anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia, su dilución de uso y el fluorocromo unido.

Anticuerpo secundario	Desarrollado en	Fluorocromo ligado	Longitud de onda de emisión	Referencia (dilución)
Anti-IgG de conejo	*cabra*	*Alexa fluor® 488*	*519 nm* 🟢	*Molecular Probes, ref. A11070 (1:1000)*
Anti-IgG de ratón	*burro*	*Alexa fluor® 594*	*618 nm* 🔴	*Molecular Probes, ref. A21203 (1:1000)*
Anti-IgG de cabra	*conejo*	*Alexa fluor® 488*	*519 nm* 🟢	*Molecular Probes, ref. A21222 (1:1000)*
Anti-IgG de conejo	*burro*	*Alexa fluor® 594*	*618 nm* 🔴	*Invitrogen, ref. A21207 (1:1000)*
Anti-IgG de cabra	*burro*	*Alexa fluor® 488*	*519 nm* 🟢	*Invitrogen, ref. A11055 (1:1000)*

Tabla M-06. Anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados en inmunohistoquímica.

3.5.3.2 Histoquímica de lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen de forma específica a carbohidratos concretos. En este trabajo se utilizaron lectinas sobre secciones de tejido para estudiar la presencia de ciertos azúcares en el epéndimo y para verificar la actividad NA. Las lectinas empleadas y sus afinidades específicas se recogen en la tabla M-07.

Lectina, referencia	Origen	Afinidad principal	Concentración de uso
LFA (Calbiochem, ref. 122129)	Babosa amarilla (*Limax flavus* L.)	Ácido siálico terminal (Neu5Ac)	2 µg/ml
SNA-biot (Vector, ref. B-1305)	Saúco común (*Sambucus nigra* L.)	Ácido siálico terminal (Neu5Ac*α2,6*Gal/GalNAc)	2 µg/ml
PNA-biot (Vector, ref. B-1075)	Cacahuete (*Arachis hypogaea* L.)	Galactosa terminal (Gal*β1,3*GalNAc/GlcNAc)	1 µg/ml

***Tabla M-07. Relación de lectinas utilizadas en tinción histoquímica. Neu5Ac**: ácido siálico, **Gal**: galactosa, **GalNAc**: N-acetil-galactosamina, **GlcNAc**: N-acetil-glucosamina, **biot**: biotinilada.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Secciones de parafina desparafinadas, y secciones de vibratomo o criostato lavadas con PBS 0,1 M, fueron sumergidas 30 min en solución de inactivación de peroxidasa endógena (apéndice 1).

A continuación, se incubaron con la solución de lectina a la concentración indicada en la tabla M-07, diluida en tampón para lectinas (apéndice 1). En todos los casos la incubación con las lectinas se realizó en gota y en cámara húmeda, a 37 °C durante una hora.

Algunas de las lectinas empleadas estaban conjugadas con biotina, en cuyo caso los cortes se lavaron e incubaron en solución ABC, de igual forma que se hace en la IHQ tras el anticuerpo secundario biotinilado (epígrafe 3.5.3.1.2). En los casos en que se utilizó la lectina LFA, no biotinilada, tras la lectina se incubó durante una hora con anticuerpo anti-LFA biotinilado (desarrollado y cedido por el grupo de investigación del Dr. Rodríguez, de la Universidad Austral de Chile), y a continuación con el complejo ABC. Finalmente, la actividad peroxidasa fue revelada tal y como se hizo en IHQ. Tras deshidratar los cortes, fueron montados con medio Eukitt®.

Con el fin de comprobar la actividad enzimática de cada lote de enzima NA, se incubaron cortes de cerebro de rata fijados en Bouin e incluidos en parafina con dicho enzima diluido en tampón para NA (apéndice 1) a distintas concentraciones (1, 2 y 5 mU/µl), toda la noche a 37 °C (Herrera y col., 1990). Posteriormente, estos cortes se incubaron con lectina PNA-biotinilada (1 µg/ml, Vector; afinidad por galactosa terminal) en tampón para lectinas (apéndice 1) durante una hora a 37 °C. En los casos en los que el enzima NA fuese activo, la superficie ependimaria de las secciones tratadas debería aparecer PNA+, puesto que al ser eliminado el ácido siálico queda un residuo de galactosa como residuo terminal (epígrafe 1.3.1, fig. I-06).

3.5.3.3 Tinción con Fluoro-jade B

Fluoro-Jade B es un derivado polianiónico de fluoresceína que muestra la propiedad de unirse específicamente a neuronas en degeneración (Schmued y col., 2000), sin distinguir entre necrosis y apoptosis. Este compuesto tiene un pico de excitación a 480 nm y un pico de emisión a 525 nm.

Los cortes fueron desparafinados e hidratados en alcoholes del modo convencional, con la particularidad de que se añadió un paso de 5 min en etanol 80° con NaOH al 1%. A continuación se incubaron en una solución de permanganato potásico al 0,06% durante 10 min, se lavaron con agua destilada 2 min, y después se incubaron en la solución de Fluoro-Jade B al 0,0004% en ácido acético 0,1% durante 20 min. Esta solución se lavó con agua destilada (tres lavados de 1 min) tras lo cual los cortes se dejaron secar al aire 10 min y sobre una placa calefactora a 50 °C durante otros 10 min. Una vez secos, se sumergieron en xileno 5 min para su montaje con medio de montaje Eukitt®.

Esta tinción fue aplicada a cortes Bouin-parafina. Como control positivo se empleó la región cortical directamente dañada por la cánula de inyección.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.5.4 Obtención y procesamiento de imágenes

Las fotografías de microscopía óptica se obtuvieron mediante una cámara digital (Nikon Digital Sight, DS.Fi1) acoplada a un microscopio óptico (Leica, modelo DMLB) mediante el software NIS-Elements F2.20 (Nikon).

Los explantes de epéndimo en cultivo fueron observados mediante un microscopio invertido (Leica, modelo MD-IL) y fotografiados con una cámara digital acoplada (Nikon Digital Coolpix E990).

La visualización y obtención de imágenes de cortes tratados con IHQ de fluorescencia y fluorojade B se realizó mediante un microscopio confocal (Leica, modelo SP5 II). El software para la captura de las imágenes fue LAS-AF (Leica).

La observación de los cortes ultrafinos se realizó en un microscopio electrónico de trasmisión (Jeol JEM 1400) con un captador de imágenes de 11 Megapixels (Gatan, ES1000w Erlangshen CCD Camera). El software usado para la captura y edición de imágenes fue Digital Micrograph™ (Gatan).

En aquellos casos en los que fue necesario, se realizaron ajustes en el brillo y/o contraste de las imágenes mediante el programa informático Corel Photo-Paint (v9.397, Corel Corporation). Este mismo fue utilizado para realizar el montaje de las imágenes y fotografías utilizadas en las figuras.

3.6 CUANTIFICACIÓN DE ÁREA INMUNORREACTIVA Y RECUENTO CELULAR

3.6.1 Cuantificación de área inmunorreactiva

Con el fin de determinar los cambios de expresión de ciertos marcadores inmunohistoquímicos a distintos tiempos tras la inyección de NA, se realizó un estudio de cuantificación de área inmunorreactiva sobre imágenes tomadas de manera sistemática.

Para evaluar la inflamación, se determinó el área inmunorreactiva de varios marcadores en regiones próximas al ventrículo inyectado y en áreas equivalentes del ventrículo contralateral. Estos fueron:

- GFAP, como marcador de astrocitos (Gomes y col., 1999).

- ICAM1, molécula de adhesión en los vasos sanguíneos (Lawson y col., 2009).

- IBA1, como marcador de microglía (Mori y col., 2003; Patro y col., 2010; Wirenfeldt y col., 2009).

Para el estudio de la degeneración en los tractos mielínicos se analizó el área ocupada por el marcador de la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés *Myelin basic protein*) en la estría medular y el quiasma óptico.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.6.1.1 Material histológico e inmunohistoquímica para la cuantificación de área inmunorreactiva

El estudio cualitativo del material histológico entre 0 h y 30 días posinyección de NA sugirió que la respuesta inmune celular progresa como se indica en la fig. M-13, lo cual está en concordancia con lo descrito en la bibliografía sobre las reacciones inflamatorias y neuroinflamatorias.

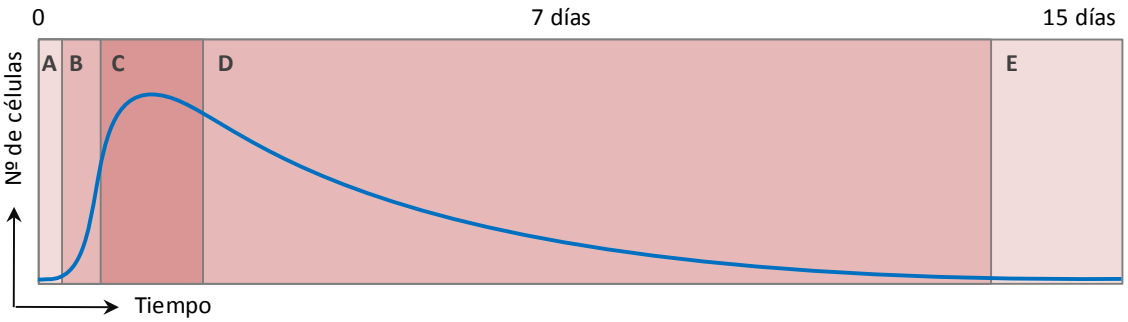


Figura M-13. Esquema de la respuesta inflamatoria celular. *Se representa el comportamiento general del número de células inflamatorias presentes en el tejido inflamado respecto al tiempo. Distinguimos 5 fases:* ***A****, estado fisiológico basal, previo a la inflamación;* ***B****, inicio de la reacción inflamatoria;* ***C****, clímax de la reacción inflamatoria;* ***D****, disminución de la respuesta inflamatoria; y* ***E****, retorno al estado fisiológico basal.*

Basándonos en dicha observación, y con el fin de abordar una descripción cuantitativa del proceso, se seleccionaron aquellos tiempos posinyección más representativos, a saber: 0 h (inmediatamente después de la inyección ICV de vehículo, animales con operación simulada), fue considerado una referencia del estado basal, pues el comienzo de la reacción inflamatoria fue posterior (se usó un animal con operación simulada y no un animal no inyectado para tener en cuenta los efectos producidos por el proceso de inyección); 4 h, tiempo alrededor del cual comienza la reacción inflamatoria celular; 24 h, momento en torno al cual se observa la máxima presencia de células inmunocompetentes en los ventrículos y meninges; 7 días, tiempo intermedio en la fase de decaimiento de la inflamación y entorno al que se observa la máxima degeneración en tractos mielínicos; y 15 días, tiempo al que consideramos que la inflamación celular estaba aparentemente resuelta y la degeneración en los tractos mielínicos había desaparecido casi en su totalidad.

En el estudio de la degeneración en tractos mielínicos, los tiempos posinyección seleccionados fueron 0, 1, 2, 4, 7, 15 y 30 días. Al igual que en el estudio de la inflamación, el tiempo 0 fue considerado una referencia del estado basal. Un día después de la inyección comienzan a observarse los primeros signos de degeneración, que se hacen máximos entre el cuarto y el séptimo día. A los 15 días las áreas degeneradas muestran un alto grado de recuperación, que es prácticamente total a los 30 días.

Varios animales por tiempo (ratas Wistar macho de entre 225 y 250 g) fueron inyectados ICV con 20 µl de NA (25 mU/µl) de *Clostridium perfringens* (epígrafe 3.1.3.1). Posteriormente se fijaron con fijador de Bouin mediante perfusión vascular. Los cerebros fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes coronales de 7 µm de espesor. Tras un estudio bajo el microscopio óptico del material teñido con

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

hematoxilina-eosina, se escogieron para el recuento aquellos animales que reunieron las mejores condiciones de inyección, fijación y procesado histológico.

De cada animal estudiado se escogieron dos cortes (tres en el caso de MBP) en los niveles aproximados indicados en la tabla M-08. Se eligieron estos niveles porque estaban lo suficientemente alejados de la zona de la inyección ICV como para que el daño tisular propio de la inyección no se viera reflejado en el estudio, pero lo suficientemente cerca como para mostrar una amplia región afectada por la NA alrededor de cada ventrículo lateral. Además, dichos cortes mostraban también regiones de interés como el fórnix, la estría medular, o el quiasma óptico.

Los cortes seleccionados fueron inmunoteñidos mediante el anticuerpo correspondiente siguiendo la técnica de amplificación ABC y revelado de la actividad peroxidasa descritos anteriormente (epígrafe 3.5.3.1).

Antígeno	Cortes usados (nivel Bregma AP aproximado)
GFAP	*-0,64 mm y -0,43 mm*
ICAM1	*-0,99 mm y -0,78 mm*
IBA1	*-0,66 mm y -0,42 mm*
MBP	*-0,92 mm, -0,95 mm y -0,99 mm*

Tabla M-08. Niveles Bregma antero-posterior aproximados de los cortes seleccionados para cada marcador inmunohistoquímico.

3.6.1.2 Obtención de fotografías y procesamiento de imágenes

En cada corte histológico se realizaron dos pares de fotografías en torno a los ventrículos laterales, la primera de cada par en el lado inyectado y la segunda en la región contralateral equivalente (fig. M-14 A). Las fotografías tomadas en el ventrículo contralateral fueron consideradas como un control interno mediante el que controlar las variaciones experimentales durante la tinción inmunohistoquímica, además de que la expresión de estos marcadores puede sufrir variaciones por regulación.

En el caso del marcador MBP usado para evaluar la desmielinización, en cada corte histológico se realizaron dos fotografías, una en el seno de la estría medular del lado inyectado y otra en el quiasma óptico, también del lado ipsilateral (fig. M-14 B). En este caso no fue necesario un control de expresión contralateral, pues la expresión de este marcador es homogénea y estable entre los distintos animales.

Las fotografías se tomaron siempre bajo las mismas condiciones de intensidad de luz, abertura de diafragma, abertura de condensador, contraste, resolución, tiempo exposición y ganancia de brillo.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

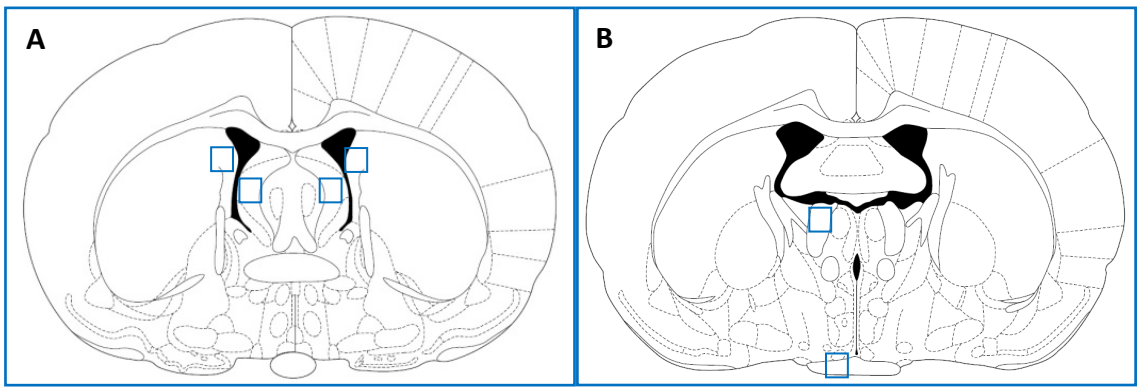


Figura M-14. Regiones seleccionadas para la cuantificación de área inmunorreactiva. A: *situación de las fotografías (recuadro azul) tomadas en el estudio de GFAP, ICAM1 e IBA1. Se tomaron dos fotografías 20× inmediatamente debajo del subepéndimo, una en la región dorsal de la pared estriatal del ventrículo y otra en la región media de la pared septal, cada una con su correspondiente fotografía control en el ventrículo contralateral. Nivel Bregma aproximado AP = -0,45 mm.* ***B:*** *situación de las fotografías tomadas en el estudio de MBP. Se tomaron dos fotografías 40×, una en el seno de la estría medular ipsilateral y otra en el interior de la mitad ipsilateral del quiasma óptico. Nivel Bregma aproximado AP = -0,95 mm.*

Las fotografías fueron procesadas mediante el programa informático Visilog 6.3 (Noesis) para la obtención de un valor del área inmunoteñida. Para ello se aisló el canal azul de cada imagen RGB (siendo este el más contrastado de los tres, puesto que la marca DAB es marrón-rojiza), y se transformó en una imagen binaria. En una imagen del sistema estándar RGB (del inglés, *Red Green Blue*), cada pixel puede tener un valor de intensidad comprendido entre 0 y 255 para cada uno de los tres canales (fig. M-15). En una imagen binaria, sin embargo, cada pixel puede tener únicamente dos valores posibles: 0 y 1. Al extraer un canal de una imagen RGB y transformarlo en imagen binaria, establecemos un límite de valor por debajo del cual consideramos la intensidad como positiva (estos pixeles pasarán a tener el valor 0) y por encima del cual, la consideramos negativa (estos pasarán a tener valor 1). Para cada marcador inmunohistoquímico, el límite para realizar la transformación (tabla M-09) fue calculado analizando visualmente el proceso de binarización manual de una fotografía tomada al azar para cada tiempo. La media de los límites obtenidos se aplicó por igual a todas las fotografías del mismo marcador.

Sobre la imagen binaria fue posible contabilizar el área ocupada por la marca positiva (valor binario = 0) frente al área ocupada por la ausencia de marca (valor binario = 1). La vinculación de las imágenes a una escala micrométrica previamente establecida permitió obtener para cada una un valor de área positiva en μm^2.

Antígeno	Limites de binarización
GFAP	*0-225 = 0; 226-255 = 1*
ICAM1	*0-217 = 0; 218-255 = 1*
IBA1	*0-230 = 0; 231-255 = 1*
MBP	*0-160 = 0; 161-255 = 1*

Tabla M-09. Límites de binarización empleados en la cuantificación de área inmunorreactiva.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

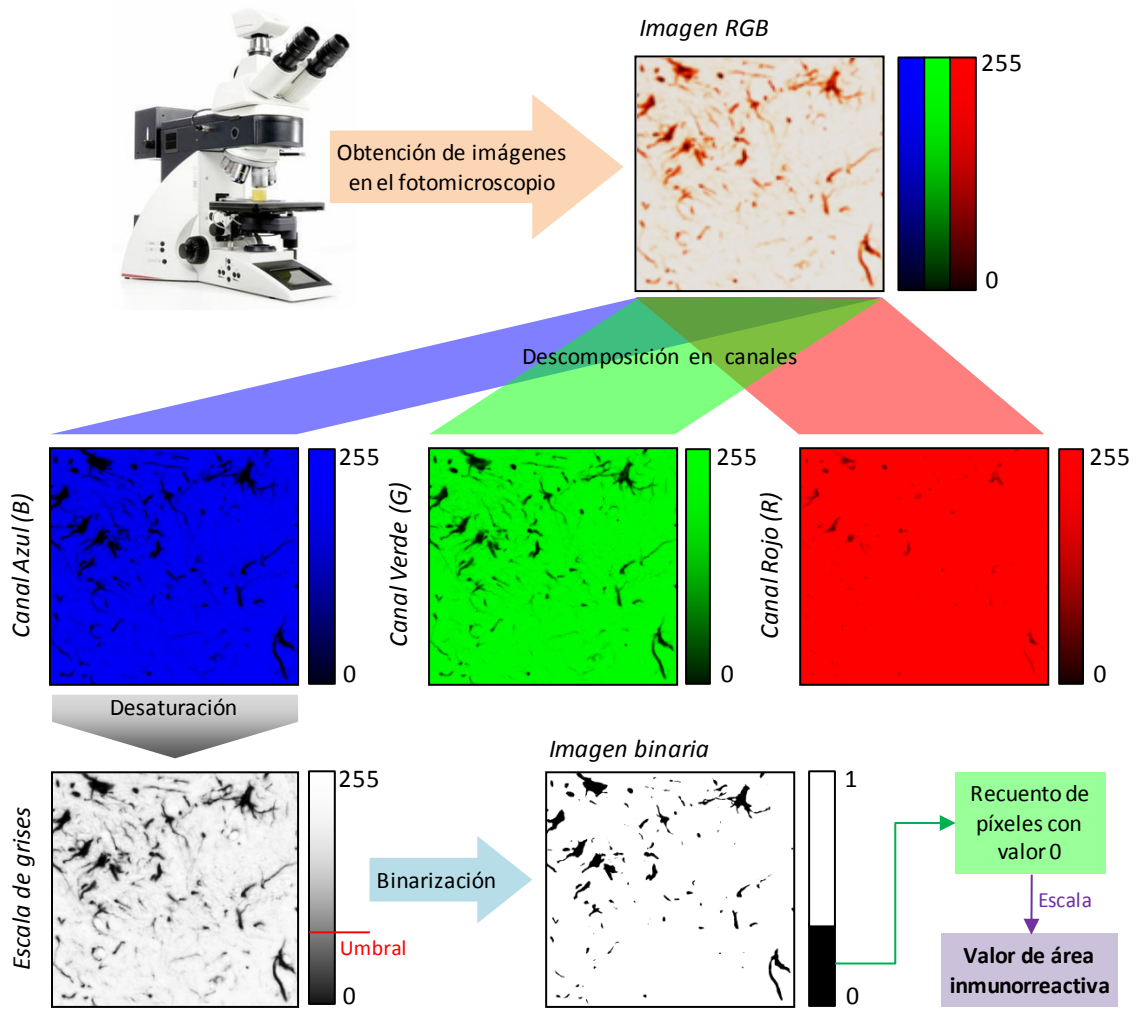


Figura M-15. Proceso de cuantificación de área inmunorreactiva. *Cada imagen RGB se separó en sus tres canales de color. Se eligió la imagen del canal azul, que se obtuvo en escala de grises. Se aplicó el umbral de binarización elegido transformándose la imagen de grises en una imagen binaria. En esta, cada pixel puede tomar únicamente el valor 0 o 1. Mediante el programa informático, se contabilizó el número de pixeles positivos (valor 0) y se transformó este dato en un valor de área mediante la comparación con una escala fotográfica previamente establecida.*

3.6.1.3 Procesamiento de los datos de cuantificación de área inmunorreactiva

Durante el estudio microscópico del material se observó una cierta variabilidad en el grado de inmunotinción entre los distintos animales, posiblemente dependiente de la cirugía de inyección ICV, o incluso del procesamiento histológico. Por este motivo, y con el fin de normalizar los datos haciéndolos independientes de dicha variabilidad, en el caso de los marcadores GFAP, ICAM1 e IBA1 las medidas realizadas en el ventrículo contralateral fueron consideradas como un control interno de cada animal y de cada sección. A cada valor de área medido en el lado inyectado se le restó el valor medido en la imagen equivalente del lado contralateral. De este modo se obtuvieron dos datos de "área positiva respecto al lado contralateral" a partir de cada una de las 2 - 3 secciones estudiadas por animal. La media de dichos valores generó un valor de área inmunoteñida para cada animal, siendo estudiados

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

entre tres y cinco animales por tiempo posinyección de NA. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo tal como se explica en el epígrafe 3.8.

3.6.2 Recuentos celulares

Con el fin de describir los cambios en el número de células de ciertas poblaciones infiltradas en las regiones afectadas por la inyección de NA y la inflamación, se realizaron recuentos celulares bajo el microscopio óptico y con la ayuda de fotografías.

Se pretendió analizar cuatro poblaciones características del proceso inflamatorio: neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B. Los marcadores inmunohistoquímicos empleados para ello fueron: 1) mieloperoxidasa (MPO), enzima citoplasmática de fuerte expresión en los neutrófilos (Prokopowicz y col., 2012); 2) IL1β, citocina proinflamatoria altamente expresada por macrófagos, principalmente M1 (Lin y col., 2000; Ma y col., 2003) y microglía activada; y CD163, proteína expresada por una subpoblación de macrófagos, principalmente M2 (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Verreck y col., 2006), pero no por microglía; 3) CD3ε, polipéptido perteneciente al complejo del receptor CD3 del linfocito T (Weiss, 1993); y 4) PAX5, factor de transcripción expresado en exclusiva por linfocitos B (Cobaleda y col., 2007) y crucial en su proceso de diferenciación.

Para el estudio de la degeneración en los tractos mielínicos se utilizó el marcador de oligodendrocitos Olig2, un factor de transcripción que se expresa constitutivamente en el núcleo de estas células (Marie y col., 2001).

3.6.2.1 Material histológico e inmunohistoquímica para recuento celular

Los animales utilizados fueron los mismos que los empleados para el estudio de cuantificación de área inmunorreactiva. Por tanto, los tiempos posinyección estudiados fueron, en el caso de la inflamación: 0 h, 4 h, 24 h, 7 días y 15 días, y en el caso de la degeneración en tractos mielínicos: 0, 1, 2, 4, 7, 15 y 30 días. Para cada tiempo y marcador fueron estudiados el mismo número de animales.

En un estudio preliminar de los cortes teñidos con CD163 se observó que el mayor número de células positivas aparecía en una estrecha ventana temporal en torno a las 12 h posinyección. Por ello, se incluyeron tres animales de este tiempo en los recuentos de dicho marcador.

De cada animal, una serie de cortes (cuatro cortes separados 70 µm entre sí) comprendidos en la región del agujero de Monro (entre los niveles Bregma AP = -0,85 mm y AP = -1,13 mm aproximadamente), fue inmunoteñida con el anticuerpo correspondiente (epígrafe 3.5.3.1). En el caso de Olig2, de cada animal se estudiaron tres cortes, de manera paralela al estudio de MBP.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.6.2.2 Obtención de fotografías y recuento celular

De cada corte histológico se escogieron tres áreas consideradas relevantes en el proceso de la inflamación cerebral (fig. M-16):

- Plexos coroideos: en cada sección estudiada, se contó el número de células positivas en el interior o en contacto con los plexos coroideos del ventrículo inyectado y se dividió entre el área ocupada por los plexos (epígrafe 3.6.2.3). De esta manera se obtuvo, para cada corte, el número de células positivas por área ocupada por los plexos en mm^2. Los recuentos se realizaron directamente bajo el microscopio, salvo en los casos en los que el elevado número de células positivas sugiriese el recuento sobre fotografías digitales.

- Vasos sanguíneos junto al órgano subfornical: se contó bajo el microscopio el número de células positivas alrededor de los grandes vasos que discurren junto al órgano subfornical, en el lado ipsilateral. Concretamente, se contaron las células localizadas en el interior de la pared de los vasos y en contacto con su superficie parenquimal, ya que el lavado del sistema circulatorio durante la perfusión vascular del tejido eliminó las células presentes en la luz de los vasos.

- Meninges ventrales al quiasma óptico: se contaron las células positivas localizadas en las meninges y el espacio meníngeo de la región ventral al quiasma óptico, en dos campos microscópicos con el objetivo 20× (unas 900 µm de extensión lineal) a un lado y a otro de la línea media cerebral.

En el caso del marcador Olig2, empleado en el estudio de la degeneración en tractos mielínicos para localizar oligodendrocitos, se realizó el recuento de los núcleos positivos sobre fotografías. Se tomaron dos fotografías con el objetivo 40× en cada corte histológico estudiado, una en el seno de la estría medular y otra en el quiasma óptico, del lado inyectado en ambos casos, de forma paralela al procedimiento seguido en la cuantificación de la tinción MBP.

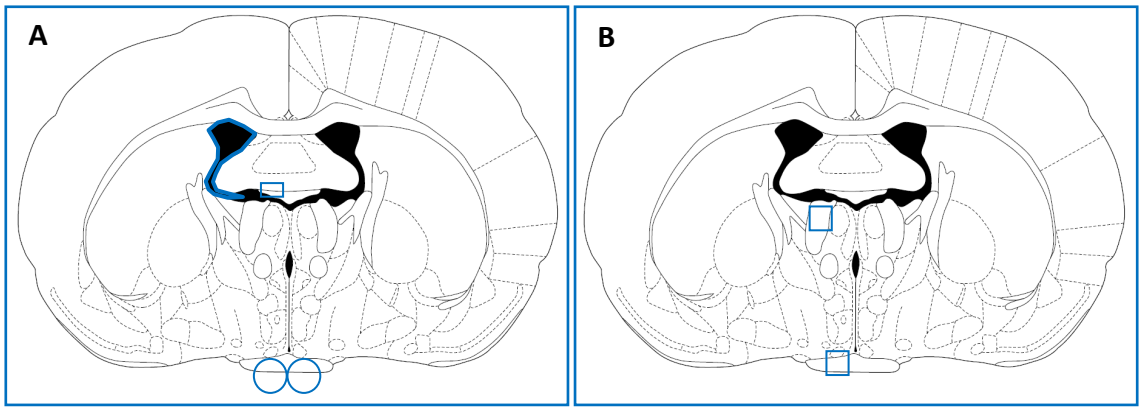


Figura M-16. Regiones estudiadas mediante recuento celular. A*: situación de las áreas de recuento en el estudio de MPO, IL1β, CD163, CD3ε y PAX5: Plexos coroideos del ventrículo inyectado (contorno azul), vasos junto al órgano subfornical (rectángulo azul) y meninges ventrales al quiasma óptico (círculos azules). Nivel Bregma aproximado AP=-0,95 mm.* ***B****: situación de las áreas de recuento en el estudio de Olig2. Dos fotografías 40×, una en el seno de la estría medular ipsilateral y otra en la mitad ipsilateral del quiasma óptico. Nivel Bregma aproximado AP=-0,95 mm.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.6.2.3 Cálculo del área ocupada por los plexos coroideos

El área ocupada por los plexos coroideos en cada corte histológico es muy variable, por lo que fue necesario calcular el número de células contadas por unidad de área ocupada por los plexos para cada corte analizado. Para calcular este área, en cada sección de tejido se realizaron fotografías que abarcaran toda la superficie ocupada por los plexos coroideos. Estas se fusionaron mediante el software Corel Draw 9.0 en una sola imagen que mostrase el plexo en su totalidad. El área ocupada por el plexo se calculó mediante el software Visilog 6.3, obteniéndose un valor en mm^2 para cada corte.

3.6.2.4 Procesamiento de los datos de recuento celular

De cada animal estudiado se obtuvieron cuatro datos (uno por cada corte) para cada una de las regiones estudiadas, y se calculó la media de estos cuatro valores para cada animal. De esta manera se obtuvo en cada zona un valor promedio de número de células positivas por animal. A continuación se calculó la media de todos los animales de cada tiempo estudiado. Estos datos fueron representados gráficamente mediante Excel 2007.

En el caso de Olig2, se obtuvieron para cada animal tres datos de número de células Olig2+ a partir de la estría medular (uno por sección), y otros tres datos a partir del quiasma óptico (uno por sección), y se calculó la media en cada caso. El número de células Olig2+ se relativizó al área total de la fotografía. El análisis estadístico de los datos de recuento se llevó a cabo tal como se indica en el epígrafe 3.8.

3.7 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE INMUNODETECCIÓN

3.7.1 ELISA de captura contra el complejo terminal del complemento de rata

3.7.1.1 Diseño y puesta a punto del ELISA contra el complejo terminal del complemento

Para detectar la formación de complejos terminales del complemento (TCC) en suero y en LCR de rata se desarrolló un ELISA de captura específico tomando como modelo un protocolo para la detección de TCC humano puesto a punto por el equipo de investigación del profesor Paul Morgan de la Universidad de Cardiff.

El apéndice 3 recoge las combinaciones de anticuerpos de captura, de unión y secundarios probadas para conseguir la detección de TCC en suero de rata. Se seleccionó una combinación que permitiera detectar la formación de TCC en suero de rata activado con zimosan, a la vez que mostrara un bajo nivel de reacción a los factores no ensamblados presentes en sueros no activados y sueros procedentes de ratas carentes de factor C6 (fig. M-18). Con este objetivo, la combinación de anticuerpos

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

seleccionada fue la siguiente: anticuerpo de captura anti-C5b-9 de rata desarrollado en ratón, anticuerpo de unión anti-C9 de rata desarrollado en conejo, y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo marcado con peroxidasa (fig. M-17).

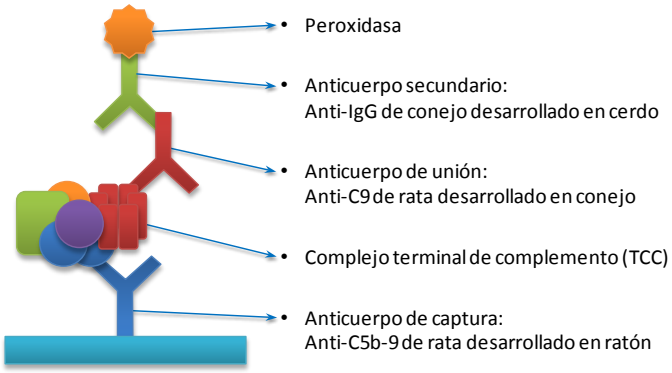


Figura M-17. Esquema del ELISA de captura desarrollado contra el TCC presente en suero de rata. *El complejo es detectado mediante la unión a un anticuerpo de captura anti-C5b-9 y a un anticuerpo anti-C9. Un anticuerpo secundario unido a peroxidasa reconoce al anticuerpo de unión y permite revelar la presencia del complejo.*

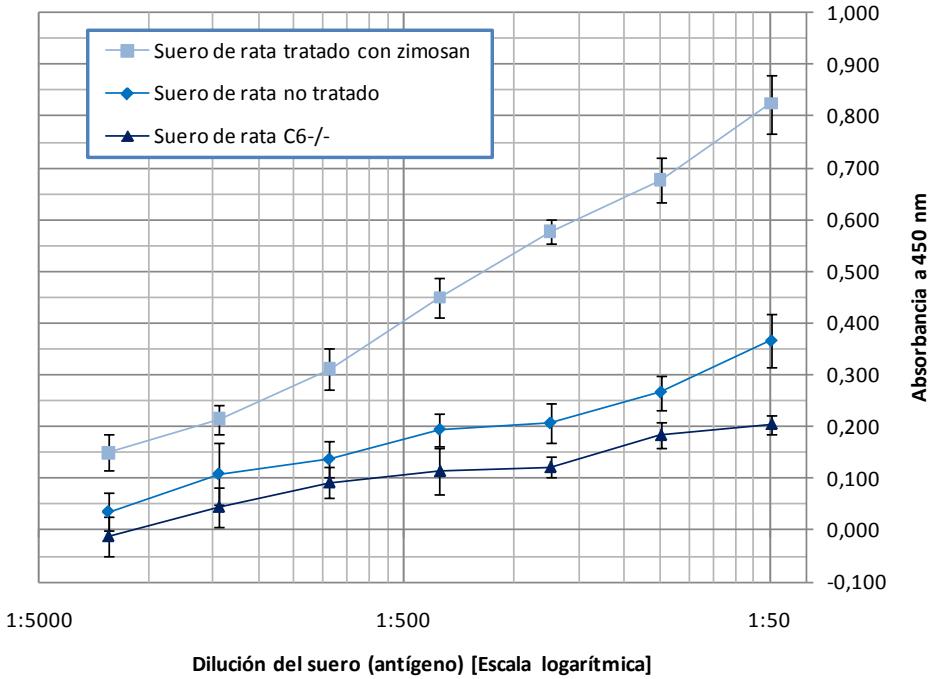


Figura M-18. Validación del ELISA de captura contra el TCC presente en suero de rata. *Cada punto representa la media ± SEM del valor de absorbancia obtenido para las distintas diluciones del antígeno. Se comprobó que la combinación de anticuerpos usada era capaz de detectar los complejos TCC de rata de forma clara a diluciones inferiores a 1:500.*

3.7.1.2 Detección del complejo terminal del complemento en suero y LCR de rata

Una vez establecido el protocolo de ELISA para detectar los TCC de rata en suspensión, procedimos a realizar un experimento cuyo objetivo fue determinar si la NA era capaz de activar de

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

forma directa el sistema del complemento y, por lo tanto, dar lugar a la formación de TCC en el suero y el LCR de rata.

Para ello se incubaron muestras de suero y LCR de rata con NA (5 mU/µl) a 37 °C durante 2 h. Como control positivo de la activación muestras paralelas fueron incubadas con zimosan, y como control negativo de la activación otras fueron incubadas con NaCl 0,9%. Como control al calentamiento sufrido, un grupo paralelo de muestras fue procesado del mismo modo pero incubado a 4 °C. Como control para la detección de complejos frente a la detección de factores libres se usaron muestras de suero y LCR procedentes de ratas $C6^{-/-}$ (no forman TCC). Como control a la detección especifica de TCC de rata se usaron muestras de suero y LCR humano. La tabla M-10 recoge todas las situaciones experimentales ensayadas mediante el ELISA, cada una de las cuales se realizó por triplicado.

	Muestra	Temperatura de incubación	Tratamiento	Finalidad
Suero	Suero rata normal	37 °C	*Sin tratar*	*Control negativo de la activación*
			Zimosan	*Control positivo de la activación*
			Neuraminidasa	*Experimental*
		4 °C	*Sin tratar*	*Control del efecto de la temperatura*
			Zimosan	*Control del efecto de la temperatura*
			Neuraminidasa	*Control del efecto de la temperatura*
	Suero rata $C6^{-/-}$	37 °C	*Sin tratar*	*Control de la detección de complejos*
			Zimosan	*Control de la detección de complejos*
			Neuraminidasa	*Control de la detección de complejos*
	Suero humano	37 °C	*Sin tratar*	*Control de la especificidad de especie*
			Zimosan	*Control de la especificidad de especie*
			Neuraminidasa	*Control de la especificidad de especie*
LCR	LCR rata normal	37 °C	*Sin tratar*	*Control negativo de la activación*
			Zimosan	*Control positivo de la activación*
			Neuraminidasa	*Experimental*
		4 °C	*Sin tratar*	*Control del efecto de la temperatura*
			Zimosan	*Control del efecto de la temperatura*
			Neuraminidasa	*Control del efecto de la temperatura*
	LCR rata $C6^{-/-}$	37 °C	*Sin tratar*	*Control de la detección de complejos*
			Zimosan	*Control de la detección de complejos*
			Neuraminidasa	*Control de la detección de complejos*
	LCR humano	37 °C	*Sin tratar*	*Control de la especificidad de especie*
			Zimosan	*Control de la especificidad de especie*
			Neuraminidasa	*Control de la especificidad de especie*

Tabla M-10. Situaciones experimentales analizadas mediante ELISA de captura para determinar la formación de TCC.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para realizar el ensayo, dos placas de ELISA de 96 pocillos se incubaron con anticuerpo de captura anti-C5b-9 (Hycult, ref. HM3033) a una dilución 1:50 en solución de recubrimiento (apéndice 1) (50 µl por pocillo) durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, tras lavar tres veces con solución de lavado (apéndice 1), los pocillos se saturaron con 300 µl de tampón saturador (apéndice 1) por pocillo durante una hora a 37 °C.

Tras retirar el tampón saturador, se incubaron las distintas muestras de suero y LCR (50 µl por pocillo) durante una hora a temperatura ambiente. De cada situación experimental, un pocillo adicional fue incubado con tampón saturador para ser usado como blanco del ELISA.

Tras lavar nuevamente con solución de lavado, se incubó el anticuerpo primario anti-C9 de rata desarrollado en conejo (obtenido y cedido por el equipo de investigación del profesor B. Paul Morgan de la Universidad de Cardiff) diluido 1:500 en tampón de saturación durante una hora a 37 °C (50 µl por pocillo).

Transcurrido este tiempo, y tras volver a lavar, se incubó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo ligado a peroxidasa (Dako, ref. P0399) a una dilución 1:1000 en tampón saturador durante una hora a temperatura ambiente (50 µl por pocillo).

A continuación se lavó tres veces con solución de lavado y se reveló la actividad de la peroxidasa añadiendo a cada pocillo 50 µl de "Sistema de revelado líquido para ELISA" que contiene tetrametil bencidina y H_2O_2, durante 10 min en agitación y oscuridad. La reacción de revelado genera un color azul, que vira al amarillo al añadir 50 µl de ácido sulfúrico 1 M para detener el revelado. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA (BioTek instruments, modelo ELx800).

A cada pocillo se le restó la absorbancia del pocillo blanco correspondiente. Dado que todas las situaciones experimentales se realizaron por triplicado, se calculó la media y el error estándar de los datos tal como se explica en el epígrafe 3.8.

3.7.2 Cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico

El ácido bicinconínico es un compuesto que forma un complejo púrpura intenso cuando se une a iones Cu^+ en medio alcalino. La estabilidad del reactivo y del cromóforo lo convierte un método para la cuantificación de proteínas sencillo, rápido, muy sensible y con una gran tolerancia a compuestos que sí interfieren en otros sistemas.

$$Proteína + Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+} \quad ; \quad Cu^{+} + BCA \rightarrow BCA\text{-}Cu^{+} \ (complejo\ púrpura)$$

Este método se empleó para determinar la concentración de proteínas en muestras y extractos empleados en *Western blot*.

Se prepararon diluciones a partir de una solución de seroalbumina bobina 2,0 mg/ml para obtener una recta patrón de referencia. En una placa multipocillo se mezclaron 20 µl de muestra (o

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

albúmina patrón) con 180 µl de reactivo BCA previamente preparado (mezcla 1:50 de reactivos A y B), y se incubaron durante 45 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia de los pocillos a 562 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, calculándose la media y el error estándar de cada punto antes de calcular la línea de ajuste e interpolar los datos de absorbancia de las muestras.

3.7.3 Inmunoprecipitación

La técnica de inmunoprecipitación se emplea para purificar proteínas concretas mediante su unión específica a anticuerpos ligados a bolitas de gel de agarosa que posteriormente son precipitadas por centrifugación. Las bolitas están recubiertas de anticuerpos (anti-IgG de ratón en nuestro caso), a los que se unirá posteriormente el anticuerpo específico para la proteína de interés (anticuerpo obtenido en ratón). En nuestro trabajo la inmunoprecipitación se utilizó en extractos de epitelio ependimario y en suero para la posterior detección mediante *Western blot* de las proteínas MBL y C1q, ya que la abundancia de las mismas se encontraba por debajo del límite de detección de esta técnica. El protocolo, basado en el sugerido en el kit *Mouse TrueBlot® set IP-Beads* (Rockland, ref. 88-7788-31) fue el siguiente:

Prelavado de bolitas (*beads*):

Las bolitas de agarosa están ligadas a anticuerpos anti-IgG de ratón. Por cada alícuota de muestra a utilizar se lavaron 100 µl de bolitas con 500 µl de tampón RIPA (apéndice 1). Tras ser centrifugadas (2500 × *g*, 3 min, 4 °C) se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de tampón RIPA.

Preaclaramiento de la muestra:

A 500 µl de muestra (suero o extracto diluido a 1 mg/ml con PBS) se le añadió 50 µl de bolitas lavadas y se incubó una hora a 4 °C en rotación. Tras ello, se centrifugó (2500 × *g,* 3 min, 4 °C) y se recogió con cuidado el sobrenadante sin bolitas. Con el preaclaramiento conseguimos retirar de la muestra aquellas moléculas que presenten afinidad por el anticuerpo anti-IgG de ratón ligado a las bolitas (fig. M-19).

Inmunoprecipitación:

A cada alícuota de sobrenadante preaclarado se le añadió 3 µg del anticuerpo primario desarrollado en ratón, en nuestro caso, anti-MBL (Abcam, ref. 23461) o anti-C1q (Abcam, ref. 71940), y 50 µl de bolitas lavadas (fig. M-19). Se incubó 2 h a 4 °C en rotación. Se centrifugó (2500 × *g,* 3 min, 4 °C), se retiró con cuidado el sobrenadante y se resuspendieron las bolitas en 500 µl de tampón RIPA. Se repitió esta operación tres veces para lavar las bolitas con tampón RIPA.

Finalmente se retiró el tampón del último lavado y se resuspendieron las bolitas en 50 µl de tampón de carga reductor para SDS-PAGE. Las muestras así preparadas se calentaron a 95 °C durante 10 min, se centrifugaron (10 000 × *g*, 5 min), y el sobrenadante obtenido se cargó en un gel SDS-PAGE.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

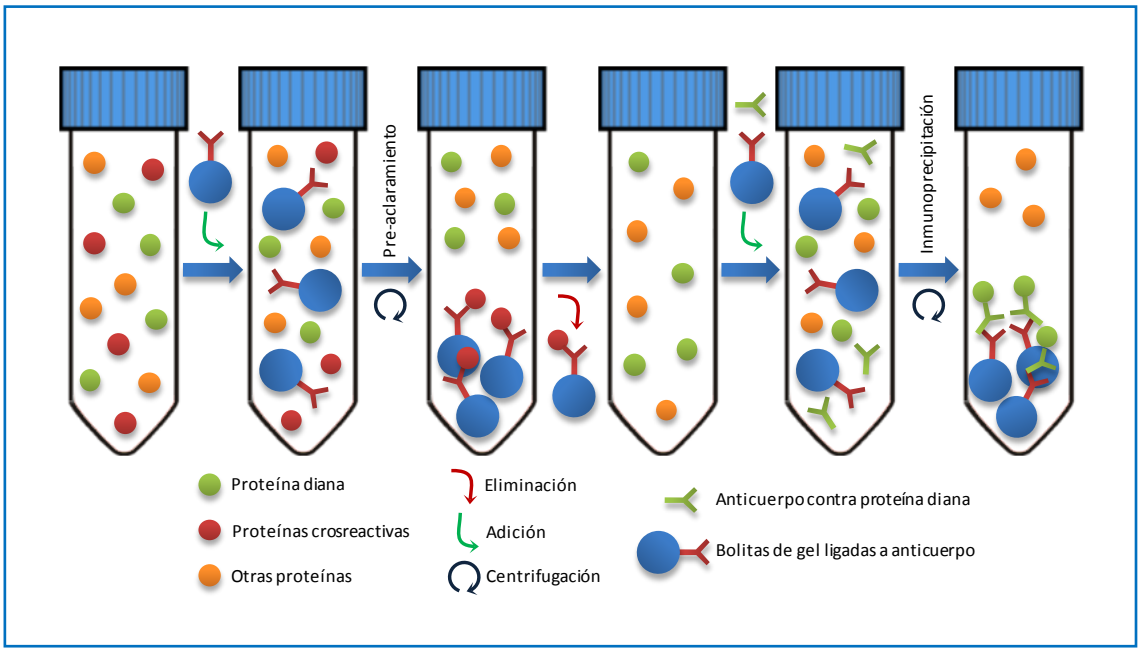


Figura M-19. Inmunoprecipitación de C1q y MBL. *La muestra de extracto o suero es preaclarada mediante la adición de bolitas ligadas a anti-IgG de ratón. Tras eliminar el precipitado, se añaden nuevas bolitas y el anticuerpo primario (anti-C1q o anti-MBL, según el caso) al sobrenadante, lo que llevará a la precipitación de la proteína diana mediante centrifugación. Este último sobrenadante es desechado, obteniéndose un precipitado enriquecido en la proteína diana.*

3.7.4 *Western blot*

La técnica de *Western blot* o inmunoblot consiste en la detección mediante el uso de anticuerpos de proteínas específicas pegadas a una membrana artificial. Las proteínas son previamente separadas por electroforesis y transferidas a la membrana. Esta técnica se utilizó para detectar los factores derivados de la activación de C3 en suero y LCR, así como la presencia de lectinas de unión a manosa (MBL) y factor C1q del complemento en extractos de epitelio ependimario.

3.7.4.1 Preparación de las muestras para *Western blot*

Para la detección de fragmentos de C3, se obtuvieron muestras de suero (epígrafe 3.2.5.1) y LCR (epígrafe 3.2.6) de rata. En cada caso, se ensayaron cuatro situaciones distintas (tabla M-11) para tiempos de incubación de 1 h y de 2 h.

A las situaciones a las que no fue añadida NA ni zimosan se les añadió el mismo volumen de solución salina. La concentración final de NA en las muestras fue aproximadamente 5 mU/µl, y de zimosan 0,01 g/ml. Pasado el tiempo de incubación correspondiente, las muestras fueron centrifugadas (9000 × *g*, 10 min) para decantar el zimosan, y se tomó el sobrenadante para llevar a cabo la electroforesis (epígrafe 3.7.4.2).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Situación	Volumen de muestra (suero o LCR)	Agente activador	Temperatura de incubación
NaCl / 4 °C	*50 µl*	*5 µl de NaCl 0,9%*	*4 °C*
NaCl / 37 °C	*50 µl*	*5 µl de NaCl 0,9%*	*37 °C*
NA / 37 °C	*50 µl*	*5 µl de neuraminidasa (50 mU/µl)*	*37 °C*
Zym / 37 °C	*50 µl*	*5 µl de zimosan (0,1 g/ml)*	*37 °C*

Tabla M-11. Situaciones experimentales empleadas para la detección de fragmentos derivados de C3 mediante Western blot.

Por otra parte, para la detección de C1q y MBL se extrajeron explantes de epitelio ependimario del ventrículo de seis ratas (tres inyectadas con NA y tres controles no inyectadas) (epígrafe 3.2.2), a partir de los cuales se prepararon extractos de proteínas (epígrafe 3.2.4). Dichos extractos fueron sometidos a inmunoprecipitación de la proteína C1q o de MBL (epígrafe 3.7.3) antes de realizar el *Western blot*.

3.7.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las muestras a analizar mediante *Western blot* fueron primero sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones ionizantes y desnaturalizantes mediante dodecilsulfato sódico (SDS) y 2-β-mercaptoetanol.

Se prepararon los geles a la concentración de poliacrilamida deseada (para C3: gel de apilamiento al 3,5% y gel de resolución al 7,5%; para MBL y C1q: gel de apilamiento al 5% y gel de resolución al 15%) con un grosor de 1,5 mm.

Las muestras se diluyeron en tampón PBS estéril hasta una concentración aproximada de 5 µg/µl. Posteriormente se diluyeron 1/2 con tampón de carga reductor 2× (con 1% de 2-β-mercaptoetanol), se calentaron a 95 °C durante 10 min, y se cargaron en los pocillos del gel (20 µl por pocillo). El primer pocillo del gel fue siempre cargado con 20 µl del marcador de pesos moleculares *Precision plus protein™ Standars* (Bio-Rad, ref. 161-0374).

La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente de voltaje constante a 150 voltios durante 60 - 90 min. Tras comprobar la llegada del frente de electroforesis (marcado por el azul bromofenol del tampón de carga) al final del gel, se detuvo la electroforesis y se obtuvieron los geles para someterlos a electrotransferencia.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.7.4.3 Electrotransferencia de proteínas desde gel a membrana de PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para hacerlas accesibles a los anticuerpos usados para la inmunodetección.

Para llevar a cabo la electrotransferencia se construyó un sándwich dentro de un casete de la siguiente forma: una esponja, tres láminas de papel de filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de PVDF (previamente activada con metanol), tres láminas de papel de filtro y otra esponja. Este casete se colocó en el soporte de transferencia, dentro de una cubeta llena de tampón de transferencia, y se aplicó una corriente eléctrica de amperaje constante (100 mA) transversal al gel de manera que las proteínas migrasen perpendicularmente hacia la membrana de PVDF. La transferencia tuvo lugar durante un mínimo de 4 h en un ambiente refrigerado.

3.7.4.4 Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF

El método usado para detectar nuestras proteínas en las membranas de PVDF fue la unión a un anticuerpo primario seguida de la unión a un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa y el revelado de su posición mediante un sustrato quimioluminiscente.

Terminada la transferencia, se sacaron las membranas del casete y se pasaron a un recipiente con PBST (apéndice 1). Seguidamente se procedió a saturar los sitios de unión en las membranas que no fueron ocupados por las proteínas transferidas, incubando en tampón saturador (PBST con 5% de leche desnatada en polvo y 2% de BSA) durante 30 min.

Tras este bloqueo se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (tabla M-12) diluido en el mismo tampón saturador, a temperatura ambiente durante toda la noche en rotación. Como control de la especificidad del anticuerpo primario, algunas membranas fueron sometidas al mismo procedimiento pero omitiendo la incubación con el mismo (OAP).

Tras varios lavados con PBST durante una hora, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (diluido en tampón saturador) durante una hora en rotación y oscuridad.

Las membranas se lavaron de nuevo con PBST durante una hora en oscuridad, y después de un último lavado con PBS se pasó al revelado de la actividad peroxidasa por un método quimioluminiscente. Para ello, las membranas se incubaron durante 5 min en rotación y oscuridad con sustrato *Clarity™ Western ECL.*

La visualización de la quimioluminiscencia se realizó mediante una cámara *Molecular Imager* (Bio-Rad, modelo ChemiDoc™ XRS+), y la obtención de imágenes mediante el software *Image Lab 4.0* (Bio-Rad).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Antígeno	Anticuerpo primario, referencia (dilución)	Anticuerpo secundario, referencia (dilución)
Fragmentos derivados de C3	*Anti-C3 (C3.30) desarrollado en ratón, Cortesía Prof. Morgan, Cardiff (1:140)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en rata, (H+L) TrueBlot® ligado a peroxidasa. Rockland, ref. 18-8817-31 (1:1500)*
C1q	*Anti-C1q desarrollado en conejo, Hycult, ref. HP8021 (1:100)*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra, (H+L) ligado a peroxidasa. Sigma, ref. A8275 (1:1000)*
MBL	*Anti-MBL desarrollado en ratón, Abcam, ref. 23461 (1:500)*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en rata, (H+L) TrueBlot® ligado a peroxidasa. Rockland, ref. 18-8817-31 (1:1500)*

Tabla M-12 Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados en Western blot.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En aquellos experimentos en los que fue requerido, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el software SPSS® Statistics 20 (IBM®). El número de réplicas experimentales fue siempre de un mínimo de cinco, salvo en los casos en los que la reducción en el uso de animales o limitaciones en la disponibilidad de algunas muestras obligase a reducir este número a tres. Se obtuvo la media aritmética ($\bar{x}$) y el error estándar de la media (SEM, del inglés, *Standard Error of the Mean*), calculado como el cociente entre la desviación estándar (SD) y la raíz cuadrada del número de réplicas.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \qquad SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \qquad SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

La homocedasticidad de las medias muestrales se comprobó mediante la prueba de Levene. En todos los casos analizados en este trabajo se confirmó la homogeneidad de varianzas. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA, del inglés *Analysis of variance*) de un factor, con un nivel de significación $\alpha = 0{,}05$. En aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas ($P < \alpha$), se aplicó la prueba de rangos *post-hoc* "diferencias honestamente significativas de Tukey" (HDS de Tukey) con un nivel de significación de 0,05. Esta prueba identifica subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí. Los subconjuntos fueron nombrados con letras (a, b, c…), aplicándose a las medias en orden descendente desde la de mayor valor. Esto permite conocer fácilmente si dos valores representados en una gráfica son significativamente diferentes a nivel 0,05 de la siguiente forma: dos valores sin diferencia significativa pertenecerán a un mismo subgrupo homogéneo (se asociarán a la misma letra en la gráfica).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4. RESULTADOS

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

4.1 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN RATAS INYECTADAS INTRACEREBRO-VENTRICULARMENTE CON NEURAMINIDASA

4.1.1 Inyección de neuraminidasa

4.1.1.1 Actividad de la neuraminidasa *in vitro* e *in vivo*

Se comprobó la actividad enzimática de cada lote de NA mediante pruebas de actividad *in vitro* (epígrafe 3.5.3.2). Para ello se utilizaron lectinas, proteínas que presentan especificidad por uno o varios radicales glucídicos. En nuestro estudio se emplearon las siguientes lectinas: 1) SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), con afinidad por moléculas de ácido siálico terminal unido a un residuo de galactosa o N-acetil-galactosamina (Neu5Ac*α2,6*Gal/GalNAc); 2) LFA (*Limax flavus* agglutinin), con afinidad por ácido siálico terminal unido a cualquiera de los residuos posibles; y 3) PNA (pea-nut agglutinin), con afinidad por galactosa terminal unida a un residuo de N-acetil-glucosamina o N-acetil-galactosamina (Gal*β1,4*GlcNAc/GalNAc) (Knibbs y col., 1991). El par LFA/PNA han sido el más utilizado tradicionalmente en el estudio del epitelio ependimario (Grondona y col., 1998; Gomez-Roldan y col., 2008).

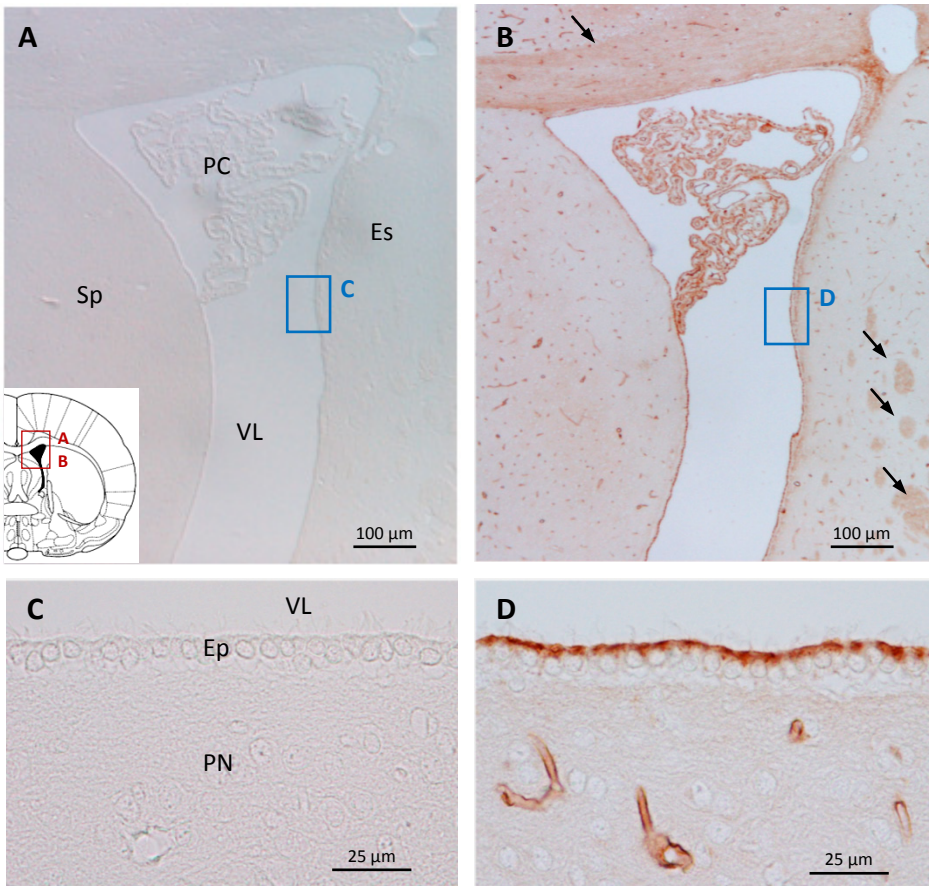


Figura R-01. Control de la actividad de la neuraminidasa sobre cortes de tejido. *Incubación de cortes histológicos Bouin-parafina con neuraminidasa y posterior histoquímica con lectina PNA-biotinilada (marca galactosa terminal). Animal control no inyectado.* ***A*** *y* ***C:*** *corte control no tratado con neuraminidasa y posteriormente teñido con PNA. No se observa marca positiva.* ***B*** *y* ***D:*** *corte tratado con neuraminidasa y posteriormente teñido con PNA. La marca positiva de la galactosa terminal indica la eliminación del ácido siálico por parte de la neuraminidasa en la superficie del epéndimo, el endotelio de los capilares sanguíneos y los haces de mielina (****flechas****).* ***PC****: plexos coroideos,* ***Sp****: séptum,* ***Es****: estriado,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Brevemente, se incubaron cortes de cerebro de ratas control con el enzima a testar. Los cortes así tratados se tiñeron posteriormente con lectina PNA, marcador de galactosa terminal. En dichos cortes se pudo observar una marca PNA+ en la superficie ependimaria, así como en el endotelio de los vasos sanguíneos del parénquima nervioso y en los principales haces mielínicos del tejido (fig. R-01 B y D). Se puso así de manifiesto la exposición de residuos terminales de galactosa tras la pérdida del ácido siálico terminal. Esta marca no se observó en ninguno de los cortes no tratados con NA (fig. R-01 A y C).

Con el propósito de comprobar la acción de la NA inyectada en el ventrículo (*in vivo*), se realizó igualmente una tinción histoquímica mediante lectinas sobre los cortes histológicos obtenidos de los distintos animales inyectados. Se usaron la lectina SNA, con afinidad por residuos terminales de ácido siálico, y la lectina PNA, con afinidad por residuos terminales de galactosa.

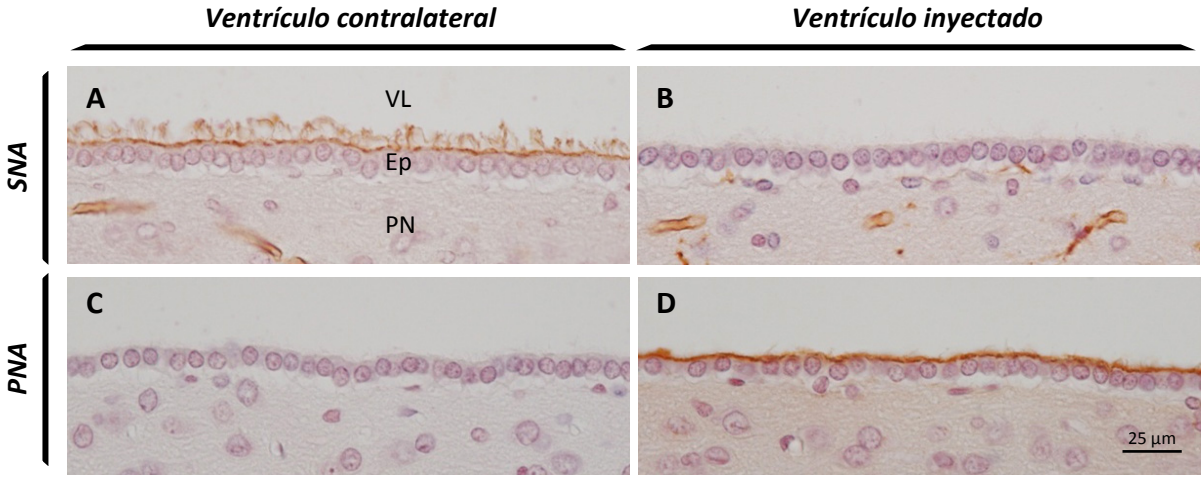


Figura R-02. Actividad de la neuraminidasa sobre el epéndimo in vivo. *Cortes histológicos Bouin-parafina de 10 µm procedentes de un animal sacrificado inmediatamente tras la inyección de neuraminidasa.* ***A*** *y* ***B****: tinción con SNA (marca ácido siálico terminal).* ***A****: epéndimo del ventrículo contralateral.* ***B****: epéndimo del ventrículo inyectado. En este no se produce el marcaje superficial del epéndimo, lo que indica una efectiva actividad de la neuraminidasa en la superficie ventricular, mientras que la marca del endotelio es aún patente. La marca en el epéndimo persiste en el ventrículo contralateral (A) lo que significa que no llega suficiente neuraminidasa para observar su efecto.* ***C*** *y* ***D****: tinción con PNA (marca galactosa terminal).* ***C****: epéndimo del ventrículo contralateral.* ***D****: epéndimo del ventrículo inyectado. El marcaje PNA observado es contrario al obtenido con SNA, tal como se esperaba.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Tras la tinción con estas lectinas, la superficie del epéndimo del ventrículo contralateral resultó PNA- (fig. R-02 C), indicando la permanencia del ácido siálico y la no exposición de residuos de galactosa, al igual que la superficie del epéndimo de ratas no inyectadas; mientras que, la superficie del epéndimo del ventrículo inyectado resultó PNA+ (fig. R-02 D), poniendo de manifiesto la exposición de los residuos de galactosa como consecuencia de la pérdida del ácido siálico terminal. Por el contrario, la superficie del epéndimo del ventrículo contralateral aparecía positiva para la lectina SNA (fig. R-02 A), indicando la presencia del ácido siálico y la no exposición de residuos de galactosa, al igual que la superficie del epéndimo de ratas no inyectadas; mientras que, la superficie del epéndimo del ventrículo inyectado apareció SNA- (fig. R-02 B), demostrando así la eliminación del ácido siálico terminal.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para estudiar el grado de penetración del enzima en el parénquima nervioso periventricular, se utilizaron las lectinas PNA y LFA, esta última, con afinidad por ácido siálico terminal, pero menos exigente en su especificidad que la lectina SNA, lo que permite obtener una tinción más general del ácido siálico terminal en el tejido.

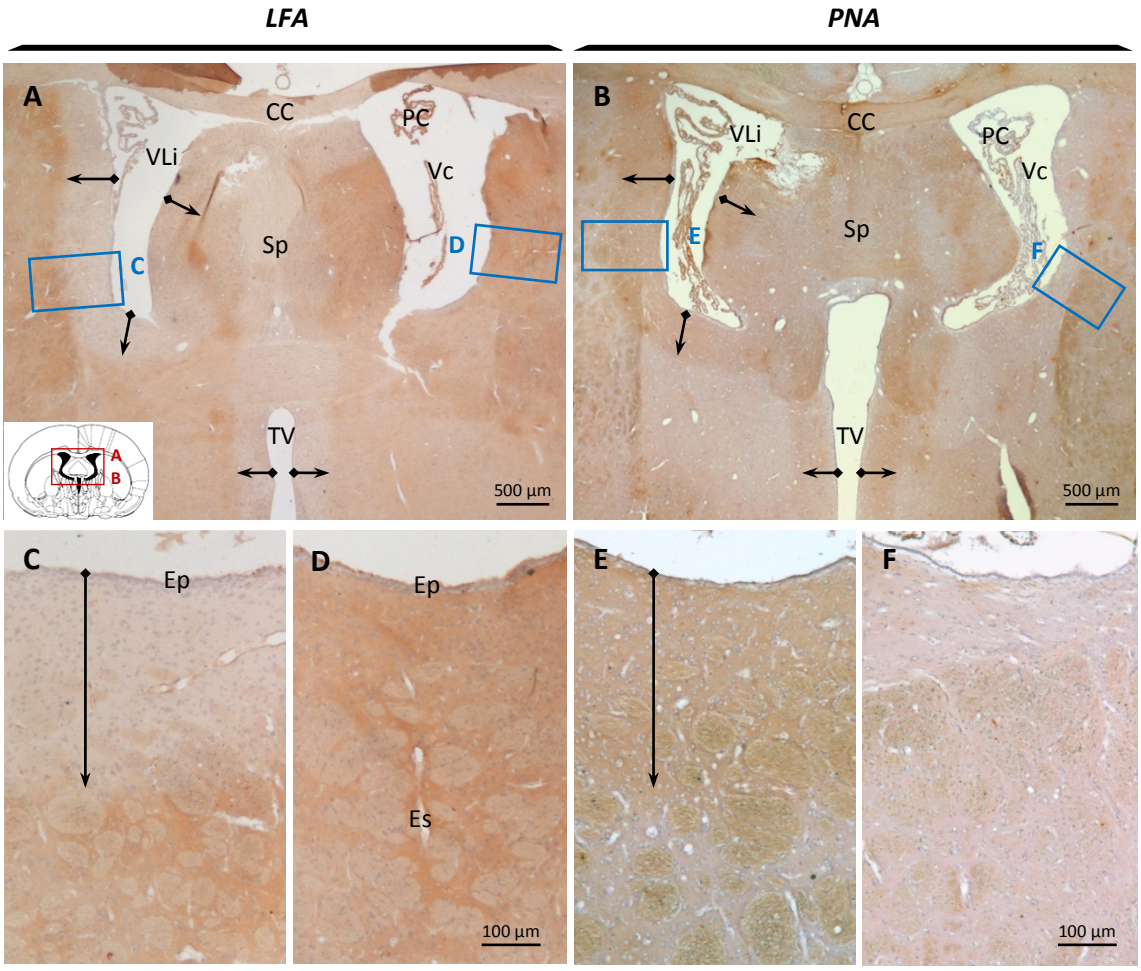


Figura R-03. Penetración de la neuraminidasa en el parénquima nervioso. *Cortes histológicos Bouin-parafina de 10 µm procedentes de un animal sacrificado inmediatamente tras la inyección de neuraminidasa. Histoquímica de lectinas con contraste hematoxilina-eosina.* ***A****: tinción con LFA (marca ácido siálico terminal). Se observa un halo LFA- (****flechas****) alrededor del ventrículo lateral inyectado y el tercer ventrículo, signo de la eliminación del ácido siálico terminal por parte de la neuraminidasa.* ***B****: tinción con PNA (marca galactosa terminal). Se observa el mismo halo (****flechas****), esta vez PNA+, alrededor del ventrículo lateral inyectado y el tercer ventrículo, indicativo de la exposición de residuos galactosa terminales.* ***C****: detalle de la pared del ventrículo lateral inyectado. Presencia de halo LFA- (****flecha****).* ***D****: detalle de la pared del ventrículo lateral contralateral. Ausencia de halo LFA-.* ***E****: detalle de la pared del ventrículo lateral inyectado. Presencia de halo PNA+ (****flecha****).* ***F****: detalle de la pared del ventrículo lateral contralateral. Ausencia de halo PNA+.* ***VLi****: ventrículo lateral inyectado,* ***Vc****: ventrículo contralateral,* ***CC****: cuerpo calloso,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***PC****: plexos coroideos,* ***Sp****: séptum,* ***Ep****: epéndimo,* ***Es****: estriado.*

Dichas tinciones mostraron un halo alrededor del ventrículo lateral inyectado, de unos 300 µm de amplitud media, en animales sacrificados inmediatamente después de la inyección (fig. R-03). Este halo, LFA- y PNA+, se presentaba también alrededor de la región rostral del tercer ventrículo. En el ventrículo contralateral, en cambio, no se observaba, manteniendo la pared ventricular su estado natural LFA+ y

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PNA-. La región caudal del tercer ventrículo y el cuarto ventrículo no fueron estudiados. Con el tiempo, las células ependimarias fueron capaces de sintetizar nuevo ácido siálico y, por lo tanto, de recuperar la positividad a LFA, como ya había sido descrito en trabajos anteriores de nuestro grupo (Gomez-Roldan y col., 2008).

4.1.1.2 Descripción espacio-temporal del efecto provocado por la neuraminidasa

Las inyecciones ICV practicadas en este estudio se realizaron en el ventrículo derecho, en torno al nivel observado en la fig. R-04.

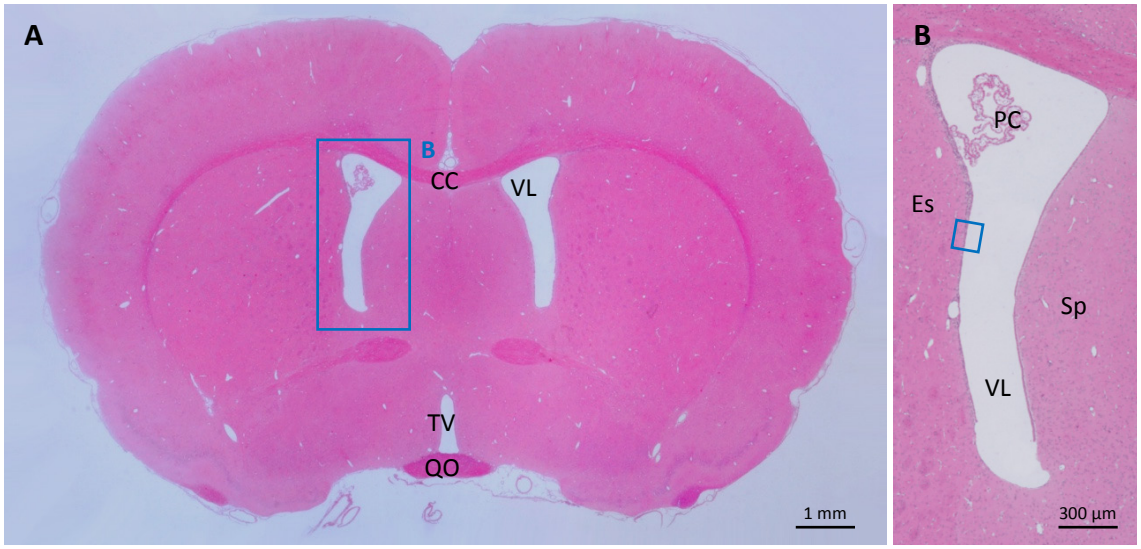


Figura R-04. Visión general de la región inyectada. *Corte Bouin-parafina de 10 µm de espesor. Tinción hematoxilina-eosina.* ***A****: imagen panorámica de un corte coronal de cerebro de rata a nivel Bregma aproximado AP = -0,5 mm.* ***B****: detalle de la región del ventrículo lateral inyectado, recuadrada en la figura A.* ***Cuadro****: región ependimaria ampliada en fig. R-05.* ***PC****: plexos coroideos,* ***Sp****: séptum,* ***Es****: estriado,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***QO****: quiasma óptico,* ***TV****: tercer ventrículo.*

En los animales controles que se inyectaron con el vehículo (animales *sham-operated*), no se encontraron diferencias significativas respecto a los animales no inyectados. No se detectó degeneración de tractos mielínicos, ni invasión de células del sistema inmune periférico. Sólo la zona de la corteza cerebral atravesada por la aguja de inyección mostró algunos signos de reacción inflamatoria local que se resolvió a las pocas horas. Nunca se observó inflamación en otros lugares, como por ejemplo los ventrículos, las meninges o las zonas periventriculares.

La tinción hematoxilina-eosina mostró que las células ependimarias del ventrículo contralateral y el tercer ventrículo dorsal presentaban características morfológicas y de afinidad por los colorantes idénticas a las del epéndimo de ratas control no inyectadas (fig. R-05 E-H). Estas células son multiciliadas y conforman un epitelio cúbico simple. Presentan un núcleo grande cuya cromatina se encuentra

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

predominantemente en forma laxa. Permanecen unidas mediante uniones celulares de tal forma que conservan la integridad de la línea epitelial.

El epéndimo del ventrículo inyectado, sin embargo, mostró signos de daño tisular que se hicieron más patentes y severos con el transcurso del tiempo. De esta manera, las células ependimarias del ventrículo inyectado de ratas sacrificadas inmediatamente después de la inyección de NA mostraron una morfología celular algo más aplanada, núcleos ligeramente picnóticos y citoplasmas más eosinófilos que las células del control (fig. R-05 A). Estos signos se acentuaron en ratas sacrificadas 2 h tras la inyección, en las que los cilios no fueron visibles a microscopía óptica y las células aparecieron más separadas entre sí, así como del tejido subyacente (fig. R-05 B). Así mismo, se pudo observar que los daños en las células ependimarias se incrementaron a medida que se disminuyó la distancia entre estas y el punto de inyección. Estos efectos fueron siempre anteriores al desarrollo de la respuesta inflamatoria celular.

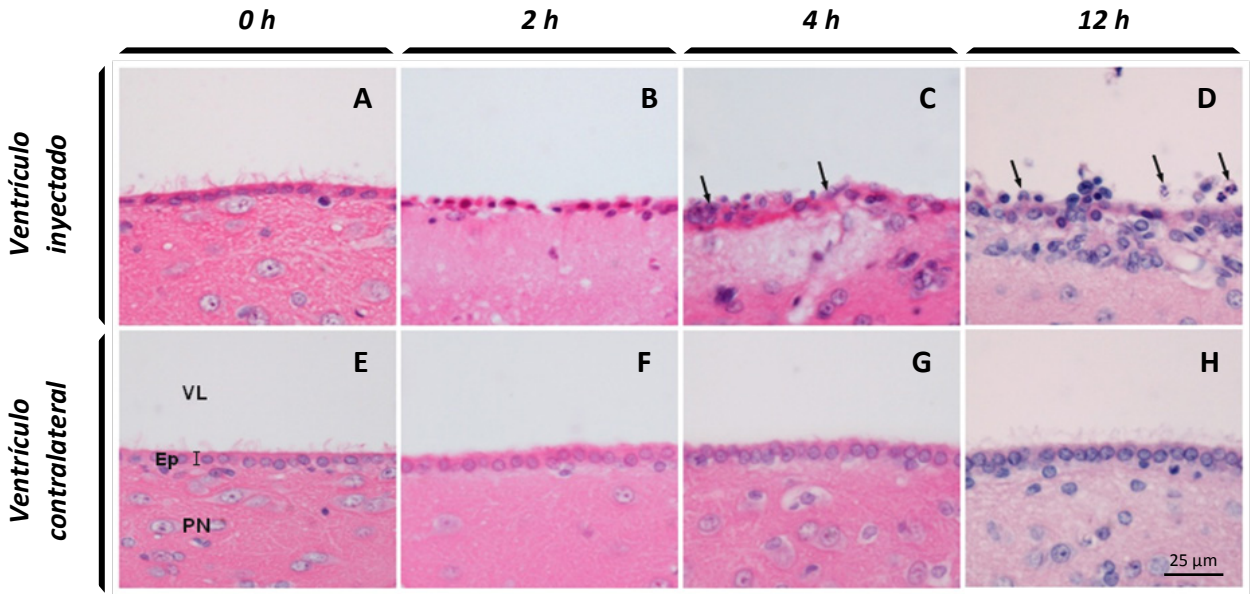


Figura R-05. Efecto de la neuraminidasa sobre la pared ventricular I. *Análisis a distintos tiempos tras la inyección ICV. Cortes Bouin-parafina de 10 µm de espesor (región indicada en fig. R-04 B).* ***A:*** *en el ventrículo inyectado se observa que los núcleos de las células ependimarias se hacen más picnóticos y su citoplasma más eosinófilo.* ***B:*** *los cilios de algunas células desaparecen y se pierde la conexión célula-célula.* ***C:*** *a las 4 horas algunas células ependimarias se desprenden de la superficie ventricular. Comienzan a aparecer células del sistema inmune (flechas).* ***D:*** *a las 12 horas la inflamación es evidente y partes del epitelio ependimario se han desprendido.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***flechas****: células inflamatorias.*

Entre la segunda y la cuarta hora posinyección es cuando la desorganización celular se hizo más patente, apareciendo huecos en la línea epitelial debidos al desprendimiento de células ependimarias (fig. R-05 C). Dichas regiones carentes de epéndimo, de tamaño y forma irregular, se observaron en el ventrículo inyectado, pero nunca en el ventrículo contralateral. A las 4 h comenzaron a aparecer células inflamatorias, que se observaron principalmente en los plexos coroideos y en la superficie ependimaria (flechas en fig. R-05 C), aunque pudieron también localizarse en el parénquima nervioso cercano al ventrículo y en los espacios meníngeos. Estas se correspondían, mayoritariamente, con neutrófilos y macrófagos, distinguibles por sus características morfológicas. Los neutrófilos aparecieron primero. Son

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

granulocitos que presentan un denso citoplasma cuyo seno alberga un gran núcleo multilobulado. Los macrófagos aparecieron más tarde. Son células de mayor tamaño, de morfología más irregular y con un núcleo grande e irregular rodeado por un escaso citoplasma.

El número de estas células inflamatorias aumentó considerablemente a las 12 h de la inyección intracerebroventricular (fig. R-05 D), pudiéndose observar, además, el inicio de la formación de agrupaciones de células procedentes de la zona subventricular en algunos de los huecos generados por el desprendimiento de ependimocitos. El epéndimo de los plexos coroideos no se vio afectado por la inyección en ninguno de los casos estudiados.

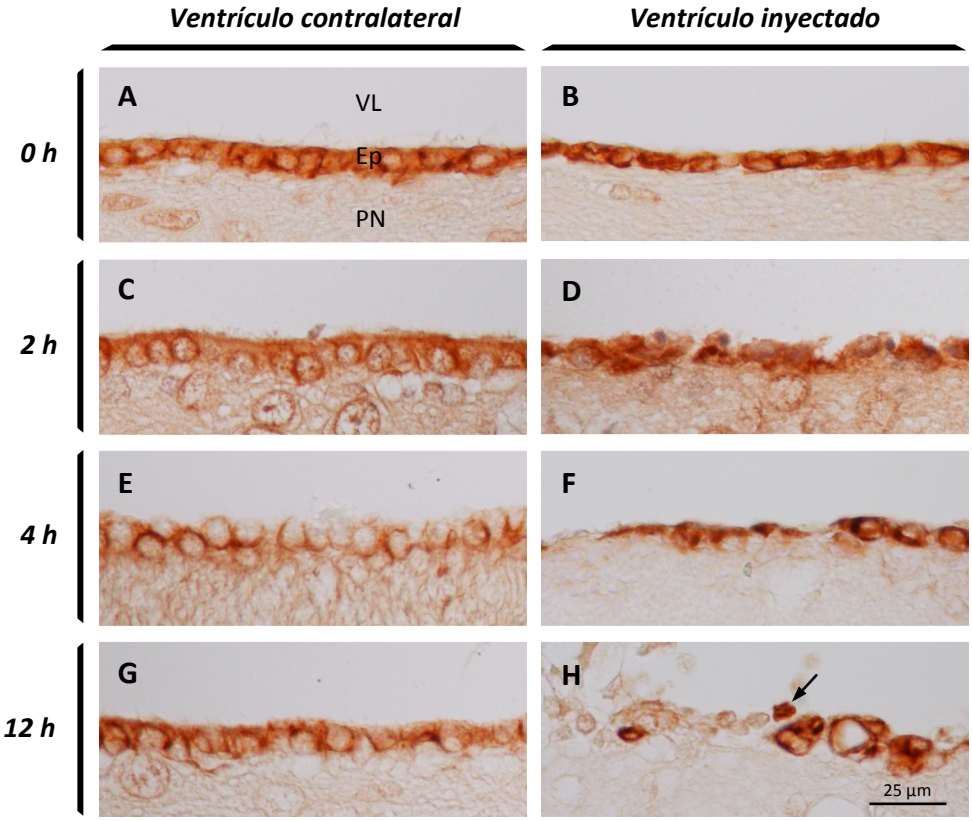


Figura R-06. Efecto de la neuraminidasa sobre la pared ventricular II. *Tinción inmunohistoquímica anti-vimentina. Cortes Bouin-parafina de 10 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas y sacrificadas a distintos tiempos.* ***A*** *y* ***B****: 0 h posinyección. El epitelio ependimario mantiene su integridad.* ***C*** *y* ***D****: 2 h posinyección. Desorganización en el epéndimo.* ***E*** *y* ***F****: 4 h posinyección. Pérdida de algunas células ependimarias.* ***G*** *y* ***H****: 12 h posinyección. Pérdida de regiones ependimarias. Presencia de restos de células ependimarias en la superficie del ventrículo inyectado.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***flecha****: fragmento celular ependimario.*

En aquellos casos en los que se observaron células y restos celulares desprendidos en el ventrículo por efecto de la NA, se recurrió a marcadores inmunohistoquímicos para su identificación. Uno de los anticuerpos usados fue anti-Vim, con el fin poner de manifiesto los filamentos intermedios de vimentina presentes en las células ependimarias de roedores (Lauro y col., 1991; Doetsch y col., 1997). Este marcador fue elegido debido a que produce una señal intensa en todo el citoplasma de las células ependimarias, lo que permite detectar sus fragmentos celulares, a la vez que no produce una marca significativa en otras células de la pared ventricular. La fig. R-06 muestra una señal intensa en el

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

citoplasma de estas células, tanto en el ventrículo inyectado con NA, como en el contralateral. Sin embargo, a tiempos superiores a 4 h y especialmente a 12 h, algunas regiones de la pared ventricular aparecieron parcialmente desprovistas de células ependimarias (fig. R-06 F y H).

Los resultados obtenidos tras la inyección ICV de NA de origen vírico fueron prácticamente idénticos a los observados con NA bacteriana. Ante inyecciones de equivalente actividad enzimática, el daño en el epéndimo, así como el grado de desialización y de reclutamiento de células inflamatorias, fue muy similar.

4.1.2 Detección inmunohistoquímica y cuantificación de marcadores de inflamación

4.1.2.1 Expresión de marcadores locales de inflamación

Con el objetivo de describir el inicio y evolución de la reacción inflamatoria acontecida tras la inyección ICV de NA, se decidió analizar la expresión tisular de ciertos marcadores inflamatorios habitualmente usados por otros autores y descritos en la bibliografía. Los marcadores elegidos fueron: 1) ICAM1 (o CD54), molécula de adhesión intercelular 1, expresada por el endotelio, el epéndimo y células del sistema inmune, que participa en la extravasación de leucocitos desde los vasos sanguíneos; 2) IBA1, proteína adaptadora de unión a calcio iónico, presente específicamente en microglía y algunas poblaciones de macrófagos, cuya expresión aumenta durante la activación inmunológica de estas células; y 3) GFAP, proteína glial fibrilar ácida, expresada por astrocitos y otras células gliales del sistema nervioso central.

4.1.2.1.1 Inmunohistoquímica con anti-ICAM1

Diversas moléculas de adhesión están implicadas en la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos durante el proceso inflamatorio. Entre ellas, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) experimenta un notable aumento de expresión en el endotelio del parénquima nervioso afectado por procesos lesivos (Lindsberg y col., 1996). Por dicha razón, se seleccionó esta molécula como indicador de la inflamación en el tejido nervioso.

En condiciones normales, los anticuerpos para detectar ICAM1 proporcionaron una marca positiva intensa en la superficie apical, tanto del epéndimo como de los plexos coroideos. A parte de esto y un ligero marcaje del endotelio de algunos vasos, no se detectaron células o regiones positivas al marcador ICAM1 en el cerebro de ratas control. Sin embargo, sí se detectó un aumento de su expresión en los vasos situados alrededor del ventrículo inyectado con NA (fig. R-07 B y D), así como en los vasos cercanos al tercer ventrículo, sobre todo en su región dorsal (fig. R-07 F). En contraste, los vasos que circundan el ventrículo contralateral y los localizados en otras regiones de los cortes analizados no mostraron un aumento aparente en la expresión de dicha proteína (fig. R-07 C).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En el lado ipsilateral, numerosas células positivas se encontraron en el parénquima nervioso periventricular (fig. R-07 E), principalmente en zonas subyacentes a regiones en donde las células ependimarias mostraron un mayor daño o estaban desprendidas (fig. R-07 D). La superficie ependimaria, tanto en las paredes ventriculares como en los plexos coroideos, presentó siempre un alto nivel de expresión, tanto en el ventrículo inyectado como en el contralateral.

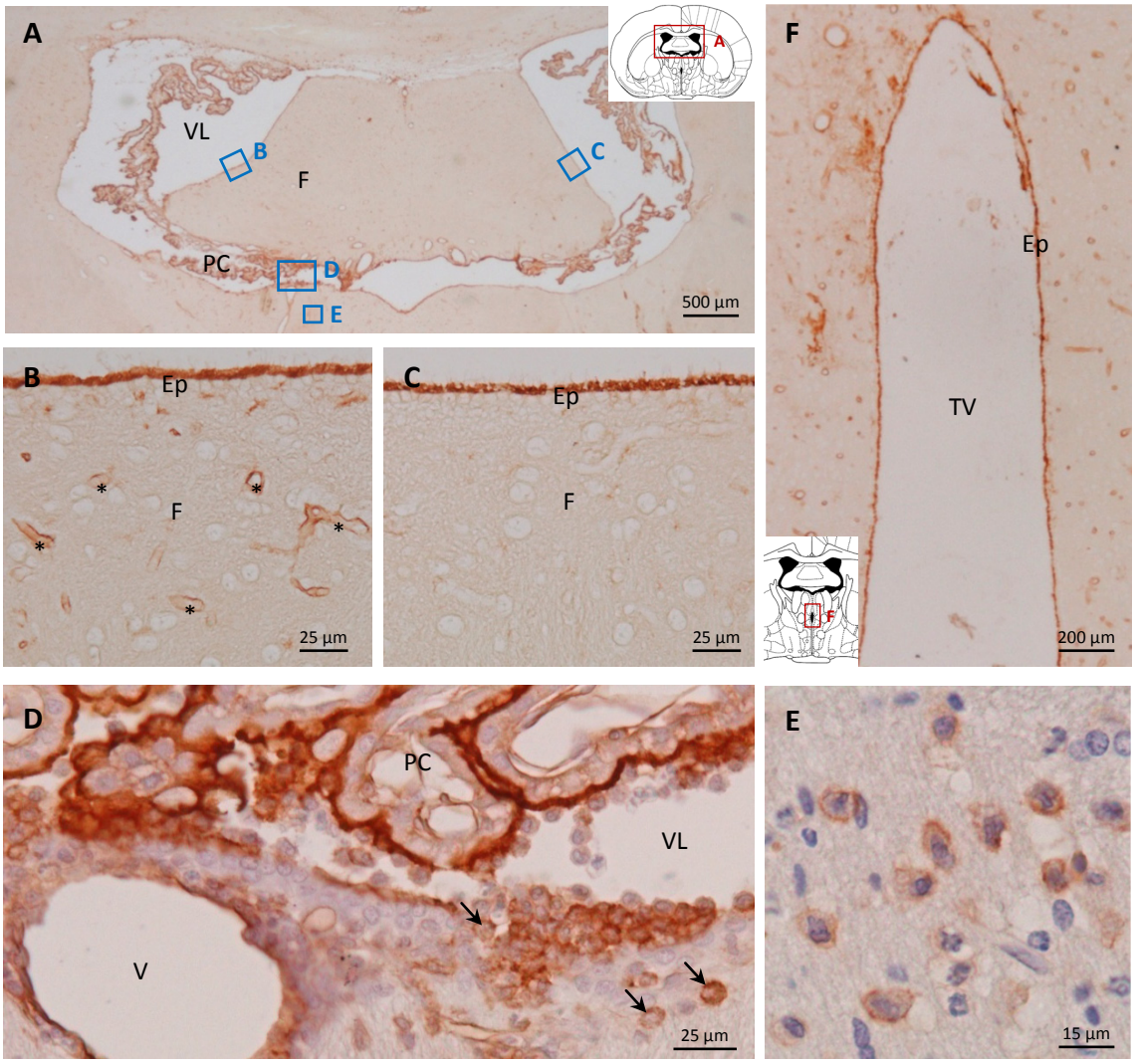


Figura R-07. Marcaje inmunohistoquímico con anti-ICAM1. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 12 h posinyección.* ***A:*** *imagen panorámica de ambos ventrículos laterales a nivel del agujero de Monro.* ***B:*** *región subemendimaria del fórnix, ventrículo inyectado. Se observa marcaje ICAM1+ en los vasos (*****).* ***C:*** *región subependimaria del fórnix, ventrículo contralateral.* ***D:*** *región del agujero de Monro del ventrículo inyectado. Se observa infiltración de células ICAM1+ (**flechas**) en el parénquima nervioso.* ***E:*** *células ICAM1+ en el seno de la estría medular del lado inyectado.* ***F:*** *tercer ventrículo. Se observa reactividad en la superficie ependimaria y en los vasos cercanos a ambos lados del ventrículo.* ***PC****: plexos coroideos,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***F****: fórnix,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

La cuantificación del área inmunorreactiva a anti-ICAM1 en las regiones periventriculares seleccionadas (epígrafe 3.6.1) mostró un aumento significativo de la expresión de esta molécula 4 h después de la inyección de NA (fig. R-08). También significativo fue el aumento que se observó entre las

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4 y las 24 h posinyección. A los 7 días el nivel disminuyó nuevamente hasta equipararse al control, para mostrarse completamente restituido a los 15 días de la inyección del enzima.

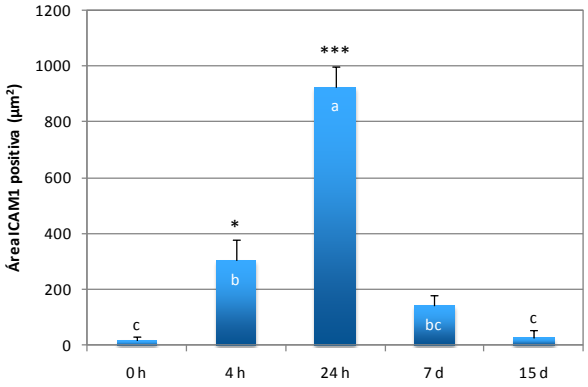


Figura R-08. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-ICAM1 a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa. *Las barras representan la media ± SEM del área ICAM1+ en el lado inyectado menos la del lado contralateral. Los grupos fueron comparados mediante ANOVA de un factor ($F_{(4,14)} = 53,890$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0,05$. (*) = $P < 0,05$; (***) = $P < 0,001$ vs. grupo 0 h.*

El aumento en la expresión de ICAM1 parecía ocurrir de forma paralela a la infiltración de células inflamatorias procedentes del torrente sanguíneo a partir de las 4 h posinyección. De hecho, algunas células infiltradas (y también algunas residentes) mostraron una fuerte expresión de ICAM1 en su superficie (fig. R-07 D).

4.1.2.1.2 Inmunohistoquímica con anti-IBA1

Para la detección de células microgliales se utilizó un anticuerpo contra la proteína adaptadora de unión a calcio iónico 1 (IBA1), cuya expresión, constitutiva en estas células, aumenta en el estado de activación, permitiendo, por tanto, la discriminación entre microglía activada y vigilante. Esta puede ser expresada también en ciertas subpoblaciones de macrófagos (Ito y col., 2001; Imai y Kohsaka, 2002).

En los animales controles inyectados con vehículo y en los no inyectados se detectaron pocas células microgliales en el parénquima periventricular, débilmente teñidas con anti-IBA1. La mayoría de ellas se localizaron en la región subependimaria, aunque también aparecieron ligeramente marcadas algunas células epiplexus y supraependimarias.

Las tinciones inmunohistoquímicas mostraron un aumento de la expresión de este marcador en la microglía presente alrededor del ventrículo inyectado y en los plexos coroideos del mismo 24 h después de la inyección (fig. R-09 A y C). En contraste, la microglía presente en el lado contralateral presentó una marca semejante a la de animales controles no inyectados (fig. R-09 B y D), esto es, un menor número de células positivas, las cuales presentaron una morfología más ramificada. También se apreció un mayor número de células positivas y con mayor inmunorreactividad en las regiones más cercanas a la zona de la inyección de NA, en contraposición a las áreas más alejadas, donde este aumento de expresión fue menor. Este efecto puede observarse claramente en el quiasma óptico, donde la inmunorreactividad con anti-IBA1 fue siempre mayor en el hemisferio inyectado (fig. R-09 E).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

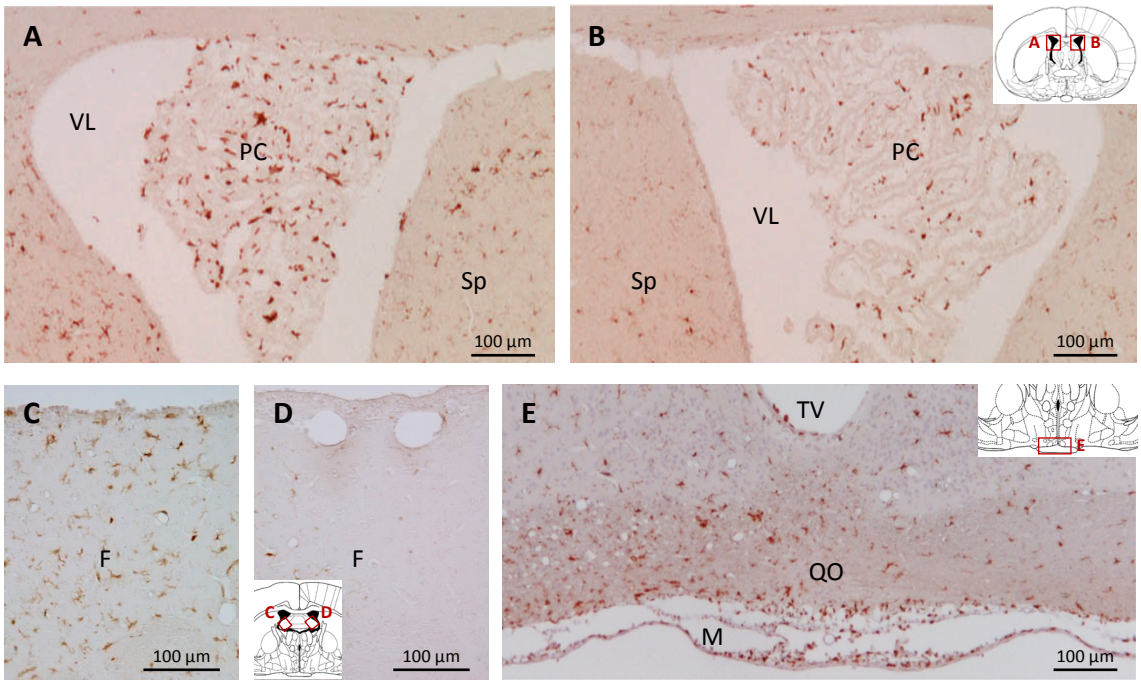


Figura R-09. Marcaje inmunohistoquímico con anti-IBA1. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección.* ***A:*** *imagen de los plexos coroideos del ventrículo inyectado. El número de células positivas es mayor que en el lado contralateral.* ***B:*** *plexos coroideos del ventrículo contralateral.* ***C:*** *región subependimaria del fórnix del ventrículo inyectado.* ***D:*** *región subependimaria del fórnix del ventrículo contralateral.* ***E:*** *región del quiasma óptico. Se observa mayor inmunorreactividad en el lado inyectado.* ***PC****: plexos coroideos,* ***SP****: séptum,* ***F****: fórnix,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***M****: meninges,* ***QO****: quiasma óptico.*

El análisis del área inmunorreactiva para la presencia de IBA1 en las regiones periventriculares seleccionadas (fig. R-10) mostró un aumento significativo del área marcada 4 h después de la inyección de NA, así como 7 días después de la misma, tiempo en el que, coincidiendo con lo descrito en otros modelos de inflamación e isquemia cerebral, se detecta el máximo de expresión. Entre estos dos valores se reflejó una disminución de la expresión del marcador, no siendo su nivel a tiempo 24 h significativamente distinto del nivel a tiempo 0 h. A los 15 días, el nivel de expresión de IBA1 disminuyó con respecto a los 7 días, si bien continuó siendo mayor que el nivel de referencia marcado por el tiempo 0 h. El estudio de IBA1 en tiempos mayores (no cuantificado) mostró una disminución progresiva de la expresión del marcador hasta 3 meses después de la inyección.

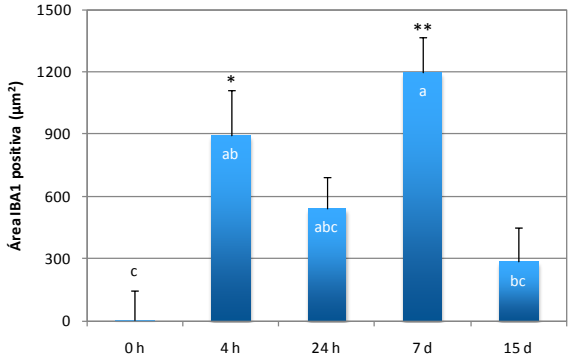


Figura R-10. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-IBA1 a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa. *Las barras representan la media ± SEM del área IBA1+ en el lado inyectado menos la del lado contralateral. Los grupos fueron comparados mediante ANOVA de un factor ($F_{(4,24)} = 6{,}989$, $P < 0{,}05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0{,}05$. (*) = $P < 0{,}05$; (**) = $P < 0{,}01$ vs. grupo 0 h.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.1.2.1.3 Inmunohistoquímica con anti-GFAP

La proteína glial fibrilar ácida (GFAP) forma filamentos intermedios en el citoplasma celular, y se utilizó para detectar los astrocitos en el tejido (Bignami y Dahl, 1974). Al igual que ocurre en la microglía con el marcador IBA1, se ha descrito el aumento de expresión de GFAP en astrocitos activados tras una lesión o daño en el sistema nervioso (Middeldorp y Hol, 2011).

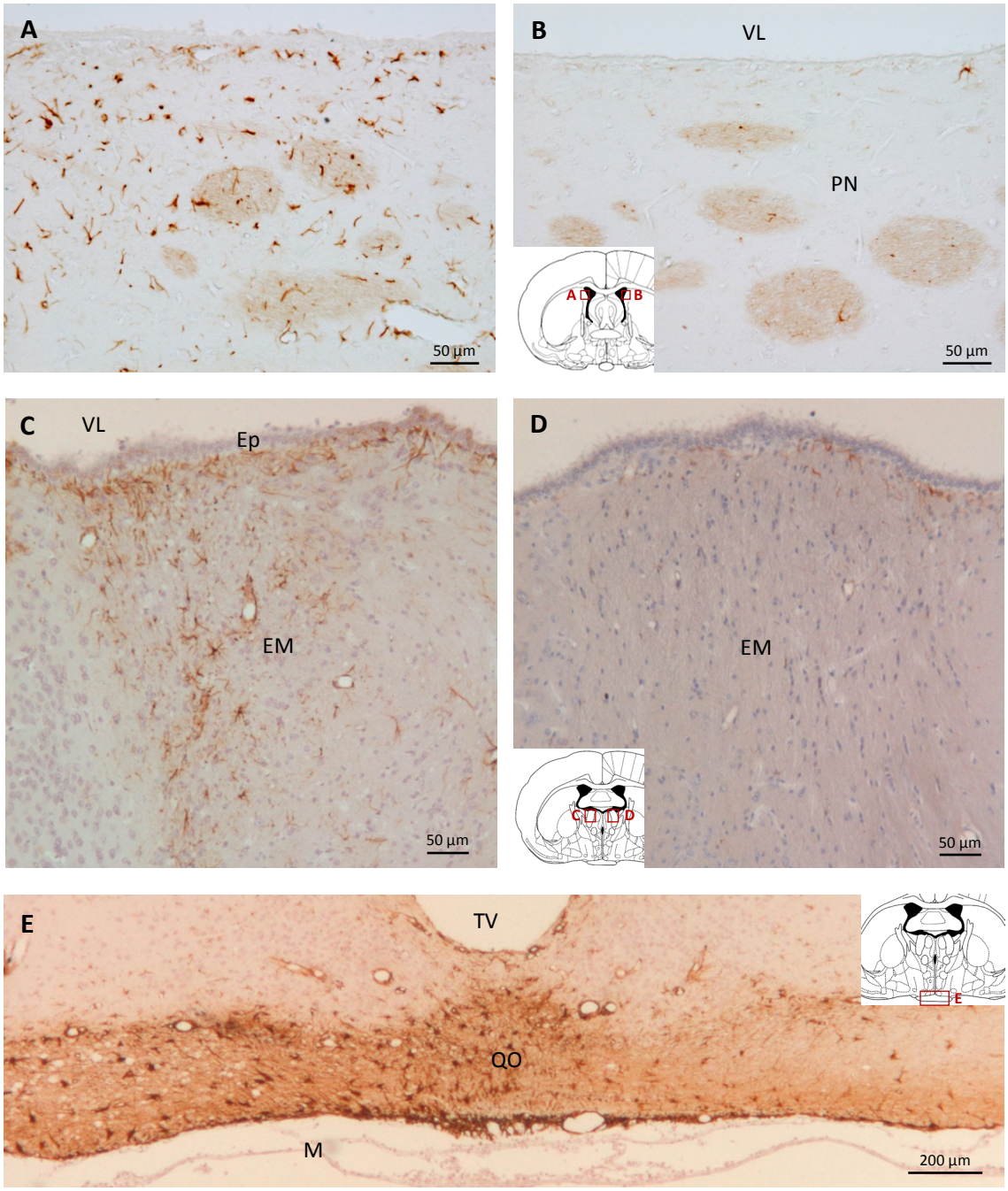


Figura R-11. Marcaje inmunohistoquímico con anti-GFAP. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección.* ***A:*** *gliosis en el parénquima nervioso periventricular. Ventrículo inyectado.* ***B:*** *región análoga en el ventrículo contralateral.* ***C:*** *gliosis en la estría medular del lado inyectado.* ***D:*** *estado normal de la estría medular contralateral.* ***E:*** *marca GFAP+ en la región del quiasma óptico.* ***EM****: estría medular,* ***QO****: quiasma óptico,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***M****: meninges,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las tinciones inmunohistoquímicas realizadas sobre cortes de ratas control mostraron cierta inmunorreactividad basal en los astrocitos del parénquima nervioso. Sin embargo, se detectó un aumento de la tinción de este marcador en las inmediaciones del ventrículo inyectado (fig. R-11), mostrándose regiones de especial concentración glial en el parénquima nervioso inmediato a las regiones denudadas de epitelio ependimario. Las inmediaciones del ventrículo contralateral no mostraron un aumento significativo en la expresión de dicha proteína (fig. R-11 B). El mismo efecto fue observado en el quiasma óptico (fig. R-11 E) y otros tractos mielínicos como la estría medular (fig. R-11 C y D), en los que la inmunorreactividad fue siempre mayor en el lado inyectado.

La cuantificación del área inmunorreactiva mediante la tinción con anti-GFAP en las zonas periventriculares seleccionadas mostró un aumento significativo y progresivo de la cantidad de esta molécula en las células gliales desde las 24 h después de la inyección de NA. Este incremento se observó aún 15 días después de la inyección, e incluso en tiempos mayores (datos no mostrados) debido a la formación de cicatrices gliales en las regiones desprovistas de epitelio ependimario.

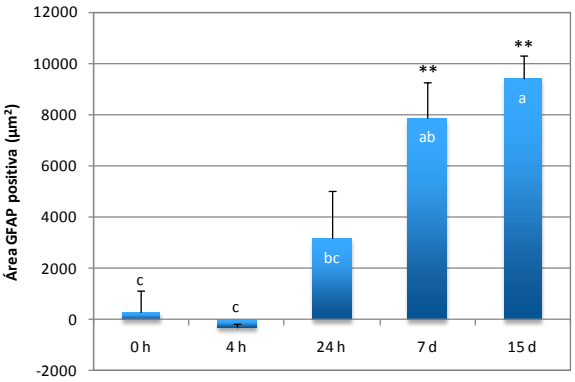


Figura R-12. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico con anti-GFAP a distintos tiempos de la inyección con neuraminidasa. *Las barras representan la media ± SEM del área GFAP+ en el lado inyectado menos la del lado contralateral. Los grupos fueron comparados mediante ANOVA de un factor ($F_{(4,14)}$ = 13,761, P < 0,05) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel P < 0,05. (**) = P < 0,01 vs. grupo 0 h.*

4.1.2.2 Cuantificación de células inmunocompetentes

Para detectar y cuantificar las células inmunocompetentes en las regiones afectadas por la inyección ICV se utilizaron, como en el caso anterior, técnicas inmunohistoquímicas. Los marcadores moleculares empleados para ello fueron: MPO (para neutrófilos), IL1β y CD163 (para las principales subpoblaciones de macrófagos), CD3ε (para linfocitos T) y PAX5 (para linfocitos B).

Las regiones en las que se realizaron los recuentos de estas poblaciones celulares fueron: los plexos coroideos, la región perivascular de los vasos cercanos al órgano subfornical en el lado inyectado y la región meníngea ventral al quiasma óptico (epígrafe 3.6.2).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

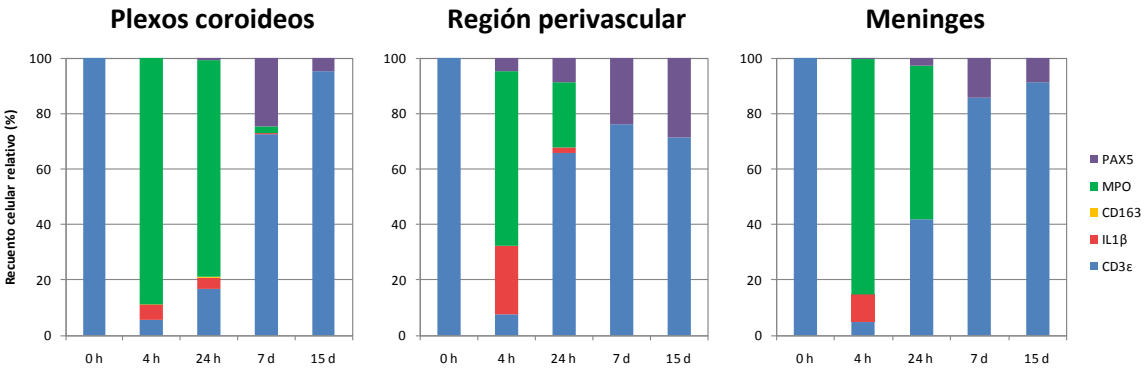


Figura R-13. Recuento celular relativo de poblaciones inmunocompetentes infiltradas. *Análisis temporal en distintas regiones del cerebro de ratas inyectadas con NA. Las barras de color representan el porcentaje que cada población celular representa en cada tiempo estudiado, calculado en base a la media del número de células positivas para cada marcador por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado.*

El análisis conjunto de los datos derivados del recuento celular (fig. R-13) mostró un comportamiento similar de las poblaciones en las tres ubicaciones estudiadas. En todos los casos, el recuento con los distintos marcadores fue cero para el tiempo 0 h, excepto con CD3ε, mediante el cual se pudieron contabilizar algunas células positivas. A las 4 h posinyección aproximadamente el 90% de las células detectadas en plexos y meninges eran polimorfonucleares MPO+. En la región perivascular este porcentaje fue menor, encontrándose un 20% de células IL1β+. Con el paso del tiempo, las células CD3ε+ fueron aumentando su presencia relativa en las áreas contadas, debido principalmente a la diminución de las demás poblaciones celulares. Los linfocitos B, marcados mediante PAX5, aumentaron su presencia con el paso de los días, detectándose su descenso a los 15 días en plexos y meninges. A continuación veremos detalladamente los resultados obtenidos para cada marcador.

4.1.2.2.1 Inmunohistoquímica con anti-MPO

Los neutrófilos fueron detectados mediante anticuerpos contra mieloperoxidasa (MPO), un enzima presente en los fagosomas de estas células polimorfonucleares (Lau y col., 2005).

Las células MPO+ fueron la población más abundante detectada. Estas células presentaban un núcleo multilobulado y un citoplasma claro en tinciones de hematoxilina-eosina (fig. R-14 E), correspondiendo a la morfología y tamaño típicos de los neutrófilos. Se localizaron principalmente en la región del ventrículo lateral inyectado, plexos coroideos, vasos cercanos al órgano subfornical y superficie ependimaria. También se encontraron numerosas células presentes en las meninges, como por ejemplo, en la región ventral al quiasma óptico (fig. R-14 D).

Los recuentos celulares efectuados en los tiempos seleccionados mostraron un pico en la abundancia de células MPO+ 4 h tras la inyección de NA, en las tres regiones estudiadas. También en todos estos casos, esta población disminuyó después de las 24 h para, finalmente, ser indetectable 7 días después de la inyección del enzima (fig. R-15).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

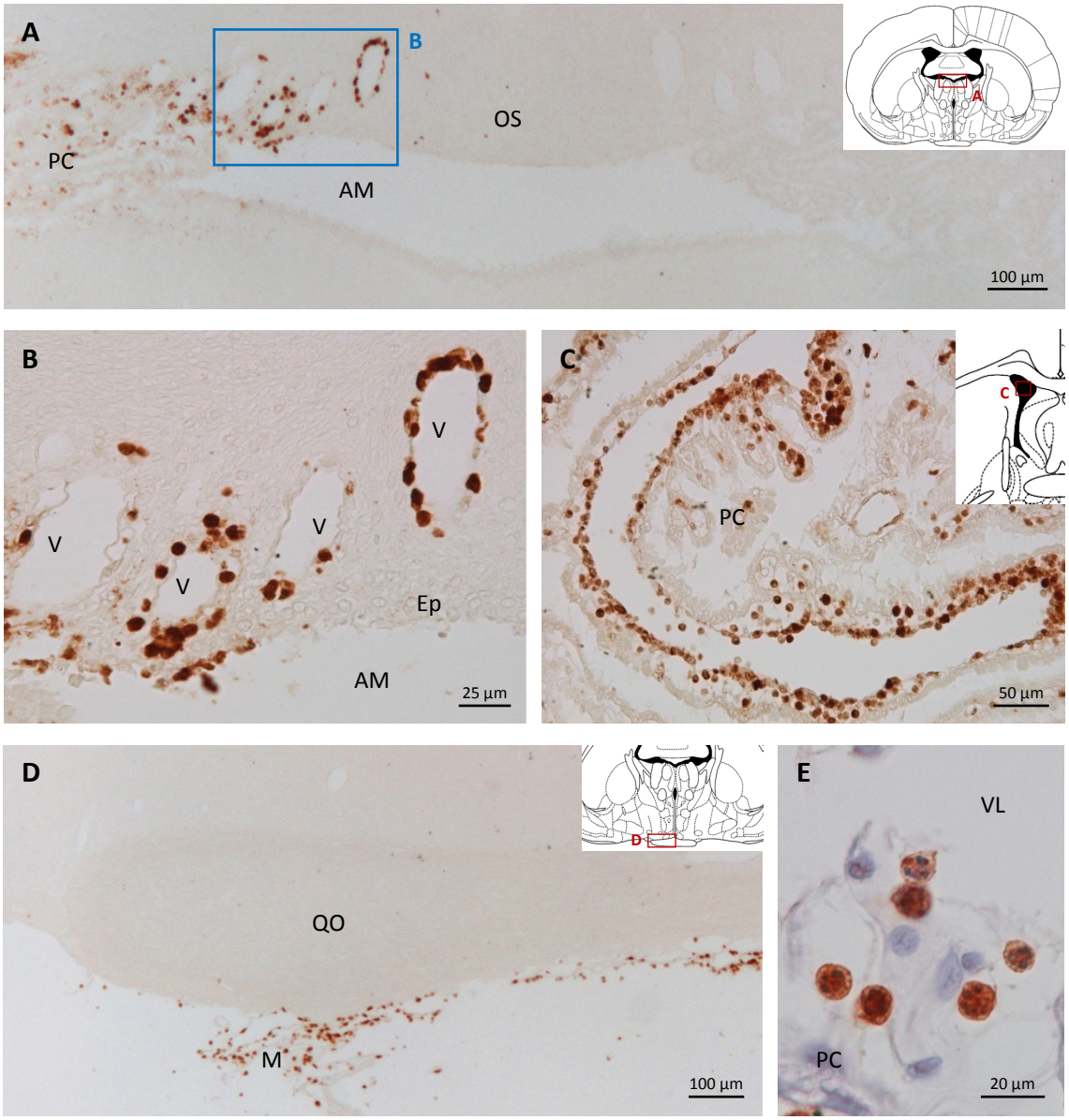


Figura R-14. Tinción inmunohistoquímica con anti-MPO. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 4 h posinyección.* ***A:*** *imagen panorámica de la región del agujero de Monro.* ***B:*** *detalle los vasos cercanos al órgano subfornical, ventrículo inyectado. Células MPO+ entorno a los vasos.* ***C:*** *plexos coroideos del ventrículo inyectado.* ***D:*** *región del quiasma óptico. Células MPO+ en las meninges.* ***E:*** *detalle de células MPO+ en los plexos coroideos. Se aprecia el núcleo multilobulado.* ***PC****: plexos coroideos,* ***AM****: agujero de Monro,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***OS****: órgano subfornical,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***M****: meninges,* ***QO****: quiasma óptico,* ***VL****: ventrículo lateral.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

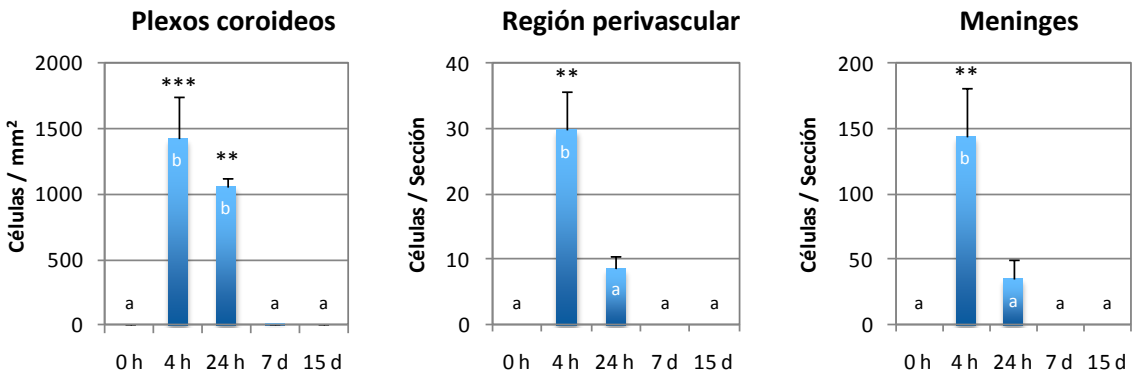


Figura R-15. Recuento de células MPO+. *Análisis a lo largo del tiempo en distintas regiones del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Las barras representan la media ± SEM del número de células positivas por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado. Los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Plexos coroideos: $F_{(4,14)} = 22,989$, $P < 0,05$; Región perivascular: $F_{(4,14)} = 11,507$, $P < 0,05$; Meninges: $F_{(4,14)} = 12,057$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0,05$. (**) = $P < 0,01$; (***) = $P < 0,001$ vs. grupo 0 h.*

4.1.2.2.2 Inmunohistoquímica con anti-IL1β y anti-CD163

Para poner de manifiesto distintas subpoblaciones de monocitos/macrófagos se utilizaron los marcadores interleucina 1 beta (IL1β) y CD163.

IL1β es una citocina proinflamatoria producida y liberada por distintas poblaciones de células inmunocompetentes, principalmente macrófagos y microglía activada (Beuscher y col., 1990), pero también monocitos y linfocitos B en menor medida (Schumann y col., 1998; Denes y col., 2012).

Se observaron multitud de células IL1β+ en las inmediaciones del ventrículo inyectado con NA a partir de las 4 h posinyección. Se trató en su mayoría de células grandes, con un gran núcleo arriñonado, morfología correspondiente a los monocitos/macrófagos (fig. R-16 G). Estas poblaciones se concentraron especialmente alrededor de los plexos coroideos (fig. R-16 A y B), si bien pudieron encontrarse también células positivas en el parénquima nervioso periventricular, alrededor de los principales vasos sanguíneos, y en la superficie ependimaria (fig. R-16 C). Se observaron numerosos casos de diapédesis de células positivas a través del epitelio ependimario (fig. R-16 E) y también en algunos vasos periventriculares. No se localizaron células con marca positiva en el ventrículo contralateral.

De forma semejante a lo observado con el marcador de MPO, los recuentos celulares efectuados en los tiempos seleccionados mostraron un pico en la abundancia de células IL1β+ 4 h después de la inyección de NA. Esto se observó tanto en los plexos coroideos, como en la inmediación de los vasos que circundan el órgano subfornical y en las meninges cercanas al quiasma óptico. En todos los casos, esta población se mostró disminuida 24 h después de la inyección para finalmente ser indetectable a partir del séptimo día.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

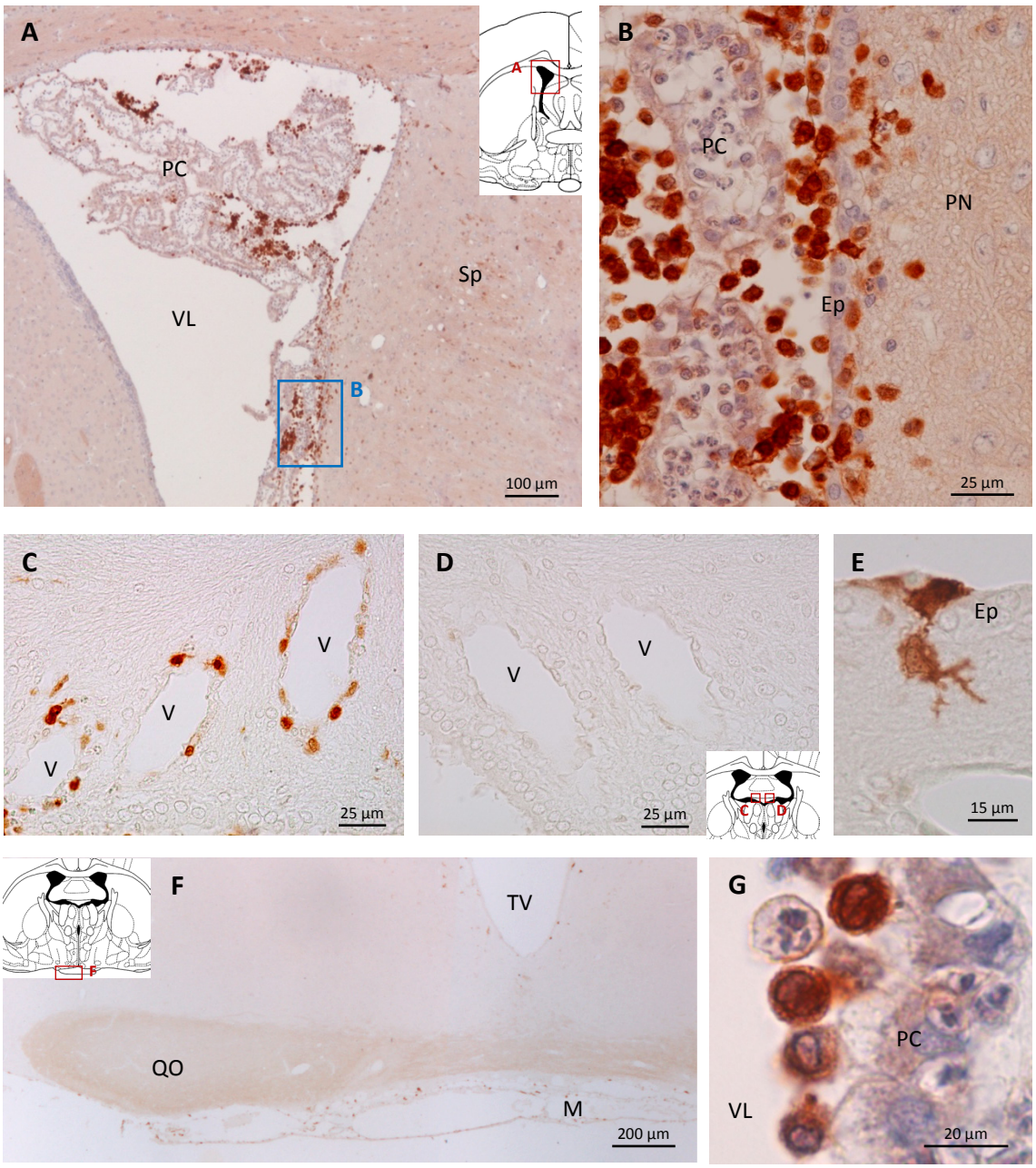


Figura R-16. Tinción inmunohistoquímica con anti-IL1β. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 12 h posinyección.* ***A:*** *abundancia de células positivas en el ventrículo inyectado.* ***B:*** *detalle de la región subependimaria, infiltración de células IL1β+.* ***C:*** *células positivas circundan los vasos sanguíneos del lado inyectado del órgano subfornical.* ***D:*** *los vasos sanguíneos del lado contralateral del órgano subfornical no presentan células positivas a su alrededor.* ***E:*** *detalle de células IL1β+ atravesando el epitelio ependimario.* ***F:*** *región del quiasma óptico.* ***G:*** *detalle de células IL1β+ en la superficie de los plexos coroideos. Neutrófilos y células ependimarias no muestran marca positiva.* ***PC****: plexos coroideos,* ***Sp****: séptum,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***M****: meninges,* ***QO****: quiasma óptico,* ***TV****: tercer ventrículo.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

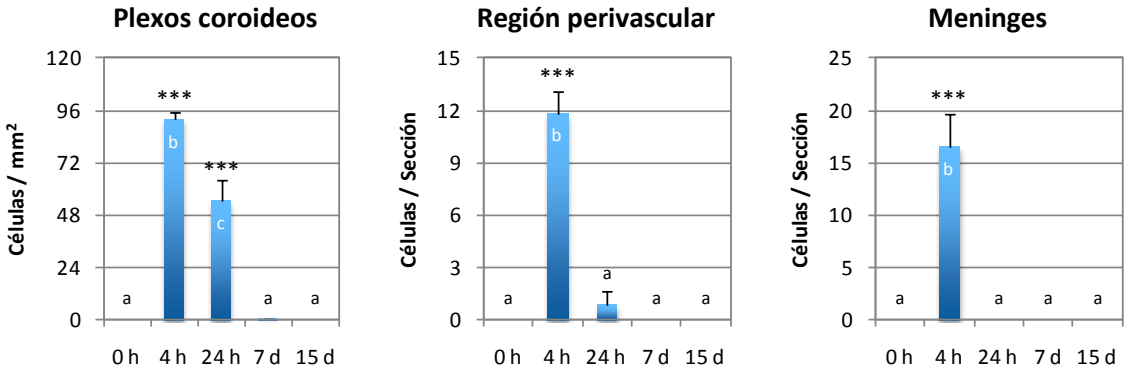


Figura R-17. Recuento de células IL1β+. *Análisis a lo largo del tiempo en distintas regiones del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Las barras representan la media ± SEM del número de células positivas por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado. Los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Plexos coroideos: $F_{(4,14)} = 87{,}241$, $P < 0{,}05$; Región perivascular: $F_{(4,14)} = 59{,}571$, $P < 0{,}05$; Meninges: $F_{(4,14)} = 27{,}473$, $P < 0{,}05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0{,}05$. (***) = $P < 0{,}001$ vs. grupo 0 h.*

CD163 (antígeno ED2 en rata) es una glucoproteína perteneciente a la superfamilia de receptores basurero ricos en cisteína exclusivamente expresada por una subpoblación de monocitos y macrófagos (Lau y col., 2004). Su expresión ha sido detectada en macrófagos perivasculares del SNC, pero no en macrófagos periventriculares (Graeber y col., 1989), por lo que su detección puede ser indicativa de la migración de macrófagos desde el torrente sanguíneo y el parénquima nervioso hacia el ventrículo.

Los macrófagos productores de IL1β se relacionan tradicionalmente con el estado de activación clásica (M1). Mediante tinción inmunohistoquímica con anti-CD163 se consiguió observar una subpoblación de macrófagos ligados preferentemente a un estado de activación alternativo (M2). Estos se detectaron en el ventrículo inyectado en torno a las 12 h de la inyección de NA. Su presencia se concentró especialmente en la superficie ependimaria del ventrículo inyectado y del tercer ventrículo (fig. R-18).

Como ya comentamos anteriormente, en el caso concreto del recuento celular con el marcador CD163 se introdujo el tiempo experimental 12 h *a posteriori*, con el fin de reflejar el pico de esta población celular, que había sido detectado en el análisis cualitativo de los cortes en esta estrecha ventana temporal.

No se detectaron células CD163+ alrededor de los vasos circundantes al órgano subfornical ni en las meninges cercanas al quiasma óptico en ninguno de los tiempos analizados. Sí fue así, sin embargo, en los plexos coroideos, en los que se observó un aumento del número de células positivas entre las 4 y las 24 h, siendo muy significativo el pico detectado a las 12 h de la inyección (fig. R-19).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

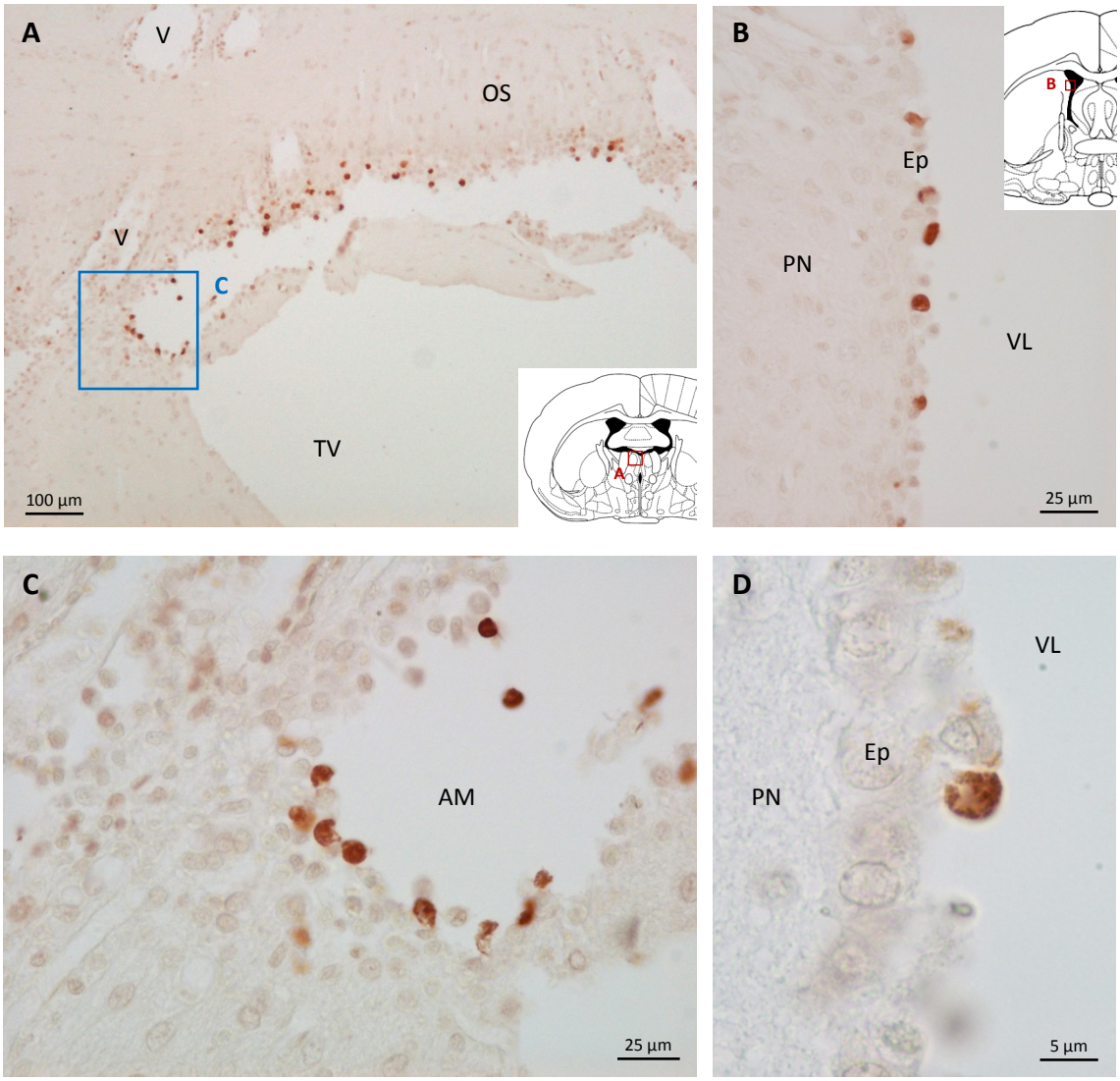


Figura R-18. Tinción inmunohistoquímica con anti-CD163*. Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 12 h posinyección.* ***A:*** *células positivas en la región del agujero de Monro.* ***B:*** *superficie ependimaria del ventrículo lateral inyectado.* ***C:*** *detalle de células CD163+ cercanas al epitelio ependimario, ventrículo inyectado.* ***D:*** *detalle de célula CD163+ en la superficie ependimaria.* ***PC****: plexos coroideos,* ***AM****: agujero de Monro,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***OS****: órgano subfornical,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***TV****: tercer ventrículo.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

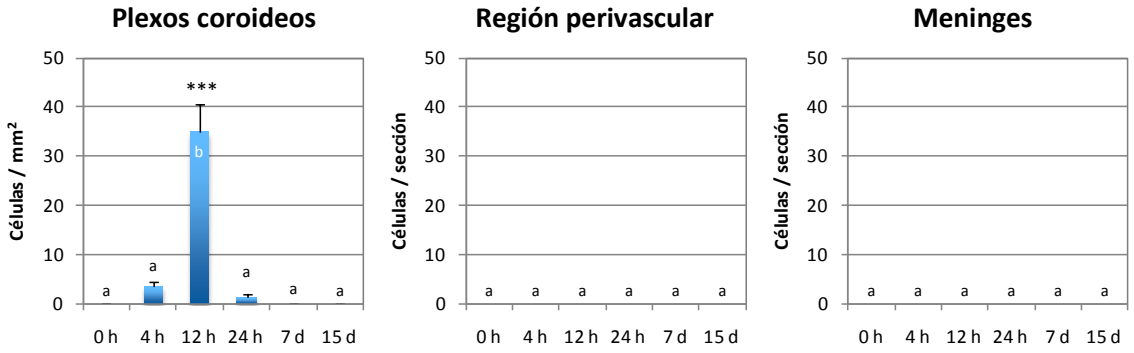


Figura R-19. Recuento de células CD163+*. Análisis a lo largo del tiempo en ratas inyectadas con neuraminidasa. Las barras representan la media ± SEM del número de células positivas por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado. Los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Plexos coroideos: $F_{(5,17)} = 34,371$, $P < 0,05$; Región perivascular: $F_{(5,17)} = 1,000$, $P < 0,05$; Meninges: $F_{(5,17)} = 1,000$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0,05$. (***) = $P < 0,001$ vs. grupo 0 h.*

4.1.2.2.3 Inmunohistoquímica con anti-CD3ε

El marcaje de linfocitos T se consiguió mediante el marcador CD3ε, polipéptido perteneciente al complejo CD3 expresado por estas células (Thibault y Bardos, 1995). Un anticuerpo contra la proteína CD8α se utilizó para marcar la subpoblación de linfocitos T citotóxicos en inmunohistoquímica de fluorescencia (epígrafe 4.1.2.3).

Las tinciones inmunohistoquímicas realizadas contra CD3ε revelaron la presencia de algunas células positivas en el tejido control analizado. En los animales inyectados, se detectó una mayor concentración de células positivas en las inmediaciones del ventrículo inyectado, especialmente en los plexos coroideos (fig. R-20 A), la región perivascular de los grandes vasos cercanos al ventrículo (fig. R-20 C) y en las meninges (fig. R-20 E), pero nunca en el ventrículo contralateral (fig. R-20 B y D). Este anticuerpo puso además de manifiesto los cuerpos basales de los cilios ependimarios.

A diferencia de las anteriormente descritas, la mayor abundancia de células CD3ε+ se detectó en torno a las 24 h posinyección en todas las regiones estudiadas, con un aumento gradual de estas células entre las 4 y 24 h, y un descenso a partir de las 24 h, manteniéndose cierto número presente hasta 15 días después de la inyección (fig. R-21). Como veremos más adelante, mediante la doble inmunohistoquímica de fluorescencia (sin cuantificación) utilizando los anticuerpos anti-CD3ε y anti-CD8α se pudo demostrar que la mayor parte de estos linfocitos pertenecían a la subpoblación CD8+ (fig. R-28).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

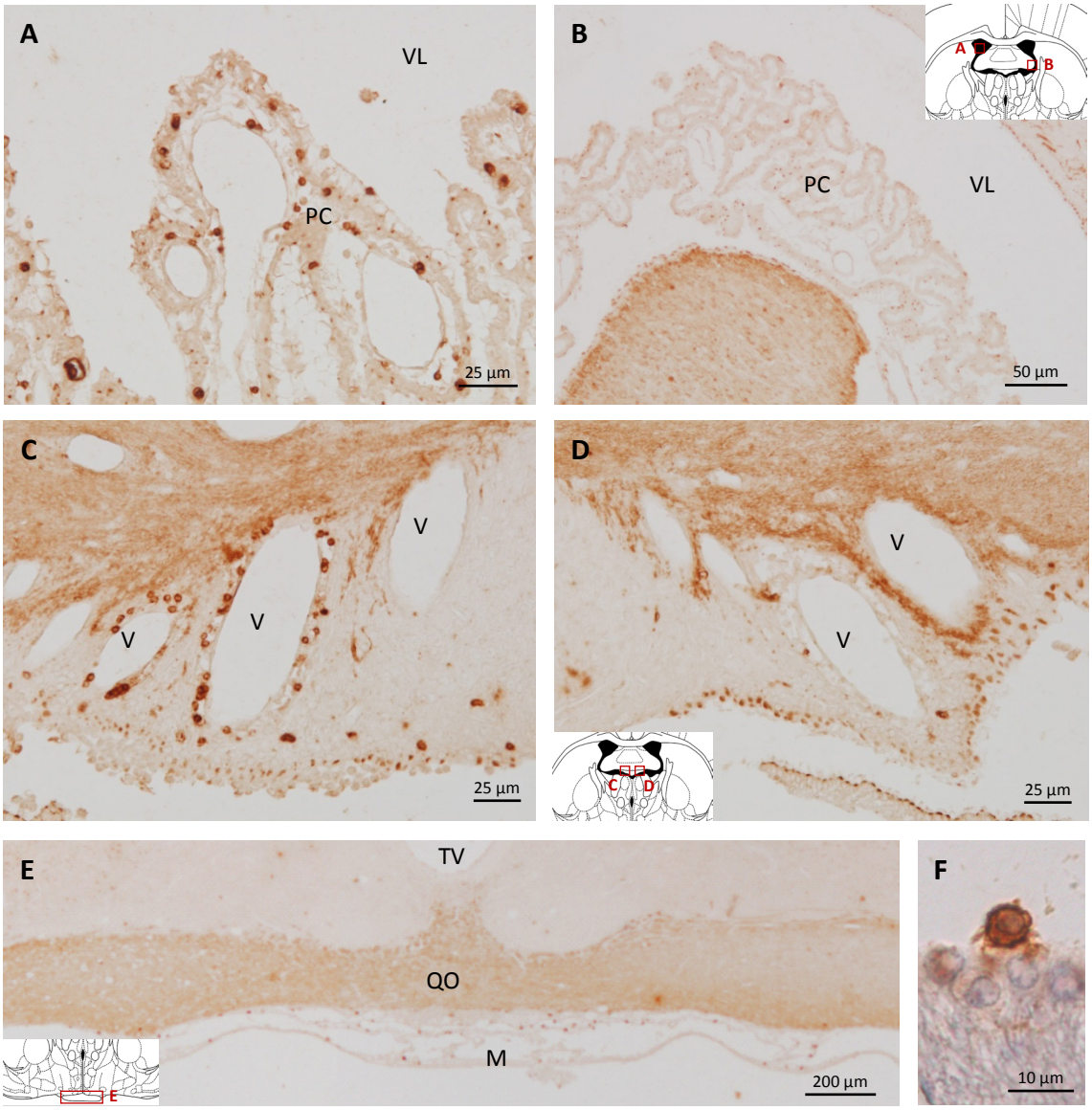


Figura R-20. Tinción inmunohistoquímica con anti-CD3ε*. Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 24 h posinyección.* ***A:*** *células positivas en los plexos coroideos del ventrículo inyectado.* ***B:*** *estas no se detectaron en los plexos coroideos del ventrículo contralateral.* ***C:*** *células positivas alrededor de los vasos cercanos al órgano subfornical. Ventrículo inyectado.* ***D:*** *vasos cercanos al órgano subfornical. Ventrículo contralateral.* ***E:*** *región del quiasma óptico. Se detectan algunas células positivas en las meninges.* ***F:*** *detalle de célula CD3ε+.* ***PC****: plexos coroideos,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***M****: meninges,* ***QO****: quiasma óptico,* ***TV****: tercer ventrículo.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

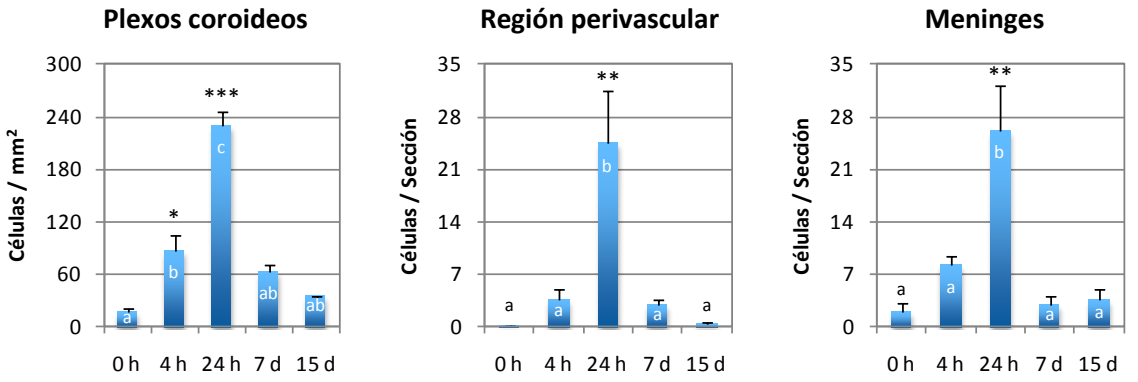


Figura R-21. Recuento de células CD3ε+. *Análisis a lo largo del tiempo en distintas regiones del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Las barras representan la media ± SEM del número de células positivas por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado. Los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Plexos coroideos: $F_{(4,14)} = 52,174$, $P < 0,05$; Región perivascular: $F_{(4,14)} = 7,874$, $P < 0,05$; Meninges: $F_{(4,14)} = 9,047$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0,05$. (*) = $P < 0,05$; (**) = $P < 0,01$; (***) = $P < 0,001$ vs. grupo 0 h.*

4.1.2.2.4 Inmunohistoquímica con anti-PAX5

El marcaje de linfocitos B se llevó a cabo mediante el marcador PAX5, un factor de transcripción expresado por estas células (Cobaleda y col., 2007).

A pesar de ser mucho más escasos que los linfocitos T, los linfocitos B se pudieron localizar en todas regiones estudiadas, apareciendo algunas células en los plexos coroideos y en la superficie ependimaria, así como en las meninges (fig. R-22 A y D). La mayor abundancia de estas células se detectó en la región perivascular de los grandes vasos que circundan el ventrículo inyectado en casi todos los tiempos que fueron estudiados (fig. R-22 B y C). No se encontró ninguna célula PAX5+ en el lado contralateral.

Los recuentos celulares llevados a cabo con este marcador demostraron que, en los plexos coroideos, la mayor presencia de células PAX5+ tuvo lugar en tiempos más tardíos que en el resto de zonas estudiadas. Así, en la región de los plexos, el pico de abundancia ocurrió a los 7 días de la inyección, mientras que en la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico, dicho pico se detectó en torno a las 24 h (fig. R-23). Este patrón espacio-temporal es similar al que se observó en las células CD3ε+.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

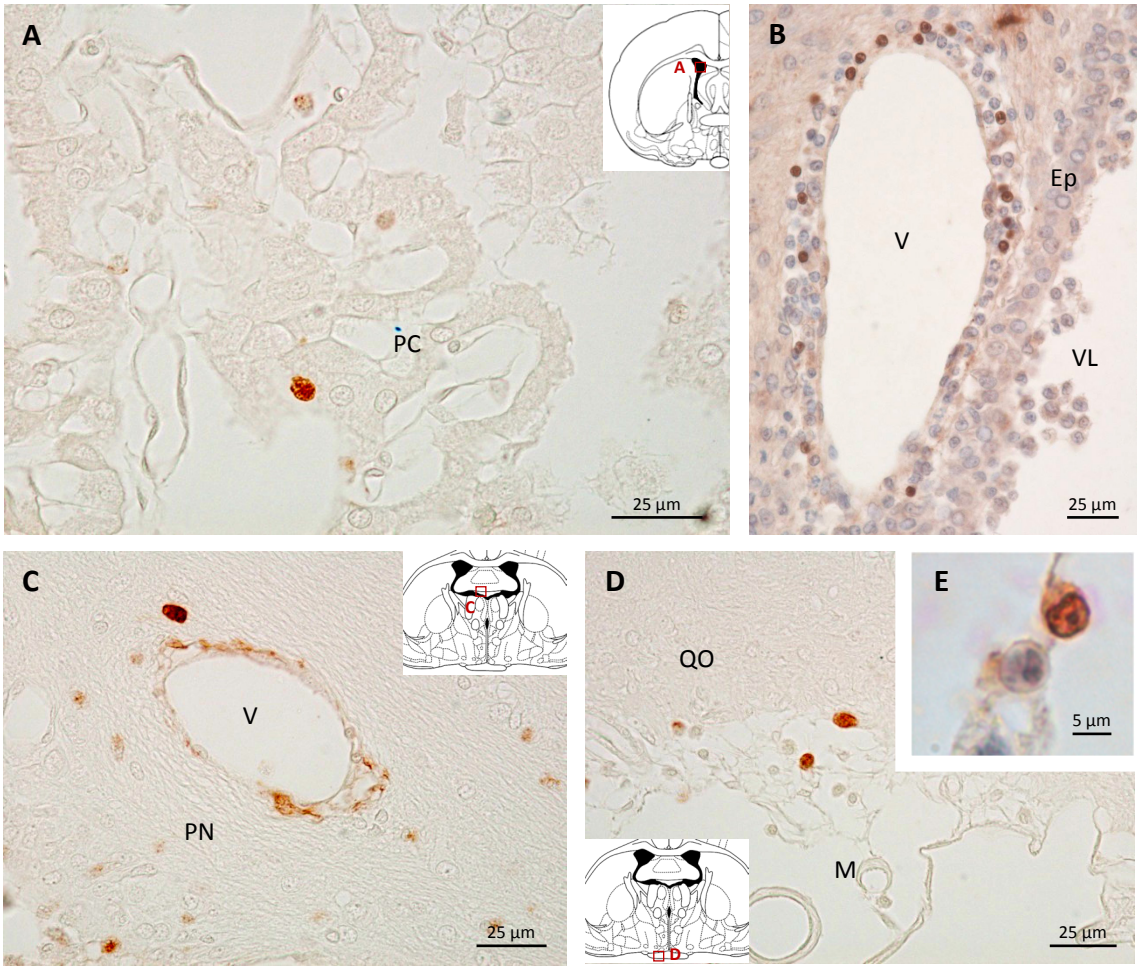


Figura R-22. Tinción inmunohistoquímica con anti-PAX5. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 24 h posinyección.* ***A:*** *algunas células positivas fueron detectadas en los plexos coroideos del ventrículo inyectado.* ***B:*** *las células positivas fueron más abundantes en las inmediaciones de los vasos cercano al órgano subfornical. Contraste hematoxilina-eosina.* ***C:*** *vaso perifornical cercano al ventrículo inyectado.* ***D:*** *meninges ventrales al quiasma óptico.* ***E:*** *detalle de célula PAX5+.* ***PC****: plexos coroideos,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***M****: meninges,* ***QO****: quiasma óptico,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

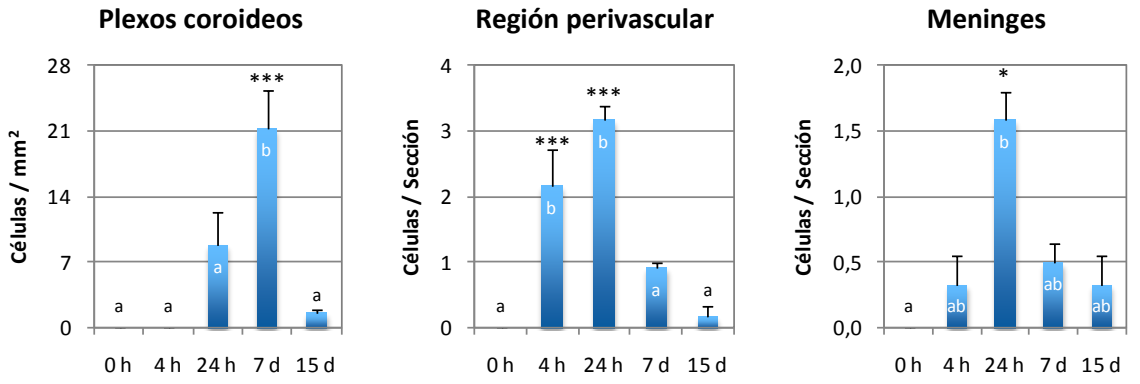


Figura R-23. Recuento de células PAX5+. *Análisis a lo largo del tiempo en distintas regiones del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Las barras representan la media ± SEM del número de células positivas por área (en el caso de los plexos coroideos) o por sección estudiada (en el caso de la región perivascular y las meninges ventrales al quiasma óptico) en el lado inyectado. Los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Plexos coroideos: $F_{(4,14)} = 13{,}168$, $P < 0{,}05$; Región perivascular: $F_{(4,14)} = 29{,}500$, $P < 0{,}05$; Meninges: $F_{(4,14)} = 4{,}625$, $P < 0{,}05$) y un análisis post-hoc de Tukey. Las letras a, b y c indican agrupaciones sin diferencias significativas a nivel $P < 0{,}05$. (*) = $P < 0{,}05$; (***) = $P < 0{,}001$ vs. grupo 0 h.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.1.2.3 Colocalización de marcadores de inflamación

Se empleó la técnica de la inmunofluorescencia doble para analizar la posible colocalización de los distintos marcadores de inflamación empleados en los recuentos celulares y en la descripción del fenómeno inflamatorio.

IBA1, IL1β y CD163 se emplearon para detectar las principales poblaciones de células fagocíticas que intervienen en la inflamación (macrófagos y microglía). Las imágenes obtenidas revelaron que no se produce colocalización entre los marcadores CD163 e IL1β, ambos, marcadores de monocitos/macrófagos ligados a distintas formas de activación (fig. R-24 C). Tampoco entre los marcadores CD163 e IBA1 (marcador de microglía) (fig. R-24 F).

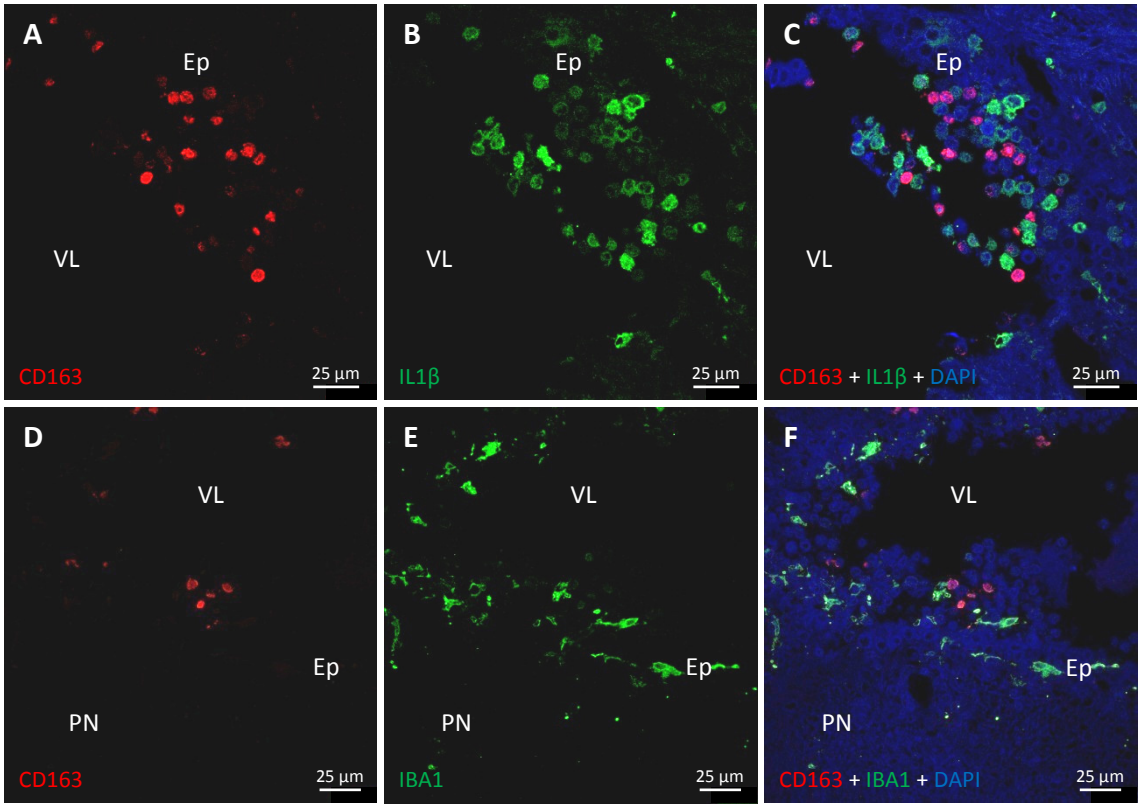


Figura R-24. Doble inmunofluorescencia con marcadores de fagocitos I. *Imágenes a microscopia confocal de cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 12 h posinyección.* ***A****: tinción con anti-CD163.* ***B****: tinción con anti-IL1ß.* ***C****: fusión de las imágenes A y B con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI (azul). No se detectaron células que presentasen simultáneamente alta expresión de CD163 e IL1ß.* ***D****: tinción con anti-CD163.* ***E****: tinción con anti-IBA1.* ***F****: fusión de las imágenes D y E con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI. No se detectaron células que presentasen simultáneamente alta expresión de CD163 e IBA1.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Sí se encontró, sin embargo, solapamiento entre las poblaciones IL1β+ e IBA1+, encontrándose un pequeño conjunto de células positivas para ambos marcadores (no más del 5-10%), generalmente asociada a la superficie de los plexos coroideos y a la región subependimaria (fig. R-25 E y F). Estas células con doble marca aparecían principalmente cerca de la superficie del epéndimo y en algunas regiones del parénquima cerebral. Sin embargo, en base a estas tinciones, no sabemos con certeza si la

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

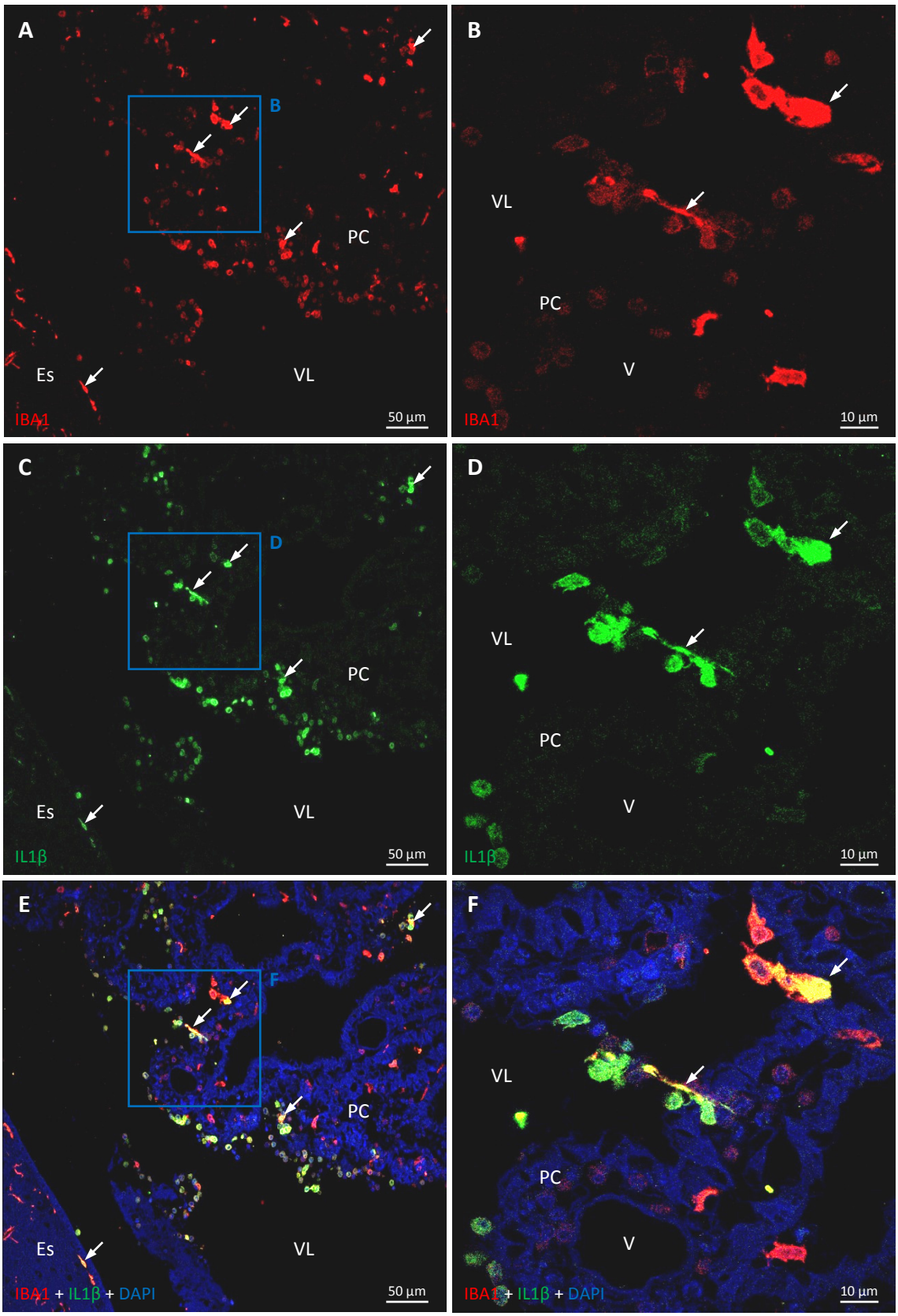


Figura R-25. Doble inmunofluorescencia con marcadores de fagocitos II. *Imágenes a microscopia confocal de cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 12 h posinyección.* ***A****: tinción con anti-IBA1.* ***C****: tinción con anti-IL1ß.* ***E****: fusión de las imágenes A y C con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI (azul).* ***B****,* ***D*** *y* ***F****: respectivas ampliaciones encuadradas. Se detectaron algunas células que presentaban simultáneamente una alta expresión de IBA1 e IL1ß (****flechas****).* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PC****: plexos coroideos,* ***V****: vasos sanguíneos,* ***Es****: estriado.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

localización de estas células era resultado de un proceso de infiltración desde el ventrículo hacia el subepéndimo o de extravasación desde los vasos hacia el parénquima.

No se encontró solapamiento entre las poblaciones IL1β+ y MPO+ (fig. R-26 C) en ninguno de los tiempos estudiados.

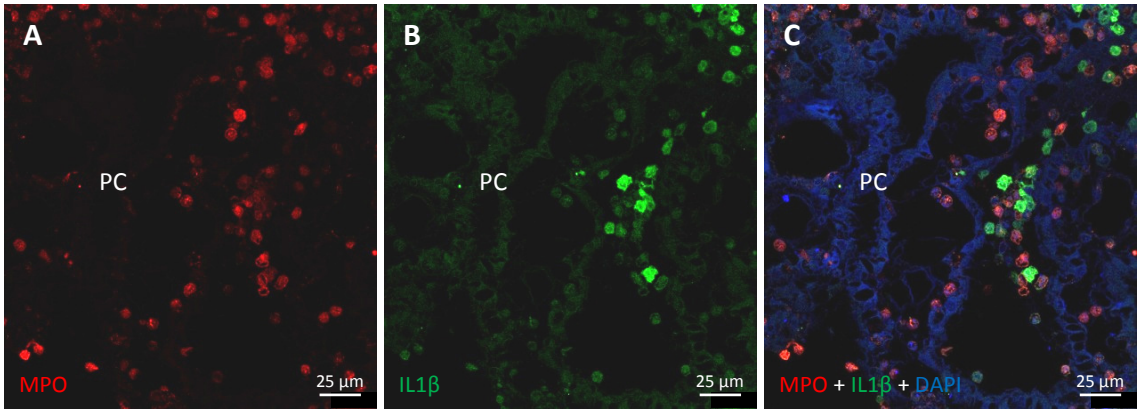


Figura R-26. Doble inmunofluorescencia con marcadores de inflamación. *Imágenes a microscopia confocal de cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 12 h posinyección.* ***A****: tinción con anti-MPO.* ***B****: tinción con anti-IL1ß.* ***C****: fusión de las imágenes A y B con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI (azul). No se detectaron células que presentasen simultáneamente alta expresión de MPO e IL1ß.* ***PC****: plexos coroideos.*

Las tinciones conjuntas de ICAM1 (molécula de adhesión) con diversos marcadores de inflamación mostraron algunas células IBA1+ con una fuerte expresión de ICAM1 en su superficie. Dichas células se encontraron asociadas frecuentemente a la superficie del epitelio ependimario ventricular (fig. R-27 D) o en el parénquima, cerca de vasos sanguíneos con alta expresión de ICAM1. Este marcaje con ICAM1 no se detectó sobre otros linajes celulares estudiados, como las células MPO+ (principalmente neutrófilos) (fig. R-27 G) o células CD3ε+ (imágenes no mostradas).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

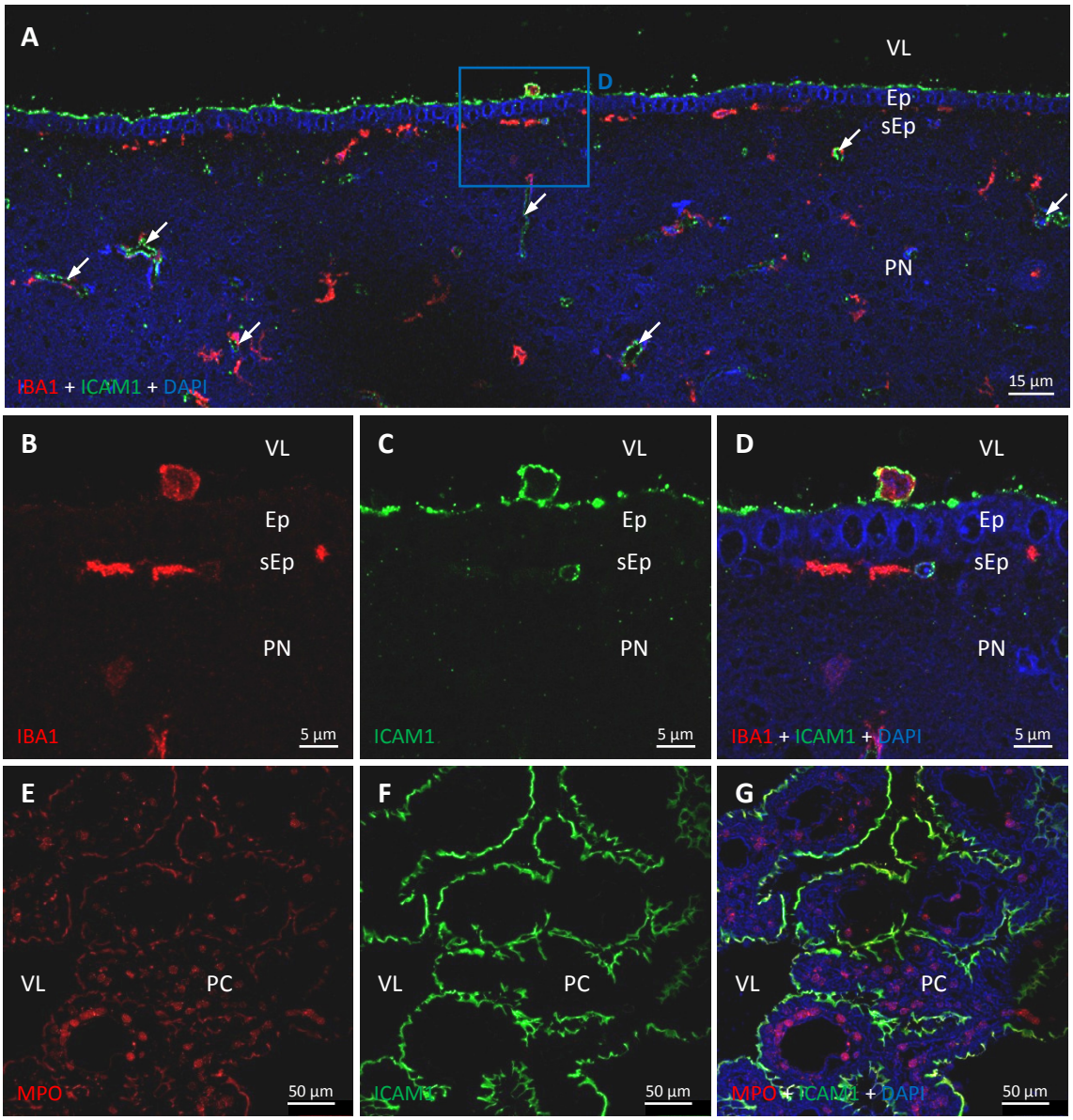


Figura R-27. Doble inmunofluorescencia utilizando ICAM1 y marcadores de inflamación. *Imágenes a microscopia confocal de cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 12 h posinyección.* ***A****: imagen de la superficie ependimaria. En rojo aparece el marcaje con anti-IBA1, en verde el marcaje con anti-ICAM1 y en azul una tinción de contraste fluorescente mediante DAPI.* ***B****: tinción con anti-IBA1.* ***C****: tinción con anti-ICAM1.* ***D****: detalle encuadrado en A. Fusión de las imágenes B y C con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI. Célula IBA1+ que muestra expresión de ICAM1 en su superficie, adherida a la superficie ependimaria del ventrículo lateral inyectado.* ***E****: tinción con anti-MPO.* ***F****: tinción con anti-ICAM1.* ***G****: fusión de las imágenes E y F con una imagen de contraste fluorescente mediante DAPI. No se detectaron células que presentasen simultáneamente expresión de MPO e ICAM1.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***sEp****: subepéndimo,* ***PN****:* parénquima *nervioso,* ***PC****: plexos coroideos.*

El uso del marcador anti-CD8α junto con el marcador anti-CD3ε de linfocitos T en inmunohistoquímica de fluorescencia (fig. R-28) nos permitió observar que la mayoría de las células CD3ε+ infiltradas eran también CD8α+ (no cuantificado mediante recuento celular). Anti-CD8α pone de manifiesto la cadena alfa de la glucoproteína transmembranal CD8, especifica de los linfocitos T citotóxicos.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

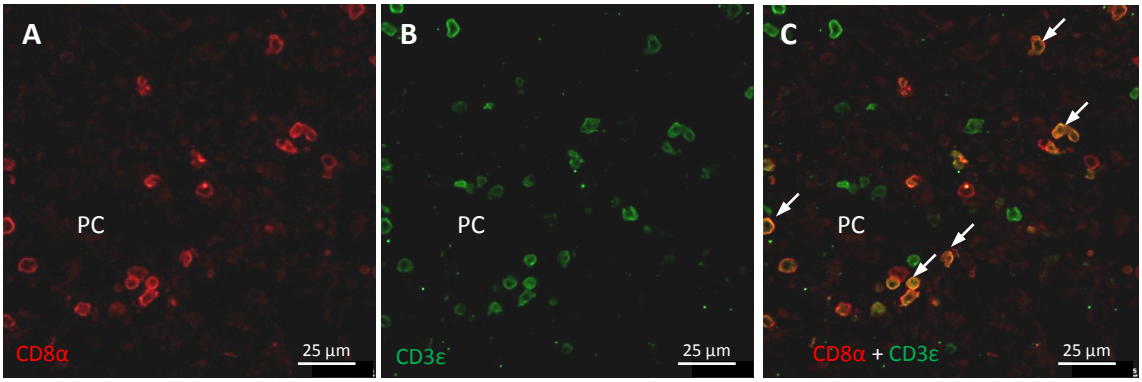


Figura R-28. Doble inmunofluorescencia con marcadores de linfocitos T. *Imágenes a microscopia confocal de cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 12 h posinyección. Las imágenes corresponden a una región de los plexos coroideos del ventrículo inyectado.* ***A****: tinción con anti-CD8α.* ***B****: tinción con anti-CD3ε.* ***C****: fusión de las imágenes A y B. Se detectó colocalización (****flechas****) entre ambos marcadores en la mayoría de células CD3ε+, si bien se observaron también algunas células marcadas con un solo marcador para ambos casos.* ***PC****: plexos coroideos.*

4.2 ANÁLISIS DE LA DEGENERACIÓN EN LOS TRACTOS MIELÍNICOS DE RATAS INYECTADAS INTRACEREBROVENTRICULARMENTE CON NEURAMINIDASA

4.2.1 Descripción espacio-temporal de la degeneración en tractos mielínicos

4.2.1.1 Estudio a microscopía óptica

Unas 24 h después de la inyección de NA se observaron áreas de aspecto vacuolar o espongiforme en distintas regiones del cerebro de estos animales. Estas alteraciones se correspondían con daños en la mielina, particularmente de los tractos locales cercanos al ventrículo inyectado, como la fimbria-fórnix (fig. R-29 C) y la estría medular (fig. R-29 E); aunque también se observaron daños en tractos mielínicos más distantes, como el quiasma óptico (fig. R-29 H). Esto ocurría en la mayoría de las ratas inyectadas analizadas y su intensidad parecía depender de la dosis de NA administrada.

Los daños más importantes se observaron alrededor del ventrículo inyectado, mientras que en el ventrículo contralateral no se detectaron alteraciones. Sin embargo, la estría medular contralateral solía presentar cierto grado de degeneración (no mostrado), así como la fimbria-fórnix contralateral, en algunos casos.

Entre las 18 - 24 h posinyección ya se podía observar una ligera degeneración en los tractos mielínicos. Esta se caracterizó por multitud de pequeñas regiones circulares decoloradas en las tinciones generales. La degeneración vacuolar máxima fue observada entre los 4 - 7 días (fig. R-29 C), presentándose, en este caso, un número menor de regiones afectadas pero de mayor tamaño e intensidad. Las pruebas realizadas con NA vírica dieron lugar a los mismos resultados que con NA de origen bacteriano.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

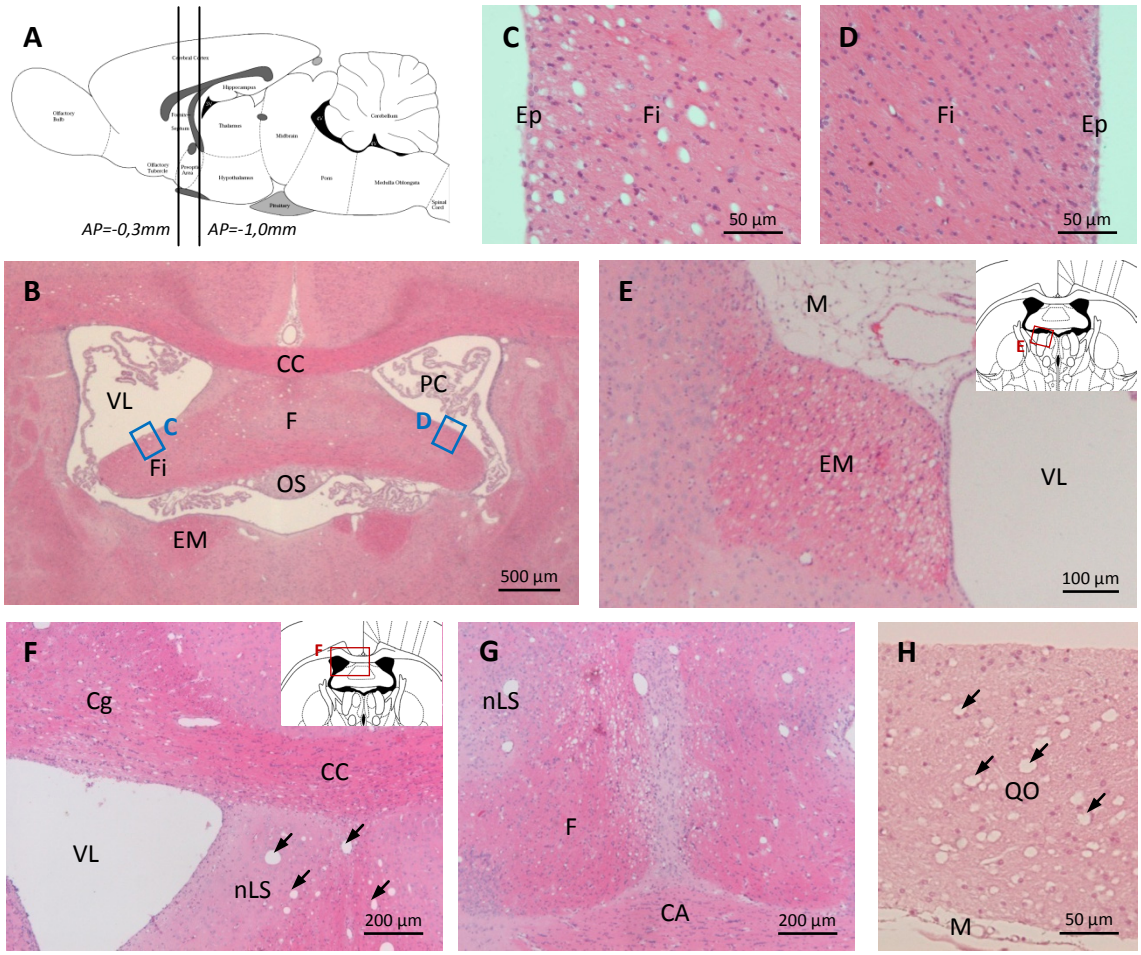


Figura R-29. Tractos mielínicos afectados tras la inyección ICV de neuraminidasa. ***A****: esquema del cerebro de rata en corte sagital. Se indican los niveles coronales mostrados: AP = -1,0 mm (****B****,* ***C****,* ***D*** *y* ***E****) y AP = -0,3 mm (****F****,* ***G*** *y* ***H****). Cortes teñidos con hematoxilina-eosina.* ***B****: corte coronal de cerebro de rata 7 días posinyección.* ***C****: detalle de la fimbria (Fi) del ventrículo inyectado con degeneración vacuolar de la mielina.* ***D****: detalle de la fimbria del ventrículo contralateral sin degeneración.* ***E****: estría medular (EM) con degeneración, 5 días posinyección.* ***F****: región ventricular dorsal del lado inyectado.* ***G****: región central del septum. Degeneración vacuolar de la mielina en la fimbria del lado inyectado.* ***H****: degeneración vacuolar (****flechas****) en la región ipsilateral del quiasma óptico (QO).* ***CA****: comisura anterior,* ***Cg****: cíngulo,* ***nLS****: núcleo lateral septal,* ***EM****: estría medular,* ***QO****: quiasma óptico,* ***CC****: cuerpo calloso,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***OS****: órgano subfornical,* ***PC****: plexos coroideos,* ***M****: meninges.*

De igual modo que la tinción general con hematoxilina-eosina, la tinción de semifinos con azul de toluidina mostró regiones vacías en los tractos mielínicos del lado ipsilateral a la inyección de NA (fig. R-30 C y D). Además, fue posible apreciar cierto grado de desorganización en los haces mielínicos que conforman el tracto dañado en comparación con los tractos mielínicos del lado contralateral (fig. R-30 B), que conservaban un aspecto similar al observado en ratas controles no inyectadas.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

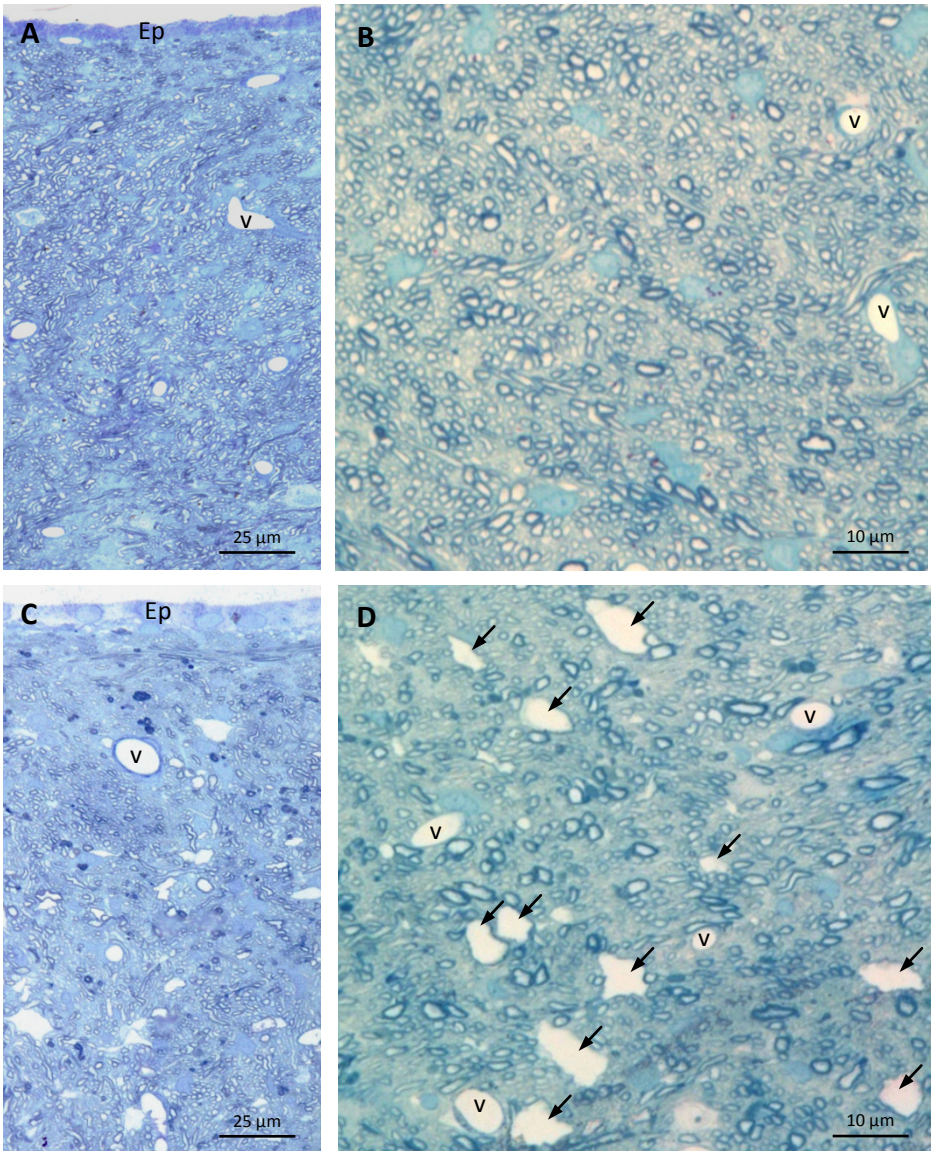


Figura R-30. Degeneración de tractos mielínicos en corte semifino. *Tinción azul de toluidina sobre cortes semifinos de 1 µm de espesor. Rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección.* ***A:*** *región no afectada de la estría medular del lado contralateral.* ***B:*** *detalle de la región no afectada de la estría medular contralateral. No se afectan tractos degenerados.* ***C:*** *región afectada de la estría medular del lado inyectado.* ***D:*** *detalle de la estría medular del lado inyectado. Se observan regiones vacías (****flechas****) fácilmente diferenciables de los vasos sanguíneos (V).* ***Ep****: epéndimo,* ***V****: vaso sanguíneo.*

El nivel máximo de degeneración en los tractos se observó entre los 4 y 7 días posinyección. Sin embargo, a partir del día 15, el daño observado en los tractos mielínicos estudiados fue menor (fig. R-31 C y D). A este tiempo, se observó cierto grado de desorganización en los tractos y regiones de menor afinidad por la eosina. Sin embargo, el número y tamaño de los huecos se redujo considerablemente (fig. R-31 G). 30 días después de la inyección de NA no se observaron en los tractos los huecos descritos a tiempos de 4 a 7 días (fig. R-31 H). A este tiempo, tanto la estría medular y el fórnix, como los tractos mielínicos más alejados (ej: quiasma óptico), presentaron un aspecto similar al de animales controles no inyectados, con coloración homogénea en la tinción hematoxilina-eosina (en ocasiones algo más clara que el tejido circundante) y ausencia de oquedades en el tejido.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

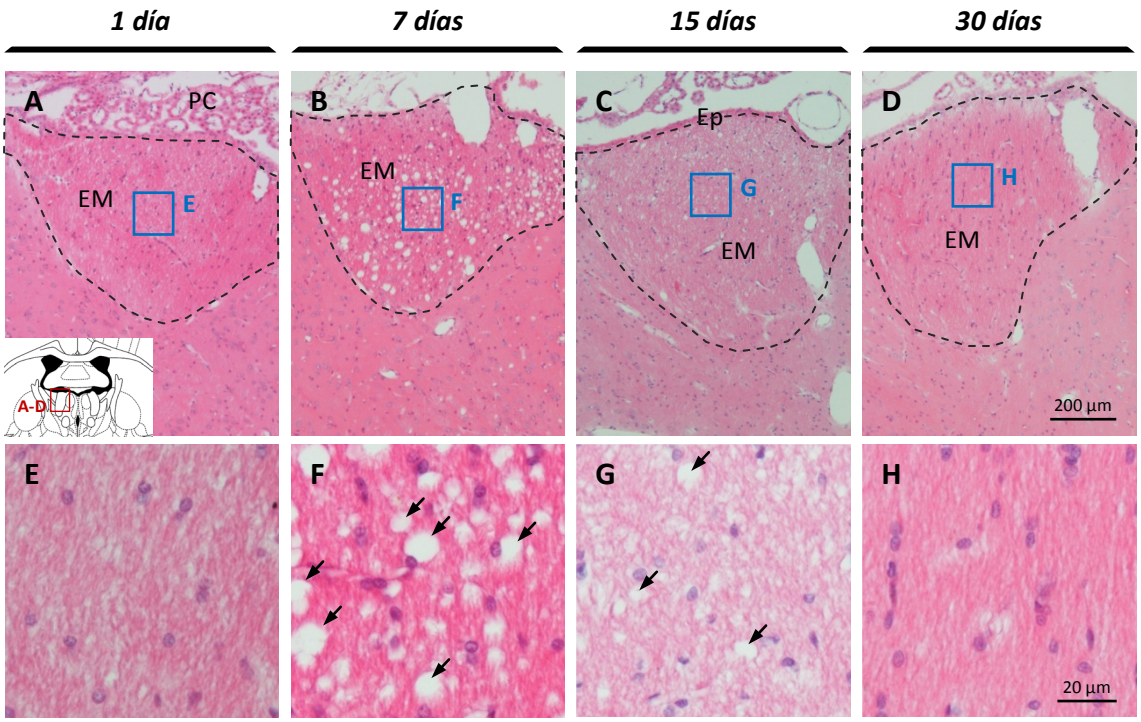


Figura R-31. Evolución temporal de la degeneración en los tractos mielínicos. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa. Tinción hematoxilina-eosina.* ***A-D:*** *estría medular (**EM**, línea discontinua) del hemisferio inyectado de ratas, 1, 7, 15 y 30 días posinyección respectivamente.* ***E-H****: detalle encuadrado de la estría medular.* ***E****: 24 h tras la inyección se aprecia cierta afección en la estría medular.* ***F****: máxima degeneración observada a 7 días.* ***G****: leve degeneración y comienzo de la recuperación a 15 días.* ***H****: estría medular completamente recuperada 30 días tras la inyección de neuraminidasa.* ***PC****: plexos coroideos,* ***EM****: estría medular,* ***Ep****: epéndimo,* ***Flechas****: degeneración.*

A los 3 meses de la inyección, algunas regiones afectadas por la degeneración pudieron ser reconocidas como tales debido a su menor afinidad por la eosina (fig. R-32 A y B). Estas áreas mostraron, además, un mayor número de células IBA1+ con morfología ramificada (fig. R-32 C y D).

Trabajos previos de otros autores constataron que el epitelio ependimario no regenera en este modelo experimental (Grondona y col., 1996; Gomez-Roldan y col., 2008). Estos mismos autores describieron la formación de una cicatriz glial en el lugar que ocupaba dicho epitelio (fig. R-32 F). Los resultados del presente trabajo coinciden con estos hechos, comprobándose que la regeneración del epéndimo no ocurre a ningún tiempo posinyección estudiado y que las cicatrices gliales persistieron a lo largo de, al menos, 6 meses posinyección.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

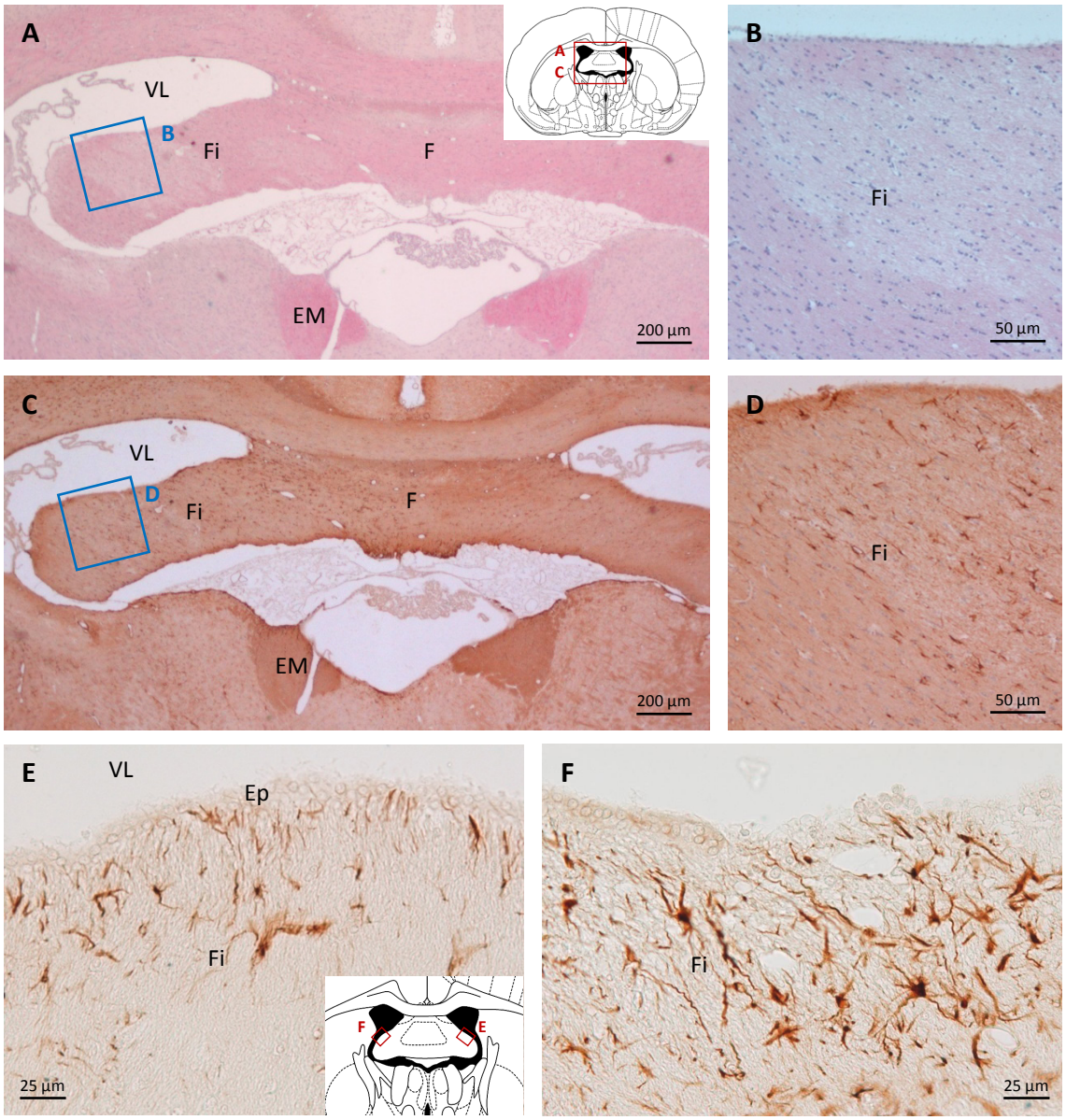


Figura R-32. Recuperación de zonas degeneradas y gliosis subependimaria. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor procedentes de ratas inyectadas con neuraminidasa.* ***A:*** *corte coronal a nivel del agujero de Monro. Rata sacrificada 3 meses posinyección. Hematoxilina-eosina. Se observa una región menos eosinófila en la fimbria ipsilateral, pero exenta de signos de degeneración.* ***B:*** *detalle de la fimbria, la región recuperada muestra decoloración.* ***C:*** *inmunohistoquímica con anti-IBA1 del corte seguido al de la imagen A.* ***D:*** *detalle de la fimbria, las regiones recuperadas muestran células con mayor expresión de IBA1.* ***E*** *y* ***F****: inmunohistoquímica con anti-GFAP en corte de rata sacrificada 7 días posinyección. Detalle de la fimbria del ventrículo contralateral* ***(E)*** *y el inyectado* ***(F)*** *mostrando gliosis subependimaria.* ***PC****: plexos coroideos,* ***F****: fórnix,* ***Fi****: fimbria,* ***EM****: estría medular,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.1.2 Estudio a microscopía electrónica

Se realizó un estudio ultraestructural de las regiones afectadas por la degeneración vacuolar con el fin de estudiar su naturaleza. Para ello se obtuvieron muestras de la estría medular de cinco ratas (dos controles no inyectadas y tres sacrificadas 7 días posinyección de NA). Estas muestras se procesaron para su corte en ultramicrotomo (epígrafe 3.5.1.4) y la obtención de cortes semifinos (1 µm) y ultrafinos (aprox. 60 nm).

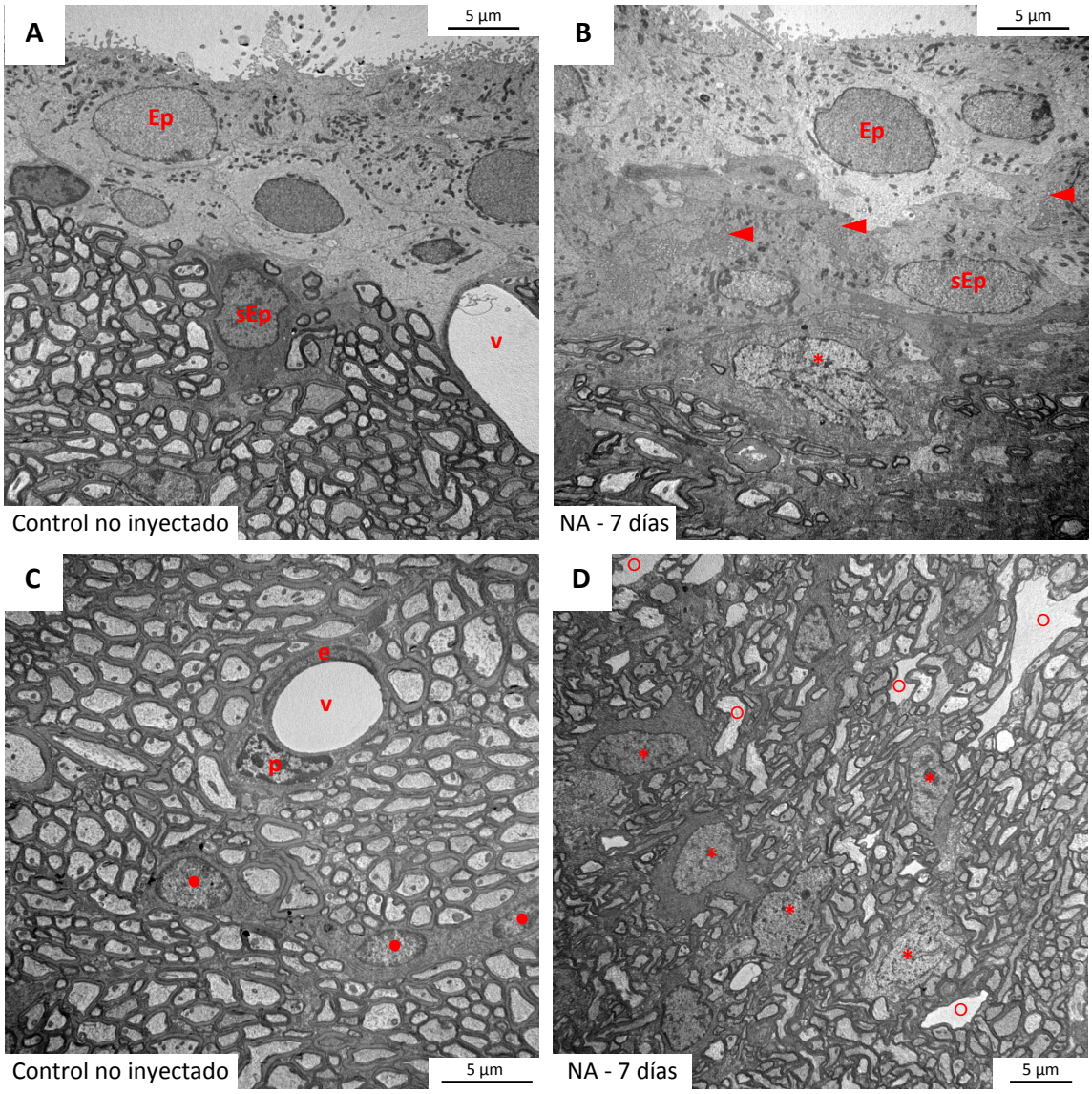


Figura R-33. Degeneración de tractos mielínicos a microscopía electrónica de transmisión I. *Cortes ultrafinos de aprox. 60 nm de espesor.* ***A*** *y* ***C:*** *cortes procedentes de una rata control no inyectada.* ***B*** *y* ***D:*** *cortes procedentes de una rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección. El epéndimo colindante con la estría medular aparece más electroclaro y con menor número de diferenciaciones apicales (microvellosidades). Las células subependimarias, por el contrario, aparecen más electodensas, y llamativamente con muchos quistes celulares repletos de microvellosidades (****cabezas de flecha****). En el tracto de la rata control (****C****) se observan diferentes tipos celulares (****puntos rojos****) que deben corresponderse con cadenas de oligodendrocitos, astrocitos y microglía, junto con células endoteliales de los vasos y pericitos. Además de estas, se observan en el subepéndimo y el tracto de ratas inyectadas numerosas células con núcleos lobulados (********) cerca de las figuras mielínicas irregulares, posiblemente microglía activada o macrófagos. El tracto del animal inyectado (****D****) presenta numerosas alteraciones en los haces nerviosos (****círculos rojos****) que aparecen como huecos electroclaros dispersos e irregulares. En contraste, los haces de la estría medular control (****C****) carecen de dicho huecos y se muestran regulares y homogéneamente empaquetados.* ***Ep****: epéndimo,* ***sEp****: subepéndimo,* ***e****: célula endotelial,* ***p****: pericito,* ***v****: vaso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las observaciones a microscopia electrónica de transmisión permitieron comprobar que los agujeros observados en los tractos mielínicos mediante las técnicas histológicas convencionales se correspondían con alteraciones en las vainas de mielina (fig. R-33 D). El epitelio ependimario que separa la estría medular del ventrículo en las inmediaciones del agujero de Monro sufría evidentes modificaciones. Estas células aparecían menos electrodensas que las del control y con un menor número de diferenciaciones apicales. También fueron frecuentes los quistes celulares, especialmente patentes en las células subependimarias (cabezas de flecha en fig. R-33 B), en los que se apreciaban numerosas microvellosidades. La naturaleza de las células subependimarias observadas es muy discutible. Podría tratarse de células microgliales propias del tracto o el subepéndimo, o bien células procedentes del ventrículo que penetraron a través del epitelio ependimario. Muchas de las células observadas, tanto en los controles y como en los animales tratados, deben corresponderse con cadenas de oligodendrocitos (punto rojo en fig. R-33 C). Otras deben corresponder con astrocitos y con las células macrofágicas (incluida microglía). Los perfiles celulares compatibles con la actividad macrofágica fueron frecuentes en los tractos de animales inyectados (asterisco en fig. R-33 B y D).

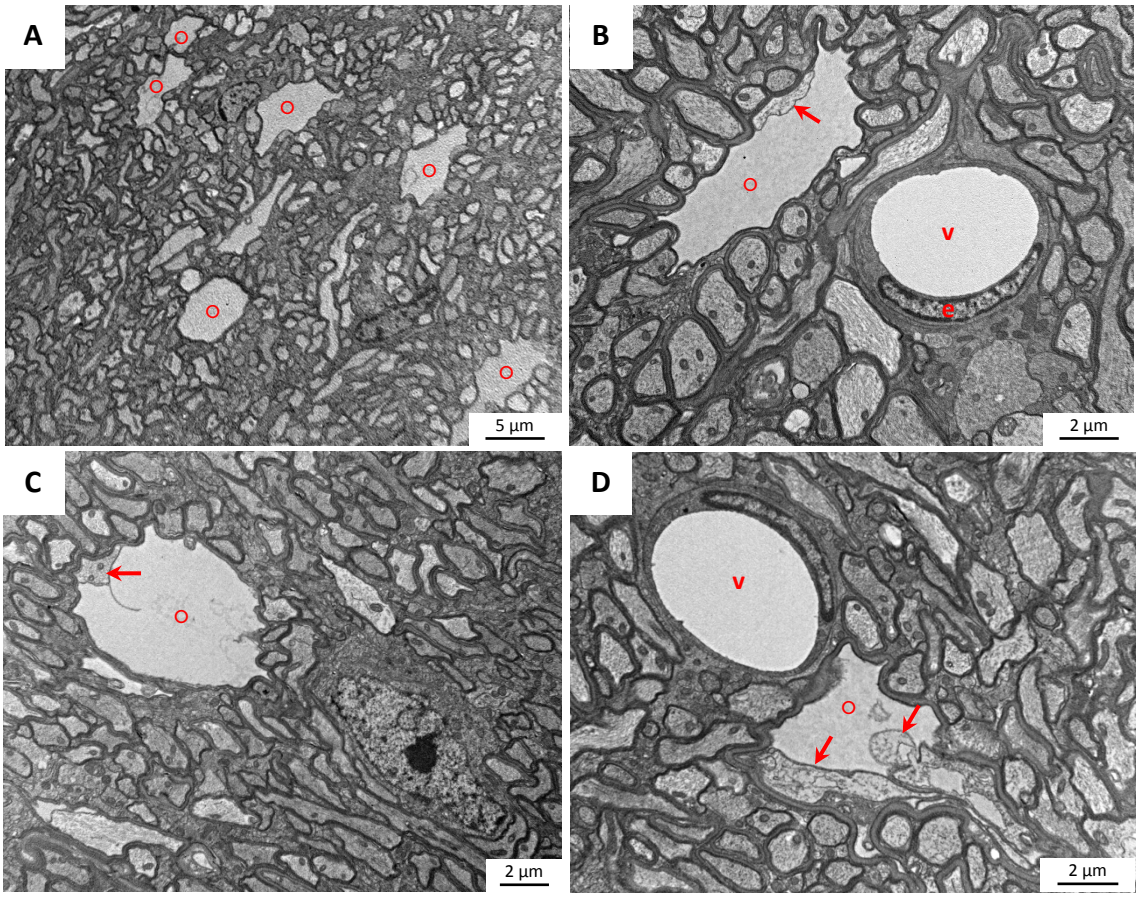


Figura R-34. Degeneración de tractos mielínicos a microscopía electrónica de transmisión II. *Cortes ultrafinos de aprox. 60 nm de espesor, procedentes de ratas inyectadas con NA y sacrificadas 7 días posinyección.* ***A****: desorganización de los haces mielínicos de la estría medular.* ***B****,* ***C*** *y* ***D****: detalle de regiones degeneradas. En el interior de la mayoría de los espacios o huecos (****círculos rojos****) observados en los tractos se pudieron encontrar estructuras axónicas (****flechas****).* ***e****: célula endotelial,* ***v****: vaso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cuando se compararon los tractos nerviosos en las distintas muestras, se observó que frente a la uniformidad y regularidad en el perfil de los haces mielínicos del animal control (fig. R-33 C), el animal inyectado mostraba numerosas fibras dilatadas, con una forma irregular en el corte transversal, además de numerosos huecos que sugerían la degeneración de las capas de mielina (fig. R-33 D). El interior de dichos espacios dilatados mostraba una menor electrodensidad y en muchos casos se observó el perfil de lo que debía ser el axón al que rodeaba la mielina (fig. R-34 B, C y D).

4.2.2 Análisis inmunohistoquímico de la degeneración en tractos mielínicos

Con el fin de cuantificar el efecto degenerativo observado en los tractos mielínicos de animales inyectados con NA, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para el marcaje de la proteína básica de la mielina (MBP) y el factor de transcripción 2 de oligodendrocitos (Olig2).

4.2.2.1 Inmunohistoquímica con anti-MBP

Para marcar la mielina del tejido se utilizó un anticuerpo contra la proteína básica de la mielina (MBP), péptido esencial en el desarrollo y la estabilidad de la mielina madura en el SNC, y que se presenta de forma homogénea en las capas mielínicas (Readhead y col., 1990).

En animales inyectados con NA se observó la ausencia de MBP en las regiones degeneradas de los haces mielínicos afectados. Este hecho se constató en varios tractos nerviosos del lado cerebral inyectado, como la estría medular (fig. R-35 B), la fimbria (fig. R-35 A) o el quiasma óptico (fig. R-35 D). Los tractos mielínicos del lado contralateral permanecieron inalterados, aunque, en algunos casos, se detectó cierta degeneración en la estría medular contralateral.

Esta tinción inmunohistoquímica nos permitió realizar una cuantificación del área inmunorreactiva en la degeneración, midiendo la disminución del área MBP+ en el seno de una región de tractos mielínicos cercana al ventrículo inyectado (estría medular ipsilateral) y otra alejada de este (la mitad ipsilateral del quiasma óptico).

Como puede observarse en la fig. R-36, a partir del segundo día tras la inyección de NA, el porcentaje de área positiva a MBP (área MBP+ / área total fotografiada × 100) tendió a disminuir en las dos regiones estudiadas. A los 7 días de la inyección, el área MBP+ fue significativamente menor a la del control 0 días, alcanzándose el menor porcentaje obtenido en los tiempos estudiados, tanto en la estría medular como en el quiasma óptico. A los 15 días, el análisis mostró una recuperación total del nivel de áreas positivas a MBP, siendo los valores similares a los tiempos iniciales a partir de aquí en adelante.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

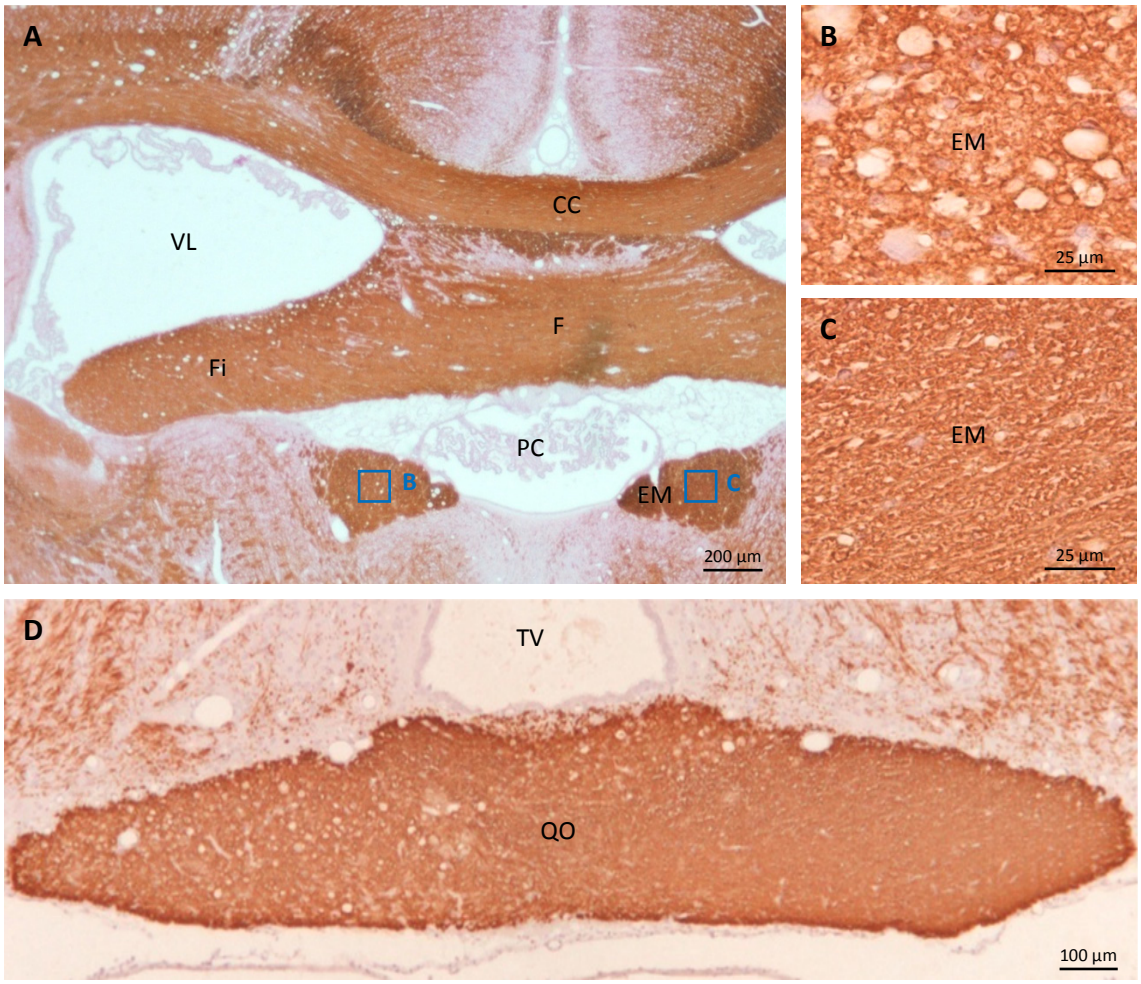
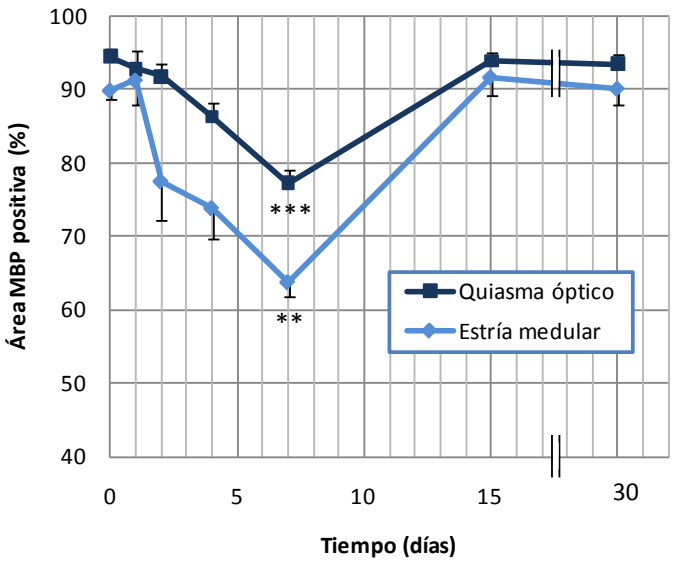


Figura R-35. Tinción inmunohistoquímica con anti-MBP. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección.* ***A:*** *corte coronal a nivel del agujero de Monro. Se observa degeneración en fimbria, estría medular y cuerpo calloso del lado inyectado.* ***B:*** *detalle de la estría medular del lado inyectado.* ***C:*** *detalle de la estría medular del lado contralateral.* ***D:*** *región del quiasma óptico. Degeneración de la mitad correspondiente al lado inyectado.* ***PC****: plexos coroideos,* ***F****: fórnix,* ***Fi****: fimbria,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***EM****: estría medular,* ***CC****: cuerpo calloso,* ***QO****: quiasma óptico.*

Figura R-36. Variación del área MBP+ en los tractos mielínicos afectados. *Análisis a lo largo del tiempo en quiasma óptico y estría medular del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Los puntos representan la media ± SEM. Para cada región, los diferentes tiempos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (Estría medular:* $F_{(c,2n)}$ = мнїнро, *P < 0,05; Quiasma óptico:* $F_{(c,2л)}$ = мо∑mсл, *P < 0,05) y un análisis post-hoc de Tukey. (**) = P < 0,01; (***) = P < 0,001 vs. grupo 0 h.*



Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.2.2.2 Inmunohistoquímica con anti-Olig2

El factor de transcripción 2 de oligodendrocitos (Olig2) es una proteína implicada en la diferenciación de las motoneuronas y de los oligodendrocitos. Es comúnmente empleado como marcador de esta última población celular (Ligon y col., 2004). Así, la inmunohistoquímica con anti-Olig2 tuvo como objetivo marcar el núcleo de los oligodendrocitos en las regiones afectadas por la degeneración. A microscopía óptica no se apreciaron diferencias entre el número de oligodendrocitos marcados en las regiones degeneradas del hemisferio inyectado con respecto a las regiones equivalentes del hemisferio contralateral (fig. R-37).

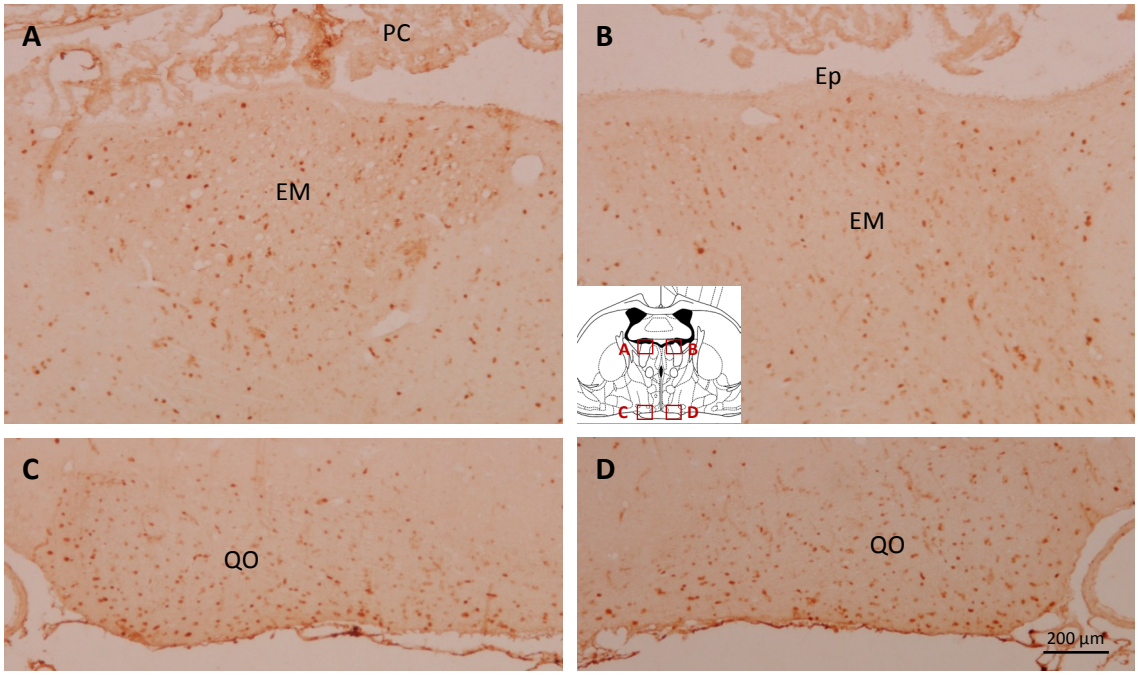


Figura R-37. Tinción inmunohistoquímica con anti-Olig2*. Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de una rata inyectada y sacrificada 7 días posinyección.* ***A:*** *estría medular del lado inyectado. No se aprecian diferencias en el número de núcleos Olig2+ respecto al lado no inyectado (****B****).* ***C:*** *quiasma óptico del lado inyectado. Tampoco aquí se aprecia un menor número de núcleos Olig2+ respecto al lado contralateral (****D****).* ***PC****: plexos coroideos,* ***EM****: estría medular,* ***QO****: quiasma óptico,* ***Ep****: epéndimo.*

Los recuentos llevados a cabo en la estría medular y en el quiasma óptico del lado inyectado no mostraron variaciones significativas en el número de núcleos Olig2+ por área total de recuento a lo largo del tiempo, sin embargo, sí se detectó un aumento significativo de los núcleos positivos en relación al área MBP+ en las regiones afectadas a los 7 días (no mostrado). Esto sería un reflejo de la disminución del área positiva a este marcador, y apoya la idea de que la pérdida de mielina no parece ir acompañada de pérdida celular.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

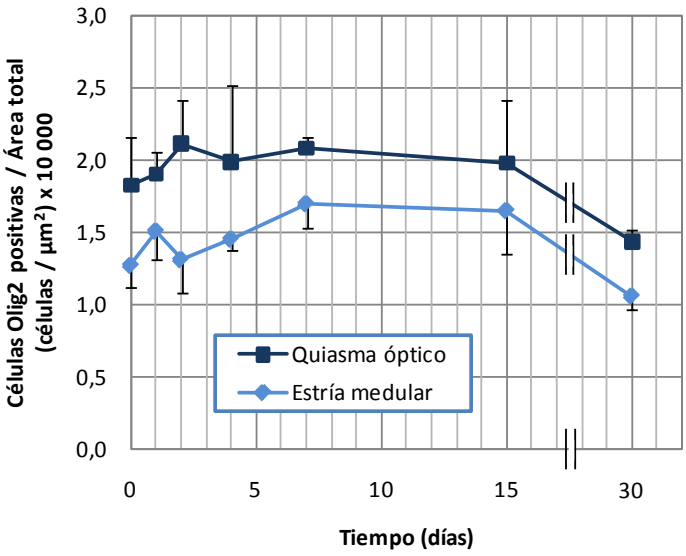


Figura R-38. Variación del número de células Olig2+ respecto al área total de recuento. *Evolución de la relación respecto al tiempo en quiasma óptico y estría medular del cerebro de ratas inyectadas con neuraminidasa. Los puntos representan la media ± SEM. Para cada región, los diferentes tiempos se compararon mediante ANOVA de un factor (Estría medular: $F_{(6,20)} = 1,480$, $P < 0,05$; Quiasma óptico: $F_{(6,20)} = 0,518$, $P < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas.*

4.2.3 Análisis de muerte celular en los tractos mielínicos afectados

Sirviéndonos de tinciones generales e inmunohistoquímicas, se intentó detectar los fenómenos necróticos y/o apoptóticos que pudieran estar relacionados con la degeneración vacuolar observada, tanto en los tractos afectados como en los núcleos neuronales de origen y destino. Concretamente se usaron la tinción con Fluoro-Jade B y la inmunohistoquímica contra caspasa 3.

4.2.3.1 Marcaje con Fluoro-Jade B

El Fluoro-Jade B es un derivado de la fluoresceína que muestra la propiedad de unirse específicamente a neuronas en degeneración, aunque no distingue entre el proceso de necrosis y apoptosis (epígrafe 3.5.3.3).

Esta tinción histoquímica se realizó sobre cortes histológicos procedentes de ratas inyectadas con NA y sacrificadas a tiempos 4 h, 12 h, 24 h, 7 y 15 días (sólo imágenes de 12 h y 7 días se muestran en la fig. R-39). Como control positivo a la tinción se usaron las neuronas dañadas mecánicamente por acción de la inyección ICV en la corteza frontal dorsal al ventrículo inyectado (fig. R-39 A). A parte de estas, ninguna neurona en degeneración fue detectada en los tiempos analizados, en ninguna de las regiones estudiadas, que incluyeron, además de los tractos mielínicos típicamente afectados por la degeneración (fig. R-39 D-G), aquellos núcleos y regiones cerebrales aferentes o eferentes a dichos tractos, como la habénula o el hipocampo (fig. R-39 B y C).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

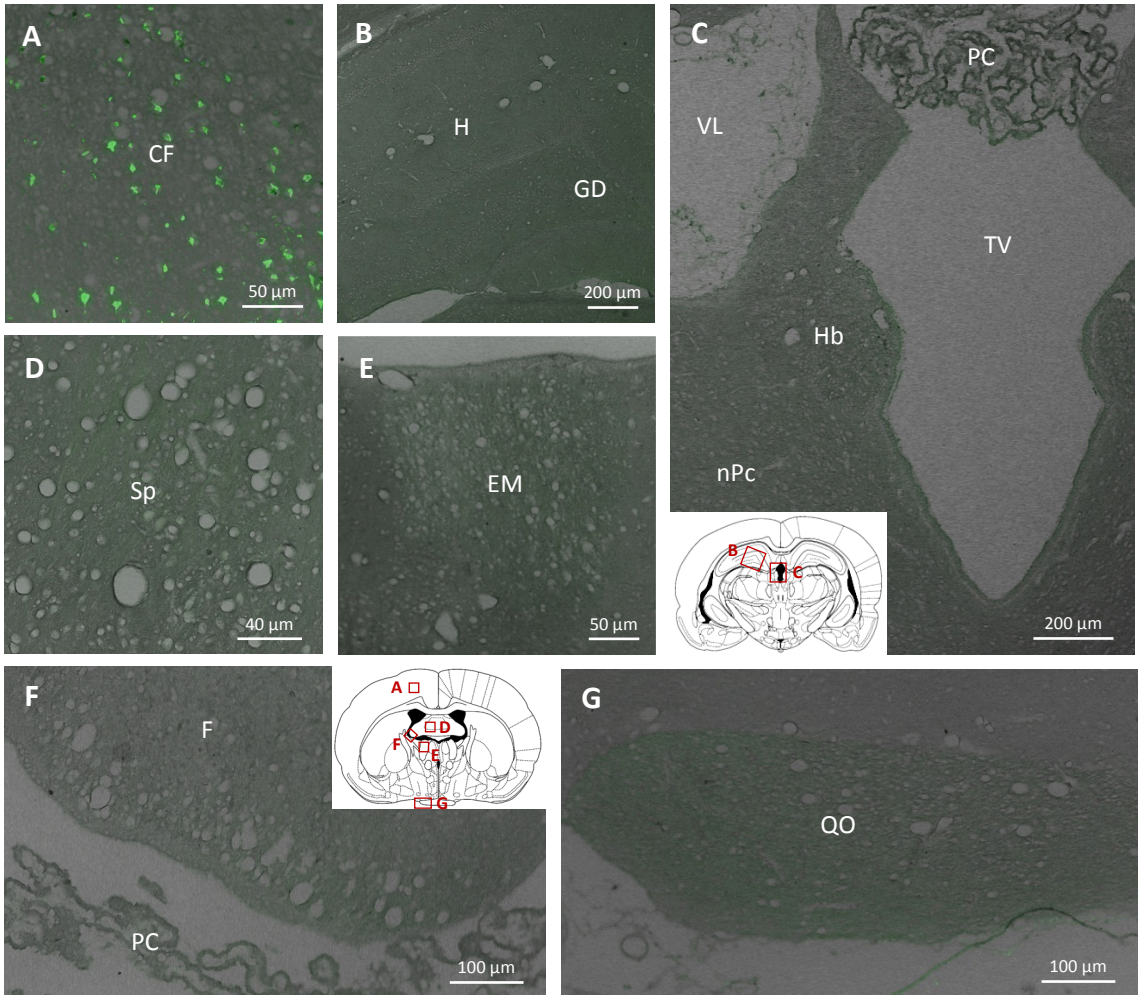


Figura R-39. Detección de degeneración neuronal mediante Fluoro-Jade B*. Cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas y sacrificadas 12 h (A, B y C) y 7 días (D, E, F y G) posinyección.* ***A:*** *somas neuronales positivos a la tinción con Fluoro-Jade B en la región del córtex dañada por la cánula de la inyección sirvieron como control positivo. Ninguna otra región estudiada mostró células positivas a la tinción.* ***B:*** *hipocampo del lado inyectado.* ***C:*** *región caudal del tercer ventrículo. Se observa la habénula del lado inyectado.* ***D:*** *degeneración en la región central del séptum.* ***E:*** *estría medular del lado inyectado.* ***F:*** *fórnix con degeneración en el lado inyectado.* ***G:*** *quiasma óptico del lado inyectado.* ***PC****: plexos coroideos,* ***Sp****: séptum,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***EM****: estría medular,* ***QO****: quiasma óptico,* ***CF****: corteza frontal,* ***TV****: tercer ventrículo,* ***GD****: giro dentado,* ***F****: fórnix,* ***H****: hipocampo,* ***Hb****: habénula,* ***nPc****: núcleo precomisural.*

4.2.3.2 Inmunohistoquímica con anti-CASP3

La caspasa 3 es una proteasa involucrada en la vía apoptótica cuya expresión aumenta en las células que comienzan dicho proceso (Vakkala y col., 1999). El anticuerpo anti-CASP3 se utilizó para poner de manifiesto células apoptóticas en las regiones estudiadas. Dicha tinción se realizó sobre cortes histológicos procedentes de ratas inyectadas con NA y sacrificadas a tiempos 0 h, 2 h, 4 h y 7 días (sólo imágenes de 2 h y 7 días se muestran en la fig. R-40). Como control positivo a la tinción se usaron cortes de amígdala palatina de rata en la cual se ha descrito la expresión constitutiva de este marcador (fig. R-40 recuadro en B). Células CASP3+ fueron encontradas en el subependimo de ratas inyectadas y

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

no inyectadas. Estas correspondían a un proceso normal de apoptosis que tiene lugar en algunas de las células derivadas de la zona neurogénica subventricular. A parte de estas, ninguna otra célula CASP3+ fue detectada en los tiempos analizados, en ninguna de las regiones estudiadas, que incluyeron el epitelio ependimario dañado del ventrículo inyectado (fig. R-40 C) y los tractos mielínicos típicamente afectados por la degeneración, como la estría medular (fig. R-40 D).

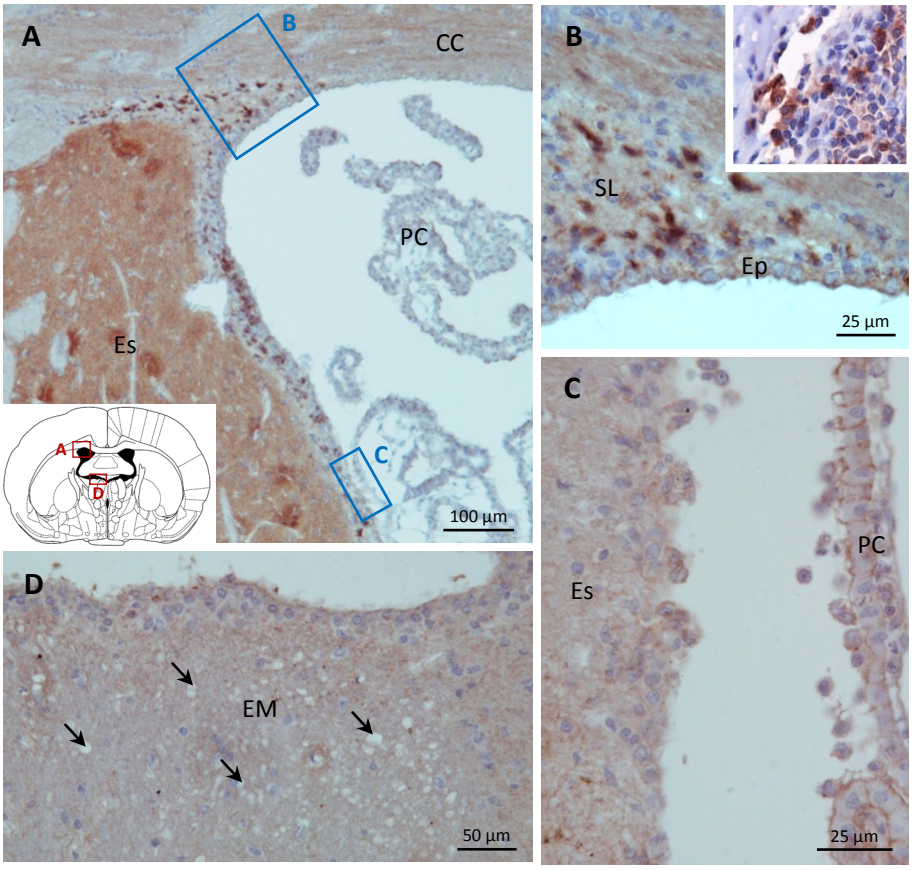


Figura R-40. Detección de procesos apoptóticos mediante anti-CASP3*. Cortes PFA-parafina de 7 µm de espesor, procedentes de ratas inyectadas y sacrificadas 2 h (A, B y C) y 7 días (D) posinyección.* ***A:*** *región dorsal de la pared estriatal del ventrículo lateral inyectado. Se observan células CASP3+ en el subepéndimo, del mismo modo que en los controles no inyectados.* ***B:*** *detalle del surco lateral dorsal del ventrículo lateral inyectado. Células CASP3+ formando parte de la corriente rostral migratoria.* ***Recuadro:*** *control positivo. Células positivas para caspasa 3 en la amígdala palatina.* ***C:*** *ausencia de marcaje CASP3+ en el epéndimo dañado de la pared estriatal del ventrículo inyectado.* ***D:*** *ausencia de marcaje CASP3+ en regiones degeneradas en la estría medular ipsilateral.* ***SL****: surco lateral dorsal del ventrículo lateral,* ***PC****: plexos coroideos,* ***Ep****: epéndimo,* ***Es****: estriado,* ***CC****: cuerpo calloso,* ***EM****: estría medular,* ***flechas****: degeneración vacuolar de la mielina.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3 IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LOS EVENTOS PROVOCADOS POR LA INYECCIÓN DE NEURAMINIDASA

Estudiar el grado de implicación que el sistema del complemento pudiera estar teniendo en la muerte del epitelio ependimario provocado por la inyección de NA en el ventrículo lateral fue uno de los principales objetivos de la presente Tesis Doctoral.

Como ya se vio en introducción, son muchos los resultados previos que apoyan esta hipótesis, entre ellos, la presencia constitutiva de los factores del complemento en el LCR, su expresión por parte de las células del SNC, el papel regulador del ácido siálico o la capacidad de la NA para activar al sistema del complemento humano *in vitro* (epígrafe 2.2). Por ello, se diseñaron varios experimentos con el fin de esclarecer el papel del sistema del complemento en nuestro modelo de destrucción ependimaria por NA en ratas.

4.3.1 Presencia de MAC sobre el epéndimo de ratas inyectadas con neuraminidasa

Demostrar que el sistema del complemento estuviese implicado en la muerte del epitelio ependimario requería la búsqueda del efector de esta necrosis sobre los ependimocitos: el complejo de ataque a la membrana (MAC) o complejo C5b-9.

Como ya se ha descrito, este complejo está formado por los factores C5b, C6, C7, C8 y varias unidades de C9. Su detección inmunohistoquímica suele realizarse mediante anticuerpos que reconocen: 1) un epítopo del complejo C5b-9, el cual se origina del ensamblaje de dichos factores y que no existe en los factores individuales, o 2) un epítopo en C9, el cual está situado en el polímero que conforma el poro transmembranal.

Así, con el objetivo de detectar los MAC del complemento se usaron dos anticuerpos: uno contra el complejo C5b-9, y otro dirigido contra los factores C9 que polimerizan para formar el poro en dicho complejo (Podack y col., 1982).

4.3.1.1 Detección inmunohistoquímica de C5b-9 en el epéndimo

La tinción inmunohistoquímica con anti-C5b-9 reveló una marca positiva en el citoplasma apical y la membrana de un gran número de células ependimarias del ventrículo inyectado de ratas sacrificada 2 h tras la inyección de NA (fig. R-41 A), tanto en la pared estriatal como en la septal. Esta marca se detectó en células con aspecto irregular que parecían desprenderse de la pared ependimaria (fig. R-41 C y E). Ninguna célula ependimaria del ventrículo contralateral (no inyectado) mostró un marcaje semejante (fig. R-41 B), apareciendo siempre como un epitelio continuo cuyas células se mantuvieron unidas y sus cilios permanecieron inalterados (fig. R-41 D y F).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

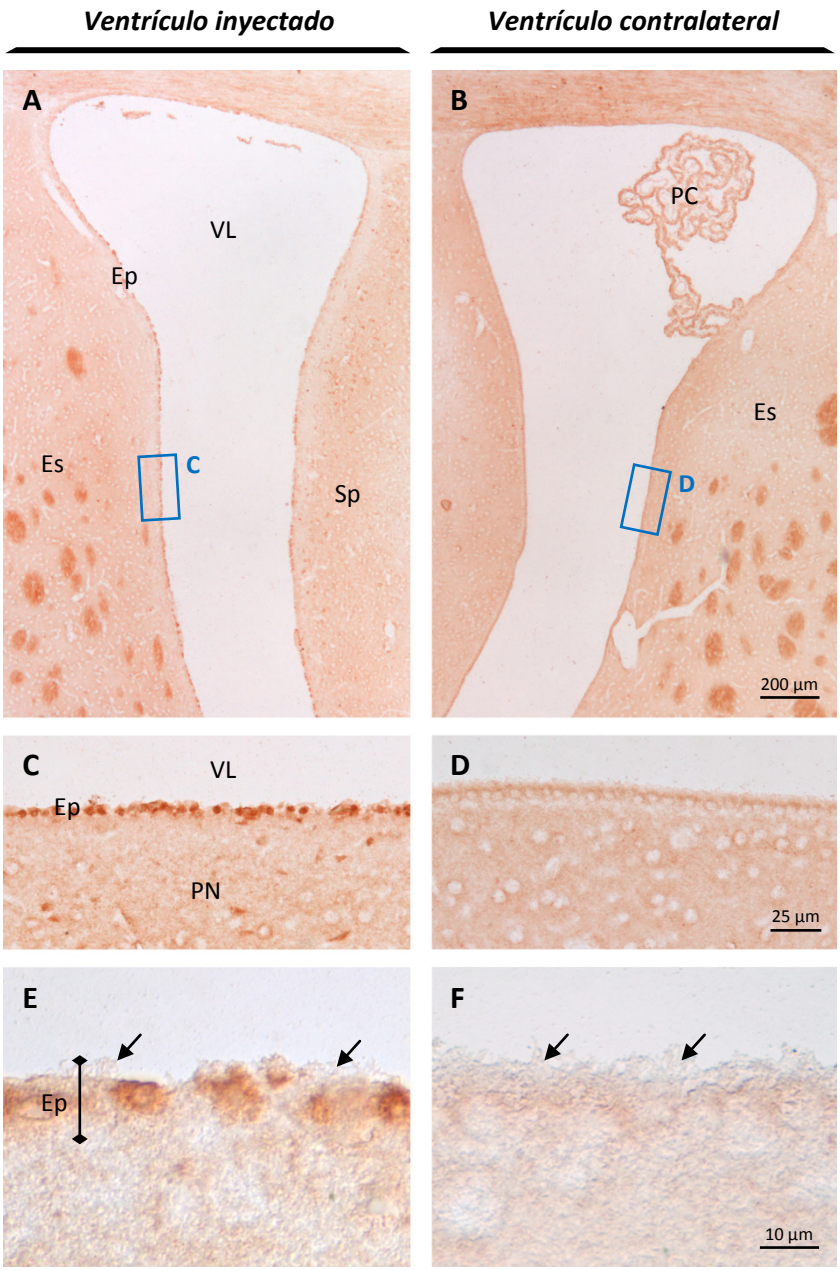


Figura R-41. Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas inyectadas con neuraminidasa. *Cortes Bouin-parafina de 10 µm de espesor procedentes de una rata inyectada con neuraminidasa y sacrificada 2 h posinyección. Tinción inmunohistoquímica con anti-C5b-9.* ***A*** *y* ***B****: ventrículos inyectado y contralateral respectivamente.* ***C*** *y* ***D****: respectivos detalles de la pared ventricular. Se observa marca C5b-9+ en la superficie del epitelio ependimario del ventrículo inyectado.* ***E*** *y* ***F****: respectivos detalles del epitelio ependimario. Células ependimarias C5b-9+ en el ventrículo inyectado.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***PC****: plexos coroideos,* ***Es****: estriado,* ***Sp****: séptum,* ***flechas****: cilios.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3.1.2 Detección inmunohistoquímica de C9 en el epéndimo

Otra manera de comprobar la presencia de MAC sobre la superficie celular fue buscar los complejos del factor C9 que conforman el poro transmembranal del complejo de ataque.

Para ello se utilizó un anticuerpo anti-C9 desarrollado por el laboratorio del profesor Paul Morgan en Cardiff, puesto a punto para su uso en inmunohistoquímica de fluorescencia de cortes en criostato (fig. R-42). Dichos cortes se obtuvieron de nueve animales (tres no inyectados, tres inyectados con NA y sacrificados 0 h posinyección, y tres sacrificados 2 h posinyección) tal como se explica en el epígrafe 3.5.1.3.

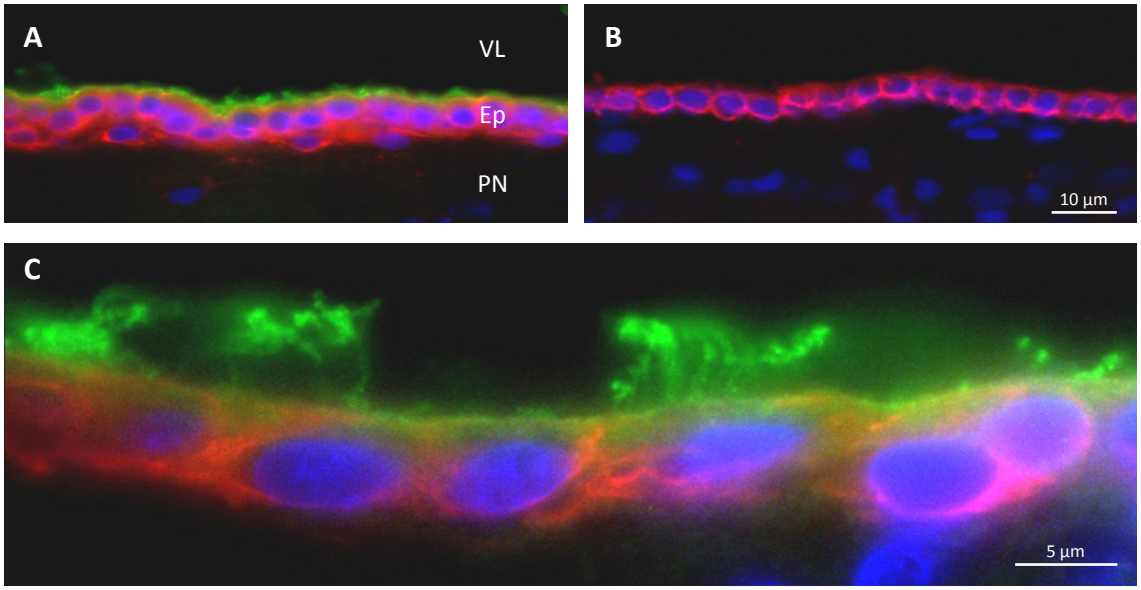


Figura R-42. Detección de C9 sobre el epitelio ependimario de ratas inyectadas con neuraminidasa. *Cortes de criostato de 10 µm de espesor procedentes de ratas inyectadas y sacrificadas 2 h posinyección. Inmunohistoquímica doble de fluorescencia con anti-C9 (verde), anti-vimentina (rojo) y marcaje nuclear mediante DAPI (azul).* ***A:*** *epitelio ependimario del ventrículo inyectado. Depósitos de C9 en la superficie.* ***B:*** *epitelio ependimario del ventrículo contralateral. Ausencia de marcaje C9+.* ***C:*** *detalle del epitelio ependimario del ventrículo inyectado. Se observa la marca C9+ en la superficie ependimaria y los cilios.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Mediante este anticuerpo se pudo observar un depósito de proteínas C9 localizado en la superficie ependimaria del ventrículo lateral inyectado con NA en ratas sacrificadas 2 h posinyección (fig. R-42 A y C). Dicha marca no se encontró en el ventrículo contralateral (fig. R-42 B) ni en animales controles no inyectados.

4.3.2 Activación del sistema del complemento por neuraminidasa

Se quiso comprobar si el enzima NA era capaz por sí misma de activar el sistema del complemento directamente y no sólo a través de la desialización de las superficies celulares. Para ello se realizaron varios experimentos *in vitro*: ensayos hemolíticos para analizar la actividad postratamiento, es decir, la pérdida de actividad de los factores del complemento una vez que han sido activados por NA.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

También se analizó la formación de complejos terminales del complemento en muestras tratadas con NA mediante ELISA de captura, y por último, se recurrió a pruebas más sensibles, como la detección de fragmentos de C3 activados mediante *Western blot*.

4.3.2.1 Análisis de la actividad del complemento mediante ensayos hemolíticos

Con el fin de comprobar si el enzima NA de *Clostridium perfringens* era capaz de activar el sistema del complemento presente en muestras de LCR de rata, se diseñaron varios experimentos en los que se comprobaría la ausencia de actividad hemolítica en muestras de suero y LCR que fueron previamente incubadas con el enzima. Si la NA tuviese la capacidad de activar al sistema del complemento, dichas muestras perderían la capacidad hemolítica por activación y desactivación posterior de los factores (epígrafe 3.3).

4.3.2.1.1 Ensayo hemolítico de difusión radial en gel

La primera prueba realizada fue un ensayo hemolítico de difusión radial en gel.

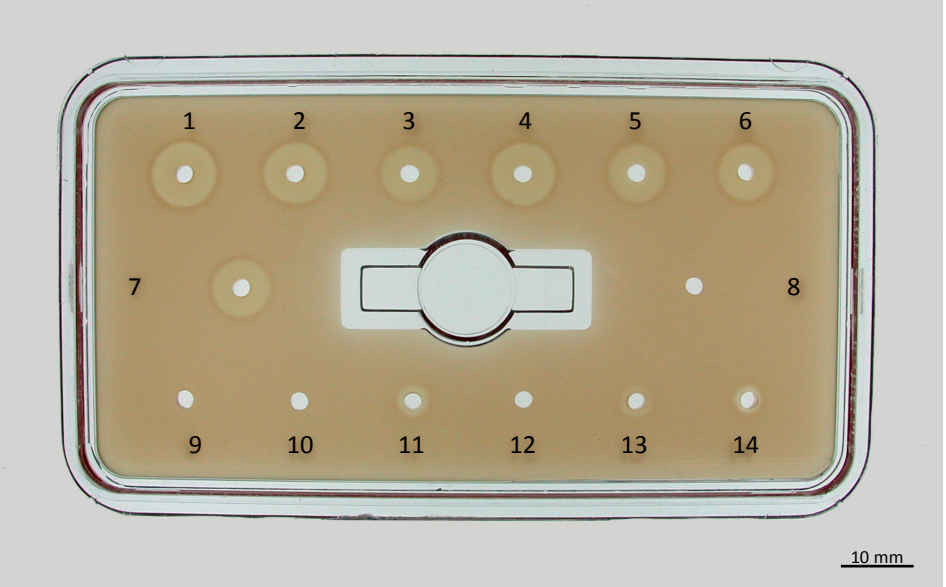


Figura R-43. Placa de hemólisis por difusión radial tras el periodo de lisis. *Pocillos: **1**: patrón 100%, **2**: patrón 50%, **3**: patrón 25%, **4**: control positivo, **5**: control positivo dil. 1/2, **6**: control positivo dil. 1/2, 37 °C, **7**: control positivo dil. 1/2, 37 °C, incubado con NA, **8**: LCR de rata no tratado, **9**: LCR de rata incubado con NA, **10**: LCR humano 1 no tratado, **11**: LCR humano 1 incubado con NA, **12**: LCR humano 2 no tratado, **13**: LCR humano 2 incubado con NA, **14**: control de NA.*

En los pocillos correspondientes a la recta patrón y a los controles positivos (suero humano) incubados en distintas situaciones, se obtuvo un claro halo de lisis (pocillos 1 al 7, fig. R-43). Respecto a

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

los experimentales con LCR, tan sólo los pocillos 11 y 13 mostraron un pequeño halo de glóbulos rojos lisados. El control de NA (pocillo 14) también mostró un pequeño halo de lisis.

El rango de sensibilidad del kit se comprendía entre los valores obtenidos en las muestras que conforman la recta patrón. Estos valores, que representan el intervalo 25% - 100% de actividad hemolítica (fig. R-44), correspondieron al rango 8,4 – 9,5 mm de halo.

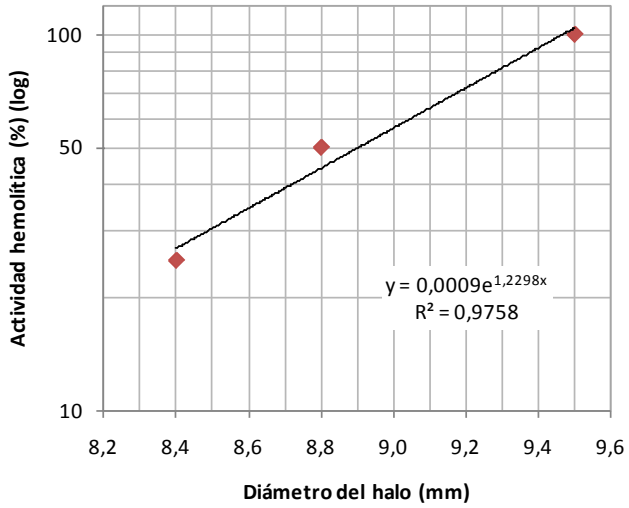


Figura R-44. Recta patrón para actividad hemolítica vs. diámetro de halo. *Línea de ajuste exponencial para los datos patrón obtenidos (pocillos 1, 2 y 3). Representación en escala logarítmica.*

Exceptuando los pocillos patrón, sólo las muestras de los pocillos 4, 5 y 7 quedaron dentro del rango de sensibilidad de la prueba (tabla R-01), siendo los valores restantes inferiores al 25% de actividad, es decir, halo de menos de 8,4 mm de diámetro. Por tanto, el porcentaje de actividad obtenido para estas muestras corresponde a una extrapolación en la recta. Los valores de actividad en porcentaje de los pocillos 4, 5 y 7 se calcularon mediante la interpolación en la recta patrón.

Para la correcta interpretación de este diseño experimental se debe tener en cuenta que algunas de las muestras analizadas se sometieron a: 1) dilución: puesto que se tuvo que mezclar la muestra con un volumen de solución de NA; y 2) calentamiento: las muestras debieron ser preincubadas a 37 °C durante 30 min, temperatura de actividad óptima de la NA. Por esta razón, al control positivo de suero humano suministrado junto con la placa de hemólisis se le sumaron controles de dilución y calentamiento, así como un control de la actividad propia de la NA sin participación del complemento.

El control positivo usado sin diluir (pocillo 4) dio lugar a un halo de lisis correspondiente a un 92,6% de actividad, dentro del rango esperado, de lo que se deduce que la realización del ensayo fue correcta y las muestras no perdieron actividad durante su manipulación.

El control de dilución realizado con suero humano control (pocillo 5) dio lugar a un grado de actividad acorde con lo esperado (disminución semejante a la obtenida en el patrón con actividad 50%), de lo que podemos deducir que las diluciones 1/2 afectaron de forma homogénea y controlada a la actividad de las muestras.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Pocillo	Finalidad / Muestra	Diámetro del halo (mm)	Actividad (% respecto al patrón en ajuste exponencial)
1	*Patrón (actividad 100%)*	***9,5***	*106,7*
2	*Patrón (actividad 50%)*	***8,8***	*45,1*
3	*Patrón (actividad 25%)*	***8,4***	*27,6*
4	*Control positivo (suero humano)*	***9,4***	*94,3*
5	*Control positivo dil. 1/2*	***8,4***	*27,6*
6	*Control positivo dil. 1/2, 37 °C*	***8,2***	*21,6**
7	*Control positivo dil. 1/2, 37 °C, NA*	***8,6***	*35,3*
8	*Control (LCR de rata + NaCl)*	***0,0***	*0,0*
9	*Experimental (LCR de rata + NA)*	***0,0***	*0,0*
10	*Control (LCR humano 1 + NaCl)*	***0,0***	*0,0*
11	*Experimental (LCR humano 1 + NA)*	***4,5***	*0,2**
12	*Control (LCR humano 2 + NaCl)*	***0,0***	*0,0*
13	*Experimental (LCR humano 2 + NA)*	***4,5***	*0,2**
14	*Control de neuraminidasa*	***3,5***	*0,1**

Tabla R-01. Resultados del ensayo hemolítico en placa de difusión radial. *Diámetro en mm de los halos de lisis obtenidos en la placa y su correspondiente porcentaje de actividad interpolado en la recta patrón de ajuste exponencial. (*) datos extrapolados (fuera del rango 25-100%).*

Respecto al control de calentamiento a 37 °C realizado con control positivo diluido 1/2 en NaCl 0,9% (pocillo 6), los resultados mostraron una ligera disminución en la actividad hemolítica respecto a la referencia no calentada (pocillo 5, mismas condiciones salvo el calentamiento), de lo que se deduce que el calentamiento de las muestras provoca cierto grado de activación del complemento. Esto era previsible, pues se sabe que los factores del complemento son proteínas de vida media corta y muy sensibles a los aumentos de temperatura.

El control de NA (pocillo 14) mostró un pequeño halo de lisis. Este aparente efecto hemolítico del enzima también se observa en el caso del control positivo incubado con NA (pocillo 7), donde la actividad hemolítica aparece ligeramente aumentada respecto al valor de referencia correspondiente (pocillo 6, mismas condiciones pero sin NA).

Teniendo esto en cuenta y observando ahora los valores obtenidos en los casos experimentales (pocillos 9, 11 y 13), podríamos considerar el valor de actividad obtenido en las muestras de LCR humano + NA (pocillos 11 y 13) como lisis debida en parte a un efecto del enzima, de forma independiente al complemento presente en dichas muestras. La ausencia de lisis obtenida en los pocillos con LCR sin NA (pocillos 8, 10 y 12) corrobora este supuesto. La ausencia de lisis en el pocillo 9 (LCR de rata + NA) podría indicar un efecto protector de esta muestra frente al efecto lítico propio de la

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

NA, pero los resultados observados en otros ensayos hemolíticos realizados hacen pensar más probablemente en un error o variación experimental.

4.3.2.1.2 Ensayo hemolítico mediante glóbulos rojos en suspensión

A la vista de los resultados anteriores, se decidió realizar un ensayo hemolítico más sensible, esta vez utilizando glóbulos rojos en suspensión (epígrafe 3.3.2).

El objetivo de este experimento fue analizar la capacidad de la NA para desencadenar la cascada de activación proteolítica del complemento y de esta manera dejar inactivo el suero o LCR correspondiente, así como corroborar que la desialización celular aumenta la susceptibilidad al ataque del sistema del complemento de rata.

Se utilizaron muestras de suero humano como control positivo, así como suero de rata no tratado. Como control negativo de la lisis se usó suero de ratas $C6^{-/-}$ (que no pueden formar MAC), además de suero normal en el que el complemento había sido previamente activado con zimosan. El valor de lisis total fue calculado mediante agua destilada, y el de lisis mínima o basal mediante el tampón para complemento (TC). Los ensayos se llevaron a cabo sobre glóbulos rojos opsonizados con amboceptor (anticuerpo anti-eritrocitario), glóbulos rojos previamente desializados y glóbulos rojos no tratados.

Los resultados mostraron que el ensayo fue capaz de detectar la actividad del complemento de rata al igual que el de origen humano (fig. R-45 A). El TC y el suero procedente de ratas $C6^{-/-}$ no provocaron lisis eritrocitaria. El suero humano activado con zimosan mostró una actividad hemolítica significativamente menor que el suero humano no tratado (fig. R-45 A).

No se detectó hemólisis bajo ninguna de las condiciones en las que fue utilizado LCR, tanto de origen humano como de rata (fig. R-45 B), lo que indicó falta de sensibilidad del ensayo para este.

La desialización previa de los glóbulos rojos dio lugar a un aumento de la lisis provocada por el tratamiento posterior con suero de rata respecto a los glóbulos rojos no tratados, aunque este efecto fue superado por la opsonización con anticuerpos (fig. R-45 C).

Pudimos observar que el calentamiento previo del suero a 37 °C (con NaCl 0,9%) disminuyó ligeramente su capacidad lítica ante los tres tipos de glóbulos rojos evaluados, sin embargo, esta disminución fue más acusada cuando el calentamiento estuvo acompañado de la presencia de NA en el medio (fig. R-45 D, E y F).

Un ligero aumento de absorbancia fue observado en la dilución 1/2 de los controles que sólo contenían NA (fig. R-45 D, E y F). Este no resultó estadísticamente significativo (análisis estadístico no mostrado en gráficas), pero decidimos realizar un experimento mediante el que detectar más eficazmente si el enzima NA desarrollaba una actividad hemolítica propia a partir de cierta concentración (epígrafe 3.3.3).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

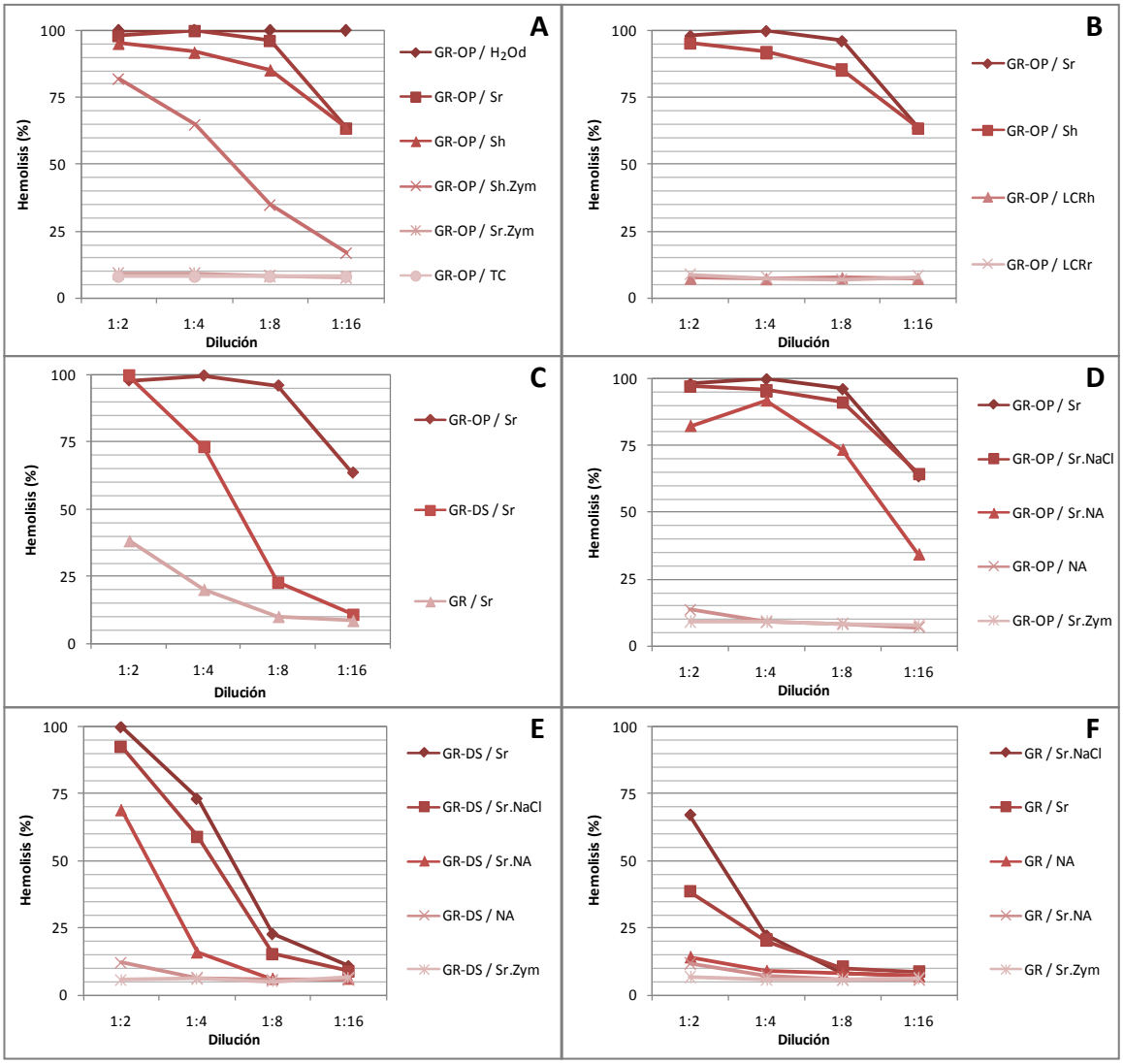


Figura R-45. Actividad hemolítica de sueros y LCR tratados o no con neuraminidasa. *Las gráficas representan el porcentaje de hemólisis respecto a la lisis total (agua destilada) obtenido para distintas diluciones del medio testado. Cada punto representa la media de los datos obtenidos (n=3). El SEM no ha sido representado con el fin de facilitar la visualización de los resultados.* ***A:*** *muestra la hemólisis obtenida por la aplicación de suero humano y de rata sobre glóbulos rojos opsonizados.* ***B:*** *compara la hemólisis obtenida mediante sueros y LCR, tanto de rata como humano.* ***C:*** *compara la hemólisis obtenida con suero de rata (sin tratar) frente a los tres tipos de glóbulos rojos ensayados.* ***D:*** *hemólisis obtenida con suero tratado con NA y sus respectivos controles, sobre glóbulos rojos opsonizados.* ***E:*** *muestra la hemólisis obtenida mediante suero tratado con NA y sus respectivos controles, sobre glóbulos rojos desializados.* ***F:*** *hemólisis obtenida mediante suero tratado con NA y sus respectivos controles, sobre glóbulos rojos no tratados.* ***GR****: glóbulos rojos,* ***OP****: opsonizados,* ***DS****: desializados,* ***Sr****: suero de rata,* ***Sh****: suero humano,* ***LCRr****: LCR de rata,* ***LCRh****: LCR de humano,* ***TC****: tampón para complemento,* ***NaCl****: solución salina,* ***Zym****: zimosan,* ***NA****: neuraminidasa.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

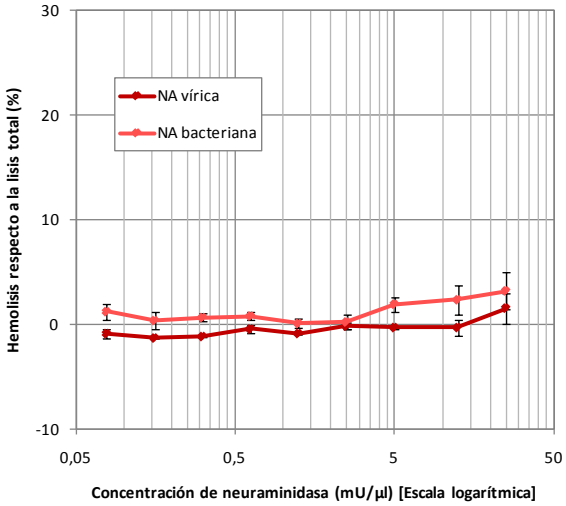


Figura R-46. Hemólisis provocada por neuraminidasa. *Cada punto representa la media ± SEM del porcentaje de hemólisis respecto a la lisis total (agua destilada), obtenido en una muestra de glóbulos rojos tratados con distintas diluciones del enzima. Para cada tipo de neuraminidasa, las diferentes concentraciones fueron comparadas mediante ANOVA de un factor (NA vírica: $F_{(9,29)} = 1,354$, $P < 0,05$; NA bacteriana: $F_{(9,29)} = 0,969$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre las diluciones ni respecto al control negativo (NaCl 0,9%).*

El ensayo hemolítico con diluciones seriadas de NA vírica y bacteriana sobre glóbulos rojos no tratados (sin la participación de anticuerpos ni factores del complemento) mostró la ausencia de hemólisis provocada por estos enzimas actuando en concentraciones comprendidas entre 0,08 y 25 mU/µl (fig. R-46).

De forma paralela a este experimento, se realizó un ensayo (epígrafe 3.4.3) con el objetivo de determinar el efecto citotóxico de distintas concentraciones de NA sobre células ependimarias aisladas en medio de cultivo (fig. R-47). Al igual que en el ensayo con glóbulos rojos, se aplicaron diluciones seriadas de NA vírica y bacteriana a las células ependimarias *in vitro*. La viabilidad celular fue determinada mediante el recuento de células teñidas con el colorante vital azul tripano. Los resultados no mostraron efectos significativos sobre la viabilidad tras 30 min de incubación, aunque sí se apreció una ligera disminución de la viabilidad de las células ependimarias incubadas con altas concentraciones de NA de origen bacteriano.

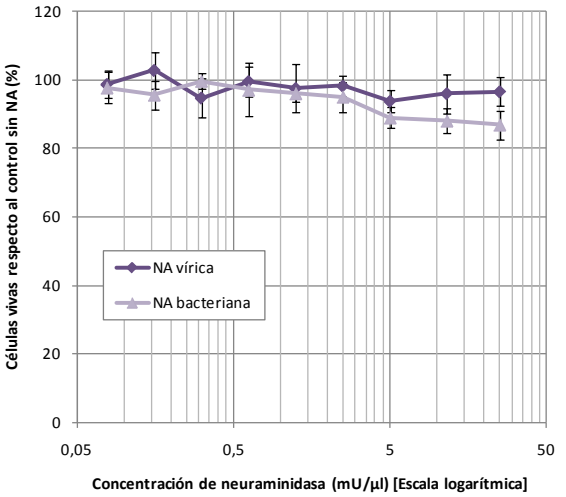


Figura R-47. Efecto de la concentración de neuraminidasa sobre las células ependimarias. *Cada punto representa la media ± SEM del porcentaje de células vivas respecto al control sin neuraminidasa, obtenido mediante el recuento de células teñidas con azul tripano. Para cada tipo de neuraminidasa, los diferentes tratamientos se compararon mediante ANOVA de un factor (NA vírica: $F_{(9,29)} = 0,326$, $P < 0,05$; NA bacteriana: $F_{(9,29)} = 1,324$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre las diluciones ni respecto al control negativo (medio sin NA).*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3.2.2 Detección de la formación de TCC mediante ELISA

La combinación de los siguientes anticuerpos: 1) anti-C5b-9 de rata hecho en ratón, 2) anti-C9 de rata hecho en conejo, y 3) anti-IgG de conejo hecho en cerdo ligado a peroxidasa, permitió el diseño de un ELISA de tipo sándwich con la capacidad de detectar la formación de complejos terminales del complemento (TCC) en suero de rata activado con zimosan, sin reaccionar de forma significativa con los factores no ensamblados presentes en sueros no activados o sueros procedentes de ratas $C6^{-/-}$ (epígrafe 3.7.1).

Los resultados de la aplicación de este ELISA al diseño experimental fueron los siguientes:

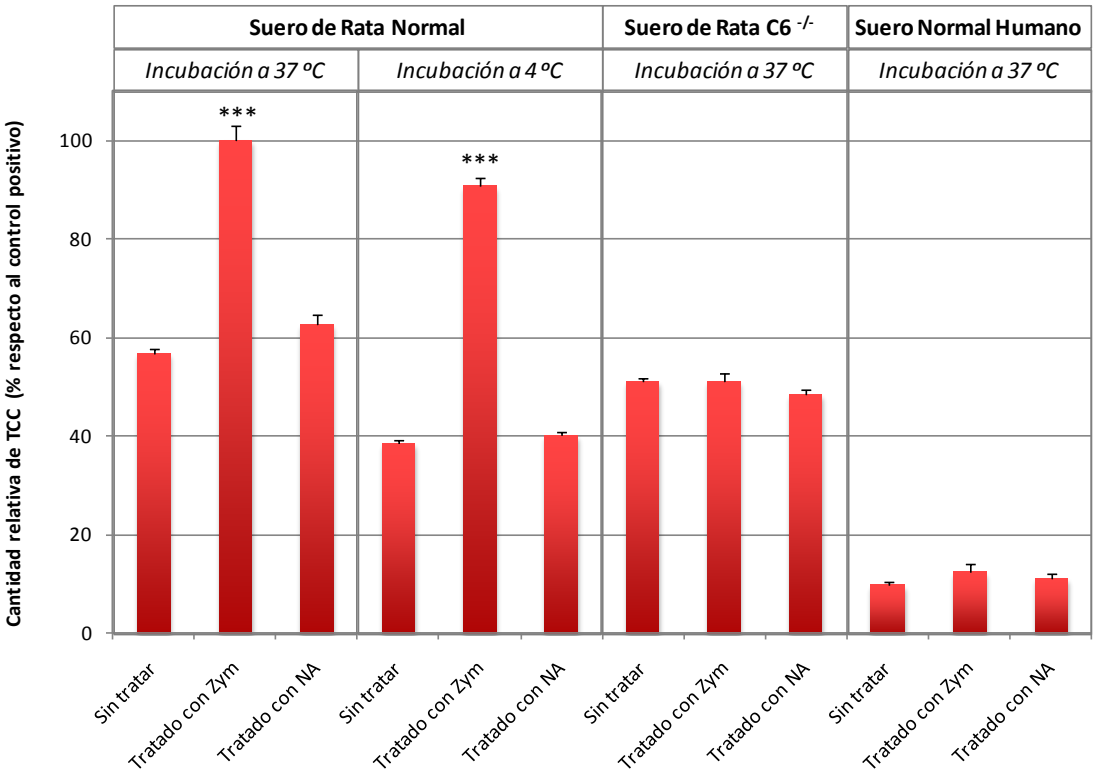


Figura R-48. Cantidad relativa de TCC en suero tratado con neuraminidasa. *Cada barra representa la media ± SEM de la absorbancia en ELISA, en porcentaje respecto al control positivo (suero normal de rata tratado con zimosan a 37 °C, máxima activación del suero). Se observa que el tratamiento con NA no provoca un aumento en los niveles de TCC detectado en suero. Para cada grupo, los diferentes tratamientos fueron comparados mediante ANOVA de un factor (grupo 1: $F_{(2,8)} = 121,019$, $P < 0,05$; grupo 2: $F_{(2,8)} = 817,923$, $P < 0,05$; grupo 3: $F_{(2,8)} = 1,849$, $P < 0,05$; grupo 4: $F_{(2,8)} = 1,490$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. (***) = $P < 0,001$ vs. grupo "sin tratar".*

Las pruebas realizadas con suero de ratas controles mostraron la formación de TCC en las muestras tratadas con zimosan, sin embargo, el nivel de TCC detectados tras el tratamiento con NA fue similar al suero control no tratado, tanto a 4 °C como a 37 °C (fig. R-48). No se detectó formación de TCC en sueros procedentes de ratas $C6^{-/-}$, así como tampoco hubo reacción de los anticuerpos con las proteínas del complemento presentes en el suero humano.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

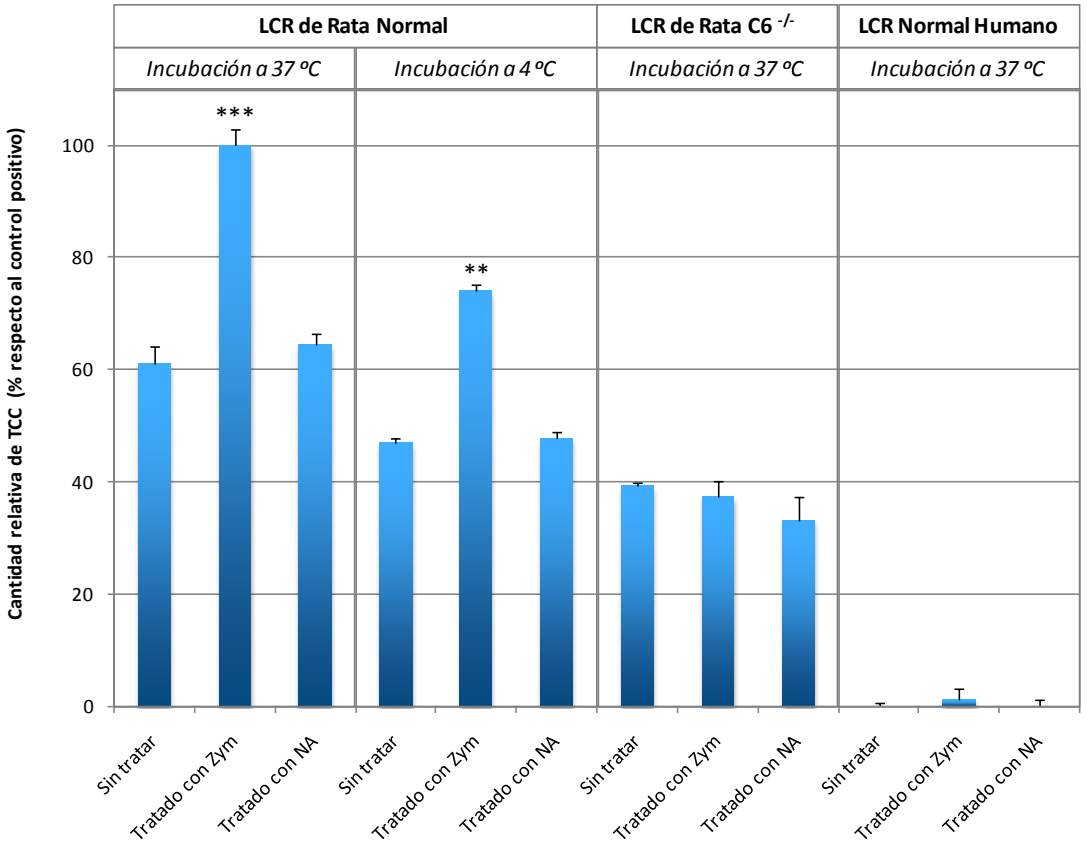


Figura R-49. Cantidad relativa de TCC en LCR tratado con neuraminidasa. *Cada barra representa la media ± SEM de la absorbancia en ELISA, en porcentaje respecto al control positivo (LCR de rata normal tratado con zimosan a 37 ºC, máxima activación del LCR). Se observa que el tratamiento con NA no provoca un aumento en los niveles de TCC detectado en LCR. Para cada grupo, los diferentes tratamientos se compararon mediante ANOVA de un factor (grupo 1: $F_{(2,8)} = 59,331$, $P < 0,05$; grupo 2: $F_{(2,8)} = 231,705$, $P < 0,05$; grupo 3: $F_{(2,8)} = 1,411$, $P < 0,05$; grupo 4: $F_{(2,8)} = 0,862$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. (**) = P < 0,01; (***) = P < 0,001 vs. grupo "sin tratar".*

Muy similares fueron los resultados obtenidos con LCR procedente de ratas normales, ratas $C6^{-/-}$ y de origen humano (fig. R-49). Se detectó la formación de TCC en las muestras tratadas con zimosan, pero no en las muestras tratadas con NA, donde los niveles detectados fueron similares a los del LCR no tratado. De igual forma, no se detectó un nivel de formación de TCC superior a la señal obtenida en el control negativo, en las muestras procedentes de ratas $C6^{-/-}$ (presencia de factores libres) ni en las muestras de origen humano (factores de otra especie).

4.3.2.3 Detección mediante *Western blot* de fragmentos de C3 activados *in vitro*

El *Western blot* supone una técnica más sensible para comprobar la posible activación del sistema del complemento por parte del enzima NA *in vitro*. Para ello se detectaron mediante un anticuerpo específico algunos de los distintos fragmentos derivados de la activación, desactivación y degradación del factor C3 (la región de C3 reconocida por el anticuerpo monoclonal utilizado se muestra en color verde en la fig. I-03, epígrafe 1.1.2.2).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

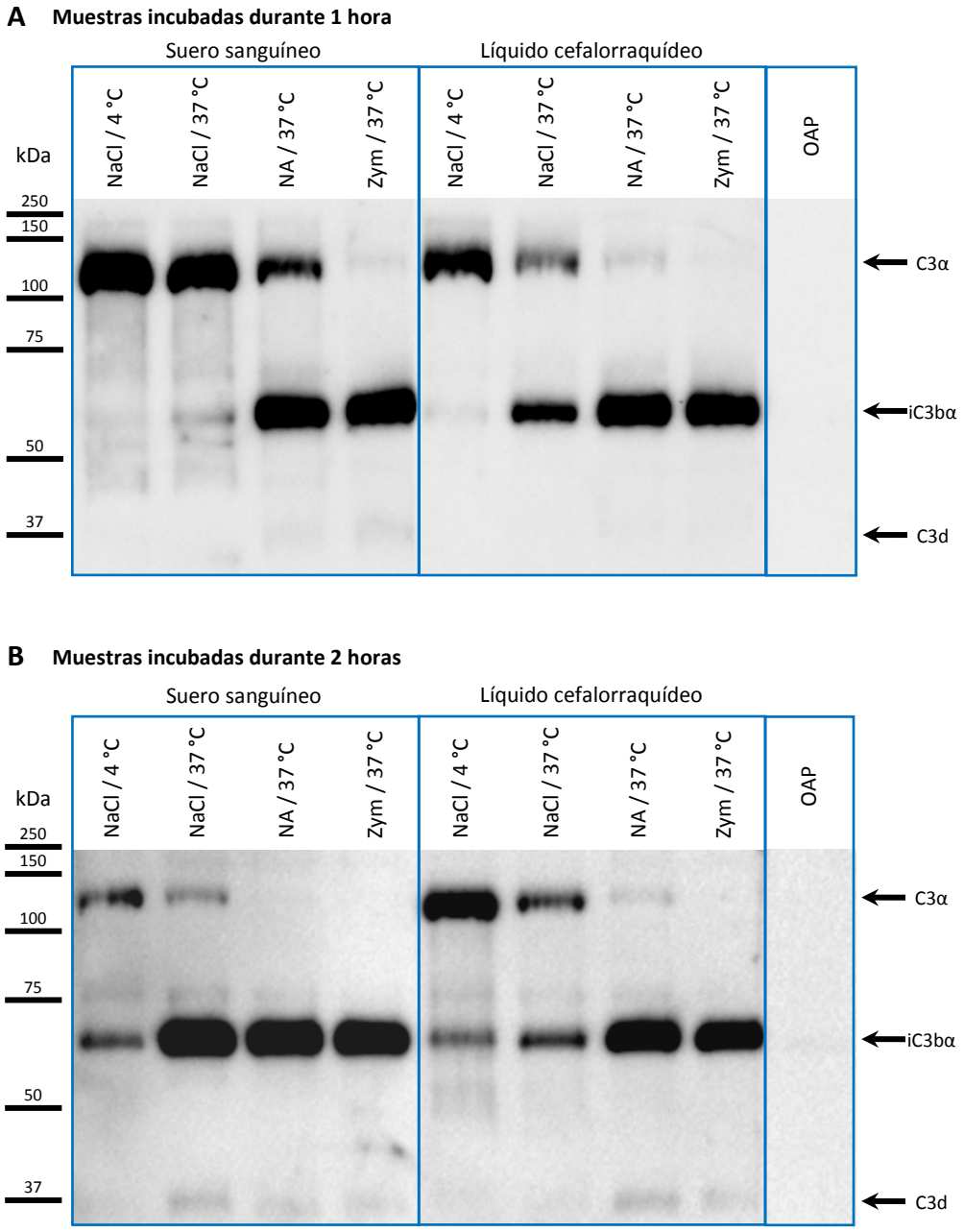


Figura R-50. Detección de fragmentos derivados de la activación, desactivación y degradación del factor C3 por tratamiento in vitro con neuraminidasa. *Tanto en A como en B, tanto para suero como LCR de rata: primera calle (**NaCl / 4 °C**), muestra sin tratar ni calentar; segunda calle (**NaCl / 37 °C**), muestra incubada a 37 °C sin neuraminidasa; tercera calle (**NA / 37 °C**), muestra incubada con neuraminidasa a 37 °C; cuarta calle (**Zym / 37 °C**), muestra incubada a 37 °C con zimosan. **OAP** (omisión de anticuerpo primario): membrana con muestra de suero Zym / 37 °C no incubada con anticuerpo primario anti-C3. Patrón de pesos moleculares Bio-Rad, ref. 161-0374. **A:** muestras incubadas durante 1 h. Se detecta C3α (113 kDa) en la muestra sin tratar (NaCl / 4 °C). Lo mismo ocurre en la muestra NaCl / 37 °C, donde además se observa cierta señal procedente de iC3bα (62,5 kDa) derivado por efecto del calentamiento. No se detecta C3α en la muestra incubada con zimosan, donde la señal obtenida corresponde casi completamente a iC3bα. En el caso de la incubación con NA, si bien no ha desaparecido completamente la detección de C3α como en el control sin NA, si que se detectan mayores niveles de iC3bα que en el control calentado. **B:** muestras incubadas durante 2 h. Se observa una clara progresión hacia la desactivación y degradación en todas las muestras, siendo el efecto igual al descrito en A, pero detectándose además bandas correspondientes a la aparición del factor C3d (35 kDa) derivado de la degradación de C3 inactivo.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los resultados mostraron que la NA induce la escisión de C3 de igual forma que el zimosan, tanto en suero como en LCR, aunque de forma más lenta (fig. R-50).

Tras 1 h de incubación, se detectaron bandas correspondientes a iC3bα tanto en las muestras incubadas con NA como con zimosan (control positivo de la activación) (fig. R-50 A). En el caso de la NA se detectó también una banda, aunque más tenue, a nivel de C3α. Esta aparece de forma más intensa en los controles incubados con solución salina (NaCl 0,9%), tanto el incubado a 37 °C como el conservado a 4 °C. Una tenue banda correspondiente a C3d se aprecia en las muestras de suero incubadas con NA y con zimosan.

A las 2 h de incubación (fig. R-50 B), se observó una progresión hacia la degradación de C3 en las muestras estudiadas. Las bandas correspondientes a C3α aparecieron más tenues que tras una hora de incubación, a la vez que las bandas de iC3bα y C3d se acentuaron.

4.3.3 Análisis de las posibles vías de activación del complemento

Con el fin de dilucidar la vía por la que la NA activa el complemento, se analizó la presencia de distintas moléculas en la superficie del epitelio ependimario mediante técnicas inmunohistoquímicas y de *Western blot*. Para ello, y una vez investigada la vía alternativa mediante el análisis de la generación de fragmentos de C3 (epígrafe 4.3.2.3), se estudió la presencia del factor C1q y anticuerpos endógenos (comienzo de la vía clásica), así como MBL (factor que inicia la vía de las lectinas), en las paredes del ventrículo lateral inyectado.

4.3.3.1 Detección de anticuerpos y C1q en la superficie ependimaria

El inicio de la vía clásica del complemento está mediado por la unión del factor C1 a inmunocomplejos de IgG o IgM previamente unidos a sus antígenos. La desialización del epitelio ependimario podría exponer epítopos reconocidos por inmunoglobulinas endógenas circulantes de tal forma que, posteriormente, permitiesen el ensamblaje del complejo C1, desencadenando la vía clásica de activación. Sin embargo, las tinciones inmunohistoquímicas realizadas contra IgG en tejido cerebral de ratas inyectadas y sacrificadas 0 h y 2 h posinyección no detectaron depósitos de esta inmunoglobulina en el epitelio ependimario de los ventrículos (fig. R-51).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

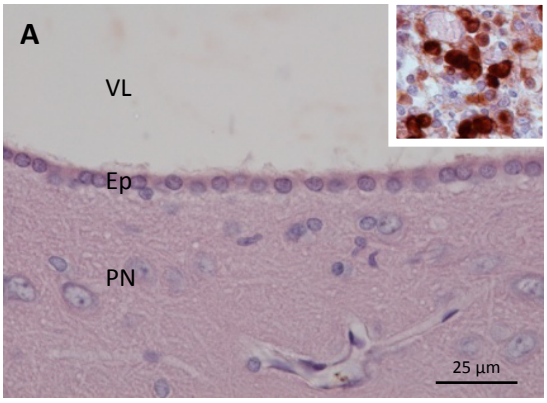


Figura R-51. Detección de inmunoglobulinas en el epéndimo y en el parénquima nervioso de ratas inyectadas con neuraminidasa. *Tinción inmunohistoquímica con anti-IgG de rata, sobre cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor procedentes de una rata sacrificada inmediatamente tras la inyección. Contraste hematoxilina-eosina.* ***A:*** *epitelio ependimario de la pared del ventrículo inyectado. Ausencia de depósitos de IgG.* ***Recuadro:*** *control positivo. Linfocitos B en amígdala palatina.* ***PN****: parénquima nervioso,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo.*

Tampoco se detectó la presencia de factor C1q (componente del complejo C1) sobre el epéndimo de los mismos animales mediante inmunohistoquímica (imágenes no mostradas) ni mediante el análisis por *Western blot* de los inmunoprecipitados de extractos de epitelio ependimario obtenidos de ratas inyectadas con NA. Sí se detectó, en cambio, una banda de unos 26 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la cadena A del factor C1q en el control positivo (fig. R-52) (el anticuerpo contra C1q utilizado en la inmunoprecipitación fue un monoclonal que reconoce un epítopo en la cadena A). Una calle con el mismo suero empleado como control positivo, pero no tratada con anti-C1q durante la inmunodetección, fue usada como control negativo del *Western blot* (OAP).

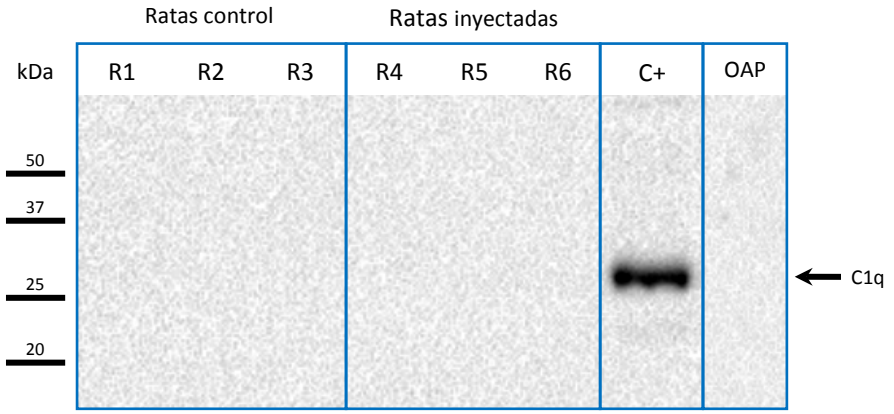


Figura R-52. Detección de C1q mediante Western blot en extractos de epitelio ependimario. *No se detectó ninguna banda en torno al peso molecular esperado para la cadena A de la proteína C1q (26 kDa) en las muestras analizadas. Sí en cambio en el control positivo.* ***R1****,* ***R2*** *y* ***R3****: inmunoprecipitados de extractos ependimarios procedentes de ratas control no inyectadas.* ***R4****,* ***R5*** *y* ***R6****: inmunoprecipitados de extractos ependimarios procedentes de ratas inyectadas con NA y sacrificadas inmediatamente después.* ***C+****: control positivo para la detección de C1q, suero normal de rata.* ***OAP*** *(omisión de anticuerpo primario): calle en la que no se ha aplicado el anticuerpo primario sobre una muestra de suero normal de rata. Patrón de pesos moleculares Bio-Rad, ref. 161-0374.*

4.3.3.2 Detección de lectina de unión a manosa (MBL) en la superficie ependimaria

La actividad de la NA sobre el epéndimo escinde los residuos terminales de ácido siálico de la superficie celular dejando expuestos residuos de galactosa. Estos suponen un posible sitio de unión para el factor MBL, iniciador de la vía de las lectinas de activación del complemento. La presencia de este

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

factor en la superficie ependimaria se analizó en primer lugar mediante inmunohistoquímica, no detectándose depósitos del mismo sobre el epitelio ependimario (imágenes no mostradas). Decidimos utilizar también la técnica de *Western blot* como un método más sensible para detectar las posibles moléculas de MBL depositadas, mediante extractos de pared ependimaria de ratas inyectadas con NA.

Las pruebas de *Western blot* realizadas no detectaron la presencia de MBL en inmunoprecipitados de extractos de epéndimo de ratas inyectadas con NA ni de ratas controles no inyectadas (fig. R-53). Sí se detectó una banda de unos 25 kDa correspondiente al peso molecular esperado de los monómeros de MBL en suero de rata usado como control positivo. Al igual que en el análisis de C1q, una calle con suero usado como control positivo no se incubó con anti-MBL durante la inmunodetección. Esta fue usada como control negativo del *Western blot* (OAP).

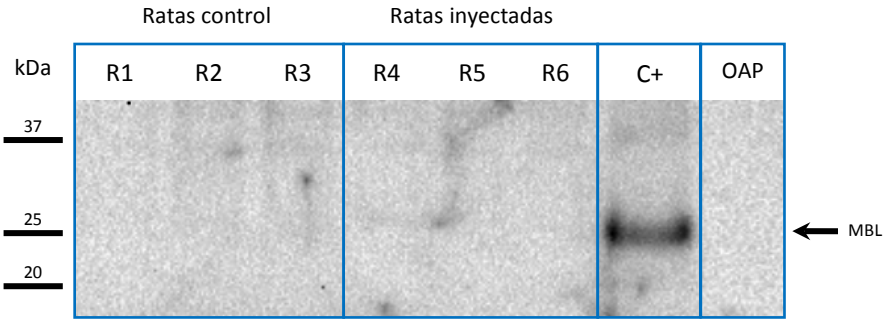


Figura R-53. Detección de MBL mediante Western blot en extractos de epitelio ependimario. *Salvo en el control positivo, no se detectó ninguna banda en torno al peso molecular esperado para la proteína MBL (26 kDa) en las muestras analizadas.* ***R1****,* ***R2*** *y* ***R3****: inmunoprecipitados de extractos ependimarios procedentes de ratas control no inyectadas.* ***R4****,* ***R5*** *y* ***R6****: inmunoprecipitados de extractos ependimarios procedentes de ratas inyectadas con NA y sacrificadas inmediatamente después.* ***C+****: control positivo para la detección de MBL, suero normal de rata.* ***OAP*** *(omisión de anticuerpo primario): calle en la que no se ha aplicado el anticuerpo primario sobre una muestra de suero normal de rata. Patrón de pesos moleculares Bio-Rad, ref. 161-0374.*

4.3.4 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo en ausencia de proteínas del complemento

4.3.4.1 Ensayos *in vitro* con explantes de pared ventricular

Se utilizaron explantes de pared ventricular, constituidos por el epitelio ependimario, el subepéndimo y una pequeña porción de parénquima nervioso. Dichos explantes se emplearon para determinar el efecto del complemento y la NA sobre las células ependimarias en ausencia de otros posibles factores que pudieran participar en el efecto *in vivo*.

Con el objetivo de comprobar el estado del epitelio ependimario, se monitorizó el movimiento ciliar del mismo a distintos tiempos para cada situación experimental. Los resultados se muestran en la tabla R-02.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medio del explante	Pre	0 h	1 h	2 h
Medio de cultivo (MC)	+++++	+++++	+++++	+++++
MC + NA	+++++	+++++	++ - - -	- - - - -
MC + Suero	+++++	+++++	+++++	+++++
MC + NA + Suero	+++++	+++++	+++ - -	+ - - - -

Tabla R-02. Registro del movimiento ciliar de explantes. *Movimiento ciliar observado a distintos tiempos en cada una de las cinco réplicas de explantes para cada situación experimental.* ***Pre****: antes del ensayo,* ***0 h****: inmediatamente después de añadir sueros y enzima,* ***1 h*** *y* ***2 h****: horas transcurridas desde 0 h. Cada* ***signo +*** *significa que se pudo verificar visualmente el movimiento ciliar de la correspondiente réplica. Cada* ***signo -*** *indica que tal movimiento no pudo verificarse. Todos los explantes en medio de cultivo y medio con suero (fuente de complemento) conservaron el movimiento ciliar 2 h después del tratamiento. Sin embargo, esto no pudo ser verificado en tres de las cinco réplicas a tiempo 1 h ni en la totalidad de las réplicas de tiempo 2 h para el medio con NA. Tampoco pudo verificarse el movimiento ciliar en dos de cinco réplicas de tiempo 1 h ni en cuatro de las cinco réplicas del tiempo 2 h en el medio con NA y suero.* ***MC****: medio de cultivo,* ***NA****: neuraminidasa.*

El movimiento ciliar fue evaluado mediante su observación microscópica directa, o bien de forma indirecta, a través del movimiento acelerado de las partículas del medio (fig. R-54).

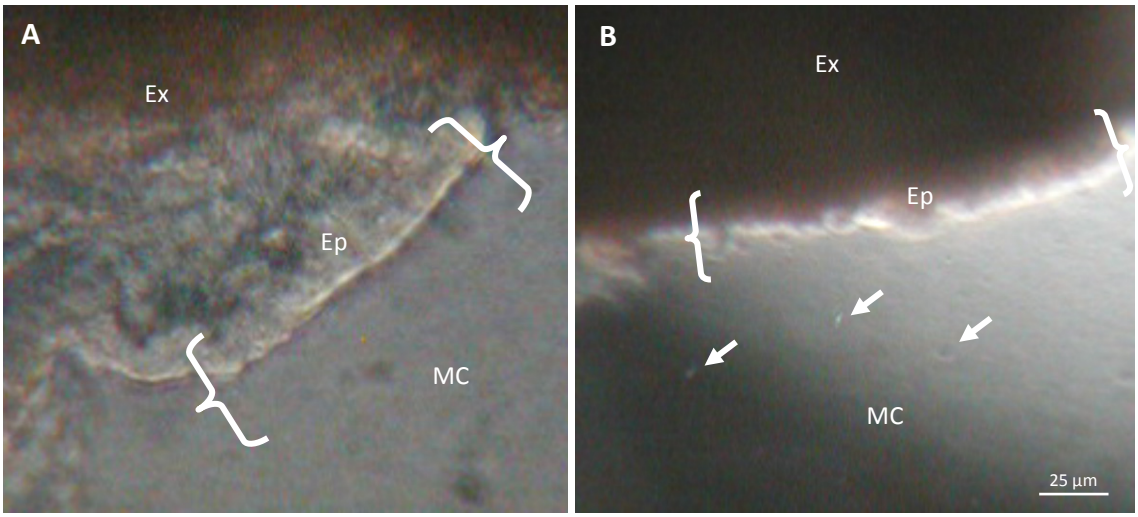


Figura R-54. Visualización del movimiento ciliar ependimario bajo el microscopio invertido. *Imágenes de la superficie ependimaria de explantes de pared ventricular de rata en cultivo observados mediante un microscopio invertido. Entre corchetes: epéndimo y superficie ciliada.* ***Flechas****: partículas arrastradas por la corriente provocada por el movimiento ciliar.* ***Ep****: epéndimo,* ***Ex****: explante,* ***MC****: medio de cultivo.*

Como puede observarse en la tabla R-02, el movimiento ciliar se mantuvo en todos los casos salvo en tres explantes de la situación "MC + NA" una hora tras el comienzo del experimento y ningún explante de dicha situación otra hora más tarde. Tampoco se observó movimiento en dos explantes de la situación "MC + NA + Suero" a tiempo 1 h y cuatro explantes a tiempo 2 h, tras ser añadidos los sueros y enzimas correspondientes a cada pocillo.

Una vez realizado el ensayo y fijados los explantes, se obtuvieron cortes en microtomo sobre los cuales se realizaron diferentes tinciones: 1) inmunohistoquímica contra vimentina para detectar el

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

epitelio ependimario; 2) una tinción histológica general (hematoxilina-eosina) para poder describir el estado citológico e histológico del epéndimo; y 3) una histoquímica de lectinas con PNA para comprobar el efecto del enzima NA.

La fig. R-55 muestra las imágenes del explante más representativo de cada situación experimental. La inmunohistoquímica contra vimentina mostró que todos los explantes portaban un fragmento de epitelio ependimario fácilmente reconocible. La histoquímica con la lectina PNA dio una reacción positiva en todos aquellos explantes tratados con NA (fig. R-55 F y L) y negativa en todos los demás (fig. R-55 C e I), demostrando que el enzima NA había desarrollado su actividad enzimática en aquellos pocillos en los que fue añadido.

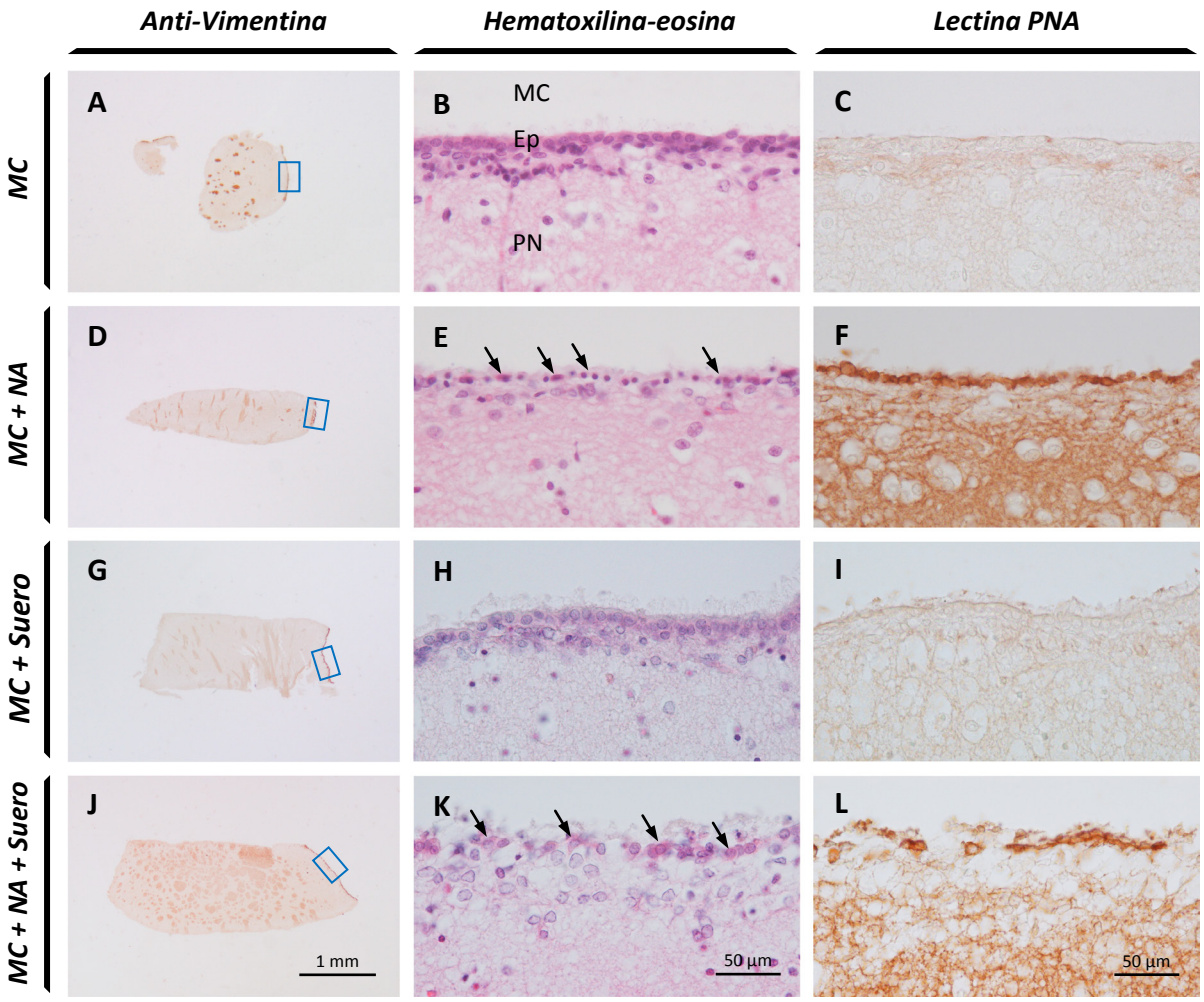


Figura R-55. Explantes de pared ventricular tratados con neuraminidasa y complemento*. Los explantes se fijaron tras 2 h de tratamiento experimental. Anti-vimentina, hematoxilina-eosina e histoquímica con PNA sobre cortes Bouin-parafina 10 µm de espesor. Las imágenes hematoxilina-eosina y PNA muestran la región enmarcada en la correspondiente imagen anti-vimentina.* ***MC****: medio de cultivo,* ***NA****: neuraminidasa,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***flechas****: células ependimarias dañadas.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La tinción con hematoxilina-eosina reveló que las células ependimarias de los explantes de la situación "MC" (sin sueros ni enzimas añadidos) no mostraban signos de daño celular ni de necrosis, tan sólo un leve incremento en su afinidad por la eosina (fig. R-55 B). Una situación similar se observó en el epéndimo del grupo "MC + Suero" (fig. R-55 H). Las células ependimarias de los explantes de la situación "MC + NA" presentaban signos de daño celular apreciables, con reducción del citoplasma y núcleos picnóticos (fig. R-55 E). Esto también se observó de forma mucho más patente en el epéndimo de los explantes incubados en la situación "MC + NA + Suero" (fig. R-55 K). Estas células mostraron núcleos picnóticos, forma celular irregular y pérdida del contacto lateral célula-célula, por lo que el epitelio perdió su integridad y mostró interrupciones puntuales a lo largo de su extensión. Claramente la situación que provocó el máximo daño fue "MC + NA + Suero".

4.3.4.2 Ensayos *in vitro* con cultivos primarios de células ependimarias aisladas

Con el fin de estudiar el efecto de la NA y del complemento en células aisladas de epéndimo, se desarrolló un método para la obtención de cultivos primarios de células ependimarias adultas de rata (epígrafe 3.2.3). Este tipo de cultivos permitió estudiar la viabilidad de las células ependimarias aisladas en presencia de NA y de factores del complemento. Dicha viabilidad fue evaluada mediante la técnica de exclusión del azul tripano (fig. R-56).

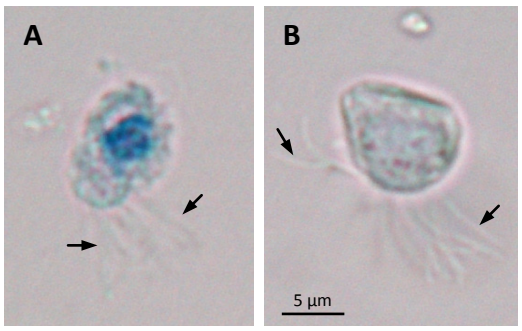


Figura R-56. Técnica de exclusión del azul tripano aplicada a células ependimarias aisladas. *Fijación con PFA 4%. Fotografía mediante óptica de Nomarski.* ***A:*** *célula ependimaria muerta, interior teñido con azul tripano.* ***B:*** *célula ependimaria viva, el interior permanece incoloro.* ***Flechas****: cilios ependimarios.*

En la fig. R-57 se observan los resultados de viabilidad de las células ependimarias en presencia de distintos medios. Se consideró el 100% de células vivas al número inicial de células ependimarias en cada medio. En todas las situaciones experimentales se observó una disminución de la viabilidad con el paso del tiempo. Esta disminución fue significativamente más acusada en aquellos medios suplementados con NA y suero de rata (fuente de factores del complemento). En este caso, la viabilidad disminuyó al 60% en un periodo de 10 min, continuando un descenso más paulatino hasta los 50 min. La curva obtenida en el tratamiento con NA + suero + inhibidor de C5 fue similar a la obtenida en el medio sólo con NA. La curva del medio con suero fue similar a la curva de medio control sin NA ni suero.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

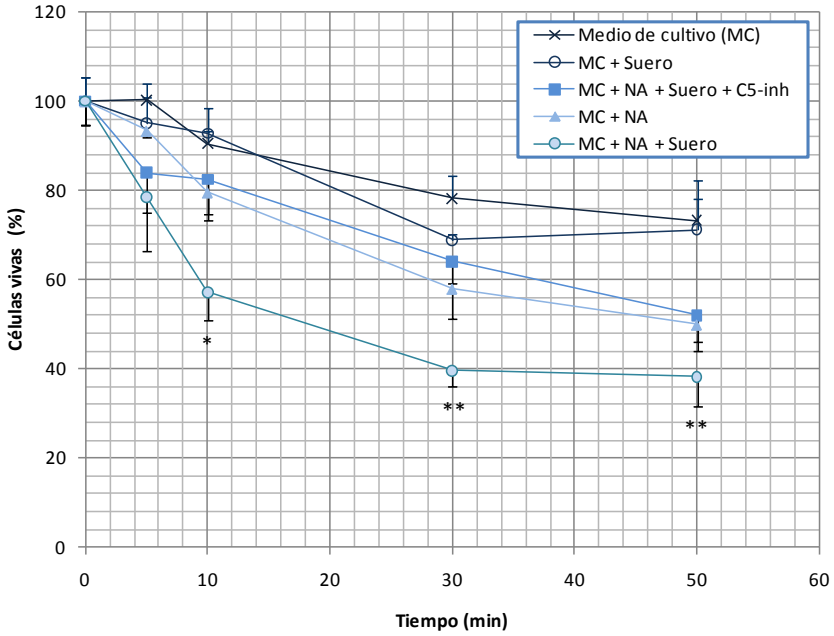


Figura R-57. Viabilidad de las células ependimarias en distintos medios. *Cada punto representa la media ± SEM del porcentaje de células vivas respecto al tiempo 0 min. Los diferentes medios dentro de cada tiempo fueron comparados mediante ANOVA de un factor (t=5: $F_{(5,17)} = 1,641$, $P < 0,05$; t=10: $F_{(5,17)} = 6,108$, $P < 0,05$; t=30: $F_{(5,17)} = 8,426$, $P < 0,05$; t=50: $F_{(5,17)} = 4,467$, $P < 0,05$) y un análisis post-hoc de Tukey. (*) = $P < 0,05$; (**) = $P < 0,01$ vs. "MC", para cada tiempo.* ***MC****: medio de cultivo,* ***NA****: neuraminidasa,* ***C5-inh****: inhibidor de C5.*

4.3.4.3 Inyección ICV de neuraminidasa en ratas con inhibición sistémica de C5

4.3.4.3.1 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas tratadas con inhibidor de C5

La escisión del factor C5 del complemento supone la aparición del factor C5b en el medio, primer componente del complejo de ataque a la membrana C5b-9. La inhibición total de la rotura proteolítica de C5 impediría, por tanto, la formación de tales complejos debido a la ausencia del factor iniciador del ensamblaje. Si bien el tratamiento sistémico con anticuerpos anti-C5 capaces de bloquear su rotura no consigue la inhibición total de este proceso, sí se ha demostrado su capacidad para conseguir estados atenuados de respuesta a la activación proteolítica (Costa y col., 2006).

Para la ejecución de este experimento se realizaron inyecciones ICV de NA, fijación, obtención de tejido y procesamiento para estudio histológico, sobre animales previamente tratados sistémicamente con un inhibidor de la escisión de C5 (epígrafe 3.1.5).

Las imágenes de la fig. R-58 muestran el estado del epitelio ependimario tras la inyección ICV del inhibidor de C5 a distintas concentraciones, con el fin de descartar que tal anticuerpo provocase por sí mismo daño ependimario o reacción inflamatoria. Como se observa, el epéndimo no mostró signos de muerte celular, siendo su aspecto equiparable al del epitelio del ventrículo contralateral no inyectado. Tampoco se detectó inflamación ventricular en tiempos posteriores (imágenes no mostradas).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

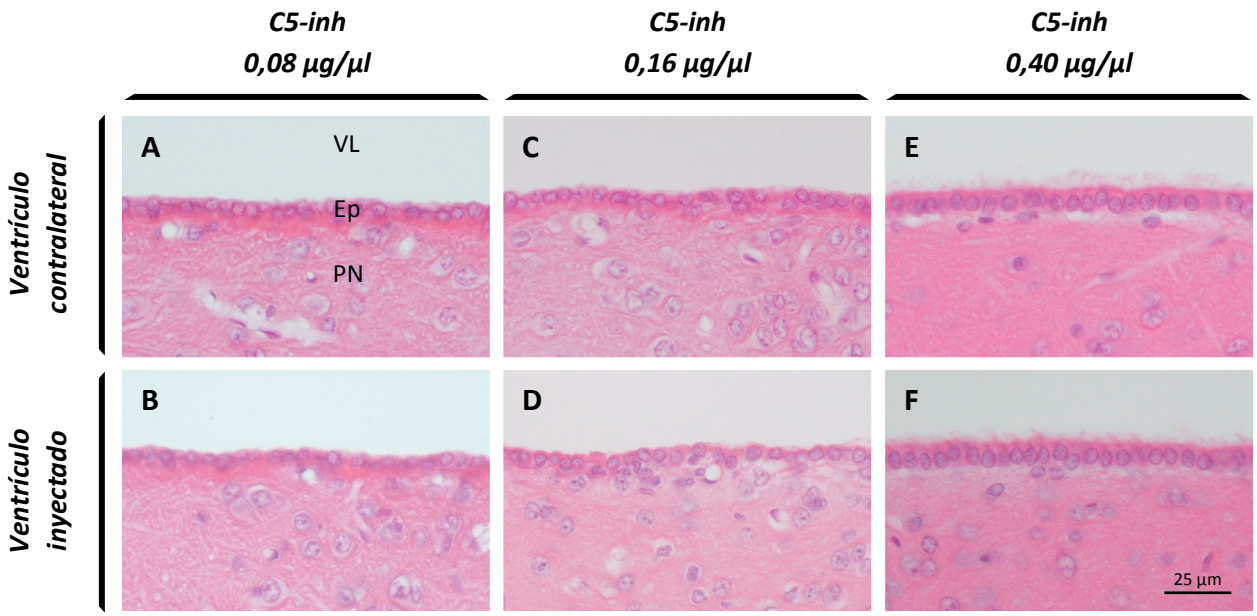


Figura R-58. Efecto de la inyección ICV del inhibidor de C5. *Cortes Bouin-parafina de 10 µm de espesor. Tinción hematoxilina-eosina. Animales control inyectados con inhibidor de C5 (anti-C5, clon 18A, Alexion Pharmaceutical) a distintas concentraciones. Las imágenes del epitelio ependimario del ventrículo lateral inyectado (**B**, **D** y **F**) no muestran alteraciones debidas a la inyección del anticuerpo, permaneciendo su aspecto igual al del ventrículo contralateral correspondiente (**A**, **C** y **E**). **VL**: ventrículo lateral, **VLi**: ventrículo lateral inyectado, **Vc**: ventrículo contralateral, **Ep**: epéndimo, **PN**: parénquima nervioso.*

Las ratas inyectadas con NA en las que simultáneamente se inhibió el factor C5 de forma sistémica, presentaron signos de daño y muerte celular en el epitelio ependimario 2 h después de la inyección del enzima (fig. R-59 B). Estos efectos fueron similares a los observados en las ratas inyectadas con NA pero no tratadas para la inhibición de C5. El epitelio ependimario del ventrículo contralateral se mantuvo intacto (fig. R-59 A).

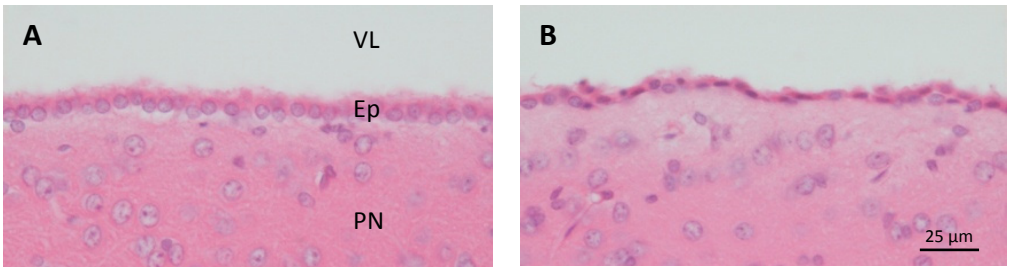


Figura R-59. Efecto de la inyección ICV de neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas con inhibición sistémica de C5. *Cortes Bouin-parafina de rata tratada con inhibición sistémica de C5, inyectada con una mezcla de NA a 25 mU/µl e inhibidor de C5 (anti-C5, clon 18A, Alexion Pharmaceutical) a 0,40 µg/µl. Sacrificada 2 h posinyección. Tinción hematoxilina eosina. **A:** epitelio ependimario del ventrículo contralateral no inyectado. **B:** epitelio ependimario del ventrículo inyectado. El epitelio muestra signos de daño epitelial semejantes a los casos de ratas sin inhibición de C5 inyectadas con NA. **VL**: ventrículo lateral, **Ep**: epéndimo, **PN**: parénquima nervioso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3.4.3.2 Detección inmunohistoquímica de MAC en el epéndimo de ratas tratadas con inhibidor de C5

Las tinciones inmunohistoquímicas con anti-C5b-9 realizadas sobre tejido procedente de ratas tratadas para la inhibición sistémica de C5 detectaron depósitos de MAC sobre el epitelio ependimario dañado del ventrículo lateral inyectado con NA (fig. R-60 B). El marcaje obtenido parecía ser de menor intensidad que el visto en ratas no tratadas con inhibidor inyectadas con NA y sacrificadas 2 h posinyección (fig. R-60 C).

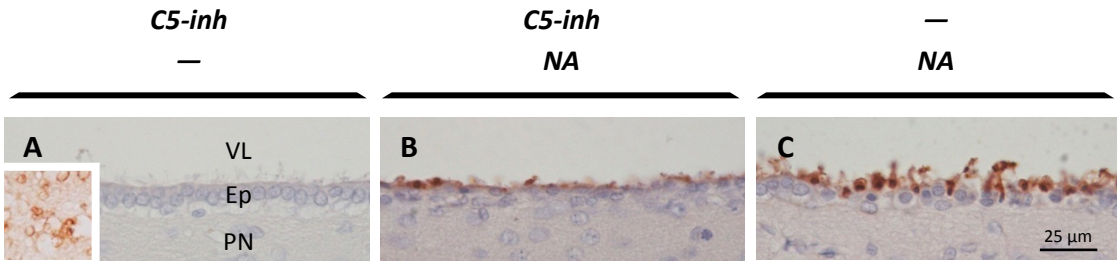


Figura R-60. Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas tratadas para la inhibición sistémica de C5. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm. Superficie ependimaria de la pared estriatal del ventrículo inyectado.* ***A****: rata control tratada con inhibidor de C5 no inyectada con NA.* ***B****: rata tratada e inyectada con NA.* ***C****: rata no tratada inyectada con NA. Todas sacrificadas 2 h posinyección.* ***Recuadro****: control positivo para C5b-9. Ganglio linfático inflamado.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

4.3.4.4 Inyección ICV de neuraminidasa en ratas $C6^{-/-}$

4.3.4.4.1 Efecto de la neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas $C6^{-/-}$

La inyecciones de NA en ratas de la cepa $C6^{-/-}$ que carecen del factor C6 del complemento y que, por tanto, no pueden culminar la formación de los MAC, provocaron daños en el epitelio ependimario muy similares a los acontecidos en las ratas controles (fenotipo salvaje) sometidas al mismo tratamiento (fig. R-61 B).

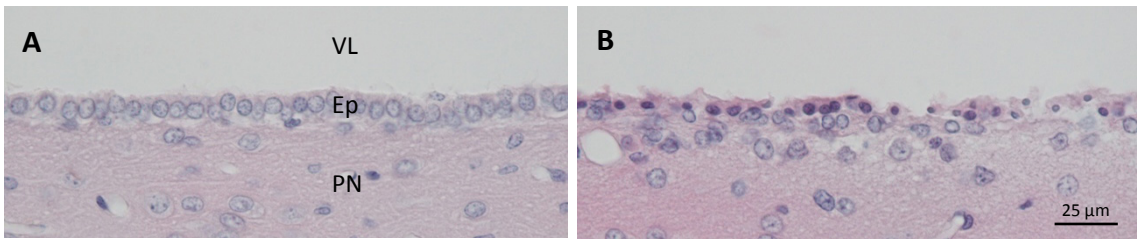


Figura R-61. Efecto de la inyección ICV de neuraminidasa sobre el epéndimo de ratas $C6^{-/-}$. *Cortes Bouin-parafina de rata $C6^{-/-}$ inyectada con neuraminidasa y sacrificada 2 h posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *epéndimo del ventrículo contralateral (no inyectado).* ***B:*** *epéndimo del ventrículo lateral inyectado. Se observa el epitelio dañado de manera semejante al de ratas de fenotipo salvaje inyectadas.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3.4.4.2 Detección inmunohistoquímica de MAC en el epéndimo de ratas C6$^{-/-}$

Las tinciones inmunohistoquímicas con anti-C5b-9 realizadas sobre tejido procedente de ratas deficientes en factor C6 del complemento no detectaron depósitos de MAC sobre el epitelio dañado del ventrículo lateral inyectado con NA (fig. R-62 A). En contraste, la imagen R-62 B muestra la detección de MAC en el epéndimo dañado de ratas control inyectadas con NA y sacrificadas 2 h posinyección.

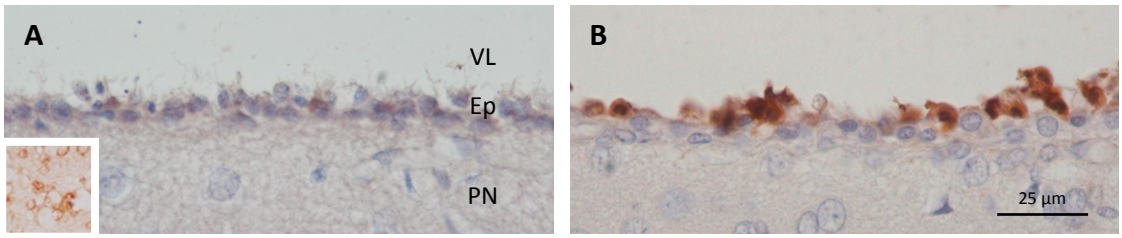


Figura R-62. Detección de complejos C5b-9 sobre el epitelio ependimario de ratas C6$^{-/-}$. *Cortes Bouin-parafina de 7 µm. Superficie ependimaria de la pared estriatal del ventrículo inyectado.* ***A****: rata C6$^{-/-}$ inyectada con NA.* ***B****: rata control (fenotipo salvaje) inyectada con NA. Ambas sacrificadas 2 h posinyección.* ***Recuadro****: control positivo para C5b-9. Ganglio linfático inflamado.* ***VL****: ventrículo lateral,* ***Ep****: epéndimo,* ***PN****: parénquima nervioso.*

4.3.5 Implicación del sistema del complemento en la inflamación

4.3.5.1 Análisis de la inflamación tras la inyección ICV de C5a en ratas

Las inyecciones de anafilotoxina C5a del complemento realizadas en ratas mostraron que esta tiene la capacidad de provocar una reacción inflamatoria ventricular, periventricular, y también meníngea, muy similar a la observada tras las inyecciones de NA. Fue posible observar un gran acúmulo de células inmunocompetentes (principalmente neutrófilos) en los plexos coroideos del ventrículo inyectado 24 h después de la inyección de C5a (fig. R-63 B). También se observaron células del sistema inmune alrededor de los grandes vasos junto al órgano subfornical (fig. R-63 C) y en las meninges que rodean todo el encéfalo al nivel antero-posterior de la inyección ICV, incluso en regiones tan alejadas como son las meninges ventrales al quiasma óptico (fig. R-63 D).

4.3.5.2 Análisis de la inflamación en ratas con inhibición sistémica de C5 y ratas C6$^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa

El análisis mediante tinciones generales del material histológico obtenido de ratas tratadas con inhibidor de C5 mostró que, 24 h después de la inyección de NA, tanto los plexos coroideos como el resto del ventrículo inyectado y otras regiones cercanas presentaban gran número de células inflamatorias de igual modo que ocurría en animales inyectados con el enzima pero no tratados con inhibidor (fig. R-64 B). Esta inflamación estuvo restringida al ventrículo inyectado, quedando el ventrículo lateral libre de células inflamatorias (fig. R-64 A).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

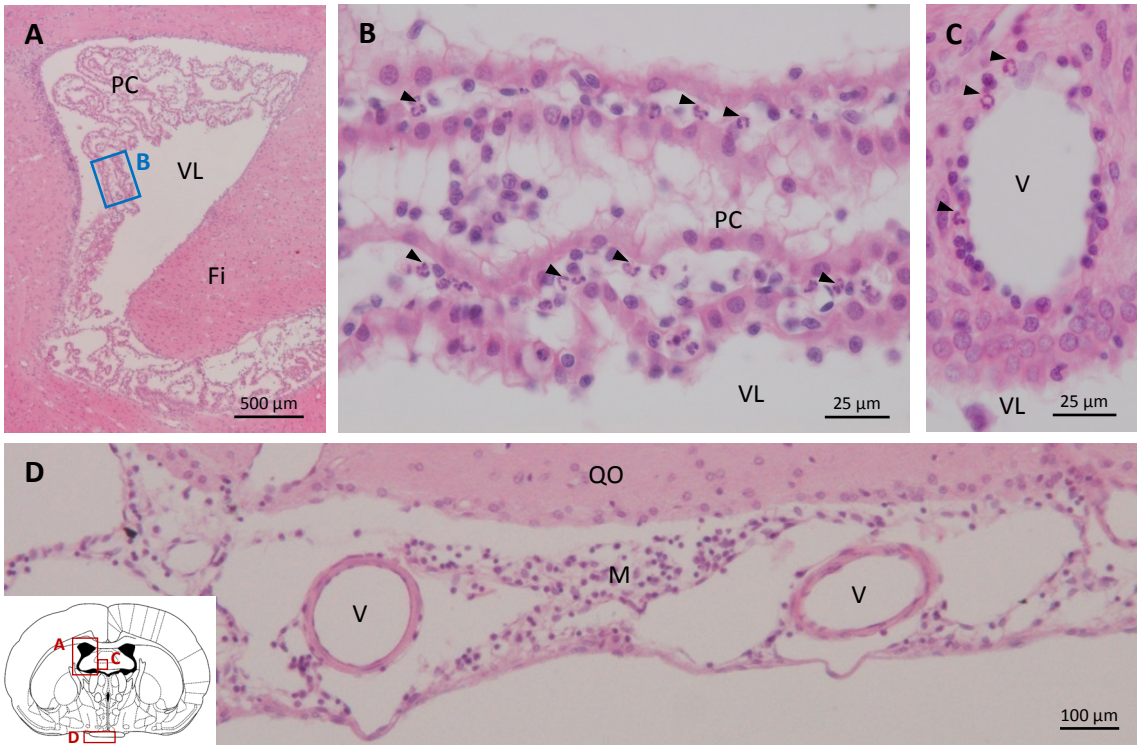


Figura R-63. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de C5a en ratas. *Cortes Bouin-parafina de rata inyectada con anafilotoxina C5a (Sigma) y sacrificada 24 h posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *ventrículo lateral inyectado.* ***B:*** *detalle de los plexos coroideos del ventrículo inyectado.* ***C:*** *vaso sanguíneo cercano al órgano subfornical en el lado inyectado.* ***D:*** *inflamación en las meninges ventrales al quiasma óptico.* ***PC****: plexos coroideos,* ***M****: meninges,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***QO****: quiasma óptico,* ***Fi****: fimbria,* ***V****: vasos,* ***cabezas de flecha****: células inflamatorias.*

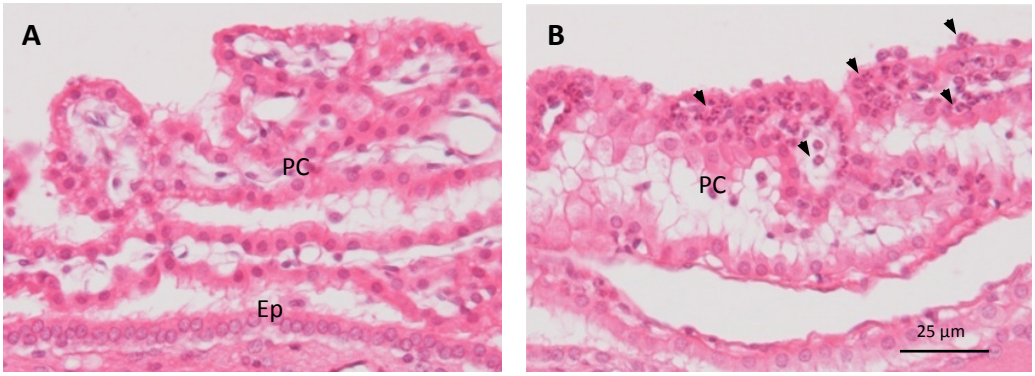


Figura R-64. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de neuraminidasa sobre ratas con inhibición sistémica de C5*. Cortes Bouin-parafina de rata con inhibición sistémica de C5, inyectada con una mezcla de NA e inhibidor de C5 y sacrificada 24 h posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *plexos coroideos del ventrículo contralateral no inyectado.* ***B:*** *plexos coroideos del ventrículo inyectado, en los que aparecen células inflamatorias (****cabezas de flecha****).* ***PC****: plexos coroideos,* ***Ep****: epéndimo.*

Así mismo, a partir de las 4 h posinyección se desarrolló una gran reacción inflamatoria en el ventrículo inyectado de ratas $C6^{-/-}$, con la llegada de células inmunocompetentes a los plexos coroideos y las inmediaciones del ventrículo inyectado, manteniéndose el ventrículo contralateral libre de estas células (fig. R-65 A). Las imágenes muestran la acumulación de neutrófilos en el interior de los plexos coroideos del ventrículo inyectado de una rata sacrificada 24 h posinyección (fig. R-65 B).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

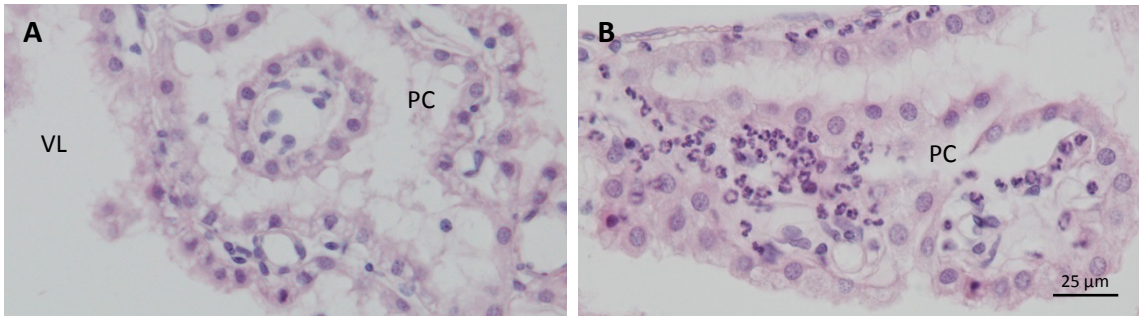


Figura R-65. Efecto inflamatorio de la inyección ICV de neuraminidasa en ratas C6$^{-/-}$. *Cortes Bouin-parafina de rata C6$^{-/-}$ inyectada con neuraminidasa y sacrificada 24 h posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *ausencia de inflamación en los plexos coroideos del ventrículo contralateral (no inyectado).* ***B:*** *presencia de células inflamatorias en los plexos coroideos del ventrículo lateral inyectado.* ***PC****: plexos coroideos,* ***VL****: ventrículo lateral.*

4.3.6 Implicación del sistema del complemento en la degeneración de tractos mielínicos

Disponiendo del material histológico y los anticuerpos necesarios, se quiso indagar en la posible participación del sistema del complemento en la degeneración vacuolar observada en los tractos mielínicos. Para ello se intentó detectar la presencia de complejos antígeno-anticuerpo y MAC en las regiones afectadas, y se analizó la presencia de degeneración en los tractos mielínicos de ratas C6$^{-/-}$ inyectadas con NA.

4.3.6.1 Detección de MAC en los tractos degenerados

Como puede observarse en la fig. R-66, no se detectaron depósitos de MAC en las zonas afectadas por la degeneración en la estría medular y el fórnix de ratas inyectadas y sacrificadas 7 días posinyección de neuraminidasa. Tampoco se detectaron en estas regiones depósitos de IgG sobre la mielina o las células (fig. R-66 D).

4.3.6.2 Análisis de la degeneración en tractos mielínicos tras la inyección ICV de anafilotoxina C5a en ratas

El estudio mediante tinción hematoxilina-eosina de cortes procedentes de animales inyectados con anafilotoxina C5a y sacrificados 7 días después, no mostró alteraciones de las fibras mielínicas tal como ocurría en el caso de la inyección con NA. En este caso, tanto la estría medular, la fimbria-fórnix y el quiasma óptico no presentaron signos de degeneración vacuolar, siendo su aspecto similar a los de ratas control no inyectadas (fig. R-67).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

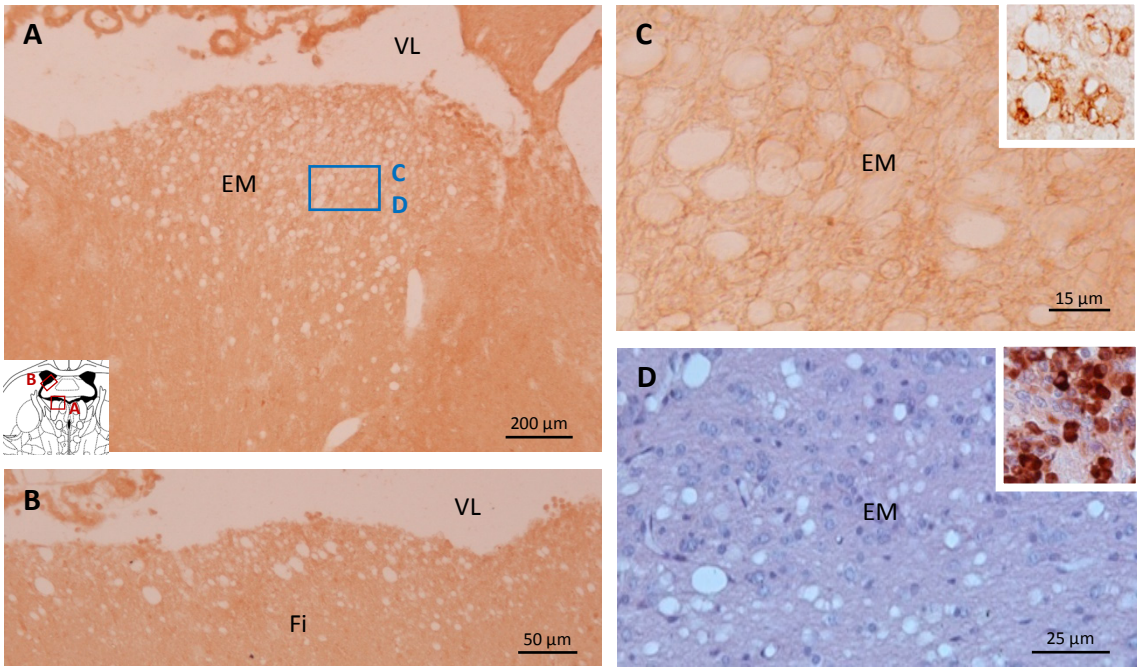


Figura R-66. Inmunohistoquímica con anti-C5b-9 y anti-IgG de rata en tractos mielínicos afectados por la degeneración. A-C: *tinción inmunohistoquímica con anti-C5b-9, sobre cortes Bouin-parafina de 7 µm de espesor procedentes de ratas sacrificadas 7 días posinyección de NA. No se detectó deposición de complejos C5b-9 en las regiones degeneradas de estría medular (**A** y **C**) y fimbria (**B**). **Recuadro en C**: control positivo para C5b-9. Ganglio linfático inflamado. **D:** tinción inmunohistoquímica con anti-IgG de rata, sobre el mismo material, donde se observa la ausencia de depósitos de IgG. Contraste hematoxilina-eosina. **Recuadro en D:** control positivo para IgG. Linfocitos B en amígdala palatina. **Fi**: fimbria, **VL**: ventrículo lateral, **EM**: estría medular.*

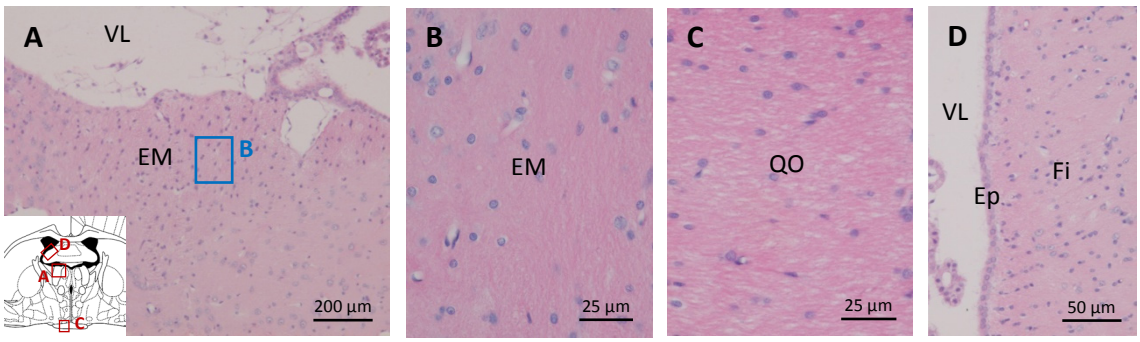


Figura R-67. Efecto de la inyección ICV de C5a sobre los tractos mielínicos. *Cortes Bouin-parafina de rata inyectada con anafilotoxina C5a y sacrificada 7 días posinyección. Tinción hematoxilina eosina. **A:** estría medular ipsilateral. **B:** detalle de la estría medular encuadrado en A. **C**: detalle del quiasma óptico. **D**: fimbria y epéndimo del lado ipsilateral. En todos los casos hubo ausencia de degeneración en los tractos mielínicos. **EM**: estría medular, **VL**: ventrículo lateral, **Ep**: epéndimo, **QO**: quiasma óptico, **Fi**: fimbria.*

4.3.6.3 Análisis de la degeneración de tractos mielínicos en ratas con inhibición sistémica de C5 y ratas C6$^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa

Al analizar mediante tinción hematoxilina-eosina los cortes procedentes de ratas tratadas con inhibidor de C5 y sacrificadas 7 días después de la inyección de NA, se pudo observar un grado de degeneración de los tractos mielínicos semejante al de ratas inyectadas con NA no tratadas con inhibidor (fig. R-68).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

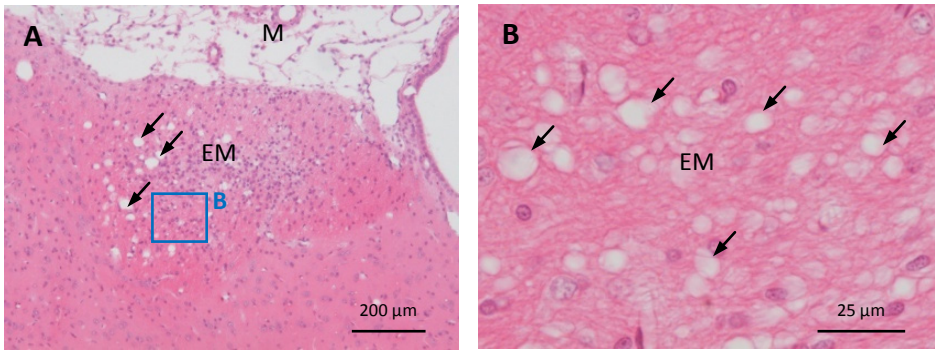


Figura R-68. Degeneración de tractos mielínicos en ratas con inhibición sistémica de C5 inyectadas con neuraminidasa*. Cortes Bouin-parafina de rata con inhibición sistémica de C5, inyectada con una mezcla de NA e inhibidor de C5 y sacrificada 7 días posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *estría medular ipsilateral. Se detectan regiones degeneradas igual que en el caso de ratas sin inhibición de C5 inyectadas con NA.* ***B:*** *detalle de la estría medular encuadrado en A.* ***M****: meninges,* ***EM****: estría medular,* ***flechas****: signos de degeneración.*

El estudio del material histológico obtenido de ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con NA y sacrificadas 7 días después, mediante tinción general hematoxilina-eosina, reveló la presencia de degeneración vacuolar en los mismos tractos que se ven afectados en ratas de fenotipo salvaje inyectadas con el enzima (fig. R-69). La intensidad y tamaño de las lesiones fueron muy similares a las observadas en las ratas controles, dependiendo, al igual que en estas, de la dosis de NA administrada, el tiempo transcurrido y de la cercanía al lugar de inyección.

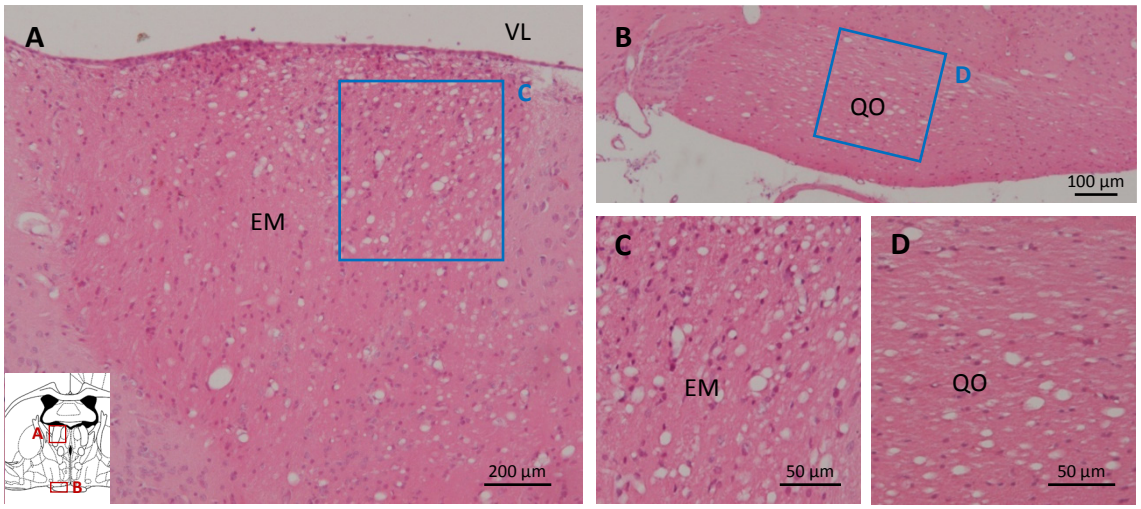


Figura R-69. Degeneración de tractos mielínicos en ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa. *Cortes PFA-parafina procedentes de ratas $C6^{-/-}$ inyectadas con neuraminidasa y sacrificadas 7 días posinyección. Tinción hematoxilina eosina.* ***A:*** *estría medular ipsilateral.* ***B:*** *mitad ipsilateral del quiasma óptico.* ***C:*** *detalle de la estría medular encuadrado en A. Se aprecia degeneración espongiforme en la mielina, semejante a la encontrada en ratas de fenotipo salvaje inyectadas con neuraminidasa.* ***D:*** *Detalle del quiasma óptico encuadrado en B. Se observa degeneración en los haces mielínicos.* ***EM****: estría medular,* ***VL****: ventrículo lateral,* ***QO****: quiasma óptico.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. DISCUSIÓN

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

5.1 LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE NEURAMINIDASA PROVOCA DAÑO EPENDIMARIO, INFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DE TRACTOS MIELÍNICOS

La presente Tesis Doctoral aporta un mayor conocimiento de los procesos inflamatorios y degenerativos provocados por la inyección ICV de NA en rata, investigando la implicación del sistema del complemento en dichos fenómenos y prestando especial atención a su participación en el daño producido sobre el epitelio ependimario.

El modelo de lesión ependimaria empleado en el presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad de Málaga (Grondona y col., 1996) y ha sido utilizado en varios estudios llevados a cabo tanto en nuestro laboratorio (Gomez-Roldan y col., 2008; Grondona y col., 1998; Pérez-Martín, 2000), como en otros (Carbonell y col., 2005). En todos los casos se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a la destrucción de las células ependimarias.

Desde el punto de vista neuroinflamatorio, el modelo aquí descrito podría dividirse en cuatro etapas:

1) Desde el momento de la inyección ICV hasta las 3 - 4 h. En este periodo el enzima NA desarrolla la mayor parte de su actividad enzimática, eliminando el ácido siálico de la superficie ependimaria y de una amplia región del parénquima nervioso alrededor del ventrículo inyectado. Se produce la activación del sistema del complemento y de las células inmunocompetentes locales, así como la muerte y desprendimiento de parte del epitelio ependimario.

2) Desde las 3 - 4 h hasta las 24 h posinyección. Comienza la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo. Estos inundan ventrículos, plexos coroideos, meninges, y algunas regiones del parénquima nervioso, alcanzándose una pleocitosis máxima entre las 12 y las 24 h.

3) Desde las 24 h hasta los 7 días posinyección. La presencia de leucocitos comienza a disminuir rápidamente, sucediéndose distintas poblaciones especializadas (macrófagos, linfocitos T, linfocitos B…). Comienza entonces a detectarse la vacuolización de ciertos tractos mielínicos.

4) A partir de los 7 días posinyección. La respuesta inmune celular prácticamente ha revertido. La degeneración observada en los tractos mielínicos es máxima, comenzando a partir de entonces su reparación, que estará prácticamente concluida a los 15 días de la inyección. El epitelio ependimario dañado, en cambio, no se recupera, dando lugar a cicatrices permanentes.

5.1.1 Desialización de la superficie ependimaria y penetración de la neuraminidasa en el parénquima periventricular

Diversos estudios relativos a la consolidación de este modelo pusieron de manifiesto que los efectos observados en los tejidos periventriculares tras la inyección de NA de *Clostridium perfringens* eran debidos a la actividad de este enzima y no a la metodología empleada para llevar a cabo la inoculación. La inyección de ratas con el vehículo (diluyente) del enzima, usada como control en este trabajo (*sham-operated rats*), así como la inyección de anticuerpos y moléculas trazadoras (Cifuentes y

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

col., 1992; Cifuentes y col., 1994; Fernández-Llebrez y col., 1993), o de NA inactiva (Pérez-Martín, 2000; datos sin publicar) no provocan desialización, inflamación ni degeneración semejantes a las observadas tras la inoculación de NA.

La NA es una exoglucosidasa que actúa eliminando residuos de ácido siálico de cadenas glucídicas localizados en posición terminal (Corfield y col., 1992). Normalmente este ácido siálico va seguido de un residuo de galactosa, tanto en las glucoproteínas como en los glucolípidos (Ej.: en el glucocálix epitelial, el endotelio o la mielina) (Varki, 1992), por lo que la actuación del enzima puede ser comprobada mediante la tinción histoquímica con lectinas de unión específica a ácido siálico o a galactosa.

Mediante el uso de estas lectinas pudimos comprobar cómo, efectivamente, la NA usada tanto en las incubaciones sobre tejido como en las inyecciones ICV, eliminó el ácido siálico terminal del glucocálix de las células ependimarias, dejando expuestos residuos de galactosa terminales, sólo en el ventrículo inyectado y no en el contralateral. Además, esto ocurría inmediatamente tras la inoculación, pues el efecto se observaba ya en los animales sacrificados 0 h tras la inyección (15 min reales, teniendo en cuenta el tiempo de preparación para la fijación por perfusión vascular).

Además de la desialización de la superficie ependimaria, se pudo comprobar que el enzima penetra en el parénquima nervioso a través del epitelio ependimario, actuando sobre una región de tejido alrededor del ventrículo inyectado. El epéndimo permite el paso de macromoléculas a través de sus espacios intercelulares hacia el parénquima (Cifuentes y col., 1992; Del Bigio, 1995; Gotow y col., 1979). En trabajos previos con este modelo (Gomez-Roldan y col., 2008) ya se pudo observar que la NA de *Clostridium perfringens*, proteína de 56 kDa de peso molecular, podía difundir por los espacios intercelulares y penetrar varias decenas e incluso centenares de micrómetros en el tejido periventricular. Así lo demuestran las tinciones histoquímicas con lectinas, en las que se puede observar un área de desialización alrededor del ventrículo lateral inyectado y de gran parte del tercer ventrículo. Esta zona incluye prácticamente la totalidad del subepéndimo, así como ciertos tractos mielínicos como el cuerpo calloso, la estría medular, la fimbria y el fórnix alrededor del ventrículo lateral inyectado, además de parte del quiasma óptico, aquella que se encuentra en la zona ventral al tercer ventrículo. La desialización producida en estos tractos podría estar relacionada con la degeneración vacuolar observada a medio plazo en los animales inyectados, como analizaremos más adelante.

5.1.2 Muerte y desprendimiento de algunas células del epitelio ependimario

El estudio histológico de los cortes de cerebro mediante tinción con hematoxilina-eosina mostró que la dosis de NA empleada en la inyección ICV (una dosis menor respecto a la utilizada anteriormente en otros trabajos) producía daños en el epéndimo del ventrículo inyectado, pero no afectaba al epitelio del ventrículo contralateral, ni provocaba estenosis del acueducto cerebral e hidrocefalia. El daño en el epéndimo se produjo siempre con anterioridad a la aparición de las primeras células inflamatorias, por lo que se deduce que el agente causal de tal lesión y muerte celular no pudo ser la reacción

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inmunológica celular. El trabajo publicado por Gomez-Roldan y col., 2008 apoya estos resultados.

La tinción con hematoxilina-eosina no permite asegurar con total precisión qué proceso, entre necrosis o apoptosis, se corresponde con la muerte de las células ependimarias afectadas. Sin embargo, la morfología celular, el aumento de la eosinofilia del citoplasma y el aspecto picnótico de los núcleos parecen indicar que se trata de un proceso principalmente necrótico. Las tinciones IHQ con anti-CASP3 sobre cortes procedentes de ratas inyectadas no mostraron positividad para este marcador de apoptosis sobre el epitelio ependimario dañado. Estudios anteriores (Pérez-Martín, 2000) en los que se comprobó la ausencia de núcleos apoptóticos mediante la técnica TUNEL (del inglés, *TdT-mediated x-dUTP nick end labeling*) y la presencia de indicadores de necrosis celular bajo observación a microscopía electrónica, apoyan la hipótesis de que el proceso es fundamentalmente necrótico.

Según nuestros resultados, entre las 2 y las 4 h posinyección comienza a producirse el desprendimiento de algunas células del epitelio, dando lugar a zonas que comunican el LCR con el parénquima nervioso, además de un conjunto de restos celulares en el ventrículo. Estos restos serán posteriormente eliminados en su mayoría por macrófagos residentes (epiplexus) y fagocitos reclutados que, según parece, se extravasan desde los plexos coroideos. Mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos específicos se pudieron identificar las células ependimarias desprendidas en aquellos casos en los que la acción de la NA y el tiempo transcurrido hasta la fijación del tejido produjeron desprendimientos en la línea epitelial. En vista de estos resultados se eligieron los tiempos experimentales 0 h y 2 h posinyección como los idóneos para llevar a cabo los estudios del objetivo 2 (implicación del complemento).

Los desprendimientos epiteliales correspondieron siempre a células ependimarias ciliadas cuboidales de las paredes ventriculares, pero nunca a células ependimarias de los plexos coroideos. A diferencia de las anteriores, los ependimocitos de los plexos presentan uniones estrechas (Petrov y col., 1994) que impiden el paso del enzima hacia los espacios laterales y basales del epitelio. Luego cabe pensar que la llegada del enzima NA a estos espacios en el epitelio ependimario de la pared ventricular esté relacionada con la causa del desprendimiento. Es sabido que la presencia de cadenas de oligosacáridos ricos en ácido siálico y, posiblemente, su carga negativa, juega un papel importante en las interacciones célula-célula y célula-matriz (Kelm y col., 1997). Se ha descrito que varias moléculas de adhesión intercelular desarrollan su función uniéndose específicamente a carbohidratos de membrana ricos en ácido siálico, como las sialoadhesinas, las selectinas (Tedder y col., 1995) o la glucoproteína asociada a la mielina (Collins y col., 1997; Kelm y col., 1994). La presencia de este tipo de uniones no ha sido estudiada a fondo en el epitelio ependimario, pero su frecuencia en el SNC hace pensar que es probable que alguna de ellas intervenga en la estabilidad de las uniones entre las células ependimarias contiguas, y entre estas y el subepéndimo. Si esto fuese así, la NA podría estar alterando la función adhesiva de dichas glucoproteínas y glucolípidos cuya presencia se ha descrito en las paredes basolaterales de las células ependimarias (Figarella-Branger y col., 1995; Kuchler y col., 1994). Sin embargo, el desprendimiento de las células ependimarias no es la causa de la necrosis de las mismas,

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

puesto que la muerte de las células precede siempre a la separación de estas del neuropilo subyacente. Además, dos situaciones experimentales en las que se provoca el desprendimiento ependimario: 1) la inyección experimental de tripsina en el ventrículo (Pérez-Martín, 2000; datos no publicados) y, 2) el aislamiento de células ependimarias *in vitro* mediante métodos enzimáticos (Grondona y col., 2013), no provocan nunca la muerte de dichas células.

Otra hipótesis sobre un posible agente causal de la muerte ependimaria que debemos contemplar es la de altas concentraciones de citocinas proinflamatorias como TNFα. Sobre un modelo de lesión ependimaria semejante al nuestro, consistente en la inyección de proteína Tat de lentivirus en el ventrículo lateral, se demostró que la muerte ependimaria que acompañaba a la reacción inflamatoria provocada por la presencia de Tat en el ventrículo podía evitarse mediante la administración de pentoxifilina, un inhibidor de la síntesis de TNFα (Han y col., 1990; Noel y col., 1990; Philippon y col., 1994). Sin embargo, la rapidez con la que se produce la muerte ependimaria en nuestro modelo (2 h) parece indicar un factor más inmediato, puesto que, aunque TNFα es efectivamente un factor producido por las propias células ependimarias a las 4 h de un estímulo infectivo (Kim y col., 2004), no es probable la producción de este factor de forma tan rápida y masiva como para tener efectos nocivos en el epitelio. Además, su producción no ha sido detectada en nuestro modelo mediante técnicas IHQ a tiempos cortos (0 - 4 h) (datos no mostrados). Por otra parte, las células inflamatorias también producen TNFα, pero su llegada ocurre siempre después de la muerte y desprendimiento ependimario.

Una posibilidad más para explicar la muerte de las células ependimarias tras el tratamiento con NA sería la contaminación de estos preparados con toxinas y proteasas procedentes de *Clostridium perfringens*. Este fenómeno ya fue estudiado por algunos grupos de investigación en los años 70, tras la frecuente detección de citotoxicidad en los preparados comerciales de NA procedente de *C. perfringens* mediante cromatografía de afinidad (Den y col., 1975). Sin embargo, las técnicas de purificación actuales consiguen extractos con una actividad proteolítica promedio menor al 0,1%, como es el caso de la NA usada en este estudio (Roche, ref. 11585886001). Además, la inyección ICV de enzimas NA procedentes de otras especies bacterianas, como *Arthrobacter ureafaciens* (Pérez-Martín, 2000), o de especies víricas como el virus de Newcastle (Pérez-Martín, 2000) o el virus de la gripe, dan lugar a los mismos efectos. Todo ello nos lleva a descartar esta posibilidad.

Así pues, las inyecciones ICV con NA vírica procedente de influenzavirus H1N1 realizadas en este trabajo mostraron unos efectos muy similares a los provocados por NA de *C. perfringens* en el ventrículo. Las tinciones generales con hematoxilina eosina, histoquímicas con lectinas, e inmunohistoquímicas, mostraron los mismos efectos en desialización, muerte epitelial, inflamación y degeneración vacuolar de tractos mielínicos, en las mismas regiones y los mismos tiempos. Como vimos en introducción, estos enzimas comparten actividad, pero no exactamente la misma estructura molecular (epígrafe 1.3.1). Inyecciones realizadas con endoglucosidasa (Endo-F3), un enzima que elimina por completo el árbol glucídico de muchas glucoproteínas y glucolípidos, también causan efectos similares (no mostrados). Estos hechos apoyan la hipótesis de que es la actividad enzimática

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(eliminación del ácido siálico) la que, mediante un mecanismo desconocido, provoca los efectos inflamatorios, y no la presencia de una proteína extraña (antígeno) en el SNC. En este sentido, la inyección de trazadores proteicos como la peroxidasa de rábano, que no provoca la lesión y reacción inflamatoria observada en nuestro modelo, apoya este razonamiento (Cifuentes y col., 1992).

Respecto a las posibilidades de un efecto de citotoxicidad o de alteración de la membrana plasmática propio de la NA, los ensayos hemolíticos realizados en este trabajo mostraron que ni la NA bacteriana ni la vírica causaban hemólisis cuando actúan con una actividad menor o igual a 25 mU/µl. De igual modo, los ensayos análogos realizados sobre células ependimarias aisladas tan sólo mostraron una ligera disminución en la viabilidad celular en aquellos medios en los que se había añadido NA a una actividad enzimática de 5 mU/µl o mayor, pero esta no era estadísticamente significativa, por lo que tendríamos que aumentar el número de réplicas del experimento con el fin de comprobar si dicha tendencia se confirma. Según nuestros cálculos (epígrafe 3.4.1), la inyección ICV de NA practicada en este trabajo provoca que el enzima actúe sobre la pared del ventrículo con una concentración media aproximada de 4 - 5 mU/µl. En contraste con del experimento con células ependimarias aisladas, se detectó un daño ependimario claro en los ensayos *in vitro* con explantes sometidos a dicha dosis de enzima. Esto nos hace pensar en un efecto citotóxico que pudiera estar afectando a las interacciones y uniones célula-célula. Por ello, contemplamos ampliar este estudio en el futuro.

La hipótesis de la participación del sistema del complemento en la muerte ependimaria provocada por NA se presentaba como la más probable de todas las analizadas, estando firmemente respaldada por los antecedentes bibliográficos (epígrafe 2.2). Brevemente, la presencia de forma completa y funcional de los factores del complemento en el LCR posibilita su actuación en el seno del sistema ventricular y sobre el epitelio ependimario (Casarsa y col., 2003; Gasque y col., 2000; Stahel y col., 1998). La eliminación del ácido siálico de la superficie de distintos tipos celulares como eritrocitos o células cancerosas ha demostrado aumentar su sensibilidad al ataque del complemento (Donin y col., 2003; Pangburn, 2000). Por otro lado, se ha descrito la capacidad del enzima NA para activar al sistema del complemento humano (Fujita y col., 1999). Desarrollaremos esta hipótesis y el análisis de sus resultados experimentales en el epígrafe 5.2.

5.1.3 Inflamación ventricular y meníngea posterior a la muerte ependimaria

Entre 3 y 4 h tras la inyección ICV de NA comienza una reacción inflamatoria en las inmediaciones del ventrículo inyectado. Esta se inicia con la activación de células residentes, principalmente la microglía subependimaria, detectada mediante un aumento significativo del área ocupada por las células IBA1+ alrededor del ventrículo lateral inyectado; y se continúa con la llegada de células inflamatorias reclutadas desde el torrente sanguíneo, en su mayoría neutrófilos (marcador MPO) y macrófagos (marcadores IL1β y CD163), que se observan principalmente en los plexos coroideos, los espacios meníngeos y la superficie ependimaria, aunque también se han localizado en el parénquima nervioso cercano al ventrículo y en los espacios perivasculares de los grandes vasos. El transcurso de la

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

reacción inflamatoria provocada por la inyección de complejos C5b-9 en el ventrículo lateral sigue este mismo patrón respecto a la llegada de las poblaciones de células inflamatorias (Casarsa y col., 2003).

La activación de la microglía, concretamente de la localizada en el subepéndimo, parece ser la primera respuesta inflamatoria al daño provocado por la NA, jugando un papel crucial en el inicio del proceso inflamatorio. Es una de las poblaciones celulares, con capacidad inflamatoria, más cercana al foco de la lesión, activándose rápidamente y movilizándose en respuesta a la inyección del enzima. Modelos de inyecciones ICV similares, con rodamina y con proteína Tat del VIH-1, han demostrado la capacidad de la microglía subependimaria para activarse en respuesta a lesiones periventriculares, migrar hacia el parénquima y hacia el ventrículo, y contribuir a las labores de limpieza de los restos celulares mediante fagocitosis (Carbonell y col., 2005).

Entre las causas de esta activación microglial podemos contemplar varias posibilidades:

1) Una acción directa del enzima sobre las células microgliales. Las tinciones mediante lectinas demuestran que la NA penetra y desarrolla su actividad enzimática en una amplia región del subepéndimo. La desialización de ciertas glucoproteínas de la superficie celular podría estar provocando la activación de estas células y su inducción a producir citocinas proinflamatorias, como ya ha sido descrito en otras células como los monocitos (Stamatos y col., 2004).

2) Una respuesta a moléculas proinflamatorias producidas por el epéndimo como consecuencia de la presencia de NA. Se ha demostrado que este enzima incrementa la producción de IL8 en las células epiteliales pulmonares (Kuroiwa y col., 2009). Este fenómeno podría estar ocurriendo en las células epiteliales que conforman el epéndimo, pues comparten muchas características con el epitelio ciliado de los conductos respiratorios. Un objetivo enmarcado en los proyectos que continuaran el presente trabajo en el futuro será comprobar la producción de IL8 por parte del epitelio ependimario en nuestro modelo de inflamación.

3) Una respuesta a los factores derivados de la muerte ependimaria. La necrosis ependimaria libera factores y moléculas propias del interior celular al LCR. Estas podrían actuar como señalizadores de daño tisular (citocinas proinflamatorias) (Chen y col., 2007; Majno y col., 1960). Por ejemplo, se ha descrito que la libración de IL1α procedente del interior de células muertas participa en la generación de la respuesta inflamatoria (Eigenbrod y col., 2008), y su bloqueo mediante anticuerpos inhibe significativamente la respuesta inflamatoria neutrofílica causada por necrosis (Chen y col., 2007). También se ha descrito una estrecha relación entre la concentración de ácido siálico libre en el suero con el daño celular sufrido por pacientes con infarto de miocardio (Süer Gökmen y col., 2006), por lo que cabe pensar que quizás los residuos de ácido siálico liberados de la superficie ependimaria pudieran estar teniendo un efecto señalizador en el LCR. Sin embargo, inyecciones preliminares con Endo-F3 (resultados no mostrados), un enzima que escinde el árbol glucídico completo de la superficie ependimaria, han mostrado que esta provoca el mismo grado de inflamación posterior, sin que su actuación conlleve la liberación de residuos de ácido siálico libre al LCR.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4) Una activación provocada por anafilotoxinas u otros factores derivados de la activación del complemento. La NA parece ejercer una acción activadora sobre las moléculas del complemento (Fujita y col., 1999), por lo tanto, es posible que ocurra la liberación de anafilotoxinas como C5a en el LCR, un péptido con potente actividad quimiotáctica y proinflamatoria. Estas moléculas llevan a cabo el papel señalizador de cara a la reacción inflamatoria. Si bien se ha descartado que cantidades menores de 0,5 µg/ml de C5a en el ventrículo lateral provoquen reacción inflamatoria (Casarsa y col., 2003), dosis superiores inyectadas en el LCR de conejos provocan una rápida invasión de leucocitos en los ventrículos cerebrales (Kadurugamuwa y col., 1989). En un futuro, uno de nuestros objetivos será analizar cuantitativamente la presencia de estas moléculas en el LCR de ratas inyectadas con NA. También se ha visto que concentraciones inferiores al umbral lítico del complejo C5b-9 pueden desempeñar un papel estimulador en cultivos de células gliales, induciendo la producción de mediadores inflamatorios como el ácido araquidónico y derivados como el leucotrieno B_4 (Shirazi y col., 1989). También se ha sugerido que los complejos C5b-9 podrían tener un rol en la síntesis de IL1β por parte de los plexos coroideos (Casarsa y col., 2003; Hoffman y col., 2007). Cabría por tanto la posibilidad de que la dinámica del LCR diese lugar a regiones del ventrículo donde la dilución del complejo C5b-9 indujese la liberación de estos mediadores inflamatorios por parte de las células gliales de la zona. Sin embargo, la inflamación observada en las ratas $C6^{-/-}$ (incapaces de generar tales complejos) inyectadas con NA nos hace descartar al complejo C5b-9 como principal factor iniciador de la inflamación. Esta observación no exime sin embargo a C5a de desempeñar tal papel, pues la ausencia del factor C6 no afecta a la liberación de esta anafilotoxina.

5) Una activación mediada por receptores tipo Toll (TLR). La variedad de los TLR expresados por las células gliales y las cascadas de señalización asociadas a su activación son determinantes en la respuesta inflamatoria que ocurren en el SNC (Jack y col., 2005). La microglía presenta varios de estos receptores de patrones en su superficie (Glass y col., 2010), secretando mediadores inflamatorios como TNFα e IL1β en respuesta a su activación (Takeda y col., 2004), e induciendo así el comienzo de la respuesta inflamatoria (Saijo y col., 2009). La especificidad de los TLR por diferentes moléculas asociadas a patógenos confiere la capacidad para adaptar la respuesta inmune innata al estímulo concreto de activación (Jack y col., 2005). Si bien no se ha descrito el reconocimiento específico de la NA por parte de ningún TLR conocido, se ha especulado que la desialización previa puede sensibilizar las células para generar una respuesta inflamatoria mejorada tras la exposición a ligandos de TLR, tales como LPS, en un modelo murino de lesión pulmonar aguda (Feng y col., 2013). Una de las vías de continuación de la presente Tesis Doctoral en el futuro será el estudio de la interacción NA-TLR en nuestro modelo de neuroinflamación.

Otra población celular residente en el entorno ventricular que podría estar relacionada con la iniciación de la respuesta inflamatoria son los macrófagos epiplexus o células de Kolmer (Kolmer, 1921). Estas células, presentes en la superficie de los plexos coroideos, y por tanto, en contacto directo con el LCR, podrían ser las primeras en detectar la presencia/acción de la NA, activándose y dando lugar a la generación de citocinas proinflamatorias propias de los macrófagos (Engelhardt y col., 2001), como IL1β.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El aumento de expresión de esta citocina fue detectado en estas células y en un gran número de células microgliales subependimarias justo antes de la llegada masiva de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo.

Junto a la activación microglial, en torno a las 4 h de la inyección, también se produce la invasión de los plexos, ventrículo y meninges por poblaciones de neutrófilos y en menor medida macrófagos. Esta llegada de macrófagos foráneos podría explicar el rápido aumento del área IBA1+ observado a las 4 h de la inyección de NA. El máximo observado a los 7 días correspondería a la activación de la mayor parte de la microglía residente en el parénquima, explicándose así los dos picos detectados en el marcaje IBA1+. Otra posible explicación para la disminución del marcaje IBA1+ observada a las 24 h podría ser que, coincidiendo con la etapa de mayor infiltración de células foráneas (12 - 24 h), esto relajase la presión de activación sobre las células microgliales residentes.

De forma paralela a esta invasión de células del sistema inmune se detectó un aumento de la expresión de ICAM1 en los plexos y en los vasos sanguíneos cercanos al ventrículo lateral inyectado. ICAM1 es un factor clave en el reclutamiento de leucocitos desde el torrente sanguíneo (Lyck y col., 2003). El aumento de su expresión en los vasos endoteliales de las regiones del cerebro afectadas por un proceso inflamatorio ya ha sido descrito (Dietrich, 2002; Engelhardt y col., 1994; Greenwood y col., 2002). En nuestro caso, y de acuerdo con la bibliografía (Alvarez y col., 2006; Ransohoff y col., 2003), los principales vasos implicados en la extravasación son las vénulas de las leptomeninges, del plexo coroideo y del subepéndimo alrededor del ventrículo lateral y el agujero de Monro. Interesantemente, estos vasos coinciden con la región de mayor expresión de receptores para IL1β (Konsman y col., 2004) y para otros mediadores inflamatorios como TNFα (Nadeau y col., 1999). También observamos indicios de una extravasación de menor calibre en vasos del parénquima nervioso de la zona afectada por la inyección de NA. El incremento de moléculas de adhesión como ICAM1 en los vasos de los plexos coroideos en otros modelos de neuroinflamación (Casarsa y col., 2003), o la migración leucocitaria descrita en los plexos coroideos en condiciones inflamatorias (Petito y col., 2005), están en consonancia con nuestras observaciones. Además, nuestros resultados muestran que ICAM1 no sólo se expresa en las células endoteliales, sino también, tal como ha sido descrito, en la superficie de los plexos coroideos (Steffen y col., 1996; Wolburg y col., 1999) y en el epéndimo (Lopez y col., 1999). Es probable, por tanto, que ICAM1 juegue también un papel importante en el traspaso de la barrera sangre-LCR a través de los plexos coroideos y del epéndimo multiciliado que recubre los ventrículos cerebrales. En este sentido, la expresión de ICAM1 observada en la superficie de algunas células inflamatorias (principalmente IBA1+) podría hablar a favor de esa función, sugiriendo un papel importante de esta molécula de adhesión en la movilidad, no sólo de las células inmunocompetentes procedentes de los vasos sanguíneos, sino también de las células microgliales.

La primera población infiltrada y la más abundante se corresponde con neutrófilos MPO+, seguida de una población de macrófagos IL1β+. Ambas alcanzan su mayor presencia en el ventrículo entre las 4 y las 12 h posinyección, siendo su número menor a las 24 h y prácticamente nulo 7 días

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

después. Nuestros recuentos mostraron cifras muy similares a las detalladas en otros modelos de inflamación ventricular, en los que se describieron poblaciones de leucocitos polimorfonucleares del 95% en torno a las 4 h, que posteriormente pasan a ser del 50% entre las 12 y las 24 h, debido a la disminución del número de neutrófilos y el aumento progresivo de macrófagos y linfocitos (Casarsa y col., 2003). A partir del séptimo día, las poblaciones infiltradas observadas fueron puramente linfocíticas. El 100% de células CD3ε+ encontradas a tiempo 0 h en los cortes estudiados es consistente con la bibliografía. Esto sería debido a que en circunstancias normales, el parénquima nervioso y el LCR contienen pocas células procedentes del sistema inmune (nuestros recuentos para la mayoría de las poblaciones leucocitarias fue cero), pero en proporción, la gran mayoría de ellas son linfocitos T de memoria (Kivisäkk y col., 2003; Kivisäkk y col., 2006), células que están específicamente involucradas en el proceso de vigilancia inmune basal del SNC (Wilson y col., 2010). Una vez desarrollada la inflamación, la mayoría de los linfocitos extravasados al tejido afectado fueron linfocitos T (CD3ε+), y de estos, la mayoría eran linfocitos T citotóxicos (CD8+), tal como ocurre también en otros modelos de neuroinflamación (Ma y col., 2006; Neumann y col., 2002).

Se contemplan varias hipótesis sobre cuál puede ser la señal que marque a la región ventricular para el reclutamiento de células inflamatorias del sistema inmune. A las ya descritas para la activación microglial, y que también serían aplicables a este fenómeno, habría que sumar varias posibilidades:

1) Por un lado, podría deberse a la acción que la NA tiene sobre los endotelios y los espacios perivasculares que circundan los ventrículos, regiones ricas en ácido siálico. En condiciones normales, el endotelio de los vasos en los que existe BHE y de los vasos de los plexos coroideos, expresa constitutivamente niveles basales de selectinas, integrinas y moléculas de adhesión como ICAM1 (Wolburg y col., 1999). Ante la inflamación del SNC, ya sea debido a respuestas autoinmunes, traumas mecánicos o infecciones, se produce una mayor expresión de estas moléculas (Carrithers y col., 2000; Deckert-Schlüter y col., 1994). En nuestro modelo se detectó un aumento significativo en la expresión de la molécula de adhesión ICAM1 en el endotelio de los vasos cercanos al ventrículo inyectado y en los plexos. Esto podría ser fruto, bien del efecto de la NA sobre las células endoteliales o una respuesta de estas a los factores proinflamatorios derivados de la activación microglial cercana (Carlos y col., 1994; Modur y col., 1996; Yusuf-Makagiansar y col., 2002). Los principales ligandos de ICAM1 son LFA-1 (del inglés, *Lymphocyte function-associated antigen 1*) y Mac-1 (del inglés, *Macrophage-1 antigen*), integrinas expresadas por linfocitos y monocitos/macrófagos respectivamente (Anderson y col., 2003; Yang y col., 2007). El epitelio de los plexos también podría estar implicado en la producción de citocinas y quimiocinas, bien por la acción directa de la NA, bien por mediación de las células de Kolmer. Las células coroideas estimuladas producen quimiocinas del tipo CXC, potentes quimioatrayentes de neutrófilos tales como CXCL1, CXCL2, y CXCL3. Estas quimiocinas son secretadas tanto apical como basolateralmente por el epitelio coroideo, lo que promueve la migración de los neutrófilos a través de las barreras epiteliales de la barrera sangre-LCR (Szmydynger-Chodobska y col., 2009).

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2) Por otro lado estaría el propio efecto de las citocinas producidas por la microglía activada. Como ya se comentó en introducción, la microglía activada secreta factores citotóxicos, moléculas de reclutamiento de macrófagos (quimiocinas CCL3 y CCL4) y de monocitos (quimiocinas CXCL8 y CCL2), M-CSF y moléculas de señalización proinflamatoria (Lue y col., 2001). Además, adquieren la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T CD4+, como los linfocitos Th1 y Th2, productores de IFNγ e IL4 respectivamente (Aloisi, 2001; Carson y col., 1998). En nuestro caso concreto, la evidencia más importante detectada en este sentido fue el incremento transitorio en la producción de IL1β por parte de la microglía subependimaria y los macrófagos ventriculares. Esta citocina podría ser la principal causante de la señalización proinflamatoria del ventrículo inyectado, promoviendo la activación de células cercanas y la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo. De hecho, se ha demostrado que la inyección de IL1β por sí misma es suficiente para inducir la inflamación (Masters y col., 2009).

Según nuestros resultados, la principal vía de entrada de las células inflamatorias foráneas al ventrículo lateral inyectado parece ser los plexos coroideos. A diferencia del endotelio que forma parte de la BHE en el parénquima nervioso, las células endoteliales fenestradas del plexo coroideo carecen de uniones estrechas que limiten la diapédesis de leucocitos. Por lo tanto, aunque las células inmunes que se extravasen tengan aún que atravesar el epitelio del plexo coroideo (este presenta las uniones estrechas), parece que esta estructura está especializada en permitir el rápido acceso de linfocitos al LCR (Wilson y col., 2010).

A parte de esta vía, nuestros resultados, en consonancia con la bibliografía, señalan el espacio subaracnoideo (que contiene LCR) en las meninges y el espacio perivascular de los vasos grandes y medianos del parénquima nervioso como las vías de entrada complementarias para las poblaciones de leucocitos que acuden al SNC tras la inyección de NA. Es importante destacar que, después de una lesión en el SNC, la activación de las células endoteliales y las células asociadas a estas, tales como los astrocitos, puede conducir a una reducción en la integridad de las uniones estrechas y la formación de vías transendoteliales (Lossinsky y col., 2004; Stamatovic y col., 2008), facilitando de este modo la migración de leucocitos a través la BHE en el cerebro hacia el parénquima nervioso (Wolburg y col., 2004; Wolburg y col., 2005).

En torno a las 4 h se detectaron células IL1β+, cuya morfología se asemejaba a la de células microgliales activadas, en contacto con la cara basal de las células ependimarias, e incluso localizadas en el seno de la línea epitelial. Esto da lugar a pensar en un posible movimiento transepitelial de estas células. Puesto que IL1β funciona como marcador tanto para macrófagos como para microglía, no se podría determinar con estos resultados si las células halladas en mitad del epitelio ependimario corresponden a microglía que está moviéndose hacia el ventrículo o macrófagos ventriculares que se están moviendo hacia el parénquima nervioso. Sin embargo, la inmunotinción con IBA1 (marcador de células microgliales) también pone de manifiesto células que aparentemente están atravesando el

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

epitelio, lo que nos hace pensar que es principalmente una parte de la microglía subependimaria la que se estaría moviendo hacia la luz del ventrículo.

Los neutrófilos inundan rápidamente el ventrículo lateral inyectado, las meninges y el interior de los plexos coroideos. Es bien sabido que estos leucocitos polimorfonucleares desempeñan un papel muy importante en la batalla contra los patógenos invasores mediante la producción de moléculas antimicrobianas e intermediarios reactivos de oxígeno (Nathan, 2006); sin embargo, ninguna célula MPO+ resultó positiva también al marcaje contra IL1β. Su papel en la neuroinflamación es principalmente agresivo, por lo que su infiltración masiva en el SNC tras la inyección de NA tiene sin duda el objetivo de eliminar el supuesto agente infeccioso causante del daño.

Los macrófagos infiltrados, sin embargo, parecen tener la misión de ayudar a la eliminación de los restos celulares generados tras la necrosis ependimaria. Estas células desempeñarían esta labor junto con las células microgliales de la región subependimaria, conformando una población de fagocitos que, como se observó en nuestros resultados, patrulla los límites del ventrículo lateral entre las 4 y las 24 h posinyección. De hecho, además de la población de macrófagos IL1β+, se detectó una población CD163+ (marcador ligado a la forma de activación M2) principalmente situada en la superficie ependimaria del ventrículo inyectado. Este marcador no mostró colocalización con IBA1, lo que descartaría la naturaleza microglial de estas células; y tampoco con IL1β, lo que apoya la idea de la dualidad de la población de macrófagos en sus formas de activación M1 y M2. No sabemos con certeza si la aparición de estas células CD163+ es consecuencia de la activación y reclutamiento de monocitos sanguíneos o se corresponden con macrófagos perivasculares procedentes del parénquima nervioso. Sin embargo, la ausencia de células CD163+ en el parénquima nervioso de animales sacrificados 0 h posinyección sugiere más probable la primera de las opciones.

Los mecanismos de entrada de macrófagos desde el torrente sanguíneo hacia el ventrículo y hacia el parénquima nervioso a través del epéndimo son aún poco conocidos (Amat-Peral y col., 1994; Man y col., 2007). La degradación de las proteínas de unión intercelular por metaloproteasas secretadas por las células invasoras o residentes parece ser esencial en este proceso (Agrawal y col., 2006). En el caso del paso a través de los plexos coroideos, se observó frecuentemente el fenómeno de emperipolesis. De esta forma se mantiene la integridad de la BHE formada por las uniones estrechas de las células de los plexos, ya que el paso de las células se realiza a través de vacuolas que atraviesan el citoplasma de las células. Esto permitiría mantener un alto nivel de control en el traspaso celular y minimizar las fugas de líquido extracelular entre ambos compartimentos.

La activación astrocitaria ocurre después de la microglial, y seguramente después también de la infiltración de gran parte de las células polimorfonucleares del sistema inmune. Esta activación se corresponde con un aumento en el número de astrocitos, cambios en su morfología, y un incremento en la expresión de GFAP, una proteína estructural específica de la glía (Escartin y col., 2008). En nuestro modelo, el primer aumento significativo (de entre los tiempos estudiados) del área GFAP+ se detectó a los 7 días de la inyección de NA. Esta activación sería probablemente consecuencia de procesos

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

señalizadores posteriores a la inyección, derivados de la activación microglial y la infiltración de las primeras células del sistema inmune. La mayor gliosis astrocitaria se produce en aquellas regiones desprovistas de epitelio ependimario, en donde dichas células conformarían una cicatriz glial, ya que el epitelio ependimario no regenera (Gomez-Roldan y col., 2008). Estos resultados sugieren que la activación astrocitaria tendría un propósito fundamentalmente reparador.

La contribución de los astrocitos a la respuesta inmune del cerebro mediante la producción de citocinas ha sido descrita en varios modelos (Krishnamoorthy y col., 2007). Además, modelos de esclerosis múltiple en roedores sugieren que los astrocitos podrían ser capaces de realizar la función de células presentadoras de antígeno a los linfocitos T (Fontana y col., 1984), resaltando el posible papel de estas células gliales en la respuesta inmune. Los astrocitos activos se han asociado frecuentemente con la migración de los linfocitos T, actuando como fuente de múltiples citocinas y quimiocinas durante la neuroinflamación (Nair y col., 2008). Estos datos sugieren que la activación astrocitaria podría ser el nexo de unión entre la primera infiltración de neutrófilos y macrófagos, y la posterior llegada de linfocitos observada en nuestro modelo.

La llegada de linfocitos es más tardía que la de neutrófilos y macrófagos. Esto podría explicarse, en parte, porque el reconocimiento de antígeno puede ser en ocasiones un nivel adicional de control requerido para la entrada y retención de linfocitos T en el SNC (Galea y col., 2007; Ling y col., 2006; Wilson y col., 2009). Si esto fuese así en nuestro modelo, la presencia de linfocitos dependería del reconocimiento de la NA como molécula extraña y su presentación como antígeno por parte de las células gliales. La entrada y permanencia de linfocitos T y B en el parénquima nervioso podría estar relacionada con los fenómenos degenerativos y desmielinizantes posteriores.

Los recuentos mostraron un aumento significativo de linfocitos T (CD3ε+) en torno a las 24 h posinyección, y de linfocitos B (PAX5+) en torno a los 7 días posinyección, en el ventrículo ipsilateral. Si bien la primera vía de entrada de los neutrófilos y macrófagos foráneos parecía ser los plexos coroideos, en el caso de los linfocitos T y B, nuestros recuentos celulares mostraron que el número de dichas células se incrementó en primer lugar alrededor de los vasos perifornicales, y después en los plexos coroideos. Esto apoyaría la hipótesis de la participación de los astrocitos del parénquima, estrechamente relacionados con la BHE perivascular, en el reclutamiento de linfocitos desde el torrente sanguíneo, probablemente a través de la liberación de citocinas y quimiocinas (Wilson y col., 2010).

En base a lo expuesto proponemos el esquema de la fig. D-01 para explicar la respuesta inflamatoria ventricular y meníngea acaecida tras la inyección de NA.

Como se comentó anteriormente, esta reacción inflamatoria es siempre posterior a la necrosis ependimaria, por lo que descartamos que la muerte de los ependimocitos esté mediada directamente por el propio sistema inmune celular del animal. Este hecho queda apoyado además por experimentos como la inyección de anticuerpos contra la fibra de Reissner (Cifuentes y col., 1994) o la inyección de anafilotoxina C5a realizada en este trabajo, tras las cuales se produce una reacción inflamatoria similar a la de nuestro modelo, pero quedando el epitelio ependimario intacto en todo momento.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

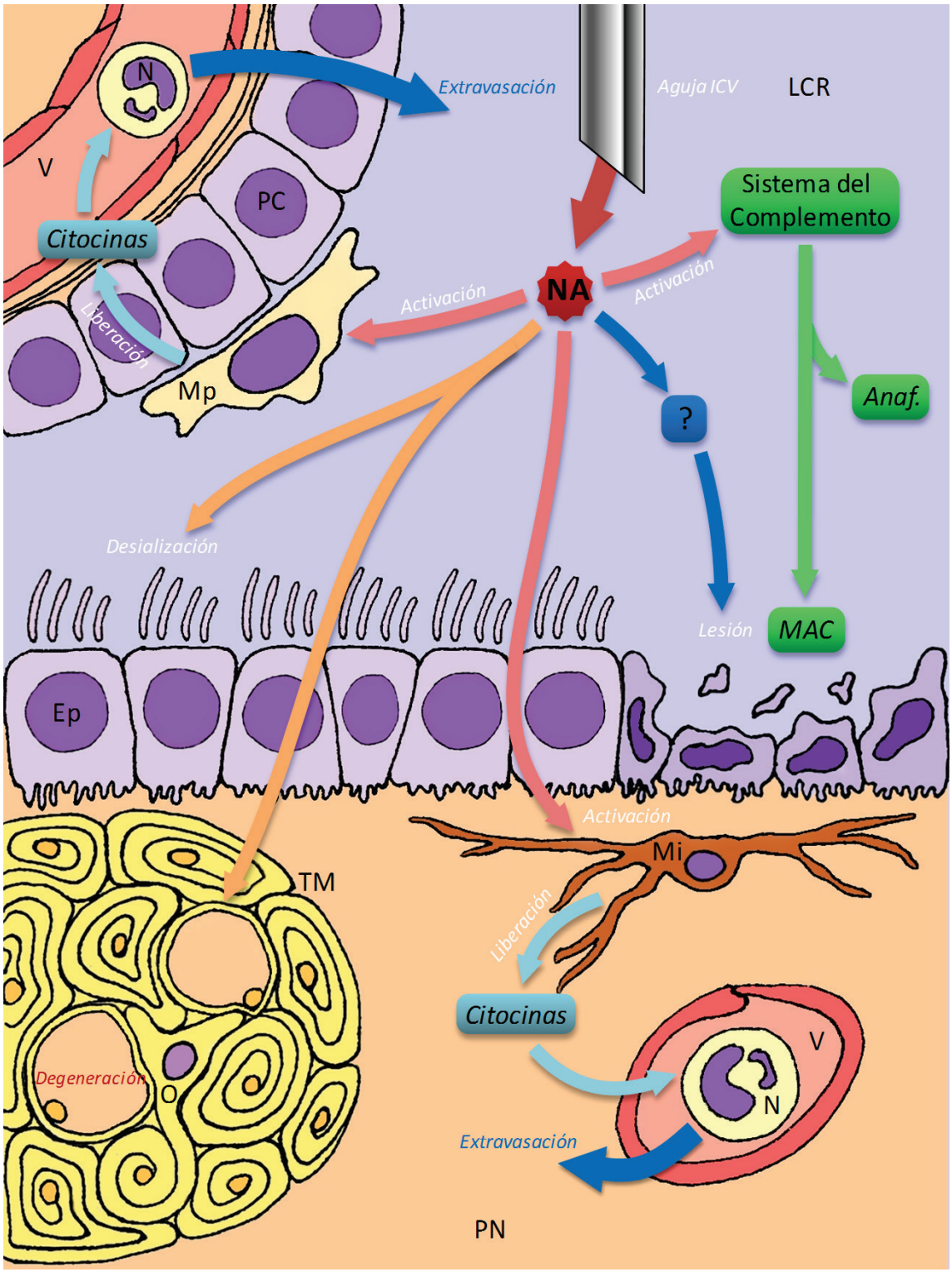


Figura D-01. Efectos de la inyección ICV de NA en el ventrículo de rata. *La NA inyectada inunda el LCR del ventrículo y penetra en el parénquima a través del epitelio ependimario, eliminando el ácido siálico del glucocálix de las células de este entorno, incluidas las células de tractos mielínicos cercanos, que padecerían la degeneración de parte de sus fibras mielínicas. Activa al sistema del complemento dando lugar a la generación de anafilotoxinas y el depósito de MAC sobre el epitelio dañado. Activa a la microglía subependimaria y los macrófagos periventriculares. Estas células darían lugar a citocinas que conducirían a la extravasación de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, desde los vasos.* ***ICV****: inyección intracerebroventricular,* ***NA****: neuraminidasa,* ***Ep****: epéndimo,* ***PC****: plexo coroideo,* ***LCR****: líquido cefalorraquídeo,* ***PN****: parénquima nervioso,* ***MAC****: complejo de ataque a la membrana,* ***Anaf.****: anafilotoxinas,* ***Mi****: microglía,* ***Mp****: macrófago periventricular,* ***O****: oligodendrocito,* ***N****: neutrófilo,* ***V****: vaso sanguíneo,* ***TM****: tracto mielínico.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Sin embargo, como ya se ha comentado, la infiltración de células procedentes del sistema inmune en el SNC está relacionada con numerosos casos de daño y muerte celular. La presencia de células inmunocompetentes en el parénquima nervioso podría provocar daños en el tejido neuronal (Glass y col., 2010). La importancia en el conocimiento de la etiología de los procesos inflamatorios del SNC, muchas veces provocados por infecciones previas que pudieron pasar desapercibidas, radica en su asociación con un gran número de enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes. La neuroinflamación es un proceso complejo que implica tanto a células del sistema inmune periférico como del SNC y juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades neurológicas. Como vimos en introducción, enfermedades como la esclerosis múltiple (Marrie y col., 2002), la esclerosis lateral amiotrófica (Molgaard y col., 1986), la enfermedad de Parkinson (Takahashi y col., 2001), la enfermedad de Alzheimer (Honjo y col., 2009), la esquizofrenia (Ebert y col., 2005) o la panencefalitis esclerosante subaguda (Sato, 1981) se han relacionado con la inflamación ocurrida durante invasiones previas del SNC a cargo de diferentes tipos de protozoos, hongos, bacterias y virus, algunos de ellos portadores de NA en sus cubiertas. Ciertos episodios de daño cerebral agudo como apoplejías, infecciones y lesiones traumáticas conllevan la infiltración de células inmunitarias periféricas y su interacción con células del SNC y del sistema inmune innato (Xie y col., 2010).

Al igual que en nuestro modelo, diversos estudios han demostrado la presencia de neutrófilos en el SNC bajo estas condiciones patológicas (Price y col., 2004; Shaftel y col., 2007; Tani y col., 1996; Zehntner y col., 2005; Zhou y col., 2003). Estas células son especialmente dañinas con el entorno, provocando la muerte de células circundantes mediante la producción de citocinas y factores citotóxicos (Liu y col., 2006; Romson y col., 1983). Su infiltración en el parénquima nervioso, como la que se observa en aquellas regiones de la pared ventricular desprovistas de epéndimo, podría estar relacionada con fenómenos degenerativos posteriores. Dada la gran abundancia de neutrófilos en el SNC durante la neuroinflamación y la no especificidad de los compuestos citotóxicos derivados de estos, se piensa que la acción defensiva de estas células en el huésped también puede mediar daños tisulares (Fujishima y col., 1995). Tanto es así, que en condiciones normales, la inflamación neutrofílica está altamente regulada, incluyendo la generación de citocinas antiinflamatorias y el control y disminución de las poblaciones de neutrófilos mediante inducción a la apoptosis (Kennedy y col., 2009). Además, se ha demostrado que la microglía podría intervenir induciendo la eliminación de neutrófilos invasores (Neumann y col., 2008).

Lo mismo ocurriría con los linfocitos T citotóxicos o linfocitos B. Estos últimos podrían estar progresando hacia el parénquima nervioso, favoreciendo la aparición de células B productoras de anticuerpos contra antígenos propios como la mielina, como ha sido descrito en algunas enfermedades neurodegenerativas (Frohman y col., 2006; Lassmann y col., 2001).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5.1.4 Degeneración de ciertos tractos mielínicos tras la inyección de neuraminidasa

Un efecto a medio plazo detectado tras la inyección de NA en el ventrículo lateral fue la degeneración vacuolar en ciertos tractos mielínicos del SNC. Este fenómeno ya había sido observado en estudios previos usando este modelo (Grondona y col., 1996; Pérez-Martín, 2000), pero no había sido analizado en profundidad. En dichos estudios, una dosis mayor de NA que la utilizada en este trabajo provocaba alteraciones en prácticamente la totalidad de los tractos mielínicos del cerebro. Este efecto fue más limitado en nuestro caso, al reducir la dosis de NA administrada.

Como fue descrito en resultados, este fenómeno se observó ya entre las 18 - 24 h posinyección como una ligera degeneración de algunos tractos mielínicos cercanos al ventrículo lateral inyectado. La degeneración vacuolar máxima fue observada entre los 5 - 7 días posinyección, afectando particularmente a los tractos locales, la fimbria-fórnix, el cuerpo calloso y la estría medular, aunque también se observó en tractos mielínicos más distantes al ventrículo lateral inyectado, como el quiasma óptico, y en algunos casos, la estría medular contralateral. Esta última observación podría ser causa, bien de la decusación de fibras nerviosas que ocurre entre los hemisferios cerebrales, o bien de la llegada de cierta cantidad de NA a la región medial del agujero de Monro que conecta el tercer ventrículo con el ventrículo contralateral (las tinciones con lectinas mostraron en ocasiones cierto grado de desialización ependimaria en esta región). A los 15 días de la inyección el daño observado en todos los haces era menor y a los 30 días no se observó degeneración alguna, presentando los tractos mielínicos un aspecto similar a los de ratas control no inyectadas con NA.

La naturaleza de la degeneración se determinó mediante el estudio de las regiones dañadas a microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y mediante tinciones inmunohistoquímicas. La degeneración observada a microscopía óptica mostraba un aspecto vacuolar o espongiforme que se concentraba en el interior de los haces afectados y no aparecía en regiones del parénquima pobres o carentes de tractos mielínicos. Estos tractos se volvían más claros a la tinción con eosina, pero conservaban aparentemente el mismo grado de tinción nuclear para hematoxilina. La medida del área inmunorreactiva para la proteína básica de la mielina (MBP) mostró una disminución significativa del marcaje MBP+ / área en los tractos mielínicos afectados. Esta fue más acusada en los tractos más cercanos al punto de inyección. La mayor disminución se produjo en torno a los 7 días, para luego volver progresivamente al nivel basal. Esta disminución no se vio acompañada, sin embargo, por una disminución en el número de núcleos Olig2+ en dichas áreas, de lo que deducimos que la pérdida de mielina no está asociada a una degeneración de oligodendrocitos, sino más probablemente a una pérdida de la fracción proteica o glucídica de la mielina en las prolongaciones celulares. Esto podría estar causando alteraciones en el empaquetado de la misma, como ocurre en el caso de ratones mutantes deficientes en la producción de lipoproteínas (Moniki y col., 1995) o ratones mutantes carentes de galactolípidos (Coetzee y col., 1998).

Existen gran variedad de alteraciones de los tractos mielínicos descritos en la bibliografía (Peters, 2002). La degeneración encontrada en nuestro modelo es muy similar, a nivel de microscopía óptica, a

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

los globos de mielina descritos en primates de edad avanzada (Feldman y col., 1998), acumulaciones de fluido extracelular en la línea interperiodo de las vainas mielínicas. Sin embargo, en nuestro caso, no hemos podido determinar si la dilatación interrumpe esta línea o la línea densa principal de la mielina. Además, a microscopía electrónica, los huecos detectados en nuestro modelo no presentan la forma esférica característica de los globos de mielina, lo cual sugiere que el fluido infiltrado no ejerce una alta presión hacia el exterior.

Bajo el microscopio electrónico, estas alteraciones se observaron principalmente como una separación entre el axón y la vaina de mielina, dando lugar a la formación de un edema o dilatación del espacio entre ambas estructuras. Cabría pensar que el aspecto espongiforme observado a microscopia óptica fuera el resultado de las tensiones que el tejido sufre durante el procesado histológico. Tras la pérdida de unión entre axón y mielina, esta región es susceptible de reflejar dilataciones y oquedades de mayor tamaño a las que se observan tras un procesado histológico menos agresivo, como el de microscopia electrónica.

Existen numerosas referencias bibliográficas que relacionan procesos infecciosos con episodios desmielinizantes y, a su vez, estos con pérdida axonal en los tractos mielínicos afectados y sus núcleos neuronales de origen y destino. Se ha reportado, por ejemplo, una mayor tasa de muerte neuronal en el hipocampo tras diferentes casos de meningitis bacteriana (Gerber y col., 2010), o degeneración axonal ligada a la inflamación provocada tras la infección por virus de Theiler en la encefalomielitis murina (Molina-Holgado y col., 2002). Sin embargo, en nuestro caso, la mayor parte de los huecos observados a microscopía electrónica presentaba una figura de perfil axónico en su interior. El análisis con marcadores de muerte celular indica que, a pesar de la degeneración observada, no parece existir pérdida axonal (neuronal) o de células gliales. Así, las tinciones inmunohistoquímicas con anti-CASP3 no mostraron positividad en los tractos mielínicos afectados en los tiempos estudiados. Tampoco se detectó degeneración neuronal en las regiones afectadas mediante la tinción histoquímica con Fluoro-Jade B, ni en los núcleos neurales cuyos axones, aferentes o eferentes, conforman tales tractos. Estos núcleos son principalmente el hipocampo, la habénula, núcleos del séptum y los cuerpos mamilares. A pesar de esto, no descartamos la posibilidad de que se produjera la degeneración de ciertas fibras axónicas a nivel de los tractos, fenómeno que podría no haber sido detectado mediante las técnicas empleadas.

Tres posibles causas podrían explicar la degeneración observada:

1) La degeneración vacuolar en los tractos mielínicos podría ser consecuencia de la penetración de células inflamatorias en el parénquima nervioso que se produce tras la inyección ICV de NA. Los marcadores inmunohistoquímicos utilizados pusieron de manifiesto la presencia de numerosas células inflamatorias foráneas al SNC en el parénquima nervioso periventricular, incluidos tractos mielínicos como la fimbria o el fórnix. Esta presencia estuvo frecuentemente asociada a la pérdida total o parcial del epitelio ependimario que separa la región afectada del ventrículo, lo que indicaría que las regiones denudadas serían zonas de mayor permeabilidad al paso de células desde el LCR al parénquima que

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

aquellas que conservan el epitelio ependimario. Se ha observado la afinidad de los linfocitos infiltrados por la estría medular en ratones con lupus eritromatoso sistémico neurosiquiátrico (Ma y col., 2006). Esta especial afinidad podría deberse a la proximidad anatómica de los vasos a través de los cuales sucede gran parte de la infiltración leucocitaria y podría justificar, al menos en parte, el hecho de que dicho tracto se observe siempre afectado en todos nuestros animales inyectados. La estría medular contiene axones que conectan los principales núcleos del sistema límbico (como el séptum, el hipotálamo o la estría terminal) con la habénula (Hikosaka y col., 2008). Esta a su vez se conecta a los centros de recompensa del cerebro medio mediante el fascículo retroflexo, responsable de gran parte del control de retroalimentación negativa del cerebro anterior (Ellison, 2002). La estría medular juega, por tanto, un papel fundamental en el funcionamiento de este sistema encargado de gestionar las respuestas fisiológicas a estímulos emocionales. Su disfunción podría estar relacionada con las reacciones emocionales alteradas detectadas en los ratones mencionados (Ballok y col., 2003; Ballok y col., 2004; Sakic y col., 1994). En nuestro modelo, podría suponer una explicación a la irritabilidad y el comportamiento agresivo detectado en las ratas entre las 12 h y los 4 días posinyección de NA, periodo en el que la infiltración de células del sistema inmune es máxima y comienza la degeneración de los tractos mielínicos. Además, se ha descrito la relación entre algunas disfunciones del sistema límbico con alteraciones del comportamiento y enfermedades como la esquizofrenia (Bogerts y col., 1985; Tamminga y col., 1992). Varios trabajos describen también la relación entre la inflamación local y ciertos trastornos desmielinizantes (Ip y col., 2006; Norton y col., 1990). Las lesiones mielínicas que caracterizan la esclerosis múltiple están estrechamente relacionadas con la infiltración de linfocitos y macrófagos en el SNC (Traugott y col., 1982a; Traugott y col., 1982b). La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones se establece mediante la inmunización de estos animales con antígenos de la mielina, resultando en infiltración leucocitaria en el SNC y desmielinización (Fujinami y col., 1985; Rezai-Zadeh y col., 2009). Sin embargo, en nuestro modelo, la pronta recuperación de los tractos mielínicos afectados, un par de semanas después de la inyección, nos hace pensar que el daño viene dado por un evento puntual y transitorio, y no un efecto crónico como podría ser la inmunización de linfocitos contra proteínas de la mielina. Además, inyecciones ICV realizadas con anafilotoxina C5a dieron lugar al desarrollo de una respuesta inflamatoria muy similar, sin causar daños en los tractos mielínicos. Si bien, el hecho de que se mantuviera la integridad del epitelio ependimario podía haber evitado parte de la infiltración de células inflamatorias hacia los tractos, el estudio histológico de los cortes mostró que en este caso también se produjo infiltración de células inflamatorias, tanto desde el ventrículo como desde los vasos.

2) Otra posible causa del daño observado en los tractos mielínicos podría ser la activación astrocítica. Se ha descrito que la estimulación intensa de estas células puede dar lugar a la sobreexpresión específica de citocinas como TNFα, IFNα, TGFβ, IL6, e IL12, lo que en ocasiones contribuye a la inflamación crónica y episodios de neurodegeneración progresivos (Akwa y col., 1998; Campbell y col., 1993; Pagenstecher y col., 2000; Wyss-Coray y col., 1997). Algunos trabajos relacionan la actividad astrocítica con procesos y enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Miljković y col., 2011). Además, se ha descrito que los astrocitos de rata son capaces de presentar MBP como antígeno a los linfocitos T de manera específica mediante el MHC de clase II (Fontana y col., 1984). Sin embargo, en nuestro modelo, no hemos detectado la producción de IL1β ni TNFα por parte de los astrocitos.

3) Otra posibilidad, la que consideramos más probable, es que la degeneración vacuolar sea un efecto directo de la acción de la NA sobre estos tractos. Como hemos visto, el epitelio ependimario permite el paso de la NA hacia el parénquima nervioso, dando lugar a una región LFA- y PNA+ detectada alrededor del ventrículo lateral inyectado y el tercer ventrículo. Los tractos mielínicos afectados siempre fueron periventriculares, incluidos el quiasma óptico, al que la NA podría haber llegado atravesando la pared ventral del tercer ventrículo. La mayor parte de los gangliósidos y glucoesfingolípidos presentes en el SNC presentan ácido siálico en su estructura (Svennerholm, 1994). Se ha descrito que este residuo es esencial para la unión de dichos lípidos de membrana a la glucoproteína asociada a mielina (Collins y col., 1997; Yang y col., 1996). Además, una degeneración vacuolar muy similar a la observada en nuestro estudio, así como otras anormalidades estructurales, ha sido descrita en la mielina de ratones mutantes que presentan alteraciones en el metabolismo del ácido polisiálico (Fewou y col., 2007) o ratones mutantes carentes de galactolípidos (Coetzee y col., 1998). Por otra parte, en contraposición a la desmielinización mediada por citotoxicidad celular y autoinmunidad, el proceso observado en nuestro modelo parece ocurrir de forma aguda y puntual, produciéndose una recuperación posterior, una vez eliminado el agente lesivo (el enzima inyectado). Además, inyecciones ICV preliminares de Endo-F3, que conllevan de igual manera la pérdida del ácido siálico terminal al eliminar el árbol glucídico completo de glucolípidos y glucoproteínas, también producen degeneración en los tractos mielínicos (material no mostrado). Todo ello nos hace pensar que muy probablemente sea la llegada de la NA a los tractos la que alterase las interacciones lípido-proteína de la mielina, especialmente en las uniones axón-mielina. Los fenómenos de distensión y contracción que sufre el tejido durante la fijación y el procesamiento histológico contribuirían al ensanchamiento de los poros y oquedades observados en las regiones en las que las uniones entre axón y mielina fueron alteradas.

Para afinar en el estudio de este fenómeno nos proponemos investigar el efecto que la NA tiene sobre la glucoproteína asociada a mielina (MAG) y la proteína proteolipídica de la mielina (PLP).

Como ya comentamos en resultados, la degeneración de los tractos mielínicos es reversible y, al cabo de cierto tiempo, las ratas regeneran las fibras mielínicas dañadas, que vuelven a mostrar una apariencia normal, sin degeneración visible, a microscopia óptica. Si nuestra hipótesis es cierta, esta reparación se debería a la renovación de las proteínas de unión afectadas por parte de los oligodendrocitos. El recuento de núcleos Olig2+ no puso de manifiesto una disminución de los mismos durante la degeneración, ni tampoco un aumento durante la reparación, lo que sugiere que dicho proceso transcurre sin el concurso de la proliferación celular. Experimentos preliminares de marcaje inmunohistoquímico (no mostrados) manifestaron indicios de colocalización ente ABCA2 (marcador de oligodendrocitos inmaduros) y BrdU en la fimbria, aunque pensamos que esto puede deberse a la tasa

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

normal de división celular que presentan estas células, incluso en el tejido adulto (Ludwin y col., 1988; Suzuki y col., 1992). La remielinización en el tejido adulto es un hecho ampliamente aceptado y descrito en la bibliografía (Wood y col., 1991), que incluye la interacción con astrocitos (Blakemore y col., 1989).

5.2 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN EL DAÑO EPENDIMARIO, INFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN PROCOVADOS POR LA NEURAMINIDASA

Uno de los principales objetivos de la presente Tesis Doctoral fue comprobar el grado de implicación del sistema del complemento en los procesos lesivos y degenerativos derivados de la inyección de NA en el ventrículo lateral de rata. Como se vio anteriormente, esta hipótesis está avalada por varios antecedentes bibliográficos: 1) la presencia del sistema del complemento en el LCR (Casarsa y col., 2003; Gasque y col., 2000; Stahel y col., 1998); 2) la mayor susceptibilidad de las células desializadas al ataque del complemento (Donin y col., 2003; Pangburn, 2000; Tompkins y col., 1976); y 3) la activación de este por parte de la NA (Fujita y col., 1999).

Se estudió su efecto lítico (mediado por los MAC) sobre las células ependimarias, así como en la degeneración vacuolar detectada en tractos mielínicos. También se analizó la posible participación de la anafilotoxina C5a en el inicio y desarrollo de la reacción inflamatoria posterior a la inyección ICV de NA.

5.2.1 La neuraminidasa provoca la activación de la vía alternativa del complemento y la deposición de complejos de ataque a la membrana sobre el epitelio ependimario

El primer paso para comprobar la posible participación del sistema del complemento en la muerte del epitelio ependimario tras la inyección de NA fue detectar los MAC sobre estas células. Las pruebas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra el complejo de ataque a la membrana (C5b-9) y contra el factor C9 polimerizado pusieron de manifiesto estas moléculas en el epitelio ependimario del ventrículo lateral inyectado 2 h después de la inoculación del enzima, quedando el epitelio del ventrículo contralateral libre de dicho marcaje. Aunque es sabido que muchos tipos celulares del sistema nervioso tienen la capacidad de producir proteínas del sistema del complemento (Barnum, 1995; Gasque y col., 2000; Morgan y col., 1997; Stahel y col., 1997), la especificidad de los anticuerpos por las formas activadas/polimerizadas de los factores y el hecho de que la marca obtenida se concentrase en las células más dañadas del ventrículo inyectado nos hace descartar que la detección corresponda a una producción de factores del complemento por parte de las células ependimarias. La naturaleza de las células marcadas se pudo determinar por la presencia de penachos de cilios en la superficie de algunas de ellas, así como su localización y características morfológicas. Además se obtuvo marcaje de colocalización entre el factor C9 y la vimentina, un filamento intermedio expresado por las células ependimarias.

La activación del complemento que promueve la unión de C5b-9 al epitelio ependimario podría deberse a: 1) la acción directa de la NA sobre los factores del complemento presentes en el LCR, y/o 2)

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la supresión de los factores reguladores que inhiben la activación del complemento mediante el "marcapasos" de C3, como son el ácido siálico superficial (Donin y col., 2003), el factor H (Pangburn, 2000) o el factor CD59 (Meri y col., 1990; Rollins y col., 1990).

Como ya se comentó en la introducción, el ácido siálico en los polisacáridos de la cápsula bacteriana actúa como factor de virulencia previniendo la formación de los MAC del complemento del huésped (Marques y col., 1992). De igual forma, se ha descrito que la eliminación del ácido siálico de la superficie de células cancerosas humanas, eritrocitos, y otros muchos tipos celulares, las hace más susceptibles a la deposición los MAC del complemento (Donin y col., 2003; Pangburn, 2000; Tompkins y col., 1976). Dicho aumento de susceptibilidad se debe a una activación más eficiente de la vía alternativa, descartándose el concurso de la vía clásica o de las lectinas mediante el uso de anticuerpos inhibidores. Queda por saber si el incremento en la activación de esta vía es el resultado de un aumento en la afinidad inespecífica de las IgG a la superficie celular desializada o a una disminución en la actividad protectora de factores reguladores (Donin y col., 2003).

El factor H es una molécula soluble con capacidad de unión al ácido siálico de las membranas celulares (Pangburn y col., 2000). Este inhibe la formación de los complejos C3/C5 convertasas y detiene la amplificación de la señal de activación. Se ha descrito una importante disminución de su eficacia cuando actúa sobre células cuya superficie está exenta de ácido siálico (Kazatchkine y col., 1979; Meri y col., 1990; Pangburn y col., 1978). La desialización de la superficie ependimaria podría, por tanto, estar reduciendo el anclaje y la eficacia del factor H en su superficie, lo que permitiría la formación de complejos C3 convertasa procedentes de la activación constitutiva de C3 que en condiciones normales son inhibidos.

El regulador del complemento CD59 inhibe la formación de los MAC mediante la interacción con C5b-8 y la inhibición de la polimerización de C9 (Meri y col., 1990; Rollins y col., 1990). Su papel protector podría estar viéndose comprometido por dos causas: 1) en el anclaje de CD59 a la membrana intervienen glucofosfolípidos cuya estructura podría verse afectada por la acción de la NA (Meri y col., 1996); y 2) las moléculas CD59 de las membranas eritrocitarias poseen residuos de ácido siálico. Si bien la eliminación de este último (mediante tratamiento con NA) no afecta a la función de estas moléculas en los eritrocitos (Ninomiya y col., 1992), esto no ha sido comprobado en células del SNC.

Con el fin de investigar la implicación de estos reguladores del complemento en el modelo, nos proponemos en un futuro comprobar si existe variación en la cantidad de factor H y CD59 asociado a la membrana de las células ependimarias tratadas con NA respecto a las no tratadas.

Los ensayos hemolíticos nos permitieron observar que el suero de rata tratado previamente con NA *in vitro* perdía en cierta medida la capacidad hemolítica del complemento respecto a un suero no tratado (pérdida de actividad debida a la activación y consiguiente desactivación de los factores). De igual manera pudimos comprobar, tal como sugería la bibliografía (Fearon, 1978; Kazatchkine y col., 1979), que la desialización previa de los glóbulos rojos los hace más susceptibles al ataque del complemento, en nuestro caso, de rata. El hecho de no haber obtenido lisis en los pocillos de muestras

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de LCR sin tratar con NA (en el experimento de difusión en gel) podría ser debido a que: 1) las muestras no conservaron íntegro el sistema del complemento. Esto es improbable, puesto que en todos los casos la extracción de LCR siguió el protocolo establecido para la preservación de la actividad del complemento y; 2) el kit de análisis de actividad hemolítica total del complemento no fuese lo suficientemente sensible para detectar la actividad presente en muestras de LCR. Esto resulta más probable, pues el kit, en origen, está diseñado para el análisis de muestras de suero sanguíneo, y es sabido que la concentración de proteínas del complemento en el LCR es muy inferior a la del suero (unas 350 veces en humanos) (Thompson y col., 1990), debido a la barrera hematoencefálica y la menor producción de factores endógenos en el SNC (Brown y col., 2004; Stahel y col., 1998).

Si bien los ensayos de activación *in vitro* mediante ELISA no revelaron la formación de complejos terminales del complemento en el suero y LCR de rata tratados con NA, las pruebas de *Western blot* sí permitieron detectar los fragmentos resultantes de la activación de C3 en las mismas muestras tratadas. La detección de estos fragmentos sugiere que el enzima podría estar actuando, bien directamente sobre este factor, o bien sobre factores que diesen lugar a la formación de complejos C3 convertasa solubles. Aunque la incubación de sueros y LCR con NA *in vitro* se realizó en ausencia de membranas celulares, la formación de complejos C3 convertasa en ausencia de anclajes a membrana es posible (Medicus y col., 1976; Rawal y col., 2007).

Por otro lado, no se detectaron depósitos de factor C1q, IgG, ni MBL en la superficie del epitelio ependimario del ventrículo inyectado, ni mediante IHQ ni mediante *Western blot*. Todo ello nos lleva a pensar que, tal como Fujita había descrito en 1999 para el complemento humano, la NA podría estar acelerando la activación del complemento de rata por la vía alternativa (sin la participación de C1 de la vía clásica ni MBL de la vía de las lectinas). Sin embargo, según nuestros resultados de ELISA, esta activación por sí sola no parece conducir a la formación de complejos terminales del complemento. La generación de dichos complejos podría quizás requerir la presencia de membranas o complejos proteína-carbohidrato (como en el zimosan) susceptibles al anclaje de los factores para la adecuada amplificación de la señal de activación y la formación de suficientes MAC. En este sentido, la desialización de la superficie ependimaria podría suponer la aparición de esta superficie capaz en el ventrículo lateral inyectado. Como ya se ha comentado, la desialización celular facilita la formación de complejos C3 y C5 convertasa (que amplificarían la activación) y la deposición de MAC, bien sea por la eliminación del propio ácido siálico, bien por la repercusión que esto pudiera tener en la estructura y/o el anclaje a la membrana de reguladores del complemento como el factor H o CD59 (Pangburn, 2000; Rollins y col., 1990).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5.2.2 Repercusión de la inhibición total o parcial del sistema del complemento *in vivo* e *in vitro* sobre la capacidad lesiva de la neuraminidasa

Una de las estrategias que se planteó para determinar el papel del complemento en la destrucción del epéndimo por la NA fue la de suprimir o bloquear este sistema de defensa simultáneamente a la actuación del enzima sobre el epitelio ependimario.

Para ello se utilizó, como primera aproximación experimental, un ensayo *in vitro* con explantes de epitelio ependimario de rata en un medio en el cual pudiéramos controlar la presencia del enzima NA y de los factores del complemento.

En este ensayo se observó que el enzima fue capaz de provocar daños en el epitelio ependimario tanto en aquellos medios en los que se añadió proteínas del complemento como en aquellos en los que no se añadió, si bien pudimos observar que la lesión provocada por la NA sobre el epitelio en presencia de proteínas del complemento era mayor que en ausencia de estas. Además, la evaluación del movimiento ciliar de los ependimocitos que se realizó durante el experimento permitió asegurar la permanencia de este solamente en aquellos explantes en cuyo medio no había sido añadida NA. En los medios con NA este movimiento no se pudo confirmar, lo que podría ser debido al daño sufrido por el epitelio y la retracción ciliar, fenómeno ya observado en trabajos anteriores (Gomez-Roldan y col., 2008; Grondona y col., 1996).

Por su parte, los explantes situados en medios sin NA (control) no mostraron signos de daño en el epitelio ependimario (núcleos picnóticos, citoplasma más eosinófilo, pérdida de las uniones basolaterales, pérdida del aparato ciliar, etc.). De esto se deduce que ni el medio de cultivo empleado, ni los sueros usados como fuente de factores del complemento presentaban ningún agente lesivo para el epitelio ependimario.

El lavado en medio de cultivo realizado a los explantes antes del comienzo del ensayo nos hace descartar la posibilidad de que hubiese factores del complemento aportados por el propio explante. Si bien las células del SNC tienen la capacidad de producir proteínas del sistema del complemento (Gasque y col., 2000), consideramos que tras los lavados, la duración del ensayo no fue suficiente como para que esta síntesis y secreción diera lugar a una concentración de factores suficiente en el volumen de medio de cultivo como para tener actividad lítica.

El ensayo con explantes presentaba la ventaja de ser el modelo *in vitro* más cercano a la situación *in vivo*, en lo que a integridad del epitelio ependimario se refiere, pero tiene la desventaja de no permitir aislar al epitelio de la influencia de las células subyacentes ni de las interacciones célula-célula en el epitelio. Por ello realizamos un ensayo parecido sobre un modelo de células ependimarias aisladas, en el que poder evaluar el efecto lesivo de la NA en presencia o ausencia de factores del complemento sin la influencia de células no ependimarias ni de interacciones célula-célula a través de las uniones celulares.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los resultados de este ensayo fueron muy similares a los realizados sobre explantes, comprobándose que la NA por si sola era capaz de disminuir la tasa de viabilidad de las células ependimarias en el medio de cultivo, si bien esta disminución era más acusada y significativa en presencia del complemento. La adición de un inhibidor de C5 (el mismo utilizado en el tratamiento para la inhibición sistémica en ratas) a un medio con NA y suero (nuestra fuente de complemento) dio lugar a valores de viabilidad similares al medio que contenía sólo NA, lo cual sugiere que el efecto sinérgico que el suero está produciendo en la muerte de las células ependimarias es debido a los factores del complemento y no a otros factores presentes en él.

Para comprobar el efecto que pudiera tener el bloqueo del sistema del complemento *in vivo* durante la inyección ICV de NA, dispusimos de un anticuerpo inhibidor de la escisión del factor C5 de rata. El factor C5 es clave en el desarrollo de la vía lítica del complemento, pues su proteólisis supone el inicio de la cascada de activación que culmina con el ensamblaje de los MAC. Por tanto, su bloqueo mediante el inhibidor de C5 evita la formación de los MAC responsables de la lisis celular mediada por el complemento (Vakeva y col., 1998). Este inhibidor ha sido también utilizado de forma sistémica en otros modelos de lesión tisular, como el de recuperación de shocks hemorrágicos (Peckham y col., 2007). En el presente estudio, dicho inhibidor se utilizó simultáneamente de forma sistémica y mediante inyección ICV junto a la NA. Con esta doble aplicación se reforzó su actuación a nivel de los ventrículos cerebrales (epígrafe 3.1.5).

Las características del epitelio ependimario del ventrículo inyectado con C5-inh + NA fueron semejantes a las de ratas inyectadas sólo con NA. Es decir, las células del ventrículo inyectado mostraron signos de daño celular, idénticos a los producidos en ausencia del inhibidor. Esto podría deberse a:

1) El inhibidor bloquea al factor C5, pero la NA activa al sistema del complemento a un nivel posterior de la cascada proteolítica. Esto es improbable, pues por un lado, nuestros experimentos de activación *in vitro* detectaron la activación del complemento a nivel de C3, previo a la escisión del factor C5. Igualmente, existen referencias sobre el aumento de iC3b en suero normal humano tras la incubación con NA (Fujita y col., 1999). Si ocurre lo mismo en rata, la inhibición a nivel de C5 debería ser efectiva. Por otro lado, aunque la NA actuase sobre factores posteriores a C5 en la cascada enzimática de activación, la participación del factor C5b procedente de la escisión de C5 es fundamental para la formación de los MAC.

2) La inhibición de C5 está teniendo lugar de forma efectiva, pero existen otros mecanismos paralelos involucrados en la muerte de las células ependimarias que no están siendo inhibidos.

3) El nivel de inhibición alcanzado no es suficiente para evitar la acción lítica del sistema del complemento. La creación de nuevo LCR en el ventrículo lateral, la continua producción de complemento a nivel sistémico y la dilución del inhibidor, tanto en el ambiente hemal como en el LCR, podrían provocar que no todo el factor C5 fuese inhibido y que quedase una cantidad suficiente para desarrollar la vía lítica del complemento en el ventrículo. Esto es probable, pues los datos bibliográficos (Costa y col., 2006) y los controles realizados con el suero de ratas con inhibición sistémica de C5 (datos

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

no mostrados) revelaron que este aún posee una capacidad hemolítica de entre el 60% y el 70% respecto al suero de ratas sin inhibición sistémica. Por otra parte, se detectó cierto nivel de marca positiva en el epéndimo de cortes teñidos mediante IHQ con anti-C5b-9. Todos estos resultados sugieren que esta opción es la más probable.

Posteriormente a la realización de los experimentos con inhibidor de C5 se pudo disponer de una cepa de ratas carentes del factor C6 del complemento, cedidas por el Dr. B. Paul Morgan, del Instituto de Medicina de la Universidad de Cardiff, Reino Unido. Como se comentó en material y métodos, estas ratas $C6^{-/-}$ portan una deleción natural en el gen del factor C6 del complemento (Bhole y col., 2004; Ramaglia y col., 2007), lo que les impide la formación del MAC y, por tanto, producir la lisis celular mediada por el complemento (Leenaerts y col., 1994; van Dixhoorn y col., 1997).

La inyección ICV de NA en estas ratas produjo los mismos efectos observados en las ratas inyectadas de fenotipo salvaje, apareciendo regiones dañadas y desprendidas del epitelio ependimario en el ventrículo lateral inyectado, pero no en el contralateral. Dada la incapacidad total en estas ratas para producir MAC (Leenaerts y col., 1994), y que este no fue detectado mediante IHQ, las observaciones nos llevan a concluir que la vía lítica del sistema del complemento no puede ser la causante principal del daño inducido por la NA sobre el epitelio ependimario. Sin embargo, la acción conjunta de la NA y el complemento observada en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, así como la detección de los complejos MAC sobre el epéndimo de ratas tratadas con NA, sugieren que el complemento está participando en la necrosis observada de forma sinérgica con otros factores independientes. Estos podrían ser algunos de los ya mencionados en el epígrafe 5.1.2, y pensamos que la hipótesis de la alteración de las uniones celulares es la más probable.

5.2.3 Implicación del sistema del complemento en el comienzo de la reacción inflamatoria

Como ya comentamos en introducción, la activación del sistema del complemento libera anafilotoxinas como C3a y C5a que son capaces por sí mismas de iniciar una respuesta inflamatoria local en el SNC (Stahel y col., 1997). De hecho, se ha comprobado que tanto la inyección de C5a (Faustmann y col., 1995) como del complejo C5b-9 (Casarsa y col., 2003) en el LCR provocan una intensa inflamación en las meninges y los ventrículos cerebrales. Además, el receptor de la anafilotoxina C5a (CD88) está presente en muchas células del SNC, tales como astrocitos, microglía o células endoteliales del cerebro inflamado (Gasque y col., 1997).

El hecho de que la reacción inflamatoria se inicie y transcurra de forma muy similar en ratas $C6^{-/-}$ y ratas de fenotipo salvaje inyectadas ambas con NA, sugiere que el complejo C5b-9 no es el principal responsable de la activación de la reacción inflamatoria en nuestro modelo. Por ello, consideramos las anafilotoxinas como las candidatas más probables a ser el activador de la respuesta inflamatoria por parte del sistema del complemento.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las anafilotoxinas C3a y C5a son pequeños péptidos con importante capacidad proinflamatoria. Entre ellas destaca C5a, un potente quimioatrayente e inductor de la síntesis de citocinas en astrocitos y microglía (Czermak y col., 1999; Sayah y col., 1999). Sobre ella centramos nuestro estudio. Para comprobar si, efectivamente, C5a producía un episodio inflamatorio similar al observado en nuestro modelo, realizamos inyecciones ICV de esta anafilotoxina (epígrafe 3.1.3.3) en el ventrículo lateral de varias ratas que fueron sacrificadas a distintos tiempos. El estudio histológico posterior reveló que C5a provocó una reacción inflamatoria ventricular y meníngea muy similar a la observada tras la inyección de NA. No se observaron, en cambio, daños sobre el epitelio ependimario del ventrículo inyectado ni alteraciones en los tractos mielínicos estudiados hasta el momento.

Estos resultados sugieren que C5a podría ser uno de los factores responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria en el modelo de inyección de NA. Existen similitudes espaciales, temporales y de tipología celular en la neuroinflamación observada en los modelos de inyección de NA y de C5a. A esto habría que añadir las siguientes observaciones: 1) Los ensayos *in vitro* realizados (pruebas hemolíticas y detección de fragmentos de C3 mediante *Western blot*) y algunos antecedentes bibliográficos (Fujita y col., 1999) sugieren que la NA podría estar activando al sistema del complemento a nivel del factor C3 o anterior, lo que incluiría la generación de moléculas C5a en la cascada de activación desencadenada. 2) Si bien los ensayos de inhibición sistémica de C5 en ratas inyectadas con NA no evitó el desarrollo de la reacción inflamatoria, hay que considerar que esta metodología no consigue el bloqueo de la totalidad del factor C5 circulante en el organismo, y que por tanto, el acontecimiento de esta inflamación no descarta la actuación de C5a como agente iniciador de tal respuesta. 3) Puesto que la escisión de C5 es independiente de la presencia de factor C6 en el medio, la reacción inflamatoria observada tras la inyección de NA en ratas deficientes de factor C6 tampoco exime a C5a de ser el agente iniciador de la respuesta inflamatoria.

Para comprobar si la inyección de NA está provocando un aumento de los niveles de C5a en el ventrículo inyectado, en un futuro nos proponemos realizar extracciones de LCR del ventrículo lateral de ratas previamente inyectadas con el enzima para analizar su contenido en anafilotoxinas, así como analizar la generación de estas en muestras de LCR *in vitro*. Otra estrategia que nos plantamos sería la de bloquear mediante anticuerpos específicos las moléculas de C5a generadas durante la inyección de NA, pero al igual que en el caso del inhibidor de C5, esto difícilmente conseguiría la inhibición total de la anafilotoxina. Dado que estas moléculas proinflamatorias tienen la capacidad de actuar a muy baja concentración iniciando procesos de activación amplificadores, los resultados de tal experimento no serían concluyentes para determinar el grado de participación de la anafilotoxina en el inicio de la reacción inflamatoria.

5.2.4 Implicación del sistema del complemento en la degeneración de tractos mielínicos

La deposición de proteínas del complemento y de IgG ha sido ampliamente descrita en la materia blanca lesionada de pacientes con enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (Frohman

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y col., 2006). Si bien la presencia dispersa de factores del complemento en estas zonas dañadas podría ser debida a una pérdida en la integridad de la BHE (Gay y col., 1991), productos de la activación del complemento e IgG han sido encontrados en las paredes de los capilares, las vainas de mielina (Lumsden, 1971), en la mielina degradada y en el interior de células fagocíticas que contienen mielina (Barnett y col., 2009; Brink y col., 2005; Compston y col., 1989; Storch y col., 1998). Esto ha dado lugar a la hipótesis de la posible participación del complemento en la degradación mielínica de la esclerosis múltiple. Revisiones recientes de la patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad (Charbel Issa y col., 2011), el lupus eritematoso sistémico y la lesión de la médula espinal (Alexander y col., 2008), o enfermedades priónicas (Veerhuis y col., 2005) han aportado ejemplos adicionales del importante papel del complemento en las enfermedades neurodegenerativas.

En condiciones fisiológicas, tras un trauma o infección que provocase desmielinización puntual de ciertos nervios, la remielinización inherente al proceso de reparación posterior puede llevarse a cabo de forma normal. Sin embargo, en los casos de inflamación crónica como la esclerosis múltiple, el proceso de remielinización está gravemente deteriorado, lo que conduce a la degeneración axonal y la eventual muerte de la neurona (Trapp y col., 2008).

En nuestro modelo, las tinciones inmunohistoquímicas realizadas contra el MAC no mostraron depósitos de estas proteínas en los tractos mielínicos afectados por la degeneración vacuolar. Tampoco se detectaron depósitos de IgG en estos tractos. Además, las inyecciones ICV de NA en las ratas $C6^{-/-}$, incapaces de formar MAC del complemento, produjeron el mismo efecto sobre los haces mielínicos periventriculares, apareciendo degeneración vacuolar a los mismos tiempos que en el caso de ratas de fenotipo salvaje inyectadas con el enzima. Estos datos sugieren que el sistema del complemento no estaría participando de forma directa en la degeneración de tractos mielínicos observada en nuestro modelo.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6. CONCLUSIONES

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

De los resultados expuestos en el presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1) La neuraminidasa administrada mediante inyección ICV induce la activación de la microglía subependimaria y de los astrocitos, así como de macrófagos periventriculares y perivasculares. También produce un incremento en la expresión de ICAM1 en los vasos sanguíneos de la zona afectada.

2) Seguidamente a estos fenómenos, se produce la invasión del ventrículo y las meninges por células inflamatorias procedentes del torrente sanguíneo, principalmente a través de los plexos coroideos, infiltrándose en primer lugar neutrófilos y macrófagos, y posteriormente linfocitos T y B.

3) La acción de la neuraminidasa sobre los tractos mielínicos que discurren cerca de los ventrículos provoca la pérdida de integridad de las capas de mielina, produciéndose una degeneración vacuolar o espongiforme. Dicha degeneración no va acompañada de pérdida de oligodendrocitos en el tracto afectado, ni tampoco de neuronas en los núcleos de origen y destino. Transcurrido un mes, los tractos mielínicos han regenerado.

4) La neuraminidasa es capaz de activar al sistema del complemento en el LCR de rata. Dicha activación parece ocurrir mediante la vía alternativa del complemento, y no mediante las vías clásica o de las lectinas.

5) La activación de la vía lítica del complemento no es necesaria para la destrucción del epéndimo ni para la degeneración de tractos mielínicos causadas por la neuraminidasa. Sin embargo, la activación del complemento inducida por el enzima contribuye al daño celular provocado por esta. Por otra parte, no se han encontrado indicios de la participación directa del complemento en la degeneración de los tractos mielínicos.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

The results exposed in this Thesis yield the following conclusions:

1) *The ICV-injection of neuraminidase induces the activation of subependymal microglia and astrocytes, as well as perivascular and periventricular macrophages. It also increases the expression of ICAM1 in the blood vessels within the affected area.*

2) *Following these events, the ventricles and meninges are invaded by inflammatory cells infiltrated from the bloodstream primarily through the choroid plexus. Neutrophils infiltrate in the first place, and macrophages and lymphocytes T and B later.*

3) *The action of neuraminidase on myelinated tracts running close to the ventricles causes the loss of integrity of the myelin sheath, resulting in vacuolar or spongiform degeneration. This degeneration is not accompanied by a loss of oligodendrocytes in the affected tract, nor neurons in the nuclei of origin and destination. After a month, the myelinated tracts have fully regenerated.*

4) *The neuraminidase is capable of activating the complement system in the rat CSF. This activation seems to occur through the alternative complement pathway, and not through the classical or the lectin pathways.*

5) *Activation of the lytic complement pathway is not required for ependymal destruction or myelinated tracts degeneration caused by neuraminidase. Nevertheless, neuraminidase-induced complement activation contributes to the ependymal damage caused by the enzyme. Moreover, no evidences have been found of a direct involvement of the complement in the degeneration of myelinated tracts.*

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7. BIBLIOGRAFÍA

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

Abulafia D.P., De Rivero Vaccari J.P., Lozano J.D., Lotocki G., Keane R.W. y Dietrich W.D. (2009). Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 534-544.

Adams J.C. (1992). Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40, 1457-1463.

Agrawal S., Anderson P., Durbeej M., van Rooijen N., Ivars F., Opdenakker G. y Sorokin L.M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 203, 1007-1019.

Aguado F., Ballabriga J., Pozas E. y Ferrer I. (1998). Trka immunoreactivity in reactive astrocytes in human neurodegenerative diseases and colchicine-treated rats. *Acta Neuropathol* 96, 495-501.

Air G.M. (2012). Influenza neuraminidase. *Influenza and other respiratory viruses* 6, 245-256.

Ajami B., Bennett J.L., Krieger C., Tetzlaff W. y Rossi F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain cns microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10, 1538-1543.

Akiyama H. (1994). Inflammatory response in alzheimer's disease. *The Tohoku journal of experimental medicine* 174, 295-303.

Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L. y col. (2000). Inflammation and alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21, 383-421.

Akwa Y., Hassett D.E., Eloranta M.L., Sandberg K., Masliah E., Powell H., Whitton J.L., Bloom F.E. y Campbell I.L. (1998). Transgenic expression of ifn-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol* 161, 5016-5026.

al-Ali S.Y. y al-Hussain S.M. (1996). An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *Journal of anatomy* 188 (Pt 2), 257-262.

Albert B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Robert K. y Watson J. (1994). Molecular biology of the cell, 3rd edn (New York: Garland Science).

Alexander J.J., Anderson A.J., Barnum S.R., Stevens B. y Tenner A.J. (2008). The complement cascade: Yin-yang in neuroinflammation, neuroprotection and degeneration. *J Neurochem* 107, 1169-1187.

Almolda B., Gonzalez B. y Castellano B. (2011). Antigen presentation in eae: Role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1157-1171.

Aloisi F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.

Aloisi F., Ria F., Penna G. y Adorini L. (1998). Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in th1 but not th2 cell activation. *J Immunol* 160, 4671-4680.

Alper C.A. y Rosen F.S. (1976). Genetics of the complement system. *Advances in human genetics* 7, 141-188.

Alvarez J.I., Cayrol R. y Prat A. (2011). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812, 252-264.

Alvarez J.I. y Teale J.M. (2006). Breakdown of the blood brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the cns during the course of murine ncc. *J Neuroimmunol* 173, 45-55.

Alvarez J.I. y Teale J.M. (2007a). Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 187, 102-113.

Alvarez J.I. y Teale J.M. (2007b). Evidence for differential changes of junctional complex proteins in murine neurocysticercosis dependent upon cns vasculature. *Brain Res* 1169, 98-111.

Amadori M. (2007). The role of ifn-alpha as homeostatic agent in the inflammatory response: A balance between danger and response? *J Interferon Cytokine Res* 27, 181-189.

Amat-Peral G., Blazquez J.L., Amat P., Pastor F.E., Pelaez B. y Sanchez A. (1994). Transependymal diapedesis: Reality or speculation? *J Submicrosc Cytol Pathol* 26, 449-451.

Amiry-Moghaddam M. y Ottersen O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4, 991-1001.

Anderson M.E. y Siahaan T.J. (2003). Targeting icam-1/lfa-1 interaction for controlling autoimmune diseases: Designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 24, 487-501.

Andersson P.B., Perry V.H. y Gordon S. (1992). Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *The Journal of experimental medicine* 176, 255-259.

Andres D., Diez-Fernandez C., Zaragoza A., Alvarez A. y Cascales M. (2001). Induction of cell proliferation by cyclosporine a in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology* 61, 427-435.

Anthony D.C., Bolton S.J., Fearn S. y Perry V.H. (1997). Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain* 120 (Pt 3), 435-444.

Ascherio A. (2008). Epstein-barr virus in the development of multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics* 8, 331-333.

Atkins G.J., McQuaid S., Morris-Downes M.M., Galbraith S.E., Amor S., Cosby S.L. y Sheahan B.J. (2000). Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev Med Virol* 10, 291-303.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Babeş V.S. (1892). Certains caractères des lesions histologiques de la rage. *Ann Inst Pasteur* 6, 209-223.

Bacher M., Weihe E., Dietzschold B., Meinhardt A., Vedder H., Gemsa D. y Bette M. (2002). Borna disease virus-induced accumulation of macrophage migration inhibitory factor in rat brain astrocytes is associated with inhibition of macrophage infiltration. *Glia* 37, 291-306.

Ballok D.A., Millward J.M. y Sakic B. (2003). Neurodegeneration in autoimmune mrl-lpr mice as revealed by fluoro jade b staining. *Brain Res* 964, 200-210.

Ballok D.A., Woulfe J., Sur M., Cyr M. y Sakic B. (2004). Hippocampal damage in mouse and human forms of systemic autoimmune disease. *Hippocampus* 14, 649-661.

Banizs B., Pike M.M., Millican C.L., Ferguson W.B., Komlosi P., Sheetz J., Bell P.D., Schwiebert E.M. y Yoder B.K. (2005). Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132, 5329-5339.

Barnett M.H., Parratt J.D., Cho E.S. y Prineas J.W. (2009). Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol* 65, 32-46.

Barnum S.R. (1995). Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 6, 132-146.

Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J., Chan J.H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O. y Coffman R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 202, 1131-1139.

Barry M. y Bleackley R.C. (2002). Cytotoxic t lymphocytes: All roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.

Batiz L.F., Paez P., Jimenez A.J., Rodriguez S., Wagner C., Perez-Figares J.M. y Rodriguez E.M. (2006). Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the hyh mice carrying a point mutation in alpha-snap. *Neurobiology of disease* 23, 152-168.

Bauer J., Huitinga I., Zhao W., Lassmann H., Hickey W.F. y Dijkstra C.D. (1995). The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 15, 437-446.

Bechmann I., Galea I. y Perry V.H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology* 28, 5-11.

Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R. y Naftolin F. (1999). Fasl (cd95l, apo1l) is expressed in the normal rat and human brain: Evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27, 62-74.

Bergers G. y Song S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* 7, 452-464.

Bergmann C.C., Lane T.E. y Stohlman S.A. (2006). Coronavirus infection of the central nervous system: Host-virus stand-off. *Nature reviews Microbiology* 4, 121-132.

Bernstein H.-G., Steiner J. y Bogerts B. (2009). Glial cells in schizophrenia: Pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert review of neurotherapeutics* 9, 1059-1071.

Beuscher H.U., Günther C. y Röllinghoff M. (1990). Il-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *J Immunol* 144, 2179-2183.

Bhatia A. y Kast R.E. (2007). How influenza's neuraminidase promotes virulence and creates localized lung mucosa immunodeficiency. *Cell Mol Biol Lett* 12, 111-119.

Bhole D. y Stahl G.L. (2004). Molecular basis for complement component 6 (c6) deficiency in rats and mice. *Immunobiology* 209, 559-568.

Bi W., Zhu L., Wang C., Liang Y., Liu J., Shi Q. y Tao E. (2011). Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain Res* 1395, 12-20.

Bia F.J. y Barry M. (1986). Parasitic infections of the central nervous system. *Neurol Clin* 4, 171-206.

Bianco F., Pravettoni E., Colombo A., Schenk U., Moller T., Matteoli M. y Verderio C. (2005). Astrocyte-derived atp induces vesicle shedding and il-1 beta release from microglia. *J Immunol* 174, 7268-7277.

Bignami A. y Dahl D. (1974). Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol* 153, 27-38.

Billings C.G. y Howard P. (1993). Occupational siderosis and welders' lung: A review. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS e Istituto di clinica tisiologica e malattie apparato respiratorio, Universita di Napoli, Secondo ateneo* 48, 304-314.

Blakemore W.F. y Crang A.J. (1989). The relationship between type-1 astrocytes, schwann cells and oligodendrocytes following transplantation of glial cell cultures into demyelinating lesions in the adult rat spinal cord. *J Neurocytol* 18, 519-528.

Bleul C.C., Fuhlbrigge R.C., Casasnovas J.M., Aiuti A. y Springer T.A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (sdf-1). *The Journal of experimental medicine* 184, 1101-1109.

Block M.L. y Hong J.-S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76, 77-98.

Block M.L. y Hong J.S. (2007). Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society transactions* 35, 1127-1132.

Blondel O., Collin C., McCarran W.J., Zhu S., Zamostiano R., Gozes I., Brenneman D.E. y McKay R.D. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci* 20, 8012-8020.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Bogerts B., Meertz E. y Schonfeldt-Bausch R. (1985). Basal ganglia and limbic system pathology in schizophrenia. A morphometric study of brain volume and shrinkage. *Arch Gen Psychiatry* 42, 784-791.

Bogestal Y.R., Barnum S.R., Smith P.L., Mattisson V., Pekny M. y Pekna M. (2007). Signaling through c5ar is not involved in basal neurogenesis. *Journal of neuroscience research* 85, 2892-2897.

Bonifati D.M. y Kishore U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Molecular immunology* 44, 999-1010.

Borregaard N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657-670.

Botto M., Lissandrini D., Sorio C. y Walport M.J. (1992). Biosynthesis and secretion of complement component (c3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 149, 1348-1355.

Boulanger L.M. (2009). Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64, 93-109.

Braunstein G.D., Reichert L.E., Jr., Van Hall E.V., Vaitukaitis J.L. y Ross G.T. (1971). The effects of desialylation on the biologic and immunologic activity of human pituitary luteinizing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 42, 962-967.

Brightman M.W. y Palay S.L. (1963). The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *J Cell Biol* 19, 415-439.

Brightman M.W. y Reese T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40, 648-677.

Brink B.P., Veerhuis R., Breij E.C., van der Valk P., Dijkstra C.D. y Bo L. (2005). The pathology of multiple sclerosis is location-dependent: No significant complement activation is detected in purely cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 147-155.

Broadwell R.D. y Sofroniew M.V. (1993). Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol* 120, 245-263.

Bronson R.T. y Lane P.W. (1990). Hydrocephalus with hop gait (hyh): A new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 54, 131-136.

Brown A.S., Begg M.D., Gravenstein S., Schaefer C.A., Wyatt R.J., Bresnahan M., Babulas V.P. y Susser E.S. (2004a). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 61, 774-780.

Brown E.J. (1992). Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. *Infect Agents Dis* 1, 63-70.

Brown P.D., Davies S.L., Speake T. y Millar I.D. (2004b). Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* 129, 957-970.

Bruni J.E. (1998). Ependymal development, proliferation, and functions: A review. *Microsc Res Tech* 41, 2-13.

Butler M.P., O'Connor J.J. y Moynagh P.N. (2004). Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (ltp) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase ltp. *Neuroscience* 124, 319-326.

Cacquevel M., Lebeurrier N., Chéenne S. y Vivien D. (2004). Cytokines in neuroinflammation and alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5, 529-534.

Cagnin A., Brooks D.J., Kennedy A.M., Gunn R.N., Myers R., Turkheimer F.E., Jones T. y Banati R.B. (2001). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358, 461-467.

Campbell I.L., Abraham C.R., Masliah E., Kemper P., Inglis J.D., Oldstone M.B. y Mucke L. (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10061-10065.

Canova C., Neal J.W. y Gasque P. (2006). Expression of innate immune complement regulators on brain epithelial cells during human bacterial meningitis. *Journal of neuroinflammation* 3, 22.

Capuron L., Gumnick J.F., Musselman D.L., Lawson D.H., Reemsnyder A., Nemeroff C.B. y Miller A.H. (2002). Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsycho pharmacology* 26, 643-652.

Carbonell W.S., Murase S.I., Horwitz A.F. y Mandell J.W. (2005). Infiltrative microgliosis: Activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. *Journal of neuroinflammation* 2, 5.

Cardona A.E., Pioro E.P., Sasse M.E., Kostenko V., Cardona S.M., Dijkstra I.M., Huang D., Kidd G., Dombrowski S., Dutta R. y col. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 917-924.

Carlos T.M. y Harlan J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.

Carpenter S.J., McCarthy L.E. y Borison H.L. (1970). Electron microscopic study of the epiplexus (kolmer) cells of the cat choroid plexus. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 110, 471-486.

Carrithers M.D., Visintin I., Kang S.J. y Janeway C.A. (2000). Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123 (Pt 6), 1092-1101.

Carroll M.C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annual review of immunology* 16, 545-568.

Carson M.J., Reilly C.R., Sutcliffe J.G. y Lo D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22, 72-85.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Casarsa C., De Luigi A., Pausa M., De Simoni M.G. y Tedesco F. (2003). Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain. *European journal of immunology* 33, 1260-1270.

Cathcart R.S., 3rd y Worthington W.C., Jr. (1964). Ciliary movement in the rat cerebral ventricles: Clearing action and directions of currents. *J Neuropathol Exp Neurol* 23, 609-618.

Cifuentes M., Fernandez L.P., Perez J., Perez-Figares J.M. y Rodriguez E.M. (1992). Distribution of intraventricularly injected horseradish peroxidase in cerebrospinal fluid compartments of the rat spinal cord. *Cell Tissue Res* 270, 485-494.

Cifuentes M., Rodriguez S., Perez J., Grondona J.M., Rodriguez E.M. y Fernandez-Llebrez P. (1994). Decreased cerebrospinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of reissner's fibre. *Exp Brain Res* 98, 431-440.

Cobaleda C., Schebesta A., Delogu A. y Busslinger M. (2007). Pax5: The guardian of b cell identity and function. *Nature immunology* 8, 463-470.

Codarri L., Gyülvészi G., Tosevski V., Hesske L., Fontana A., Magnenat L., Suter T. y Becher B. (2011). Rorγt drives production of the cytokine gm-csf in helper t cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 12, 560-567.

Coetzee T., Dupree J.L. y Popko B. (1998). Demyelination and altered expression of myelin-associated glycoprotein isoforms in the central nervous system of galactolipid-deficient mice. *Journal of neuroscience research* 54, 613-622.

Colten H.R. y Goldberger G. (1979). Ontogeny of serum complement proteins. *Pediatrics* 64, 775-780.

Collins B.E., Yang L.J., Mukhopadhyay G., Filbin M.T., Kiso M., Hasegawa A. y Schnaar R.L. (1997). Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. *J Biol Chem* 272, 1248-1255.

Compston D.A., Morgan B.P., Campbell A.K., Wilkins P., Cole G., Thomas N.D. y Jasani B. (1989). Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15, 307-316.

Consiglio A.R. y Lucion A.B. (2000). Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain research Brain research protocols* 5, 109-114.

Corfield A.P., Wagner S.A., Clamp J.R., Kriaris M.S. y Hoskins L.C. (1992). Mucin degradation in the human colon: Production of sialidase, sialate o-acetylesterase, n-acetylneuraminate lyase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infection and immunity* 60, 3971-3978.

Coskun V., Wu H., Blanchi B., Tsao S., Kim K., Zhao J., Biancotti J.C., Hutnick L., Krueger R.C., Jr., Fan G. y col. (2008). Cd133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026-1031.

Costa C., Zhao L., Shen Y., Su X., Hao L., Colgan S.P., Stahl G.L., Zhou T. y Wang Y. (2006). Role of complement component c5 in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 1100, 142-151.

Crennell S.J., Garman E.F., Laver W.G., Vimr E.R. y Taylor G.L. (1993). Crystal structure of a bacterial sialidase (from salmonella typhimurium lt2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9852-9856.

Cui Q., Yin Y. y Benowitz L.I. (2009). The role of macrophages in optic nerve regeneration. *Neuroscience* 158, 1039-1048.

Cupedo R.N., de Weerd H. y Dijk F. (1985). Membrane specializations and their relation to hrp transport in the medial habenular nucleus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 171, 21-30.

Czermak B.J., Sarma V., Bless N.M., Schmal H., Friedl H.P. y Ward P.A. (1999). In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on c5a and tnf-alpha. *J Immunol* 162, 2321-2325.

Chanson M., Kotsias B.A., Peracchia C. y O'Grady S.M. (2007). Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Progress in biophysics and molecular biology* 94, 233-244.

Charbel Issa P., Chong N.V. y Scholl H.P. (2011). The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249, 163-174.

Chastain E.M.L., Duncan D.A.S., Rodgers J.M. y Miller S.D. (2011). The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812, 265-274.

Chen A.M., Khanna N., Stohlman S.A. y Bergmann C.C. (2005). Virus-specific and bystander cd8 t cells recruited during virus-induced encephalomyelitis. *Journal of virology* 79, 4700-4708.

Chen C.J., Kono H., Golenbock D., Reed G., Akira S. y Rock K.L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13, 851-856.

Cho J. y Gruol D.L. (2008). The chemokine ccl2 activates p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cultured rat hippocampal cells. *J Neuroimmunol* 199, 94-103.

Chodobski A. y Szmydynger-Chodobska J. (2001). Choroid plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 52, 65-82.

Chong A.K., Pegg M.S. y von Itzstein M. (1991). Influenza virus sialidase: Effect of calcium on steady-state kinetic parameters. *Biochim Biophys Acta* 1077, 65-71.

Christensen R.N., Ha B.K., Sun F., Bresnahan J.C. y Beattie M.S. (2006). Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in ameboid microglia. *Journal of neuroscience research* 84, 170-181.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Damier P., Hirsch E.C., Zhang P., Agid Y. y Javoy-Agid F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and parkinson's disease. *Neuroscience* 52, 1-6.

Das G.D. (1979). Gliogenesis and ependymogenesis during embryonic development of the rat. An autoradiographic study. *J Neurol Sci* 43, 193-204.

Davis B.K., Wen H. y Ting J.P.-Y. (2011). The inflammasome nlrs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 29, 707-735.

Deckert-Schluter M., Schluter D., Hof H., Wiestler O.D. y Lassmann H. (1994). Differential expression of icam-1, vcam-1 and their ligands lfa-1, mac-1, cd43, vla-4, and mhc class ii antigens in murine toxoplasma encephalitis: A light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 457-468.

Deckert-Schlüter M., Schlüter D., Hof H., Wiestler O.D. y Lassmann H. (1994). Differential expression of icam-1, vcam-1 and their ligands lfa-1, mac-1, cd43, vla-4, and mhc class ii antigens in murine toxoplasma encephalitis: A light microscopic and ultrastructural immuno histochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 457-468.

Del Bigio M.R. (1995). The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14, 1-13.

Del Bigio M.R. (2010). Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 55-73.

Del Rio-Hortega P. (1932). Microglia. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* 2, 481–534.

Den H., Malinzak D.A. y Rosenberg A. (1975). Cytotoxic contaminants in commercial clostridium perfringens neuraminidase preparations purified by affinity chromatography. *Journal of chromatography* 111, 217-222.

Denes A., Lopez-Castejon G. y Brough D. (2012). Caspase-1: Is il-1 just the tip of the iceberg? *Cell Death Dis* 3, 338.

Deng Y., Thompson B.M., Gao X. y Hall E.D. (2007). Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 205, 154-165.

DeWitt D.A., Perry G., Cohen M., Doller C. y Silver J. (1998). Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of alzheimer's disease. *Exp Neurol* 149, 329-340.

Dietrich J.B. (2002). The adhesion molecule icam-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 128, 58-68.

Dinarello C.A., Ikejima T., Warner S.J., Orencole S.F., Lonnemann G., Cannon J.G. y Libby P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139, 1902-1910.

DiScipio R.G., Chakravarti D.N., Muller-Eberhard H.J. y Fey G.H. (1988). The structure of human complement component c7 and the c5b-7 complex. *J Biol Chem* 263, 549-560.

Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M. y Alvarez-Buylla A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.

Donin N., Jurianz K., Ziporen L., Schultz S., Kirschfink M. y Fishelson Z. (2003). Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clinical and experimental immunology* 131, 254-263.

Drzeniek R. (1967). Differences in splitting capacity of virus and v. Cholerae neuraminidases on sialic acid type substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 26, 631-638.

Drzeniek R. y Gauhe A. (1970). Differences in substrate specificity of myxovirus neuraminidases. *Biochem Biophys Res Commun* 38, 651-656.

Duman R.S., Heninger G.R. y Nestler E.J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54, 597-606.

Ea H.K. y Liote F. (2004). Calcium pyrophosphate dihydrate and basic calcium phosphate crystal-induced arthropathies: Update on pathogenesis, clinical features, and therapy. *Current rheumatology reports* 6, 221-227.

Ebert T. y Kotler M. (2005). Prenatal exposure to influenza and the risk of subsequent development of schizophrenia. *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 7, 35-38.

Ehrlich P. (1885). Das sauerstufbudurfnis des organismus. In Eine farbenanalytische studie (Berlin: Hirschwald), pp. 167-195.

Ehrlich P. (1904). Ueber die beziehungen von chemischer constitution, verteilung und pharmakologischer wirkung. In Gesammelte arbeiten zur immunita etsforschung (Berlin: Hirschwald), pp. 574-602.

Eigenbrod T., Park J.H., Harder J., Iwakura Y. y Nunez G. (2008). Cutting edge: Critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of il-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* 181, 8194-8198.

Eikelenboom P. y Stam F.C. (1982). Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol* 57, 239-242.

Eikelenboom P. y Stam F.C. (1984). An immunohisto chemical study on cerebral vascular and senile plaque amyloid in alzheimer's dementia. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology* 47, 17-25.

Eikelenboom P., Zhan S.S., Kamphorst W., van der Valk P. y Rozemuller J.M. (1994). Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in alzheimer's disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 424, 421-427.

Ellison G. (2002). Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsycho pharmacology* 12, 287-297.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Engelhardt B. y Coisne C. (2011). Fluids and barriers of the cns establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the cns castle. *Fluids Barriers CNS* 8, 4.

Engelhardt B., Conley F.K. y Butcher E.C. (1994). Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* 51, 199-208.

Engelhardt B. y Ransohoff R.M. (2005). The ins and outs of t-lymphocyte trafficking to the cns: Anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in immunology* 26, 485-495.

Engelhardt B. y Sorokin L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31, 497-511.

Engelhardt B., Wolburg-Buchholz K. y Wolburg H. (2001). Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* 52, 112-129.

Englund J.A. (2002). Antiviral therapy of influenza. *Seminars in pediatric infectious diseases* 13, 120-128.

Escartin C. y Bonvento G. (2008). Targeted activation of astrocytes: A potential neuroprotective strategy. *Molecular neurobiology* 38, 231-241.

Fabriek B.O., Van Haastert E.S., Galea I., Polfliet M.M.J., Döpp E.D., Van Den Heuvel M.M., Van Den Berg T.K., De Groot C.J.A., Van Der Valk P. y Dijkstra C.D. (2005). Cd163-positive perivascular macrophages in the human cns express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51, 297-305.

Fantuzzi G., Ku G., Harding M.W., Livingston D.J., Sipe J.D., Kuida K., Flavell R.A. y Dinarello C.A. (1997). Response to local inflammation of il-1 beta-converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* 158, 1818-1824.

Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Velardi A. y Caligiuri M.A. (2002). Natural killer cell receptors: New biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100, 1935-1947.

Fatemi S.H., Reutiman T.J., Folsom T.D., Huang H., Oishi K., Mori S., Smee D.F., Pearce D.A., Winter C., Sohr R. y col. (2008). Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: Implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophrenia research* 99, 56-70.

Faustmann P.M., Krause D., Dux R. y Dermietzel R. (1995). Morphological study in the early stages of complement c5a fragment-induced experimental meningitis: Activation of macrophages and astrocytes. *Acta Neuropathol* 89, 239-247.

Fearon D.T. (1978). Regulation by membrane sialic acid of beta1h-dependent decay-dissociation of amplification c3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1971-1975.

Fearon D.T. y Ahearn J.M. (1990). Complement receptor type 1 (c3b/c4b receptor; cd35) and complement receptor type 2 (c3d/epstein-barr virus receptor; cd21). *Current topics in microbiology and immunology* 153, 83-98.

Feldman M.L. y Peters A. (1998). Ballooning of myelin sheaths in normally aged macaques. *J Neurocytol* 27, 605-614.

Feng C., Zhang L., Nguyen C., Vogel S.N., Goldblum S.E., Blackwelder W.C. y Cross A.S. (2013). Neuraminidase reprograms lung tissue and potentiates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 191, 4828-4837.

Fernández-Llebrez P., Cifuentes M., Grondona J., Pérez J. y Rodríguez E. (1993). The effect of immunological blockade of reissner's fiber formation on the circulation of cerebrospinal fluid along the central canal of the rat spinal cord. In The subcommissural organ, an ependymal brain gland (Berlin: Springer-Verlag), pp. 289-298.

Ferrer I., Bernet E., Soriano E., del Rio T. y Fonseca M. (1990). Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39, 451-458.

Fewou S.N., Ramakrishnan H., Bussow H., Gieselmann V. y Eckhardt M. (2007). Down-regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation. *J Biol Chem* 282, 16700-16711.

Fidler J.M. (1979). The induction of hapten-specific immunological tolerance and immunity in b lymphocytes. Vi. Differential tolerance susceptibility in adult spleen as a function of b-cell maturation level. *The Journal of experimental medicine* 150, 491-506.

Figarella-Branger D., Lepidi H., Poncet C., Gambarelli D., Bianco N., Rougon G. y Pellissier J.F. (1995). Differential expression of cell adhesion molecules (cam), neural cam and epithelial cadherin in ependymomas and choroid plexus tumors. *Acta Neuropathol* 89, 248-257.

Filiz S., Dalcik H., Yardimoglu M., Gonca S. y Ceylan S. (2002). Localization of neural cell adhesion molecule (n-cam) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission* 77, 127-135.

Finsterer J. y Hess B. (2007). Neuromuscular and central nervous system manifestations of clostridium perfringens infections. *Infection* 35, 396-405.

Flugel A., Matsumuro K., Neumann H., Klinkert W.E., Birnbacher R., Lassmann H., Otten U. y Wekerle H. (2001). Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: Inhibition of monocyte transendothelial migration. *European journal of immunology* 31, 11-22.

Flügel A., Schwaiger F.W., Neumann H., Medana I., Willem M., Wekerle H., Kreutzberg G.W. y Graeber M.B. (2000). Neuronal fasl induces cell death of encephalitogenic t lymphocytes. *Brain Pathol* 10, 353-364.

Foell D., Wittkowski H., Vogl T. y Roth J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: A novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 81, 28-37.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fonseca M.I., Zhou J., Botto M. y Tenner A.J. (2004). Absence of c1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 6457-6465.

Fontana A., Fierz W. y Wekerle H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic t-cell lines. *Nature* 307, 273-276.

Franchi L., Eigenbrod T. y Nunez G. (2009). Cutting edge: Tnf-alpha mediates sensitization to atp and silica via the nlrp3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 183, 792-796.

Frohman E.M., Racke M.K. y Raine C.S. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine* 354, 942-955.

Fujinami R.S. y Oldstone M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: Mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045.

Fujishima S. y Aikawa N. (1995). Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive care medicine* 21, 277-285.

Fujita T., Ohi H., Endo M., Ohsawa I. y Kanmatsuse K. (1999). The role of sialidase in the development of hypocomplementemia in postinfectious acute glomerulonephritis. *Clin Immunol* 92, 97-102.

Gaboriaud C., Thielens N.M., Gregory L.A., Rossi V., Fontecilla-Camps J.C. y Arlaud G.J. (2004). Structure and activation of the c1 complex of complement: Unraveling the puzzle. *Trends in immunology* 25, 368-373.

Galea I., Bechmann I. y Perry V.H. (2007a). What is immune privilege (not)? *Trends in immunology* 28, 12-18.

Galea I., Bernardes-Silva M., Forse P.A., van Rooijen N., Liblau R.S. y Perry V.H. (2007b). An antigen-specific pathway for cd8 t cells across the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine* 204, 2023-2030.

Galkina E. y Ley K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annual review of immunology* 27, 165-197.

García E., Alonso A., Miró M. y Peña J. (2003). Inmunologia: El sistema del complemento (Universidad de Córdoba).

Gasque P., Dean Y.D., McGreal E.P., VanBeek J. y Morgan B.P. (2000). Complement components of the innate immune system in health and disease in the cns. *Immunopharmacology* 49, 171-186.

Gasque P., Singhrao S.K., Neal J.W., Götze O. y Morgan B.P. (1997). Expression of the receptor for complement c5a (cd88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *The American journal of pathology* 150, 31-41.

Gay D. y Esiri M. (1991). Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study. *Brain* 114 (Pt 1B), 557-572.

Gehrmann J., Matsumoto Y. y Kreutzberg G.W. (1995). Microglia: Intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 269-287.

Geissmann F., Gordon S., Hume D.A., Mowat A.M. y Randolph G.J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 10, 453-460.

Gerber J. y Nau R. (2010). Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Current opinion in neurology* 23, 312-318.

Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M.F., Conway S.J., Ng L.G., Stanley E.R. y col. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

Glass C.K., Saijo K., Winner B., Marchetto M.C. y Gage F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934.

Goldmann E. (1913). Vitalfarbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss* 1, 1-60.

Gomes F.C., Paulin D. y Moura Neto V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (gfap): Modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian journal of medical and biological research, Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica.* 32, 619-631.

Gomez-Roldan M.C., Perez-Martin M., Capilla-Gonzalez V., Cifuentes M., Perez J., Garcia-Verdugo J.M. y Fernandez-Llebrez P. (2008). Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J Comp Neurol* 507, 1571-1587.

Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.

Gordon S. y Taylor P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

Gotow T. y Hashimoto P.H. (1979). Fine structure of the ependyma and intercellular junctions in the area postrema of the rat. *Cell Tissue Res* 201, 207-225.

Graeber M.B. (2010). Changing face of microglia. *Science* 330, 783-788.

Graeber M.B., Li W. y Rodriguez M.L. (2011). Role of microglia in cns inflammation. *FEBS Lett* 585, 3798-3805.

Graeber M.B. y Streit W.J. (2010). Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 89-105.

Graeber M.B., Streit W.J. y Kreutzberg G.W. (1989). Identity of ed2-positive perivascular cells in rat brain. *Journal of neuroscience research* 22, 103-106.

Graus F., Cordon-Cardo C., Houghton A.N., Melamed M.R. y Old L.J. (1984). Distribution of the ganglioside gd3 in the human nervous system detected by r24 mouse monoclonal antibody. *Brain Res* 324, 190-194.

Greenwood J., Etienne-Manneville S., Adamson P. y Couraud P.O. (2002). Lymphocyte migration into the central nervous system: Implication of icam-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascular pharmacology* 38, 315-322.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Griffin D.E. (2003). Immune responses to rna-virus infections of the cns. *Nat Rev Immunol* 3, 493-502.

Grondona J.M., Granados-Duran P., Fernandez-Llebrez P. y Lopez-Avalos M.D. (2013). A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents. *Histochemistry and cell biology* 139, 205-220.

Grondona J.M., Perez-Martin M., Cifuentes M., Perez J., Estivill-Torrus G., Perez-Figares J.M., Fernandez-Llebrez P. y Rodriguez E.M. (1998). Neuraminidase injected into the cerebrospinal fluid impairs the assembly of the glycoproteins secreted by the subcommissural organ preventing the formation of reissner's fiber. *Histochemistry and cell biology* 109, 391-398.

Grondona J.M., Perez-Martin M., Cifuentes M., Perez J., Jimenez A.J., Perez-Figares J.M. y Fernandez-Llebrez P. (1996). Ependymal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neuraminidase into the lateral ventricle of adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 999-1008.

Gubareva L.V., Kaiser L. y Hayden F.G. (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 355, 827-835.

Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J. y Golenbock D.T. (2008). The nalp3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 9, 857-865.

Han J., Thompson P. y Beutler B. (1990). Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *The Journal of experimental medicine* 172, 391-394.

Hanisch U.-K. y Kettenmann H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.

Harrison D.G., Guzik T.J., Goronzy J. y Weyand C. (2008). Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep* 10, 464-469.

Harrison J.K., Jiang Y., Chen S., Xia Y., Maciejewski D., McNamara R.K., Streit W.J., Salafranca M.N., Adhikari S., Thompson D.A. y col. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and cx3cr1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10896-10901.

Harry G.J. y Kraft A.D. (2008). Neuroinflammation and microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4, 1265-1277.

Hauptmann G. (1979). Genetic polymorphism of human complement proteins. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 22, 587-614.

Hauser S.L., Bhan A.K., Gilles F., Kemp M., Kerr C. y Weiner H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19, 578-587.

Hauwel M., Furon E., Canova C., Griffiths M., Neal J. y Gasque P. (2005). Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: The role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 220-233.

Hawkes C. (2006). Olfaction in neurodegenerative disorder. *Adv Otorhinolaryngol* 63, 133-151.

Heijnen B.H., Straatsburg I.H., Padilla N.D., Van Mierlo G.J., Hack C.E. y Van Gulik T.M. (2006). Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clinical and experimental immunology* 143, 15-23.

Held K.S., Chen B.P., Kuziel W.A., Rollins B.J. y Lane T.E. (2004). Differential roles of ccl2 and ccr2 in host defense to coronavirus infection. *Virology* 329, 251-260.

Hendrix S. y Nitsch R. (2007). The role of t helper cells in neuroprotection and regeneration. *J Neuroimmunol* 184, 100-112.

Herrera H. y Rodriguez E.M. (1990). Secretory glycoproteins of the rat subcommissural organ are n-linked complex-type glycoproteins. Demonstration by combined use of lectins and specific glycosidases, and by the administration of tunicamycin. *Histochemistry* 93, 607-615.

Hetland G., Johnson E. y Eskeland T. (1988). [biosynthesis of complement in mononuclear phagocytes]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 108, 32-34.

Hikosaka O., Sesack S.R., Lecourtier L. y Shepard P.D. (2008). Habenula: Crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 28, 11825-11829.

Hirano A. y Zimmerman H.M. (1967). Some new cytological observations of the normal rat ependymal cell. *Anat Rec* 158, 293-302.

Hock C., Heese K., Hulette C., Rosenberg C. y Otten U. (2000). Region-specific neurotrophin imbalances in alzheimer disease: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57, 846-851.

Hodgkin P.D. y Basten A. (1995). B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Curr Opin Immunol* 7, 121-129.

Hoffman W.H., Casanova M.F., Cudrici C.D., Zakranskaia E., Venugopalan R., Nag S., Oglesbee M.J. y Rus H. (2007). Neuroinflammatory response of the choroid plexus epithelium in fatal diabetic ketoacidosis. *Experimental and molecular pathology* 83, 65-72.

Honjo K., van Reekum R. y Verhoeff N.P. (2009). Alzheimer's disease and infection: Do infectious agents contribute to progression of alzheimer's disease? *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 5, 348-360.

Horstmann E. (1954). [the fiber glia of selacean brain]. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 39, 588-617.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Humayun S., Gohar M., Volkening K., Moisse K., Leystra-Lantz C., Mepham J., McLean J. y Strong M.J. (2009). The complement factor c5a receptor is upregulated in nfl-/- mouse motor neurons. *J Neuroimmunol* 210, 52-62.

Ibanez-Tallon I., Pagenstecher A., Fliegauf M., Olbrich H., Kispert A., Ketelsen U.P., North A., Heintz N. y Omran H. (2004). Dysfunction of axonemal dynein heavy chain mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet* 13, 2133-2141.

Ifergan I., Kebir H., Alvarez J.I., Marceau G., Bernard M., Bourbonniere L., Poirier J., Duquette P., Talbot P.J., Arbour N. y col. (2011a). Central nervous system recruitment of effector memory cd8+ t lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin. *Brain* 134, 3560-3577.

Ifergan I., Kebir H., Terouz S., Alvarez J.I., Lecuyer M.A., Gendron S., Bourbonniere L., Dunay I.R., Bouthillier A., Moumdjian R. y col. (2011b). Role of ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Ann Neurol* 70, 751-763.

Imai Y. y Kohsaka S. (2002). Intracellular signaling in m-csf-induced microglia activation: Role of iba1. *Glia* 40, 164-174.

Infante-Duarte C., Horton H.F., Byrne M.C. y Kamradt T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of il-17 in th cells. *J Immunol* 165, 6107-6115.

Ip C.W., Kroner A., Bendszus M., Leder C., Kobsar I., Fischer S., Wiendl H., Nave K.A. y Martini R. (2006). Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *J Neurosci* 26, 8206-8216.

Isfort K., Ebert F., Bornhorst J., Sargin S., Kardakaris R., Pasparakis M., Bähler M., Schwerdtle T., Schwab A. y Hanley P.J. (2011). Real-time imaging reveals that p2y2 and p2y12 receptor agonists are not chemoattractants and macrophage chemotaxis to complement c5a is phosphatidylinositol 3-kinase (pi3k)- and p38 mitogen-activated protein kinase (mapk)-independent. *J Biol Chem* 286, 44776-44787.

Ishii D., Schenk A.D., Baba S. y Fairchild R.L. (2010). Role of tnfalpha in early chemokine production and leukocyte infiltration into heart allografts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, 59-68.

Ishii K.J., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L.D. y Klinman D.M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of apcs. *J Immunol* 167, 2602-2607.

Ishii T. y Haga S. (1984). Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol* 63, 296-300.

Ito D., Tanaka K., Suzuki S., Dembo T. y Fukuuchi Y. (2001). Enhanced expression of iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32, 1208-1215.

Jack C.S., Arbour N., Manusow J., Montgrain V., Blain M., McCrea E., Shapiro A. y Antel J.P. (2005). Tlr signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175, 4320-4330.

Jackson R.J., Cooper K.L., Tappenden P., Rees A., Simpson E.L., Read R.C. y Nicholson K.G. (2011). Oseltamivir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: A systematic review. *The Journal of infection* 62, 14-25.

Jacque C. y Tchélingérian J.L. (1994). [new concepts on the role of cytokines in the central nervous system]. *Rev Neurol (Paris)* 150, 748-756.

Jain K.K., Mittal S.K., Kumar S. y Gupta R.K. (2007). Imaging features of central nervous system fungal infections. *Neurol India* 55, 241-250.

Jang H., Boltz D., Sturm-Ramirez K., Shepherd K.R., Jiao Y., Webster R. y Smeyne R.J. (2009). Highly pathogenic h5n1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14063-14068.

Jarvis G.A. y Vedros N.A. (1987). Sialic acid of group b neisseria meningitidis regulates alternative complement pathway activation. *Infection and immunity* 55, 174-180.

Jensen-Smith H.C., Luduena R.F. y Hallworth R. (2003). Requirement for the betai and betaiv tubulin isotypes in mammalian cilia. *Cell motility and the cytoskeleton* 55, 213-220.

Jimenez A.J., Tome M., Paez P., Wagner C., Rodriguez S., Fernandez-Llebrez P., Rodriguez E.M. y Perez-Figares J.M. (2001). A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 1105-1119.

Johanson C., Stopa E., McMillan P., Roth D., Funk J. y Krinke G. (2011). The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: Toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. *Toxicologic pathology* 39, 186-212.

Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U. y Frisen J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.

Johnson R.T. y Johnson K.P. (1969). Hydrocephalus as a sequela of experimental myxovirus infections. *Experimental and molecular pathology* 10, 68-80.

Johnson R.T., Johnson K.P. y Edmonds C.J. (1967). Virus-induced hydrocephalus: Development of aqueductal stenosis in hamsters after mumps infection. *Science* 157, 1066-1067.

Jung J.S., Bhat R.V., Preston G.M., Guggino W.B., Baraban J.M. y Agre P. (1994). Molecular characterization of an aquaporin cdna from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 13052-13056.

Kabayo J.P. y Hutchinson D.W. (1977). Studies on a neuraminidase from streptomyces griseus. *FEBS Lett* 78, 221-224.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Kadurugamuwa J.L., Hengstler B., Bray M.A. y Zak O. (1989). Inhibition of complement-factor-5a-induced inflammatory reactions by prostaglandin e2 in experimental meningitis. *The Journal of infectious diseases* 160, 715-719.

Karman J., Ling C., Sandor M. y Fabry Z. (2004). Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 173, 2353-2361.

Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137-138.

Karpowicz P., Willaime-Morawek S., Balenci L., DeVeale B., Inoue T. y van der Kooy D. (2009). E-cadherin regulates neural stem cell self-renewal. *J Neurosci* 29, 3885-3896.

Katoh S., Maeda S., Fukuoka H., Wada T., Moriya S., Mori A., Yamaguchi K., Senda S. y Miyagi T. (2010). A crucial role of sialidase neu1 in hyaluronan receptor function of cd44 in t helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clinical and experimental immunology* 161, 233-241.

Katsumoto T., Mitsushima A. y Kurimura T. (1990). The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell* 68, 139-146.

Kazatchkine M.D., Fearon D.T. y Austen K.F. (1979). Human alternative complement pathway: Membrane-associated sialic acid regulates the competition between b and beta1 h for cell-bound c3b. *J Immunol* 122, 75-81.

Kelm S., Pelz A., Schauer R., Filbin M.T., Tang S., de Bellard M.E., Schnaar R.L., Mahoney J.A., Hartnell A. y Bradfield P. (1994). Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and cd22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 4, 965-972.

Kelm S. y Schauer R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 175, 137-240.

Kelly K.J., Williams W.W., Jr., Colvin R.B., Meehan S.M., Springer T.A., Gutierrez-Ramos J.C. y Bonventre J.V. (1996). Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 97, 1056-1063.

Kelly R. y Greiff D. (1970). Toxicity of pneumococcal neuraminidase. *Infection and immunity* 2, 115-117.

Kemper C., Atkinson J.P. y Hourcade D.E. (2010). Properdin: Emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annual review of immunology* 28, 131-155.

Kennedy A.D. y DeLeo F.R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 43, 25-61.

Kerschensteiner M., Meinl E. y Hohlfeld R. (2009). Neuro-immune crosstalk in cns diseases. *Neuroscience* 158, 1122-1132.

Kerschensteiner M., Stadelmann C., Dechant G., Wekerle H. y Hohlfeld R. (2003). Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: Implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53, 292-304.

Khalili K. y White M.K. (2006). Human demyelinating disease and the polyomavirus jcv. *Mult Scler* 12, 133-142.

Kida S., Steart P.V., Zhang E.T. y Weller R.O. (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 Y.S., Honkaniemi J., Sharp F.R. y Tauber M.G. (2004). Expression of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in the brain during experimental group b streptococcal meningitis. *Brain research Molecular brain research* 128, 95-102.

Kivisakk P., Mahad D.J., Callahan M.K., Trebst C., Tucky B., Wei T., Wu L., Baekkevold E.S., Lassmann H., Staugaitis S.M. y col. (2003). Human cerebrospinal fluid central memory cd4+ t cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via p-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8389-8394.

Kivisäkk P., Mahad D.J., Callahan M.K., Trebst C., Tucky B., Wei T., Wu L., Baekkevold E.S., Lassmann H., Staugaitis S.M. y col. (2003). Human cerebrospinal fluid central memory cd4+ t cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via p-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8389-8394.

Kivisakk P., Tucky B., Wei T., Campbell J.J. y Ransohoff R.M. (2006). Human cerebrospinal fluid contains cd4+ memory t cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: Relevance for immunotherapy. *BMC immunology* 7, 14.

Kivisäkk P., Tucky B., Wei T., Campbell J.J. y Ransohoff R.M. (2006). Human cerebrospinal fluid contains cd4+ memory t cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: Relevance for immunotherapy. *BMC immunology* 7, 14.

Kiwic G., Slusarczyk K. y Slusarczyk R. (1998). [the central nervous system and the lymphatic system. Lymphatic drainage of the cerebrospinal fluid]. *Neurol Neurochir Pol* 32, 633-641.

Klein M. y Pfister H.-W. (2010). [bacterial infections of the central nervous system]. *Der Nervenarzt* 81, 150-161.

Klos A., Tenner A.J., Johswich K.-O., Ager R.R., Reis E.S. y Köhl J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular immunology* 46, 2753-2766.

Knibbs R.N., Goldstein I.J., Ratcliffe R.M. y Shibuya N. (1991). Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from maackia amurensis. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J Biol Chem* 266, 83-88.

Knoblach S.M., Fan L. y Faden A.I. (1999). Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95, 115-125.

Kolmer W. (1921). Uber eine eigenartige beziehung von wanderzellen zu den choroideal-plexus des gehirns der wirbeltiere. *Anat Anz* 54, 15-19.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Konsman J.P., Vigues S., Mackerlova L., Bristow A. y Blomqvist A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* 472, 113-129.

Korn T., Bettelli E., Oukka M. y Kuchroo V.K. (2009). Il-17 and th17 cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.

Kornfeld R. y Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry* 54, 631-664.

Krisch B., Leonhardt H. y Buchheim W. (1978). The functional and structural border between the csf- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res* 195, 485-497.

Krishnamoorthy G., Holz A. y Wekerle H. (2007). Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. *J Mol Med (Berl)* 85, 1161-1173.

Krumbholz M., Theil D., Derfuss T., Rosenwald A., Schrader F., Monoranu C.M., Kalled S.L., Hess D.M., Serafini B., Aloisi F. y col. (2005). Baff is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 201, 195-200.

Kuchler S., Graff M.N., Gobaille S., Vincendon G., Roche A.C., Delaunoy J.P., Monsigny M. y Zanetta J.P. (1994). Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. *Neurochem Int* 24, 43-55.

Kuroiwa A., Hisatsune A., Isohama Y. y Katsuki H. (2009). Bacterial neuraminidase increases il-8 production in lung epithelial cells via nf-kappab-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 754-759.

Lassmann H., Bruck W. y Lucchinetti C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: Implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 7, 115-121.

Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T. y col. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with cd11b/cd18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 431-436.

Lau S.K., Chu P.G. y Weiss L.M. (2004). Cd163: A specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *American journal of clinical pathology* 122, 794-801.

Lauf P.K. (1975). Immunological and physiological characteristics of the rapid immune hemolysis of neuraminidase-treated sheep red cells produced by fresh guinea pig serum. *The Journal of experimental medicine* 142, 974-988.

Lauro G.M., Fonti R. y Margotta V. (1991). Phylogenetic evolution of intermediate filament associated proteins in ependymal cells of several adult poikilotherm vertebrates. *J Hirnforschung* 32, 257-261.

Laursen S.B., Thiel S., Teisner B., Holmskov U., Wang Y., Sim R.B. y Jensenius J.C. (1994). Bovine conglutinin binds to an oligosaccharide determinant presented by ic3b, but not by c3, c3b or c3c. *Immunology* 81, 648-654.

Lawson C. y Wolf S. (2009). Icam-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61, 22-32.

Leenaerts P.L., Stad R.K., Hall B.M., Van Damme B.J., Vanrenterghem Y. y Daha M.R. (1994). Hereditary c6 deficiency in a strain of pvg/c rats. *Clinical and experimental immunology* 97, 478-482.

Leonhardt H. (1980). Ependym und circumventriculare organe. In Neuroglia i, handbuch der mikroskopischen anatomic des menschen (Berlin: Springer), pp. 177-666.

Leonhardt H. y Desaga U. (1975). Recent observations on ependyma and subependymal basement membranes. *Acta neurochirurgica* 31, 153-159.

Lew W., Chen X. y Kim C.U. (2000). Discovery and development of gs 4104 (oseltamivir): An orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem* 7, 663-672.

Lewandowsky M. (1900). Zur lehre von der cerebrospinalflussigkeit. *Z Klin Med* 40, 480-494.

Lewin G.R. y Barde Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19, 289-317.

Li J., Gran B., Zhang G.X., Ventura E.S., Siglienti I., Rostami A. y Kamoun M. (2003). Differential expression and regulation of il-23 and il-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J Neurol Sci* 215, 95-103.

Li X., Kong H., Wu W., Xiao M., Sun X. y Hu G. (2009). Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience* 162, 67-77.

Ligon K.L., Alberta J.A., Kho A.T., Weiss J., Kwaan M.R., Nutt C.L., Louis D.N., Stiles C.D. y Rowitch D.H. (2004). The oligodendroglial lineage marker olig2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 499-509.

Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M. y Alvarez-Buylla A. (2000). Noggin antagonizes bmp signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.

Lim H.W. (1990). The complement system. Activation, modulation, and clinical relevance. *Dermatologic clinics* 8, 609-618.

Lin T.J., Hirji N., Stenton G.R., Gilchrist M., Grill B.J., Schreiber A.D. y Befus A.D. (2000). Activation of macrophage cd8: Pharmacological studies of tnf and il-1 beta production. *J Immunol* 164, 1783-1792.

Lindsberg P.J., Carpén O., Paetau A., Karjalainen-Lindsberg M.L. y Kaste M. (1996). Endothelial icam-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 94, 939-945.

Lindsberg P.J., Strbian D. y Karjalainen-Lindsberg M.-L. (2010). Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 689-702.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Ling C., Sandor M., Suresh M. y Fabry Z. (2006). Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to t-cell recruitment in the cns. *J Neurosci* 26, 731-741.

Ling E.A. (1983). Scanning electron microscopic study of epiplexus cells in the lateral ventricles of the monkey (macaca fascicularis). *Journal of anatomy* 137 (Pt 4), 645-652.

Ling E.A., Kaur C. y Lu J. (1998). Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc Res Tech* 41, 43-56.

Lippoldt A., Jansson A., Kniesel U., Andbjer B., Andersson A., Wolburg H., Fuxe K. y Haller H. (2000). Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Res* 854, 197-206.

Liu L., Li Y., Van Eldik L.J., Griffin W.S. y Barger S.W. (2005). S100b-induced microglial and neuronal il-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J Neurochem* 92, 546-553.

Liu Z.X., Han D., Gunawan B. y Kaplowitz N. (2006). Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43, 1220-1230.

Lopez S., Prats N. y Marco A.J. (1999). Expression of e-selectin, p-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. *The American journal of pathology* 155, 1391-1397.

Lossinsky A.S. y Shivers R.R. (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histology and histopathology* 19, 535-564.

Lu J., Kaur C. y Ling E.A. (1993). Intraventricular macrophages in the lateral ventricles with special reference to epiplexus cells: A quantitative analysis and their uptake of fluorescent tracer injected intraperitoneally in rats of different ages. *Journal of anatomy* 183 (Pt 2), 405-414.

Lu J., Kaur C. y Ling E.A. (1994). Immunophenotypic features of epiplexus cells and their response to interferon gamma injected intraperitoneally in postnatal rats. *Journal of anatomy* 185 (Pt 1), 75-84.

Lublin D.M. y Atkinson J.P. (1990). Decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *Current topics in microbiology and immunology* 153, 123-145.

Lucas S.M., Rothwell N.J. y Gibson R.M. (2006). The role of inflammation in cns injury and disease. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1, S232-240.

Ludwin S.K. y Bakker D.A. (1988). Can oligodendrocytes attached to myelin proliferate? *J Neurosci* 8, 1239-1244.

Lue L.F., Rydel R., Brigham E.F., Yang L.B., Hampel H., Murphy G.M., Jr., Brachova L., Yan S.D., Walker D.G., Shen Y. y col. (2001). Inflammatory repertoire of alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35, 72-79.

Lumsden C.E. (1971). The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res* 28, 365-390.

Luo J., Shook B.A., Daniels S.B. y Conover J.C. (2008). Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 28, 3804-3813.

Lyck R., Reiss Y., Gerwin N., Greenwood J., Adamson P. y Engelhardt B. (2003). T-cell interaction with icam-1/icam-2 double-deficient brain endothelium in vitro: The cytoplasmic tail of endothelial icam-1 is necessary for transendothelial migration of t cells. *Blood* 102, 3675-3683.

Ma J., Chen T., Mandelin J., Ceponis A., Miller N.E., Hukkanen M., Ma G.F. y Konttinen Y.T. (2003). Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 60, 2334-2346.

Ma X., Foster J. y Sakic B. (2006). Distribution and prevalence of leukocyte phenotypes in brains of lupus-prone mice. *J Neuroimmunol* 179, 26-36.

Määttä J.A., Sjöholm U.R., Nygårdas P.T., Salmi A.A. y Hinkkanen A.E. (1998). Neutrophils secreting tumor necrosis factor alpha infiltrate the central nervous system of balb/c mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 90, 162-175.

Mack C.L., Vanderlugt-Castaneda C.L., Neville K.L. y Miller S.D. (2003). Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144, 68-79.

Majde J.A. (2010). Neuroinflammation resulting from covert brain invasion by common viruses - a potential role in local and global neurodegeneration. *Medical hypotheses* 75, 204-213.

Majde J.A., Bohnet S.G., Ellis G.A., Churchill L., Leyva-Grado V., Wu M., Szentirmai E., Rehman A. y Krueger J.M. (2007). Detection of mouse-adapted human influenza virus in the olfactory bulbs of mice within hours after intranasal infection. *J Neurovirol* 13, 399-409.

Majno G., La Gattuta M. y Thompson T.E. (1960). Cellular death and necrosis: Chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* 333, 421-465.

Majumder S., Zhou L.Z. y Ransohoff R.M. (1996). Transcriptional regulation of chemokine gene expression in astrocytes. *Journal of neuroscience research* 45, 758-769.

Malaviya R., Ikeda T., Ross E. y Abraham S.N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through tnf-alpha. *Nature* 381, 77-80.

Malik T., Wolbert C., Mauldin J., Sauder C., Carbone K.M. y Rubin S.A. (2007). Functional consequences of attenuating mutations in the haemagglutinin neuraminidase, fusion and polymerase proteins of a wild-type mumps virus strain. *The Journal of general virology* 88, 2533-2541.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Man S., Ubogu E.E. y Ransohoff R.M. (2007). Inflammatory cell migration into the central nervous system: A few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 17, 243-250.

Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C. y Jaillon S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 519-531.

Margolis G. y Kilham L. (1969). Hydrocephalus in hamsters, ferrets, rats, and mice following inoculations with reovirus type i. Ii. Pathologic studies. *Lab Invest* 21, 189-198.

Marie Y., Sanson M., Mokhtari K., Leuraud P., Kujas M., Delattre J.Y., Poirier J., Zalc B. y Hoang-Xuan K. (2001). Olig2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *Lancet* 358, 298-300.

Marques F., Sousa J.C., Correia-Neves M., Oliveira P., Sousa N. y Palha J.A. (2007). The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus. *Neuroscience* 144, 424-430.

Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K. y Wessels M.R. (1992). Prevention of c3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type iii group b streptococci. *Infection and immunity* 60, 3986-3993.

Marrie R.A. y Wolfson C. (2002). Multiple sclerosis and epstein-barr virus. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses* 13, 111-118.

Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I. y Kastner D.L. (2009). Horror autoinflammaticus: The molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annual review of immunology* 27, 621-668.

Mathur M., Johnson C.E. y Sze G. (2012). Fungal infections of the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am* 22, 609-632.

Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A. y Klenk H.D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of virology* 78, 12665-12667.

McCandless E.E., Wang Q., Woerner B.M., Harper J.M. y Klein R.S. (2006). Cxcl12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177, 8053-8064.

McCandless E.E., Zhang B., Diamond M.S. y Klein R.S. (2008). Cxcr4 antagonism increases t cell trafficking in the central nervous system and improves survival from west nile virus encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11270-11275.

McColl S.R., Staykova M.A., Wozniak A., Fordham S., Bruce J. y Willenborg D.O. (1998). Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 161, 6421-6426.

McGeer P.L., Akiyama H., Itagaki S. y McGeer E.G. (1989). Activation of the classical complement pathway in brain tissue of alzheimer patients. *Neurosci Lett* 107, 341-346.

McGeer P.L. y McGeer E.G. (1995). The inflammatory response system of brain: Implications for therapy of alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21, 195-218.

McGeer P.L. y McGeer E.G. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 26, 459-470.

McGeer P.L. y McGeer E.G. (2008). Glial reactions in parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23, 474-483.

McKimmie C.S. y Graham G.J. (2010). Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 1006-1011.

McMahon E.J., Bailey S.L. y Miller S.D. (2006). Cns dendritic cells: Critical participants in cns inflammation? *Neurochem Int* 49, 195-203.

Medicus R.G., Götze O. y Müller-Eberhard H.J. (1976). Alternative pathway of complement: Recruitment of precursor properdin by the labile c3/c5 convertase and the potentiation of the pathway. *The Journal of experimental medicine* 144, 1076-1093.

Meri S., Lehto T., Sutton C.W., Tyynela J. y Baumann M. (1996). Structural composition and functional characterization of soluble cd59: Heterogeneity of the oligosaccharide and glycophosphoinositol (gpi) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis. *The Biochemical journal* 316 (Pt 3), 923-935.

Meri S., Morgan B.P., Davies A., Daniels R.H., Olavesen M.G., Waldmann H. y Lachmann P.J. (1990). Human protectin (cd59), an 18,000-20,000 mw complement lysis restricting factor, inhibits c5b-8 catalysed insertion of c9 into lipid bilayers. *Immunology* 71, 1-9.

Merrill J.E., Ignarro L.J., Sherman M.P., Melinek J. y Lane T.E. (1993). Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151, 2132-2141.

Michelucci A., Heurtaux T., Grandbarbe L., Morga E. y Heuschling P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210, 3-12.

Middeldorp J. y Hol E.M. (2011). Gfap in health and disease. *Progress in neurobiology* 93, 421-443.

Migliore A., Paoletti P. y Villani R. (1963). [production, circulation and reabsorption of the cerebrospinal fluid]. *Minerva neurochirurgica* 10, 89-100.

Milhorat T.H. (1969). Choroid plexus and cerebrospinal fluid production. *Science* 166, 1514-1516.

Miljković D., Timotijević G. y Mostarica Stojković M. (2011). Astrocytes in the tempest of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585, 3781-3788.

Miller S.D., McMahon E.J., Schreiner B. y Bailey S.L. (2007). Antigen presentation in the cns by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 1103, 179-191.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Mitro A K.A. (1977). The ependyma of the ventriculus mesencephali in the rat. *Acta morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 25, 1-8.

Miyagi T. y Yamaguchi K. (2007). Biochemistry of glycans: Sialic acids in comprehensive glycoscience. *Amsterdam Elsevier* 1, 297–322.

Modur V., Zimmerman G.A., Prescott S.M. y McIntyre T.M. (1996). Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 271, 13094-13102.

Molesworth-Kenyon S.J., Oakes J.E. y Lausch R.N. (2005). A novel role for neutrophils as a source of t cell-recruiting chemokines ip-10 and mig during the dth response to hsv-1 antigen. *J Leukoc Biol* 77, 552-559.

Molgaard C.A. y Gresham L. (1986). Swine flu vaccine and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 255, 2294.

Molina-Holgado E., Arevalo-Martin A., Vela J.M. y Guaza C. (2002). [theiler's virus encephalomyelitis infection as a model for multiple sclerosis: Cytokines and pathogenic mechanisms]. *Rev Neurol* 35, 973-978.

Mollnes T.E. y Lachmann P.J. (1988). Regulation of complement. *Scandinavian journal of immunology* 27, 127-142.

Moniki E.S. y Lemke G. (1995). Molecular biology of myelination. In the axon: Structure, function and pathophysiology (New York: Oxford University Press.).

Morell A.G., Gregoriadis G., Scheinberg I.H., Hickman J. y Ashwell G. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246, 1461-1467.

Morgan B.P., Gasque P., Singhrao S. y Piddlesden S.J. (1997). The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology* 38, 43-50.

Mori I., Goshima F., Koshizuka T., Imai Y., Kohsaka S., Koide N., Sugiyama T., Yoshida T., Yokochi T., Kimura Y. y col. (2003). Iba1-expressing microglia respond to herpes simplex virus infection in the mouse trigeminal ganglion. *Brain research Molecular brain research* 120, 52-56.

Morita K., Miura M., Paolone D.R., Engeman T.M., Kapoor A., Remick D.G. y Fairchild R.L. (2001). Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate t cell recruitment and progression of acute allograft rejection. *J Immunol* 167, 2979-2984.

Moscona A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *The New England journal of medicine* 353, 1363-1373.

Mosser D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.

Mosser D.M. y Edwards J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.

Mossman B.T. y Churg A. (1998). Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157, 1666-1680.

Moussion C., Ortega N. y Girard J.P. (2008). The il-1-like cytokine il-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, 3331.

Mrak R.E. y Griffinbc W.S. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine s100b in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 22, 915-922.

Mukherjee P. y Pasinetti G.M. (2001). Complement anaphylatoxin c5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3. *J Neurochem* 77, 43-49.

Muldoon L.L., Alvarez J.I., Begley D.J., Boado R.J., Del Zoppo G.J., Doolittle N.D., Engelhardt B., Hallenbeck J.M., Lonser R.R., Ohlfest J.R. y col. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 13-21.

Müller H.E. (1976). [neuraminidase as a pathogenicity factor in microbial infections (proceedings)]. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 235, 106-110.

Murthy J.M.K. (2007). Fungal infections of the central nervous system: The clinical syndromes. *Neurol India* 55, 221-225.

Nadeau S. y Rivest S. (1999). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: A view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* 93, 1449-1464.

Nagatsu T. y Sawada M. (2005). Inflammatory process in parkinson's disease: Role for cytokines. *Current pharmaceutical design* 11, 999-1016.

Nair A., Frederick T.J. y Miller S.D. (2008). Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 65, 2702-2720.

Nakamura Y. y Sato K. (1993). Role of disturbance of ependymal ciliary movement in development of hydrocephalus in rats. *Childs Nerv Syst* 9, 65-71.

Nash B., Thomson C.E., Linington C., Arthur A.T., McClure J.D., McBride M.W. y Barnett S.C. (2011). Functional duality of astrocytes in myelination. *J Neurosci* 31, 13028-13038.

Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.

Neumann H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191-199.

Neumann H., Cavalié A., Jenne D.E. y Wekerle H. (1995). Induction of mhc class i genes in neurons. *Science* 269, 549-552.

Neumann H., Medana I.M., Bauer J. y Lassmann H. (2002a). Cytotoxic t lymphocytes in autoimmune and degenerative cns diseases. *Trends Neurosci* 25, 313-319.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Neumann H., Misgeld T., Matsumuro K. y Wekerle H. (1998). Neurotrophins inhibit major histocompatibility class ii inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5779-5784.

Neumann H., Schmidt H., Wilharm E., Behrens L. y Wekerle H. (1997). Interferon gamma gene expression in sensory neurons: Evidence for autocrine gene regulation. *The Journal of experimental medicine* 186, 2023-2031.

Neumann H., Schweigreiter R., Yamashita T., Rosenkranz K., Wekerle H. y Barde Y.A. (2002b). Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci* 22, 854-862.

Neumann J., Sauerzweig S., Rönicke R., Gunzer F., Dinkel K., Ullrich O., Gunzer M. y Reymann K.G. (2008). Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: A new mechanism of cns immune privilege. *J Neurosci* 28, 5965-5975.

Neuwelt E., Abbott N.J., Abrey L., Banks W.A., Blakley B., Davis T., Engelhardt B., Grammas P., Nedergaard M., Nutt J. y col. (2008). Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 7, 84-96.

Neuwelt E.A., Bauer B., Fahlke C., Fricker G., Iadecola C., Janigro D., Leybaert L., Molnár Z., O'Donnell M.E., Povlishock J.T. y col. (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci* 12, 169-182.

Neuwelt E.A. y Clark W.K. (1978). Unique aspects of central nervous system immunology. *Neurosurgery* 3, 419-430.

Nguyen M.D., Julien J.-P. y Rivest S. (2002). Innate immunity: The missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227.

Ninomiya H., Stewart B.H., Rollins S.A., Zhao J., Bothwell A.L. y Sims P.J. (1992). Contribution of the n-linked carbohydrate of erythrocyte antigen cd59 to its complement-inhibitory activity. *J Biol Chem* 267, 8404-8410.

Nirogi R., Kandikere V., Mudigonda K., Bhyrapuneni G., Muddana N., Saralaya R. y Benade V. (2009). A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods* 178, 116-119.

Noel P., Nelson S., Bokulic R., Bagby G., Lippton H., Lipscomb G. y Summer W. (1990). Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. *Life sciences* 47, 1023-1029.

Northrop N.A. y Yamamoto B.K. (2011). Neuroimmune pharmacology from a neuroscience perspective. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 6, 10-19.

Norton W.T., Brosnan C.F., Cammer W. y Goldmuntz E.A. (1990). Mechanisms and suppression of inflammatory demyelination. *Acta neurobiologiae experimentalis* 50, 225-235.

Nuki G. y Simkin P.A. (2006). A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis research & therapy* 8 Suppl 1, S1.

Nyland H., Mörk S. y Matre R. (1982). In-situ characterization of mononuclear cell infiltrates in lesions of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 8, 403-411.

O'Barr S.A., Caguioa J., Gruol D., Perkins G., Ember J.A., Hugli T. y Cooper N.R. (2001). Neuronal expression of a functional receptor for the c5a complement activation fragment. *J Immunol* 166, 4154-4162.

O'Toole R.D., Goode L. y Howe C. (1971). Neuraminidase activity in bacterial meningitis. *J Clin Invest* 50, 979-985.

Olson J.K. y Miller S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple tlrs. *J Immunol* 173, 3916-3924.

Orozco S., Feria-Romero I. y Grijalva I. (2013). Immunology and epilepsy: Clinical and experimental evidence. *Current Immunology Reviews* 6, 185-194.

Orth D., Ehrlenbach S., Brockmeyer J., Khan A.B., Huber G., Karch H., Sarg B., Lindner H. y Wurzner R. (2010). Espp, a serine protease of enterohemorrhagic escherichia coli, impairs complement activation by cleaving complement factors c3/c3b and c5. *Infection and immunity* 78, 4294-4301.

Osaka H., Mukherjee P., Aisen P.S. y Pasinetti G.M. (1999). Complement-derived anaphylatoxin c5a protects against glutamate-mediated neurotoxicity. *J Cell Biochem* 73, 303-311.

Osterloh A., Veit A., Gessner A., Fleischer B. y Breloer M. (2008). Hsp60-mediated t cell stimulation is independent of tlr4 and il-12. *International immunology* 20, 433-443.

Padilla B., Contreras A. y Noris García E. (2005). Complement and central nervous system. *Rev Mex Neuroci* 6, 310-314.

Paez P., Batiz L.F., Roales-Bujan R., Rodriguez-Perez L.M., Rodriguez S., Jimenez A.J., Rodriguez E.M. y Perez-Figares J.M. (2007). Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 1082-1092.

Pagenstecher A., Lassmann S., Carson M.J., Kincaid C.L., Stalder A.K. y Campbell I.L. (2000). Astrocyte-targeted expression of il-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 164, 4481-4492.

Palin K., Cunningham C., Forse P., Perry V.H. y Platt N. (2008). Systemic inflammation switches the inflammatory cytokine profile in cns wallerian degeneration. *Neurobiology of disease* 30, 19-29.

Pangburn M.K. (1983). Activation of complement via the alternative pathway. *Federation proceedings* 42, 139-143.

Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Pangburn M.K. (2000). Host recognition and target differentiation by factor h, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* 49, 149-157.

Pangburn M.K. y Müller-Eberhard H.J. (1978). Complement c3 convertase: Cell surface restriction of beta1h control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2416-2420.

Pangburn M.K., Pangburn K.L., Koistinen V., Meri S. y Sharma A.K. (2000). Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: Interactions among factor h, c3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J Immunol* 164, 4742-4751.

Pangburn M.K., Schreiber R.D. y Müller-Eberhard H.J. (1981). Formation of the initial c3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of c3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native c3. *The Journal of experimental medicine* 154, 856-867.

Patro N., Nagayach A. y Patro I.K. (2010). Iba1 expressing microglia in the dorsal root ganglia become activated following peripheral nerve injury in rats. *Indian journal of experimental biology* 48, 110-116.

Paxinos G. y Watson C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates, 3rd edn (San Diego: Academic Press).

Peckham R.M., Handrigan M.T., Bentley T.B., Falabella M.J., Chrovian A.D., Stahl G.L. y Tsokos G.C. (2007). C5-blocking antibody reduces fluid requirements and improves responsiveness to fluid infusion in hemorrhagic shock managed with hypotensive resuscitation. *J Appl Physiol* 102, 673-680.

Peretto P., Dati C., De Marchis S., Kim H.H., Ukhanova M., Fasolo A. y Margolis F.L. (2004). Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128, 685-696.

Perez-Figares J.M., Jimenez A.J., Perez-Martin M., Fernandez-Llebrez P., Cifuentes M., Riera P., Rodriguez S. y Rodriguez E.M. (1998). Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse hyh. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 188-202.

Pérez-Fígares J.M., Jimenez A.J. y Rodríguez E.M. (2001). Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52, 591-607.

Pérez-Martín M. (2000). Papel del epitelio ependimario en la estabilidad de los ventrículos cerebrales y en la neurogénesis en el adulto. *Biología Celular, Genética y Fisiología*, Universidad de Málaga.

Perez-Martin M., Cifuentes M., Grondona J.M., Bermudez-Silva F.J., Arrabal P.M., Perez-Figares J.M., Jimenez A.J., Garcia-Segura L.M. y Fernandez-Llebrez P. (2003). Neurogenesis in explants from the walls of the lateral ventricle of adult bovine brain: Role of endogenous igf-1 as a survival factor. *Eur J Neurosci* 17, 205-211.

Perlmutter D.H. y Colten H.R. (1986). Molecular immunobiology of complement biosynthesis: A model of single-cell control of effector-inhibitor balance. *Annual review of immunology* 4, 231-251.

Perraud F., Kuchler S., Gobaille S., Labourdette G., Vincendon G. y Zanetta J.P. (1988). Endogenous lectin csl is present on the membrane of cilia of rat brain ependymal cells. *J Neurocytol* 17, 745-751.

Perry V.H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: Implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, behavior, and immunity* 18, 407-413.

Perry V.H., Bell M.D., Brown H.C. y Matyszak M.K. (1995). Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5, 636-641.

Perry V.H., Cunningham C. y Holmes C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167.

Peters A. (2002). The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: A review. *J Neurocytol* 31, 581-593.

Petito C.K. y Adkins B. (2005). Choroid plexus selectively accumulates t-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. *J Neuroimmunol* 162, 19-27.

Petrov T., Howarth A.G., Krukoff T.L. y Stevenson B.R. (1994). Distribution of the tight junction-associated protein zo-1 in circumventricular organs of the cns. *Brain research Molecular brain research* 21, 235-246.

Philippon V., Vellutini C., Gambarelli D., Harkiss G., Arbuthnott G., Metzger D., Roubin R. y Filippi P. (1994). The basic domain of the lentiviral tat protein is responsible for damages in mouse brain: Involvement of cytokines. *Virology* 205, 519-529.

Phillips S., Chokshi S., Riva A., Evans A., Williams R. y Naoumov N.V. (2010). Cd8(+) t cell control of hepatitis b virus replication: Direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol* 184, 287-295.

Pisalyaput K. y Tenner A.J. (2008). Complement component c1q inhibits beta-amyloid- and serum amyloid p-induced neurotoxicity via caspase- and calpain-independent mechanisms. *J Neurochem* 104, 696-707.

Pocock J.M. y Kettenmann H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30, 527-535.

Podack E.R., Tschoop J. y Müller-Eberhard H.J. (1982). Molecular organization of c9 within the membrane attack complex of complement. Induction of circular c9 polymerization by the c5b-8 assembly. *The Journal of experimental medicine* 156, 268-282.

Polazzi E. y Contestabile A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Reviews in the neurosciences* 13, 221-242.

Poli A., Kmiecik J., Domingues O., Hentges F., Bléry M., Chekenya M., Boucraut J. y Zimmer J. (2013). Nk cells in central nervous system disorders. *J Immunol* 190, 5355-5362.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Porcel J.M. y Vergani D. (1993). [the complement system: A fascinating biological chain of events]. *Medicina clinica* 100, 428-435.

Prat A., Biernacki K., Lavoie J.F., Poirier J., Duquette P. y Antel J.P. (2002). Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol* 59, 391-397.

Prendergast C.T. y Anderton S.M. (2009). Immune cell entry to central nervous system--current understanding and prospective therapeutic targets. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 9, 315-327.

Prendergast R.A., Iliff C.E., Coskuncan N.M., Caspi R.R., Sartani G., Tarrant T.K., Lutty G.A. y McLeod D.S. (1998). T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 754-762.

Price C.J., Menon D.K., Peters A.M., Ballinger J.R., Barber R.W., Balan K.K., Lynch A., Xuereb J.H., Fryer T., Guadagno J.V. y col. (2004). Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: An imaging-based study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35, 1659-1664.

Prodinger C., Bunse J., Krüger M., Schiefenhövel F., Brandt C., Laman J.D., Greter M., Immig K., Heppner F., Becher B. y col. (2011). Cd11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 121, 445-458.

Prokopowicz Z., Marcinkiewicz J., Katz D.R. y Chain B.M. (2012). Neutrophil myeloperoxidase: Soldier and statesman. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 60, 43-54.

Ramaglia V., King R.H., Nourallah M., Wolterman R., de Jonge R., Ramkema M., Vigar M.A., van der Wetering S., Morgan B.P., Troost D. y col. (2007). The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid wallerian degeneration. *J Neurosci* 27, 7663-7672.

Ransohoff R.M. y Brown M.A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122, 1164-1171.

Ransohoff R.M. y Cardona A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253-262.

Ransohoff R.M., Kivisakk P. y Kidd G. (2003a). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3, 569-581.

Ransohoff R.M., Kivisäkk P. y Kidd G. (2003b). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3, 569-581.

Rash J.E., Yasumura T., Davidson K.G., Furman C.S., Dudek F.E. y Nagy J.I. (2001). Identification of cells expressing cx43, cx30, cx26, cx32 and cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell communication & adhesion* 8, 315-320.

Ravits J. (2005). Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: A hypothesis of persistent (non-lytic) enteroviral infection. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6, 77-87.

Rawal N. y Pangburn M.K. (2007). Role of the c3b-binding site on c4b-binding protein in regulating classical pathway c5 convertase. *Molecular immunology* 44, 1105-1114.

Ray P.K. y Sundaram K. (1975). Cytolysis of neuraminidase-treated autochthonous lymphoid cells by autologous serum. *Clinical and experimental immunology* 19, 529-532.

Readhead C., Takasashi N., Shine H.D., Saavedra R., Sidman R. y Hood L. (1990). Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann N Y Acad Sci* 605, 280-285.

Redies C. y Takeichi M. (1996). Cadherins in the developing central nervous system: An adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev Biol* 180, 413-423.

Redzic Z.B., Biringer J., Barnes K., Baldwin S.A., Al-Sarraf H., Nicola P.A., Young J.D., Cass C.E., Barrand M.A. y Hladky S.B. (2005). Polarized distribution of nucleoside transporters in rat brain endothelial and choroid plexus epithelial cells. *J Neurochem* 94, 1420-1426.

Rezai-Zadeh K., Gate D. y Town T. (2009). Cns infiltration of peripheral immune cells: D-day for neurodegenerative disease? *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4, 462-475.

Rheingold S.R., Brown V.I., Fang J., Kim J.M. y Grupp S.A. (2003). Role of the bcr complex in b cell development, activation, and leukemic transformation. *Immunol Res* 27, 309-330.

Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K. y Lambris J.D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* 11, 785-797.

Rima B.K. y Duprex W.P. (2005). Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus research* 111, 132-147.

Ritchie K.J., Malakhov M.P., Hetherington C.J., Zhou L., Little M.T., Malakhova O.A., Sipe J.C., Orkin S.H. y Zhang D.E. (2002). Dysregulation of protein modification by isg15 results in brain cell injury. *Genes Dev* 16, 2207-2212.

Ritter M.R., Banin E., Moreno S.K., Aguilar E., Dorrell M.I. y Friedlander M. (2006). Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 116, 3266-3276.

Roberge C.J., de Medicis R., Dayer J.M., Rola-Pleszczynski M., Naccache P.H. y Poubelle P.E. (1994). Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active il-1 and il-1 receptor antagonist. *J Immunol* 152, 5485-5494.

Rock K.L., Latz E., Ontiveros F. y Kono H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology* 28, 321-342.

Rodriguez E.M., Blazquez J.L., Pastor F.E., Pelaez B., Pena P., Peruzzo B. y Amat P. (2005). Hypothalamic tanycytes: A key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247, 89-164.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Rodriguez P. y Bouchaud C. (1996). The supra-ependymal innervation is not responsible for the repression of tight junctions in the rat cerebral ependyma. *Neurobiology (Bp)* 4, 185-201.

Rogers J., Cooper N.R., Webster S., Schultz J., McGeer P.L., Styren S.D., Civin W.H., Brachova L., Bradt B., Ward P. y col. (1992). Complement activation by beta-amyloid in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10016-10020.

Rollins S.A. y Sims P.J. (1990). The complement-inhibitory activity of cd59 resides in its capacity to block incorporation of c9 into membrane c5b-9. *J Immunol* 144, 3478-3483.

Romson J.L., Hook B.G., Kunkel S.L., Abrams G.D., Schork M.A. y Lucchesi B.R. (1983). Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67, 1016-1023.

Rosenberg G.A. (2002). Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* 8, 586-595.

Roth A.D., Ramírez G., Alarcón R. y Von Bernhardi R. (2005). Oligodendrocytes damage in alzheimer's disease: Beta amyloid toxicity and inflammation. *Biol Res* 38, 381-387.

Roth Y., Kimhi Y., Edery H., Aharonson E. y Priel Z. (1985). Ciliary motility in brain ventricular system and trachea of hamsters. *Brain Res* 330, 291-297.

Rothwell N.J. y Relton J.K. (1993). Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the cns. *Neurosci Biobehav Rev* 17, 217-227.

Rozniecki J.J., Hauser S.L., Stein M., Lincoln R. y Theoharides T.C. (1995). Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 37, 63-66.

Rozovsky I., Morgan T.E., Willoughby D.A., Dugichi-Djordjevich M.M., Pasinetti G.M., Johnson S.A. y Finch C.E. (1994). Selective expression of clusterin (sgp-2) and complement c1qb and c4 during responses to neurotoxins in vivo and in vitro. *Neuroscience* 62, 741-758.

Russell J.H. y Ley T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 20, 323-370.

Saijo K., Winner B., Carson C.T., Collier J.G., Boyer L., Rosenfeld M.G., Gage F.H. y Glass C.K. (2009). A nurr1/corest pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137, 47-59.

Sakic B., Szechtman H., Talangbayan H., Denburg S.D., Carbotte R.M. y Denburg J.A. (1994). Disturbed emotionality in autoimmune mrl-lpr mice. *Physiology & behavior* 56, 609-617.

Sakka L., Coll G. y Chazal J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 128, 309-316.

Santana M.A. y Rosenstein Y. (2003). What it takes to become an effector t cell: The process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195, 392-401.

Sarma J.V. y Ward P.A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res* 343, 227-235.

Sarnat H.B. (1992a). Regional differentiation of the human fetal ependyma: Immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 51, 58-75.

Sarnat H.B. (1992b). Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 8, 163-178.

Sasseville V.G. y Lackner A.A. (1997). Neuropathogenesis of simian immunodeficiency virus infection in macaque monkeys. *J Neurovirol* 3, 1-9.

Sato T. (1981). [subacute viral infection in the central nervous system -- subacute sclerosing panencephalitis]. *Nihon Rinsho* 39, 2303-2307.

Savarin C. y Bergmann C.C. (2008). Neuroimmunology of central nervous system viral infections: The cells, molecules and mechanisms involved. *Current opinion in pharmacology* 8, 472-479.

Sawamoto K., Wichterle H., Gonzalez-Perez O., Cholfin J.A., Yamada M., Spassky N., Murcia N.S., Garcia-Verdugo J.M., Marin O., Rubenstein J.L. y col. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.

Sayah S., Ischenko A.M., Zhakhov A., Bonnard A.S. y Fontaine M. (1999). Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by c3a and c5a anaphylatoxins: Specific increase in interleukin-6 mrna expression. *J Neurochem* 72, 2426-2436.

Sayed B.A., Christy A.L., Walker M.E. y Brown M.A. (2010). Meningeal mast cells affect early t cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through tnf: A role for neutrophil recruitment? *J Immunol* 184, 6891-6900.

Scott K., Manunta M., Germain C., Smith P., Jones M., Mitchell P., Dessi D., Branigan Bamford K., Lechler R.I., Fiori P.L. y col. (2005). Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology* 116, 245-254.

Schauer R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal* 17, 485-499.

Schmitt O., Preusse S. y Haas S.J. (2004). Comparison of contrast, sensitivity and efficiency of signal amplified and nonamplified immunohistochemical reactions suitable for videomicroscopy-based quantification and neuroimaging. *Brain research Brain research protocols* 12, 157-171.

Schmued L.C. y Hopkins K.J. (2000). Fluoro-jade b: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874, 123-130.

Schneider-Schaulies J., Meulen V. y Schneider-Schaulies S. (2003). Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol* 9, 247-252.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Schumacher C., Clark-Lewis I., Baggiolini M. y Moser B. (1992). High- and low-affinity binding of gro alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10542-10546.

Schumann R.R., Belka C., Reuter D., Lamping N., Kirschning C.J., Weber J.R. y Pfeil D. (1998). Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 91, 577-584.

Schwab C. y McGeer P.L. (2002). Complement activated c4d immunoreactive oligodendrocytes delineate small cortical plaques in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 174, 81-88.

Seder R.A. y Ahmed R. (2003). Similarities and differences in cd4+ and cd8+ effector and memory t cell generation. *Nature immunology* 4, 835-842.

Shaftel S.S., Carlson T.J., Olschowka J.A., Kyrkanides S., Matousek S.B. y O'Banion M.K. (2007). Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 27, 9301-9309.

Sheikh K.A., Sun J., Liu Y., Kawai H., Crawford T.O., Proia R.L., Griffin J.W. y Schnaar R.L. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7532-7537.

Shen Q., Wang Y., Kokovay E., Lin G., Chuang S.M., Goderie S.K., Roysam B. y Temple S. (2008). Adult svz stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.

Shinjyo N., Stahlberg A., Dragunow M., Pekny M. y Pekna M. (2009). Complement-derived anaphylatoxin c3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells* 27, 2824-2832.

Shirazi Y., McMorris F.A. y Shin M.L. (1989). Arachidonic acid mobilization and phosphoinositide turnover by the terminal complement complex, c5b-9, in rat oligodendrocyte x c6 glioma cell hybrids. *J Immunol* 142, 4385-4391.

Siffrin V., Brandt A.U., Radbruch H., Herz J., Boldakowa N., Leuenberger T., Werr J., Hahner A., Schulze-Topphoff U., Nitsch R. y col. (2009). Differential immune cell dynamics in the cns cause cd4+ t cell compartmentalization. *Brain* 132, 1247-1258.

Simi A., Tsakiri N., Wang P. y Rothwell N.J. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochemical Society transactions* 35, 1122-1126.

Smith G.M. y Shine H.D. (1992). Immunofluorescent labeling of tight junctions in the rat brain and spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 10, 387-392.

Sonderegger I., Iezzi G., Maier R., Schmitz N., Kurrer M. y Kopf M. (2008). Gm-csf mediates autoimmunity by enhancing il-6-dependent th17 cell development and survival. *The Journal of experimental medicine* 205, 2281-2294.

Song W.C., Sarrias M.R. y Lambris J.D. (2000). Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 49, 187-198.

Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M. y Alvarez-Buylla A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25, 10-18.

Spector R. y Johanson C. (2006). Micronutrient and urate transport in choroid plexus and kidney: Implications for drug therapy. *Pharmaceutical research* 23, 2515-2524.

Sriram U., Biswas C., Behrens E.M., Dinnall J.-A., Shivers D.K., Monestier M., Argon Y. y Gallucci S. (2007). Il-4 suppresses dendritic cell response to type i interferons. *J Immunol* 179, 6446-6455.

Stahel P.F. y Barnum S.R. (1997). Bacterial meningitis: Complement gene expression in the central nervous system. *Immunopharmacology* 38, 65-72.

Stahel P.F., Morganti-Kossmann M.C. y Kossmann T. (1998). The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev* 27, 243-256.

Stamatos N.M., Curreli S., Zella D. y Cross A.S. (2004). Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases erk 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. *J Leukoc Biol* 75, 307-313.

Stamatovic S.M., Keep R.F. y Andjelkovic A.V. (2008). Brain endothelial cell-cell junctions: How to "open" the blood brain barrier. *Current neuropharmacology* 6, 179-192.

Steffen B.J., Breier G., Butcher E.C., Schulz M. y Engelhardt B. (1996). Icam-1, vcam-1, and madcam-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *The American journal of pathology* 148, 1819-1838.

Stoll G., Jander S. y Schroeter M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in neurobiology* 56, 149-171.

Storch M.K., Piddlesden S., Haltia M., Iivanainen M., Morgan P. y Lassmann H. (1998). Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465-471.

Streit W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the cns. *Glia* 40, 133-139.

Suarez C.R., Pickett W.C., Bell D.H., McClintock D.K., Oronsky A.L. y Kerwar S.S. (1987). Effect of low dose methotrexate on neutrophil chemotaxis induced by leukotriene b4 and complement c5a. *The Journal of rheumatology* 14, 9-11.

Süer Gökmen S., Kazezoğlu C., Sunar B., Ozçelik F., Güngör O., Yorulmaz F. y Gülen S. (2006). Relationship between serum sialic acids, sialic acid-rich inflammation-sensitive proteins and cell damage in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 44, 199-206.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Suzuki M. y Raisman G. (1992). The glial framework of central white matter tracts: Segmented rows of contiguous interfascicular oligodendrocytes and solitary astrocytes give rise to a continuous meshwork of transverse and longitudinal processes in the adult rat fimbria. *Glia* 6, 222-235.

Svennerholm L. (1994). Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Progress in brain research* 101, 6-14.

Szmydynger-Chodobska J., Strazielle N., Zink B.J., Ghersi-Egea J.-F. y Chodobski A. (2009). The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1503-1516.

Takahashi M. y Yamada T. (2001). A possible role of influenza a virus infection for parkinson's disease. *Advances in neurology* 86, 91-104.

Takano T., Mekata Y., Yamano T. y Shimada M. (1993). Early ependymal changes in experimental hydrocephalus after mumps virus inoculation in hamsters. *Acta Neuropathol* 85, 521-525.

Takeda K. y Akira S. (2004). Tlr signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9.

Tamminga C.A., Thaker G.K., Buchanan R., Kirkpatrick B., Alphs L.D., Chase T.N. y Carpenter W.T. (1992). Limbic system abnormalities identified in schizophrenia using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alterations with deficit syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 49, 522-530.

Tani M., Fuentes M.E., Peterson J.W., Trapp B.D., Durham S.K., Loy J.K., Bravo R., Ransohoff R.M. y Lira S.A. (1996). Neutrophil infiltration, glial reaction, and neurological disease in transgenic mice expressing the chemokine n51/kc in oligodendrocytes. *J Clin Invest* 98, 529-539.

Taylor P.W. (1992). Complement-mediated killing of susceptible gram-negative bacteria: An elusive mechanism. *Exp Clin Immunogenet* 9, 48-56.

Tchélingérian J.L., Le Saux F. y Jacque C. (1996). Identification and topography of neuronal cell populations expressing tnf alpha and il-1 alpha in response to hippocampal lesion. *Journal of neuroscience research* 43, 99-106.

Tedder T.F., Steeber D.A., Chen A. y Engel P. (1995). The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 866-873.

Terada N., Kidd G.J., Kinter M., Bjartmar C., Moran-Jones K. y Trapp B.D. (2005). Beta iv tubulin is selectively expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Glia* 50, 212-222.

Tettamanti G., Bonali F., Marchesini S. y Zambotti V. (1973). A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 296, 160-170.

Thibault G. y Bardos P. (1995). Compared tcr and cd3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta t cells. Evidence for the association of two tcr heterodimers with three cd3 epsilon chains in the tcr/cd3 complex. *J Immunol* 154, 3814-3820.

Thoenen H. y Sendtner M. (2002). Neurotrophins: From enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1046-1050.

Thompson E.J. y Keir G. (1990). Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Annals of clinical biochemistry* 27 (Pt 5), 425-435.

Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J. y col. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Tian L., Rauvala H. y Gahmberg C.G. (2009). Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends in immunology* 30, 91-99.

Tompkins W.A., Seth P., Gee S. y Rawls W.E. (1976). Neuraminidase reversal of resistance to lysis of herpes simplex virus-infected cells by antibody and complement. *J Immunol* 116, 489-495.

Torcia M., Bracci-Laudiero L., Lucibello M., Nencioni L., Labardi D., Rubartelli A., Cozzolino F., Aloe L. y Garaci E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory b lymphocytes. *Cell* 85, 345-356.

Tran E.H., Hoekstra K., van Rooijen N., Dijkstra C.D. y Owens T. (1998). Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol* 161, 3767-3775.

Trapp B.D. y Nave K.A. (2008). Multiple sclerosis: An immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31, 247-269.

Traugott U., Scheinberg L.C. y Raine C.S. (1982a). Multiple sclerosis: Heterology among early t cells and tg cells. *Ann Neurol* 11, 182-186.

Traugott U., Shevach E., Chiba J., Stone S.H. y Raine C.S. (1982b). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis: T- and b-cell distribution within the target organ. *Cellular immunology* 70, 345-356.

Traynor T.R., Majde J.A., Bohnet S.G. y Krueger J.M. (2007). Interferon type i receptor-deficient mice have altered disease symptoms in response to influenza virus. *Brain, behavior, and immunity* 21, 311-322.

Trifilo M.J., Bergmann C.C., Kuziel W.A. y Lane T.E. (2003). Cc chemokine ligand 3 (ccl3) regulates cd8(+)-t-cell effector function and migration following viral infection. *Journal of virology* 77, 4004-4014.

Tsai H.H., Frost E., To V., Robinson S., Ffrench-Constant C., Geertman R., Ransohoff R.M. y Miller R.H. (2002). The chemokine receptor cxcr2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110, 373-383.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tsunoda I., Lane T.E., Blackett J. y Fujinami R.S. (2004). Distinct roles for ip-10/cxcl10 in three animal models, theiler's virus infection, eae, and mhv infection, for multiple sclerosis: Implication of differing roles for ip-10. *Mult Scler* 10, 26-34.

Tuomisto L., Kilpeläinen H. y Riekkinen P. (1983). Histamine and histamine-n-methyltransferase in the csf of patients with multiple sclerosis. *Agents Actions* 13, 255-257.

Vakeva A. y Meri S. (1998). Complement activation and regulator expression after anoxic injury of human endothelial cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 106, 1149-1156.

Vakkala M., Pääkkö P. y Soini Y. (1999). Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *British journal of cancer* 81, 592-599.

van Dixhoorn M.G., Timmerman J.J., Van Gijlswijk-Janssen D.J., Muizert Y., Verweij C., Discipio R.G. y Daha M.R. (1997). Characterization of complement c6 deficiency in a pvg/c rat strain. *Clinical and experimental immunology* 109, 387-396.

Varki A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2, 25-40.

Varki A. y Gagneux P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1253, 16-36.

Vartanian T., Li Y., Zhao M. y Stefansson K. (1995). Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1, 732-743.

Veerhuis R., Boshuizen R.S. y Familian A. (2005). Amyloid associated proteins in alzheimer's and prion disease. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4, 235-248.

Veerhuis R., Janssen I., Hoozemans J.J., De Groot C.J., Hack C.E. y Eikelenboom P. (1998). Complement c1-inhibitor expression in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 96, 287-296.

Veerhuis R., Nielsen H.M. y Tenner A.J. (2011). Complement in the brain. *Molecular immunology* 48, 1592-1603.

Verreck F.A.W., de Boer T., Langenberg D.M.L., van der Zanden L. y Ottenhoff T.H.M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and ifn-gamma- and cd40l-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79, 285-293.

Villoslada P., Hauser S.L., Bartke I., Unger J., Heald N., Rosenberg D., Cheung S.W., Mobley W.C., Fisher S. y Genain C.P. (2000). Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of t helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *The Journal of experimental medicine* 191, 1799-1806.

Wagner C., Batiz L.F., Rodriguez S., Jimenez A.J., Paez P., Tome M., Perez-Figares J.M. y Rodriguez E.M. (2003). Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1019-1040.

Wallis R. (2007). Interactions between mannose-binding lectin and masps during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology* 212, 289-299.

Weiner H.L. y Frenkel D. (2006). Immunology and immunotherapy of alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 6, 404-416.

Weiss A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: A tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73, 209-212.

Wekerle H., Sun D., Oropeza-Wekerle R.L. y Meyermann R. (1987). Immune reactivity in the nervous system: Modulation of t-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132, 43-57.

Weller R.O., Djuanda E., Yow H.-Y. y Carare R.O. (2009). Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* 117, 1-14.

Weller R.O., Engelhardt B. y Phillips M.J. (1996). Lymphocyte targeting of the central nervous system: A review of afferent and efferent cns-immune pathways. *Brain Pathol* 6, 275-288.

Weller R.O., Galea I., Carare R.O. y Minagar A. (2010). Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* 17, 295-306.

Westergaard E. (1969). The cerebral ventricles of the rat during growth. *Acta anatomica* 74, 405-423.

Westergaard T., Mortensen P.B., Pedersen C.B., Wohlfahrt J. y Melbye M. (1999). Exposure to prenatal and childhood infections and the risk of schizophrenia: Suggestions from a study of sibship characteristics and influenza prevalence. *Arch Gen Psychiatry* 56, 993-998.

Wetsel R.A. (1995). Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol* 7, 48-53.

Wilson E.H., Harris T.H., Mrass P., John B., Tait E.D., Wu G.F., Pepper M., Wherry E.J., Dzierzinski F., Roos D. y col. (2009). Behavior of parasite-specific effector cd8+ t cells in the brain and visualization of a kinesis-associated system of reticular fibers. *Immunity* 30, 300-311.

Wilson E.H., Weninger W. y Hunter C.A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 120, 1368-1379.

Wirenfeldt M., Clare R., Tung S., Bottini A., Mathern G.W. y Vinters H.V. (2009). Increased activation of iba1+ microglia in pediatric epilepsy patients with rasmussen's encephalitis compared with cortical dysplasia and tuberous sclerosis complex. *Neurobiology of disease* 34, 432-440.

Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Wolburg H. y Paulus W. (2010). Choroid plexus: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 75-88.

Wolburg H., Wolburg-Buchholz K. y Engelhardt B. (2004). Involvement of tight junctions during transendothelial migration of mononuclear cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ernst Schering Research Foundation workshop* 47, 17-38.

Wolburg H., Wolburg-Buchholz K. y Engelhardt B. (2005). Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 109, 181-190.

Wolburg K., Gerhardt H., Schulz M., Wolburg H. y Engelhardt B. (1999). Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse. *Cell Tissue Res* 296, 259-269.

Wong G., Goldshmit Y. y Turnley A.M. (2004). Interferon-gamma but not tnf alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol* 187, 171-177.

Wood P.M. y Bunge R.P. (1991). The origin of remyelinating cells in the adult central nervous system: The role of the mature oligodendrocyte. *Glia* 4, 225-232.

Woodruff T.M., Ager R.R., Tenner A.J., Noakes P.G. y Taylor S.M. (2010). The role of the complement system and the activation fragment c5a in the central nervous system. *Neuromolecular Med* 12, 179-192.

Worthington W.C., Jr. y Cathcart R.S., 3rd (1963). Ependymal cilia: Distribution and activity in the adult human brain. *Science* 139, 221-222.

Wraith D.C. y Nicholson L.B. (2012). The adaptive immune system in diseases of the central nervous system. *J Clin Invest* 122, 1172-1179.

Wyss-Coray T., Borrow P., Brooker M.J. y Mucke L. (1997). Astroglial overproduction of tgf-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol* 77, 45-50.

Wyss-Coray T., Loike J.D., Brionne T.C., Lu E., Anankov R., Yan F., Silverstein S.C. y Husemann J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453-457.

Xia Y., Hu H.Z., Liu S., Ren J., Zafirov D.H. y Wood J.D. (1999). Il-1beta and il-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* 103, 1309-1316.

Xie L., Poteet E.C., Li W., Scott A.E., Liu R., Wen Y., Ghorpade A., Simpkins J.W. y Yang S.H. (2010). Modulation of polymorphonuclear neutrophil functions by astrocytes. *Journal of neuroinflammation* 7, 53.

Yaksh T.L. (1999). Spinal drug and delivery., 1st edn (Seattle: Elsevier Sciences).

Yamada T., McGeer P.L. y McGeer E.G. (1992). Lewy bodies in parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol* 84, 100-104.

Yamashita T., Wu Y.P., Sandhoff R., Werth N., Mizukami H., Ellis J.M., Dupree J.L., Geyer R., Sandhoff K. y Proia R.L. (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2725-2730.

Yang H., Yu J., Fu G., Shi X., Xiao L., Chen Y., Fang X. y He C. (2007). Interaction between single molecules of mac-1 and icam-1 in living cells: An atomic force microscopy study. *Exp Cell Res* 313, 3497-3504.

Yang L.J., Zeller C.B., Shaper N.L., Kiso M., Hasegawa A., Shapiro R.E. y Schnaar R.L. (1996). Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 814-818.

Yates A.J., Franklin T.K., McKinney P., Collins R., Comas T., Boesel C.P. y Pearl D.K. (1999). Gangliosides and neutral glycolipids in ependymal, neuronal and primitive neuroectodermal tumors. *Journal of molecular neuroscience : MN* 12, 111-121.

Yusuf-Makagiansar H., Anderson M.E., Yakovleva T.V., Murray J.S. y Siahaan T.J. (2002). Inhibition of lfa-1/icam-1 and vla-4/vcam-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Medicinal research reviews* 22, 146-167.

Zahs K.R. (1998). Heterotypic coupling between glial cells of the mammalian central nervous system. *Glia* 24, 85-96.

Zehntner S.P., Brickman C., Bourbonniere L., Remington L., Caruso M. y Owens T. (2005). Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate t cell responses. *J Immunol* 174, 5124-5131.

Zhang J.R. y Tuomanen E. (1999). Molecular and cellular mechanisms for microbial entry into the cns. *J Neurovirol* 5, 591-603.

Zhang R.X., Liu B., Li A., Wang L., Ren K., Qiao J.T., Berman B.M. y Lao L. (2008). Interleukin 1beta facilitates bone cancer pain in rats by enhancing nmda receptor nr-1 subunit phosphorylation. *Neuroscience* 154, 1533-1538.

Zhou J., Stohlman S.A., Hinton D.R. y Marten N.W. (2003). Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol* 170, 3331-3336.

Ziai W.C. y Lewin J.J., 3rd (2008). Update in the diagnosis and management of central nervous system infections. *Neurol Clin* 26, 427-468, viii.

Zwirner J., Fayyazi A. y Götze O. (1999). Expression of the anaphylatoxin c5a receptor in non-myeloid cells. *Molecular immunology* 36, 877-884.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8. APÉNDICES

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

8.1 APÉNDICE 1: SOLUCIONES, TAMPONES Y TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS

Relación de soluciones, tampones, fijadores y tratamiento de portaobjetos, en orden alfabético.

Anestésico tribromoetanol

Se utilizó en las ratas previamente al sacrificio e inyección ICV.

Composición (para 25 ml):

- Etanol 100° ..... 2 ml
- 2,2,2-tribromoetanol ..... 0,5 g
- Solución salina 0,9% ..... hasta 25 ml

Preparación: diluir completamente el tribromoetanol en el alcohol y añadir luego poco a poco la solución salina atemperada.

Conservación: a 4 °C.

Fijador de Bouin

Principal fijador utilizado en el estudio histológico de material incluido en parafina.

Composición (para 105 ml):

- Ácido pícrico en solución acuosa saturada (15 g/L) ..... 75 ml
- Formaldehido al 40% 25ml
- Ácido acético glacial ..... 5 ml

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación.

Conservación: a temperatura ambiente.

Fijador de Karnovsky

Fijador utilizado en el estudio histológico a microscopía electrónica.

Composición (para 100 ml):

- Agua destilada (a unos 60 °C) ..... 50 ml
- Paraformaldehído en polvo ..... 2 g
- Hidróxido sódico (NaOH) 10 N ..... algunas gotas
- Glutaraldehído 25% ..... 2,5 ml
- PB 0,2 M ..... 50 ml

Preparación: añadir el paraformaldehído al agua caliente, agitar, y añadir unas gotas de NaOH concentrado hasta que la solución sea transparente. Añadir a continuación el glutaraldehído, y finalmente el PB 0,2 M para obtener una solución final 0,1 M.

Conservación: a 4 °C.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fijador paraformaldehído 4% (PFA 4%)

Fijador utilizado para el estudio histológico de muestras incluidas en parafina, corte en vibratomo y fijación de muestras *in vitro*.

Composición (para 100 ml):

- Agua destilada (a unos 60 °C) ..... 50 ml
- Paraformaldehído en polvo ..... 4 g
- Hidróxido sódico (NaOH) 10 N ..... algunas gotas
- PB 0,2 M ..... 50 ml

Preparación: añadir el paraformaldehído al agua caliente, agitar, y añadir unas gotas de NaOH concentrado hasta que la solución sea transparente. Añadir a continuación el PB 0,2 M para obtener una solución final 0,1 M.

Conservación: a 4 °C. Congelar para conservar más de 2 días.

Gelatinado de portaobjetos

Los portaobjetos gelatinados se usaron preferentemente para cortes procedentes de vibratomo.

Composición (para 600 ml):

- Agua destilada (a unos 60 °C) ..... 600 ml
- Cromo (III) potasio sulfato 12-hidrato ($KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) ..... 0,6 g
- Gelatina ..... 3,0 g
- Azida sódica (NaN_3) ..... 0,06 g

Preparación: mezclar los ingredientes de la solución de gelatinado. Filtrar si fuera necesario. Sumergir las cestillas con portaobjetos previamente desengrasados (ver protocolo de poli-L-lisinado) durante 2 min. Escurrir y envolver la cestilla en papel de filtro. Dejar secar en la estufa a 75 °C un mínimo de 3 h.

Conservación: los portaobjetos secos se conservan a temperatura ambiente a salvo de la humedad y el polvo.

Geles para SDS-PAGE

Volúmenes para obtener un gel de 1,50 mm de espesor en sistema Hoeffer:

Composición (para el gel de resolución al 15%):

- Agua bidestilada ..... 2,4 ml
- Acrilamida 30% ..... 5,0 ml
- Tampón para gel de resolución ..... 2,5 ml
- Dodecilsulfato sódico (SDS) 10% ..... 100 µl
- Persulfato amónico (APS) 10% ..... 50 µl
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) ..... 5 µl

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Composición (para el gel de apilamiento al 5%):

- Agua bidestilada ..... 1,7 ml
- Acrilamida 30% ..... 0,5 ml
- Tampón para el gel de apilamiento ..... 750 µl
- Dodecilsulfato sódico (SDS) 10% ..... 30 µl
- Persulfato amónico (APS) 10% ..... 16 µl
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) ..... 3 µl

Preparación: mezclar los ingredientes de cada gel excepto el TEMED. Añadir el TEMED a la mezcla para el gel de resolución y verterlo en entre los cristales del soporte. Añadir 1 ml de isopropanol a la superficie para eliminar burbujas. Una vez solidificado, eliminar el isopropanol lavando con agua destilada, añadir el TEMED a la mezcla para el gel de apilamiento, verter en el molde, colocar el peine que definirá las calles del gel y dejar solidificar.

Conservación: es preferible usar el gel ese mismo día.

Medio de montaje para fluorescencia

Se empleó para montar los portaobjetos con muestras tratadas con inmunohistoquímica de fluorescencia.

Composición:

- Glicerol (frío) ..... 6,0 g
- Mowiol 4-88 ..... 2,4 g
- Agua destilada (a temperatura ambiente) ..... 6,0 ml
- Tris-HCl 0,2 M ..... 12 ml
- Azida sódica (NaN_3) (opcional) 0,02%

Preparación: mezclar el mowiol con el glicerol en frío durante 2 h. Añadir el agua destilada y dejar mezclar toda la noche. Posteriormente calentar a 50 °C la solución y añadir el tris. Mezclar durante al menos 15 min. Después centrifugar a 5000 × *g*, a 4 °C durante 15 min. Recoger el sobrenadante y alicuotarlo.

Conservación: a -20 °C en oscuridad.

Poli-L-lisinado de portaobjetos

Los portaobjetos poli-L-lisinados se usaron preferentemente para cortes procedentes de microtomo de parafina.

Composición (para 200 ml):

- Poli-L-lisina (stock 10×) ..... 20 ml
- Agua destilada ..... 180 ml

Preparación: colocar los portaobjetos nuevos en cestillas de plástico. Estos serán desengrasados previamente en una solución HCl 1% en etanol 70° durante 10 min. Tras ser lavados 10 min en

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

agua destilada, se sumergen 5 min en solución de poli-L-lisina. Escurrir y dejar secar en la estufa a 60 °C un mínimo de 3 h.

Conservación: los portaobjetos secos se conservan a temperatura ambiente a salvo de la humedad y el polvo.

Silanizado de portaobjetos

Los portaobjetos silanizados se usaron preferentemente para cortes procedentes de microtomo de parafina que tuviesen que sufrir tratamientos agresivos como la recuperación antigénica en microondas.

Composición (para 200 ml):

- (3-aminopropil)trietoxisilano (stock 50×) ..... 4 ml
- Acetona ..... 196 ml

Preparación: colocar los portaobjetos nuevos en cestillas. Estos serán desengrasados previamente en una solución HCl 1% en etanol 70° durante 10 min. Tras esto deben quedar bien secos de nuevo. Se sumergen 1 min en acetona pura, a continuación 3 min en solución de silano, y finalmente se enjuagan en acetona pura 15 segundos. Escurrir muy bien y dejar secar en la estufa a 60 °C un mínimo de 3 h.

Conservación: los portaobjetos secos se conservan a temperatura ambiente a salvo de la humedad y el polvo.

Solución de acetato de uranilo

Empleada en la inclusión de muestras en resina para microscopía electrónica.

Composición (para 10 ml):

- Acetato de uranilo ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) ..... 2% (0,2 g)
- Etanol 70° ..... 10 ml

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación.

Conservación: no conservar. Emplear recién preparada.

Solución de Fluoro-Jade B

Utilizada para el marcaje fluorescente de neuronas en degeneración.

Composición (para 10 ml de solución stock):

- Agua destilada ..... 10 ml
- Fluoro-Jade® B ..... 1,0 mg

Composición (para 20 ml de solución de uso):

- Solución stock ..... 1 ml
- Solución de ácido acético 0,1% ..... 19 ml

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Preparación: la solución de uso se prepara a partir de una solución stock previamente preparada desde el componente sólido.

Conservación: la solución stock puede conservarse hasta 2 meses a 4 °C. La solución de uso debe usarse el mismo día que es preparada.

Solución de inactivación de peroxidasa endógena

Se empleó para eliminar la actividad peroxidasa propia de los tejidos estudiados mediante inmunohistoquímica de revelado con diaminobenzidina.

Composición (para 100 ml):

- PB 0,1 M ..... 80 ml
- Metanol ..... 10 ml
- Peróxido de hidrógeno 30%..... 10 ml

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación.

Conservación: a 4 °C.

Solución de lavado para ELISA

Se usó para realizar los lavados de las placas de ELISA entre las distintas incubaciones.

Composición (para 500 ml):

- Cloruro sódico (NaCl)..... 0,9% (4,5 g)
- Tween® 20 ..... 0,05% (0,25 ml)
- Agua destilada ..... 500 ml

Preparación: diluir los componentes mediante agitación.

Conservación: a temperatura ambiente.

Solución de recubrimiento para ELISA

Se usó para diluir los antígenos y anticuerpos de captura en las placas de ELISA.

Composición (para 50 ml):

- Carbonato sódico (Na_2CO_3) ..... 0,1 M (0,5 g)
- Agua destilada ..... 50 ml

Preparación: diluir mediante agitación. Ajustar el pH a 9,5.

Conservación: a 4 °C.

Solución de revelado con diaminobenzidina

Empleada para detectar la presencia de actividad peroxidasa en las técnicas de marcaje histoquímico no fluorescente.

Composición (para 50 ml):

- PBS 0,1 M..... 50 ml

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Diaminobenzidina (DAB)..... 0,05% (25 mg)
- Peróxido de hidrógeno 30%..... 0,03% (50 µl)

Preparación: diluir la diaminobenzidina en el tampón, filtrar para eliminar precipitados y añadir el peróxido de hidrogeno inmediatamente antes de ser empleada. Preservar de la luz.

Conservación: la solución preparada debe usarse de forma inmediata.

Solución de tetróxido de osmio

Empleada en la inclusión de muestras en resina para microscopia electrónica.

Composición (para 10 ml):

- Tetróxido de osmio (OsO_4) ..... 2% (0,2 g)
- PB 0,1 M ..... 10 ml

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación.

Conservación: no conservar. Emplear recién preparada.

Tampón borato 50 mM

Empleado para la obtención de tiramina biotinilada.

Composición (para 100 ml):

- Tetraborato sódico 10-hidrato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) ..... 1,9 g
- Agua destilada ..... 100 ml

Preparación: para disolver mejor, llevar antes el pH hasta 8,5 y reajustarlo después.

Conservación: a temperatura ambiente.

Tampón citrato 10 mM pH 6,0

Se empleó para el tratamiento de recuperación antigénica en microondas de algunos tejidos previamente a su marcaje inmunohistoquímico.

Composición (para 500 ml de solución 10×):

- Citrato sódico ($Na_3C_3H_5O(COO)_3$) ..... 14,75 g
- Agua destilada ..... Hasta 500 ml

Preparación: disolver y ajustar a pH 6,0.

Conservación: a 4 °C.

Tampón crioprotector

Se utilizó para incluir las muestras destinadas a corte en criostato, y para conservar cortes procedentes de vibratomo a -15 °C.

Composición (para 1 L):

- PB 0,2 M pH 7,3 ..... 500 ml
- Sacarosa..... 30% (300 g)

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Etilenglicol ..... 30% (300 ml)
- Agua destilada ..... Hasta 1 L

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación y ajustar el pH a 7,3.

Conservación: a 4 °C.

Tampón de carga para SDS-PAGE

Se utilizó para cargar las proteínas en el gel de SDS-PAGE.

Composición (para 100 ml de solución 2× no reductora):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 2,8 g
- SDS ..... 8 g
- Sacarosa ..... 40 g
- Azul de bromofenol ..... 0,008 g
- Agua destilada ..... Hasta 100 ml

Preparación: disolver los componentes y ajustar el pH a 6,8 con HCl. Para obtener tampón de carga 2× reductor añadir 2-β-Mercaptoetanol al 5% (v/v) (1:20).

Conservación: a temperatura ambiente.

Tampón de extracción de proteínas

Se utilizó para la obtención de extractos de proteínas para SDS-PAGE y *Western blot*.

Composición (para 50 ml):

- Tris-HCl ..... 20 mM (0,121 g)
- Cloruro sódico (NaCl) ..... 100 mM (0,292 g)
- Tritón X-100 ..... 0,2% (100 µl)

Preparación: diluir y ajustar a pH 8,0 con HCl. Una vez obtenida la solución, se añadirá una pastilla de inhibidores de proteasas *Complete Mini* (Roche, ref. 04 693 124 001) por cada 10 ml, 5 min antes de su uso.

Conservación: no conservar, preparar justo antes de su uso.

Tampón de migración para SDS-PAGE

Se empleó para realizar la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Composición (para 1 L de solución 10×):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 30,3 g
- Glicina ..... 144,4 g
- Agua destilada ..... hasta 1 L

Preparación: diluir los componentes mediante agitación. Ajustar el pH a 7,3. El SDS 10% se añade a la solución 1× para que quede al 0,1% (5 ml en 500 ml de 1×).

Conservación: 10× a temperatura ambiente. Preparar el 1× para ser usado.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tampón de transferencia para *Western blot*

Se utilizó para realizar la transferencia de proteínas del gel a la membrana PVDF.

Composición (para 1 L):

- Tampón de migración para SDS-PAGE 10× ..... 200 ml
- Metanol ..... 200 ml
- Agua destilada ..... 600 ml

Preparación: mezclar los componentes mediante agitación. Ajustar el pH a 7,3.

Conservación: preparar directamente para ser usado.

Tampón fosfato (PB)

El PB de uso es 0,1 M. Este se prepara a partir del 0,2 M.

PB 0,2M:

- Componente mayoritario:

  Representa aproximadamente un 77% del volumen final, por lo que para hacer 500 ml, partimos de unos 385 ml de componente mayoritario.

- Componente minoritario:

  Se añade poco a poco al componente mayoritario en el agitador magnético hasta alcanzar el pH 7,3. Esa será la medida.

Componentes:

Para 500 ml de componente mayoritario:

- Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ..... 0,2 M (17,8 g)
- Agua destilada ..... 500 ml

Para 500 ml de componente minoritario:

- Fosfato monosódico monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) ..... 0,2 M (13,8 g)
- Agua destilada ..... 500 ml

Conservación: a 4 °C.

Tampón fosfato salino (PBS)

Tampón de uso estándar en histología.

Composición (para 1 L):

- Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ..... 1,9 g
- Fosfato dihidrógeno potásico (KH_2PO_4) ..... 0,43 g
- Cloruro sódico (NaCl) ..... 7,22 g
- Agua destilada ..... Hasta 1 L

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación. Se suele preparar una solución 10× que luego será diluida. El pH debe ajustarse a 7,3.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Conservación: 10× puede conservarse a temperatura ambiente tras autoclavarse. 1× se conserva a 4 °C. Para una mayor duración, puede añadirse azida sódica (NaN_3) al 0,02%.

Tampón fosfato salino con Tween® 20 (PBST)

Tampón usado en *Western blot*.

Composición (para 1 L):

- Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ..... 1,9 g
- Fosfato dihidrógeno potásico (KH_2PO_4) ..... 0,43 g
- Cloruro sódico (NaCl) ..... 7,22 g
- Tween® 20 ..... 10 ml
- Agua destilada ..... Hasta 1 L

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación. El pH debe ajustarse a 7,3.

Conservación: a 4 °C.

Tampón para complemento

Se utiliza para diluir sueros o soluciones en las que haya que conservar la funcionalidad del sistema del complemento. Provee de preservadores del complemento y de iones esenciales para su actividad citolítica.

Composición (para 1 L):

- Barbiturato sódico ..... 0,575 g
- Cloruro sódico (NaCl) ..... 8,500 g
- Cloruro magnésico ($MgCl_2$) ..... 0,168 g
- Cloruro cálcico ($CaCl_2$) ..... 0,028 g
- Barbital soluble ..... 0,185 g

Preparación: los componentes del tampón para complemento pueden adquirirse en forma de tabletas (*Complement fixation diluent*, Oxoid, ref. BR0016G) para su dilución directa en 100 ml de agua destilada a 40 °C. Se obtiene un pH de 7,2.

Conservación: una vez preparado, conservar a 4 °C.

Tampón para gel de apilamiento en SDS-PAGE

Componente del gel de apilamiento.

Composición (para 100 ml):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 6,0 g
- Agua destilada ..... 100 ml

Preparación: diluir y ajustar a pH 6,8 con HCl.

Conservación: a 4 °C.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tampón para gel de resolución en SDS-PAGE

Componente del gel de resolución.

Composición (para 100 ml):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 18,15 g
- Agua destilada ..... 100 ml

Preparación: diluir, y ajustar a pH 8,8 con HCl.

Conservación: a 4 °C.

Tampón para lectinas

Es recomendado para diluir lectinas en tratamientos histoquímicos. Consiste en un tampón tris-salino.

Composición (para 1 L):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 6,5 g
- Cloruro sódico (NaCl)..... 7,0 g
- Azida sódica (NaN_3) (opcional) ..... 0,2 g
- Agua destilada .....hasta 1 L

Preparación: mezclar los componentes mediante agitación. Ajustar el pH a 7,6.

Conservación: a 4 °C.

Tampón para neuraminidasa

Diluyente del enzima neuraminidasa para su uso *in vitro* sobre cortes histológicos.

Composición (para 50 ml):

- Acetato sódico ($NaCH_3COO$)..... 0,1 M (0,410 g)
- Cloruro cálcico (Cl_2Ca) ..... 0,004 M (0,222 g)
- Agua destilada .....50 ml

Preparación: mezclar los componentes y ajustar el pH a 5,6 con ácido acético glacial.

Conservación: a 4 °C.

Tampón PBT (PB-BSA-Tritón)

Tampón usado como saturador y diluyente de anticuerpos en inmunohistoquímica.

Composición (para 100 ml):

- PB 0,1 M pH 7,3 ..... 100 ml
- Tritón X-100 .....0,3% (0,3 ml)
- BSA (albúmina) ..... 0,3% (0,3 g)

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación y ajustar el pH a 7,3.

Conservación: sin azida sódica congelarlo a -20 °C. Con azida sódica (NaN_3) al 0,05% puede conservarse a 4 °C.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tampón RIPA

Tampón usado en inmunoprecipitación mediante bolitas de agarosa.

Composición (para 100 ml):

- Tris-HCl ..... 50 mM (0,60 g)
- Cloruro sódico (NaCl)..... 150 mM (0,87 g)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ..... 1 mM (0,03 g)
- NP-40 .....1,00% (1 ml)
- Deoxicolato sódico .....0,25% (0,25 g)

Preparación: mezclar los componentes mediante agitación. Ajustar el pH a 7,4 con HCl.

Conservación: a 4 °C.

Tampón saturador para ELISA

Se usó para saturar las placas de ELISA y diluir los anticuerpos.

Composición (para 100 ml):

- PBS 1× pH 7,3..... 100 ml
- Tween® 20 ..... 0,05 ml
- BSA (albúmina) ..... 0,25 g

Preparación: diluir mediante agitación. Ajustar el pH a 7,3.

Conservación: a 4 °C.

Tampón saturador para *Western blot*

Se usó para saturar las membranas del *Western blot* y diluir los anticuerpos.

Composición (para 100 ml):

- Tampón fosfato salino con Tween® 20 (PBST) pH 7,3 ..... 100 ml
- Leche desnatada en polvo ..... 5% (5 g)
- BSA (albúmina) ..... 2% (2 g)

Preparación: diluir mediante agitación.

Conservación: a 4 °C.

Tampón Tris 10 mM - EDTA 1mM pH 9,0

Se empleó para el tratamiento de recuperación antigénica en microondas de algunos tejidos previamente a su marcaje inmunohistoquímico.

Composición (para 500 ml de solución 10×):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 10 mM (6,0 g)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ..... 1 mM (1,85 g)
- Tween® 20 ..... 2 ml
- Agua destilada ..... Hasta 500 ml

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Preparación: disolver y ajustar a pH 9,0.

Conservación: a 4 °C. El 10× se puede conservar a temperatura ambiente.

Tampón tris-fosfato salino (tris-PBS)

Tampón de uso estándar en histología.

Composición (para 1 L):

- Tris-(hidroximetil)-aminometano ..... 5 g
- Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_42H_2O$) ..... 1,48 g
- Fosfato dihidrógeno potásico (KH_2PO_4) ..... 0,48 g
- Cloruro sódico (NaCl) ..... 7,00 g
- Agua destilada ..... Hasta 1 L

Preparación: mezclar los ingredientes en agitación. Se suele preparar una solución 10× que luego será diluida. El pH debe ajustarse a 7,8 con HCl.

Conservación: 10× puede conservarse a temperatura ambiente tras autoclavarse. 1× se conserva a 4 °C. Para una mayor duración, puede añadirse azida sódica (NaN_3) al 0,02%.

Tiramina biotinilada

La tiramina biotinilada (biotin-tiramida) usada en la técnica TSA para inmunohistoquímica fue obtenida en el laboratorio de la siguiente forma.

Composición (para 40 ml):

- Tiramina-HCl ..... 31,2 mg
- Sulfosuccinimidil-6-biotinamida hexanoato (NHS-LC-biotina) ..... 100 mg
- Tampón borato 50 mM ..... 40 ml

Preparación: se siguió el protocolo descrito por Adams (1992). Se disolvió primero el NHS-LC-biotina en el tampón borato. Luego se añadió la tiramina-HCl y se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente, se filtró la solución a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro.

Conservación: el filtrado se alicuotó y congeló a -80 °C.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.2 APÉNDICE 2: RELACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES

Relación de productos comerciales utilizados en la presente Tesis Doctoral, junto a su casa comercial y referencia. En orden alfabético.

(3-aminopropil)trietoxisilano, *Sigma*, *ref. A3648*.
2,2,2-tribromoetanol, *Fluka*, *ref. 90710*.
2-β-mercaptoetanol, *Sigma*, *ref. M3148*.
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), *Invitrogen*, *ref.D1306*.
Acetato de uranilo ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$), *EMS*, *ref. 22400*.
Acetato sódico ($NaCH_3COO$), *Sigma*, *ref. S8750*.
Acetona, *Panreac*, *ref. 211007.1214*.
Ácido acético glacial, *Panreac*, *ref. 141008.1611*.
Ácido clorhídrico (HCl), *Panreac*, *ref. 131020.1611*.
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), *Sigma*, *ref. EDS-100*.
Ácido pícrico, *Panreac*, *ref. 141048.1610*.
Ácido sulfúrico (H_2SO_4), *Panreac*, *ref. 211058.1611*.
Acrilamida 30%, *Bio-Rad*, *ref. 161-0158*.
Albúmina (BSA), *Merck*, *ref. 1.12018*.
αMEM, *Gibco*, *ref. A10490*.
Anafilotoxina C5a, *Sigma*, *ref. C5788*.
Anticuerpo de captura anti-C5b-9, *Hycult*, *ref. HM3033*.
Anticuerpo anti-eritrocitos de conejo (amboceptor), *Siemens*, *ref. ORLC25*.
Araldita, *EMS*, *ref. 10900*.
Azida sódica (NaN_3), *Panreac*, *ref. 122712.1608*.
Azul de bromofenol, *Sigma*, *ref. B5525*.
Azul de toluidina, *Panreac*, *ref. 251176*.
Azul tripano, *Sigma*, *ref. T8154*.
BCA Protein Assay kit, *Pierce*, *ref. 23225*.
Buprenorfina Buprex® 0,3 mg, *Reckitt Benckiser*.
Butanol, *Panreac*, *ref. 141082.1214*.
Carbonato sódico (Na_2CO_3), *Merck*, *ref. 6392*.
Citrato sódico ($Na_3C_3H_5O(COO)_3$), *Merck*, *ref. 6448*.
Cloruro cálcico (Cl_2Ca), *Panreac*, *ref. 211221*.
Cloruro sódico (NaCl), *Panreac*, *ref. 135659.1211*.
Complejo Avidina-Biotina con peroxidasa (kit), *Pierce*, *ref. 32020*.
Complement fixation diluent (CFD), *Oxoid*, *ref. BR0016G*.
Cromo (III) potasio sulfato 12-hidrato ($KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), *Panreac*, *ref. 131284.1210*.
D-Glucosa, *Sigma*, *ref. G7021*.
Deoxicolato sódico, *Sigma*, *ref. D6750*.
Diaminobenzidina (DAB), *Sigma*, *ref. D5637-SG*.
DMEM-F12, *Gibco*, *ref. 31330*.
Desoxirribonucleasa I (DNasa I), *Sigma*, *ref. DN25*.
Dodecilsulfato sódico (SDS), *Panreac*, *ref. 142363.1209*.
Eosina amarillenta hidroalcohólica 1%, *Panreac*, *ref. 251301.1609*.
Etanol 100°, *Panreac*, *ref. 212801.1214*.
Etanol 96°, *Panreac*, *ref. 212800.1214*.
Etilenglicol, *Panreac*, *ref. 141316.1212*.
Eukitt®, *O. Kindler*, *ref. Eukitt*.
Fluoro-Jade® B, *Millipore*, *ref. A6325*.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Formaldehido 4% tamponado, *Panreac*, *ref. 252931.1315*.
Fosfato dihidrógeno potásico (KH_2PO_4), *Panreac*, *ref. 131509.1211*.
Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), *Panreac*, *ref. 122507.1211*.
Fosfato monosódico monohidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), *Panreac*, *ref. 131965.1211*.
Gelatina, *Panreac*, *ref. 142060.1210*.
Glicerol, *Panreac*, *ref. 131339.1211*.
Glicina, *Panreac*, *ref. 131340.1211*.
Glutaraldehído 25%, *Panreac*, *ref. 163857.1611*.
Hematoxilina de Harris, *Panreac*, *ref. 253949.1611*.
HEPES, *Sigma*, *ref. H0887*.
Hidróxido sódico (NaOH), *Panreac*, *ref. 141687.1210*.
Inhibidor de C5, *Alexion Pharmaceuticals*, *ref. r18a10*.
Inhibidores de proteasas Complete Mini, *Roche*, *ref. 04693124001*.
Isopropanol, *Panreac*, *ref. 131090.1611*.
Leche en polvo desnatada, *Nestlé*.
Membranas de polifluoruro de vinilideno, *Bio-Rad*, *ref. 162-0174*.
Metanol, *Panreac*, *ref. 141091.1214*.
Mouse TrueBlot® IP-Beads set, *Rockland*, *ref. 88-7788-31*.
Mowiol 4-88, *Calbiochem*, *ref. 475904*.
Neuraminidasa bacteriana, *Roche*, *ref. 11 585 886 001*.
Neuraminidasa vírica, *Sino Biological*, *ref. 11058-VNAHC*.
NP-40, *Calbiochem*, *ref. 492015*.
Óxido de propileno, *Merck*, *ref. 8.07027*.
Parafina (histosec), *Merck*, *ref. 1.11609*.
Paraformaldehído 40%, *Panreac*, *ref. 211328.1211*.
Paraformaldehído en polvo, *Merck*, *ref. 1.04005*.
Permanganato potásico, *Merck*, *ref. 5082*.
Peróxido de hidrógeno 30%, *Merck*, *ref. 1.07210*.
Persulfato amónico (APS), *Merck*, *ref. 1201*.
Placa de hemólisis total por difusión radial en gel, *The Binding Site*, *ref. RC001.P*.
Pluronic F-127, *Sigma*, *ref. P2443*.
Patrón de pesos moleculares para *Western blot*, *Bio-Rad*, *ref. 161-0374*.
Poli-L-lisina, *Sigma*, *ref. P8920*.
Sacarosa, *Panreac*, *ref. 131621.1211*.
Seroalbumina bobina, *Pierce*, *ref. 23209*.
Sistema de revelado líquido para ELISA, *Sigma*, *ref. T0440*.
Solución enzimática TrypLE™ Express, *Gibco*, *ref. 12604-021*.
Solución salina tamponada de Hank, *Gibco*, *ref. 14175*.
Solución salina tamponada de Hank sin calcio ni magnesio, *Gibco*, *ref. 14170*.
Sulfosuccinimidil-6-biotinamida hexanoato (NHS-LC-biotina), *Pierce*, *ref. 21327*.
Sustrato ECL Clarity™, *Bio-Rad*, *ref. 170-5060*.
Tetraborato sódico 10-hidrato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), *Sigma*, *ref. 221732*.
Tetrametiletilendiamina (TEMED), *Merck*, *ref. 10732*.
Tetróxido de osmio (OsO_4), *EMS*, *ref. 19150*.
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, *Sakura finetek, ref. 4583*
Tiramina-HCl, *Sigma*, *ref. T2879*.
Tris-(hidroximetil)-aminometano, *Scharlau*, *ref. TR04241000*.
Tritón X-100, *Sigma*, *ref. 9002-93-1*.
Tween® 20, *Sigma*, *ref. P1379*.
Xileno, *Panreac*, *ref. 141769.2711*.
Zimosan, *Sigma*, *ref. Z4250*.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.3 APÉNDICE 3: DESARROLLO DEL ELISA DE CAPTURA

La siguiente tabla recoge las combinaciones de anticuerpo de captura, de unión y secundario empleadas en el desarrollo del ELISA de captura contra el complejo terminal del complemento.

Anticuerpo de captura	Anticuerpo de unión	Anticuerpo secundario
Anti-C9 humano (clon B7) desarrollado en ratón	*Anti-C5b-9 humano desarrollado en conejo*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 de rata desarrollado en conejo	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 humano desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C8 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
Anti-C5b-9 humano (clon aE11) desarrollado en ratón	*Anti-C8 humano ligado a peroxidasa*	-
	Anti-C9 humano ligado a peroxidasa	-
	Anti-C5b-9 humano ligado a peroxidasa	-
	Anti-C9 humano desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C5b-9 humano desarrollado en conejo	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 de rata desarrollado en conejo	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 humano desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C8 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Anti-C5b-9 de rata desarrollado en ratón	*Anti-C5b-9 humano desarrollado en conejo*	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C6 de rata desarrollado en conejo	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 de rata desarrollado en conejo	*Anti-IgG de conejo desarrollado en cerdo ligado a peroxidasa*
	Anti-C6 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C6 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C8 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
Anti-C9 de rata desarrollado en conejo	*Anti-C5b-9 humano desarrollado en ratón*	*Anti-IgG de ratón desarrollado en oveja ligado a peroxidasa*
	Anti-C5b-9 de rata desarrollado en ratón	*Anti-IgG de ratón desarrollado en oveja ligado a peroxidasa*
	Anti-C6 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C6 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C8 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C8 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*
	Anti-C9 de rata desarrollado en oveja	*Anti-IgG de oveja desarrollado en conejo ligado a peroxidasa*

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.4 APÉNDICE 4: RESUMEN EN INGLÉS / ABSTRACT IN ENGLISH

Introduction

The nervous and the immune systems are two of the more complex body systems. Both are formed by a diversity of cell types and a wide variety of molecules, which results in the generation of multiple physical and chemical interactions.

Traditionally, the central nervous system (CNS) has been considered unique from an immunological point of view due to its isolation and its selective permeability to cells and molecules coming from the circulatory system, which represents the main diffusion pathway for components of the immune system. The blood-brain barrier (BBB), the microglia, the cerebrospinal fluid (CSF), and the absence of a lymphoid system contribute to the particular immunological status of the CNS. References to the relationship between the immune system and the CNS are increasingly abundant in the literature, what illustrates the importance of understanding this close and highly controlled relationship.

Inflammation is a physiological response of body tissues to infectious processes, injuries and traumas. Due to the special immunological characteristics of the CNS and its relative isolation, the inflammatory response must be initiated by resident cells (neurons and glial cells) or by peripheral immune cells after infiltration into the nerve tissue. In addition to the cellular component of the response, many molecules and factors, both from resident cells and from recruited cells, are involved as well. Inflammation within the CNS, a process named neuroinflammation, consists of a complex series of reactions that are intended to neutralize invading pathogens and to repair damaged regions, thus restoring tissue homeostasis. Neuroinflammation necessarily implies the invasion of immune cells from the bloodstream. Such phenomenon occurs in parallel to microglial activation, which is a proper CNS immune response that arises without the participation of foreign cells (Graeber *et al.*, 2011). Although neuroinflammation may be responsible for secondary damage and may have negative effects during the recovery process after injury, the local immune response has evident beneficial effects on the traumatized tissue. Such effects include removal of cellular debris, secretion of neurotrophic factors and activation of proteases for the remodelling of extracellular matrix (Harry *et al.*, 2008).

The causes that trigger the development of an inflammatory processes within the CNS are diverse and can be classified into two groups: septic causes (virus, bacteria, fungi or parasites) and aseptic causes (mechanical injury, irritants or antigenic molecules). Ultimately, both types of stimuli provoke the same cellular, molecular, and vascular responses, in order to face inflammation (Rock *et al.*, 2010).

Thus the cellular immune response in the CNS is defined by two cell groups: resident cells of the CNS and infiltrating cells (blood-borne immune cells that get access into the CNS through the blood vessels). The role of resident cells in neuroinflammation is crucial, since they execute the first response against infections and injuries to the nervous tissue. Among them microglia are principal players, with a

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

function analogous to that of macrophages in other tissues. Microglia are the most important effectors of innate immunity in the nervous system and play a pivotal role in the immune response by the secretion of numerous factors. The subependymal microglial cells are particularly active. Because of its location beneath the ependymal epithelium that separates the nervous parenchyma from the ventricular CSF, they display a quick response to harmful and infectious agents present in the CSF. Furthermore, it has been proved a role in the cleanup of cell debris by phagocytosis in situations of periventricular cell damage (Carbonell *et al.*, 2005).

Astrocytes, the most numerous glial cells, also play important roles in the neuroinflammatory processes and in the innate immune response in the CNS (Wyss-Coray *et al.*, 2003). They are also actively involved in the building of the BBB (Neuwelt *et al.*, 2011) and have phagocytic capacity, although this is often linked to cleaning and maintenance rather than to the immune response itself (al-Ali *et al.*, 1996).

The involvement of neurons and oligodendrocytes in the regulation of the immune response in the CNS is less important compared to that of microglia and astrocytes.

In addition to the aforementioned, there are two major types of resident macrophages in the CNS: perivascular macrophages and intraventricular macrophages. The privileged location of these macrophages facilitates the detection of pathogens, thus helping to the quick, innate and adaptive, immune responses in the CNS (Fabriek *et al.*, 2005).

Despite the presence of cells with immune capacity in the CNS, the infiltration of peripheral immune cells is essential for the defense against acute infections and for the cleaning and repair of damaged regions after various traumas (Hauwel *et al.*, 2005; Held *et al.*, 2004; Trifilo *et al.*, 2003; Tsunoda *et al.*, 2004). Under inflammatory conditions, the BBB allows the entry of large numbers of neutrophils, macrophages and lymphocytes. However, this infiltration must be highly controlled because it can cause significant damage to the nerve tissue if excessive or inappropriate.

Besides the cellular component, the molecular component of the immune system is also present in the CNS. It includes cytokines and chemokines, complement system factors and antimicrobial peptides. Despite the presence of the BBB, the peripheral immune system can be activated by infections or injuries within the CNS, and later infiltrate the nervous tissue (Nguyen *et al.*, 2002).

The complement system consists of a complex set of molecules, mostly glycoproteins, which are interrelated forming a cascade of enzymatic activation. It is the major humoral mediator of innate immune reactions (Padilla *et al.*, 2005) responsible for protection, signalling, and immunoregulation (Sarma *et al.*, 2011). The activation of the complement can occur through three main pathways: the classical, the alternative and the lectins pathway. All of them involve the release of anaphylatoxins and culminate in the formation of the membrane attack complex (MAC) of the complement, a multimeric complex of proteins that forms a pore in the cellular membrane. It has been shown that many of the complement factors are present in the CNS, and are even synthesized therein. Neurons and glial cells

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

express complement receptors and regulators, and virtually all components of its activation cascade, both at basal levels and in response to injury or infection (Veerhuis *et al.*, 2011).

However, the inflammatory response is not always beneficial to the CNS, and has been associated with various diseases of the nervous system, notably neurodegenerative diseases (Glass *et al.*, 2010). Two decades ago a relationship between Alzheimer's disease and the innate immune response was noted (Akiyama, 1994); microglial activation and astrogliosis around senile plaques seemed to play important roles (Akiyama *et al.*, 2000). Subsequent studies have documented inflammatory components in Parkinson's disease (including microglial activation, astrogliosis and infiltrating lymphocytes; Damier *et al.*, 1993; Block *et al.*, 2007; McGeer *et al.*, 2008; Nagatsu *et al.*, 2005), amyotrophic lateral sclerosis (glial activation and increased production of potentially cytotoxic molecules; McGeer *et al.*, 2002), and multiple sclerosis (Lassmann *et al.*, 2001). Extensive epidemiological studies suggested that schizophrenia was associated with influenza infections in the mother during pregnancy and in the childhood (Westergaard *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2004). Although inflammation may not be the main initiating factor, there are increasing evidences that the inflammatory processes can contribute to the progression of these diseases (Glass *et al.*, 2010).

Furthermore, several respiratory viral infections, such as measles, mumps, rubella and chickenpox, can infect the CNS and cause neuroinflammation and neuronal loss; these effects accumulate over time (Majde, 2010). In humans it has been also described a direct association between certain viruses and neurodegenerative disorders, such as HIV with dementia (Sasseville *et al.*, 1997), polyomavirus with progressive multifocal leukoencephalopathy (Khalili *et al.*, 2006), and enterovirus with amyotrophic lateral sclerosis (Ravits, 2005). Indeed, the fact that not all neurodegenerative diseases can be associated to viruses might be due to a “hit and run" event (Atkins *et al.*, 2000), where initially viruses cause damage and glial activation, but since viruses do not persist long in the brain, they cannot be detected later in neurodegenerative disease patients.

Some of these viruses, and some bacteria, bear the enzyme neuraminidase (NA) in the surface (Ebert *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 1993). NA injected into the rat cerebral ventricles produced the death of the ependymal epithelium, inflammation and degenerative processes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Grondona *et al.*, 1998; Grondona *et al.*, 1996). However, despite much evidence of the important role of this enzyme in the neuroinflammatory process caused by certain pathogens, little is known about the phenomena that occur after its administration and the precise mechanism of action at the cellular level.

NA is an exoglycosidase that hydrolyzes terminal sialic acid in carbohydrate chains. It acts preferentially on α2-3-bonded residues, but can also target other links (bacterial NA: α2-3 > α2-8 = α2-6; viral NA: α2-3 > α2-8) (Drzeniek, 1967; Drzeniek *et al.*, 1970). Thereby, terminal sialic acid is released, and the next sugar in the oligosaccharide chain is exposed.

When NA is injected into the brain ventricle it cleaves the terminal sialic acid residues from the oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids that compose the glycocalyx of ependymal cells. It also

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

penetrates the underlying nervous parenchyma and affects the local cells as well. In most glycoproteins terminal sialic acid is linked to a galactose residue (Kornfeld *et al.*, 1985), which becomes exposed once sialic acid is removed. Thus, after NA action the ependymal surface turns covered by terminal galatose instead of sialic acid.

Ependymal cells form the lining of the brain ventricles and the central canal of the spinal cord. In most brain regions ependymal cells form a multiciliated cylindrical or cubic epithelium called ependyma. The ependyma has been assigned a wide range of functions. Besides its role as a selective permeability barrier between the nervous parenchyma and the CSF, it has trophic functions, participates in molecular transport and cellular communication, contributes to CSF circulation, and regulates neurogenesis in the subventricular zone (Del Bigio, 2010).

Mutations that disrupt the intercellular junctions in the ependyma provoke ependymal cells detachment and hydrocephalus (due to the obstruction of the cerebral aqueduct), as is the case of *hyh* mice (*hydrocephalus with hop gait*) (Bronson *et al.*, 1990; Perez-Figares *et al.*, 1998). Similarly, a single ICV-injection of NA in rats caused the detachment and death of much of the ciliated ependymal epithelium, followed by an acute inflammatory process in ventricles and meninges, and hydrocephalus by aqueduct stenosis (Grondona *et al.*, 1996). Furthermore, it was found that between two and five months after the injection, rats seemed to develop an acute central demyelinating syndrome (unpublished results).

On the other hand, in order to investigate the role of the ependyma in subventricular neurogenesis, a milder model of ependymal loss was developed by decreasing the dose of NA, which resulted in a limited ependymal damage in the injected ventricle and an intact contralateral ventricle (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). This model has also been used by others (Carbonell *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2008). Ependymal damage was found to occur immediately after injection (between the first and the second hours post-injection) and before the onset of the inflammatory response (from the fourth hour post-injection), indicating that the death of the ependymal cells was not due to inflammation, but it was probably caused directly by the NA present in the CSF.

Interestingly, many bacteria and viruses that invade the CNS and cause the death of ependymal cells have NA in their capsid or surface, and it is involved in the invasive mechanism (Müller, 1976). Therefore, the possibility exists that ependymal destruction might be a side effect of the enzymatic activity of NA, rather than the result of the viral invasion. Ependymal cell death entails the loss of a physical barrier between the nerve tissue and the ventricular system, with serious and irreversible consequences for the homeostasis of the nervous tissue and the CSF. In the absence of ependyma, potential pathogens and inflammatory cells in the CSF could have an easier access to the nervous parenchyma, what might cause the development of neurodegenerative syndromes in the long term.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Objectives and hypotheses

The ICV injection of NA described here has been used before as a tool to analyze different processes occurring in the CNS, such as the polymerization of the Reissner´s fiber after the secretion of its components to the CSF (Grondona *et al.*, 1998), or the subventricular neurogenesis in the absence of ependyma (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). However, the injection of NA in the ventricle also provokes inflammatory and degenerative events which have not been studied in depth.

The present work is intended as a first approach to the study of the harmful processes linked to the ICV injection of NA, i.e. the death and detachment of the ependymal epithelium, the ventricular and meningeal inflammation, and the vacuolar degeneration of myelinated tracts. The possible involvement of the complement system in these events is of interestas well.

Therefore, two main goals were raised in this work, the first one being descriptive and not subjected to experimental hypotheses, and the second one more analytical aimed to validate a specific experimental hypothesis.

Objective 1: to describe the damage, the inflammation and the degenerative events occurring at different times after a single ICV injection of neuraminidase.

This objective was intended to study the course of the inflammatory reaction and degenerative processes occurring as a consequence of the presence of NA in the cerebral ventricles. Understanding these processes would be of great interest, especially for the design of therapies aimed at protecting the ependymal epithelium in those infectious processes that could compromise its stability.

Objective 2: to study the role of the complement system in the damage, the inflammation and the degenerative processes caused by neuraminidase.

The second objective is based on the following experimental evidence: 1) all complement components are present in the CSF (Casarsa *et al.*, 2003; Gasque *et al.*, 2000; Stahel *et al.*, 1998); 2) the surface of the ependymal cells displays complement regulators (Canova *et al.*, 2006); 3) the ependymal cell surface is rich in sialic acid (Grondona *et al.*, 1996); 4) the removal of sialic acid from the surface of human cancer cells and erythrocytes increases notably their susceptibility to the complement attack (Donin *et al.*, 2003; Pangburn, 2000); and 5) NA alone is able to activate the human complement system (Fujita *et al.*, 1999).

Based on these experimental results, the following hypothesis was proposed: *the ependymal cell death following the injection of NA in the ventricular cavity is caused by the action of the complement system.* More specifically, ependymal death would be caused by: 1) the greater vulnerability of desialylated cells to the complement attack; and 2) the activation by NA of the complement system in the CSF. Both events enable the deposit of MAC on the cell surface.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Material and methods

We used male Wistar rats and a strain of rats deficient in the complement factor C6, the latter provided by Dr. B. Paul Morgan of the Institute of Medicine of the University of Cardiff, United Kingdom. The housing and handling of the animals was according to regulations published in Real Decreto 1201/2005 and regulations of the European Union for the use of experimental animals 86/609 / EEC.

Clostridium perfringens NA was injected ICV with a stereotaxic apparatus and a motorized injection pump. Viral NA, C5-inhibitor and anaphylatoxin C5a were similarly injected as part of different experimental designs.

The brains of the injected animals were studied by histology. The animals were fixed by vascular perfusion, their brains removed, and processed for cutting in microtome, vibratome, cryostat or ultramicrotome. The sections were stained with general histology techniques, by immunohistochemistry, or by lectin histochemistry, and accordingly studied under the light, the confocal or the electron microscopes. The inflammatory reaction was described, as well as the degenerative phenomena observed in the ependymal epithelium and in certain myelinated tracts. These processes were also quantified by two different strategies: counting of specific cell populations (immune cells infiltrated from the circulatory system), and quantification of the immunoreactive area (to estimate the activation of resident cells).

The activity of the complement system and its possible activation by the enzyme NA was analyzed by haemolytic assays, in the presence of rat serum or CSF as sources of complement factors. Also, an ELISA to detect the formation of soluble MAC (TCC) in rat serum and CSF was developed. To identify the complement pathway activated by NA, the deposition of factors identifying the different pathways on the ependyma of rats injected with NA was analyzed by Western blot.

Moreover, in order to determine to what extent the complement system is involved in the death of ependymal cells caused by NA, experiments under controlled activity of the complement were performed: *in vitro* assays with explants of ependymal epithelium and isolated ependymal cells (according to Grondona *et al.*, 2013), NA injection in rats treated with C5-inhibitor, and NA injection in C6 deficient rats.

Results

Histochemical stains using lectins demonstrated the activity of the injected NA. Thus, PNA lectin binding revealed the presence of galactose after the removal of terminal sialic acid. The sialidase action of NA occurred only in the injected ventricle but not in the contralateral one, and mainly affected the surface of the ependyma and choroid plexus, as well as the periventricular parenchyma to a depth of about 300 µm. Besides, the removal of sialic acid was observed in several periventricular cells and tracts.

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

The quantification of the immunoreactive area at various times post-injection of NA showed a significant increase in: 1) ICAM1 (adhesion molecule involved in blood cell extravasation) in blood vessels of the injected periventricular area between 4 and 24 hours; 2) IBA1 (microglial marker) in the same region between 4 hours and 7 days; and 3) GFAP (astrocyte marker) from the seventh day onwards. An interesting finding was the production of IL1β by resident macrophagic cells, including epiplexus and subependymal microglial cells, before the invasion of blood-borne immunocompetent cells (3 and 4 hours after the injection).

The counts of immunocompetent cells, mostly coming from the bloodstream, in three selected regions (choroid plexus, perivascular region close to the subfornical organ, and the meninges next to the optic chiasm) showed a large number of neutrophils (MPO-positive) from 4 hours after the injection, followed by macrophages (IL1β-positive). The arrival of T-lymphocytes (CD3ε-positive) and B-lymphocytes (PAX5-positive) occurred later, reaching a peak between 24 hours and 7 days post-injection. Double immunofluorescence showed IBA1 and IL1β colocalization in a limited fraction of cells.

The study of myelinated tracts under light microscopy showed alterations starting around 24 hours post-injection of NA. The maximum degeneration was observed at 7 days, and after 30 days tracts appeared completely repaired. The quantification of the area positive to a myelin marker agreed with these observations. Furthermore, no decrease in the number of oligodendrocytes was found in the tracts affected. On the other hand, no neuronal cell degeneration was detected by staining with Fluoro-Jade B, nor was apoptosis of glial cells noticed by caspase 3 immunostaining. The transmission electron microscopy revealed severe myelin disorganization, although no axon loss seemed to occur.

Regarding the involvement of the complement system on the degenerative processes described above, the deposition of MAC on the ependymal surface of the injected but not the contralateral ventricle was detected by immunohistochemistry as early as 2 hours after the injection of NA. Haemolytic assays allowed to detect the activation of the complement induced by NA in rat serum samples. However, the same assays failed when using rat CSF, most probably due to the insufficient detectability of the technique.

An ELISA was design to specifically detect the formation of terminal complement complex (TCC) in rat serum and CSF samples; no differences were found between NA-treated and not-treated samples. Conversely, protein fragments derived from the activation of C3 were detected by Western blot. The same technique failed to detect potential deposits of C1q (classical pathway) and MBL (lectin pathway) in ependymal wall extracts from injected rats.

Interestingly, *in vitro* studies using explants of ventricular wall or isolated ependymal cells showed that NA alone can cause damage to the ependymal cells, but when the culture media was further supplemented with complement factors a greater damage to ependymal cells occurred. Similar results were observed after NA injection in rats previously treated with a C5-inhibitor (that provokes a partial blockade of the lytic pathway of complement system), and in C6 deficient mutant rats. Thus, in

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

the absence of complement activity the NA caused ependymal damage, inflammation and degeneration of myelinated tracts.

Discussion

The present work provides a better understanding of the inflammatory and degenerative processes caused by the ICV-injection of NA in rats.Particular attention is devoted to the participation of inflammation in the damage produced to the ependymal epithelium, and to the involvement of the complement system in these phenomena.

From a neuroinflammatory point of view, the model described here could be divided into four stages:

1) From the time of injection until 3 - 4 hours. In this period the NA exerts most of its enzymatic activity by removing sialic acid from the ependymal surface and from a wide region of the nervous parenchyma around the injected ventricle. Activation of the complement system and of local immunocompetent cells occurs, as well as the death and detachment of the ependymal epithelium.

2) From 3 - 4 hours to 24 hours post-injection. An orderly influx of leukocytes from the bloodstream begins. The invading cells flood ventricles, choroid plexus, meninges, and some regions of the nervous parenchyma. The maximum pleocytosis is reached between 12 and 24 hours.

3) From 24 hours to 7 days post-injection. Leukocytes retreat and their number decrease rapidly. The first signs of vacuolation of certain myelinated tracts can be observed.

4) From 7 days post-injection. The cellular immune response has almost cleared up. The degeneration observed in myelinated tracts is noticeable. However myelin repair is almost complete 15 days after injection. The lost ependymal epithelium, conversely, is never recovered, leading to permanent scars in the ventricular surface.

The low dose of NA used in the ICV-injection, compared to higher doses employed in previous works, produced damage in the ependyma of the injected ventricle but did not affect the epithelium of the contralateral ventricle, nor did cause stenosis of the cerebral aqueduct and hydrocephalus. Ependymal damage always occurred prior to the pioneer inflammatory cells; therefore the cause of such damage should be independent of the subsequent immune response.

The morphology of the damaged ependymal cells and the appearance of condensed nuclei suggest that the ependymal death occurs by a necrotic process. In addition, immunostaining with anti-CASP3 (a marker of apoptosis) did not show any positive cell in the damaged epithelium.

Interestingly, ependymal cells of the choroid plexus did never detach nor die. Unlike the ependymal cells overlaying the ventricles, choroid plexus cells are linked by tight junctions. The occurrence of sialidase activity on molecules present in the basolateral space of the epithelium covering

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

the ventricular wall may be related to the detachment of these ependymal cells. It is possible that sialylated adhesion molecules are involved in the junctions between adjacent ependymal cells and with the subependyma. However, this effect of NA seems to be quite specific, as the isolation of ependymal cells by enzymatic methods (Grondona *et al.*, 2013) does not cause the death of such cells. Thus, the NA might be responsible not only for cell detachment but also for the onset of a necrotic process.

Local macrophages activation, specifically epiplexus cells (Kolmer, 1921) and subependymal microglia, is one of the earliest responses to NA and presumably play crucial roles in initiating the inflammatory process. Several possibilities arise: 1) a direct action of NA on the activity of resident macrophages; 2) a response to putative proinflammatory molecules produced by the ependyma; 3) a response to molecules derived from the ependymal death; or 4) a response induced by anaphylatoxins and other factors related to complement activation. In any case, the activation of microglia (and probably other resident macrophages; Engelhardt *et al.*, 2001) probably occurs through Toll-like receptors (TLR), a possibility that deserves further investigation.

Parallel to the invasion of immune cells, an increase in the expression of ICAM1 in the choroid plexus and in the nearby blood vessels was detected. The vessels mostly involved in the extravasation were the venules located in the leptomeninge, in the choroid plexus, and in the subependyma around the injected lateral ventricle and the foramen of Monro. Our results show that ICAM1 is expressed not only in endothelial cells but also, as previously described, on the surface of the choroid plexus (Steffen *et al.*, 1996; Wolburg *et al.*, 1999) and the ependyma (Lopez *et al.*, 1999).

The first and most abundant infiltrating cells in the ventricle were MPO-positive neutrophils, followed by IL1β-positive macrophages. Both cell populations reached a peak between 4 and 12 hours after NA injection, and 7 days later they were no longer present. The time course of cellular infiltration described here is quite similar to that detailed in other models of ventricular inflammation (Casarsa *et al.*, 2003).

Several reasons might justify the recruitment of inflammatory immune cells to the ventricles: 1) the proper action of NA on the endothelium and/or the perivascular spaces around the ventricles, and 2) cytokines produced by (for instance) activated microglia and/or astrocytes (al-Ali *et al.*, 1996).

In this model, lymphocytes infiltrated later than neutrophils and macrophages. This could be due, at least in part, to the antigen recognition required for the entry and retention of T cells in the CNS (Galea *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2009).

Infiltration of immune cells into the CNS is associated, in most cases, to cell damage and death. The presence of immunocompetent cells in the nervous parenchyma may cause damage to the neuronal tissue (Glass *et al.*, 2010). Given the abundance of neutrophils in the nervous tissue during neuroinflammation and the bounty of non-specific cytotoxic compounds derived from them, it is thought that the defensive action of these cells may also mediate tissue damage. This may apply also to T lymphocytes and/or B lymphocytes. B lymphocytes could invade the nervous parenchyma, favoring

Publicaciones y Divulgación Científica
UMA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

the emergence of B cells that produce antibodies against self antigens such as myelin, as has been described in several neurodegenerative diseases (Frohman *et al.*, 2006; Lassmann *et al.*, 2001).

A medium-term effect detected after the injection of NA into the lateral ventricle was the vacuolar degeneration of certain myelinated tracts. Under the electron microscope most of the voids observed within the myelin tracts presented an axon inside. Moreover, the myelin damage was not associated with a loss of oligodendrocytes. These results suggest that the observed damage might be due to an alteration in the glycoproteins comprising the myelin sheath, leading to the disorganization of its structure.

We consider that three possible causes could explain the degeneration of myelin: 1) the infiltration of inflammatory blood-borne cells into the nervous parenchyma; 2) the astrocytic activation and the factors produced by them; 3) a direct effect of the sialidase activity of NA on these tracts.

According to our initial hypothesis, the complement system is involved in the ependymal death observed after the injection of NA. The immunohistochemical detection of MAC on the surface of the ependymal epithelium speaks in favour of our hypothesis. MAC deposition may be caused by: 1) the direct activation by NA of complement factors present in the CSF, or 2) the removal of regulatory factors that normally inhibit complement activation via the "pacemaker" of C3, e.g. the surface sialic acid (Donin *et al.*, 2003), factor H (Pangburn, 2000), or factor CD59 (Meri *et al.*, 1990; Rollins *et al.*, 1990). Under normal conditions the C3 factor of the complement (required for the formation of C3 convertase complex) is constitutively activated. Factor H inhibits the formation of the complex onto own cells, serving as a mechanism of self protection. The removal of sialic acid from the ependymal surface could reduce the anchoring and efficiency of factor H, enabling the formation of the C3 convertase complex.

The possibility that NA can activate the complement system was analyzed in rat serum and CSF samples. Haemolytic assays demonstrated that the rat serum treated with NA partially loses haemolytic capacity. Furthermore, Western blot allowed the detection of C3 fragments derived from its activation in samples treated with NA. However, the formation of TCC (detected by ELISA) was not enhanced in the presence of NA, both in rat serum and CSF samples. The results obtained by haemolytic assays and Western blot suggest that NA can activate the complement cascade. However, this activation seems not to result in the formation of TCC in the *in vitro* conditions used here.

We did not detect deposits of IgG or factors C1q and MBL in the epithelium of the injected ventricle, neither by IHC nor by Western blot. These results lead us to believe that, according to Fujita (1999), the NA could improve the rat complement activation via the alternative pathway (without involving C1 of the classical pathway, nor MBL of the lectins pathway). However, in our results, this activation alone does not necessarily imply the formation of MAC, which would also require the presence of sites suitable for anchoring, such as membranes or protein-carbohydrate complexes (as is the case for zymosan). This anchoring allows the amplification of the activation signal and the formation

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

of enough MAC. In this regard, the removal of sialic acid from the ependymal surface may cause the anchoring of MAC in the injected ventricle surface.

It was then examined, both *in vitro* and *in vivo*, to what extent the complement participates in NA induced ependymal death. *In vitro*, the enzyme alone (in the absence of complement) was capable of causing serious damage to the ependymal cells, both in ventricular wall explants and in isolated cell cultures. However, the damage was greater if the proteins of the complement were added to the culture medium.

On the other hand, an inhibitor antibody against C5 factor was used to block i*n vivo* the activation of the complement system. C5 is a key factor of the lytic complement pathway, as its proteolysis initiates the activation cascade that culminates in the assembly of the MAC. The C5 inhibitor antibody impedes C5 proteolysis, therefore preventing the formation of MAC (Vakeva *et al.*, 1998). Rats treated both peripherally and centrally with the antibody and later injected ICV with NA, showed a damage to the ependymal epithelium similar to that of NA injected rats not treated with the antibody, indicating that the blockade had no apparent effect. Several facts could explain this result: 1) in spite of C5 blockade, NA was able to activate the complement at a level of the proteolytic cascade downstream from C5; 2) the death of ependymal cells is happening by other mechanism independent of the complement activity; and 3) the level of inhibition achieved is not enough to prevent some lytic activity of the complement system.

In C6-deficient rats, the other model of *in vivo* complement blockade used, the effect of an ICV-injection of NA was similar to that observed in normal rats, namely damaged regions and detachment of the ependymal epithelium in the injected but not the contralateral ventricle. Given the complete failure of C6-deficient rats to produce MAC (Leenaerts *et al.*, 1994), and that indeed we were not able to detect it by immunohistochemistry, it could be concluded that the lytic pathway of the complement system may not be the only cause of the ependymal damage induced by NA.

The fact that, after NA injection, the inflammatory reaction in C6-deficient rats evolves in a quite similar way to that of normal rats, suggests that the formation of MAC is not essential for the ependymal damage. Therefore, we believe that anaphylatoxins could be the most likely candidates of the complement system to activate the immune response.

To check if indeed the anaphylatoxin C5a was able to produce a similar inflammatory process to that observed in our NA injection model, it was injected into the lateral ventricle. C5a caused ventricular and meningeal inflammation quite similar to that observed after the injection of NA, although milder. However, damage in the ependymal lining of the ventricles or alterations in myelinated tracts were not observed. These results suggest that C5a could be one of the factors responsible for triggering the inflammatory response in the model of ICV injection of NA, but probably not the only one.

On the other hand, the possibility that the complement system is involved in the vacuolar degeneration of myelin was analyzed. Immunohistochemistry showed no deposits of MAC in myelinated

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tracts affected by vacuolar degeneration. IgG deposits were not detected either. Furthermore, in C6 deficient rats (unable to form MAC) NA-induced myelin degeneration was identical to that observed in normal rats. These results suggest that the complement system is not directly involved in the myelin degeneration observed in our model, which seems to result from a direct action of the NA on myelin.

Conclusions

The results exposed in this Thesis yield the following conclusions:

1) The ICV-injection of neuraminidase induces the activation of subependymal microglia and astrocytes, as well as perivascular and periventricular macrophages. It also increases the expression of ICAM1 in the blood vessels within the affected area.

2) Following these events, the ventricles and meninges are invaded by inflammatory cells infiltrated from the bloodstream primarily through the choroid plexus. Neutrophils infiltrate in the first place, and macrophages and lymphocytes T and B later.

3) The action of neuraminidase on myelinated tracts running close to the ventricles causes the loss of integrity of the myelin sheath, resulting in vacuolar or spongiform degeneration. This degeneration is not accompanied by a loss of oligodendrocytes in the affected tract, nor neurons in the nuclei of origin and destination. After a month, the myelinated tracts have fully regenerated.

4) The neuraminidase is capable of activating the complement system in the rat CSF. This activation seems to occur through the alternative complement pathway, and not through the classical or the lectin pathways.

5) Activation of the lytic complement pathway is not required for ependymal destruction or myelinated tracts degeneration caused by neuraminidase. Nevertheless, neuraminidase-induced complement activation contributes to the ependymal damage caused by the enzyme. Moreover, no evidences have been found of a direct involvement of the complement in the degeneration of myelinated tracts.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

9. ANEXOS

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y
Divulgación Científica

Histochem Cell Biol (2013) 139:205–220
DOI 10.1007/s00418-012-1008-2

ORIGINAL PAPER

A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents

J. M. Grondona · P. Granados-Durán · P. Fernández-Llebrez · M. D. López-Ávalos

Accepted: 25 July 2012 / Published online: 10 August 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Ependymal cells form an epithelium lining the ventricular cavities of the vertebrate brain. Numerous methods to obtain primary culture ependymal cells have been developed. Most of them use foetal or neonatal rat brain and the few that utilize adult brain hardly achieve purity. Here, we describe a simple and novel method to obtain a pure non-adherent ependymal cell culture from explants of the striatal and septal walls of the lateral ventricles. The combination of a low incubation temperature followed by a gentle enzymatic digestion allows the detachment of most of the ependymal cells from the ventricular wall in a period of 6 h. Along with ependymal cells, a low percentage (less than 6 %) of non-ependymal cells also detaches. However, they do not survive under two restrictive culture conditions: (1) a simple medium (alpha-MEM with glucose) without any supplement; and (2) a low density of 1 cell/μl. This purification method strategy does not require cell labelling with antibodies and cell sorting, which makes it a simpler and cheaper procedure than other methods previously described. After a period of 48 h, only ependymal cells survive such conditions, revealing the remarkable survival capacity of ependymal cells. Ependymal cells can be maintained in culture for up to 7–10 days, with the best survival rates obtained in Neurobasal supplemented with B27 among the tested media. After 7 days in culture, ependymal cells lose most of the cilia and therefore the mobility, while acquiring radial glial cell markers (GFAP, BLBP, GLAST). This interesting fact might indicate a reprogramming of the cell identity.

Keywords Ependymal cells · Primary cell culture · Multiciliated epithelium · Dedifferentiation · Ventricular wall · Radial glia · Rodents

Introduction

Multiciliated ependymal cells cover most of the ventricular cavities and the central canal of the spinal cord of the vertebrate nervous system. They form a simple cuboidal epithelium that separates the cerebrospinal fluid (CSF) and the nervous parenchyma. Several functions have been ascribed to these cells, the most evident due to the beating of cilia that creates a current flow of CSF within the lateral ventricles (Worthington and Cathcart 1963; Cathcart and Worthington 1964). Animal models devoid of ciliary movement develop alterations of the CSF flow and hydrocephaly (Kobayashi et al. 2002; Monkkonen et al. 2007; Ibanez-Tallon et al. 2004). Additional functions have been proposed for this epithelium: (1) brain protection, since it could regulate the transport of molecules between the CSF and the nervous tissue preventing the entry of harmful substances (Kuchler et al. 1994); (2) stability of the ventricular system, since ependymal destruction results in the obliteration of the cerebral aqueduct and hydrocephaly (Grondona et al. 1996); (3) specialized ependymal cells, such as tanycytes and ependymal cells belonging to

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00418-012-1008-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. M. Grondona (✉) · P. Granados-Durán · P. Fernández-Llebrez · M. D. López-Ávalos (✉)
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain
e-mail: grondona@uma.es

M. D. López-Ávalos
e-mail: lopezavalos@uma.es

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

circumventricular organs, may have neuroendocrine (Oksche 1973) or sensitive functions (Garcia et al. 2003).

Ependymal cells are considered to form part of the adult neurogenic niche in the subventricular zone (SVZ) (Doetsch et al. 1997) where they are in intimate contact with the stem cells and their progeny. For the last decade, the presumed role of the ependymal cells as neural stem cells (NSC) has been a matter of debate (reviewed in Chojnacki et al. 2009). However, recent findings demonstrate that ependymal cells do not proliferate in normal conditions, and so they do not fulfil the defining criteria of stem cells (Carlen et al. 2009). Nonetheless, ependymal cells may control different aspects of adult neurogenesis such as: (1) the cell fate specification of progenitor cells, influenced by Noggin secreted from ependyma (Lim et al. 2000); and (2) the neuroblasts rostral migration, which partially relies on Slit2 gradients maintained by the ciliary beating (Sawamoto et al. 2006). Furthermore, partial ependymal destruction by intracerebroventricular injection of neuraminidase results in an increased production of neuroblasts in SVZ areas devoid of ependyma, which suggests that ependymal cells control the proliferation of the nearby neural progenitors (Gomez-Roldan et al. 2008). It has been recently shown that the expression of the adapter molecule Ankyrin-3 by ependymal cells is required for the maintenance of the SVZ niche structure and the production of new neurons (Paez-Gonzalez et al. 2011).

Radial glial cells are considered the neural stem cells present in the nervous system during the foetal and early postnatal periods (Miyata et al. 2001; Noctor et al. 2001; Malatesta et al. 2000). Within 1 or 2 weeks after birth, most mammalians' radial glial cells give rise to both adult NSC in the SVZ (B cells or subventricular astrocytes) (Merkle et al. 2004) and ependymal cells (Spassky et al. 2005). On the other hand, in the adult brain under physiological conditions, the ependymal cells are regarded as postmitotic (Spassky et al. 2005; Carlen et al. 2009). Interestingly, they maintain some phenotypic characteristics of NSC, that is, NSC markers such as integrin-beta1 (Hall et al. 2006), CD133 (Uchida et al. 2000), and Sox2 (Zappone et al. 2000) are expressed by the ependymal cells (Pfenninger et al. 2007; Coskun et al. 2008; Ellis et al. 2004; Kazanis et al. 2010). Although ependymal cells in the adult are quiescent, several evidences suggest that they may behave as NSC under specific circumstances. First, forebrain ependymal cells acquire radial glial cell features under certain conditions such as nervous tissue injury (Namiki and Tator 1999), stroke (Carlen et al. 2009; Zhang et al. 2007), carcinogenic transformation (Taylor et al. 2005), Notch1 cell signalling blockade (Carlen et al. 2009), and exposure to growth factors (Gregg and Weiss 2003). Second, a hallmark of all stem cells is the asymmetric cell division, a feature that has also been observed in ependymal cells after brain injury (Gleason et al. 2008). Third, it has been demonstrated that ependymal cells can proliferate under certain conditions such as injury of the nervous system (Gleason et al. 2008; Meletis et al. 2008; Cizkova et al. 2009; Moreno-Manzano et al. 2009) and stroke (Carlen et al. 2009; Li et al. 2002; Zhang et al. 2005, 2007), rendering a progeny consisting of neurons (Carlen et al. 2009) or astrocytes and oligodendrocytes (Meletis et al. 2008).

The first report of cultured ependymal cells dates from 1947, and employed human foetal tissue (Hogue 1947). Since then, several research groups have developed a variety of methods to obtain ependymal cell cultures from foetal or newborn rodents (Araki et al. 1983; Thomas 1985; Gabrion et al. 1988; Laabich et al. 1989; Hild 1957; Hamprecht and Loffler 1985; Prothmann et al. 2001; Weibel et al. 1986). Most of them were based in the same strategy: dissociated nervous tissue was plated in Petri dishes pre-treated with fibronectin or collagen and cultured in serum-free media with various supplements (bovine serum albumin, insulin, and transferrin; and in some cases thrombin). After 2 weeks of culture a cellular monolayer was formed and differentiated ependymal cells grouped in clusters could be identified by the cilia (for a review of such methods see Gabrion et al. 1998). Also, a method to obtain a primary culture of spinal cord ependymal cells from axolotl was developed by Chernoff et al. (1990). All these methods of culturing ependymal cells have led to the publication of more than 50 articles dealing with ultrastructure (Araki et al. 1983; Rieke et al. 1987), cell biology (Kowtharapu et al. 2009; Tritschler et al. 2007), electrophysiology (Hild et al. 1965), metabolism (Prothmann et al. 2001; Verleysdonk et al. 2004a, b, 2005; Murin et al. 2009), ciliogenesis (Hirota et al. 2010; Guirao et al. 2010; Monkkonen et al. 2008), ciliary beating physiology (Fadaee-Shohada et al. 2010; Monkkonen et al. 2007) and differentiation capacity (Chernoff et al. 1998; Laabich et al. 1991) of ependymal cells. One disadvantage of all these cultures is the use of foetal or neonatal nervous tissue making necessary a 2–3 week period for the ependymal cells to differentiate. The presence in the cultures of other cell types is also a drawback, since these cultures contain 10 % of non-ependymal contaminating cells: fibroblast, astrocytes, oligodendrocytes and microglia (Gabrion et al. 1998). On the contrary, only one reference reports the purification of ependymal cells from adult rats, and in such case the culture obtained was composed by a mix of ependymal (76 %) and non-ependymal cells (24 %) (Manthorpe et al. 1977).

As previously stated, under certain circumstances the ependymal cells can change their identity, giving rise to other cell types of the nervous system. This feature makes ependymal cells a possible candidate for cell replacement

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

or nervous tissue repair, and emphasizes the importance of having a pure primary culture of ependymal cells from adult animals to study the factors that could trigger those changes. The first attempt to obtain a pure culture of ependymal cells from adult rodents was performed by Janson et al. (1999) who used a strategy based on the labelling of ependymal cells with a specific antibody (anti-Notch1) followed by magnetic cell sorting. Recently, a similar method for cell labelling with magnetic or fluorescent antibodies (CD133 and CD24) and the subsequent cell sorting has been used to get pure ependymal cell cultures (Coskun et al. 2008; Pfenninger et al. 2007, 2011). In the present article, we describe a new and simple method to obtain pure cultures of non-adherent ependymal cells from adult rodents. This method takes advantage of the ability of ependymal cells to survive in culture throughout 48 h in non-supplemented media and at low density. Such conditions allow for an acceptable yield of pure ependymal cells without the difficulty of cell labelling and sorting. The availability of an easy to obtain pure culture of adult multiciliated ependymal cells will allow the study of a variety of aspects of the physiology of ependymal cells, or even of multiciliated cells in general.

Materials and methods

Animals

Adult male CD1 mice (1–2 months old) and adult male Wistar rats (2–3 months old), both from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA), were used to obtain ventricular wall explants and ependymal cells. The animals were housed under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water, and handled in conformity with the current national legislation (Decree 223/1988, BOE no. 67), and guidelines from the Council of the European Communities (86/609/CEE).

Explants from the walls of the lateral ventricle of adult rat brain

Rats were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (300 mg/kg i.p.) before decapitation and mice were killed by cervical dislocation. The heads were immersed in 70 % ethanol before the extraction of the brains. The dissection of the ventricular wall to obtain explants was performed under sterile conditions in cold Hank's balanced salt solution (HBSS) without calcium and magnesium (Invitrogen, ref. 14170-088) using a dissecting microscope (MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Briefly, the brains were transversally cut using the optic chiasm as a reference point (Fig. 1a) leaving the caudal-most portion of the lateral ventricles in the rostral fragment (Fig. 1b). By using iris scissors (Moria, Dowell model) two cuts were performed perpendicular to the former plane of section: the first one through the telencephalon, following the dorsal portion of the lateral ventricle (see dorsal dotted line in Fig. 1b); and the second one following the ventral portion of the caudal region of the lateral ventricle (see ventral dotted line in Fig. 1b). To avoid the contact of the iris scissors with the ventricular surfaces, the ventricular cavity needs to be widened with forceps. In this way two fragments are obtained: one contains the striatal wall of the lateral ventricle (Fig. 1c), and the other the septal wall (Fig. 1e). From the striatal wall, explants were obtained by cutting along the dotted line in Fig. 1c, and later dissecting a sheet of tissue of no more than 0.5 mm thick with the iris scissor (Fig. 1d). These striatal wall explants enclosed the ependymal and subependymal layers as well as a small portion of the nervous parenchyma. The septal wall explants were dissected in a similar way, although in this case the subependymal layer was much reduced or completely absent. During this dissection procedure it is extremely important not to touch the surface of the ependymal cells, especially with metal tools. For this reason the obtained explants were handled with disposable plastic Pasteur pipettes.

Enzymatic treatment of explants and separation of ependymal cells

Immediately after dissection, the explants were incubated in different solutions to facilitate the separation of the ependymal cells from the ventricular wall. First, they were washed in cold HBSS with no calcium and no magnesium for over 30 min, and then incubated in TrypLE^{TM} Express (Invitrogen, ref. 12605-010) following a specific sequence of temperatures: 4 °C (5 min), 37 °C (20 min), and 4 °C (5 min) (Fig. 2a). The TrypLE^{TM} Express is a trademarked enzymatic mixture (exact composition is confidential) that contains EDTA and a single recombinant enzyme that, like trypsin, cleaves peptide bonds on the C-terminal side of lysine and arginine. The explants were then washed 10 min in alpha-MEM (Invitrogen, ref. A10490-01) with the following additives: 0.2 % Pluronic F-127 (Sigma, ref. P-2443), 0.3 % glucose (Sigma, ref. D-7021), 0.01 M HEPES (Invitrogen, ref. 15630056). Finally, they were incubated at 37 °C and 5 % CO_2 in a separation medium consisting of alpha-MEM with 0.2 % Pluronic F-127, 0.3 % glucose, 0.01 M HEPES and 0.01 % DNase type I (Sigma, ref. DN-25). Pluronic F-127 is a non-ionic detergent that prevents cell adhesion to plastics. Explants were incubated in 6-well plates (TPP, ref. 92006) placing one explant in 3 ml of medium per well. Ependymal cells take between 6 and 24 h to detach from the explant, although

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

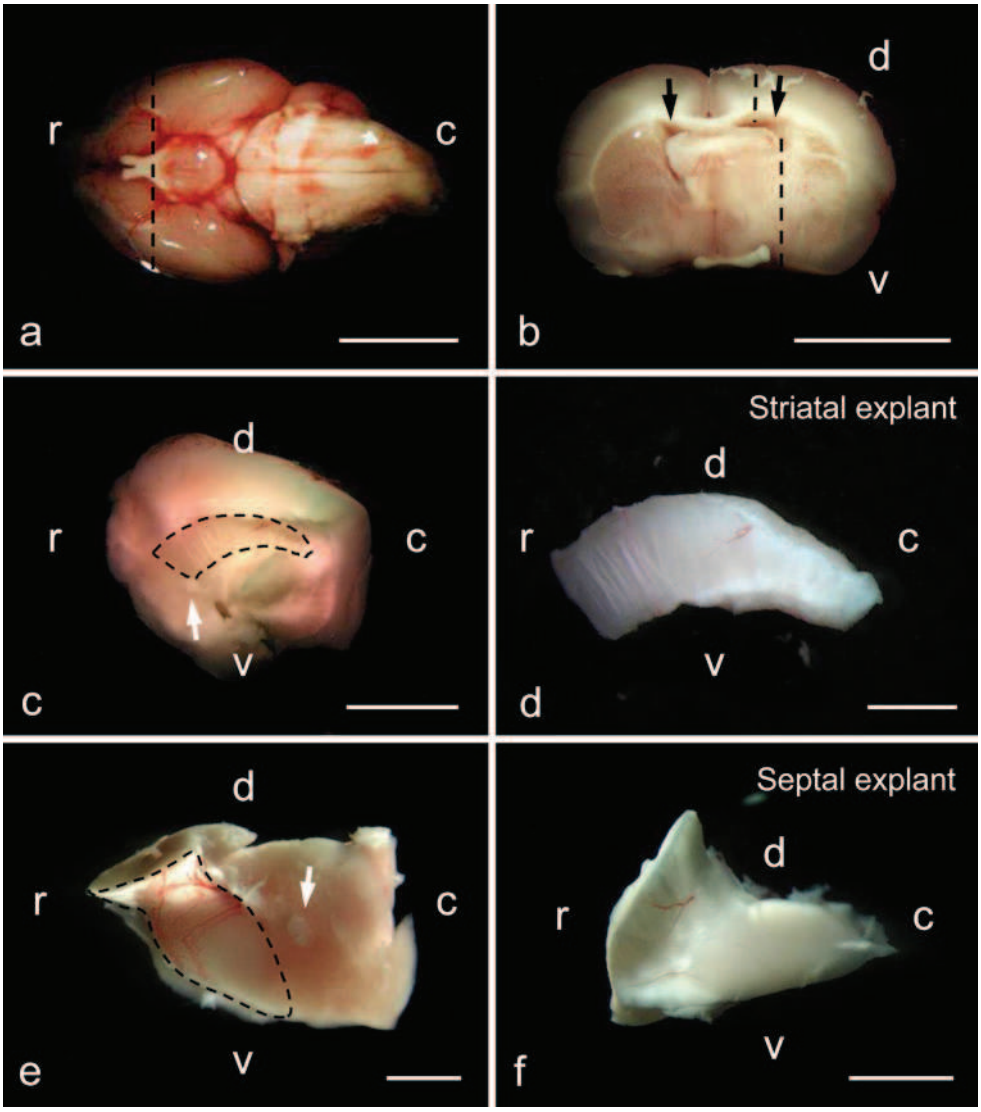


Fig. 1 Dissection procedure to obtain striatal and septal explants from the lateral ventricles of the rat brain. **a** Ventral view of the rat brain. The *dotted line* indicates the plane of section passing through the optic chiasm. **b** Caudal view of the rostral fragment obtained after transversal sectioning of the rat brain as indicated in **a**. The most caudal portions of the lateral ventricles (*arrows*) are exposed. Iris scissors are introduced into the lateral ventricles to cut through the dorsal telencephalon (*dorsal broken line*). A second cut is performed following the ventral portion of the caudal region of the lateral ventricle (*ventral broken line*). The contact of the scissors with the ventricular surface should be strictly avoided. **c** Fragment containing the striatal wall of the lateral ventricles (*area enclosed by dotted line*) that will be used by obtain striatal explants. The *arrow* points to the anterior commissure. **d** Striatal explant obtained from the fragment shown in **c**. The piece of tissue shown in **c** is first cut along the *dotted line*; a thin sheet of tissue is later obtained by cutting the underlying parenchyma. **e** Septal fragment obtained after the cuts described in **b**. This fragment contains the septal wall of the lateral ventricles (*area enclosed by dotted line*). Most of the blood vessels in the enclosed area belong to the choroid plexus that must be removed (see next image). The *arrow* points to the anterior commissure. **f** Septal explant obtained from the *area enclosed by the dotted line* in **e**. It contains both the caudal septal wall as well as a portion of the wall of the hippocampal fimbria. *r* rostral, *c* caudal, *d* dorsal, *v* ventral. *Scale bars* 10 mm (**a**, **b**), 5 mm (**c**), 2 mm (**d**–**f**)

after 6 h of incubation approximately 50 % of them are freefloating and moving in the medium. Albeit numerous cells still detach from 6 h onward, only cells separated during the first 6 h were used in this study. In some cases, a trypsin–EDTA solution (0.25 % trypsin, 0.02 % EDTA, Sigma, ref. T-4049) was used instead of TrypLE™ Express; however, the yield of cells was lower than that obtained with the TrypLE™ Express. Besides alpha-MEM, other culture media were tested as separation medium: DMEM-F12 (Invitrogen, ref. 31330) and MEM (Invitrogen, ref. 21575), both with the same additives as mentioned above for alpha-MEM. These two media resulted in lower yields of cells compared to alpha-MEM (not shown). No antibiotics were added to the media.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Purification of ependymal cells

Although most of the cells that detached from the explants were ependymal cells other cells types were also present in the culture. The following strategy allowed for the removal of those cells. After 6 h of incubation of the explant in the separation medium, the medium was collected, centrifuged at 300*g* for 10 min, and the cells in the pellet (pellet 1) were resuspended in 3 ml of the separation medium without DNase I. The cells were kept in this new medium for 18 h. At this point, the cells obtained from different explants were pooled, centrifuged (300*g* for 10 min), and the cells in the pellet (pellet 2) counted in a Neubauer chamber and resuspended in a medium with no growth factors, cytokines or serum (alpha-MEM medium plus 0.2 % Pluronic F-127, 0.3 % glucose, and 0.01 M HEPES) to a density of 1 cell/µl. The combination of a low cell density and the absence of growth factors represent a very restrictive framework for cell survival, which only permits ependymal cells to survive while other cell types die. After a 48-h period of incubation in this restrictive media, the ependymal cells can be harvested and used for any purpose.

Long-term survival of ependymal cell

In order to study ependymal cell survival, the pellet 2 (obtained 24 h after the enzymatic treatment, see above) was distributed in four 100 mm cell culture dishes (SPL, ref. 20101) containing 12 ml of different media: alpha-MEM, DMEM-F12, MEM and Neurobasal-A (Invitrogen, ref. 10888) with B27 (Invitrogen, ref. 17504). All media were supplemented with 0.2 % Pluronic F-127, 0.3 % glucose, and 0.01 M HEPES. With the exception of Neurobasal-A, which was supplemented with B27, the media were not supplemented with any growth factor, cytokine or serum. Approximately 12×10^3 cells were placed in each plate to reach a cell density of 1 cell/µl. Samples of cells in 0.5 ml were collected at different times (1, 2, 3, 7 and 10 days) counted from the moment of the enzymatic treatment (see open arrows in Fig. 2a). The cells were fixed in 2 % formaldehyde (30 min at 4 °C), centrifuged (300*g* for 10 min), and the pellet (50 µl) was placed in a 96-well plates for cell counting (TPP, ref. 92696). Under the microscope, the cells were counted in nine different areas of the well, each area consisting of 2.6 mm^2. The total number of cells in all the nine areas counted (cells in 23.4 mm^2) was used to calculate the cell number in the well (cells in 33.5 mm^2 = cells in 50 µl). This method was found to be more accurate than the Neubauer chamber for a reduced number of cells.

Immunocytochemistry

Explants from ventricular walls were dissected as previously described, and fixed during 24 h in Dent's fixative (4:1 methanol-dimethyl sulfoxide solution) at −20 °C or in 4 % formaldehyde at 4 °C. After fixation, explants were dehydrated, embedded in paraffin wax, and 10-µm-thick sections were obtained with a microtome (RM2125, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Isolated ependymal cells were fixed in 2 % formaldehyde at 4 °C for 30 min, centrifuged and the cell pellet washed with PBS. The cells were spun down again, and the pellet was placed onto poly-L-lysine coated slides and air-dried overnight prior to staining.

The primary antibodies used in this study were: (1) a mouse monoclonal antibody against β-IV tubulin (1:1,000, Sigma T7941); (2) a mouse monoclonal antibody against β-III tubulin (1:5,000, Clone 5G8, Promega); (3) a rabbit polyclonal antibody against GFAP (1:1,000, Sigma G9269); (4) a mouse monoclonal antibody against vimentin (1:1,000, Sigma V6630); (5) a rabbit polyclonal antiserum against BLBP (1:1,000, Abcam ab27171); (6) a rabbit polyclonal antibody against gamma tubulin (1:1,000, Sigma T5192); (7) a rabbit polyclonal antiserum against GLAST (EAAT1, 1:1,000, Abcam ab416); (8) a mouse monoclonal antibody against acetylated tubulin (1:1,000, SigmaT6793).

Double immunofluorescence was performed as described previously (Hoyo-Becerra et al. 2006). Briefly, the histological sections or the smear of isolated ependymal cells were hydrated, rinsed with PBS with 0.05 % Tween-20 (Sigma), and incubated in the primary antibody for 18 h at room temperature. A mixture of Alexa-labelled secondary antibodies (anti-mouse IgG Alexa 568 and anti-rabbit IgG Alexa 488, both raised in donkey and diluted 1:1,000; Invitrogen) was applied for 30 min to reveal mouse and rabbit primary antibodies, respectively. After extensive washings, the sections were then mounted with a solution containing Mowiol (Calbiochem) as an antifading agent, and examined with a Nikon fluorescence microscope (Eclipse E800). Digitized images were captured with the ACT-1 software, and processed with an image editing software (Adobe Photoshop 5.0). Some double-stained tissue sections or cells were analysed by confocal laser scanning microscopy (Leica, SP5 II).

Some sections/cells were immunostained according to the avidin–biotin complex method (Hsu et al. 1981). Prior to the incubation with the primary antibodies, a step for the inactivation of endogenous peroxidase was required (15 min incubation in 10 % methanol, 3 % hydrogen peroxide, in 0.1 M PBS). The biotinylated secondary antibodies, anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG both raised in goat, were purchased from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA). The ABC peroxidase staining kit (Thermo Scientific, ref. 32020) was employed following the manufacturer's instructions. The peroxidase activity was developed as described elsewhere (Hoyo-Becerra et al. 2005).

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

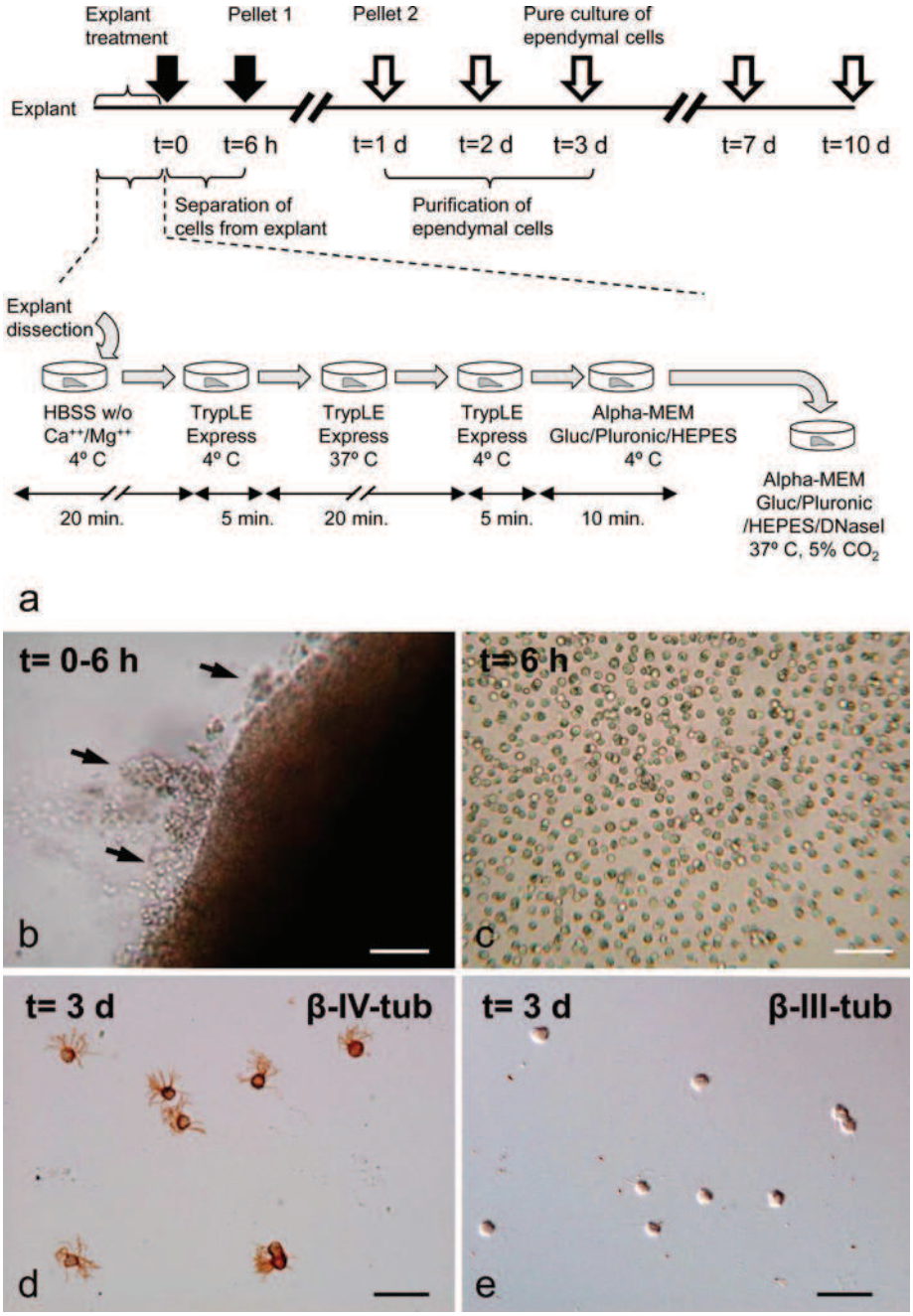


Fig. 2 **a** Timing of the experimental protocol for the separation and purification of ependymal cells from explants of lateral ventricle walls. The *black arrows* indicate the period over which ependymal cells detach from explants, after which the free and moving cells are harvested by centrifugation (pellet 1) Cells from pellet 1 are placed in fresh medium up to day 1 ($t = 1$ day), when they are again centrifuged (pellet 2). Pellet 2 contains a 6 % of non-ependymal cells. For the subsequent purification step pellet 2 is resuspended at a very low cell density in fresh medium without any supplement. Purification of ependymal cells take place between days 1 ($t = 1$ day) and 3 ($t = 3$ days). After this time, all non-ependymal cells have died, only remaining ependymal cells. *Open arrows* indicate the times of sampling for ependymal cell count and immunostaining. **b** Detail of the explant after the enzymatic treatment (between 0 and 6 h). Cell clumps (*arrows*) on top of the ependymal surface of the explant give rise later to free small clusters or individual ependymal cells (see online resource 1 and 2). The active motion of such cells or clusters indicates that they are ependymal cells. **c** After 6 hours of enzymatic treatment, numerous ependymal cells in motion are present at the bottom of the plate (see online resource 3). **d** and **e** After 48 h under purification conditions (low cell density and non-supplemented medium) only ependymocytes survive and a pure culture of ependymal cells is achieved. More than 1,500 cells were analysed by using immunocytochemical cell markers for ciliated cells (beta-IV tubulin) and neuroblast (beta-III tubulin). All cells were labelled with beta-IV tubulin, while none of them was labelled with beta-III tubulin (taken with Nomarski differential interference contrast). *Scale bars* 100 μm (**b**, **c**), 40 μm (**d**, **e**)

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

All the primary and secondary antibodies were diluted in PBS pH 7.2 containing 3 % BSA and 0.3 % Triton X-100 (Sigma), and all the incubations were performed in a moist chamber at room temperature. Negative controls for immunostaining consisted of incubation of sections/cells with non-immune rabbit serum or diluent buffer, instead of the primary antibody.

Results

Ependymal cells detach from the ventricular wall explants by themselves

In the process of isolation of ependymal cells from the adult brain, we have noticed that a determining factor is the correct dissection of the explants, which must be done with the least manipulation possible and avoiding that the dissection tools touch the ventricular surface. Ependymal cells need to be in motion to quickly detach and therefore its ciliary apparatus must be functional. In fact, the motion and the viability of ependymal cells decreased dramatically when the ventricular surface was touched with metal dissection tools. For this reason, explants were always handled with disposable plastic Pasteur pipettes. Despite the care taken during the dissection, it is a manual process susceptible of variation, hence the explants obtained are not at all identical, which could explain the variability observed in the yield of ependymal cells from different explants subjected to the same subsequent isolation process.

A sequence of low temperatures and a gentle proteolytic digestion allowed the optimal separation of ependymal cells from the ventricular surface of the explants. In the process, only 6 % of non-ependymal cells also detached (Fig. 2c; video in online resource 3). Few hours after the enzymatic treatment, partially detached cell clumps which presented an active movement could be observed (Fig. 2b; video in online resource 1 and 2). Under the microscope, it was possible to follow the detachment of ependymal cells in motion, a process most probably aided by the cilia movement. After 6 h of the enzymatic treatment, approximately 15×10^3 ependymal cells per explant can be obtained. Along with the ependymal cells, about 6 % of non-ependymal cells is present in the culture, although they die in the subsequent purification step. Between 6 and 24 h, the detachment of cells from the explants continues, so the yield of cells per explant could be even higher. However, for unknown reasons, when the ependymal cells remain with the explant in the separation medium overnight, they build up lipid droplets. For this reason, we decided to discard these cells for further procedures, although the usefulness of these cells cannot be ruled out.

Isolated ependymal cells survive in a non-supplemented simple media without any supplementation allowing its purification

Most nervous cell types need specific supplementation of the media for survival and culture. Interestingly, we observed that isolated ependymal cells were able to survive in a simple culture media without any supplementation and at low cell density (1 cell/µl) for a short period of time. We consider this a quite significant feature of ependymal cells not described so far, that will enable the purification strategy described below. Since non-ependymal cells represent about 6 % of those detached from the explant, a purification step was necessary to obtain a pure culture. We took advantage of the surviving capacity of the ependymal cells to purify them. Thus, after 48 h of culture under these restrictive conditions (non-supplemented medium and low cell density), all non-ependymal cells died resulting in a pure ependymal cell culture. A fraction of ependymal cells died as well (between 50 and 90 % depending on the media used; see next section). Smears of cell samples taken after this purification step were labelled with ependymal cell markers. All cells out of 1,500 cells counted, were positive for two ciliated cell markers: beta-IV tubulin and acetylated tubulin. The beta-IV tubulin and beta-I tubulin isotypes are present in all ciliated cells (Jensen-Smith et al. 2003); and acetylated tubulin is a marker of cilia (Piperno and Fuller 1985; McClintock et al. 2008). Thus, the positive reaction to these antibodies was considered an unequivocal sign of ependymal cell identity. On the other hand, the active motion of the isolated ependymal cells prevented its adhesion to the plate, resulting in a culture of cells in suspension. Only in further culture stages some ependymal cells may attach to the plate, a sign of differentiation which only happened under certain circumstances.

Survival of ependymal cells cultured in different media

We aimed to find the best medium for in vitro culture and maintenance of purified ependymal cells. For this purpose, after the purification step the isolated ependymal cells were placed in four different media: alpha-MEM, DMEM-F12, MEM and Neurobasal-A supplemented with B27, all of them supplemented as well with 0.3 % glucose, 0.2 % Pluronic F-127, and 0.01 M HEPES. In these media, cells were kept at a density of 1 cell/µl, and no growth factors were added. To evaluate cell survival, samples were taken at different time points for cell counting. Three independent isolations were performed. Data shown in Fig. 3 represent the mean counts of the three experiments, considering 100 % the amount of cells plated at day 1 in each media.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

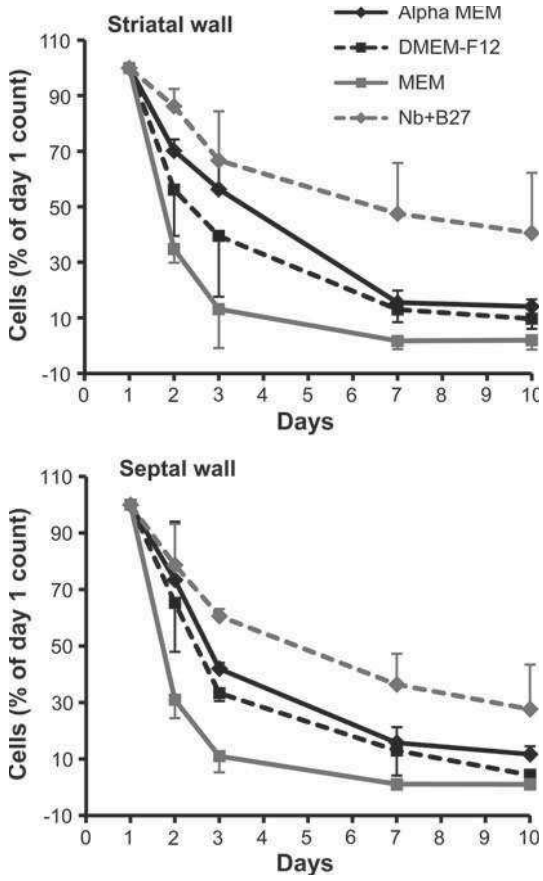


Fig. 3 Survival of isolated ependymal cells in different culture media. Cells obtained from striatal or septal wall explants were cultured in different media from day 1 until day 10. The cells counted at each time point were expressed as the percentage of the initial cell counts. The *graphs* show the mean ± standard deviation of three independent experiments

In all the different media used there was an important reduction of the cell number over time, due to the very restrictive culture conditions (similar to those employed in the purification step). Two days after the beginning of the culture, only about a 10 % of the ependymal cells survived in MEM, while this percentage was higher in alpha-MEM (40–55 %) and DMEM-F12 (30–40 %). The best survival rate was obtained with Neurobasal-A + B27 (60–70 %). It is important to note that B27 was omitted from the media during the purification step, as this supplement is designed to specifically promote survival of neurons in culture (Brewer et al. 1993). The survival of the ependymal cells was similar irrespective of the septal or striatal origin of the explants (Fig. 3). On day 7 of culture a 35–50 % of the cells survived in Neurobasal-A + B27, but in alpha-MEM and DMEM-F12 the survival dropped to only 10–15 %. Thus, Neurobasal-A + B27 seems to be the best medium for ependymal cell maintenance in culture for longer periods of time.

Cultured ependymal cells acquire radial glia markers

The identity and differentiation state of the isolated ependymal cells maintained in culture for several days was studied by labelling with immunohistochemical markers. Labelling was performed on ependymal cells in situ, i.e. in sections of the ventricular wall, as well as on ependymal cells smears 6 h after isolation and after 7 days of culture in alpha-MEM. The markers used included some radial glia specific, such as GFAP, BLBP and GLAST, along with other classical ependymal cell markers, like vimentin. Ciliated cell markers (beta-IV tubulin and acetylated tubulin) were also employed.

When located in the ventricular walls, ependymal cells displayed a very weak immunoreactivity to the astrocyte marker GFAP, as well as to BLBP and GLAST (Fig. 4a, d, g, green). However, labelling with vimentin and several ciliated cell markers was quite prominent (Fig. 4a, d, g, red). Isolated ependymal cells 6 h after the enzymatic treatment, presented a similar display of markers as when they were located in the ventricular wall (Fig. 4b, e, h, green); only GLAST label was slightly increased (Fig. 4, compare inset h2 with e2 and b2). The vimentin label was found in the cell body but was absent from the cilia, while beta-IV tubulin and acetylated tubulin labels were mainly located in the cilia (Fig. 4b, e, h, red).

After 7 days in culture, the amount of cilia in the ependymal cells was reduced, albeit some cells preserved a tuft of cilia similar to those shown by 6 h cultured cells. This fact correlates with the occurrence in the cultures of a small amount of cells in motion. The ciliary markers beta-IV tubulin and acetylated tubulin highlighted the few cilia present in these cells (Fig. 4, inset i1, f, i, arrows). Concerning radial glial cell markers, 7-day cultured ependymal cells were strongly labelled with antibodies against GFAP, BLBP and GLAST (Fig. 4c, f, i, green). The classical ependymal cell marker vimentin was also present in these cells (Fig. 4, inset c1). These results suggest that after 7 days in culture ependymal cells acquire novel radial glial cell markers not previously expressed, along with a prominent loss in the number of cilia.

Discussion

In the present report we describe a simple, rapid and non-expensive method to obtain a pure non-adherent culture of ependymal cells from adult rodents. Most previous methods were based on the differentiation of ependymal precursors in vitro which takes 2–3 weeks. Recently, another method based on immunolabeling and cell sorting has been developed. In the method described here, a pure culture of differentiated ependymal cells is obtained in 3 days without the use of expensive or laborious techniques.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

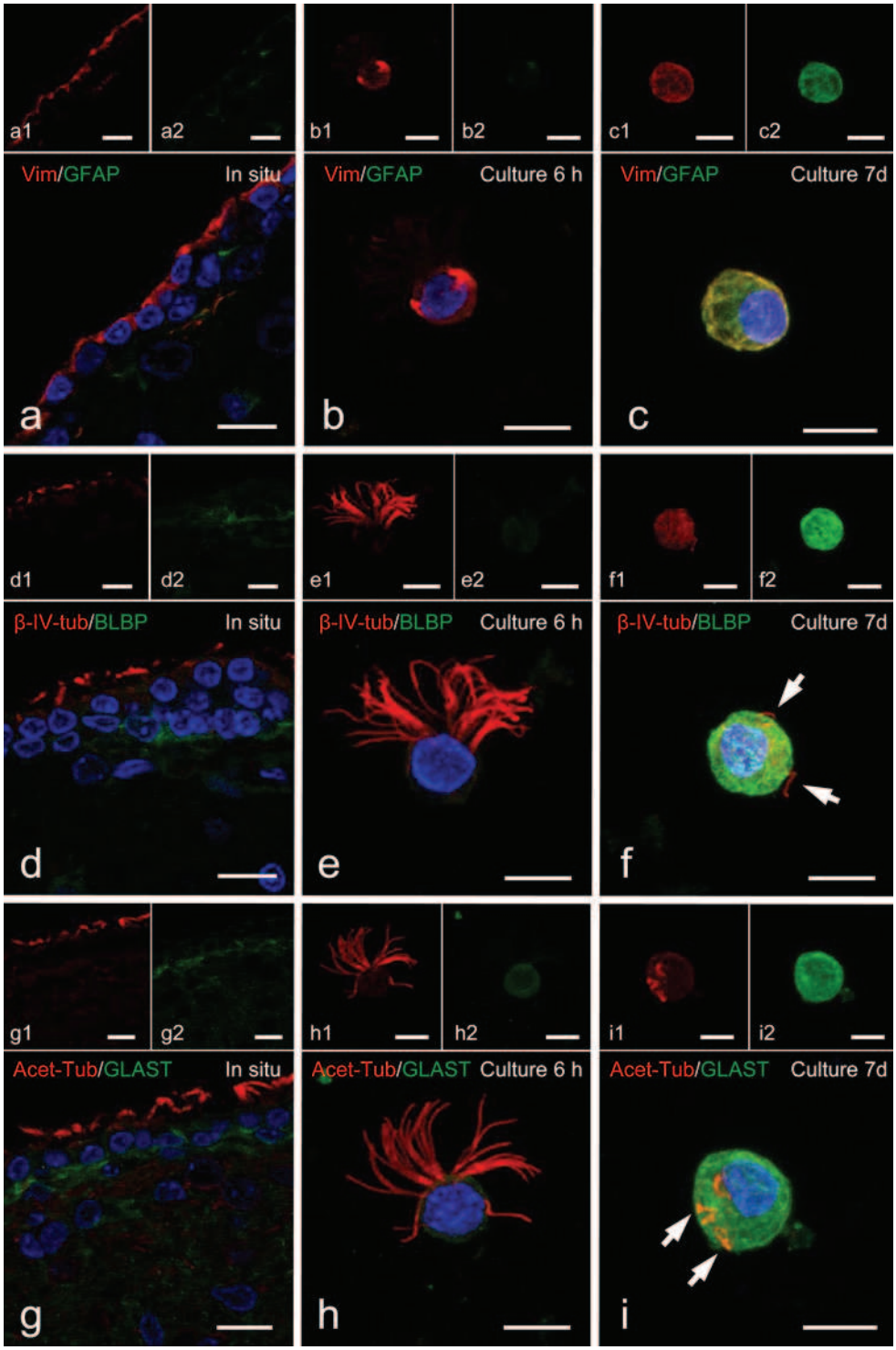


Fig. 4 Immunocytochemical characterization of ependymal cells in explants and after isolation. Isolated ependymal cells were analysed both 6 h after the enzymatic treatment and after 7 days of culture. Confocal images of: (1) in situ ependymal cells in a striatal explant section (**a**, **d**, **g**); (2) isolated ependymal cells after 6 h of the enzymatic treatment (**b**, **e**, **h**); and (3) ependymal cells after 7 days of culture (**c**, **f**, **i**). Double-immunostaining with antibodies against ciliary markers (beta-IV tubulin and acetylated tubulin) and glial markers (vimentin, GFAP, BLBP and GLAST) were performed in the three conditions. **a**, **b**, and **c** Ependymal cells displayed vimentin immunoreactivity (*red*) in all situations while GFAP (*green*, insets *a2*, *b2* and *c2*) only appeared after 7 days of culture. **d**, **e**, and **f** A similar scenario was observed with the glial cell marker BLBP (*green*), which was strongly expressed only in ependymal cells cultured for 7 days. Beta-IV tubulin highlights cilia in all stages, revealing that after 7 days in culture ependymal cells lose most of the cilia. *Arrows* point to few remaining cilia. **g**, **h**, and **i** The glial cell marker GLAST (*green*) was weakly immunopositive in ependymal cells in situ and after 6 h of isolation (see insets *g2* and *h2*, respectively), while it was highly positive after 7 days of culture. Acetylated tubulin only labels cilia, which were abundant in both ependymal cells in situ and 6 h after isolation. However, as previously shown with beta-IV tubulin, only few cilia remain after 7 days in culture (arrows in **i**). Scale bars 10 μm (**a**–**i**)

Relevant factors in the isolation process: dissection, temperature and composition of the culture media

The method here described is based on the detachment of ependymal cells by a combination of a soft enzymatic treatment and several incubations at low temperature. A subsequent purification step is necessary since non-ependymal cells are also released in the former step. The purification of ependymal cells is achieved by incubation of the detached cells in very restrictive culture conditions: non-supplemented media and low cell density.

As previously explained, the initial dissection of the ventricular wall explants is a crucial step for the subsequent isolation, so that contact of the ependymal surface with the

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

dissection tools must be avoided to prevent any damage to the ependymal cells. Similar recommendations were published by Mirzadeh et al. (2010) when studying the CSF flow generated by the ependymal cells in striatal explants. Out of the three culture media tested for the separation of ependymal cells (alpha-MEM, DMEM-F12 and MEM) alpha-MEM gave the highest yield of ependymal cells in motion. DMEM-F12 and MEM media resulted in a slightly lower yield, although many of the ependymal cells were not moving (results not shown).

A novel means used to enhance the detachment of the ependymal cells from the explant was the incubation at low temperatures before and after the enzymatic treatment. It is well established that integrin-mediated adhesion is temperature sensitive, diminishing at low temperatures (Altevogt et al. 1995; Xia et al. 1996; Jetha et al. 2007; Rico et al. 2010). Since ependymal cells contain a high amount of beta1-integrin (Grooms et al. 1993; Kazanis et al. 2010), a decrease in the temperature may disturb integrin-mediated cell interactions, which would allow a better action of the proteolytic enzymes. Besides the low temperature, the use of Hank's balanced salt solution without divalent ions has been found to be essential to obtain a high number of ependymal cells. In this sense, our group developed a method to obtain ependymal sheets with very few non-ependymal cells from adult bovine lateral ventricles (Perez-Martin et al. 2000, 2003) which also involved a period of immersion in cold Hank's solution during the transport to the laboratory (Perez-Martin et al. 2000).

The exposed results led to the choice of alpha-MEM as the separation medium, with the incorporation of some additives. Glucose was added to the medium, as ependymal cells display a high metabolism (Del Bigio 1995; Bruni 1998), contain high amounts of glycogen, and the enzymes involved in its metabolism (Cataldo and Broadwell 1986; Pfeiffer et al. 1990). The uptake of glucose by ependymal cells is up-regulated by insulin and insulin-like growth factor (Verleysdonk et al. 2004b), which are normally produced by the nearby subependymal cells (Perez-Martin et al. 2003) and choroid plexus (Garcia-Segura et al. 1991). Therefore, a high concentration of glucose (16 mM) was used to compensate for the absence of both factors in the separation medium.

On the other hand, ependymal cells that remain with the explant during 24 h accumulate lipid droplets (not shown), which does not occur when the cells are kept with the explant for only 6 h. Neurotransmitters such as L-glutamate and serotonin are released as a consequence of neuronal death (Grabb et al. 2002; Globus et al. 1992) leading to increased concentrations in the culture media of explants. It is known that L-glutamate increases the glucose uptake in astrocytes (Hamai et al. 1999), and serotonin regulates glycogen metabolism in rat ependymal cell cultures (Verleysdonk et al. 2005). Therefore, we hypothesize that high levels of both neurotransmitters in the culture media might alter carbohydrate metabolism causing lipid accumulation.

Once the ependymal cells were separated, four different culture media were tested to study the survival of ependymal cells over 10 days: alpha-MEM, DMEM-F12, MEM and Neurobasal-A supplemented with B27. Neurobasal-A + B27 was the one that resulted in the best survival rates, most probably due to the presence in B27 of antioxidants (catalase, superoxide dismutase and glutathione) and steroid hormones (corticosterone and progesterone) (Brewer et al. 1993). To avoid the pro-survival properties of B27 on neurons and neuroblasts (Brewer et al. 1993), it was excluded from the purification media.

Concerning other components of the culture medium, it is worth emphasizing the utilization of Pluronic F-127, a non-ionic surfactant polyol that reduces the adhesion of different cell types to plastic (Biran et al. 2001; Detrait et al. 1999). Cilia of ependymal cells are covered by glycoproteins with high content in sialic acid (Grondona et al. 1996) which probably reduces cell adhesion to plastic surfaces (Shimamura et al. 1994). However, basolateral membranes are devoid of such sialylated cover, what could favour that cells stick to plastic surfaces. Pluronic F-127 would reduce the adherence and loss of cells along the different manipulation steps, which is especially important when dealing with low numbers of cells.

Previous methods to obtain ependymal cell cultures

There have been numerous attempts to obtain cultures of ependymal cells, most of them based on the culture of ependymal cell precursors isolated from brains of foetal or newborn rodents. Those precursors attach to fibronectin-coated dishes and, after 2–3 weeks of culture in serum-free defined medium, differentiate to ependymal cells (Araki et al. 1983; Thomas 1985; Gabrion et al. 1988; Laabich et al. 1989; Hild 1957; Hamprecht and Loffler 1985; Prothmann et al. 2001; Weibel et al. 1986). Various studies on ependyma have been performed employing slight variations of this method (see "Introduction"). One interesting advantage of these cultures is the formation of a continuous monolayer of ependymal cells, which makes it suitable for permeability studies when cultured on porous bottom dishes (Laabich et al. 1989, 1991). However, together with ependymocytes, other cells types as astrocytes, oligodendrocytes and fibroblasts differentiate at the same time. Although these only represent 10 % of the total cell number (Laabich et al. 1989), the lack of purity would preclude the use of this in vitro model for certain studies which require pure ependymal cell cultures.

Few attempts to obtain ependymal cell cultures have used adult brains (Coskun et al. 2008; Pfenninger et al.

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2007, 2011; Janson et al. 1999; Manthorpe et al. 1977). Manthorpe and collaborators dissected coronal sections of rat brain which were digested with trypsin and incubated with EGTA to promote the release of the ependymal cells, which were later harvested by several rounds of centrifugation. With such method, 59 % of the cells obtained were ciliated and beating cells, and 17 % were ciliated but non-beating cells; the remaining 24 % were non-ciliated cells (Manthorpe et al. 1977). Since this method starts from adult rat brains, it is the closest to the one described in the present article. However, we obtained a lower proportion (6 %) of non-ependymal cells. The higher ratio of ependymal surface to tissue surface in explants compared to brain coronal sections could explain this difference. In addition, the enzymatic mixture in TripLE Express provides a gentler digestion than that of the trypsin–EGTA mixture, which would reduce the number of non-ependymal cells detached. Anyway, these authors did not perform any purification step to get rid of contaminating cells.

Newer methods using cell immunolabeling combined with fluorescent or magnetic cell sorting have allowed to obtain pure cultures of ependymal cells from adult brains, with the advantages of rapidity and high yield. However, there are no surface markers unique to ependymal cells. Antibodies against Notch1 (Janson et al. 1999), CD133 and CD24 (Coskun et al. 2008), and CD133, CD24, CD45 and CD34 (Pfenninger et al. 2007, 2011) have been employed to purify ependymal cells by immunolabeling and cell sorting strategies, but none of these surface markers is exclusive of ependymal cells. CD133 is present in hematopoietic progenitor cells (Corbeil et al. 2000), endothelial progenitor cells (Balasubramaniam et al. 2007), oligodendrocytes (Corbeil et al. 2009), and type B1 astrocytes (Mirzadeh et al. 2008); while CD24 is expressed in ependymal cells (Corbeil et al. 2009; Mirzadeh et al. 2008; Coskun et al. 2008) and differentiating neuroblasts (Figarella-Branger et al. 1993; Calaora et al. 1996). In addition, the method of immunolabeling and cell sorting does not guarantee the purity of the cell fractions collected. In fact, to increase purity after magnetic activated cell sorting (MACS) the first fractions obtained were passed over new columns. In the case of CD133-positive fractions, a re-analysis by fluorescent activated cell sorting (FACS) gave a purity of 96.6 % of CD133-positive cells (Pfenninger et al. 2007). In a more recent report, the same authors used a combination of cell markers and a sorting strategy that implies a series of sequential passages (up to 6) of the fractions through the sorter to obtain a small fraction of CD133+/CD24+/CD45−/CD34− cells (Fig. 1 in supplementary material; Pfenninger et al. 2011). A re-analysis was necessary to confirm that the cells did not belong to other cell fractions, and thus to be sure that the isolated cells were ependymal cells. By using the CD133+/CD24+/CD45−/CD34− cell fraction in a neurosphere forming assay, they suggested that spinal cord ependymal cells display self-renewal properties in vitro and the capacity to differentiate into the three lineages of the nervous system, features which are absent in ependymal cells obtained from the lateral ventricle walls (Pfenninger et al. 2011).

On the contrary, in the method reported here, the purification of ependymal cells was achieved with a quite simple strategy, consisting of applying certain restrictive culture conditions during just 48 h: (1) the use of media without supplementation (i.e. without growth factors, cytokines or sera) and, (2) the culture at low cell density. This result reveals that isolated ependymal cells are able to survive in a very simple medium, at least for a short period of time. In fact, we observed that ependymal cells could survive for 24 h even in Hank's balanced salt solution (our unpublished results). Furthermore, our group showed in a previous work that ependymal explants from adult bovine brains could survive when cultured in DMEM-F12 without any supplements (Perez-Martin et al. 2000). Such explants formed by the ependymal layer and some attached subependymal cells gave rise to neuroblasts after several days of culture without any supplement (Perez-Martin et al. 2003). It is known that ependymal cells synthesize and release different growth factors such as FGF1 (Suzuki et al. 2001), FGF2 (Tooyama et al. 1993), BMP2 (Sato et al. 2010), PEDF (Ramirez-Castillejo et al. 2006), CNTF (Severi et al. 2012; Schorr et al. 1996), IGF-I (Garcia-Segura et al. 1991) and VEGF (Arai et al. 1998). Besides, some cell signalling molecules such as Noggin (Lim et al. 2000; Mikawa and Sato 2011) and Sonic hedgehog (Chen et al. 2005) can be expressed by ependymal cells. Therefore, ependymal cells could provide support to the neurogenic processes taking place in the underlying subependymal layer. In addition, some receptors for the former growth factors are also expressed by ependymal cells: FGFR1 (Gonzalez et al. 1995), BMPR (Miyagi et al. 2011), CNTF receptor alpha (Severi et al. 2012), BDNF receptor(s) (trkB) (Yan et al. 1994) and IGFR in tanycytes (Garcia-Segura et al. 1997), which suggests that those growth factors could eventually act as autocrine regulators. Thus, the existence of a source of growth factors, albeit at low concentrations, and the presence of their receptors in the ependymal cells could account for the survival support required by the ependymal cells in culture. Such requirements are probably quite short or almost absent since ependymal cells were at low density and, therefore, growth factor concentrations in the medium should as well be very low. On the contrary, other nervous cells presumably require a higher trophic support, since they die in such conditions.

Regarding the yield of cells obtained with the method described here, we estimated a mean of 15×10^3 cells per explant. As we obtain four explants per brain, that would

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

be about 60×10^3 cells per brain, an efficiency far lower than that reported by other authors (Weibel et al. 1986). This moderate yield of ependymal cells could limit the use of this isolation technique for certain type of studies that require a high amount of cells, particularly those related to metabolism. A dissection method that recovers other areas of the ventricular wall could be worked out in the future.

Differentiation state of adult ependymal cells in culture

Multiciliated ependymal cells differentiate during early postnatal life from embryonic radial glial cells (Spassky et al. 2005), which are considered to be the multipotent neural stem cells in the brain at early stages (Malatesta et al. 2000, 2008; Noctor et al. 2001; Doetsch 2003). Conversely, adult multiciliated ependymal cells are regarded as postmitotic cells (Spassky et al. 2005). However, the occasional presence of cells positive for both CD133 and Ki67 in the ependymal layer would argue against such postmitotic character (Coskun et al. 2008). In addition, in certain circumstances, such as stroke or injury of the nervous system, ependymal cells express radial glial cell markers (Carlen et al. 2009; Gregg and Weiss 2003; Taylor et al. 2005; Zhang et al. 2007) or can even proliferate (Gleason et al. 2008; Cizkova et al. 2009; Moreno-Manzano et al. 2009; Li et al. 2002; Zhang et al. 2005, 2007) and give rise to neurons (Carlen et al. 2009) or oligodendrocytes (Meletis et al. 2008). Such capacity of dedifferentiation and proliferation has been specifically described in the ependymal cells of the spinal cord (Cizkova et al. 2009; Meletis et al. 2008; Danilov et al. 2006; Namiki and Tator 1999; Moreno-Manzano et al. 2009; Attar et al. 2005). In this regard Pfenninger et al. (2011) have reported that spinal cord ependymal cells could behave as true neural stem cells because: (1) have the capacity of self-renewal and differentiation in vitro; (2) express several genes involved in cell division, cell cycle regulation, and chromosome stability; and (3) bear certain transcripts which are shared with neural stem cells of the embryonic forebrain.

Here, we show that ependymal cells isolated from the lateral ventricles acquire radial glial cells markers (GFAP, BLBP and GLAST) after 1 week of culture under restrictive conditions. Similar results were previously observed in ependymal cells within explants from the lateral ventricular wall: (1) obtained from adult bovine brain, containing ependymal cells and few subependymal cells (Perez-Martin et al. 2000), and; (2) obtained from adult rat, which contain ependymal cells, a subependymal cell layer and a thin layer of nervous parenchyma (Grondona, Fernández-Llebrez and López-Ávalos; unpublished results). In both cases, after 2 weeks of culture ependymal cells displayed radial glial markers, being strongly positive to antibodies against BLBP and GFAP (Perez-Martin et al. 2000; Grondona, Fernández-Llebrez and López-Ávalos, unpublished results). All these results suggest that adult ependymal cells maintain the capacity of dedifferentiation when the cellular environment is altered.

In summary, we have developed a novel, inexpensive and simple method to obtain pure cultures of multiciliated adult ependymal cells, taking advantage of the capacity of these cells to survive under restrictive conditions consisting of: (1) the absence of exogenous growth factors or cytokines in the culture media; and (2) a low cell density. In such environment, non-ependymal neural cells die after 48 h of culture while ependymal cells remain alive. The simplicity of this method will encourage the performance of in vitro studies aimed to explore the biology of the adult ependymal cells, and particularly the factors controlling their capacity of dedifferentiation and possible reprogramming.

Acknowledgments The authors are grateful to José Esteban Casares Mira for valuable technical assistance and David Navas Fernández for his help with confocal microscopy. Leica confocal microscope (SP5 II) was funded by FEDER funds of the European Union. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia, Tecnología, Innovación y Sanidad (Spain) (BFU 2006-11754; SAF2010-19087; PNSD2010-143), and Junta de Andalucía (Spain) (P07-CVI-03079; SAS-S 0742; SAS08-0029; SAS 2010-111224).

References

Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M, Lohr J, von Hoegen P, Sammar M, Andrew DP, McEvoy L, Humphries MJ, Butcher EC (1995) The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1. J Exp Med 182(2):345–355

Arai Y, Deguchi K, Takashima S (1998) Vascular endothelial growth factor in brains with periventricular leukomalacia. Pediatr Neurol 19(1):45–49

Araki M, Sato F, Saito T (1983) Primary monolayer culture of rat ependymal cells: an ultrastructural study. Arch Histol Jpn 46(2):191–201

Attar A, Kaptanoglu E, Aydin Z, Ayten M, Sargon MF (2005) Electron microscopic study of the progeny of ependymal stem cells in the normal and injured spinal cord. Surg Neurol 64(Suppl 2):S28–S32

Balasubramaniam V, Mervis CF, Maxey AM, Markham NE, Abman SH (2007) Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292(5):L1073–L1084. doi:10.1152/ajplung.00347.2006

Biran R, Webb K, Noble MD, Tresco PA (2001) Surfactant-immobilized fibronectin enhances bioactivity and regulates sensory neurite outgrowth. J Biomed Mater Res 55(1):1–12

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. J Neurosci Res 35(5):567–576

Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. Microsc Res Tech 41(1):2–13

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Calaora V, Chazal G, Nielsen PJ, Rougon G, Moreau H (1996) mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. Neuroscience 73(2): 581–594

Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. Nat Neurosci 12(3):259–267

Cataldo AM, Broadwell RD (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. J Neurocytol 15(4):511–524

Cathcart RS 3rd, Worthington WC Jr (1964) Ciliary movement in the rat cerebral ventricles: clearing action and directions of currents. J Neuropathol Exp Neurol 23:609–618

Chen J, Leong SY, Schachner M (2005) Differential expression of cell fate determinants in neurons and glial cells of adult mouse spinal cord after compression injury. Eur J Neurosci 22(8):1895–1906. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04348.x

Chernoff EA, Munck CM, Mendelsohn LG, Egar MW (1990) Primary culture of axolotl spinal cord ependymal cells. Tissue Cell 22(5):601–613

Chernoff EA, Henry LC, Spotts T (1998) An ependymal cell culture system for the study of spinal cord regeneration. Wound Repair Regen 6(4):403–412

Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S (2009) Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? Nat Rev Neurosci 10(2):153–163

Cizkova D, Nagyova M, Slovinska L, Novotna I, Radonak J, Cizek M, Mechirova E, Tomori Z, Hlucilova J, Motlik J, Sulla I Jr, Vanicky I (2009) Response of ependymal progenitors to spinal cord injury or enhanced physical activity in adult rat. Cell Mol Neurobiol 29(6–7):999–1013

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. J Biol Chem 275(8):5512–5520

Corbeil D, Joester A, Fargeas CA, Jaszai J, Garwood J, Hellwig A, Werner HB, Huttner WB (2009) Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells. Glia 57(8):860–874. doi:10.1002/glia.20812

Coskun V, Wu H, Blanchi B, Tsao S, Kim K, Zhao J, Biancotti JC, Hutnick L, Krueger RC Jr, Fan G, de Vellis J, Sun YE (2008) CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. Proc Natl Acad Sci USA 105(3):1026–1031

Danilov AI, Covacu R, Moe MC, Langmoen IA, Johansson CB, Olsson T, Brundin L (2006) Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. Eur J Neurosci 23(2):394–400

Del Bigio MR (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. Glia 14(1):1–13

Detrait E, Lhoest JB, Bertrand P, van den Bosch de Aguilar P (1999) Fibronectin-pluronic coadsorption on a polystyrene surface with increasing hydrophobicity: relationship to cell adhesion. J Biomed Mater Res 45(4):404–413

Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. Nat Neurosci 6(11):1127–1134. doi:10.1038/nn1144

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 17(13):5046–5061

Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L (2004) SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. Dev Neurosci 26(2–4):148–165. doi:10.1159/000082134

Fadaee-Shohada MJ, Hirst RA, Rutman A, Roberts IS, O'Callaghan C, Andrew PW (2010) The behaviour of both *Listeria monocytogenes* and rat ciliated ependymal cells is altered during their co-culture. PLoS ONE 5(5):e10450. doi:10.1371/journal.pone.0010450

Figarella-Branger D, Moreau H, Pellissier JF, Bianco N, Rougon G (1993) CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B lymphocytes, is a marker for human regenerating muscle. Acta Neuropathol 86(3):275–284

Gabrion J, Peraldi S, Faivre-Bauman A, Klotz C, Ghandour MS, Paulin D, Assenmacher I, Tixier-Vidal A (1988) Characterization of ependymal cells in hypothalamic and choroidal primary cultures. Neuroscience 24(3):993–1007

Gabrion JB, Herbute S, Bouille C, Maurel D, Kuchler-Bopp S, Laabich A, Delaunoy JP (1998) Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. Microsc Res Tech 41(2):124–157

Garcia MA, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, Reinicke K, Zuniga F, Vera JC, Onate SA, Nualart F (2003) Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. J Neurochem 86(3):709–724

Garcia-Segura LM, Perez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Aleman I (1991) Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. Brain Res 560(1–2):167–174

Garcia-Segura LM, Rodriguez JR, Torres-Aleman I (1997) Localization of the insulin-like growth factor I receptor in the cerebellum and hypothalamus of adult rats: an electron microscopic study. J Neurocytol 26(7):479–490

Gleason D, Fallon JH, Guerra M, Liu JC, Bryant PJ (2008) Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury. Neuroscience 156(1):81–88

Globus MY, Wester P, Busto R, Dietrich WD (1992) Ischemia-induced extracellular release of serotonin plays a role in CA1 neuronal cell death in rats. Stroke J Cereb Circ 23(11): 1595–1601

Gomez-Roldan MC, Perez-Martin M, Capilla-Gonzalez V, Cifuentes M, Perez J, Garcia-Verdugo JM, Fernandez-Llebrez P (2008) Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. J Comp Neurol 507(4):1571–1587

Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A (1995) A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. Brain Res 701(1–2):201–226

Grabb MC, Lobner D, Turetsky DM, Choi DW (2002) Preconditioned resistance to oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal death: alterations in vesicular GABA and glutamate release. Neuroscience 115(1):173–183

Gregg C, Weiss S (2003) Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. J Neurosci 23(37):11587–11601

Grondona JM, Perez-Martin M, Cifuentes M, Perez J, Jimenez AJ, Perez-Figares JM, Fernandez-Llebrez P (1996) Ependymal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neuraminidase into the lateral ventricle of adult rats. J Neuropathol Exp Neurol 55(9):999–1008

Grooms SY, Terracio L, Jones LS (1993) Anatomical localization of beta 1 integrin-like immunoreactivity in rat brain. Exp Neurol 122(2):253–259

Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi JM, Strehl L, Hirota Y, Desoeuvre A, Boutin C, Han YG, Mirzadeh Z, Cremer

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

H, Montcouquiol M, Sawamoto K, Spassky N (2010) Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. Nat Cell Biol 12(4):341–350. doi:10.1038/ncb2040

Hall PE, Lathia JD, Miller NG, Caldwell MA, Ffrench-Constant C (2006) Integrins are markers of human neural stem cells. Stem Cells 24(9):2078–2084. doi:10.1634/stemcells.2005-0595

Hamai M, Minokoshi Y, Shimazu T (1999) L-Glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. J Neurochem 73(1):400–407

Hamprecht B, Loffler F (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. Methods Enzymol 109:341–345

Hild W (1957) Ependymal cells in tissue culture. Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 46(3):259–271

Hild W, Takenaka T, Walker F (1965) Electrophysiological properties of ependymal cells from the mammalian brain in tissue culture. Exp Neurol 11:493–501

Hirota Y, Meunier A, Huang S, Shimozawa T, Yamada O, Kida YS, Inoue M, Ito T, Kato H, Sakaguchi M, Sunabori T, Nakaya MA, Nonaka S, Ogura T, Higuchi H, Okano H, Spassky N, Sawamoto K (2010) Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. Development 137(18):3037–3046. doi:10.1242/dev.050120

Hogue MJ (1947) Human fetal ependymal cells in tissue cultures. Anat Rec 99(4):642

Hoyo-Becerra C, Lopez-Avalos MD, Alcaide-Gavilan M, Gomez-Roldan MC, Perez J, Fernandez-Llebrez P, Grondona JM (2005) Reissner's fiber formation depends on developmentally regulated factors extrinsic to the subcommissural organ. Cell Tissue Res 321(3):429–441

Hoyo-Becerra C, Lopez-Avalos MD, Perez J, Miranda E, Rojas-Rios P, Fernandez-Llebrez P, Grondona JM (2006) Continuous delivery of a monoclonal antibody against Reissner's fiber into CSF reveals CSF-soluble material immunorelated to the subcommissural organ in early chick embryos. Cell Tissue Res 326(3):771–786

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29(4):577–580

Ibanez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen UP, North A, Heintz N, Omran H (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. Hum Mol Genet 13(18):2133–2141

Janson AM, Frisen J, Johanson C, Momma S, Clarke D, Zhao M, Lendahl U, Delfani K (1999) Ependymal neural stem cells and method for their isolation. International Patent WO 99/67363, 29.12.99

Jensen-Smith HC, Luduena RF, Hallworth R (2003) Requirement for the betaI and betaIV tubulin isotypes in mammalian cilia. Cell Motil Cytoskelet 55(3):213–220. doi:10.1002/cm.10122

Jetha KA, Egginton S, Nash GB (2007) Changes in the integrin-mediated adhesion of human neutrophils in the cold and after rewarming. Biorheology 44(1):37–49

Kazanis I, Lathia JD, Vadakkan TJ, Raborn E, Wan R, Mughal MR, Eckley DM, Sasaki T, Patton B, Mattson MP, Hirschi KK, Dickinson ME, Ffrench-Constant C (2010) Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals. J Neurosci 30(29):9771–9781. doi:10.1523/JNEUROSCI.0700-10.2010

Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N (2002) Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. Mol Cell Biol 22(8):2769–2776

Kowtharapu BS, Vincent FC, Bubis A, Verleysdonk S (2009) Lentiviral transfection of ependymal primary cultures facilitates the characterisation of kinocilia-specific promoters. Neurochem Res 34(8):1380–1392. doi:10.1007/s11064-009-9918-7

Kuchler S, Graff MN, Gobaille S, Vincendon G, Roche AC, Delaunoy JP, Monsigny M, Zanetta JP (1994) Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. Neurochem Int 24(1):43–55

Laabich A, Sensenbrenner M, Delaunoy JP (1989) Monolayer cultures of ependymal cells on porous bottom dishes. A tool for transport studies across the brain cerebrospinal barrier. Neurosci Lett 103(2):157–161

Laabich A, Graff MN, Dunel-Erb S, Sensenbrenner M, Delaunoy JP (1991) A study of in vitro and in vivo morphological changes of ependymal cells induced by galactocerebrosides. Glia 4(5):504–513

Li Y, Chen J, Chopp M (2002) Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats. J Neurol Sci 193(2):137–146

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. Neuron 28(3):713–726

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development 127(24):5253–5263

Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F (2008) Radial glia and neural stem cells. Cell Tissue Res 331(1):165–178. doi:10.1007/s00441-007-0481-8

Manthorpe CM, Wilkin GP, Wilson JE (1977) Purification of viable ciliated cuboidal ependymal cells from rat brain. Brain Res 134(3):407–415

McClintock TS, Glasser CE, Bose SC, Bergman DA (2008) Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. Physiol Genomics 32(2):198–206. doi:10.1152/physiolgenomics.00128.2007

Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. PLoS Biol 6(7):e182

Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc Natl Acad Sci USA 101(50):17528–17532

Mikawa S, Sato K (2011) Noggin expression in the adult rat brain. Neuroscience 184:38–53. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.036

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. Cell Stem Cell 3(3):265–278. doi:10.1016/j.stem.2008.07.004

Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H, Alvarez-Buylla A (2010) The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. J Vis Exp: JoVE (39). doi:10.3791/1938

Miyagi M, Mikawa S, Hasegawa T, Kobayashi S, Matsuyama Y, Sato K (2011) Bone morphogenetic protein receptor expressions in the adult rat brain. Neuroscience 176:93–109. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.027

Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron 31(5):727–741

Monkkonen KS, Hakumaki JM, Hirst RA, Miettinen RA, O'Callaghan C, Mannisto PT, Laitinen JT (2007) Intracerebroventricular

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

antisense knockdown of G alpha i2 results in ciliary stasis and ventricular dilatation in the rat. BMC Neurosci 8:26

Monkkonen KS, Hirst RA, Laitinen JT, O'Callaghan C (2008) PACAP27 regulates ciliary function in primary cultures of rat brain ependymal cells. Neuropeptides 42(5–6):633–640

Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Garcia-Rosello M, Lainez S, Erceg S, Calvo MT, Ronaghi M, Lloret M, Planells-Cases R, Sanchez-Puelles JM, Stojkovic M (2009) Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. Stem Cells 27(3):733–743

Murin R, Cesar M, Kowtharapu BS, Verleysdonk S, Hamprecht B (2009) Expression of pyruvate carboxylase in cultured oligodendroglial, microglial and ependymal cells. Neurochem Res 34(3):480–489. doi:10.1007/s11064-008-9806-6

Namiki J, Tator CH (1999) Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. J Neuropathol Exp Neurol 58(5):489–498

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409(6821):714–720

Oksche A (1973) Circumventricular structures and pituitary functions. In: Ariens-Kappers J (ed) Proceedings of the fourth international congress of endocrinology, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, pp 73–79

Paez-Gonzalez P, Abdi K, Luciano D, Liu Y, Soriano-Navarro M, Rawlins E, Bennett V, Garcia-Verdugo JM, Kuo CT (2011) Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. Neuron 71(1):61–75. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.029

Perez-Martin M, Grondona JM, Cifuentes M, Perez-Figares JM, Jimenez JA, Fernandez-Llebrez P (2000) Ependymal explants from the lateral ventricle of the adult bovine brain: a model system for morphological and functional studies of the ependyma. Cell Tissue Res 300(1):11–19

Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Arrabal FJB-S, Arrabal PM, Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Garcia-Segura LM (2003) Neurogenesis in explants from the walls of the lateral ventricle of adult bovine brain: role of endogenous IGF-1 as a survival factor. Eur J Neurosci 17(2):205–211

Pfeiffer B, Elmer K, Roggendorf W, Reinhart PH, Hamprecht B (1990) Immunohistochemical demonstration of glycogen phosphorylase in rat brain slices. Histochemistry 94(1):73–80

Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, Jacobsen SE, Nuber UA (2007) CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. Cancer Res 67(12):5727–5736

Pfenninger CV, Steinhoff C, Hertwig F, Nuber UA (2011) Prospectively isolated CD133/CD24-positive ependymal cells from the adult spinal cord and lateral ventricle wall differ in their long-term in vitro self-renewal and in vivo gene expression. Glia 59(1):68–81

Piperno G, Fuller MT (1985) Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. J Cell Biol 101(6):2085–2094

Prothmann C, Wellard J, Berger J, Hamprecht B, Verleysdonk S (2001) Primary cultures as a model for studying ependymal functions: glycogen metabolism in ependymal cells. Brain Res 920(1–2):74–83

Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. Nat Neurosci 9(3):331–339. doi:10.1038/nn1657

Rico F, Chu C, Abdulreda MH, Qin Y, Moy VT (2010) Temperature modulation of integrin-mediated cell adhesion. Biophys J 99(5):1387–1396. doi:10.1016/j.bpj.2010.06.037

Rieke GK, Jordan FL, Wynder HJ, Thomas WE (1987) Ultrastructure of ependymal cells in primary cultures of cerebral cortex. J Neurosci Res 18(3):484–492. doi:10.1002/jnr.490180316

Sato T, Mikawa S, Sato K (2010) BMP2 expression in the adult rat brain. J Comp Neurol 518(22):4513–4530. doi:10.1002/cne.22469

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. Science 311(5761):629–632

Schorr M, Zhou L, Schwechheimer K (1996) Expression of ciliary neurotrophic factor is maintained in spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 140(1–2):117–122

Severi I, Carradori MR, Lorenzi T, Amici A, Cinti S, Giordano A (2012) Constitutive expression of ciliary neurotrophic factor in mouse hypothalamus. J Anat 220(6):622–631. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01498.x

Shimamura M, Shibuya N, Ito M, Yamagata T (1994) Repulsive contribution of surface sialic acid residues to cell adhesion to substratum. Biochem Mol Biol Int 33(5):871–878

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 25(1):10–18

Suzuki S, Li AJ, Ishisaki A, Hou X, Hasegawa M, Fukumura M, Akaike T, Imamura T (2001) Feeding suppression by fibroblast growth factor-1 is accompanied by selective induction of heat shock protein 27 in hypothalamic astrocytes. Eur J Neurosci 13(12):2299–2308

Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T, Gilbertson RJ (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. Cancer Cell 8(4):323–335

Thomas WE (1985) Synthesis of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by dissociated cerebral cortical cells in vitro. Brain Res 332(1):79–89

Tooyama I, Kremer HP, Hayden MR, Kimura H, McGeer EG, McGeer PL (1993) Acidic and basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the striatum and midbrain in Huntington's disease. Brain Res 610(1):1–7

Tritschler F, Murin R, Birk B, Berger J, Rapp M, Hamprecht B, Verleysdonk S (2007) Thrombin causes the enrichment of rat brain primary cultures with ependymal cells via protease-activated receptor 1. Neurochem Res 32(6):1028–1035. doi:10.1007/s11064-006-9267-8

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 97(26):14720–14725

Verleysdonk S, Hamprecht B, Rapp M, Wellard J (2004a) Uptake and metabolism of serotonin by ependymal primary cultures. Neurochem Res 29(9):1739–1747

Verleysdonk S, Hirschner W, Wellard J, Rapp M, de los Angeles Garcia M, Nualart F, Hamprecht B (2004b) Regulation by insulin and insulin-like growth factor of 2-deoxyglucose uptake in primary ependymal cell cultures. Neurochem Res 29(1):127–134

Verleysdonk S, Kistner S, Pfeiffer-Guglielmi B, Wellard J, Lupescu A, Laske J, Lang F, Rapp M, Hamprecht B (2005) Glycogen metabolism in rat ependymal primary cultures: regulation by serotonin. Brain Res 1060(1–2):89–99

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Weibel M, Pettmann B, Artault JC, Sensenbrenner M, Labourdette G (1986) Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium. Brain Res 390(2):199–209

Worthington WC Jr, Cathcart RS 3rd (1963) Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. Science 139:221–222

Xia Y, Gil SG, Carter WG (1996) Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. J Cell Biol 132(4):727–740

Yan Q, Matheson C, Sun J, Radeke MJ, Feinstein SC, Miller JA (1994) Distribution of intracerebral ventricularly administered neurotrophins in rat brain and its correlation with trk receptor expression. Exp Neurol 127(1):23–36. doi:10.1006/exnr.1994.1076

Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK (2000) Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. Development 127(11): 2367–2382

Zhang PB, Liu Y, Li J, Kang QY, Tian YF, Chen XL, Zhao JJ, Shi QD, Song TS, Qian YH (2005) Ependymal/subventricular zone cells migrate to the peri-infarct region and differentiate into neurons and astrocytes after focal cerebral ischemia in adult rats. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 25(10):1201–1206

Zhang RL, Zhang ZG, Wang Y, LeTourneau Y, Liu XS, Zhang X, Gregg SR, Wang L, Chopp M (2007) Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. J Cereb Blood Flow Metab 27(6): 1201–1212

Publicaciones y Divulgación Científica
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Publicaciones y Divulgación Científica