



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL GLUTAMATO EN LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLÍA EN CULTIVO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

LIBB Adriana Paola Nebreda Corona

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Julio Morán Andrade
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lourdes Massieu Trigo
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Leonor Pérez Martínez
[Instituto de Biotecnología](#)

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Protesta Universitaria de Integridad y Honestidad



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL (Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

EFFECTO DEL GLUTAMATO EN LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLÍA EN CULTIVO

que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Adriana Nebreda

Adriana Paola Nebreda Corona -- 308218673
(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Julio Morán Andrade, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento por parte de la DGAPA-UNAM (IN212019 y IN216422) y del CONACYT (285184).

La realización de este proyecto contó con el apoyo técnico de la M. en C. Guadalupe Domínguez.

Agradecemos el apoyo del personal del bioterio en la asistencia, reproducción y cuidado de los animales.

Esta tesis también contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado:

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. Laura Virginia Adalid Peralta

Dr. Lenin David Ochoa De La Paz

Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo

Durante la realización de mi tesis de maestría se me otorgó una beca por parte de CONACYT.

Índice

Protesta Universitaria de Integridad y Honestidad.....	2
Agradecimientos	3
Resumen.....	6
Abstract	7
Introducción	8
Sistema inmune.....	8
Inflamación.....	9
Microglía.....	12
Cambios morfológicos de la microglía	14
Fenotipos de activación	16
ERO, NADPH Oxidasas y microglía	20
Receptores glutamatérgicos	23
Receptores metabotrópicos glutamatérgicos en la microglía	24
Descripción del problema	26
Justificación	27
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares	27
Materiales y Métodos	28
Animales.....	28
Cultivo mixto de células granulares de cerebelo	28
Cultivo primario de microglía de cerebro completo.....	29
Análisis por inmunofluorescencia	30
Viabilidad.....	30

Análisis de la morfología microglial.....	31
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Cultivos de microglía	32
Efecto del LPS en la viabilidad de las células de microglía	33
Discusión	48
Conclusiones	52
Referencias.....	53

Resumen

La excitotoxicidad se ha descrito como un mecanismo de daño neuronal relacionado con desequilibrios en las concentraciones de glutamato extracelular. La microglía desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis dentro del cerebro, así como de la respuesta inmune, principalmente la inflamación. Cuando existe una desregulación de esta respuesta se puede exacerbar el daño. Las NADPH oxidasas (NOX) tienen la función de generar especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales también participan en respuestas proinflamatorias, especialmente las orquestadas por la microglía. El glutamato actúa principalmente a través de receptores específicos, como los receptores metabotrópicos (mGluRs) que desencadenan vías de señalización, como la activación de las NOX. En particular el mGluR5 es capaz de inhibir la actividad de NOX2, reduciendo la producción de ERO y contribuyendo a un efecto neuroprotector. Al activar este receptor de glutamato, específicamente en la microglía, se podrá modificar su estado de activación, reduciendo mecanismos inflamatorios, de forma dependiente de NOX2. En este proyecto nos enfocamos en establecer un cultivo primario de microglía utilizando cerebros de rata para investigar la participación de los receptores de glutamato en la modificación de la activación de la microglía, especialmente en relación con cambios en su morfología. Evaluamos la respuesta de la microglía al glutamato en condiciones de activación por lipopolisacárido (LPS), examinando la viabilidad celular y la morfología. Tras estimular el cultivo con LPS y glutamato, se identificaron células con diversas morfologías. Es necesario utilizar marcadores moleculares específicos para determinar el fenotipo específico de la activación de las células. Determinamos que ni el LPS ni el glutamato afectan la viabilidad microglial bajo las condiciones examinadas, y observamos que las ERO y la actividad de NOX no influyen en la viabilidad en condiciones de activación. Para futuras investigaciones proponemos la utilización de agonistas y antagonistas del receptor mGluR5, así como un inhibidor más selectivo de la NOX, para comprender mejor los mecanismos de regulación de la respuesta inmune mediada por la microglía en el contexto de excitotoxicidad.

Abstract

Excitotoxicity has been described as a mechanism of neuronal damage related to imbalances in extracellular glutamate concentrations. Microglia plays a crucial role in regulating homeostasis within the brain, as well as the immune response, primarily inflammation. When there is a dysregulation of this response, damage can be exacerbated. NADPH oxidases (NOX) function to generate reactive oxygen species (ROS), which also participate in proinflammatory responses, especially those orchestrated by microglia. Glutamate acts mainly through specific receptors, such as metabotropic receptors (mGluRs), which trigger signaling pathways, including the activation of NOX. In particular, mGluR5 can inhibit the activity of NOX2, reducing ROS production and contributing to a neuroprotective effect. By activating this glutamate receptor, specifically in microglia, it is possible to modify their activation state, reducing inflammatory mechanisms, depending on NOX2. In this project, we focus on establishing a primary microglial culture using rat brains to investigate the involvement of glutamate receptors in modifying microglial activation, especially in relation to changes in morphology. We evaluate the microglial response to glutamate under lipopolysaccharide (LPS) activation conditions, examining cell viability and morphology. After stimulating the culture with LPS and glutamate, cells with various morphologies were identified. Specific molecular markers are needed to determine the specific phenotype of cell activation. We determined that neither LPS nor glutamate affects microglial viability under the examined conditions, and we observed that ROS and NOX activity do not influence viability under activation conditions. For future research, we propose the use of mGluR5 receptor agonists and antagonists, as well as a more selective NOX inhibitor, to better understand the regulatory mechanisms of the immune response mediated by microglia in the context of excitotoxicity.

Introducción

Sistema inmune

El sistema inmune de un organismo se compone de órganos, células y moléculas encargados de vigilar la integridad de los tejidos, detectar y combatir tanto elementos nocivos como agentes infecciosos (Abbas et al., 2015)(Sender et al., 2023). Para proteger efectivamente al individuo de ataques, el sistema inmune debe completar 4 tareas importantes. La primera es el reconocimiento inmunológico, lo que quiere decir que dicha amenaza debe ser detectada, por ejemplo, sustancias u organismos extraños que han ingresado al cuerpo o componentes propios modificados. Este proceso es muy importante ya que también implica reconocer a los elementos propios del organismo y evitar reaccionar contra ellos. La segunda es contener la infección y si es posible eliminarla, usando un repertorio diverso de células y moléculas que actúan en forma conjunta. La tercera comprende la regulación de la respuesta inmune para evitar dañar al organismo, generar respuestas alérgicas o de autoinmunidad. Por último, la participación de la memoria inmunológica que permite combatir al mismo patógeno en caso de que ocurra una reinfección (Murphy, 2012).

La respuesta de un organismo contra ataques de microorganismos y agentes nocivos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra ataques externos y sus componentes están presentes incluso antes de que ocurra el daño o la infección, por lo que es capaz de responder rápidamente. Los principales componentes que conforman la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales, las células inmunes como los fagocitos, células dendríticas y otras células linfocíticas naturales, y las proteínas sanguíneas como las del sistema del complemento, así como mediadores inflamatorios (Abbas et al., 2015).

Esta primera respuesta es activada generalmente cuando los receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés) detectan la presencia de estructuras conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), los cuales se encuentran preservados en varios tipos de patógenos. De forma análoga, los patrones

moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés), que son ligandos endógenos, pueden activar a la respuesta inmune innata. Estas señales pueden generarse después de un daño como el ocurrido por isquemia, traumatismo o excitotoxicidad, e incluyen una gran gama de moléculas que pueden ser moléculas de adenosin trifosfato (ATP), ácidos nucleicos, proteínas de choque térmico, proteínas modificadas o mal plegadas, entre otros (Abbas et al., 2015).

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa depende de la exposición que sufre el organismo a agentes infecciosos, es decir, debe ser aprendida. Este tipo de inmunidad se caracteriza por la generación de respuestas específicas que dependen de que exista un contacto directo con el agente infeccioso, así como a la capacidad de responder más vigorosamente con cada infección sucesiva, lo que constituye la memoria inmunológica orquestada por los linfocitos (Abbas et al., 2015).

Ambos tipos de inmunidad no actúan independientes el uno del otro. La inmunidad innata es capaz de estimular las respuestas inmunitarias adaptativas y puede influir en ellas para hacerlas eficaces frente a diferentes tipos de microorganismos. De este modo, la inmunidad innata no solo realiza funciones defensivas al principio de la infección, sino que también proporciona señales de peligro que alertan al sistema inmunitario adaptativo para que responda. Además, diferentes componentes de la respuesta inmunitaria innata reaccionan a menudo de distintas formas a diferentes microorganismos y así influyen en el tipo de respuesta inmunitaria adaptativa que se desarrolla.

Para efectos de este trabajo nos enfocaremos principalmente en la respuesta innata y en específico en la inflamación.

Inflamación

La inflamación es una respuesta homeostática fisiológica del sistema inmune innato frente a agentes infecciosos y no infecciosos. Esta respuesta es fundamentalmente protectora y está diseñada para que un organismo elimine las causas de una lesión (invasores externos), así como las consecuencias de la misma (restos necróticos de células). La inflamación aguda es desencadenada para enfrentar a las infecciones y el daño tisular al promover la movilización e interacción de numerosos tipos

celulares y moléculas señalizadoras al sitio de lesión, los cuales producen una respuesta tanto local como sistémica (Lyman et al., 2014)(Medzhitov, 2021). Estos elementos pueden actuar tanto promoviendo procesos inflamatorios (proinflamatorios) así como limitándolos (antiinflamatorios). El inicio y resolución de la respuesta inflamatoria involucra la expresión compleja y coordinada de muchos factores, incluyendo citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), quimiocinas como interleucina 8 (también conocida como CXCL8), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (CCL3), factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteasas como la plasmina o las metaloproteinasas, productos de estrés oxidante como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, entre otros (Kumar et al., 2015)(Abbas et al., 2015).

El objetivo de esta respuesta localizada es el control y la eliminación del agente nocivo y la reparación del daño. Sin embargo, cuando el proceso inflamatorio no es controlado y se sostiene evoluciona a una fase crónica y puede amplificar el daño que le dio origen y expandirlo (Brüne et al., 2013)(Cervellati et al., 2020), lo cual puede llevar a estados que comprometan la homeostasis celular y estados patológicos que pueden ser más graves que el causante de la inflamación.

La respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central (SNC), conocida como neuroinflamación, juega un papel importante en el inicio y la progresión de distintas patologías neurológicas que pueden ser agudas como isquemia, hipoxia, traumatismo craneoencefálico, así como crónicas incluyendo las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, entre otras. Este proceso se caracteriza por la activación glial, cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que promueven la infiltración de células inmunes de la periferia al parénquima cerebral y la liberación de moléculas pro y antiinflamatorias (Shastri et al., 2013). La finalidad de este proceso consiste en eliminar a los estímulos nocivos y controlar el daño al tejido circundante, similar a lo que ocurre en la periferia. Sin embargo, cuando la neuroinflamación se presenta de forma crónica puede tener consecuencias indeseables para el SNC, provocando daño y muerte neuronal (González et al., 2014) .

La neuroinflamación está mediada por la producción de citocinas como IL-1 β , TNF- α , quimiocinas como CCL2, fractalkina (CX3CL1), especies reactivas de oxígeno (ERO) y mensajeros secundarios como prostaglandinas, óxido nítrico, etc. generados por las células de la glia residentes del SNC

(microglía y astrocitos), neuronas, oligodendrocitos, pericitos, células endoteliales y células inmunitarias derivadas de la periferia (Wohleb & Godbout, 2013). Estas respuestas neuroinflamatorias tienen consecuencias inmunitarias, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas. Además, el grado de neuroinflamación depende del contexto, la duración y el curso del estímulo o daño inicial (Figura 1) (DiSabato et al., 2016).

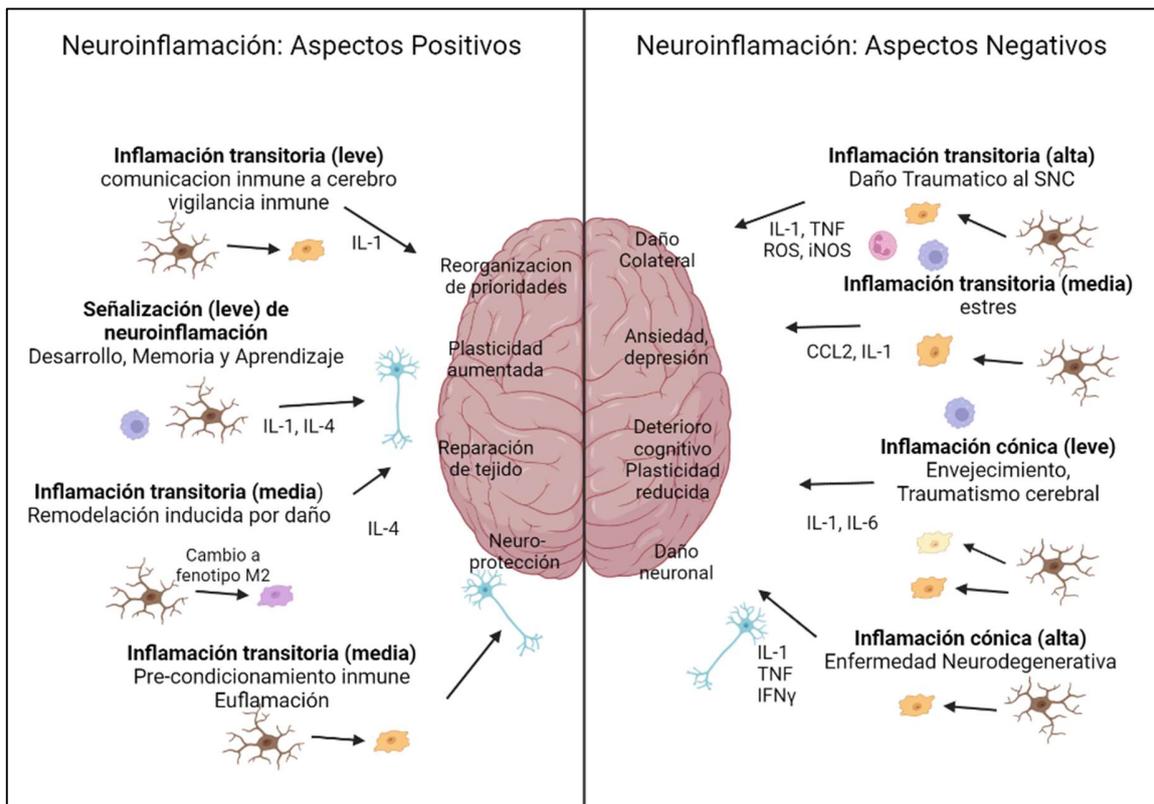


Figura 1. Aspectos positivos y negativos de la neuroinflamación. La intensidad y la duración de la inflamación explican en gran medida si las señales inmunitarias son de apoyo o destructivas para el sistema nervioso central. Modificada de DiSabato 2016.

Las células de la microglía son consideradas como los componentes principales del sistema inmune innato dentro del cerebro debido a sus funciones similares a los macrófagos, por lo que presentan un especial interés en la rama de la neuroinmunología.

Microglía

La microglía es el principal orquestador de la respuesta inmune dentro del SNC (Kreutzberg, 1996) y es considerado el principal tipo celular relacionado con el daño por inflamación, proceso esencial dentro de la respuesta inmune innata (Hanisch & Kettenmann, 2007). La microglía comparte funciones con los macrófagos de la periferia como reconocimiento de patrones, fagocitosis, autofagia y secreción de moléculas reguladoras (Troutman et al., 2021). Este tipo celular se origina a partir de las células troncales hematopoyéticas derivadas del saco vitelino que migran y colonizan el cerebro alrededor del día embrionario 9, en ratón (Ginhoux et al., 2010) (Kierdorf & Prinz, 2013). En el caso de los humanos, el origen de la microglía no ha sido estudiado ampliamente, pero la inmunotinción del encéfalo indican la presencia de células positivas a IBA1 en la semana gestacional 5.5, que se cree entran al cerebro por los ventrículos (Monier et al., 2006). Una vez que esta población se establece dentro del SNC, se mantiene a lo largo de la vida al proliferar cuando es necesario y no depende de precursores derivados de la medula espinal (Prinz & Priller, 2014).

La microglía representa aproximadamente el 10% de la población de células gliales en el cerebro (Lawson et al. 1990) y está encargada de monitorear los cambios en el microambiente, principalmente los asociados con daños o alguna patología (Kaur et al., 2010), detectando agentes tóxicos como LPS (lipopolisacárido) y señales celulares como citocinas, para posteriormente liberar moléculas mediadoras de inflamación como citocinas, quimiocinas y ERO (Qin et al., 2004). Por su capacidad fagocítica son considerados los macrófagos residentes del SNC, que pueden interactuar con el resto de las células inmunes que se infiltran en respuesta al daño y regularlas o ser reguladas por ellas (Carson, 2002). La microglía también puede participar en procesos fisiológicos del cerebro como en el desarrollo, controlando la proliferación y diferenciación celular y promoviendo la formación de conexiones sinápticas (Wolf et al., 2017) .

En condiciones fisiológicas se ha descrito que la microglía que se encuentra en un estado de reposo, caracterizado por una morfología ramificada, la cual le ayuda a monitorear el microambiente (Nimmerjahn et al., 2005). Cuando dichas condiciones cambian debido a la pérdida de la homeostasis o como resultado de alguna patología, la microglía presenta un proceso de activación que inicia cuando reconoce señales de alerta a través de los PRR. Estos receptores de membrana y

citosólicos interactúan con PAMPs, los cuales se encuentran presentes en diversos organismos, pero ausentes en el huésped y proporcionan señales exógenas que alertan al sistema inmunitario de la presencia de patógenos, promoviendo así la inmunidad (Tang et al., 2012).

Los receptores PRR también son capaces de reconocer DAMPs, que son expresados como señales endógenas de peligro, en condiciones de muerte celular no programada, en respuesta al estrés, etc. y de esta manera se desencadenan mecanismos de defensa celular (Rubartelli & Lotze, 2007). Algunas de estas moléculas son ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear o mitocondrial, histonas, proteínas de choque térmico (HSP por su nombre en inglés), ácido úrico etc. (Roh & Sohn, 2018).

La familia de los receptores tipo toll (TLR por sus siglas en inglés) es una clase importante de receptores de reconocimiento de patrones que participa tanto en respuestas inmunes innatas como adaptativas y son expresados constitutivamente por distintos tipos de células cerebrales, incluida la microglía (Fiebich et al., 2018). Para el caso de la microglía se sabe que estos receptores como el TLR2 o el TLR4 están vinculados con la activación de este tipo celular hacia un fenotipo proinflamatorio y altamente oxidante (García-Revilla et al., 2019) (Kumar, 2019) (Reed-Geaghan et al., 2009).

Posterior al reconocimiento de estas moléculas de daño, se activan diversas vías de señalización intracelulares que a su vez regulan factores de transcripción y la inducción subsecuente de genes que desencadenan una respuesta proinflamatoria, así como quimiocinas, proteasas y proteínas redox que ayudan a defender el tejido (Colton C., 2009). Por ejemplo, la activación de TLR4 es necesaria para preparar el ensamblaje del inflammasoma, el cual promueve la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18, contribuyendo a la respuesta inflamatoria (Singhal et al., 2014) (Hanamsagar et al., 2012).

El término “activación microglial” es utilizado para describir una gran variedad de respuestas funcionales y morfológicas de la microglía hacia diferentes factores desencadenantes, incluido el estrés, inflamación o afecciones neurodegenerativas crónicas (Dubbelaar et al., 2018). Esta activación le permite a la microglía eliminar patógenos y detritus celulares, así como realizar funciones de reparación del daño tisular mediante la liberación de factores tróficos y expresar diversas proteínas que le permiten llevar a cabo funciones distintas dependiendo del fenotipo de

activación que, a su vez, sirven como marcadores para identificar los fenotipos de activación (Perego et al., 2011). Por otro lado, esta activación puede tener efectos adversos al fagocitar neuronas vivas (Brown & Neher, 2014) o al liberar factores con acciones tóxicas como las ERO, el glutamato, las citocinas proinflamatorias, etc. (Lannes et al., 2017).

Cambios morfológicos de la microglía

En cuanto a su morfología, la microglía puede modificar la forma de sus procesos y soma en respuesta a diferentes estímulos, lo cual se relaciona con la diversa gama de funciones que presenta en estados tanto fisiológicos como patológicos. Inicialmente, el proceso de activación microglial fue descrito en 1919 por Pio del Rio-Hortega como una transición de una morfología ramificada en el estado de "reposo" a una morfología ameboide en el estado "activado"; sin embargo, estudios más recientes nos indican que los cambios son más complejos. Utilizando técnicas mínimamente invasivas se ha podido visualizar a la microglía en reposo y se ha evaluado que este tipo de células participan en procesos esenciales para la homeostasis sin perder su morfología ramificada (Nimmerjahn et al., 2005). Los estudios en tejido post mortem de humanos también han sido de utilidad para estudiar la función de la microglía en distintas patologías, tanto neurodegenerativas como psiquiátricas (Giordano et al., 2021). Así, nuestra comprensión de la fisiología microglial en relación con su morfología aún es limitada ya que no existe una clasificación estandarizada que nos permita describir estas características (Vidal-Itriago et al., 2022a).

Tomando en cuenta las anteriores consideraciones, la mayoría de los estudios utilizan el espectro ameboidal/ramificado para clasificar la morfología de las células microgliales y, en general, correlacionan directamente la apariencia fenotípica con la respuesta fisiológica. Varios estudios han identificado morfologías alternativas bordeadas por los estadios ameboide y ramificado, que dependen de la intensidad de la activación y la temporalidad del proceso inflamatorio (Jurga et al., 2020) (Vidal-Itriago et al., 2022a). Así, los parámetros morfométricos como la esfericidad, el volumen, el área del cuerpo celular, el número de procesos, la longitud de los procesos, etc. se han utilizado ampliamente en la evaluación de la morfología microglial. A continuación, presentamos algunos ejemplos de morfologías descritas (Figura 2, Tabla 1).

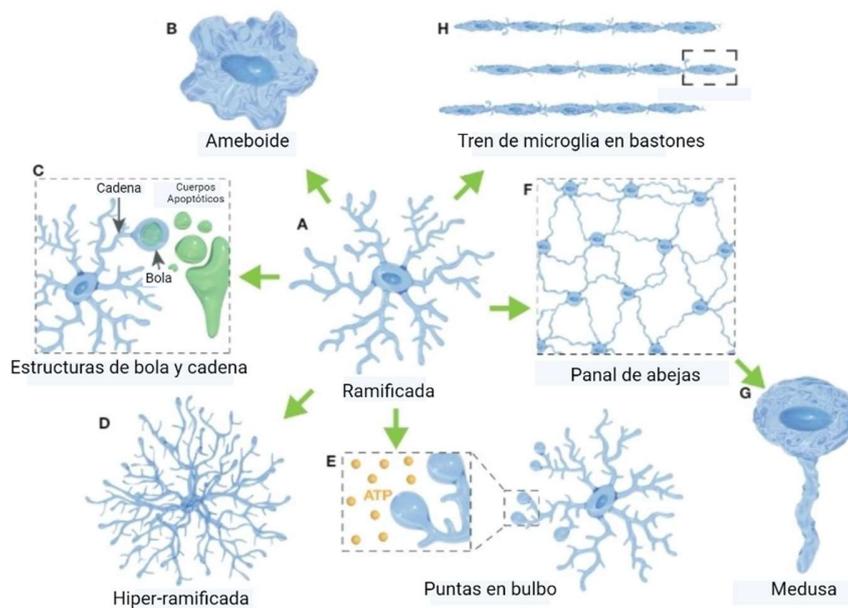


Figura 2. Diversidad en la morfología en microglía. Modificada de Vidal-Itriago et al. 2022.

Morfología	Característica
(A) Ramificada:	Anteriormente clasificada como estado inactivo, quiescente, vigilante. Con múltiples procesos primarios y secundarios. Vigilancia del parénquima cerebral y de la actividad neuronal. Neuroprotección durante excitotoxicidad.
(B) Ameboide:	Anteriormente clasificada como estado activo, asociada con la actividad fagocítica ameboidea. Se presenta con una morfología muy redondeada en comparación con sus estados ramificados (a menudo con una alta capacidad fagocítica y migratoria). En el cerebro sano se encarga de eliminar detritus celular y células apoptóticas.
(C) Estructuras en bola y Cadena:	Participa en la fagocitosis de células apoptóticas, precursores neurales y vainas de mielina. La microglía puede formar estructuras de bola y cadena en la punta de sus prolongaciones para fagocitar pequeñas cantidades de material (como sinapsis o cuerpos apoptóticos).
(D) Hiper-ramificada:	Se presenta en respuesta a estrés agudo y crónico, posiblemente participa en modificaciones sinápticas relacionadas a estrés. Presenta mayor ramificación de sus prolongaciones.
(E) Terminaciones bulbosas de procesos microgliales:	Presenta estructuras bulbosas en los ápices de los procesos, participa en la respuesta quimiotáctica La microglía muestra una gemación bulbosa al final de algunos de sus procesos (considerada importante para la detección de ATP).
(F) Panal de abeja:	Se presenta cuando hay fuga en la barrera hematoencefálica. Varias células microgliales forman una red que se asemeja a un panal.

(G) Medusa:	En respuesta a muerte astrocítica, se extiende un solo brazo sin ramificaciones, posee actividad fagocítica. La morfología de medusa se ha informado como una transición morfológica de la microglía en panal
(H) Microglia en bastón:	La microglía de bastón se caracteriza por un soma alargado y estrecho sin procesos planos que pueden formar trenes de bastoncillos de células microgliales (en respuesta a una lesión).

Tabla 1. Clasificación morfológica de la microglía. Modificada de Vidal-Itriago et al. 2022

Para poder realizar una amplia gama de funciones, la microglía debe ser capaz de detectar diferentes señales en su microambiente inmediato y adaptar su morfología a diferentes estímulos, mostrando una gran cantidad de formas celulares. Es importante destacar que estos estudios no encontraron una correlación clara entre el aumento de la expresión de marcadores pro o antiinflamatorios con los distintos tipos de morfologías. Esto sugiere que la microglía es capaz de modificar su morfología en respuesta a estímulos no relacionados con su activación o estado inmunológico (Vidal-Itriago et al., 2022a). La morfología de la microglia también depende inmensamente tanto del estado de activación como de su localización en el SNC (Jurga et al., 2020).

Al igual que para los macrófagos de la periferia, las funciones adquiridas por la microglía durante el proceso de activación podrían promover (fenotipo M1) o atenuar la respuesta inflamatoria (fenotipo M2) (J. Wang et al., 2023). Aunque aún no está completamente definido, el repertorio de fenotipos microgliales es probable que abarquen un espectro completo que va desde la activación al fenotipo de activación alternativa (Colton, 2009)(Boche et al., 2013). En la siguiente sección discutiremos estos fenotipos de activación más a detalle.

Fenotipos de activación

Las células de la microglía pueden presentar distintos fenotipos de activación dependiendo del estímulo que enfrenten y del microambiente en el que se encuentren. También son capaces de responder diferente al mismo estímulo dependiendo si es precedido por un estímulo diferente, lo que sugiere que el comportamiento de la microglía no está estereotipado y puede abarcar un gran espectro de respuestas (Franco & Fernández-Suárez, 2015)(Li et al., 2021)

Estos fenotipos pueden regular múltiples fases de la neuroinflamación como citotoxicidad, reparación, regeneración e inmunosupresión (Martinez et al., 2009). Históricamente se describieron dos fenotipos de activación principales denominados activación clásica (M1) y activación alternativa (M2) (Figura 3) (Hu et al., 2012; Perego et al., 2011). Posteriormente se agregaron dos fenotipos nuevos relacionados con el que era conocido como M2, denominados activación alternativa tipo II (M2b) o desactivación adquirida (M2c) (Walker & Lue, 2015). El descubrimiento de los diferentes subtipos microgliales estuvo acompañado por la identificación de una amplia variedad de marcadores fenotípicos para detectar los estados activados clásicos y alternativos. Estos marcadores incluyen citocinas, quimiocinas, receptores de superficie y enzimas metabólicas que están involucradas en las diferentes funciones y/o adquisición de los distintos fenotipos y contribuyen a los efectos proinflamatorios y antiinflamatorios de los fenotipos M1 y M2 respectivamente (Tabla 2) (Franco & Fernández-Suárez, 2015) (Jurga et al., 2020).

Fenotipo	Agente Inductor	Señalización	Marcadores	Enzimas	Citocinas	Quimiocinas
M1	IFN γ , LPS	STAT1	CD16, CD32	iNOS	Familia de IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF α , IFN γ	CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL9, CXCL10
M2	IL-4, IL-10, IL-13	STAT6	CD206, CD163	ARG1	Agonista del receptor IL-1 α , IL-4, TGF β , IL-10, IL-4	CCL2, CCL22, CCL17, CCL24

Tabla 2. Tabla comparativa entre los fenotipos de activación de la microglía (Jurga et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, la microglía puede presentar distintos fenotipos. La primera nomenclatura usada para denominar los fenotipos de activación para la microglía y los macrófagos, es análoga a la usada para los linfocitos cooperadores Th1 y Th2 (Dubbelaar et al., 2018). En la activación clásica M1, la microglía responde a factores proinflamatorios como LPS o IFN- γ y aumenta la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β y, a través de la activación de NOX, produce ERO. Este fenotipo podría ser responsable del daño al tejido por inflamación (Colton & Wilcock, 2010; Walker & Lue, 2015).

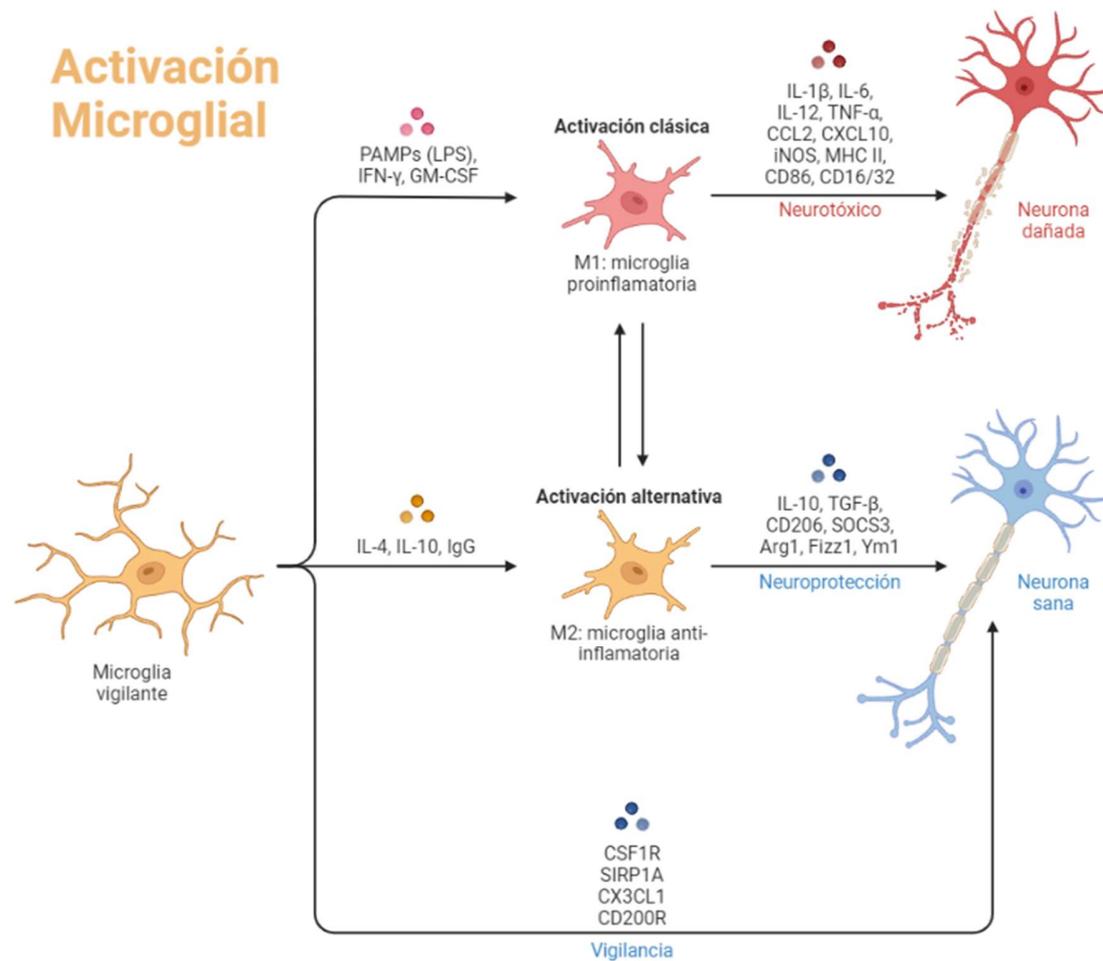


Figura 3. Fenotipos de activación de la microglía. Desde el estado de reposo, se ha descrito que la microglía puede emprender dos vías de activación, la clásica conocida como M1 o la alternativa conocida como M2. Imagen modificada desde BioRender.

En un principio, esta respuesta proinflamatoria aguda actúa como un mecanismo de "defensa y reparación", necesario en condiciones fisiológicas, la cual debe mantenerse bajo estrictos mecanismos de control que aseguran la desactivación de la microglía una vez que se ha completado su tarea. Por razones que aún no se comprenden del todo, la inflamación aguda a veces se convierte en un proceso tóxico autosostenible sin fin que daña el tejido en lugar de repararlo (Rodríguez-Gómez et al., 2020).

La activación alternativa de microglía/macrófagos fue sugerida cuando se descubrió que estas células presentaban estados funcionales alternados cuando eran inducidos por factores de linfocitos Th1 y Th2. La interleucina 4 (IL-4) producida por linfocitos T cooperadores lleva a una reducción de factores proinflamatorios y a la activación alternativa M2 (Stein et al., 1992)(Kisucká et al., 2021).

La activación alternativa se puede dividir en 4 subtipos que son inducidos por diferentes factores en el microambiente, principalmente las citocinas. El fenotipo M2a se caracteriza por la respuesta de las células a IL-4 o IL-13, un aumento en la fagocitosis y la producción de factores de crecimiento, así como de citocinas antiinflamatorias como IL-10. Este fenotipo podría estar relacionado con la eliminación del detrito celular y reparación de tejidos (Martinez & Gordon, 2014). La activación alternativa de tipo II o M2b se caracteriza por la unión de receptores FcγRs (CD16, CD32 o CD64) a complejos inmunes en células previamente estimuladas con LPS o IL-1β. En este fenotipo se disminuye la producción de IL-12 y se aumenta la IL-10 (Walker & Lue, 2015). La desactivación adquirida o M2c es inducida por IL-10 o glucocorticoides, llevando al aumento en la producción de TGF-β (Walker & Lue, 2015). Todos los fenotipos M2a, b y c se consideran células reparadoras antiinflamatorias. Estos subtipos generalmente se caracterizan por los bajos niveles de citocinas proinflamatorias como IL1, TNFα o IFNγ, con la excepción del fenotipo M2b, que produce altos niveles de citocinas proinflamatorias acompañados por alta expresión de IL-10 pero baja de IL-12. El cuarto subtipo es M2d el cual recluta de la activación de receptores de adenosina en células activadas del fenotipo M1 (Ferrante et al., 2013).

Normalmente la polarización hacia un fenotipo proinflamatorio de la microglía es seguida de una fase de reparación, caracterizada por la presencia de células de fenotipo M2 ya que la reparación y la resolución no resultan simplemente del decaimiento pasivo de las señales de inicio (Colton, 2009a; Rojo et al., 2014). Más recientemente se ha identificado la expresión de marcadores de los distintos fenotipos microgliales en varios modelos de patologías cerebrales (Murray et al., 2014) que permiten distinguir diferentes estados de reactividad mitocondrial, eliminando la clasificación de polarización M1 y M2., Así se ha propuesto el “concepto multidimensional” para explicar la activación microglial, que incorpora la ontogenia, señales del microambiente y señales de estrés para la clasificación de los estados de activación (Ginhoux et al., 2016).

Cuando la activación de la microglía no está regulada, ésta es capaz de inducir daño o incluso muerte neuronal, repercutiendo negativamente en la función residual subsecuente al evento nocivo. Existe controversia con respecto a la activación microglial ya que es capaz de producir factores citotóxicos como superóxido, óxido nítrico o TNF- α ; así como factores neurotróficos y antiinflamatorios. Diversos factores pueden influir en el perfil microglial que podría llevar a daño o neuroprotección (Block & Hong, 2005).

La producción de ERO por múltiples fuentes intracelulares es un factor común en condiciones proinflamatorias, se sabe que la activación de la microglía hacia el fenotipo proinflamatorio promueve el aumento en la producción de ERO provenientes de la mitocondria y de otras fuentes enzimáticas, mayoritariamente de las NADPH-oxidasas (NOX). Estas moléculas pueden tener efectos citotóxicos al promover vías de señalización proinflamatorias (Block et al., 2007; Qin et al., 2004), o tener propiedades inmunosupresoras induciendo a las células T reguladoras (Kraaij et al., 2013). Por otro lado, se sugiere que la actividad de la NOX podría estar modulando la polarización de la microglía entre los distintos fenotipos al regular factores de transcripción (Vilhardt et al., 2016).

ERO, NADPH Oxidasas y microglía

En el contexto biológico, las ERO pueden ser producidas por enzimas específicas, como en el caso de las NOX o como productos secundarios del metabolismo oxidante mitocondrial (Haslund-Vinding et al., 2016). Las NOX producen una gran cantidad de ERO que, además de participar en la instauración de estrés oxidante, podrían estar regulando otros procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con la respuesta al daño orquestada por la microglia. Estas enzimas se localizan en organelos membranales de todas las células del SNC (Massaad & Klann, 2011) y en el caso de la microglía son considerados los principales productores de ERO (Figura 4) (Rojo et al., 2014).

La familia de las NOX se compone de un grupo de siete proteínas homólogas siendo la NOX2 la más ampliamente distribuida y estudiada (Cross & Segal, 2004). Hasta el momento, la única función descrita de las NOX es la generación de ERO como producto principal, a diferencia de otros sistemas en los que las especies reactivas constituyen un producto secundario, estas enzimas pueden ser activadas por distintos factores como un aumento de calcio intracelular, la estimulación de diversos

receptores de patógenos o toxinas como el receptor TLR4, receptores acoplados a proteínas G y moléculas como la citocina TNF α , IL-1 β (Petry et al., 2010) (Brennan-Minnella et al., 2015).

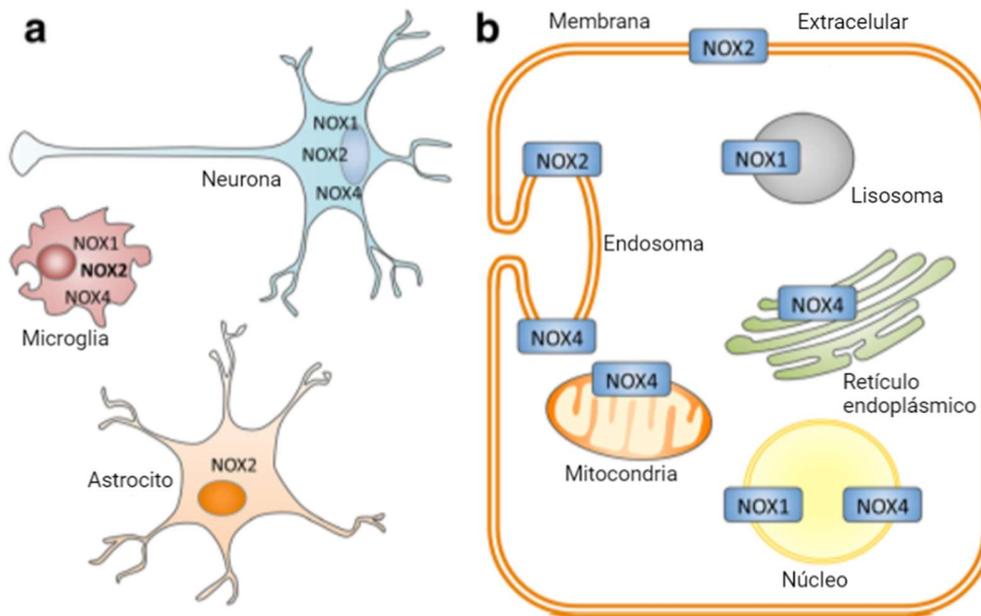


Figura 4. Localización celular y subcelular de las proteínas NOX en el cerebro. a Diagrama mostrando la localización reportada de las proteínas NOX en los tipos celulares del cerebro. b Diagrama mostrando la localización subcelular de las proteínas NOX en una célula hipotética del cerebro (imagen modificada de (Belarbi et al., 2017)).

Se sabe que las ERO producidas por NOX pueden ejercer severos efectos citotóxicos (Block et al., 2007; Qin et al., 2004), así como facilitar vías de señalización proinflamatoria al activar, por ejemplo, NF- κ B y promover la transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF α entre otros y la producción de otros mediadores inflamatorios como COX2 o el inflamasoma NLRP3 (Liu et al., 2017) por lo que se le considera importante en la patogenia de muchas enfermedades inflamatorias, incluidas la aterosclerosis, el asma, la artritis y las enfermedades neurodegenerativas (Bedard & Krause, 2007).

La NOX2 se encuentra expresada en distintas regiones del cerebro como la corteza, cerebelo, hipocampo, etc. (Sorce & Krause, 2009), así como en varios tipos celulares, altamente expresada en microglía, tanto en roedores como humanos (Sorce et al., 2012) y en menor medida en neuronas y astrocitos (Nayernia et al., 2014)(Gao et al., 2012). Bajo ciertas condiciones, la activación de la

NOX en la microglía puede ser dañina, tanto por la producción de ERO extracelular que puede afectar a las neuronas vecinas, como por la iniciación de mecanismos de señalización redox que amplifican la respuesta proinflamatoria, y de esta forma se mantiene a la microglía activada de forma crónica y se continúa con un estado neuroinflamatorio (Block et al., 2007; Qin et al., 2004).

Como ya se había mencionado antes, las NOX se localizan en organelos membranales pero su distribución tanto en tiempo como en espacio es de vital importancia para sus funciones biológicas. En macrófagos y microglía vigilantes o en reposo, NOX2 está presente en la membrana plasmática, pero cuando estas células se activan esta enzima se redistribuye por medio de endocitosis mediada por clatrina a un compartimento intracelular de almacenamiento formando vesículas (Ejlerskov et al., 2012).

La microglía, tanto en su estado activo como inactivo, expresan al complejo proteico NOX2 y su expresión aumenta posterior a la activación clásica (M1), sin embargo, su actividad enzimática no está activa a menos que reciba un estímulo (Brown & Vilalta, 2015; Qin et al., 2004). Por ejemplo, cuando el LPS se presenta a células del sistema inmune, éste las hace más receptivas a otros estímulos, fenómeno conocido como cebado o “priming”. El priming prepara a la NOX para su activación y posterior producción de ERO (DeLeo et al., 1998). En el SNC, la producción de ERO por la microglía es considerada una de las principales causas de daño e incluso muerte neuronal, por el daño oxidante directamente sobre las macromoléculas neuronales o el desajuste de la señalización redox dentro de las células (Block et al., 2007; Gao et al., 2012; Rojo et al., 2014).

Cuando la función de la NOX2 es inhibida, ya sea por los knock-out de sus subunidades o por el uso de inhibidores (apocinina, DPI) se promueve la polarización de la microglía hacia un fenotipo M2 y se reduce la producción de ERO y citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6 (Block M.L. 2008) (Choi et al., 2012). Por otro lado, se sabe que las citocinas antiinflamatorias con TGF- β e IL-10 pueden regular la actividad de NOX (Dang et al., 2006) (Qian et al., 2006).

Interesantemente, algunos receptores a neurotransmisores se encuentran presentes en la microglía como en el caso de los receptores de glutamato. Similar a lo ocurrido en las neuronas, la señalización de estos receptores puede llevar a la activación de NOX y producción de ERO (Mead, 2012). En modelos de daño excitotóxico que involucra al glutamato (isquemia, traumatismo encefálico) se ha

visto que una deficiencia o inhibición de NOX2 ocurre una marcada reducción en la producción en la reactividad microglial y en el volumen de la lesión resultante, lo que sugiere que las ERO producidas por la NOX2 juegan un papel fundamental en la respuesta de la microglía en eventos que cursan con procesos excitotóxicos (Guemez-Gamboa et al., 2011). El papel de la NOX en la respuesta excitotóxica podría estar mediada por la activación de receptores sinápticos a glutamato en neuronas y/o en la microglía.

Receptores glutamatérgicos

Cuando se presenta algún tipo de daño en el SNC, la pérdida de la regulación de las concentraciones extracelulares de glutamato puede llevar a una condición de excitotoxicidad y muerte neuronal en respuesta a la activación continua y sostenida de los receptores glutamatérgicos en neuronas y células gliales (Brown & Vilalta, 2015), lo que se observa en numerosas patologías incluyendo esquizofrenia, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, epilepsia, isquemia cerebral, etc. (Drouin-Ouellet et al., 2011). Es conocido que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC (Hermans & Challiss, 2001). Éste se libera a la hendidura sináptica para posteriormente unirse a receptores sinápticos, los cuales pueden ser de tipo ionotrópico (NMDA, AMPA y kaínico) o metabotrópico. Algunos de estos receptores, como los del tipo NMDA y, en menor grado, AMPA y kaínico permiten la entrada de Ca⁺⁺. Todos ellos son permeables a los iones sodio y participan en la señal excitadora de la neurona postsináptica (Kew & Kemp, 2005).

Por su parte, los receptores metabotrópicos (mGluRs) forman parte de la súper familia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores son proteínas de membrana que se activan por la unión de ligandos extracelulares y transducen señales al interior de la célula por medio de la interacción con proteínas G. Una proteína G está formada por tres subunidades (α , β y γ) las cuales pueden modular gran variedad de moléculas efectoras como enzimas, canales iónicos y factores de transcripción (Niswender & Conn, 2010).

Receptores de glutamato	Expresados en neuronas	Expresados en microglía
Receptores ionotrópicos	NMDAR	NMDAR
	Receptor de Kainato	Receptor de Kainato
	AMPA	AMPA
Receptores metabotrópicos	Grupo 1 (mGluR1 y mGluR5)	Grupo 1 (mGluR1 y mGluR5)
	Grupo 2 (mGluR2 y mGluR3)	Grupo 2 (mGluR2 y mGluR3)
	Grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8)	Grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR8)

Tabla 2. Expresión de los tipos de receptores de glutamato en neuronas y microglía. Modificada de Zhang X. et al 2020.

Debido a la amplia gama de moléculas efectoras, los mGluRs tienen una gran variedad de respuestas biológicas como la liberación de neurotransmisores, incluyendo el mismo glutamato, la regulación de factores de transcripción como CREB, NF- κ B (Wang & Zhuo, 2012) y la expresión y liberación de citocinas como IL-6, TNF- α (Aronica et al., 2005) (Taylor et al., 2005) (Loane et al., 2009). Los mGluRs se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y están localizados específicamente en sinapsis y sitios extra sinápticos en neuronas, así como en astrocitos y la microglía. Estos receptores se dividen en tres grupos dependiendo de la vía de señalización intracelular que activan (Bordi & Ugolini, 1999). Los receptores del grupo I (mGluR1 y mGluR5) se encuentra acoplado a proteínas G α q/ fosfolipasa C, las cuales al activarse causan un incremento de inositol trifosfato y diacil glicerol, también induce la liberación de calcio, y la activación de la proteína cinasa C (Byrnes, Loane, et al., 2009). En los grupos dos y tres se encuentran los receptores acoplados a proteínas Gi/o, las cuales regulan negativamente a la enzima adenilato ciclasa.

Receptores metabotrópicos glutamatérgicos en la microglía

Los receptores del grupo I normalmente están localizados en la postsinapsis y su activación puede llevar a la despolarización celular y al incremento de la excitabilidad neuronal, además de mediar la transmisión glutamatérgica. También pueden modular otros receptores de neurotransmisores incluidos los receptores a GABA o los receptores ionotrópicos de glutamato (Bordi & Ugolini, 1999) (Niswender & Conn, 2010)

A pesar de activar vías de señalización similares, los mGluRs del grupo I han mostrado tener distintas implicaciones para la viabilidad neuronal. La activación del mGluR1 aumenta la muerte neuronal

necrótica y promueve mecanismos inflamatorios (Allen et al., 2000; Pacheco et al., 2004), pero la activación de mGluR5 inhibe la muerte neuronal por apoptosis (Allen et al., 2000) y protege neuronas en modelos de daño al SNC (Bao et al., 2001; Chen, Cao, et al., 2012; Loane et al., 2013).

De entre los receptores glutamatérgicos, los receptores metabotrópicos parecen jugar un papel fundamental en la funcionalidad de la microglía. Diversos estudios tanto in vitro (Loane et al., 2009)(Byrnes, Stoica, Loane, et al., 2009) como in vivo (Byrnes et al., 2012; Byrnes, Loane, et al., 2009), demuestran que el receptor mGluR5 se encuentra expresado en microglia. Existe evidencia que señala a los mGluR5 como parte de mecanismos de neuroprotección en neuronas y microglia. En modelos experimentales de lesión, la expresión de este receptor se encuentra aumentada en la microglia que rodea el sitio de lesión (Byrnes et al., 2012; Drouin-Ouellet et al., 2011; Loane et al., 2013). Se sabe que la activación del mGluR5 disminuye la activación microglial y reduce la liberación de factores proinflamatorios (Byrnes et al., 2012; Byrnes, Loane, et al., 2009). Estos efectos protectores parecen estar mediados en parte por la inhibición de la actividad de NOX2, al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno. En cultivos de microglia deficientes de NOX2 (gp91phox^{-/-}) y cuando se usan siRNAs contra sus subunidades membranales, este efecto neuroprotector no se ve, lo que indica que se requiere que la enzima esté presente pero inhibida para ejercer el efecto protector (Loane et al., 2009, 2013; Loane, Kumar, et al., 2014).

En respuesta a un daño excitotóxico, aumenta la producción de mediadores inflamatorios y la activación de células gliales (astrocitos y microglia). Esto va aparejado con un aumento en la expresión de mGluR5 en la microglia (Drouin-Ouellet et al., 2011), lo que sugiere que este aumento forma parte de la respuesta reguladora del proceso inflamatorio. Estudios recientes resaltan la asociación entre la microglia y la excitotoxicidad por estimulación glutamatérgica. Como se dijo, la microglia presenta una alta expresión de mGluR3 y mGluR5 (Pocock & Kettenmann, 2007)(Berger et al., 2012) y en los últimos años se ha estudiado al receptor mGluR5 como blanco potencial para la modificación de la activación microglial con el objetivo de prevenir la muerte neuronal. En modelos experimentales de daño se ha demostrado que la activación farmacológica de mGluR5 reduce la activación microglial y promueve la supervivencia neuronal (Z. Zhang et al., 2015). En específico, para el daño ocasionado por una hemorragia subaracnoidea se encontró que la activación de mGluR5 mejoró la función neurológica y disminuyó el edema cerebral a las 24 h de iniciada la hemorragia. También se encontró una reducción tanto en la activación microglial así

como la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α . Además, se detectó una reducción en el número de neuronas apoptóticas (Z. Zhang et al., 2015).

Por otro lado, se ha encontrado una relación entre la activación de los receptores mGluR5 microgliales y las ERO y la actividad de NOX (Loane et al., 2009). El grupo de Chantong (Chantong et al., 2014) mostró que el bloqueo de los receptores mGluR5 induce una respuesta de estrés caracterizada por un incremento de ERO intracelular y mitocondrial, así como un aumento de marcadores inflamatorios como NOS inducible e IL-6. Se cree que los efectos benéficos de la activación glutamatérgica de los receptores metabotrópicos en la microglía son causados por una inhibición directa de NOX ya que un agonista selectivo de mGluR5 ((RS)-2-chloro-5-hydroxyphenylglycine) reduce la actividad de NF- κ B y la producción de nitrito en microglía estimulada con LPS, pero este efecto no se ve en cultivos deficientes de NOX2. En modelos experimentales de traumatismo a cerebro o médula espinal se ha visto que la administración de un agonista de mGluR5 (CHPG) ha resultado en el mejoramiento de la función motora, reducción en el volumen de lesión. Del mismo modo se notó una reducción en la activación crónica de la microglía y la expresión de NADPH oxidasas (Byrnes et al., 2009)(Loane et al., 2013).

Descripción del problema

Se sabe que los niveles extracelulares del glutamato pueden incrementarse en respuesta al daño neuronal primario. Además, se ha demostrado que la activación de algunos receptores glutamatérgicos metabotrópicos de la microglia/macrófagos podría modular la respuesta inflamatoria. También se ha demostrado que la activación de los receptores glutamatérgicos activa a la NOX y genera ERO en microglía y que estas ERO participan en la activación microglial. Se desconoce, sin embargo, qué efecto tiene la activación simultánea de todos los receptores glutamatérgicos microgliales, ionotrópicos y metabotrópicos, en el metabolismo de la microglía, específicamente en su viabilidad y activación. Tampoco se sabe la participación de las ERO y NOX en la viabilidad microglial en respuesta al glutamato y una condición de activación microglial. Es importante dilucidar la regulación diferencial de los receptores glutamatérgicos en la microglía como blanco terapéutico para proteger a las neuronas del daño inducido por la excitotoxicidad.

Justificación

El papel de los procesos inflamatorios dentro de la patogenia de las enfermedades neurológicas cada día toma mayor relevancia, por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares y celulares relacionados con el establecimiento y desarrollo de estas enfermedades podrían ayudar a mejorar los tratamientos actuales.

Hipótesis

El glutamato regula la activación de la microglía sin afectar su viabilidad de forma dependiente de las ERO producidas por NOX2.

Objetivo general

Determinar la participación de los receptores glutamatérgicos en la activación microglial evaluada morfológicamente y explorar la participación de NOX2 en el metabolismo microglial

Objetivos particulares

- Establecer un cultivo primario de las células de microglía (ratas cepa Wistar, edad postnatal 0-2 días).
- Determinar la concentración de LPS y tiempo de estímulo adecuados para la activación de las células (morfología)
- Evaluar la viabilidad de las células de microglía en respuesta a su activación por LPS y su regulación por glutamato en un curso temporal (MTT, calceína /IP)
- Evaluar el papel de NOX y las ERO en la viabilidad de la microglía en condiciones de activación por LPS y tratadas con glutamato
- Evaluar el efecto del glutamato en la activación de la microglía

Materiales y Métodos

Animales

Los animales fueron manejados de acuerdo con los estándares de los Institutos Nacionales de Salud, guía de cuidado y uso de animales de laboratorio. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo JMA199-22). Se usaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de cero a dos días postnatal para el cultivo de microglía y de 8 días postnatal para los cultivos mixtos. La colonia de animales se estableció en el vivario del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron bajo temperatura controlada (20°C – 22°C) con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h.

Cultivo mixto de células granulares de cerebelo

Se prepararon cultivos celulares a partir de ratas Wistar del día 8 postnatal. Posterior a la eutanasia por sección cervical, se disecó el cerebelo para subsecuentemente disociar el tejido y aislar las células, las cuales fueron cultivadas como se describió anteriormente (Morán y Patel, 1989). Las células se sembraron a placa multipozos pretratada durante 24 h con poli-L-lisina (5µg/ml) y fueron dispuestas en medio basal Eagle suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (inactivado por efecto del calor), 25mM de KCl, 2mM de glutamina, 50µg/ml de estreptomicina y 50U/ml de penicilina. Los cultivos fueron mantenidos en incubación durante 7 días in vitro (DIV) a una temperatura constante de 37°C y una atmósfera humidificada de aire al 95% y CO₂ al 5%. De esta manera obtenemos cultivos mixtos. Con el objetivo de inhibir la proliferación de células gliales para obtener únicamente neuronas, se adicionó citosina arabinosa (10µM) 24 h después del sembrado celular, la cual actúa promoviendo la muerte de células gliales en proliferación celular al ser un inhibidor de la síntesis del DNA (Negishi et al, 2003). Dichos cultivos neuronales poseen más del 90% de pureza (Morán y Patel, 1989). Para los pozos seleccionados de células gliales no se les agregó citosina arabinosa.

Cultivo primario de microglía de cerebro completo

Este protocolo fue amablemente proporcionado por la doctora Leonor Pérez del IBT (Instituto de Biotecnología) y modificado para ser empleado usando ratas. Los cultivos mixtos gliales se prepararon a partir de ratas de la estirpe Wistar de cero a 2 días postnatal. Los animales fueron lavados con etanol 70% y posteriormente decapitados. Las cabezas fueron colocadas en una caja de Petri de 60 mm. Se realizó un corte por la línea media del cráneo desde la base de la cabeza hasta el punto entre los ojos y se retiraron los pedazos del cráneo para exponer al cerebro. Se removió el cerebro con cuidado con ayuda de una espátula y se colocó sobre papel filtro estéril. Se eliminaron las meninges por rodamiento. Posteriormente, los cerebros se colocaron en tubos cónicos de 50 ml con 10 mL de solución Hank's y se centrifugaron a 1200 rpm por 3 min. El sobrenadante fue descartado y se le realizaron dos lavados al pellet con solución Hank's. Los cerebros fueron colocados en una caja de Petri de 60 mm con 1 ml de solución de digestión (precalentada 15 min a 37°C).

Utilizando una navaja, se realizaron cortes finos al tejido para su homogenización y se transfirió con una pipeta a un tubo que contenía solución de digestión (250 µL por cerebro). El tejido se incubó por 30 min a 37 °C y se agitó manualmente cada 5 min por 10 s. Para inactivar la acción de la tripsina se adicionó medio completo (DMEM/F12, 10% suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina-streptomina, 1% glutamina), en una proporción de 1:1 con la solución de digestión, así como 200 µl de DNasa por mililitro de medio completo y se incubó por 5 min a 37°C. El tejido se centrifugó a 1200 rpm por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en medio completo. Para ayudar a la desintegración del tejido, éste se pasó a través de pipetas Pasteur de distintos diámetros de apertura. Finalmente, el homogenado fue filtrado a través de una malla de 70 µm y posteriormente centrifugado a 1200 rpm por 5 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en medio completo.

La suspensión celular resultante fue sembrada en cajas de Petri (2 cerebros por caja) con medio completo e incubada por 24 h a 37°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS dos veces y se les agregó medio de mantenimiento (DMEM/F12, 2% suero fetal bovino (SFB), 1 % penicilina-estreptomina, 1 % glutamina). Este medio se utiliza para evitar la proliferación de los astrocitos. Los cambios de medio se realizaron cada 3 días. Al octavo día, las células se lavaron dos veces con PBS y después se incubaron con tripsina por 5 min a 37°C. Para inactivar la acción de la tripsina se agregó medio de mantenimiento en una proporción de 1:1. La suspensión celular fue colectada y

las células remanentes fueron despegadas con un gendarme. La suspensión celular fue centrifugada a 1200 rpm por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en medio de mantenimiento. Las células fueron contadas usando una cámara de Neubauer y se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos y 1×10^6 células por caja de 35mm.

Análisis por inmunofluorescencia

Para evaluar la activación microglial se realizó una inmunocitoquímica seguida de análisis de imagen para visualizar la morfología de las células posterior a la exposición a los distintos tratamientos. Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo y se incubaron por 24 h a 37°C con 5 % CO₂. Las placas fueron pretratadas con poly-L-lisina. Antes de empezar la inmunofluorescencia se le cambio el medio a las células por medio sin suero para promover su precipitación. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol frío por 20 min. Se realizaron dos lavados con PBS y las células se bloquearon (PBS con 2 % suero de cabra y 0.3 % triton X-100) a temperatura ambiente por 1 h. Después de tres lavados con PBS, este medio se sustituyó por solución de bloqueo con los anticuerpos primarios (monoclonal anti-CD11b/c (5-10ug/mL), polyclonal anti-Iba1 (1:400; Wako, Osaka, Japan), monoclonal anti-NeuN (1:500; Chemicon), GFAP (1:1000; Dako, Glostrup, Denmark)) dejándolo incubar durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios fueron detectados por medio de anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit (1:500) o Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1:500) incubados por 1hr en obscuridad a temperatura ambiente. Concluido el tiempo se realizaron dos lavados con PBS y se agregaron 200 µl de Hoescht por pozo por 10 min y esta solución se eliminó y sustituyó por PBS. Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos con medio para montar y después de dejar secar por 24 h, las células se visualizaron con un microscopio (Nikon ECLIPSE Ti) con filtros para detección de fluorescencia.

Viabilidad

Los cultivos se incubaron con 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) por 15 min. Posteriormente se eliminó el medio y se incubó a temperatura ambiente por 20 min con dimethyl sulfoxide (DMSO) para solubilizar el formazán producido como resultado de la reducción del MTT. Esta reacción se lleva a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa, por lo que la

velocidad de la reacción indica el grado de actividad mitocondrial e indirectamente la viabilidad celular (Bahuguna et al. 2017). La reacción produce un aumento colorimétrico que es directamente proporcional a la viabilidad celular, la cual se expresa como la diferencia entre la absorbancia de la solución medida a 570 y 630 nm y se reporta como porcentaje con respecto al control.

Adicionalmente se empleó el marcaje con calceína AM e yoduro de propidio; el primero es un compuesto que emite fluorescencia al interactuar con las esterasas de células vivas, lo que también le impide salir de la célula (Bratosin et al 2005), mientras que el segundo es un marcador de daño celular, el cual produce fluorescencia al ingresar a la célula e intercalarse con ácidos nucleicos, debido a la pérdida de la integridad de la membrana (Rieger et al 2011). Se tomaron fotografías de tres campos por cada condición con un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE Ti) con filtros para detección de fluorescencia, utilizando el objetivo 20x. Los resultados de la cuantificación se expresan como porcentaje de las células metabólicamente activas (positivas a calceína AM) respecto al total de células.

Análisis de la morfología microglial

Se cuantificaron manualmente a las células usando el software Image J (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos), tomando tres campos distintos por condición. Nos basamos en la clasificación morfológica tomada de Vidal-Itriago (Vidal-Itriago et al., 2022b).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados y graficados con el paquete estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) para Windows y se expresaron como la media estadística \pm desviación estándar (SD). La significancia estadística se determinó a partir de un análisis de varianza (ANOVA de dos vías), seguida por una prueba post hoc de Turkey, para la comparación múltiple entre las muestras control y los diferentes tratamientos y tiempos de tratamiento. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos con valor de $p < 0.05$.

Resultados

Cultivos de microglía

Como primera aproximación, se establecieron cultivos mixtos de células granulares de cerebelo con el fin de observar por inmunocitoquímica la morfología presentada en los diversos tipos celulares utilizando los anticuerpos específicos para neuronas (NeuN), astrocitos (GFAP) y microglía (Iba1) para poder compararlos y determinar si nuestros cultivos de microglía presentaban algún otro tipo celular. Los astrocitos que visualizamos presentan una morfología con proyecciones largas que se extienden a células vecinas (Figura 5 A). Por su parte, las neuronas muestran cuerpos celulares compactos y pocas prolongaciones (Figura 5 A y B). En el caso de la microglía observamos que las células presentan un cuerpo celular pequeño con pocas prolongaciones, similar a lo que se conoce como fenotipo activado (Figura 5 B). Podemos apreciar en estos cultivos mixtos que la microglía es la población con menor proporción, como ha sido reportado desde la caracterización de este tipo celular.

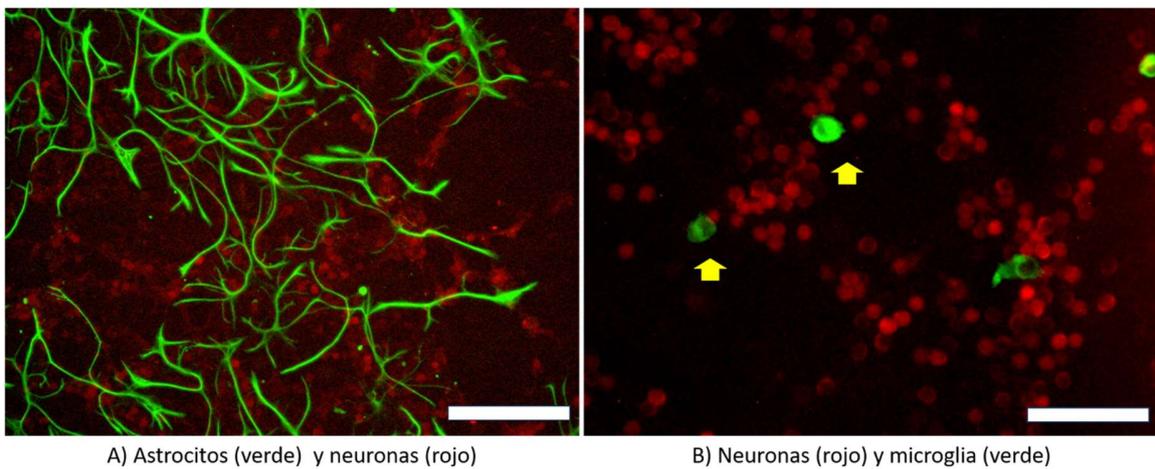


Figura 5. Imágenes representativas de los cultivos mixtos de células granulares de cerebelo: co-inmunotinciones de astrocitos con neuronas (A) y de microglía (marcadas con flechas amarillas) con neuronas (B). NeuN (1:500), GFAP (1:1000), Iba1 (1:500), Rabbit Alexa 488 (1:500), Mouse Alexa 594 (1:500). Barra de escala 100 µm.

Una vez identificados los tipos celulares en los distintos cultivos, aislamos las células de microglía para obtener cultivos enriquecidos en microglía utilizando el procedimiento que se describe en Métodos. Para identificar estas células en los cultivos se probaron diversas concentraciones de anticuerpo CD11b/c (Abcam). La Figura 6 muestra que prácticamente todas las células resultaron

positivas a CD11b/c, por lo que concluimos que el protocolo empleado permite aislar eficientemente a la microglía de los demás tipos celulares.

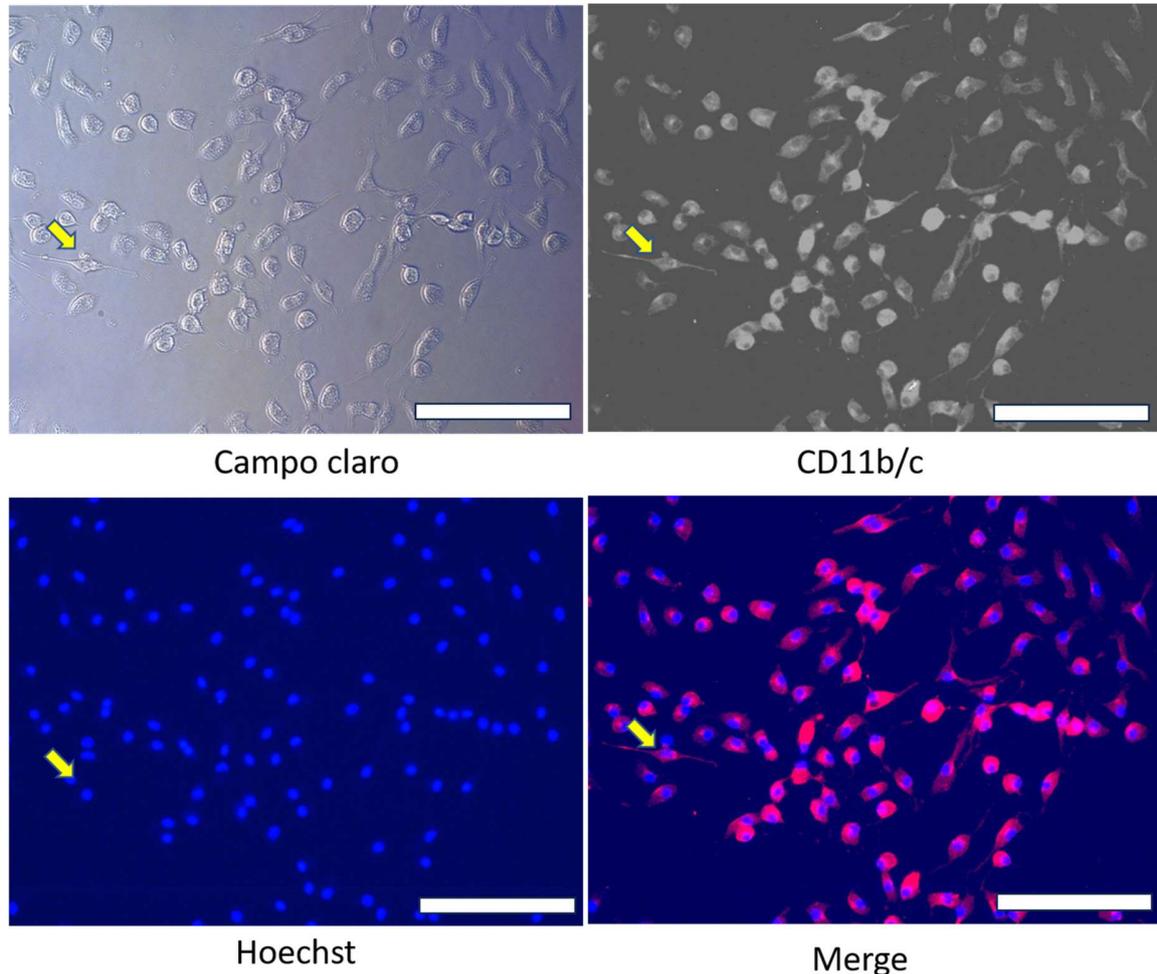


Figura 6. Caracterización por inmunocitoquímica del cultivo primario de microglía. Anticuerpo primario CD11b/c utilizado a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anticuerpo secundario Mouse Alexa 594 (1:500). La flecha muestra una célula elegida al azar en los distintos campos. Barra de escala 100 μm .

Efecto del LPS en la viabilidad de las células de microglía

El LPS es un componente de las membranas bacterianas que promueve un fenotipo proinflamatorio y citotóxico en las células de la microglía (Butovsky et al., 2005). El tratamiento con LPS es un procedimiento ampliamente utilizado para activar la microglía (Olajide et al., 2013). En este estudio, una vez establecidas las condiciones del cultivo, evaluamos la concentración de LPS que se

emplearía para activar a las células microgliales. Para ello se trataron las células con distintas concentraciones de LPS (10, 25, 50 y 100 ng/mL) durante 8 h y se evaluó la viabilidad de éstas por el ensayo de MTT.

Bajo estas condiciones notamos que la viabilidad de las células no disminuyó con ninguna de las concentraciones de LPS empleadas (Figura 7). De acuerdo a otros reportes, se decidió utilizar la mayor concentración de LPS. Hay que recalcar que el MTT mide la actividad metabólica de las células, lo cual sugiere que posiblemente las células se están activando por el LPS.

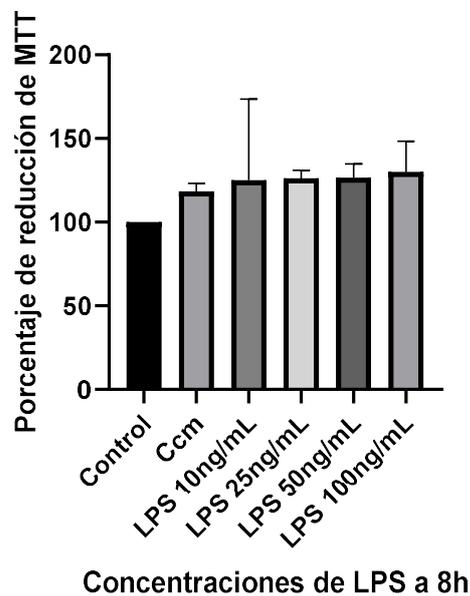


Figura 7. Estimulación del cultivo primario de microglía con distintas concentraciones de LPS. Gráfica del porcentaje de reducción de MTT en cultivo primario de microglía posterior a la estimulación con distintas concentraciones de LPS y evaluadas a las 8 h, n=2, Ccm: control cambio de medio. No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Por otro lado, determinamos la viabilidad de las células microgliales, por medio de MTT y calceína/ioduro de propidio, que fueron tratadas con la concentración de LPS anteriormente elegida (100ng/mL) en un curso temporal de 1 ,2 ,4, 6, 8 y 24 h. Las Figuras 8 y 9 muestra que, bajo estas condiciones, no hubo diferencias significativas en la viabilidad de las células a ninguno de los tiempos evaluados.

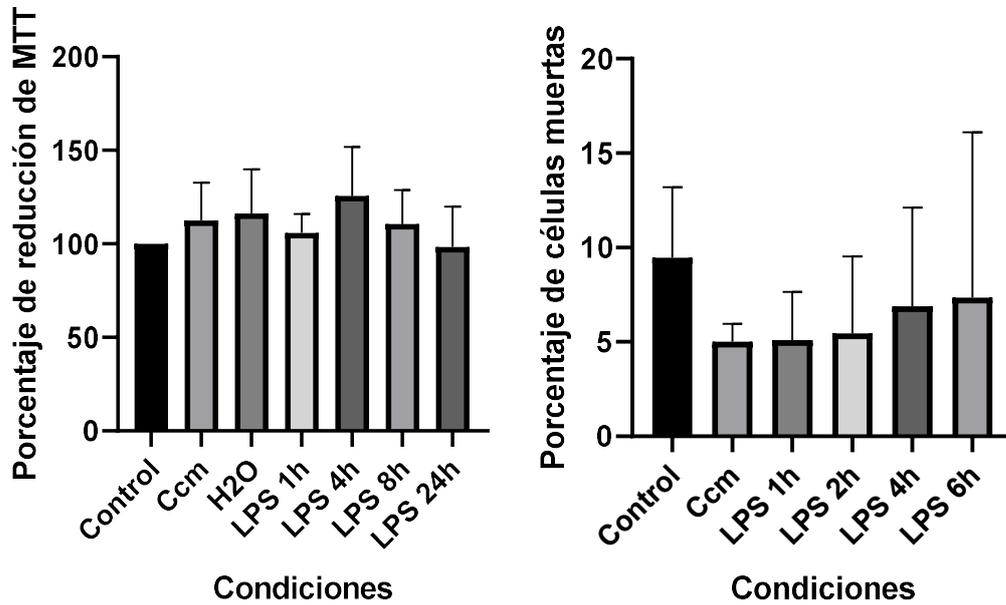


Figura 8. Viabilidad del cultivo primario de microglía posterior a la estimulación con LPS 100ng/mL. Gráficas del porcentaje de reducción de MTT y porcentaje de células muertas (por calceína/ioduro de propidio) en cultivo primario de microglía posterior a la estimulación con LPS 100ng/mL a distintos tiempos (1, 2, 4, 6, 8, 24 h) n=4, Ccm: control cambio de medio, H2O: agua. No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

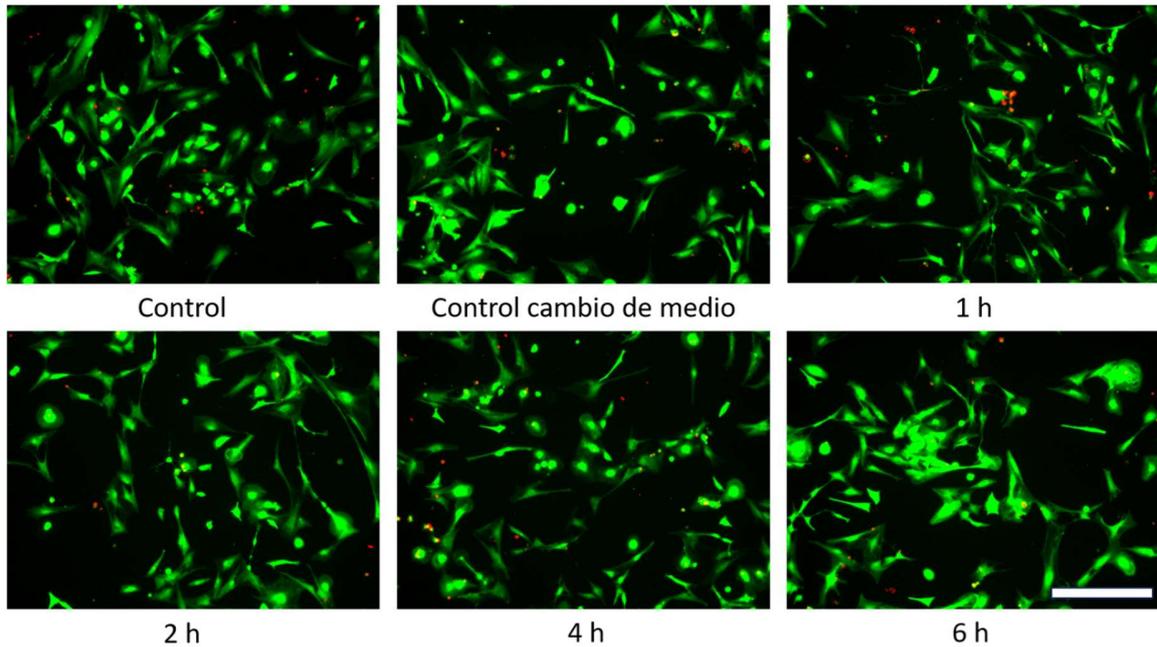


Figura 9. Imágenes representativas de las células posterior a la estimulación con LPS (100 ng/mL). La calceína (verde) es un compuesto que emite fluorescencia al interactuar con las esterasas de las células vivas, mientras que el ioduro de propidio (rojo) se intercala a los ácidos nucleicos dentro de las células dañadas ya que en éstas se ha perdido la integridad de la membrana. Barra de escala 100 μm .

Realizamos un acercamiento preliminar para observar la morfología de la microglía, iniciando con una estimulación con 100ng/mL de LPS por 6 h (Figura 10). Durante este ensayo observamos la morfología descrita en trabajos previos del laboratorio por lo que decidimos evaluar a las células a

distintos tiempos para ver si su morfología presentaba cambios a lo largo del tiempo.

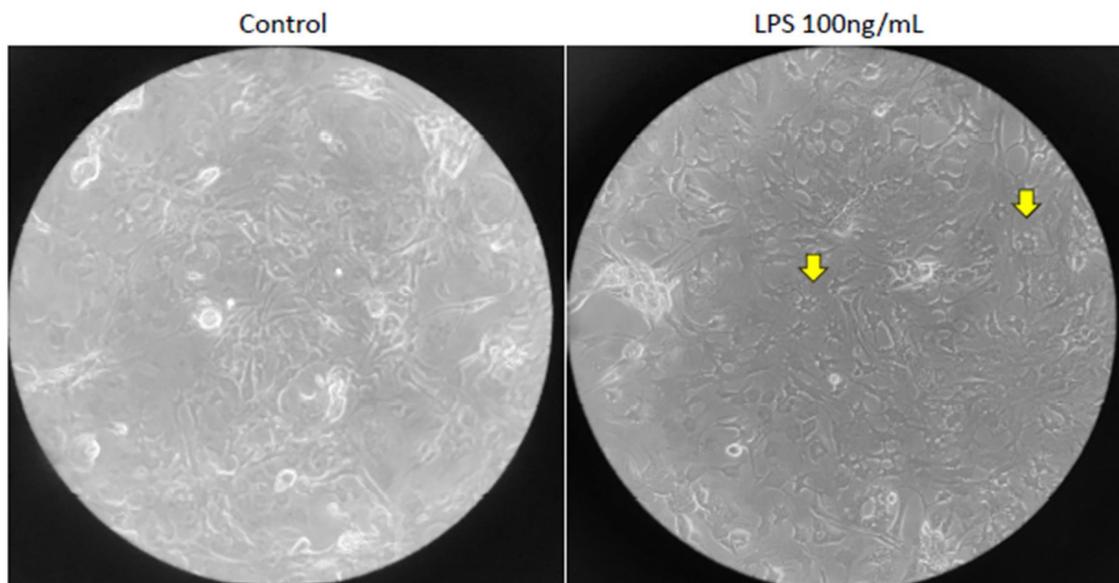


Figura 10. Imagen representativa del cultivo primario de microglía posterior a la estimulación con LPS (100 ng/mL) por 6 h. Podemos notar la presencia de células (marcadas con flechas amarillas) que muestran una reducción del soma y un aumento en el número de ramificaciones.

Para determinar si ocurre una activación de la microglía, evaluamos los cambios morfológicos inducidos por LPS 100ng/mL en un curso temporal (1, 2, 4, 6 y 24 h). La Figura 11 muestra de forma global la presencia de células “ramificadas” y células con cuyas proyecciones se notan acortadas (células “ameboides”). Podemos observar que LPS es capaz de inducir cambios morfológicos en nuestro cultivo primario de microglía presentando una tendencia a aumentar el porcentaje de células ameboides, incluso a tiempos cortos, lo que nos podría sugerir que la microglía se está activando.

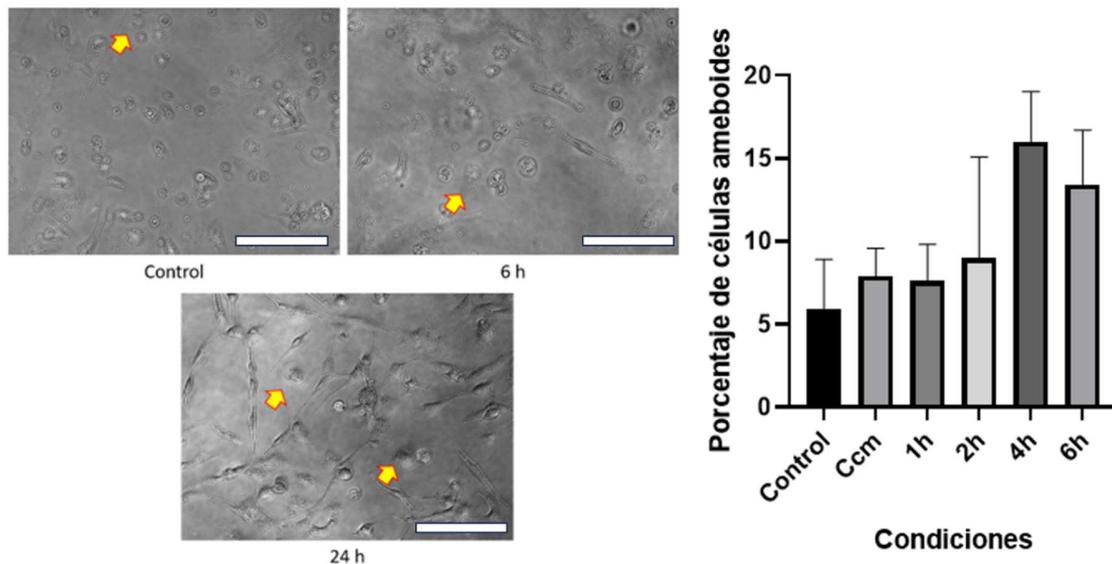


Figura 11. Imágenes representativas de la activación de microglía usando 100 ng/mL de LPS, en curso temporal (1, 2, 4, 6 y 24 h). Marcadas con flechas amarillas elegimos células al azar dentro de los campos que presentaban una reducción del soma (células ameboides). Gráfica del porcentaje de células activadas del total de células $n=3$. Ccm: control cambio de medio. Barra de escala 100 μm . No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Para corroborar este cambio en la morfología posterior a la estimulación con LPS y visualizar con más detalle los cuerpos celulares decidimos utilizar el protocolo de calceína y realizamos una cuantificación de las distintas morfologías observadas (Vidal-Itriago et al., 2022a). Utilizando este protocolo notamos un cambio marcado en el porcentaje de células con morfología ameboides (Figura 8). Esto se observó, incluso en los controles, lo que sugiere que el protocolo de la calceína tuvo un efecto per se en todas las células. La Figura 12 muestra que durante la primera hora de tratamiento con LPS notamos un aumento en el porcentaje de microglía en forma de bastón, caracterizada por presentar un soma alargado y estrecho. Desafortunadamente no pudimos encontrar todos los tipos descritos. Como se mencionó anteriormente, encontramos mayoritariamente microglía ameboides en todas las condiciones evaluadas, incluso en los controles.

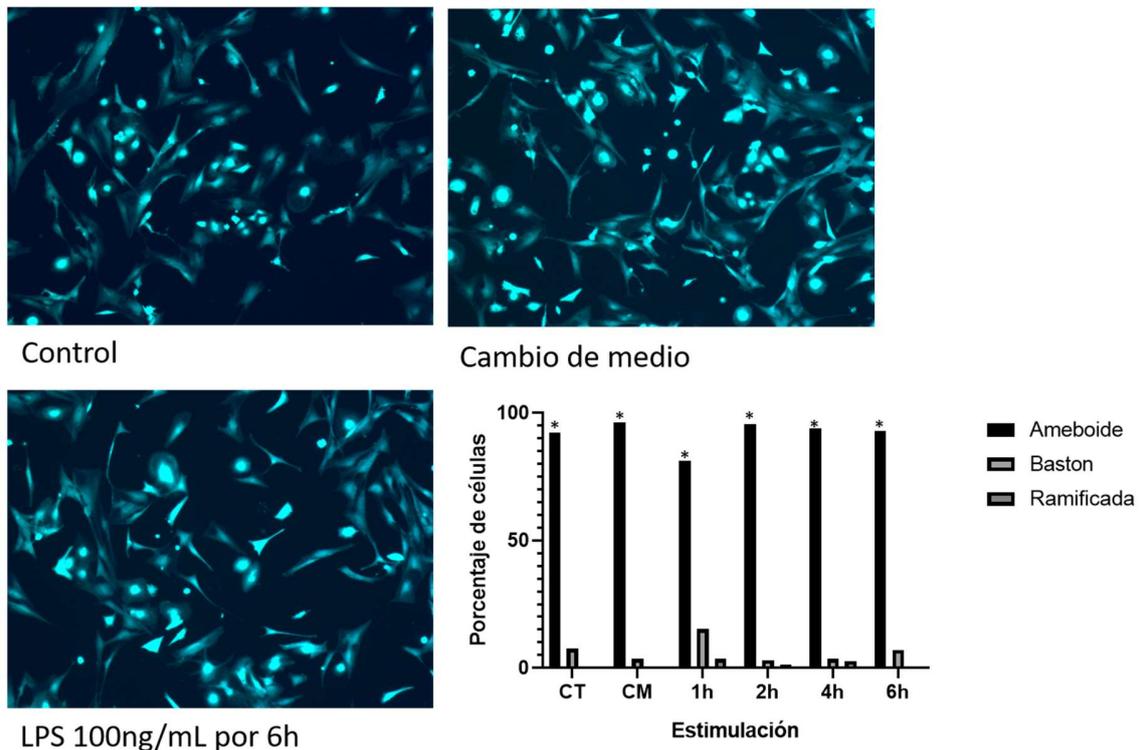


Figura 12. Morfología de las células posterior a la estimulación con LPS. Los cultivos de microglía fueron estimulados con LPS 100ng/mL por un curso temporal de 1, 2, 4 y 6 h y posteriormente se tiñeron con calceína de acuerdo con lo indicado en métodos. Se muestran imágenes representativas de las células a 6 h de la estimulación y la cuantificación durante el curso temporal, n=3. CT: control, CM: cambio de medio. Barra de escala 100 μ m. *P<0.0001

Por otro lado, evaluamos la viabilidad de las células de microglía en respuesta a diferentes concentraciones de glutamato, así como la participación de la NOX en la activación de la microglía por glutamato. La viabilidad se midió por medio de ensayos de MTT. Se emplearon las concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 2mM de glutamato, así como de 0.1, 0.5, 1 y 5 μ M de DPI, un inhibidor de la NOX. El tratamiento con glutamato fue de 8 h y todos los tratamientos se colocaron al mismo tiempo. La Figura 13 muestra que el glutamato (0.25 mM) produjo un incremento en la reducción del MTT. Otras concentraciones no modificaron la actividad metabólica. Por otra parte, observamos que los tratamientos con un inhibidor de NOX, el DPI, desde la segunda hora de tratamiento fueron muy agresivos, ya que se desde ese tiempo se detectaron células muertas. Por esa razón se decidió no usar más este inhibidor.

Como alternativa al uso de DPI decidimos probar los inhibidores apocinina y AEBSF en distintas concentraciones (200, 400, 800 y 1200 μM para apocinina; y 10, 50, 100 y 200 μM de AEBSF) por 4 h. Bajo estas condiciones no se detectaron cambios en la viabilidad de las células con ninguno de estos tratamientos (Figura 14).

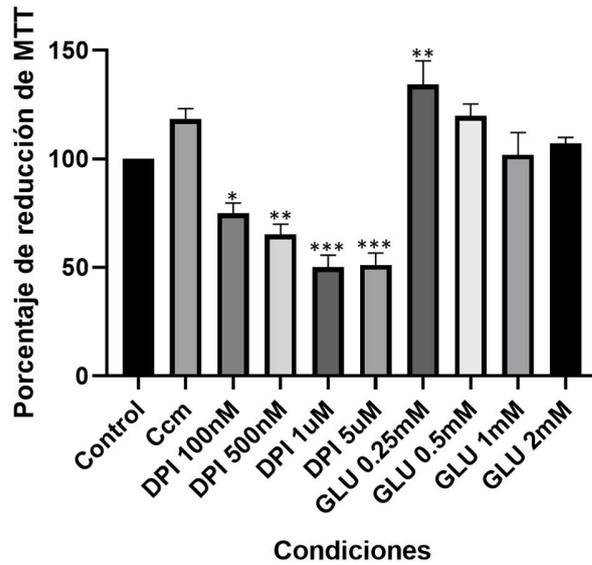


Figura 13. Gráfica de porcentaje de reducción de MTT en cultivo primario de microglía posterior a la estimulación por 8 h con diversas concentraciones de glutamato o DPI (inhibidor de NOX). N=2 Comparados con el control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Ccm= control cambio de medio

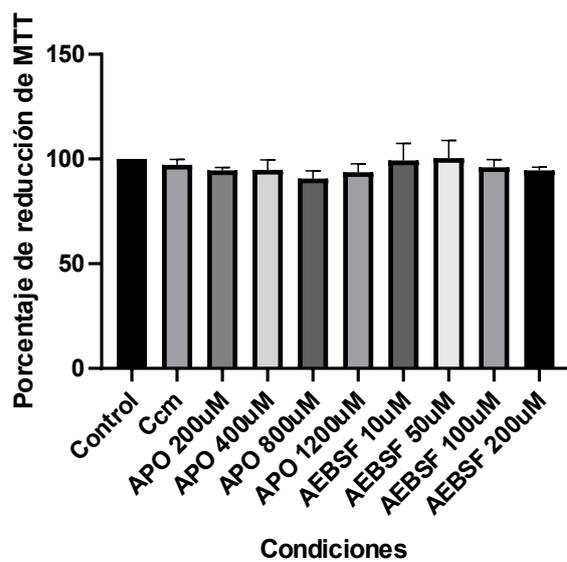
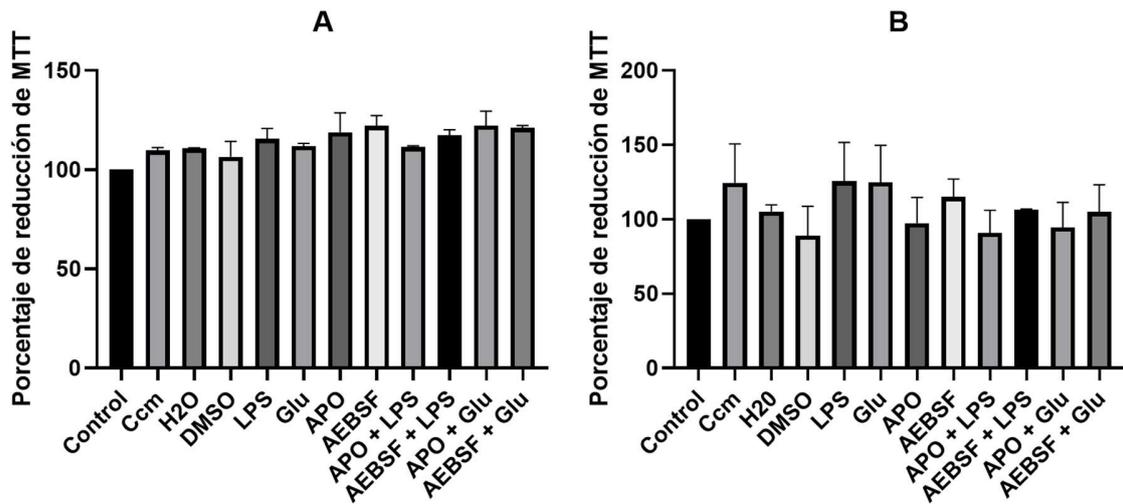


Figura 14. Viabilidad celular en cultivos primarios de microglía posterior a la estimulación por 4 h con diferentes concentraciones de apocinina y AEBSF (inhibidores de NOX). La viabilidad se midió como reducción de MTT. n= 2. Ccm: control cambio medio. No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Para confirmar los resultados anteriores, se probaron las mayores concentraciones tanto de LPS 100ng/mL como de GLU 2mM, así como de los inhibidores de NOX (APO 1200 μ M, AEBSF 200 μ M), para evaluar la viabilidad de los cultivos y posteriormente elegir la concentración ideal para realizar la evaluación de la activación microglial. En estos ensayos los inhibidores se incubaron 30 min antes que los tratamientos con LPS o glutamato a distintos tiempos (Figura 15). No se encontraron disminuciones significativas en la viabilidad de las células bajo estas condiciones sin embargo notamos una ligera disminución a las 4 h con los tratamientos de apocinina y el control de vehículo DMSO.



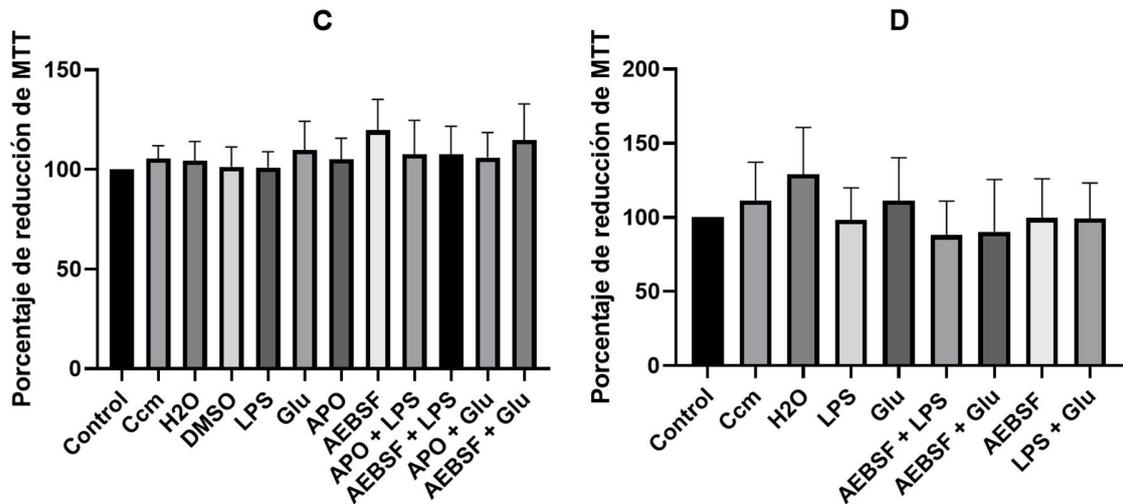


Figura 15. Gráficas de reducción de MTT para la estimulación de microglía y tratamiento con inhibidores de NOX. En estos ensayos los inhibidores (APO 1200mM, AEBSF 200mM) se incubaron 30 min antes que los tratamientos con LPS (100ng/mL) o glutamato (2mM) a distintos tiempos A) tratamiento por 1 h n= 2, B) tratamiento por 4 h n=3, C) tratamiento por 8 h n=4 y D) tratamiento por 24 h n=8, Ccm: control cambio de medio, H2O: agua. No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad por MTT a las 4 h (Figura 14, B) se realizó un ensayo de calceína/ioduro de propidio, en el cual incubamos a las células por 30 min con los inhibidores de NOX y posteriormente se trataron con glutamato o LPS por 4 h para visualizar a las células muertas de las células vivas (Figura 16). En este ensayo pudimos identificar una gran cantidad de células muertas en los tratamientos con DMSO, APO+LPS y APO+Glu. El vehículo utilizado para administrar la apocinina es DMSO por lo que se decidió no continuar usando este inhibidor.

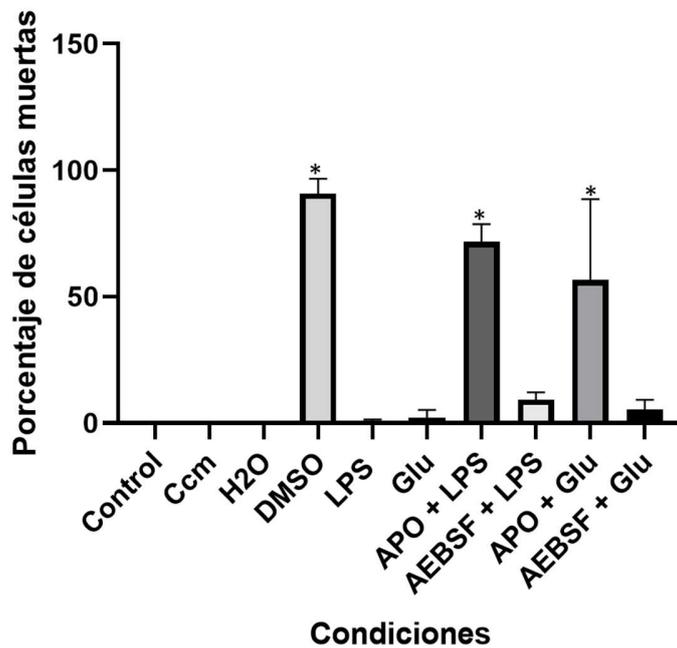
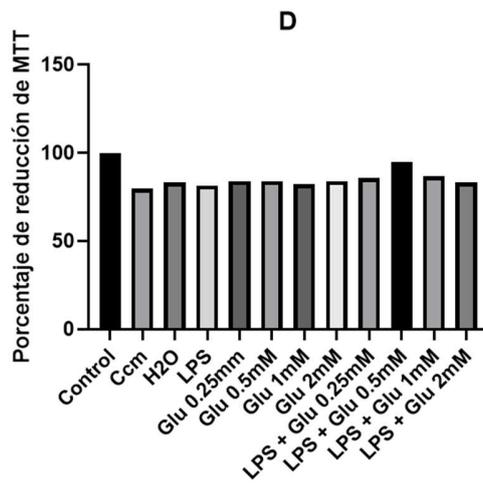
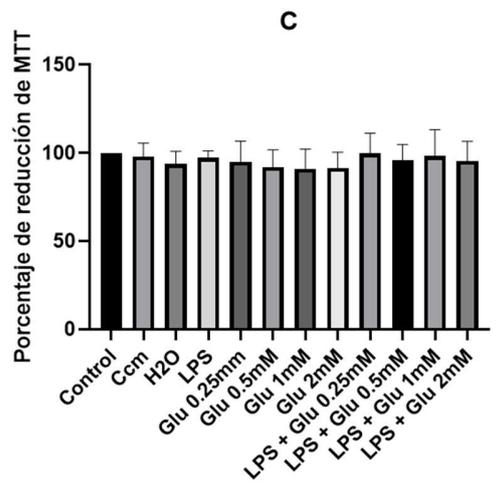
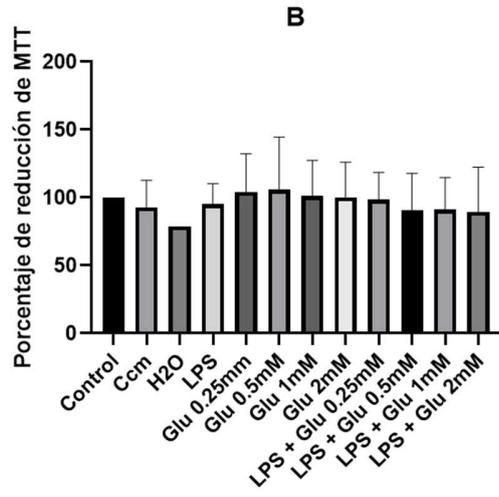
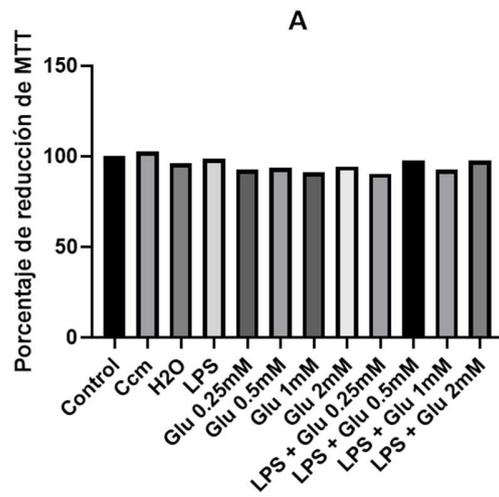


Figura 16. Gráfica de viabilidad por calceína/ioduro de propidio para la incubación de microglía con inhibidores de NOX y posterior estimulación con glutamato o LPS. Las células se incubaron por 30 min con los inhibidores de NOX apocinina (APO 1200 μ M) o AEBSF (200 μ M) y posteriormente se estimularon con LPS (100ng/mL) o glutamato (2mM) por 4 h. Los resultados de la cuantificación se expresaron como porcentaje de las células muertas respecto al total de células n=2, Ccm: control cambio de medio, H2O: agua. *P<0.001

De acuerdo con los antecedentes, la microglía expresa receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos. Por otra parte, se sabe que la estimulación de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos modifica el fenotipo de activación microglial. Con base en lo anterior, en este estudio evaluamos si la estimulación de todos los receptores glutamatérgicos, ionotrópicos y metabotrópicos, modifica la morfología de las células previamente activadas. Para ello se decidió estimular a la microglía por 6 h con LPS (100ng/mL) y posteriormente tratarlas con glutamato (Glutamato 0.25, 0.5, 1 y 2mM) a distintos tiempos (1, 4, 8, 12, 24 y 48 h). En este caso se evaluó tanto la viabilidad por MTT (Figura 17) como la morfología (Figuras 18 y 19).



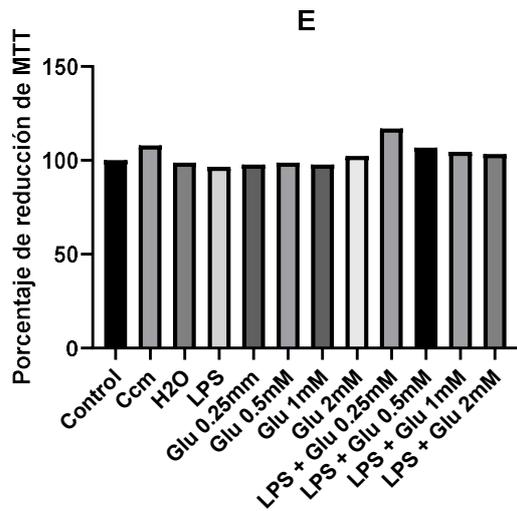


Figura 17. Gráficas de reducción de MTT para el curso temporal de la incubación con LPS y tratamiento con diversas concentraciones de Glutamato. Se incubaron los cultivos primarios de microglía con LPS (100ng/mL) por 6 h y posteriormente con diversas concentraciones de glutamato (0.25, 0.5, 1 y 2mM) durante el curso temporal de A) 1 h, B) 4 h, C) 8 h, D) 24 h y E) 48 h. Para los tiempos 4 y 8 h n=2, el resto n=1. No encontramos diferencias significativas entre los grupos

La Figura 17 muestra que ninguno de los tratamientos (LPS y glutamato) a ninguna de las concentraciones empleadas, ya sea solos o combinados, afectaron la viabilidad de las células medida como transformación de MTT.

Una vez que comprobamos que nuestros tratamientos no afectan la viabilidad de las células, evaluamos la morfología que adoptaron tras la activación con LPS y posterior a la estimulación con glutamato. Como se indicó arriba, tratamos a la microglía por 6 h con LPS (100ng/mL) y posteriormente se trataron con glutamato (1 mM) durante 1 h y se evaluó la morfología. La Figura 18 muestra que existe un cambio de la morfología microglial de las células tratadas con LPS, pero el tratamiento con glutamato no modificó los cambios observados.

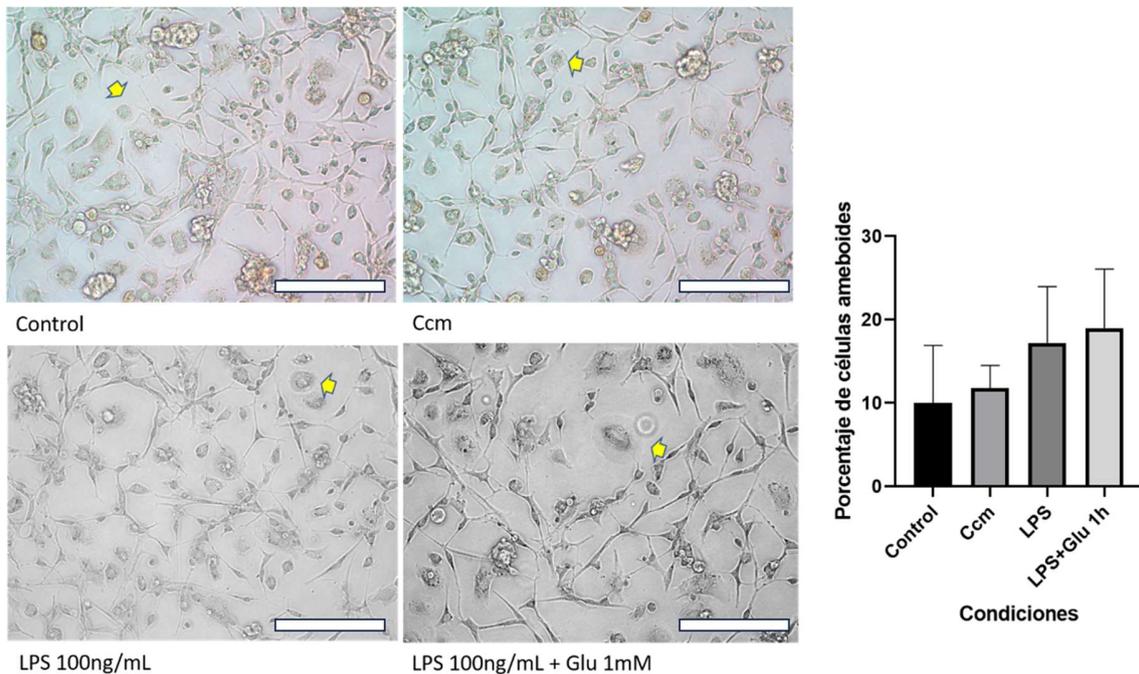


Figura 18. Imágenes representativas de los cambios morfológicos de la microglia usando 100 ng/mL de LPS y posteriormente tratadas con glutamato 1mM por una hora. Marcadas con flechas amarillas elegimos células al azar dentro de los campos que presentaban una reducción del soma (células ameboides). Gráfica del porcentaje de células activadas del total de células $n=3$. Ccm: control cambio de medio. Barra de escala 100 μm . No encontramos diferencias significativas entre los grupos.

Con el propósito de visualizar más claramente la morfología de las células, repetimos el protocolo anterior y posteriormente teñimos a las células con calceína como se indica en Métodos y realizamos una cuantificación de las distintas morfologías observadas de acuerdo con Vidal-Itriago et al. (2022). Bajo estas condiciones, observamos que la morfología de la microglía a estos tiempos no presentó cambios, mostrando un alto porcentaje de células ameboides y algunas células con forma de bastón (Figura 15). Es decir, el glutamato, en los tiempos y concentraciones evaluados, no modificó la morfología amebode basal.

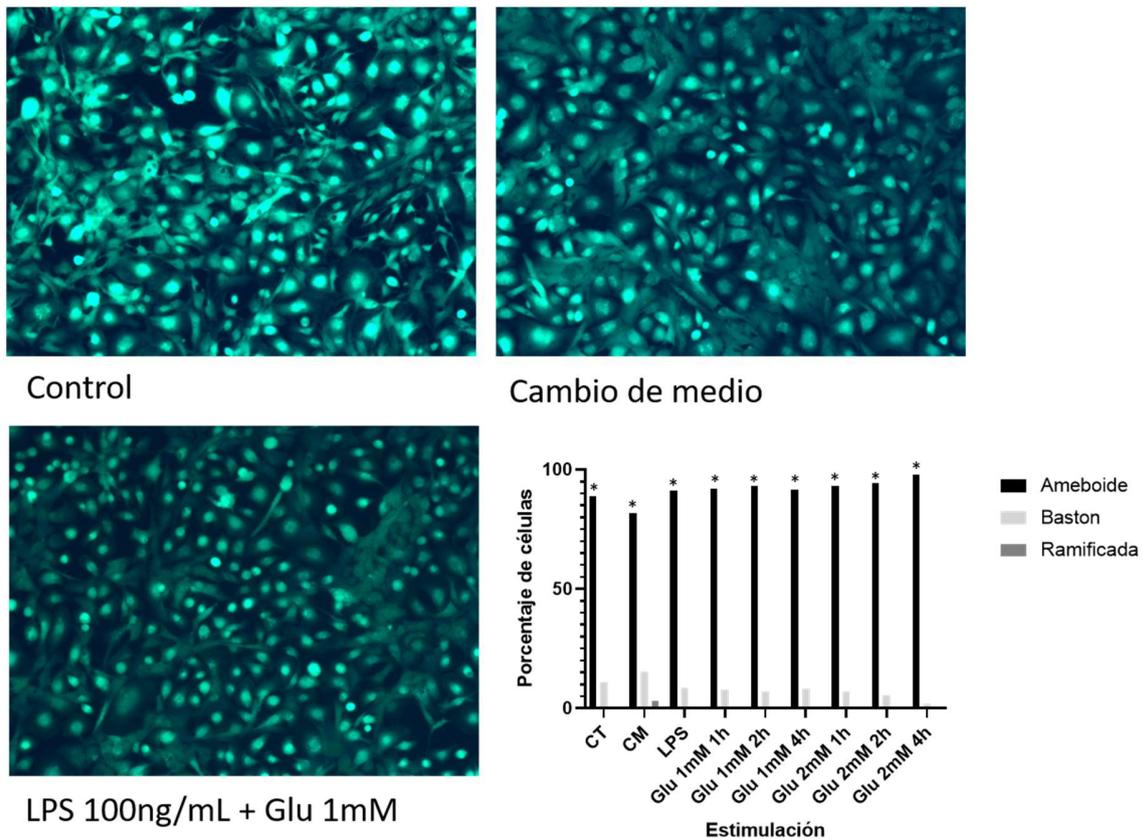


Figura 19. Morfología de las células posterior a la incubación con LPS y estimulación con glutamato. Los cultivos de microglía fueron incubados con LPS 100ng/mL por 6 h y posteriormente estimuladas con Glutamato (1 y 2mM) durante un curso temporal de 1, 2 y 4 h. Se muestran imágenes representativas de las células estimuladas con glutamato 1mM por una hora, posterior a la incubación de LPS por 6 h. También mostramos la cuantificación durante el curso temporal, n=3. Barra de escala 100 μ m. *P<0.0001

Es importante mencionar que sabemos que la evaluación de los cambios morfológicos en la microglía es solo uno de los parámetros que se deben tomar en cuenta para caracterizar a los distintos fenotipos de activación microglial. Para poder tener una visión más completa de este proceso se deben tomar en cuenta también el perfil de citocinas liberado, así como los marcadores moleculares y factores transcripcionales.

Discusión

Numerosas enfermedades neurológicas comparten a la excitotoxicidad como un mecanismo de daño neuronal, como ocurre en el caso de las enfermedades cerebrovasculares. Por ello, es de suma importancia conocer los procesos involucrados en el establecimiento del daño y poder encontrar las vías para controlarlo. Parte de los mecanismos de daño involucran una respuesta inflamatoria secundaria que tiene como finalidad reducir las consecuencias de este daño y promover la regeneración tisular; sin embargo, dependiendo de las condiciones y contexto del daño, estos procesos inflamatorios pueden agravar la condición y conducir a un episodio de muerte secundaria al daño original (Block & Hong, 2005; DiSabato et al., 2016). En este sentido, la microglía representa el principal tipo celular encargado de regular la respuesta inmune del cerebro y, particularmente, la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, como se mencionó antes, la microglía expresa diferentes estados metabólicos dependiendo del microambiente cerebral. Estos distintos estados se regulan por señales extra e intracelulares que incluyen daño neuronal y la señalización celular que le permiten llegar a un estado de activación que desencadene una respuesta inflamatoria. Recientemente se reportó la presencia de receptores metabotrópicos glutamatérgicos en la microglía, que se sugirió podrían regular la respuesta de activación microglial. En algunos estudios se ha relacionado la respuesta de activación microglial con la generación de ERO producidas por una NOX. Más aún, se ha observado la regulación de la activación de NOX por estimulación de algunos receptores glutamatérgicos metabotrópicos microgliales. Sin embargo, la activación de otros subtipos, como los mGluR5, inhibe a la NOX (Loane et al., 2009).

En este trabajo se propuso evaluar la respuesta de la microglía al glutamato en condiciones de activación por LPS y conocer si la viabilidad bajo estas condiciones está mediada por ERO producidos por una NOX. Para ello, el primer objetivo fue establecer el cultivo primario de microglía, el cual no había sido implementado anteriormente en el laboratorio (Figuras 5 y 6). Con esta idea adaptamos un protocolo de microglía de rata que originalmente se había establecido en ratón (protocolo proporcionado por la Dra. Leonor Pérez, IBT-UNAM).

A partir del protocolo empleado conseguimos tener cultivos primarios muy puros basados tanto en la morfología como en marcadores microgliales como Iba-1 (no se muestra) y CD11b/c que mostraron que prácticamente todas las células resultaron positivas a estos marcadores, por lo que concluimos que el protocolo empleado permite aislar eficientemente a la microglía de los demás

tipos celulares. En este sentido podemos decir que en todos los ensayos realizados las respuestas provinieron fundamentalmente de células microgliales.

Una vez establecido el cultivo, pudimos determinar tanto las concentraciones como los tiempos de estimulación requeridos para las distintas condiciones experimentales: LPS (Figuras 7, 8 y 9), glutamato (Figura 13) e inhibidores de NOX (Figuras 14 y 15). En todos los tratamientos nos aseguramos de que los fármacos no dañaran a las células, pues parte de los objetivos era evaluar la activación microglial a través de los cambios morfológicos.

En el caso de LPS decidimos primeramente evaluar la viabilidad de los cultivos desde una hora y concentraciones bajas de 10ng/mL hasta 100ng/mL por no más de 24 h, que es lo que normalmente se ha reportado. El LPS es una molécula altamente usada para inducir la activación microglial y su posterior producción de citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno ERO (Colton, 2009b; Qin et al., 2004), las cuales se encargan de llevar a cabo los procesos de neuroinflamación necesarios en caso de daño neural (Block & Hong, 2005; DiSabato et al., 2016). Aun cuando el LPS es un potente activador de la microglia ninguna de las concentraciones más altas empleadas a los tiempos máximos de tratamiento indujeron una modificación en la viabilidad microglial. Esto lo corroboramos con dos técnicas diferentes de evaluación indirecta de viabilidad celular, MTT y calceína/ioduro de propidio. De acuerdo con los parámetros morfológicos seleccionados para determinar si ocurría una activación de la microglía, encontramos que el tratamiento con LPS 100 ng/mL indujo una activación de estas células a partir de las 4 h hasta, al menos, 24 h. Para nuestra investigación decidimos usar LPS por ser considerado un excelente activador de la microglía, aunque se podrían usar al ácido iboténico o al kaínico ya que son usados en modelos de daño por excitotoxicidad (Coyle & Schwarcz, 2020).

Por otro lado, se mencionó que la pérdida de la regulación de las concentraciones extracelulares de glutamato puede llevar a una condición de excitotoxicidad y muerte neuronal (Brown 2015) debido a la activación continua de los receptores para glutamato, lo que lleva a una posterior condición de neuroinflamación que puede a su vez contribuir con la muerte neuronal. Con la idea de evaluar nuestra hipótesis sobre la acción reguladora del glutamato en la activación microglial, primeramente, estudiamos el efecto del glutamato en la viabilidad celular. Para esto, nos basamos en un reporte que muestra que la microglía puede liberar glutamato al medio extracelular en una concentración alrededor de 100-500 μ M (Barger et al., 2007) por lo que decidimos iniciar con 0.25 mM hasta 2 mM por un tiempo máximo de 48 h.

Nuestros resultados mostraron que el glutamato no tuvo ningún efecto en la viabilidad de las células microgliales, excepto con la concentración más baja evaluada (250 μ M) que produjo un incremento de aproximadamente 25% en la viabilidad. Es posible que esta respuesta se deba a la activación de los receptores glutamatérgicos ya que el protocolo de viabilidad por MTT mide la actividad metabólica de las células; sin embargo, no contamos con experimentos farmacológicos de bloqueo de los receptores que permitan sugerir algún mecanismo al respecto. De la misma forma encontramos que el tratamiento simultáneo con LPS y glutamato tampoco modificó la viabilidad. En ese sentido, se ha reportado que los receptores a glutamato, en particular los metabotrópicos, tienen una gran variedad de respuestas biológicas, incluso los que pertenecen al mismo grupo. Los mGluRs del grupo I han mostrado tener distintas implicaciones para la viabilidad neuronal. La activación del mGluR1 aumenta la muerte neuronal necrótica y promueve mecanismos inflamatorios (Allen et al., 2000; Pacheco et al., 2004), pero la activación de mGluR5 protege neuronas en modelos de daño al SNC (Bao et al., 2001; Chen, Zhang, et al., 2012; Loane et al., 2013).

Una vez que determinamos que nuestras condiciones de estimulación no producían daño al cultivo de microglía (Figuras 7, 8 y 9) decidimos evaluar si el glutamato producía un cambio en la morfología de las células que nos pudieran indicar algún cambio en el fenotipo de activación inducido por LPS. Por reportes previos sabemos que la activación de los receptores mGluR5 puede modificar el fenotipo de activación de la microglía hacia M2, mientras que la activación de otros receptores metabotrópicos e ionotrópicos tiene el efecto opuesto (Loane et al. 2014). Las células de la microglía expresan todos los subtipos del receptor glutamatérgico. En nuestro trabajo utilizamos glutamato, por lo que se estimularían simultáneamente todos estos receptores, como ocurre en los procesos fisiológicos.

De acuerdo con estudios previos que muestran que la estimulación del receptor mGluR5 de la microglía lleva de un perfil proinflamatorio (M1) a uno antiinflamatorio (M2), en nuestro estudio hipotetizamos que el tratamiento de las células con glutamato generaría un cambio en la morfología microglial hacia una más ramificada, lo que podría sugerir un cambio en el fenotipo de estas células. Sin embargo, contrario a lo esperado, el tratamiento con glutamato no indujo cambios morfológicos significativos de la microglía (Figura 18). Esto podría sugerir que la activación simultánea de todos los receptores glutamatérgicos no lleva a una morfología asociada a M2, como ocurre con la activación exclusiva de los receptores mGluR5 (Loane et al., 2014).

Por otro lado, el procedimiento *per se* del protocolo de tinción con calceína parece haber activado a las células, modificando su morfología, haciéndola predominantemente ameboide (Figura 19). Bajo estas condiciones y contrario a lo esperado, notamos que el glutamato tampoco produjo ningún cambio en la morfología ameboide ni fue capaz de prevenir que la mayoría de las células presentara esta morfología. Esto coincide con los resultados obtenidos con LPS.

Se ha propuesto que la microglía es capaz liberar glutamato al medio extracelular como resultado de su activación, lo cual puede contribuir a la muerte excitotóxica neuronal, independientemente de la acción de los agentes proinflamatorios. La idea es que el glutamato podría liberarse de forma indirecta por la depleción de glutatión inducida por producción masiva de ERO llevada a cabo por la NOX2 en la microglía activada (Barger et al., 2007). En modelos de daño excitotóxico, los ratones deficientes de NOX2 presentan una reducción en la producción de ERO, en la reactividad microglial y en el volumen de la lesión resultante, lo que sugiere que las ERO producidas por la NOX2 juegan un papel fundamental en la respuesta neuronal y de la microglía a múltiples eventos que cursan con procesos excitotóxicos (Gomez-Gamboa et al., 2011).

Por otro lado, se sabe que la activación de mGluR5 por glutamato es capaz de inhibir la actividad de NOX2 y por consiguiente la producción de ERO. Adicionalmente, se ha reportado que la inhibición de NOX2 promueve la polarización de la microglía hacia un fenotipo M2 (Block et al., 2007; Choi et al., 2012; Q.-G. Zhang et al., 2012). Todo esto hace pensar en las ERO producidas por NOX2 como agentes clave en la regulación de la actividad microglial. Se sabe que la expresión de la NOX2 aumenta posterior a la activación del fenotipo M1 (Haslund-Vinding et al., 2016) y estas ERO pueden ejercer severos efectos citotóxicos en las células que les circundan (Block et al., 2007; Qin et al., 2004).

En relación con lo anterior, evaluamos la participación de las ERO y de la NOX en este proceso. Nuestros resultados mostraron que el uso de DPI, un inhibidor de NOX, compromete la viabilidad celular, así como el vehículo usado para la apocinina DMSO. El tercer inhibidor probado, AEBSF, no afectó la viabilidad de las células en condiciones de activación por LPS, ni con el tratamiento con glutamato.

Para futuros experimentos se propone utilizar tanto agonistas como antagonistas del receptor mGluR5 para poder diferenciar el subtipo de receptor involucrado en la regulación de la morfología de la microglía en reposo y en condiciones de activación. También se propone utilizar un inhibidor

más selectivo de la NOX como el VAS2870, para evaluar la participación de las ERO y la NOX en los cambios morfológicos microgliales en condiciones de reposo y/o de activación con LPS con y sin glutamato.

Conclusiones

En este trabajo estandarizamos el cultivo primario enriquecido en microglía a partir de cerebros de rata. A partir de este cultivo y de su estimulación con LPS y glutamato pudimos identificar células con distinta morfología, correspondiente predominantemente a un estado activado. La evaluación de la morfología puede ayudar con el análisis de la activación de microglía, pero no nos puede decir el fenotipo particular. Para eso, es necesaria una evaluación con marcadores moleculares específicos. Teniendo eso en cuenta, primeramente, podemos concluir que, bajo nuestras condiciones ni un activador de la microglía, el LPS, ni el propio glutamato afecta la viabilidad microglial. Por otra parte, las ERO y la actividad de NOX no parecen influir tampoco en la viabilidad basal de la microglía ni en condiciones de activación con LPS o glutamato.

Por otro lado, de forma inesperada, encontramos que el procedimiento del protocolo de calceína modificó la morfología, incrementando marcadamente el porcentaje de células ameboides. Bajo estas condiciones, el glutamato no revirtió este fenotipo.

Debido a que el glutamato que fue administrado exógenamente en nuestro modelo experimental es capaz de activar todos los receptores glutamatérgicos metabotrópicos la participación de este aminoácido debe tomarse con cautela pues es posible que la expresión de los distintos subtipos de receptores dependa del contexto celular. Como se mencionó, la activación de los distintos receptores ejerce diferentes acciones en el fenotipo pro y antiinflamatorio. Por eso será necesario evaluar el efecto de agonistas y antagonistas específicos de los diferentes receptores metabotrópicos. Finalmente, aunque se estudió la participación de las ERO y la NOX en la viabilidad microglial, será necesario evaluar su acción en la activación de estas células.

Referencias

- Abbas, A. K. , Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology*.
- Allen, J. W., Knoblach, S. M., & Faden, A. I. (2000). Activation of group I metabotropic glutamate receptors reduces neuronal apoptosis but increases necrotic cell death in vitro. *Cell Death Differ*, 7(5), 470–476. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400678>
- Aronica, E., Gorter, J. A., Rozemuller, A. J., Yankaya, B., & Troost, D. (2005). Activation of metabotropic glutamate receptor 3 enhances interleukin (IL)-1 β -stimulated release of IL-6 in cultured human astrocytes. *Neuroscience*, 130(4), 927–933. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.024>
- Bao, W. L., Williams, A. J., Faden, A. I., & Tortella, F. C. (2001). Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 922(2), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03062-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03062-1)
- Barger, S. W., Goodwin, M. E., Porter, M. M., & Beggs, M. L. (2007). Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1205–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04487.x>
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Belarbi, K., Cuvelier, E., Destée, A., Gressier, B., & Chartier-Harlin, M. C. (2017). NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0225-5>
- Berger, J. V., Dumont, A. O., Focant, M. C., Vergouts, M., Sternotte, A., Calas, A. G., Goursaud, S., & Hermans, E. (2012). Opposite regulation of metabotropic glutamate receptor 3 and metabotropic glutamate receptor 5 by inflammatory stimuli in cultured microglia and astrocytes. *Neuroscience*, 205, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.044>
- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>

- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Bordi, F., & Ugolini, a. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Progress in Neurobiology*, 59(1), 55–79. <https://doi.org/S0301008298000951> [pii]
- Brennan-Minnella, A. M., Won, S. J., & Swanson, R. A. (2015). NADPH oxidase-2: linking glucose, acidosis, and excitotoxicity in stroke. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(2), 161–174. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5767>
- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 209–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3710>
- Brown, G. C., & Vilalta, A. (2015). How microglia kill neurons. *Brain Research*, 1628, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.031>
- Brüne, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., von Knethen, A., & Weigert, A. (2013). Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(6), 595–637. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4785>
- Butovsky, O., Talpalar, A. E., Ben-Yaakov, K., & Schwartz, M. (2005). Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(3), 381–393. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.03.005>
- Byrnes, K. R., Loane, D. J., & Faden, A. I. (2009). Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(1), 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.10.038>

- Byrnes, K. R., Loane, D. J., Stoica, B. a, Zhang, J., & Faden, A. I. (2012). Delayed mGluR5 activation limits neuroinflammation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-43>
- Byrnes, K. R., Stoica, B., Loane, D. J., Riccio, A., Davis, M. I., & Faden, A. I. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. *Glia*, *57*(5), 550–560. <https://doi.org/10.1002/glia.20783>
- Byrnes, K. R., Stoica, B., Riccio, A., Pajooohesh-Ganji, A., Loane, D. J., & Faden, A. I. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. *Annals of Neurology*, *66*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1002/ana.21673>
- Carson, M. J. (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous Systems : Functional Implications for Multiple Sclerosis. *Glia*, *40*(2), 218–231. <https://doi.org/10.1002/glia.10145>.Microglia
- Cervellati, C., Trentini, A., Pecorelli, A., Valacchi, G., Valacchi, G., & Valacchi, G. (2020). Inflammation in Neurological Disorders: The Thin Boundary between Brain and Periphery. *Antioxidants and Redox Signaling*, *33*(3), 191–210. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8076>
- Chantong, B., Kratschmar, D. V., Lister, A., & Odermatt, A. (2014). Inhibition of metabotropic glutamate receptor 5 induces cellular stress through pertussis toxin-sensitive G_i-proteins in murine BV-2 microglia cells. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0190-7>
- Chen, T., Cao, L., Dong, W., Luo, P., Liu, W., Qu, Y., & Fei, Z. (2012). Protective effects of mGluR5 positive modulators against traumatic neuronal injury through PKC-dependent activation of MEK/ERK pathway. *Neurochemical Research*, *37*(5), 983–990. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0691-z>
- Chen, T., Zhang, L., Qu, Y., Huo, K., Jiang, X., & Fei, Z. (2012). The selective mGluR5 agonist CHPG protects against traumatic brain injury in vitro and in vivo via ERK and Akt pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, *29*(4), 630–636. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.870>

- Choi, S. H., Aid, S., Kim, H. W., Jackson, S. H., & Bosetti, F. (2012). Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*, *120*(2), 292–301. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07572.x>
- Colton, C. A. (2009a). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *4*(4), 399–418. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9164-4>
- Colton, C. A. (2009b). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. In *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (Vol. 4, Issue 4, pp. 399–418). <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9164-4>
- Colton, C. A., & Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *9*(2), 174–191. <https://doi.org/10.2174/187152710791012053>
- Coyle, J. T., & Schwarcz, R. (2020). The Discovery and Characterization of Targeted Perikaryal-Specific Brain Lesions With Excitotoxins. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00927>
- Cross, A. R., & Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes - Prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1657*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.03.008>
- Dang, P. M. C., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O. N., Gougerot-Pocidal, M. A., & El-Benna, J. (2006). A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 2033–2043. <https://doi.org/10.1172/JCI27544>
- DeLeo, F. R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J. P., & Nauseef, W. M. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(2), 455–463. <https://doi.org/10.1172/JCI949>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

- Drouin-Ouellet, J., Brownell, A. L., Saint-Pierre, M., Fasano, C., Emond, V., Trudeau, L. E., Lévesque, D., & Cicchetti, F. (2011). Neuroinflammation is associated with changes in glial mGluR5 expression and the development of neonatal excitotoxic lesions. *Glia*, *59*(2), 188–199. <https://doi.org/10.1002/glia.21086>
- Dubbelaar, M. L., Kracht, L., Eggen, B. J. L., & Boddeke, E. W. G. M. (2018). The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Frontiers in Immunology*, *9*(July). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01753>
- Ejlerskov, P., Christensen, D. P., Beyaie, D., Burritt, J. B., Paclet, M. H., Gorch, A., Van Deurs, B., & Vilhardt, F. (2012). NADPH oxidase is internalized by clathrin-coated pits and localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated secretory compartment in activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(7), 4835–4852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293696>
- Ferrante, C. J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B. N., Hasko, G., Outram, S., & Leibovich, S. J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation*, *36*(4), 921–931. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9621-3>
- Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & de Oliveira, A. C. P. (2018). Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00329>
- Franco, R., & Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *131*, 65–86. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003>
- Gao, H.-M., Zhou, H., & Hong, J.-S. (2012). NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(6), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.008>
- García-Revilla, Alonso-Bellido, Burguillos, Herrera, Espinosa-Oliva, Ruiz, Cruz-Hernández, García-Domínguez, Roca-Ceballos, Santiago, Rodríguez-Gómez, Soto, Venero, & de Pablos. (2019). Reformulating Pro-Oxidant Microglia in Neurodegeneration. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(10), 1719. <https://doi.org/10.3390/jcm8101719>

- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., & Biswas, S. K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nature Immunology*, *17*(1), 34–40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>
- Giordano, K. R., Denman, C. R., Dubisch, P. S., Akhter, M., & Lifshitz, J. (2021). An update on the rod microglia variant in experimental and clinical brain injury and disease. *Brain Communications*, *3*(1). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa227>
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., & Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology*, *274*(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>
- Guemez-Gamboa, A., Estrada-Sánchez, A. M., Montiel, T., Páramo, B., Massieu, L., & Morán, J. (2011). Activation of NOX2 by the Stimulation of Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptors Contributes to Glutamate Neurotoxicity In Vivo Through the Production of Reactive Oxygen Species and Calpain Activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*(11), 1020–1035. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182358e4e>
- Hanamsagar, R., Hanke, M. L., & Kielian, T. (2012). Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in Immunology*, *33*(7), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.03.001>
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Haslund-Vinding, J., McBean, G., Jaquet, V., & Vilhardt, F. (2016). NADPH oxidases in Microglia oxidant production: Activating Receptors, Pharmacology, and Association with Disease. *British Journal of Pharmacology*, *16*. <https://doi.org/10.1111/bph.13425>

- Hermans, E., & Challiss, R. a. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *The Biochemical Journal*, 359(Pt 3), 465–484. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590465>
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., Gao, Y., & Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 43(11), 3063–3070. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.659656>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(August), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kaur, G., Han, S. J., Yang, I., & Crane, C. (2010). Microglia and Central Nervous System Immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*, 21(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2009.08.009>
- Kew, J. N., & Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(0033-3158 (Print)), 4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(April), 44. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00044>
- Kisucká, A., Bimbová, K., Bačová, M., Gálik, J., & Lukáčová, N. (2021). Activation of neuroprotective microglia and astrocytes at the lesion site and in the adjacent segments is crucial for spontaneous locomotor recovery after spinal cord injury. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10081943>
- Kraaij, M. D., Koekkoek, K. M., van der Kooij, S. W., Gelderman, K. A., & van Kooten, C. (2013). Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species. *Cellular Immunology*, 284(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.07.006>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kumar, V. (2019). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 332, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012>

- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (9th ed.).
- Lannes, N., Eppler, E., Etemad, S., Yotovskii, P., & Filgueira, L. (2017). Microglia at center stage: A comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget*, *8*(69), 114393–114413. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23106>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Li, J., Shui, X., Sun, R., Wan, L., Zhang, B., Xiao, B., & Luo, Z. (2021). Microglial Phenotypic Transition: Signaling Pathways and Influencing Modulators Involved in Regulation in Central Nervous System Diseases. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.736310>
- Liu, Q., Hu, Y., Cao, Y., Song, G., Liu, Z., & Liu, X. (2017). Chicoric Acid Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress via Promoting the Keap1/Nrf2 Transcriptional Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells and Mouse Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(2), 338–347. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04873>
- Loane, D. J., Kumar, A., Stoica, B. A., Cabatbat, R., & Faden, A. I. (2014). Progressive Neurodegeneration After Experimental Brain Trauma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *73*(1), 14–29. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000021>
- Loane, D. J., Stoica, B. a, Byrnes, K. R., Jeong, W., & Faden, A. I. (2013). Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *30*(5), 403–412. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2589>
- Loane, D. J., Stoica, B. A., Pajoohesh-Ganji, A., Byrnes, K. R., & Faden, A. I. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15629–15639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806139200>

- Loane, D. J., Stoica, B. A., Tchantchou, F., Kumar, A., Barrett, J. P., Akintola, T., Xue, F., Conn, P. J., & Faden, A. I. (2014). Novel mGluR5 Positive Allosteric Modulator Improves Functional Recovery, Attenuates Neurodegeneration, and Alters Microglial Polarization after Experimental Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, *11*(4), 857–869. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0298-6>
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, *79*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, *6*(March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 451–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>
- Massaad, C., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(10), 2013–2054. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3208>
- Mead, E. (2012). *Regulation of the microglial NADPH oxidase by neurotransmitters : implications for microglial – neuronal interactions.*
- Medzhitov, R. (2021). The spectrum of inflammatory responses. *Science*, *374*, 1070–1075. <https://www.science.org>
- Monier, A., Evrard, P., Gressens, P., & Verney, C. (2006). Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *Journal of Comparative Neurology*, *499*(4), 565–582. <https://doi.org/10.1002/cne.21123>
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology* (8th edition).
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage

- Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 14–20). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Nayernia, Z., Jaquet, V., & Krause, K.-H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*, *20*(17), 2815–2837. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5703>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science Magazine*, *308*(May), 1314–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, *50*(7), 295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
- Olajide, O. a., Bhatia, H. S., De Oliveira, A. C. P., Wright, C. W., & Fiebich, B. L. (2013). Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated microglia by cryptolepine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/459723>
- Pacheco, R., Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Gallart, T., Lluís, C., & Franco, R. (2004). Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33352–33358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401761200>
- Perego, C., Fumagalli, S., & Simoni, M. De. (2011). Temporal pattern of expression and colocalization of microglia / macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 174. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-174>
- Petry, A., Weitnauer, M., & Görlach, A. (2010). Receptor Activation of NADPH Oxidases. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, *13*(4).
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, *30*(10), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>

- Qian, L., Block, M. L., Wei, S. J., Lin, C., Reece, J., Pang, H., Wilson, B., Hong, J.-S., & Flood, P. M. (2006). Interleukin-10 Protects Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in Primary Midbrain Cultures by Inhibiting the Function of NADPH Oxidase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *319*(1), 44–52. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.106351>
- Qin, L., Liu, Y., Wang, T., Wei, S. J., Block, M. L., Wilson, B., Liu, B., & Hong, J. S. (2004). NADPH Oxidase Mediates Lipopolysaccharide-induced Neurotoxicity and Proinflammatory Gene Expression in Activated Microglia. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(2), 1415–1421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307657200>
- Reed-Geaghan, E. G., Savage, J. C., Hise, A. G., & Landreth, G. E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *Journal of Neuroscience*, *29*(38), 11982–11992. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009>
- Rodríguez-Gómez, J. A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M. K. R., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J. L., & Burguillos, M. A. (2020). Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071717>
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. In *Immune Network* (Vol. 18, Issue 4). Korean Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Rojo, A. I., McBean, G., Cindric, M., Egea, J., López, M. G., Rada, P., Zarkovic, N., & Cuadrado, A. (2014). Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, *21*(12), 1766–1801. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5745>
- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*, *28*(10), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.004>
- Sender, R., Weiss, Y., Navon, Y., Milo, I., Azulay, N., Keren, L., Fuchs, S., Ben-Zvi, D., Noor, E., & Milo, R. (2023). The total mass, number, and distribution of immune cells in the human body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *120*(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.2308511120>

- Shastri, A., Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/342931>
- Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., Toben, C., & Baune, B. T. (2014). Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Frontiers in Neuroscience*, 8(SEP), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00315>
- Sorce, S., & Krause, K.-H. (2009). NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(10), 2481–2504. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2578>
- Sorce, S., Krause, K.-H., & Jaquet, V. (2012). Targeting NOX enzymes in the central nervous system: Therapeutic opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(14), 2387–2407. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1014-5>
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). *Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation*. <http://rupress.org/jem/article-pdf/176/1/287/1102739/287.pdf>
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Taylor, D. L., Jones, F., Chen Seho Kubota, E. S. F., & Pocock, J. M. (2005). Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor α -induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *Journal of Neuroscience*, 25(11), 2952–2964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4456-04.2005>
- Troutman, T. D., Kofman, E., & Glass, C. K. (2021). Exploiting dynamic enhancer landscapes to decode macrophage and microglia phenotypes in health and disease. In *Molecular Cell* (Vol. 81, Issue 19, pp. 3888–3903). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.004>
- Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022a). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>

- Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022b). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>
- Vilhardt, F., Haslund-Vinding, J., Jaquet, V., & Mcbean, G. (2016). Microglia antioxidant systems and redox signalling. *British Journal of Pharmacology*, *16*. <https://doi.org/10.1111/bph.13426>
- Walker, D. G., & Lue, L.-F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's Research & Therapy*, *7*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>
- Wang, H., & Zhuo, M. (2012). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *3* NOV. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00189>
- Wang, J., He, W., & Zhang, J. (2023). A richer and more diverse future for microglia phenotypes. In *Heliyon* (Vol. 9, Issue 4). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14713>
- Wohleb, E. S., & Godbout, J. P. (2013). Basic aspects of the immunology of neuroinflammation. *Inflammation in Psychiatry*, *28*, 1–19. <https://doi.org/10.1159/000343964>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), annurev-physiol-022516-034406. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Zhang, Q.-G., Laird, M. D., Han, D., Nguyen, K., Scott, E., Dong, Y., Dhandapani, K. M., & Brann, D. W. (2012). Critical Role of NADPH Oxidase in Neuronal Oxidative Damage and Microglia Activation following Traumatic Brain Injury. *PLoS ONE*, *7*(4), e34504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034504>
- Zhang, Z., Sun, B., Liu, J., Yang, M., Li, D., Fang, J., Zhang, S., Yuan, Q., & Huang, S. (2015). Activation of mGluR5 Attenuates Microglial Activation and Neuronal Apoptosis in Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Neurochemical Research*, 1121–1132. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1572-7>