



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio de la participación del citoesqueleto de actina y la producción de ROS durante la maduración fagosomal en microglías”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Sebastián Arce Pinochet

Director del Seminario de Título: Christian González-Billault

Mayo 2023

Santiago - Chile
ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta)**.

Sebastián Arce Pinochet

“Estudio de la participación del citoesqueleto de actina y la producción de ROS durante la maduración fagosomal en microglías”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Dr. Christian González-Billault

Co-Director Seminario de Título: Dr. Ernesto Muñoz Palma

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: Dr. Marco Tulio Nuñez

Evaluador: Dr. Alejandro Roth

Santiago de Chile

Índice de Contenidos

Introducción	1
Microglías, los macrófagos del cerebro	1
Origen de las microglías	2
Fisiología de las microglías: Fagocitos especializados	4
La Fagocitosis	5
1. Encuéntrame: Migración hacia el estímulo	6
2. Cómeme: Reconocimiento, Internalización y Citoesqueleto de actina ...	7
2.1 Rho GTPasas: Rac1, Cdc42 y RhoA	9
2.2 Rac1, Cdc42 y RhoA durante la fagocitosis	12
3. Digiere, la Maduración fagosomal	14
3.1 Estallido Oxidativo	16
3.2 Crosstalk entre ROS y RhoGTPasas	17
3.3 Los destellos de actina	18
Hipótesis:	20
Objetivo general:	20
Objetivos específicos	20
Materiales y Métodos:	21
1. Cultivo celular	21
1.1 Cultivo primario de Microglías de Rata	21
1.2 Cultivos de líneas celulares microgliales BV2	22
2. Tratamientos	22
3. Transfecciones y expresión ectópica de plasmidios	23
4. Generación de <i>Beads</i> fagocitables	24
5. Inmunofluorescencia	27
5.1 Muestras:	27
5.2 Anticuerpos:	27
5.3 Procedimiento:	27
6. Microscopía de células fijadas	28
6.1 Ensayo de fagocitosis temprana	28
6.2 Adquisición de imágenes	28
6.3 Análisis de Imágenes	28

7. Microscopía de células vivas.....	30
7.1 Modelo <i>in vitro</i>	30
7.2 Ensayos fagocíticos, Dinámica y destellos de actina	30
7.3 Ensayos fagocíticos, Estallido Oxidativo:.....	31
7.4 Análisis de imágenes	32
8. Generación de Mutantes de RhoA y Rac1 2G-FRET.....	34
8.1 Partidores	34
8.2 Procedimiento	35
Resultados.....	37
1. Caracterización y estandarización de ensayos fagocíticos en células microgliales.....	37
1.1 Modelos de estudio de células microgliales.....	37
Generación de <i>Beads</i> fagocitables.....	38
1.2 Ensayos de Fagocitosis en células BV2.	39
1.3 Dinámica de Actina durante la fagocitosis.....	41
2. Dinámica de actina durante la maduración Fagosomal	43
2.1 Destellos de actina.....	43
3. Producción de ROS durante la maduración fagosomal: Estallido oxidativo.....	45
4. Actividad de RhoA durante destellos de actina	51
4.1 Mecanotransducción por destellos de actina	54
5. Generación de Mutantes de RhoA.....	56
6. Cultivos primarios de microglías.....	58
6.1 Estandarización y caracterización de cultivos primarios de microglías de rata.	58
6.2 Prueba Funcional de Microglías Primarias	60
6.3 Destellos de actina en microglías primarias.....	63
6.3 Producción de ROS intrafagosomal en Microglías Primarias de Rata	66
Discusión.....	67
1. Ensayos fagocíticos.....	68
2. Dinámica de actina durante la maduración fagosomal	69
3. Producción de ROS durante la maduración fagosomal: Estallido oxidativo.....	71
4. Actividad de RhoA durante destellos de actina	73
5. Generación de Mutantes de RhoA.....	75

6.1 Protocolos de purificación	76
6.2 Análisis funcional con LPS:	76
6.3 Destellos de actina en microglías primarias	78
6.4 Estallido Oxidativo en microglías primarias	79
Conclusiones.....	80
Bibliografía	81
Anexo	91
Anexo I: Tablas de datos obtenidos por la colocación.....	91
Anexo II: Imágenes Originales representadas en la figura 11.....	92

Índice de Tablas

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para las mutagénesis sitio dirigida con su respectivo plásmido base, Tm y % de GCs.....	35
Tabla 2: Materiales necesarios por reacción	36
Tabla 3: Tiempos para Re-annealing	36

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa del linaje de las microglías.....	3
Figura 2: Zipper model de la fagocitosis.....	9
Figura 3: Principales GTPasas, sus efectores y las estructuras de actina que promueven.....	12
Figura 4: Rho GTPasas en la fagocitosis mediada por Dectina-1.....	13
Figura 5: Maduración fagosomal.....	15
Figura 6: Reclutamiento de subunidades del complejo NOX2 durante el estallido oxidativo.....	17
Figura 7: Transfección LifeAct-GFP de células BV2 con distintos métodos... 	24
Figura 8: Fluorescencia del sobrenadante para lavados de partículas con OxyBURST.....	26
Figura 9: Caracterización de Beads Fluorescentes.....	39
Figura 10: Ensayo Fagocitosis en la línea celular microglial BV2.....	40
Figura 11: Células COS7 y C8D1A no realizan fagocitosis de beads fluorescentes.....	41
Figura 12: Dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis de células microgliales BV2.....	42
Figura 13: Características de la sonda OxyBurst.....	44
Figura 14: Características de la sonda OxyBurst.....	46
Figura 15: Imágenes representativas de la producción de ROS intrafagosomal en microglías BV2.....	46
Figura 16: Producción de ROS intrafagosomal durante la fagocitosis de microglías BV2.....	48
Figura 17: Producción Cíclica de ROS intrafagosomal en microglías.....	49
Figura 18: Producción intrafagosomal de ROS en presencia de un inhibidor de ROCK.....	50
Figura 19: La actividad de RhoA aumenta durante los destellos de actina....	52
Figura 20: Caída de la actividad de RhoA antes de los destellos de actina. ...	54
Figura 21: CaAR durante destellos de actina. Imágenes representativas de acumulación perinuclear de actina durante destellos fagosomales.....	55
Figura 22: F-actina cortical, perinuclear y fagosomal.....	56
Figura 23: Validación de mutagénesis sitio dirigida por secuenciación de Sanger.....	57

Figura 24: Métodos de purificación de microglías	59
Figura 25: Análisis funcional de microglías primarias de rata estimuladas con LPS	62
Figura 26: Caracterización tridimensional de destellos de actina en microglías de rata	63
Figura 27: Cuantificación de cobertura de actina en el eje Z en microglías de rata	64
Figura 28: Cuantificación de beads con marcaje de actina positivo en al menos un plano del eje Z en microglías de rata	65
Figura 29: Producción de ROS intrafagosomal durante la fagocitosis de microglías primarias de rata.....	66
Figura 30: Principales vías de señalización para la inducción del fenotipo M1 y M2	78

Agradecimientos

No hay escrito suficiente que pueda contener toda la gratitud que tengo por las personas que me han apoyado a lo largo de este largo camino. Partiendo desde mis padres, Claudia Pinochet y Eduardo Arce, que desde pequeño me facilitaron las herramientas que hoy permiten que me desenvuelva de manera grata en distintos ambientes académicos. No solo me otorgaron las herramientas intelectuales, sino que también el soporte emocional, tanto cuando hubo quiebres en la convivencia como cuando había prosperidad. Más que arrebatarse el timón y luchar contra la marea, supieron resignificar el barco en la tormenta, donde la supuesta hecatombe se convirtió en un pequeño y áspero tramo (que ciertamente había que recorrer), pero insignificante dentro del grato y extenso paseo en la montaña. Claro está que hubo altos y bajos, pero mirando al pasado, todo valió la pena, aunque la cima aún este lejos de alcanzarse. En esto incluyo al resto de mi familia, en especial a mi abuela María Teresa, la Lelita, quién me presto cobijo tanto tiempo para facilitarme la ida a la Universidad, me dio risas y amor cuando más lo necesitaba; en los momentos de más estrés. A Margrit Hempel, mi Omi, quién me ha enseñado tanto, desde pequeño, aprendiendo a cocinar juntos hasta hoy, enseñándome a tocar piano. A mis tías y tíos, primas y primos, todos con quienes he pasado tantas experiencias y recuerdos. A todos, los quiero con todo mi corazón y les agradezco mucho ser parte de mi vida. Además de agradecer a mis padres y familia, debo agradecer a mis amigos del colegio y universidad. Agradezco todas las experiencias inolvidables con Jose Miguel Yuseff, desde que estábamos en kínder hasta el día de hoy, nos vimos crecer, madurar juntos y ahora espero envejecer sin perder ese lazo que hemos forjado por tantos años. A Javier López, cuya amistad surgió, curiosamente, peñando en

Taekwondo y entre vandals y conversaciones distendidas se fortaleció hasta lo que es hoy. También agradecer a todos los chicos del discord y tantas risas que este ha desprendido. Al grupo de amigos del colegio; Matías Toro, Ignacio Echeverría, Antonio Solari, Paula Domínguez y tantos más. Les agradezco que estén en mi vida hasta el día de hoy. También a las amistades que se forjaron en el camino, como con Diego Portales, que a pesar de conocernos desde no hace mucho tiempo, se volvió un gran amigo y una parte importante de mi vida. También quisiera agradecer a Daniela Lefio, por saber cómo aguantarme todos estos años, entregándome amor de forma incondicional y soportando todas mis estupideces. Y sin saber que deparará de nosotros en el futuro digo sin arrepentimientos que: todo valió y valdrá la pena. Te amo con todo mi corazón. Finalmente, agradecer a todos mis compañeros del laboratorio, a Oscar, Michel, Christopher, Sandra, Rocío, Nataly, Camila, Diego, Coni, Isadora y a todos los que me apoyaron en este proceso. Agradecer a mi profesor y mentor, Christian González, quién me facilitó las herramientas y depositó su confianza en mí para explorar y proponer una nueva línea de investigación. Un especial agradecimiento a mi gran tutor y padre de laboratorio, Ernesto. Nada de lo que he hecho profesionalmente sería posible de no ser por tu gran guía, disposición y sobre todo, grandísimo corazón. Te lo agradezco mucho. Agradezco a todos quienes mencioné y a quienes no pude mencionar, ustedes hicieron de mi lo que soy hoy, por lo tanto, este seminario lleva un poco de todos ustedes.

Resumen

Las microglías son las células del sistema inmunológico que residen en el cerebro y, por lo tanto, actúan como la principal defensa inmunológica contra patógenos y enfermedades neurológicas que afectan el sistema nervioso central (SNC). La fagocitosis es una de las funciones principales de las microglías, que implica la endocitosis de agentes grandes ($>0,5 \mu\text{m}$), lo que les permite eliminar patógenos y agregados neurotóxicos característicos de diversas enfermedades neuropatológicas. Una vez que los agentes dañinos son ingeridos, las microglías forman un compartimento especializado llamado fagosoma. A pesar de la importancia fisiológica del fagosoma, se ha estudiado principalmente en otras células del sistema inmunológico, por lo que ha sido poco explorado en las microglías.

De particular relevancia es el citoesqueleto de actina, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de ciertas Rho GTPasas, como RhoA, en el desarrollo y maduración adecuados del fagosoma. Sin el funcionamiento adecuado de estos elementos, la digestión y eliminación de agentes dañinos no serían posibles. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue estudiar la dinámica del citoesqueleto de actina, la producción de ROS y la actividad de RhoA en la maduración del fagosoma microglial utilizando un modelo de fagocitosis.

Para observar la dinámica de la actina a través de la microscopía confocal, se emplearon sondas genéticas como LifeAct-GFP y Utrophin-mScarlet. Utilizando estas sondas, se descubrió un fenómeno dinámico del actina, denominado "destellos de actina", en las microglías, que no se había reportado previamente. Además, mediante el uso de una sonda redox llamada *OxyBurst*, se construyó por primera vez la curva de producción de ROS intrafagosomal en microglías. Además, a través de ensayos de fagocitosis, se observó por primera vez la naturaleza cíclica y escalonada

de la producción de ROS durante el estallido oxidativo. Para explorar una posible conexión entre los efectores de RhoA y la producción de ROS, se utilizaron inhibidores de ROCK, lo que resultó en una disminución en la magnitud del estallido oxidativo. Esto sugiere que RhoA está involucrado en la producción de ROS a través de su efector ROCK. Finalmente, mediante el uso de sensores FRET de segunda generación, se observó un aumento en la actividad de RhoA durante los destellos de actina. Los resultados indican que el citoesqueleto de actina, la producción de ROS y la actividad de RhoA están funcionalmente interconectados y son esenciales para el funcionamiento adecuado de la fagocitosis microglial.

Los hallazgos de este seminario de tesis arrojan luz sobre los mecanismos moleculares de la maduración del fagosoma, lo que tiene implicaciones tanto en la ciencia básica como en la práctica clínica. Las disfunciones en la fagocitosis son inherentes al proceso de envejecimiento y a la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas, por lo que comprender la base molecular de este fenómeno podría ser útil para el desarrollo de nuevas estrategias para tratar numerosas enfermedades.

Abstract

Microglia are the immune cells that reside in the brain and, therefore, serve as the main immune defense against pathogens and neurological diseases affecting the central nervous system (CNS). Phagocytosis is one of the primary functions of microglia, involving the endocytosis of large cargoes ($>0.5 \mu\text{m}$), allowing them to eliminate pathogens and neurotoxic aggregates which are characteristic of various neuropathologies. Once harmful agents are ingested, microglia form a specialized compartment called the phagosome. Despite the physiological importance of the phagosome, it has been primarily studied in other immune system cells and poorly explored in microglia.

Of particular relevance is the actin cytoskeleton, the production of reactive oxygen species (ROS), and the activity of certain Rho GTPases, such as RhoA, in the proper development and maturation of the phagosome. Without the proper functioning of these elements, digestion and elimination of harmful agents would not be possible. Therefore, the objective of this thesis was to study the dynamics of the actin cytoskeleton, ROS production, and RhoA activity in the microglial phagosome maturation using a model of phagocytosis.

To observe actin dynamics through confocal microscopy, genetic probes such as LifeAct-GFP and Utrophin-mScarlet were employed. Using these probes, a dynamic actin phenomenon, termed "actin flashes" was discovered in microglia, which had not been reported previously. Additionally, by employing a redox probe called Oxyburst, the curve of intra-phagosomal ROS production by microglia was constructed for the first time. Furthermore, through phagocytosis assays, the cyclic and stepped nature of ROS production during the oxidative burst was observed for the first time. To explore a potential connection between RhoA effectors and ROS

production, ROCK inhibitors were used, resulting in a decrease in the magnitude of the oxidative burst. This suggests that RhoA is involved in ROS production through its effector ROCK. Finally, using second-generation FRET sensors, an increase in RhoA activity during actin flashes was observed. The results indicate that the actin cytoskeleton, ROS production, and RhoA activity are functionally interconnected and essential for the proper functioning of microglial phagocytosis.

The findings from this thesis seminar shed light on the molecular mechanisms of phagosome maturation, which has implications in both basic science and clinical practice. Dysfunctions in phagocytosis are inherent in the aging process and the progression of various neurodegenerative diseases, so understanding the molecular basis of this phenomenon might be useful for the development of new strategies to treat numerous diseases

Lista de Abreviaturas

- ROS** *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de oxígeno)
- ATP** *Adenosine Triphosphate* (Adenosin trifosfato)
- IgG** Inmunoglobulina G
- iC3b** *Inactivated Complement 3b* (Complemento 3b inactivado)
- PAMPs** *Pathogen associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados a patógenos)
- DAMPs** *Damage associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados a daño)
- NOX2** *NADPH oxidase complex 2* (Complejo NADPH oxidasa 2)
- LPS** Lipopolisacárido
- ROCK** *Rho associated protein kinase* (Proteína Quinasa asociada a RhoA)
- MLC** *Myosin light chain* (Miosina de cadena ligera)
- SOD** *Superoxide dismutase* (superóxido dismutasa)
- DNA** *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido desoxiribonucleico)
- YPD** *Yeast extract peptone dextrose* (Extracto de levadura peptona dextrosa)
- RPM** Revoluciones por minutos
- PBS** *Phosphate Buffer saline* (Buffer fosfato salino)
- BSA** *Bovine serum albumina* (Albúmina de suero bovino)
- CFP** *Cyan fluorescent protein* (Proteína fluorescente Cyan)
- YFP** *Yellow fluorescent protein* (Proteína fluorescente Amarilla)
- GFP** *Green fluorescent protein* (Proteína fluorescente Verde)
- AF** Alexa Flúor
- ROI** *Region of interest* (Región de interés)
- FRET** *Förster resonance energy transfer* (Transferencia de energía de Förster)

SPRINP *Two-single primer reactions in parallel* (Dos reacciones con partidores únicos en paralelo)

Medio LB Medio Luria-Bertani

RhoA Ras Homolog family member A (Miembro homologo A de la familia Ras)

GDP *Guanine diphosphate* (Guanina difosfato)

GTP *Guanine triphosphate* (Guanina trifosfato)

GEF *Guanine nucleotide exchange factor* (Factor intercambiador de nucleótido de guanina)

GDI *Guanosine nucleotide dissociation inhibitor* (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina)

Introducción

Microglías, los macrófagos del cerebro

Las microglías son las únicas células del sistema inmune (SI) que residen dentro del parénquima cerebral, tejido constituido principalmente por neuronas y células gliales en el sistema nervioso central (SNC). Como el cerebro es un tejido protegido por la barrera hematoencefálica, es resiliente a la infiltración de células inmunes periféricas, por lo que las microglías son la principal línea de defensa ante patógenos y enfermedades (Forrester et al., 2018). Las principales funciones de las microglías son la vigilancia, la fagocitosis y el soporte a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, por lo que son considerados como los macrófagos del cerebro. Las microglías llegan a constituir más del 10% de las células en el cerebro, participando activamente no solo en procesos de defensa celular sino también en una diversidad de procesos neuronales incluyendo el establecimiento de las sinapsis, la neurogénesis y la mielinización de axones (Borst et al., 2021). Además, participan en una diversidad de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, donde cumplen roles tanto beneficiosos como perjudiciales para el progreso de la enfermedad (Xu et al., 2020). Sin embargo, hay mucho que se desconoce sobre las microglías, tanto así que la definición de esta ha sufrido diversos cambios en la historia. Por ende, primero debemos entender a qué nos referimos cuando hablamos de microglías.

Origen de las microglías

La definición actual y más aceptada de “microglía” es: células inmunes residentes del parénquima cerebral. Esta definición, por más simple que suene, ha tenido un origen controvertido. Las microglías fueron primeramente descritas en 1913 por Santiago Ramón y Cajal (Ginhoux & Prinz, 2015), quien es considerado como el padre de la neurociencia, el cual las describió como el “tercer elemento” del sistema nervioso. Sin embargo, en 1919 Pio del Río Hortega, discípulo de Cajal, descubrió que su maestro en realidad había descrito dos tipos celulares distintos: oligodendrocitos y microglías. Mientras que las primeras tendrían un origen común con las neuronas y astrocitos, las segundas compartían un origen totalmente distinto, es decir, otra ontogenia. Las hipótesis de Pío del Río Hortega fueron publicadas en *The Lancet* en 1939 (Rio-Hortega, 1939), pero fueron ampliamente ignoradas y el consenso científico de la época avaló la teoría del origen común entre todas las células cerebrales, es decir, una ontogenia común y ectodermal. No fue hasta 1993 (Lassmann et al., 1993) que se demostró fehacientemente que las microglías presentan un origen mesodermal, junto con las células hematopoyéticas del sistema inmune periférico, incluyendo monocitos y macrófagos. Esto representó un cambio de paradigma, ya que las microglías serían células hermanas de los macrófagos y no de las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos como se creía en la época. Esto es importante ya que mucho de lo que se asume hoy sobre el funcionamiento de las microglías **viene del estudio de macrófagos**.

Sin embargo, aún no estaba resuelto si las microglías provenían de la sangre, específicamente de monocitos que activamente se infiltran en el cerebro para diferenciarse en microglías, o más bien tenían un origen mieloide temprano, es decir, que su existencia provenía de las primeras “olas” de células mesodermales, por lo

que infiltraban el cerebro en estadios tempranos del desarrollo y no durante la vida adulta. No fue hasta el año 2010 cuando se demostró el origen mieloide de las células microgliales (Ginhoux et al., 2010; Hoeffel & Ginhoux, 2015). De esta forma, se corroboró que las microglías se diferencian en estadios tempranos del desarrollo y mantienen un *pool* auto-proliferativo a lo largo de la vida (Figura 1).

Por tanto, entender el origen de estas células es entender que las microglías son las células adoptivas del cerebro; los hermanos de los macrófagos en la casa de las neuronas. El origen explica la riqueza fisiológica de las microglías y el por qué no deben ser entendidas como una subpoblación de macrófagos; no vienen de monocitos circulantes, si no que se forjan desde el desarrollo embrionario en el nicho que habitarán de por vida, el cerebro.

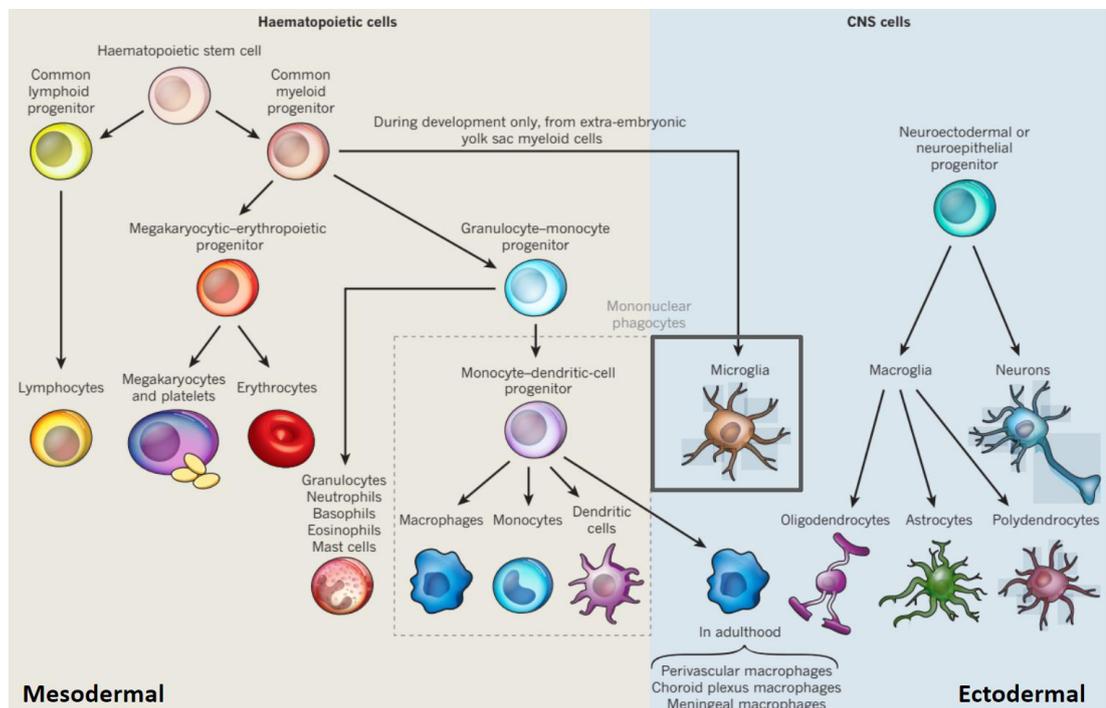


Figura 1: Mapa del linaje de las microglías: A la izquierda, con fondo rosa, se muestran las células hematopoyéticas, provenientes del mesoderma y a la derecha con fondo azul se muestran las células del sistema nervioso, donde todas vienen del ectoderma a excepción de las microglías y macrófagos periféricos. Las microglías provienen de progenitores mieloide del saco vitelino, en específico, de la primera ola hematopoyética en el desarrollo temprano. Por distintas señales, migran al cerebro y establecen su población en conjunto con las neuronas y macróglías. En el cuadrado negro se destacan las microglías. Imagen adaptada de (Ransohoff & Cardona, 2010).

Fisiología de las microglías: Fagocitos especializados

Las microglías cumplen diversas funciones neurofisiológicas para mantener la homeostasis del parénquima cerebral. Dentro de los aspectos fisiológicos más importantes de las microglías destaca su condición de fagocitos especializados, es decir, pueden sensar y endocitar partículas de gran tamaño ($>0.5\mu\text{m}$) de forma eficiente (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Esta funcionalidad les permite participar en diversos procesos cerebrales, como la sinaptogénesis, la regulación de la neurogénesis hipocampal (Diaz-Aparicio et al., 2020), la regulación de la apoptosis y la plasticidad neuronal (Cornell et al., 2021). Para esto, las microglías son capaces de sensar el medio, responder a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a las concentraciones extracelulares de ATP, a la dureza del medio (durotaxis) y a mensajeros bioquímicos (citoquinas).

Las microglías poseen una gran diversidad de receptores fagocíticos de membrana que son principalmente de dos naturalezas distintas. Los primeros receptores son de tipo opsónicos, los cuales reconocen como ligando una opsonina como anticuerpos IgG o la proteína del complemento iC3b, los cuales recubren el agente a fagocitar. Los segundos son los receptores no opsónicos, como los que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs). Estos receptores pueden actuar por sí solos o en sinergia para desencadenar el proceso de fagocitosis (Freeman et al., 2014; Uribe-Querol & Rosales, 2020). Además de la fagocitosis, la unión de estos ligandos suele iniciar una cascada de transducción de señales que alteran el fenotipo microglial, proceso comúnmente denominado como “polarización”.

Los estados de polarización canónicos generalmente descritos son antagónicos, pro-inflamatorio M1 y pro-resolutivo M2. Además, se suele describir un

tercer estado de “reposo” M0 (No confundir con quiescentes o inmóviles). Por lo general, los ligandos encargados de “visibilizar” patógenos como opsoninas y PAMPs desencadenan fenotipos proinflamatorios, mientras que la unión de citoquinas antiinflamatorias genera el efecto opuesto (Guo et al., 2022).

Frente a un estímulo fagocítico, suele activarse el fenotipo M1, que genera cascadas de transducción de señales que aumentan la transcripción de subunidades del complejo *NADPH oxidase complex 2* (NOX2) y el complejo *Nitric oxide synthase 2* (iNOS) para aumentar la producción de ROS y NOS (especies reactivas de nitrógeno) y crear un ambiente citotóxico para el agente a fagocitar (Simpson & Oliver, 2020). También se produce un *switch* metabólico, donde se transiciona de fosforilación oxidativa, a un estado glicolítico para la obtención de energía. Además, aumenta la liberación de citoquinas proinflamatorias con efectos autocrinos (actúan sobre sí mismas) y paracrinos (actúan sobre células cercanas) lo que amplifica el estímulo inflamatorio. Adicionalmente, hay una retracción de las ramificaciones y un ensanchamiento del soma, aumentando la capacidad de carga fagocítica, proceso altamente dependiente del citoesqueleto de actina (Carta & Pisanu, 2013). Todo este conjunto de respuestas prepara a la célula para efectuar eficientemente su función principal: fagocitar.

La Fagocitosis

Como se mencionó anteriormente, la fagocitosis es un proceso complejo que se encarga de la endocitosis de diversos agentes dañinos, como patógenos, debris, agregados proteicos y células apoptóticas. En la literatura suele caracterizarse la fagocitosis en tres pasos: 1, *Find me* (encuétrame), 2, *Eat me* (Cómeme) y 3, *Digest me* (Digiereme). El primero se refiere a las señales que permiten a las microglías migrar a la zona afectada. El segundo se refiere principalmente a la unión del ligando

e internalización de la partícula donde participa activamente el citoesqueleto de actina. El tercero se refiere a la formación de una vesícula especializada en la digestión, llamada fagosoma, la cual se desarrolla mediante un proceso denominado maduración fagosomal (Sierra et al., 2013).

1. Encuéntrame: Migración hacia el estímulo

Hay diversas señales que reclutan microglías a zonas afectadas. Una de las vías más comunes es la mediada por células apoptóticas. Los fagocitos especializados como las microglías pueden aproximarse y sensar células en proceso de muerte celular programada incluso antes de que estén muertas. Algunos factores solubles como la lisofosfatidilcolina (LPC), esfingosina-1-fosfato (S1P), micropartículas con Fractalkine/CX3CL1 60kDA (FKN) y nucleótidos (como ATP y UTP) son liberadas durante el transcurso de la apoptosis (algunos de manera dependiente de caspasas y otros no) y reconocidos por receptores como los acoplados a proteínas G (GPCRs), sirviendo como quimioattractantes para los fagocitos en las proximidades (Medina & Ravichandran, 2016). Uno de los quimioattractantes más estudiados en microglías y fagocitos es el ATP (Y sus derivados, ADP y AMP). Durante la apoptosis, las caspasas 3 y 7 clivan la cola C-terminal del canal Panx1 activando y fomentando la liberación de ATP (Medina & Ravichandran, 2016). El ATP liberado provoca la subsecuente liberación de más ATP mediado por astrocitos, lo que genera un gradiente que aumenta hacia la zona afectada. Esto es reconocido por las microglías cercanas principalmente por el receptor purinérgico P2Y12, un receptor metabotrópico de tipo GPCR, que activa vías de señalización río abajo para la polimerización del citoesqueleto celular (F-Actina y microtúbulos). El receptor P2Y12 puede actuar en conjunto con P2X4, un receptor ionotrópico que promueve la entrada de Ca^{+2} , lo que activa la vía PI3K, lo que

también tiene efectos en la morfología, activación microglial y dinámica del citoesqueleto celular (Illes et al., 2020). En general, la activación de estos receptores contribuye a que las microglías sean células muy móviles, por lo que poseen un citoesqueleto de actina mucho más dinámico que otros tipos celulares.

Se ha mostrado que microglías activadas con lipopolisacárido (LPS) aumentan la exocitosis de ATP, lo que en contextos fisiológicos significaría un aumento de la gradiente quimioattractante hacia la zona afectada (Imura et al., 2013), lo que podría ser independiente de la apoptosis celular. Esto, sumado a la liberación de citoquinas quimioattractantes durante la activación microglial (como TNF- α), permiten reclutar microglías en otros contextos, ya sea la invasión de patógenos como bacterias y levaduras, hasta agregados neurotóxicos, donde no necesariamente habrá apoptosis celular en las zonas “infectadas”. No obstante, hay que considerar que, a pesar de la sensibilidad de las microglías a su ambiente, estas también son altamente dinámicas, por lo que también hay mucho reconocimiento estocástico no mediado por señales de “encuétrame” en el reconocimiento de células apoptóticas y patógenos.

En resumen, el fenómeno de “encuétrame” está bien caracterizado y estudiado en microglías, donde destaca el ATP y ADP como principales moléculas quimioattractantes. Lo más destacable es que esto activa una dinamicidad importante del citoesqueleto de actina, para permitir una migración rápida a la zona afectada.

2. Cómeme: Reconocimiento, Internalización y Citoesqueleto de actina

Una vez las microglías son reclutadas a la zona afectada, deben reconocer el blanco a fagocitar además de su naturaleza (células apoptóticas, agregados proteicos, patógenos u otros) para generar una respuesta acorde al cargo a fagocitar. Una vez reconocido el agente por su receptor, se desencadenan cascadas de

transducción que remodelan el citoesqueleto de actina y permiten la endocitosis del cargo reconocido. Esta acumulación y polimerización secuencial de actina se enmarca en el modelo mecánico denominado *Zipper model*. El modelo propone la fuerte adhesión de la partícula (Figura 2-I), seguida de una acumulación cortical de actina en el sitio de adhesión (Figura 2-II) y la posterior polimerización de actina alrededor de la partícula que genera una estructura con forma de anillo denominado copa fagocítica (Figura 2-III). La copa fagocítica se extiende hasta encontrarse en la parte posterior del cargo (Figura 2-IV), se cierra y genera la fuerza mecánica necesaria para impulsar el fagosoma naciente hacia el espacio intracelular (Figura 2-V). Hay que aclarar que el mecanismo general de la fagocitosis puede variar ligeramente dependiendo del receptor estimulado. Sin embargo, siempre se requiere una alta dinamicidad del citoesqueleto de actina que debe ser regulada finamente. Para esto, es necesario la actividad de ciertas GTPasas pequeñas que regulen la polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina. Dentro de los reguladores maestros de la dinámica de actina, destacan las Rho GTPasas, familia de proteínas que adquiere un rol protagónico en el proceso fagocítico y es parte esencial del *zipper model*.

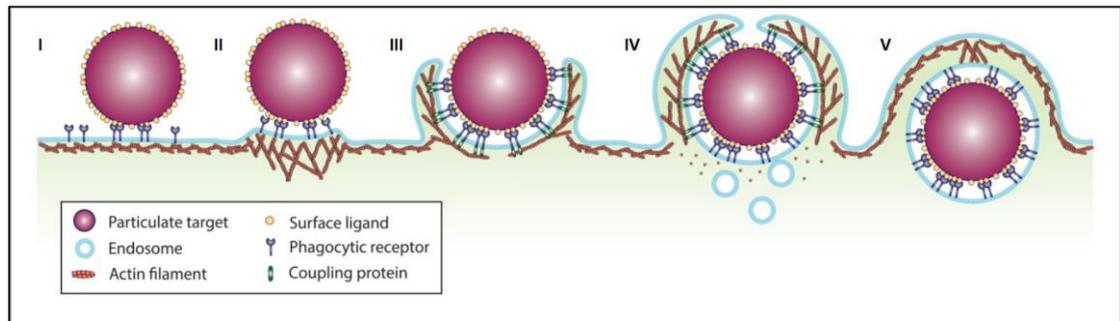


Figura 2: Zipper model de la fagocitosis: Este proceso puede ser dividido en 5 etapas, **I.** El reconocimiento de la partícula por los receptores fagocíticos respectivos **II.** La acumulación de actina cortical en la zona de unión de la partícula. Esta actina permite la elongación de protusiones dependientes de la actividad de ciertas Rho GTPasas **III.** La extensión de la membrana, la que es mediada por actina y forma la copa fagocítica. La actina se acopla a la partícula mediante los receptores de membrana y la adhesión a la partícula se vuelve más robusta. **IV.** Extensión hasta la parte posterior de la partícula. En este momento puede iniciar la despolimerización de actina en la parte anterior de la copa fagocítica, a la vez que se recluta más membrana al sitio. Sin embargo esto no es necesariamente así siempre y la despolimerización puede iniciar después de la fisión de la membrana **V.** Cierre de la copa fagocítica. En este momento se produce la fisión de la membrana mediada por proteínas como dinamina. Además, se forma la vesícula fagosomal y se despolimeriza totalmente la actina fagocítica anterior y posterior. Imagen modificada de (Jaumouillé & Waterman, 2020).

2.1 Rho GTPasas: Rac1, Cdc42 y RhoA

La familia de las Rho GTPasas está compuesta por 20 proteínas de las cuales Rac1, Cdc42 y RhoA son las más estudiadas. Estas proteínas son reguladores maestros de la dinámica del citoesqueleto de actina, por lo que a cada una de estas GTPasas se le atribuye un rol distintivo en la formación de estructuras del citoesqueleto. Las Rho GTPasas funcionan como *switches* moleculares, donde al estar unidas a GTP se encuentran activas y permiten su unión a proteínas efectoras específicas mientras que al hidrolizar GTP a GDP se inactivan. Tanto la unión de GTP como su hidrólisis a GDP es dependiente de proteínas reguladoras. Las *Guanine exchange factors* (GEFs) promueven el intercambio de GDP a GTP mientras las *Guanine activating proteins* (GAPs) promueven la hidrólisis a GDP. Adicionalmente, las *Guanosine nucleotide dissociation inhibitor* (GDIs) transportan y sequestran las Rho GTPasas en su forma inactiva (unida a GDP) en la membrana. Por otro lado, las *GDIs displacement factors* (GDFs) se encargan de desestabilizar la

unión con GDIs para liberar la Rho GTPasa para su activación por GEFs. Una vez activadas, cada GTPasa regula el citoesqueleto mediante la unión a sus proteínas efectoras, generando cascadas de señalización que desencadenan en estructuras de actina de diversa naturaleza (Hodge & Ridley, 2016).

Tras la activación de Rac1, esta RhoGTPasa se puede unir y activar al complejo WAVE, un efector que a su vez promueve la activación del complejo Arp2/3, el cual genera puntos de nucleación en los filamentos de actina y permite la ramificación (*branching*) de estos, generando estructuras de tipo lamelar. Así, la activación de WAVE vía Rac1 genera polimerización ramificada de actina. Además, Rac1 se puede unir y activar a otro efector llamado PAK, el cual a su vez activa a LIMK. LIMK puede fosforilar a cofilina, inactivándola. Como cofilina cliva los filamentos de actina, su inactivación estabiliza F-actina. De esta forma Rac1 estabiliza filamentos de actina mediante la señalización vía PAK. De esta forma, Rac1 es capaz de crear una red de filamentos de actina *de novo* denominados lamelipodios (“manto” de actina) mediante la acción combinada de sus efectores WAVE y PAK. Adicionalmente, Rac1 forma parte del complejo NOX2, el cual es necesario para la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dependientes de NADPH. Esta actividad dual de regulación de actina y generación de ROS es crucial para la fagocitosis, dado que la formación del fagosoma precede la del estallido oxidativo en un espacio temporal bastante acotado. Esto se abordará con más detalle en la siguiente sección.

Cdc42 también tiene como efector a PAK, pero a su vez activa a N-WASP y WASP, que pueden nuclear actina por sí mismas y activar otros nucleadores de actina, como Arp2/3. Además, Cdc42 se une a IRSp53, la cual generalmente bloquea la polimerización de actina. Cuando Cdc42 se une a IRSp53, activa su estado de

nucleación de actina, lo que recluta y activa proteínas como ena/VASP. Las proteínas ena/VASP sirven para reclutar actina monomérica, elongar los extremos (+) y bloquear las proteínas *Cap* que detienen la polimerización. Además, se recluta fascina la que une filamentos de actina paralelos entre sí. Estas proteínas generan la convergencia de la red lamelipoidal de actina en estructuras filopoidales (“varillas” de actina).

Por otro lado, RhoA tiene como efector a ROCK, que activa la vía de LIMK, por ende, inhibe cofilina y estabiliza F-actina. Además, ROCK fosforila la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (fosfatasa de MLC) inactivándola, de tal forma aumentan los niveles de MLC fosforilado. Además, ROCK es capaz de fosforilar directamente a MLC. Esto aumenta los niveles de miosina II activa. Otro efector de RhoA es la formina mDia. Las forminas son proteínas en forma de anillo que facilitan la polimerización paralela de filamentos de actina. Además, mDia contiene dominios de unión a profilina, lo que acelera la polimerización de actina en los *barbed ends* (+). La actividad conjunta de ROCK y mDia genera filamentos de actina contráctiles o actomiosina. PAK, el efector de Cdc42 y Rac1, inhibe las kinasas de MLC e inhibe la cadena pesada de miosina (MHC), lo que disminuye la proporción de miosina II activa. Por esta razón, se dice que Rac1 y Cdc42 tienen actividades antagónicas con RhoA, aunque compartan muchas vías de polimerización y nucleación de actina (Nayak et al., 2013). Todas estas cascadas de señalización promueven la formación de distintas estructuras de actina. El paradigma establecido es que Cdc42 genera filopodios (“varillas” de actina), Rac1 lamelipodios (“mantos” de actina) y RhoA fibras de estrés (Fibras contráctiles estructurales), pero la realidad es más compleja y algunas RhoGTPasas pueden tener actividades cruzadas y formar estructuras de actina más complejas (Steffen et al., 2017). Más aún, las Rho GTPasas pueden

regular otros procesos, como la producción de ROS (Rac1 y RhoA). La figura 3 resume a grandes rasgos la actividad de estas GTPasas.

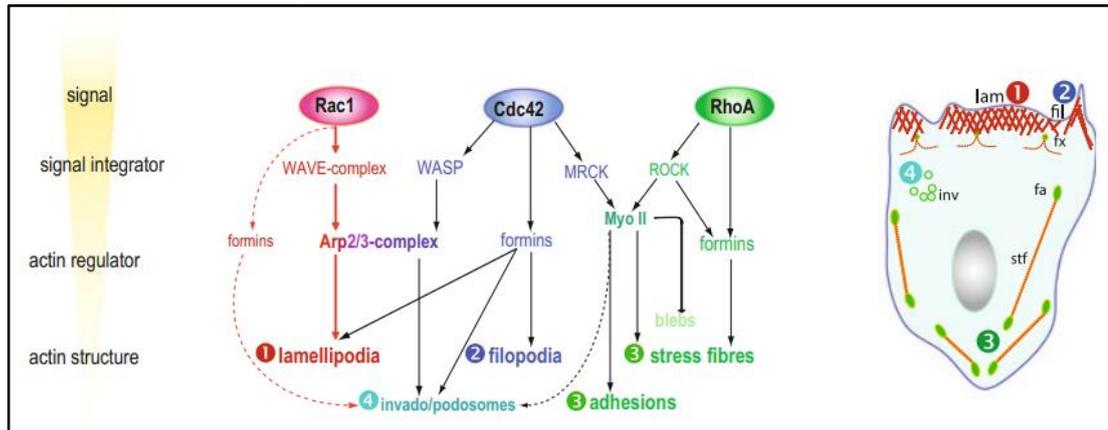


Figura 3: Principales GTPasas, sus efectores y las estructuras de actina que promueven. Rac1 regula la formación de lamelipodios principalmente por medio de su efector WAVE, el cual es capaz de estabilizar actina y además activar el complejo Arp2/3, capaz de nuclear actina. De esta forma es capaz de generar la red lamelipodial durante la migración. En cambio, Cdc42 activa principalmente WASP y N-WASP, lo que contribuye a la formación del manto lamelipodial. Adicionalmente, puede activar forminas como mDia directamente o mediante a IRSp53, lo que genera filamentos de novo que convergen en estructuras filopodiales mediado por proteínas como ena/VASP. RhoA activa su principal efector, ROCK que activa la formina mDia y además promueve la fosforilación de miosina II lo que promueve la formación de fibras de estrés y adhesiones focales. Imagen modificada de (Steffen et al., 2017).

2.2 Rac1, Cdc42 y RhoA durante la fagocitosis

La actividad de las GTPasas puede variar dependiendo del tipo de ligando unido al receptor fagocítico. Una forma muy común del estudio de la fagocitosis es mediante partículas de levadura inactivadas reconocidas por el receptor delectina-1. El receptor delectina-1 es un receptor de la inmunidad innata que es capaz de reconocer los β -1,3-glucanos de la pared celular de patógenos fúngicos, como los géneros *Candida* y *Saccharomyces*. Usar partículas inactivadas de levaduras tiene la ventaja de que delectina-1 es considerado un receptor *bona fide* de la fagocitosis, ya que su activación es suficiente para desencadenar el proceso. Además, la concentración de β -1,3-glucanos para que el receptor reconozca el ligando es muy baja (en el orden de los pM). Más aún, la dinámica de las Rho GTPasas que induce este receptor han sido bien estudiadas (Adams et al., 2008).

Durante la fagocitosis mediada por dectina-1, tanto Rac1 (y Rac2 con función redundante), Cdc42 y RhoA son reclutados a la copa fagocítica. Sin embargo, solo la actividad de Rac1, (Rac2) y Cdc42 es necesaria para la fagocitosis exitosa, como ha sido probado con versiones dominantes negativas de aquellas. Durante la formación de la copa fagocítica (Figura 4A), Cdc42 colocaliza completamente con F-actina, indicativo de que su actividad es necesaria para la formación de los pseudópodos durante la elongación de la membrana. En cambio, Rac1 comienza a aparecer en períodos más cercanos al cierre de la membrana, posiblemente por su actividad dual asociada a la dinámica de actina y la producción de ROS (Figura 4B,C). Interesantemente, se ha visto acumulación de RhoA posterior a la formación del fagosoma (Figura 4D), algo indicativo de que las Rho GTPasas no solo son esenciales para el éxito de la fagocitosis, sino que también para la maduración fagosomal (Mao & Finnemann, 2015).

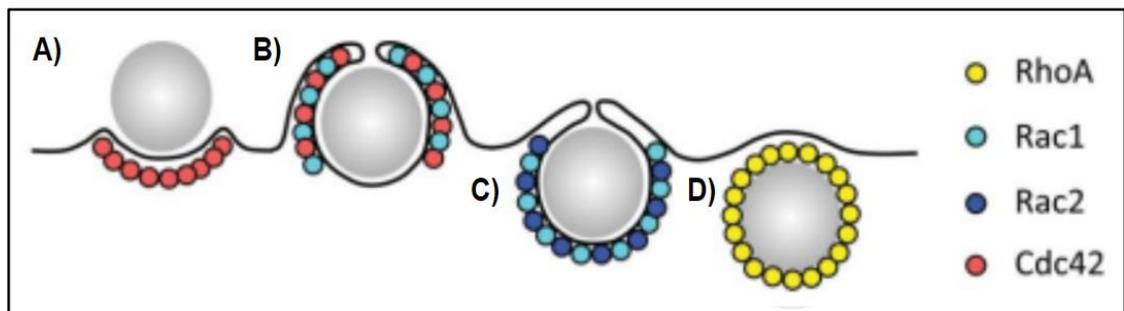


Figura 4: Rho GTPasas en la fagocitosis mediada por Dectina-1. **A)** Inicialmente hay un incremento en la actividad de Cdc42, la cuál inicia la formación del pseudópodo, la curvatura de membrana y la polimerización de actina alrededor del fagosoma. **B)-C)** Luego hay un aumento de rac 1/2 próximo al cierre del fagosoma, probablemente por su función dual de la dinámica de actina y la producción de ROS. **D)** Finalmente, se ha descrito la acumulación de RhoA después de la formación del fagosoma, indicativo de su relevancia en la maduración fagosomal. Figura modificada de (Mao & Finnemann, 2015).

3. Digiéreme, la Maduración fagosomal

Luego de internalizada la partícula, el fagosoma se desarrolla para digerir el contenido fagocitado hasta convertirse en un “fagolisosoma”. Este proceso se denomina maduración fagosomal. La maduración fagosomal se caracteriza principalmente por una acidificación progresiva del fagosoma (pH 7.4 → 4.5) mediada por V-ATPasas y la generación abrupta de ROS mediada por NOX2, que en combinación generan ácido hipocloroso (HOCl) en una reacción catalizada por mieloperoxidasas (Figura 5A). El pH ácido y la producción de ROS generan un ambiente inhóspito para patógenos e ideal para proteasas. El fagosoma adquiere distintas marcas moleculares a medida que madura, que incluye Rab5 con la unión de vesículas endocíticas tempranas, Rab7 de vesículas endocíticas tardías y finalmente Lamp1/2 con la unión de lisosomas (Kinchen & Ravichandran, 2008) (Figura 5B). El destino final del contenido fagocítico ha sido pobremente estudiado y es bastante desconocido, pero algunos autores mencionan que puede ser reciclado, liberado por exocitosis o utilizado para presentación de antígenos (Lancaster et al., 2021). También puede terminar en la fusión con otras vesículas endocíticas, como el compartimento recientemente descubierto denominado como gastrosoma (Villani et al., 2019).

En general, los mecanismos moleculares del proceso de maduración fagosomal han sido pobremente estudiadas en las células del sistema inmune, menos aún en microglías. De igual manera, la producción de ROS dentro del fagosoma durante el estallido oxidativo ha sido especialmente poco estudiada en microglías.

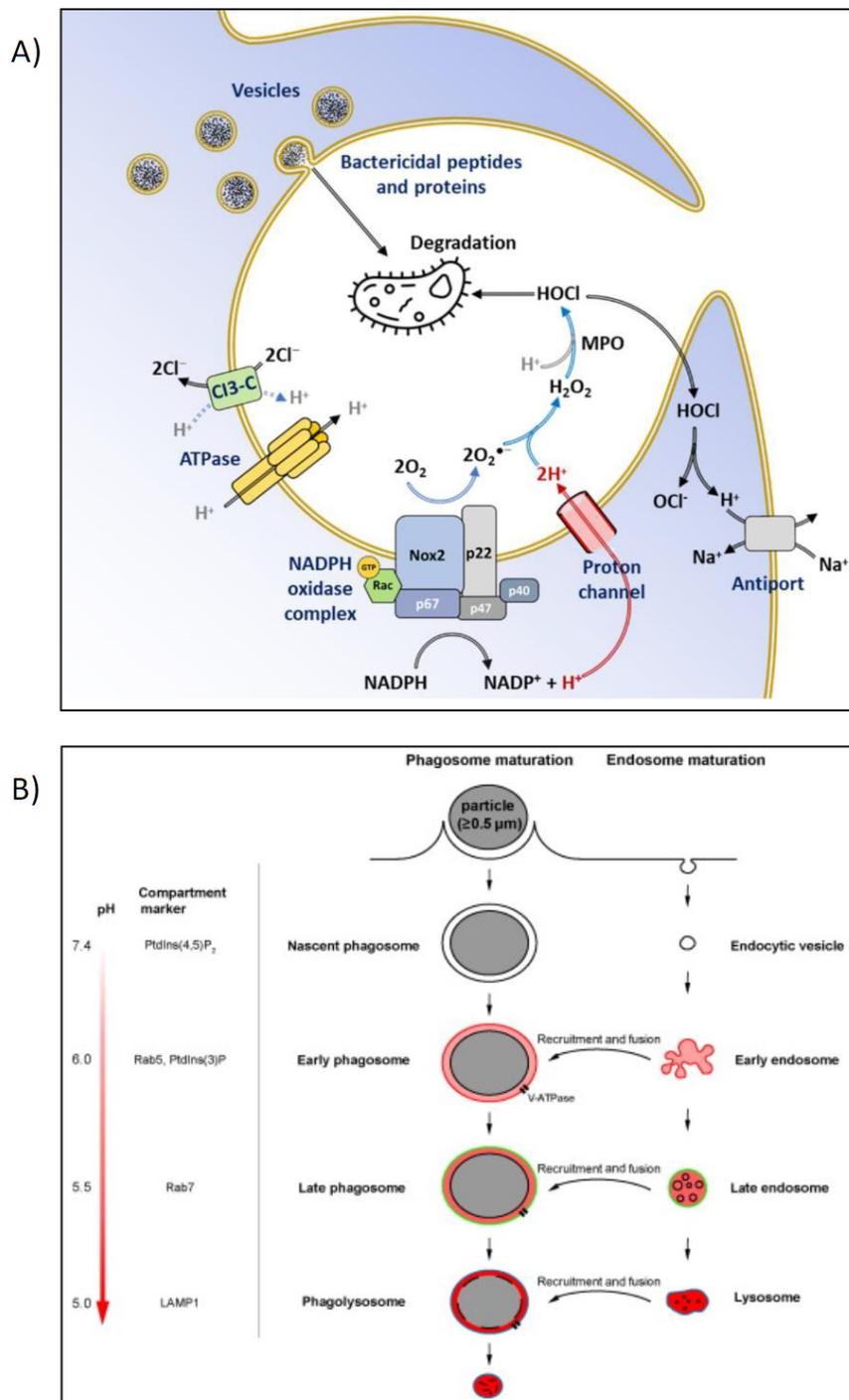
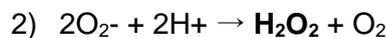
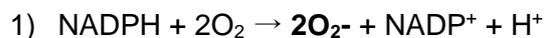


Figura 5: Maduración fagosomal. **A)** La acidificación del medio y la producción de especies reactivas de oxígeno durante la fagocitosis y la formación del fagosoma nascente. El complejo NOX2 genera ROS durante el estallido oxidativo, lo que reaccionan con el H⁺ bombeado por el complejo enzimático V-ATPasa y canales de protones, generando HOCl, un radical altamente tóxico para patógenos. Imagen adaptada de (Vermot et al., 2021) **B)** Etapas de la maduración fagosomal. El fagosoma va adquiriendo distintos marcadores a medida que va madurando, además de disminuir progresivamente su pH. Se divide en fagosoma nascente, fagosoma temprano, fagosoma tardío y fagolisosoma. Por lo general el estallido oxidativo ocurre dentro de la fagocitosis nascente y temprana, mientras que la V-ATPasa actúa incluso después de la unión de los lisosomas. Imagen adaptada de (Lu & Zhou, 2012).

3.1 Estallido Oxidativo

La producción abrupta de ROS sucede durante la fagocitosis temprana y se conoce como estallido oxidativo o respiratorio (*oxidative burst*). El estallido oxidativo está muy conservado en la señalización río abajo de los distintos tipos de receptores fagocíticos y depende principalmente del complejo NOX2. El complejo NOX2 está compuesto por Rac1, gp91phox (NOX2), p22phox, p40phox, p47phox y p67phox (Acevedo & González-Billault, 2018). Rac1 es la única RhoGTPasa que participa directamente en la producción de ROS. Sin embargo, RhoA y su efector ROCK también participan indirectamente del estallido oxidativo en la fagocitosis microglial donde ROCK es capaz de fosforilar p47phox en Ser345 y activarla (Cap et al., 2020). Una vez activado el complejo NOX2, la subunidad gp91phox oxida $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a $\text{NADP}^+ + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$ y p22phox usa los dos electrones para reducir dos moléculas de oxígeno (O_2) al radical superóxido (O_2^-). Dos moléculas de O_2^- rápidamente dismutan a H_2O_2 de forma espontánea o mediante la función de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Estas reacciones pueden ser representadas en dos ecuaciones:



En negrita se destacan las principales especies reactivas de oxígeno generadas. La primera reacción es catalizada por el complejo NOX2 y la segunda sucede de forma espontánea o es catalizada por SOD. De esta forma, se produce peróxido de hidrógeno, la principal especie reactiva de oxígeno que sirve como molécula de señalización.

A pesar de que el estallido oxidativo sea un proceso altamente conservado en la fagocitosis, ha sido principalmente estudiado en macrófagos y pobremente caracterizado en microglías, en especial su magnitud en el compartimento intrafagosomal y su duración. Como se mencionaba anteriormente, esto es principalmente por la limitación de las herramientas de estudio, por lo que resulta imperante utilizar nuevas técnicas para cuantificar el estallido oxidativo y medirlo.

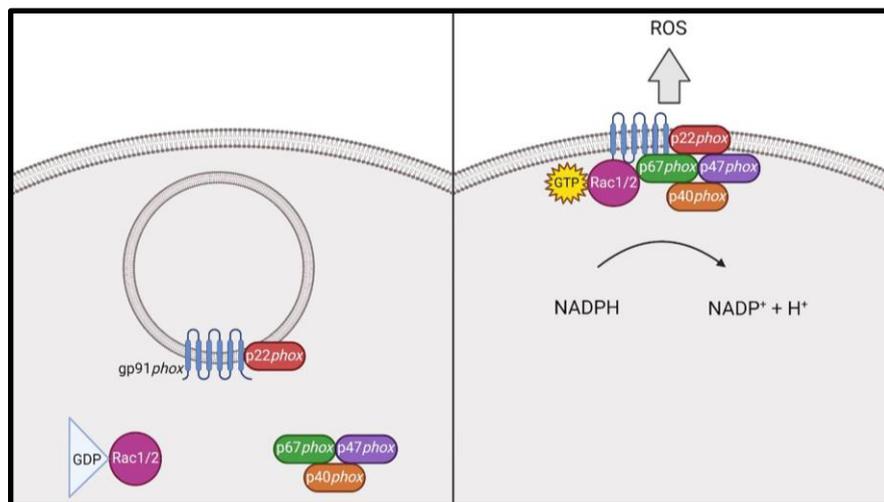


Figura 6: Reclutamiento de subunidades del complejo NOX2 durante el estallido oxidativo. Las subunidades del complejo NOX2, rac1, p67phox, p47phox y p40phox es transportado en vesículas a la membrana, donde además puede transportarse gp91phox y p22phox por rab27, o pueden ya encontrarse en la membrana. Las distintas subunidades del complejo son activadas y este se ensambla, transformando NADPH en $-O_2$ que rápidamente dismuta a H_2O_2 de forma espontánea o mediada por SOD. Foto adaptada de (Mortimer et al., 2021).

3.2 Crosstalk entre ROS y RhoGTPasas

Interesantemente, la oxidación de las GTPasas mediada por ROS es una importante modificación postraduccional (PTMs), lo que da cuenta del robusto *crosstalk* que existe entre la regulación de la dinámica de actina y la producción de ROS. La oxidación funcional ha sido descrita para Rac1, Cdc42 y RhoA, pero la de Rac1 es la más estudiada. La oxidación de Rac1 en su cisteína 18 genera un aumento de ~200 veces en el intercambio de GDP/GTP, lo que se conoce como una versión *fast cycling* (Hobbs et al., 2014). RhoA también es activable por su oxidación

en sus cisteínas 16 y 20, con la diferencia que, debido a su proximidad, algunos agentes oxidantes como NO pueden generar un puente disulfuro entre ambas cisteínas lo que inactiva RhoA (Heo et al., 2006). Hay estudios que sugieren que otras PTMs, como la fosforilación de la-Tyr42 en RhoA (PTM que a la vez es inducida por la oxidación de Src por ROS), son necesarias para la activación de RhoA mediada por ROS (Kim et al., 2017), mientras otras sugieren que la oxidación también puede generar una versión *fast cycling* análoga a Rac1-oxCys18 (Hobbs et al., 2014). A pesar de que la fagocitosis debe ser la instancia más robusta donde coincide la actividad de las Rho GTPasas con la producción de ROS, el *crosstalk* entre ambas no ha sido abordado nunca en este modelo de estudio hasta donde tiene conocimiento el autor.

3.3 Los destellos de actina

En el año 2004 se describió por primera vez que los fagosomas de células epiteliales sufrían procesos de polimerización y despolimerización cíclica de actina, lo que fue denominado como *actin flashes* (Destellos de actina) (Yam & Theriot, 2004). El 2009 se realizó una primera descripción de esto en la línea celular de macrófagos Raw264.7, donde se describe que una subpoblación de fagosomas sufre este fenómeno y es capaz de retardar la maduración fagosomal en fagocitos sobrecargados con partículas inactivadas de levadura al evitar la unión de lisosomas (Liebl & Griffiths, 2009). Recién el año 2020 se caracterizó con más detalle este fenómeno, dando evidencia de lo común del fenómeno en fagocitosis mediada por integrinas (iC3b), que RhoA está involucrada en este proceso, además de FAK, Talina, miosina II y Arp2/3 (Poirier et al., 2020).

La evidencia anterior corresponde a lo único descrito sobre el fenómeno de los destellos de actina, estudiado mayoritariamente en líneas celulares de

macrófagos y no en microglías. Más aún, la función y relevancia fisiológica del fenómeno permanece un misterio. En artículo del 2020 se hipotetiza que la acumulación transitoria de actina sería análoga a la masticación, sin embargo, no se aborda porque tendría preponderancia en algunos tipos de fagocitosis y en otros no, su mecanismo de señalización y menos aún la relevancia clínica de un fenómeno robusto. Más aún, su prevalencia en células microgliales jamás ha sido descrita, lo que podría ser fundamental puesto que la fagocitosis mediada por integrinas prepondera en procesos fisiológicos en un tejido inmunoprivilegiado como lo es el cerebro.

En general, la dinámica de actina, incluyendo estos destellos, podrían ser fundamentales para entender la maduración fagosomal, pero han sido pobremente estudiadas.

En definitiva, muy poco ha sido estudiado de la fagocitosis y maduración fagosomal en microglías:

- 1) No se ha estudiado en detalle la dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis y maduración fagosomal en microglías
- 2) No se ha medido la producción de **ROS intrafagosomal** durante la maduración fagosomal en modelos de microglías
- 3) Se desconoce la **actividad de RhoA** asociada a actina durante la maduración fagosomal en microglías.

Hipótesis:

Durante la maduración fagosomal participan el citoesqueleto de actina, la producción de ROS y la Rho GTPasa RhoA en células microgliales

Objetivo general:

Evaluar la participación del citoesqueleto de actina y la producción de ROS durante la maduración fagosomal en modelos de microglías

Objetivos específicos

1. Estudiar la dinámica de actina durante la maduración fagosomal en microglías
2. Estudiar la producción de ROS durante la maduración fagosomal en microglías
3. Evaluar la actividad de RhoA durante la maduración fagosomal en microglías

Materiales y Métodos:

1. Cultivo celular

1.1 Cultivo primario de Microglías de Rata

Co-Cultivo: El cultivo primario de microglías se obtiene a partir de un co-cultivo con astrocitos. Para ello, se utilizaron neonatos (P1-3) de ratas Wistar. El aislamiento y cultivo primario de microglías se realizó en los protocolos ya descritos (Schildge et al., 2013). Brevemente, los neonatos fueron sacrificados por inhalación de isofluorano. Luego de la disección cerebral, las cortezas fueron enzimática y mecánicamente disociadas. El conjunto de células obtenidas a partir de la disociación (principalmente neuronas, astrocitos y microglías) fueron sembradas en placas plásticas de cultivo celular T-75 tratadas previamente con Poli-D-lisina (0.1mg/ml) en medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y con 1% de antibióticos (penicilina, estreptamicina y anfotericina). En estas condiciones de cultivo celular solo prevalecen los astrocitos y microglías. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ durante 10 a 14 días. Después de este período se obtuvo una monocapa de astrocitos al 100% de confluencia sobre la cual crecieron predominantemente microglías.

Purificación de células microgliales: Las microglías se separaron de los astrocitos y otras células adherentes utilizando dos protocolos, uno de agitación suave (P1) y otro de agitación agresiva (P2).

Agitación Suave (P1): El co-cultivo se mantuvo en agitación a 240 rpm por 90 minutos a 37 °C. Luego de la agitación suave, el sobrenadante conteniendo principalmente células microgliales fue recuperado, se cuantificó la densidad celular

y se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-d-lisina (1mg/ml) en placas de cultivo con medio fresco DMEM/F12 suplementado con 10% FBS. Después de 2 horas de la siembra, se realizó un cambio de medio, para eliminar oligodendrocitos contaminantes.

Agitación Agresiva (P2): El co-cultivo se mantuvo en agitación a 240 rpm por 24 horas a 37 °C y fue suplementado con Hepes. Luego se golpeó vigorosamente 2-3 veces la placa e inmediatamente se recuperó el sobrenadante conteniendo principalmente células microgliales. La determinación de la densidad celular, la siembra y las condiciones de mantenimiento celular fueron las mismas tal como se indicó en el método de la agitación suave.

1.2 Cultivos de líneas celulares microgliales BV2

Las células BV2 fueron proporcionadas amablemente por el laboratorio del Dr. Marco Tulio Nuñez. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM 10% FBS y 1% antibióticos, a 37°C y en un ambiente humidificado con 5% CO₂. Para la mantención de las células BV2, éstas fueron subcultivadas al alcanzar 70%-80% de confluencia en proporción ~1:4, utilizando Tripsina 0,05%.

2. Tratamientos

El cultivo primario de microglías aisladas mediante el protocolo 2 se sembraron en placas de cultivo estándar previamente tratadas con poli-D-lisina (1mg/ml) y se adhirieron durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con LPS a concentraciones de 50 ng/ml y 100 ng/ml durante 24 horas, mientras que las células del grupo control fueron tratadas con el vehículo (0,5 µl de PBS 1X) en condiciones de cultivo estándar. Finalmente, se fijaron las células con para formaldehído al 4% para evaluar su morfología.

Para llevar a cabo la inhibición de ROCK con *ROCK kinase inhibitor* (SigmaAldrich Cat. No 555550) y medir su efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se trataron células de microglías primarias con concentraciones de 50 μ M y 100 μ M durante 2-3 horas con dicho inhibidor. En el caso de las células control, se les agregó el vehículo (DMSO). Posteriormente, se realizaron ensayos de fagocitosis con *beads* acoplados a Oxyburst.

3. Transfecciones y expresión ectópica de plasmidios

Contrario a lo esperado, obtuvimos una baja eficiencia de transfección de células BV2 utilizando el método estándar de transfección con Lipofectamina 2000, por lo que se implementaron diversas estrategias para optimizar las condiciones de transfección en cada experimento y plásmido. En particular, se optó por utilizar dos métodos químicos de Lipofección, *TurboFect transfection reagent* y *Lipofectamine 3000* (Ambos Thermo Fisher Scientific), ya que demostraron ser los métodos más eficaces para transfectar las células BV2. Se utilizó TurboFect para la transfección de LifeAct-GFP debido a su rendimiento superior en comparación con otros métodos (Figura 7E). Por otro lado, Lipofectamina 3000 fue utilizada y optimizada para las co-transfecciones de Utrophin mScarlet y RhoA-FRET 2G.

Para la transfección con LifeAct-GFP, las células se sembraron en placas de 35mm el día previo a la transfección para alcanzar una confluencia de ~80%. Para la generación de los complejos, se siguieron las indicaciones del fabricante. Se realizó el cambio de medio a las 4 horas de incubación con los complejos.

Para las co-transfecciones de Utrophin mScarlet y RhoA-FRET 2G con Lipofectamine 3000, se utilizaron las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, se optimizó la cantidad de DNA utilizada y el tiempo de incubación con los complejos para aumentar la viabilidad y eficiencia de la transfección. Específicamente, se encontró que 8 µg de DNA y 3 horas de incubación fueron las condiciones óptimas para la transfección. Pasadas las 3 horas, se cambió el medio de cultivo con medio fresco.

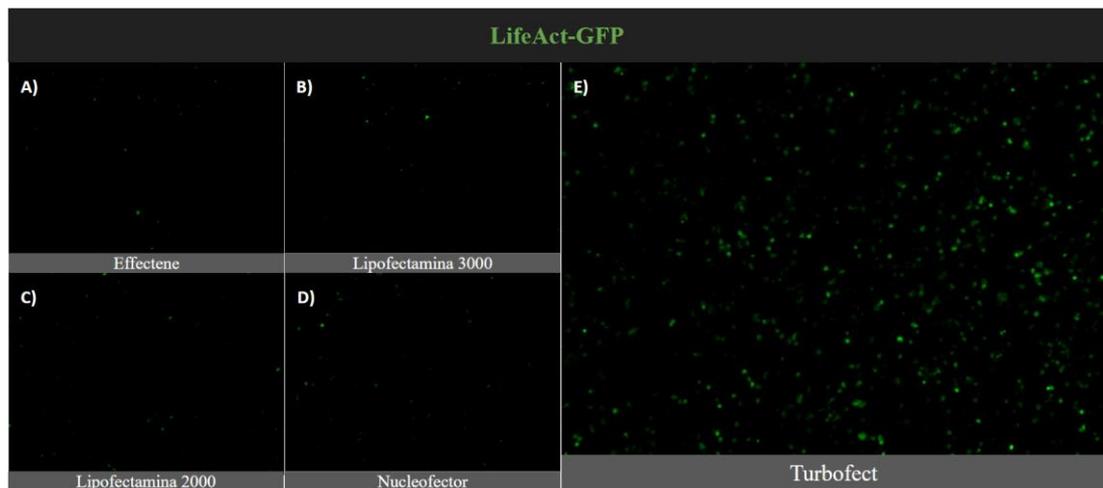


Figura 7: Transfección LifeAct-GFP de células BV2 con distintos métodos. A) Transfecciones con effectene de acuerdo a indicaciones del fabricante, **B)** Transfecciones con lipofectamina 3000, con cambio de medio a las 4h **C)** Transfecciones con Lipofectamina 2000 con cambio de medio a las 4h, **D)** Transfecciones con Nucleofector (Lonza, programa CM-158, Kit SF), **E)** Transfecciones con Turbofect con cambio de medio a las 4h.

4. Generación de *Beads* fagocitables

Preparación de *Beads*

La línea de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* S288C fue proporcionada amablemente por el laboratorio de la Dra. Jennifer Alcaíno. Se aislaron colonias y crecieron por 24 horas a 27°C en 20 ml de medio YPD, con una agitación constante a 220 rpm. Las levaduras se aislaron, se resuspendieron en agua destilada y se inactivaron por 60 minutos a 95 °C. Los agregados de levaduras muertas se filtraron utilizando un *cell strainer* (tamaño de malla de 40 µm) y se centrifugaron a 1100 g por

5 minutos. Luego, el pellet conteniendo las levaduras inactivas se resuspendió en buffer bicarbonato 0.1M a pH 8.3 y se determinó el número celular (desde ahora “*beads*”) en una cámara de Neubauer. La suspensión se ajustó a una concentración de 109 *beads*/ml. Se prepararon alícuotas de 200 µl y se guardaron a -20 °C para su uso posterior.

Preparación de *Beads* fluorescentes

Para el acoplamiento (marcaje) de las *beads* con el fluoróforo Alexa Flúor 488 NHS, las alícuotas de las *beads* se lavaron 2 veces con buffer bicarbonato 0.1M a pH 8.3 y se incubaron con exceso de la sonda Alexa Flúor 488 NHS por 60 minutos en agitación rotatoria, obteniendo el marcaje fluorescente de las *beads*. Para remover el exceso de tinción, se realizaron 5 lavados de 1 ml por 10 minutos con buffer Tris 1M a pH 8.0 por centrifugación a temperatura ambiente y en un rotador de tubos. Finalmente, las *beads* fluorescentes fueron resuspendidas en 200 µl de buffer bicarbonato 0.1M a pH 8.3 y se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Las alícuotas se guardaron a -20°C para usos posteriores.

Preparación de *Beads* acopladas a OxyBURST

Para el acoplamiento de las *beads* con la sonda OxyBURST™ Green H2DCFDA, SE (Thermo Fisher Scientific; D2935), se resuspendió 5mg de la sonda en 500µl de DMSO (Bajo campana y en oscuridad) y se prepararon 10 alícuotas de 50 µl en tubos ámbar de 1,5 mL. Luego, se realizó una rápida inyección de N2 para eliminación del oxígeno y las alícuotas se guardaron a -20°C. Posteriormente se realizó la eliminación del oxígeno del buffer bicarbonato 0.1M (pH 8.3), del buffer Tris 1M (pH 8.0) y de la solución de PBS 1X mediante 60 minutos burbujeo con N2.

Rápidamente se realizaron 3 lavados de una alícuota de beads con 200 μ l de buffer bicarbonato 0.1M a pH 8.3 desgaseado. Luego, las beads fueron incubadas con la sonda OxyBURST durante 60 minutos en agitación rotatoria a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar el exceso de la sonda, las beads fueron lavadas 4 veces por 10 minutos cada uno con 200 μ l de buffer Tris 1M pH 8.0 en agitación rotatoria, para bloquear los grupos NHS (Figura 8a) a temperatura ambiente. Luego, se realizaron múltiples lavados adicionales de 1 ml de PBS 1X desgaseado, entre 5-6, recuperando el sobrenadante y verificando la presencia de la sonda en exceso con un transiluminador UV (Figura 8b). Se realizó un lavado de 16h con 1ml de PBS 1X desgaseado en el rotador de tubos. Al día siguiente se realizaron 4-5 lavados adicionales hasta que el sobrenadante presentase un mínimo de fluorescencia (Figura 8c). Se hicieron 4 alícuotas de 50 μ l de *beads* conjugadas con OxyBURST y se guardaron a -20°C para futuros usos.

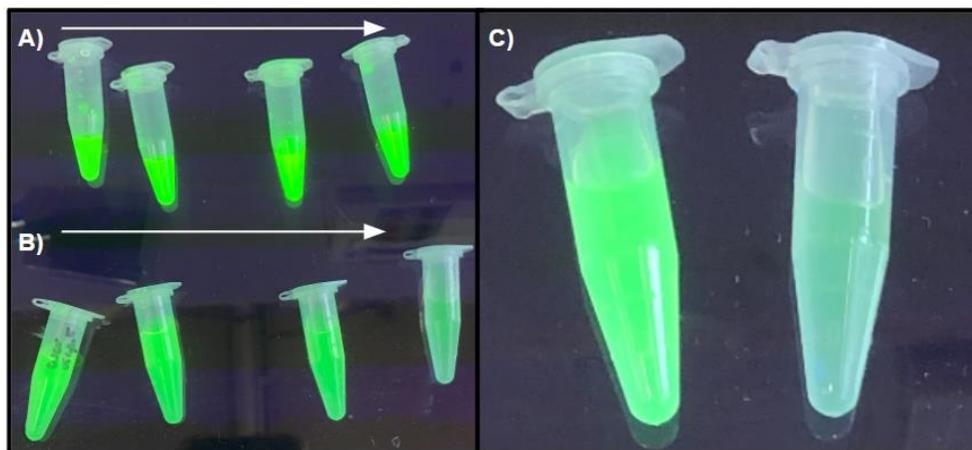


Figura 8: Fluorescencia del sobrenadante para lavados de partículas con OxyBURST. **A)** Sobrenadante de partículas lavadas con $\sim 200 \mu$ l de buffer Tris 1M pH 8.0 desgaseado, iluminados con luz UV. La flecha indica el aumento en el número de lavados. Con los primeros lavados no se observó una disminución significativa de la fluorescencia, lo que implica la presencia de exceso de la sonda. **B)** Sobrenadante de partículas lavadas con ~ 1 ml de PBS 1X desgaseado, iluminados con UV. La flecha indica el aumento en el número de lavados. Se observó una disminución progresiva de la fluorescencia, indicativo de que se está reduciendo el exceso de la sonda. De todas formas, se dejó lavando por 16h. **C)** Sobrenadante de partículas lavadas con ~ 1 ml de PBS 1X desgaseado el segundo día, iluminados con UV. El tubo de la izquierda corresponde al sobrenadante del primer lavado mientras que el tubo de la derecha corresponde al sobrenadante del último lavado.

5. Inmunofluorescencia

5.1 Muestras:

Se utilizaron células aisladas con ambos protocolos de purificación de microglías primarias de rata, que provenían de neonatos entre P0 - P3.

5.2 Anticuerpos:

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-IBA1 (Rabbit, 1:200), CD11b (Rat, 1:50), β -actina (Mouse, 1:200) y Rab5 (Mouse, 1:200). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa Fluor 488, 546 y 670.

5.3 Procedimiento:

Las células se cultivaron sobre vidrio en placas de cultivo estándar y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Después de la fijación, se realizaron tres lavados por 5 minutos con PBS 1X. Se permeabilizó con una solución de Tritón X-100 al 0,2% durante 5 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y luego, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario, se bloqueó con BSA 5% previamente filtrado y disuelto en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la respectiva dilución del anticuerpo primario en PBS 1X con 1% de BSA y se incubó durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario en la solución PBS 1X con 1% de BSA. Se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y, finalmente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1X. De corresponder, el primero de los últimos 3 lavados se realizó con DAPI en oscuridad y a temperatura ambiente para marcar el núcleo celular.

6. Microscopía de células fijadas

6.1 Ensayo de fagocitosis temprana

Para identificar células durante fagocitosis temprana, se plaquearon 50.000 microglías primarias de rata en pocillos p24 y al día siguiente, se añadieron 106 *beads* acoplados a un Alexa Fluóor 488. Después de 15 minutos, se realizó un lavado para que solo los *beads* adheridos a las microglías permanecieran en el campo. Luego, se permitió que continuara la fagocitosis por 15 minutos para posteriormente fijar las células con 4% de para-formaldehído. De esta forma, se esperaba observar fagosomas con 15-30 minutos de vida (Fagosomas tempranos).

6.2 Adquisición de imágenes

Para ambos métodos de purificación de microglías primarias de neonatos de rata, se realizaron adquisiciones con los láseres 405, 488, 546 y 670 para ver las distintas inmunotinciones en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 a una resolución de 1024 x 1024 y una profundidad de 16 bits. Se adquirieron de 10-20 campos aleatorios a una magnificación de 40X de cada condición.

Las mismas condiciones de adquisición se utilizaron para los destellos de actina en células fijadas de microglías primarias. Además, se adquirieron *Z Stack* con 20-25 planos por imagen, con un pinhole de 0.5 unidades de Airy para obtener la mejor resolución en Z.

6.3 Análisis de Imágenes

Para el análisis y montaje de las imágenes se utilizó el software ImageJ de Fiji, donde comparando los marcajes en el canal de DAPI e IBA1 se estimó la pureza de los cultivos. Para el análisis de colocalización entre IBA1 con β -actina y DAPI, se

utilizó el plugin de imageJ *Coloc 2* sin máscara ni ROI, sino que con el campo completo, utilizando campos de microglías aisladas. Se utilizó el umbral *Bisection* para estimar el coeficiente de correlación de Pearson, umbral que se basa en la mediana de la distribución de intensidad de píxeles en cada canal de imagen por lo que es menos susceptible a las variaciones en la intensidad de cada canal en comparación con el comúnmente usado umbral *Costes*. Esto es especialmente importante dado la saturación de la señal de IBA1 en el núcleo. Los coeficientes de Pearson obtenidos sobre el umbral fueron agrupados por análisis de colocación (IBA1 con DAPI e IBA1 con β -actina) contra cada tratamiento (Control, LPS 50ng/ml, LPS 100ng/ml) en GraphPad Prism y analizados estadísticamente mediante Two-Way Anova utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$ y una corrección post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples entre los tratamientos. Los resultados fueron graficados mediante el mismo programa. Como se utilizó el campo completo en el análisis de colocación, se aplicó una corrección post-hoc basada en la contribución ponderada de cada campo de acuerdo a su respectivo número de células, para así determinar si había cambios importantes. Sin embargo, como no hubo variaciones importantes en el promedio, se consideró que los resultados de campo completo representan adecuadamente la contribución de las células que ellos contienen. De todas formas, los promedios ponderados se encuentran transparentados en el Anexo I.

Para cuantificar los destellos de actina, se realizaron proyecciones en Z y se analizaron los planos uno por uno, definiendo los ROIs de interés para la cuantificación.

7. Microscopía de células vivas

7.1 Modelo *in vitro*

Se utilizó como modelo principal células BV2 y microglías primarias de rata, aunque se experimentó puntualmente con las líneas celulares COS7 y C8D1A.

7.2 Ensayos fagocíticos, Dinámica y destellos de actina

Las células se sembraron en placas con fondo de vidrio de 35 mm a una densidad del ~80%. Para la adquisición de imágenes, se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 710, donde se utilizó campo claro, un filtro de excitación de 458 nm, 488 nm y 546 nm dependiendo del ensayo. Con el objetivo de monitorear los procesos dinámicos del citoesqueleto se realizaron *Timelapses* en intervalos regulares de entre 15 y 60 minutos, con la adquisición de imágenes cada 15 segundos para todos los experimentos. También se utilizó una resolución de 1024 x 1024 y una profundidad de 16 bits en todas las adquisiciones. Para ver la dinámica de actina en células transfectadas con LifeAct-GFP, se utilizó campo claro y excitación de 488 nm. En cuanto a la adquisición de las células co-transfectadas con Utrophin-mScarlet y el sensor FRET de RhoA, se utilizó excitación 546 nm y 458 nm respectivamente. Para el sensor se registró simultáneamente el espectro de emisión de CFP (458-490nm) e YFP (503-532nm). Adicionalmente, se realizaron adquisiciones puntuales de células COS7 y C8D1A en condiciones similares, con excitación de 488 nm (para visualizar beads acoplados a AF488) y campo claro.

Previo a cada ensayo de fagocitosis con células BV2 previamente transfectadas, se realizaron adquisiciones preliminares para evaluar la dinámica normal de actina y/o actividad de RhoA, verificando ausencia de fototoxicidad, *photobleaching*, señales de estrés celular y/o apoptosis con los parámetros de

adquisición. Después de asegurar que las condiciones fuesen óptimas, se agregaron 6 μL de la suspensión calibrada a una densidad de 109 beads/mL, previamente disgregadas y diluidas en 200 μL del medio de cultivo, para una difusión rápida, todo realizado *in situ*. Después de agregar las *beads*, comenzaron de inmediato los registros, con un tiempo total aproximado de 6-7 horas por réplica. Para garantizar la viabilidad celular en estos prolongados períodos de adquisición, se mantuvieron las condiciones de temperatura a 37 °C con una cámara de incubación y la presencia de tampón Hepes para controlar la acidificación.

7.3 Ensayos fagocíticos, Estallido Oxidativo:

Para el análisis del estallido oxidativo, se utilizaron 50.000 células por pocillo en placas de cultivo estándar de 24 pocillos (p24) y se agregaron 106 *beads* acopladas a OxyBurst (por pocillo), los cuales fueron previamente disgregados y diluidos en 200 μL de medio en condiciones de esterilidad. Inmediatamente las células fueron trasladadas al microscopio de epifluorescencia automatizable LionHeart FX. El microscopio se configuró previamente para adquirir imágenes con una magnificación de 20X, con registros tomados cada 15 segundos y una excitación de 488 nm más contraste de fase. Las adquisiciones se realizaron manteniendo las condiciones de temperatura a 37°C con 5% de CO₂ y en un ambiente humidificado para asegurar la viabilidad celular.

Para determinar el rango dinámico de las *beads*, se realizó un ensayo de fotooxidación en microscopio confocal Zeiss LSM 710 con la lámpara en luz verde (modo de epifluorescencia). Para esto, el campo completo fue excitado por ~60s con longitud de onda de 488 nm. Se compararon los campos fotooxidados con los no-excitados para determinar el rango dinámico del OxyBurst. Los resultados se encuentran en el Anexo IV.

7.4 Análisis de imágenes

Para el análisis de los ensayos de la evaluación de la dinámica y destellos de actina en células vivas expresando el sensor Lifeact-GFP se utilizó principalmente el software ImageJ. Para la cuantificación de la fluorescencia durante los destellos de actina, se definieron manualmente las regiones de interés (ROIs) para cada fotograma y se normalizaron utilizando el valor mínimo del registro. Los resultados de intensidad media normalizada se graficaron con respecto al tiempo utilizando GraphPad Prism. Se calculó la duración de los destellos como la diferencia de tiempo entre los picos de intensidad de fluorescencia en cada uno de los registros. Las imágenes representativas de los destellos también se montaron en ImageJ. El fenómeno de *CaAR* fue cuantificado también con ImageJ, mediante ROIs manuales para el fagosoma y el núcleo, pero mediante *threshold* y filtros binarios para tomar los bordes de la célula y cuantificar la actina cortical.

Para el reescalado de las imágenes seleccionadas y montadas en ImageJ (Figura 11) se utilizó un interfaz de aplicación de programación (API) de superresolución disponible de forma online en la página de DeepAI, el cual se basa en el modelo de *Super Resolution Generative Adversarial Network* entrenado en PyTorch (Torch-SRGAN) y pre-entrenado por la misma compañía. El modelo de escalado SRGAN fue utilizado solo para mejorar la definición de las estructuras, sin embargo, las imágenes son solo representativas, pero no son cuantificables y las subestructuras no son reales. En el Anexo II están las imágenes crudas.

Para determinar la eficiencia del FRET, se utilizó el método de *sensitized* FRET (SE-FRET) basado en la emisión de aceptor y donador al excitar solo el donador calculado de la siguiente manera:

$$1) FRET_{SE} = \frac{F_{AD}}{F_D + F_{AD}}$$

donde FAD es la fluorescencia del aceptor al excitar el donador y FD es la fluorescencia del donador al excitar el donador. Con imageJ, se realizó un *threshold* del aceptor para determinar las intensidades de fluorescencia a tomar. Con este, se creó una máscara binaria y se dividió por la suma de los canales según se muestra en la ecuación 1. Las imágenes fueron posteriormente cuantificadas usando ROIs.

Para analizar las imágenes del estallido oxidativo, se utilizó el plugin *Time series analyzer V3* de imageJ, se definieron los ROIs con la opción de auto ROI, se definieron los *recenter parameters* con límite de convergencia de 0.1 píxeles, 241 iteraciones (una para cada frame) y 0.5 el valor del factor máximo de reescalado. Se midió el *mean gray value* con la opción *get average* y se graficaron los resultados individuales de cada ROI vs el tiempo en Graphpad Prism. La curva promedio con su respectivo error asociado fue graficada. Se realizó un *fit* de una curva logística del promedio junto con su coeficiente de correlación de Pearson al cuadrado (R²) para posterior análisis. En el mismo GraphPad Prism se obtuvo la primera derivada (sin *smooth*) del *fitting* de la curva, la cual fue graficada. Adicionalmente, se calculó la derivada discreta de los datos brutos (sin *smooth*) y se graficaron. Adicionalmente, se realizó un *smooth* a las derivadas, pero *a posteriori*, para eliminar el ruido por pequeños cambios de foco. Es importante destacar que, para no generar artefactos, los ROIs se definieron siguiendo los siguientes criterios:

- 1) La señal de fluorescencia de un ROI no debe solaparse con otro ROI durante todo el registro.
- 2) No se deben incluir *beads* que tengan cambios de foco muy abruptos.

3) No deben elegirse ROIs dentro de cúmulos de beads. El recentrado no discrimina fácilmente entre cada *bead* del cúmulo y su movimiento, lo que dificultará el seguimiento y alterará las mediciones.

4) El registro debe dar muestras claras de fagocitosis en el *bead* medido y este debe estar dentro de la célula por al menos 30 minutos. Un aumento de la fluorescencia sobre el ruido es indicativo de interiorización, ya que las esterasas removieron los grupos protectores del Oxy-Burst y el *bead* comenzó a oxidarse por acción de ROS intrafagosomal.

8. Generación de Mutantes de RhoA y Rac1 2G-FRET

8.1 Partidores

Para generar las mutantes de Rac1 y RhoA, se diseñaron los partidores apropiados con SnapGene (Tabla 1) utilizando como templado los plásmidos obtenidos en addgene; RhoA WT (Addgene 15899), RhoA GFP (Addgene 12965), RhoA FRET-2G (Addgene 40176) y Rac1 FRET-2G (Addgene 66110). Se trataron de cumplir los siguientes parámetros para el diseño de partidores:

- 1.- Los partidores deben ser complementarios entre ellos.
- 2.- Longitud de al menos 10-20 nucleótidos no mutados en ambos extremos.
- 3.- De preferencia, las bases mutadas deben estar en el centro.
- 4.- El contenido de GC debe ser del 40%-70%.
- 5.- La T_m debe estar entre 75-85 °C excluyendo la zona mutada.
- 6.- El partidor debe empezar y terminar con al menos una G o C.

Cuando no era posible generar un partidador que cumpliera todas las condiciones, se priorizó en el orden establecido (1 más importante, 6 menos importante).

Partidor	Secuencia	Tm (°C)	%GC
Rac1_Q61L_F	GGGATACAGCTGGACTAGAAGATTATGACAGATTACGCCCCC	66.0	50,0%
Rac1_Q61L_R	GGGGGCGTAATCTGTCATAATCTTCTaGTCCAGCTGTATCCC	66.0	50,0%
Rac1_T17N_F	GGGAGACGGAGCTGTAGGTAAAAaTTGCCTACTGATCAG	64.9	48,7%
Rac1_T17N_R	CTGATCAGTAGGCAATTTTTACCTACAGCTCCGTCTCCC	64.9	48,7%
RhoA_C16A_F	GATTGTTGGTGATGGAGCCgcTGGAAAGACATGCTTGCTC	68.2	52,5%
RhoA_C16A_R	GAGCAAGCATGTCTTTCCAgcGGCTCCATCACCAACAATC	68.2	52,5%
RhoA_C16/20A_F	GGAGCCGCTGGAAAGACAGCCTTGCTCATAGTTAACAGCA	68.5	52,5%
RhoA_C16/20A_R	TGCTGTAACTATGAGCAAGGCTGTCTTTCCAGCGGCTCC	68.5	52,5%

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para las mutagénesis sitio dirigida con su respectivo plásmido base, Tm y % de GCs

8.2 Procedimiento

Para la mutagénesis sitio dirigida, se usó como referencia el método de dos *single primer reactions in parallel* (SPRINP) elaborado por (Edelheit et al., 2009) con ligeras modificaciones (Tabla II). Con un termociclador MultiGene™ Mini (TC020-24-230V), se realizó un PCR con una denaturación inicial de 3 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 40s 95°C, 40s a 58°C y 5 min a 72°C. Finalmente se realizó una elongación de 30 min a 72°C. Ambos productos corridos en paralelo se combinaron en un solo tubo y se realizó el *reannealing* aleatorio disminuyendo paulatinamente la temperatura (Tabla III). La digestión del ADN plasmidial metilado se realizó con 30U de enzima DpnI (BioLabs R0176S) por 16h a 37°C. Se transformaron en bacterias competentes *Escherichia coli* DH5-α con 3 uL de producto y se sembraron en placas LB-Agar a 37°C por 16h. Se aislaron colonias y crecieron en LB líquido en agitación por 16h a 37°C. Finalmente se purificó el ADN plasmídico mediante un kit Mini Prep

(Thermo Fisher), cuyo resultado fue verificado mediante secuenciación de Sanger mediante el uso de partidores universales.

Componente	Reacción 1	Reacción 2
DNA plasmidial	~500 ng	~500 ng
Forward primer (10µM)	1,25 µl	-
Reverse primer	-	1,25 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl	0,5 µl
Platinum™ SuperFi™ (2U/uL)	0,25 µl	0,25 µl
5X SuperFi™ GC Enhancer (opcional)	5 µl	5 µl
5X SuperFi™ Buffer	5 µl	5 µl
Volumen final (H2O) agua ultrapura	25 µl	25 µl

Tabla 2: Materiales necesarios por reacción

Paso	T °C	Tiempo (min)
1	95	5
2	90	1
3	80	1
4	70	0.5
5	60	0.5
6	50	0.5
7	40	0.5
8	37	Holding

Tabla 3: Tiempos para Re-annealing

Resultados

Objetivo 1:

Estudiar la dinámica de actina durante la maduración fagosomal de microglías BV2

1. Caracterización y estandarización de ensayos fagocíticos en células microgliales.

1.1 Modelos de estudio de células microgliales

Debido a que los ensayos de fagocitosis no se habían realizado previamente en el laboratorio, se estandarizó un protocolo para evaluar la fagocitosis microglial. Para esto se utilizó como modelo de estudio la línea celular de microglías BV2, que se originan de microglías primarias de ratones C57/BL6 que fueron inmortalizadas con los factores de transcripción v-raf y v-myc en el año 1990 (Blasi et al., 1990). Las células BV2 son la línea de microglías más utilizada y caracterizada a la fecha, por lo que hay más literatura sobre esta en comparación a otros tipos celulares, como las líneas N9 y HAPI (Timmerman et al., 2018). Además, las células BV2 poseen una respuesta inflamatoria similar a las células microgliales primarias (Henn et al., 2009). Finalmente, a diferencia de otros modelos como las células HCM3, las células BV2 expresan funcionalmente el complejo NOX2, esencial para los procesos de fagocitosis y maduración fagosomal (Li et al., 2009).

Generación de *Beads* fagocitables

Para los ensayos fagocíticos, se generaron partículas inactivadas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa S288C tal como se detalla en la sección de materiales y métodos, referidas en este trabajo como “*beads*”. Las *beads* de levadura presentan ventajas importantes respecto a las *beads* de látex comúnmente usados en ensayos de fagocitosis. Las *beads* de levadura presentan una rigidez relativamente baja de 5,09 1,51 mPa (Chang et al., 2021) (módulo de Young) comparado con ~3000 mPa (Según Ficha técnica de Thermo Fisher) de *beads* de látex, lo que las hace digeribles. Sin embargo, siguen siendo más rígidas que otros tipos de cargo como RBCs o restos apoptóticos (Vorselen et al., 2020). Además, las levaduras poseen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que permiten reconocer las partículas sin opsonización. Lo más destacable de utilizar *beads* con levaduras, es que es posible conjugar distintas sondas fluorescentes a las aminas primarias de sus proteínas de membrana, algo esencial para el marcaje fluorescente. Aprovechando esta cualidad, se conjugaron los *beads* generados con un Alexa Flúor 488 NHS para caracterizarlos por microscopía confocal. Se evaluó el diámetro de Feret de las *beads* (diámetro entre los dos puntos más lejanos) el cual fue alrededor de 4 μm , con la mayoría de las partículas concentradas entre los 4-5 μm (Figura 9C, D). Esto representa una baja heterogeneidad y es importante ya que se ha reportado que no hay diferencias significativas entre la mecánica fagocítica de partículas entre 3 y 9 μm de diámetro (Vorselen et al., 2020).

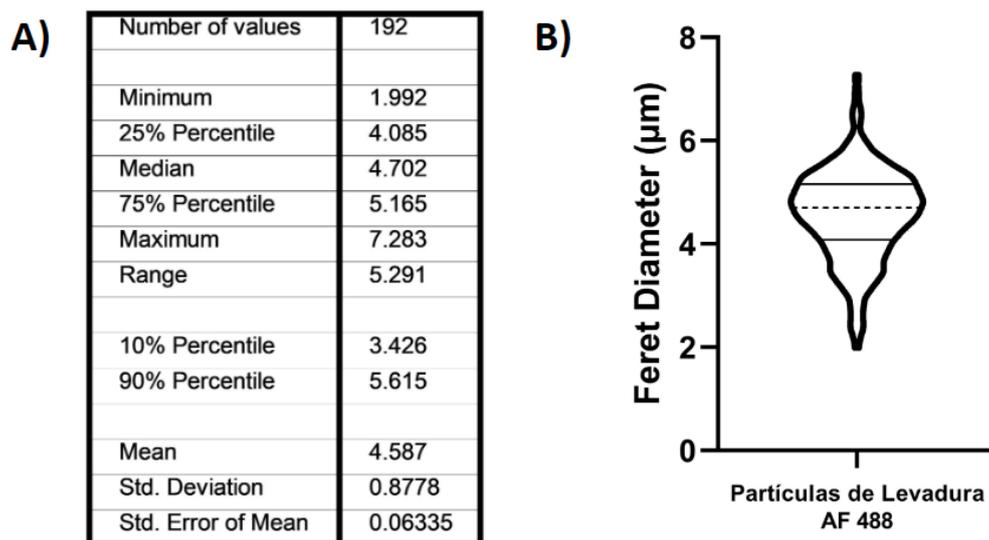


Figura 9: Caracterización de Beads Fluorescentes. **A)** Resultados estadísticos de distintas mediciones de partículas individuales. **B)** Gráfica del diámetro de Feret de partículas de levadura. Barra de escala: 30 μm

1.2 Ensayos de Fagocitosis en células BV2.

Luego de haber generado y caracterizado las *beads* fluorescentes de levadura, se realizaron ensayos de fagocitosis en las células BV2. Mediante microscopía de epifluorescencia y contraste de fase, se registró el proceso de fagocitosis. Tras la aplicación de las *beads* de levaduras, las células BV2 fueron capaces de fagocitar rápidamente estas partículas fluorescentes de levadura en un corto período de tiempo (menor a 5 min) (Figura 10A). Además, durante este proceso se observó la extensión de estructuras celulares que podrían corresponder a pseudópodos y a la formación de la copa fagocítica (Figura 10C).

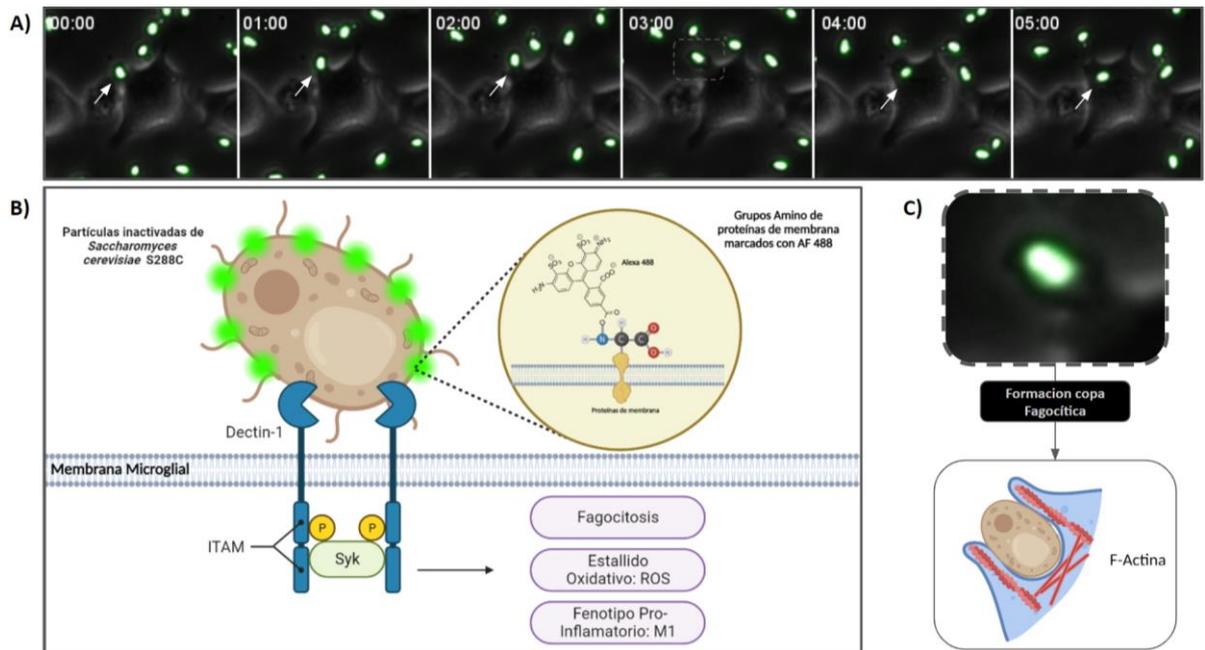


Figura 10: Ensayo Fagocitosis en la línea celular microglial BV2. **A)** Imágenes representativas de fagocitosis de beads inactivados de levadura. Las flechas blancas indican el bead interiorizado. En $t = 3:00$ minutos, se ve la formación de una estructura que parece ser la copa fagocítica (Cuadrado punteado). **B)** Esquema representativo del ensayo fagocítico desarrollado. Las partículas inactivadas de levaduras poseen proteínas de membrana, cuyos aminoácidos fueron acoplados a un AF 488, NHS en sus aminas primarias. El receptor de Dectina-1 reconoce los β -1,3-glucanos de la pared de las levaduras, iniciando una cascada de transducción que induce la fagocitosis, el estallido oxidativo y un fenotipo pro-inflamatorio. **C)** Acercamiento de lo que parece ser la formación de la copa fagocítica característica del zipper model, donde debiese haber polimerización de F-actina, como se ve en el esquema.

Por otra parte, como control y especificidad del proceso de fagocitosis se evaluó la capacidad de incorporación de *beads* de células no fagocíticas. Para esto, se utilizó la línea celular COS7 y la línea celular de astrocitos C8D1A ya que se ha reportado que los astrocitos cooperan en la labor microglial realizando *bystander phagocytosis*, que es el nombre que se le da a la fagocitosis poco eficiente que pueden hacer células no fagocíticas para asistir en la respuesta inmune. Se observó que no hubo eventos de fagocitosis con ninguno de estos tipos celulares (Figura 9A, B), lo que sugiere que la fagocitosis de patógenos fúngicos puede ser específico para fagocitos especializados como microglías, al menos de levaduras inactivadas.

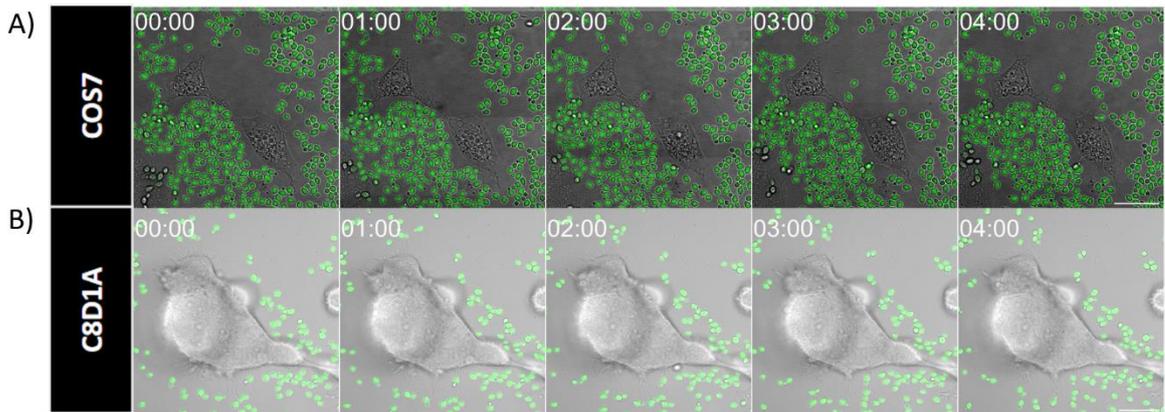


Figura 11: Células COS7 y C8D1A no realizan fagocitosis de *beads* fluorescentes **A)** Imágenes representativas de timelapses de células COS7 desafiadas con partículas de levaduras inactivadas. **B)** Imágenes representativas de timelapses de células C8D1A desafiadas con partículas de levadura. Barra de escala: 30 μ m

1.3 Dinámica de Actina durante la fagocitosis

Considerando la capacidad fagocítica de las células BV2 y las estructuras celulares observadas (mediadas principalmente por el citoesqueleto de actina) en el proceso fagocítico, se evaluó la estructuración y dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis de los *beads*. Para ello, se realizó la transfección de células BV2 con Lifeact-GFP, un sensor fluorescente del citoesqueleto de actina y se registró del proceso de fagocitosis microglial de *beads* de levadura (*beads* sin marcaje). Como se muestra en la figura 12, durante el procesos de fagocitosis se observó la adherencia de los *beads* (Figura 12.1), seguida de la acumulación de actina cortical (Figura 12.2), la extensión y retracción de protusiones filopodiales correspondientes a la formación de la copa fagocítica (Figura 12.3,4), el cierre de la copa fagocítica sobre la partícula (Figura 12.5,6), la formación del fagosoma (Figura 12.7) y finalmente la despolimerización secuencial de actina desde la parte anterior a posterior del fagosoma (Figura 12.8-16), consistente con el *zipper model* de la fagocitosis (Tollis et al., 2010). Estos datos corroboran la capacidad fagocítica de las

células BV2 y sugieren que el citoesqueleto de actina participa activamente y es fundamental durante este proceso en células microgliales.

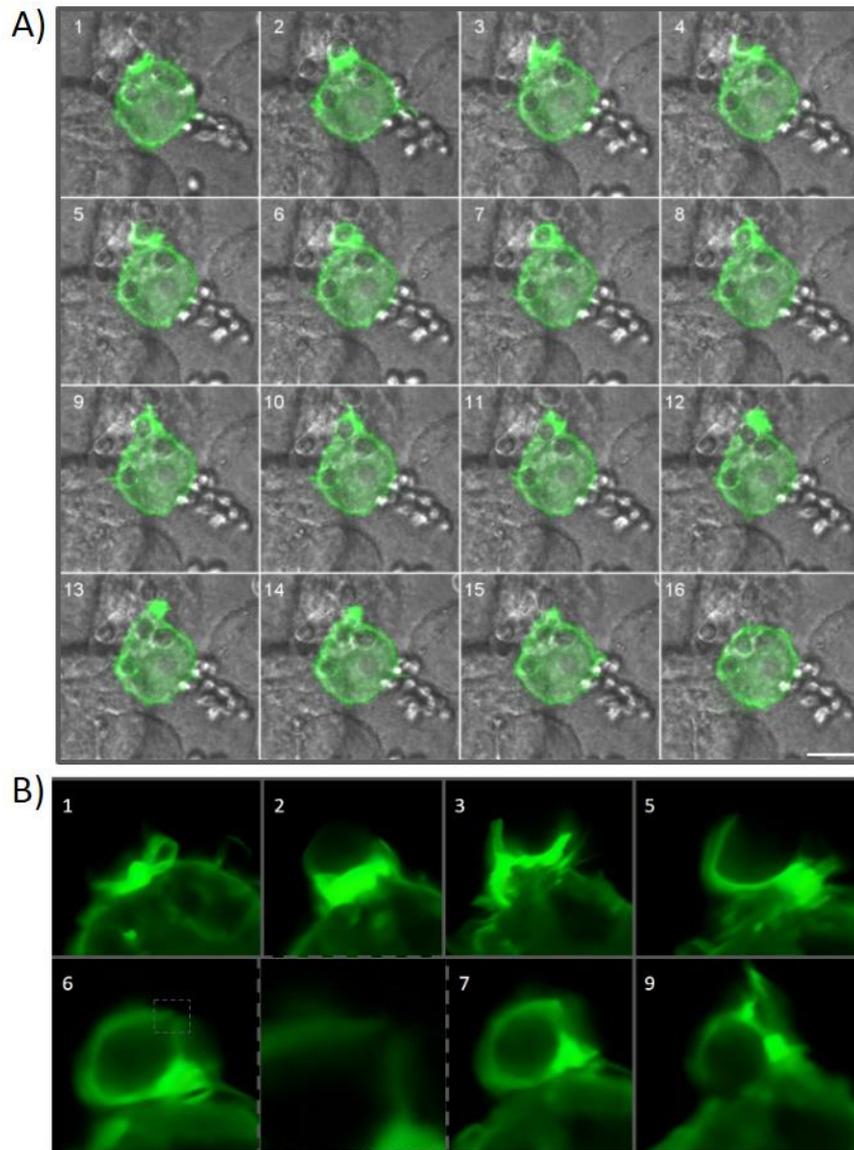


Figura 12: Dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis de células microgliales BV2. Imágenes representativas del registro de la dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis. **A)** En verde se observa LifeAct-GFP para visualizar F-actina en células vivas. Desde el registro se observa la adhesión y acumulación de actina cortical (1,2), la formación de la copa fagocítica (3,4), el encuentro de la membrana en la parte posterior de la partícula para el cierre (5,6), el cierre de la copa que conlleva la escisión de la membrana y formación del fagosoma (7) y finalmente la despolimerización secuencial de actina desde la parte anterior a posterior del fagosoma, en concordancia con el zipper model. **B)** Se hizo un acercamiento de solo el canal GFP para la mejor visualización de la dinámica de actina. Barra de escala: 10µm

2. Dinámica de actina durante la maduración Fagosomal

2.1 Destellos de actina

En adición a la participación del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis de las *beads*, se observó que alrededor de las partículas de levadura ya internalizadas (Fagosomas) permanecía una cubierta de actina (señal de Lifeact-GFP) consistente con lo observado en macrófagos (Liebl & Griffiths, 2009). Además, interesantemente, se observó que en algunas partículas tal presencia de la cubierta de actina fue dinámica debido a que la señal de Lifeact-GFP incrementaba y disminuía en el tiempo, lo que corresponde a una polimerización y despolimerización de actina de naturaleza cíclica (Figura 13A,B), proceso intracelular ya reportado en macrófagos denominado “destellos de actina” (*Actin Flashes*) (Poirier et al., 2020), pero que no ha sido descrito en células microgliales. Los destellos de actina ocurrieron en etapas tempranas de la fagocitosis de forma regularmente espaciadas en el tiempo, principalmente con una duración de ~2 minutos entre picos de incrementos de señal de actina (Figura 13D). Además, algunos fagosomas presentaron pocos destellos (3-5 destellos) mientras que en algunos casos los destellos de actina fueron muchos más (>10). Esto significa que los destellos pueden extenderse entre los primeros 4-5 minutos (Figura 13B), hasta las etapas más finales de la fagocitosis temprana, es decir, hasta los 20-25 minutos (Figura 13C). Sin embargo, tanto su naturaleza cíclica (polimerización y despolimerización de actina) como el espaciamiento temporal se mantuvieron relativamente conservados independientemente de la duración total del proceso. Estos datos, sugieren que la dinámica de actina está finamente coordinada durante los destellos, probablemente mediante la acción de ciertas RhoGTPasas involucradas en la maduración fagosomal

como RhoA (Mao & Finemann, 2015) y que su duración total es heterogénea, pero que abarca la fagocitosis temprana.

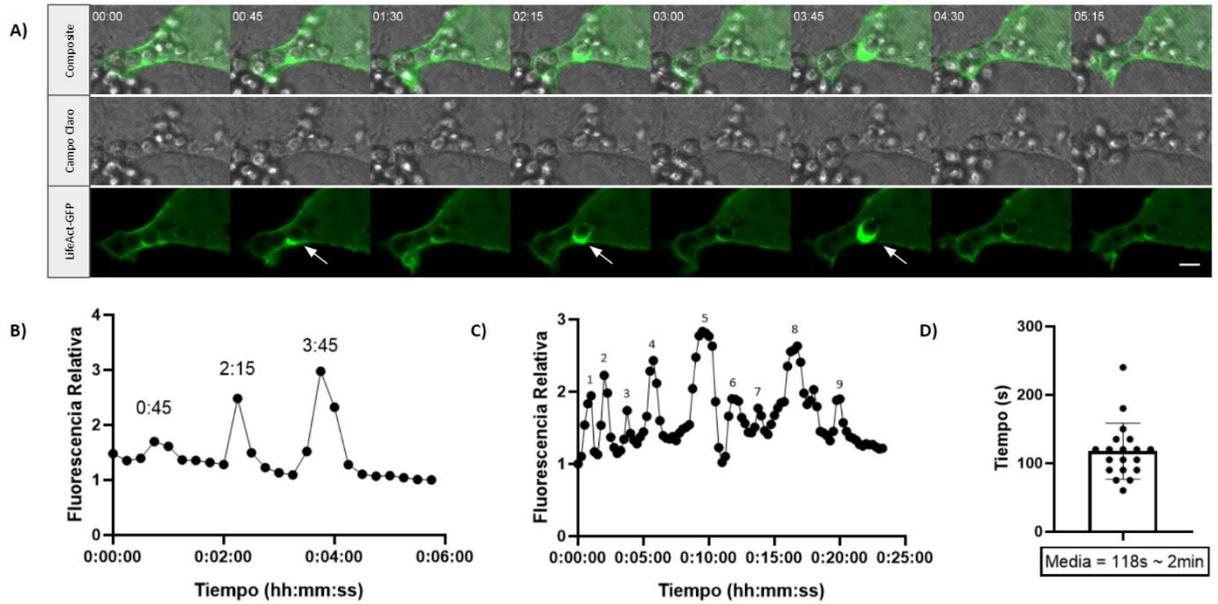


Figura 13: Destellos de actina en la línea celular BV2. **A)** Imágenes representativas de los destellos de actina en la línea celular BV2. En verde se muestra la señal de LifeAct-GFP y en gris el campo claro. Las flechas blancas indican los picos de fluorescencia durante los destellos de actina **B)** Fluorescencia relativa de LifeAct-GFP durante el tiempo de la imagen A). Se ve una fuerte acumulación de F-actina de forma cíclica y regularmente espaciado en el tiempo. **C)** Destellos de un *bead* con 9 eventos de destellos, con una duración total de ~20 minutos **D)** Cuantificación del tiempo promedio entre puntos máximos de intensidad de actina. N=3. Barra de escala 5µm

Objetivo 2:

Estudiar la producción de ROS durante la maduración fagosomal de microglías BV2

3. Producción de ROS durante la maduración fagosomal: Estallido oxidativo

El estallido oxidativo se caracteriza por un aumento generalizado de ROS en toda la célula, pero en especial dentro del fagosoma con el fin de convertirse rápidamente en una vesícula citotóxica y eliminar agentes patógenos o restos celulares, resultando en un incremento sustancial, pero controlado, de la producción de ROS. Sin embargo, la producción de ROS intrafagosomal en microglías no ha sido caracterizada. Esto se debe especialmente a las pocas herramientas disponibles para estudiar espacio-temporalmente este fenómeno. Para sobrepasar este problema y poder caracterizar la temporalidad del estallido oxidativo intrafagosomal en microglías, se acopló un sensor redox (OxyBurst) a las partículas de levaduras inactivadas. El OxyBurst consiste en una molécula sensible a las ROS (DCF) con grupos protectores para evitar su oxidación (grupos que son removidos por esterasas intracelulares) y además un grupo NHS, que permite su acople a aminas primarias de las proteínas de la pared celular de las levaduras. De esta forma, logramos medir solo las ROS intrafagosomales, ya que la sonda queda en el interior del fagosoma, por lo que se reconoce específicamente el ROS generado hacia el lumen de esta vesícula. El funcionamiento y procedimiento de acople se ilustra en la Figura 14A, B.

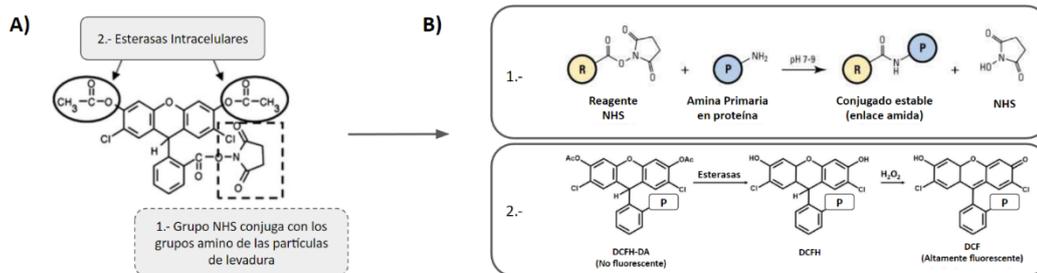


Figura 14: Características de la sonda OxyBurst. **A)** Estructura química de la sonda acoplada a las beads. La sonda se basa en un sensor de diclorofluoresceína, la cual en este caso posee dos grupos ésteres protectores (ovalos) que protegen la sonda de la oxidación antes del ensayo. Estos son removidos por esterasas intracelulares después de la fagocitosis. La sonda además contiene un grupo NHS, el cual se acopla a las aminas primarias en las partículas de levadura. **B)** En 1.- se muestra el modo de acoplamiento de la sonda a aminas primarias mediante la conjugación estable con un enlace amida. 2.- se muestra el mecanismo de oxidación de la sonda. Primero se remueven los grupos éster por esterasas intracelulares, lo que permite su oxidación, haciéndola altamente fluorescente.

Una vez acoplada la sonda a las *beads*, se realizó un ensayo de fagocitosis en células BV2 y, mediante microscopía de fluorescencia, se estudió la producción de ROS intrafagosomal mediante la cuantificación de la fluorescencia de las *beads* (Figura 15). Luego de la internalización de las *beads*, se observó un incremento significativo de la intensidad de la sonda a lo largo del tiempo. Las *beads* que no fueron fagocitadas por las células mantuvieron estable su señal fluorescente (Figura 15), sugiriendo una pronunciada producción de ROS (estallido oxidativo) durante la fagocitosis en células microgliales BV2.

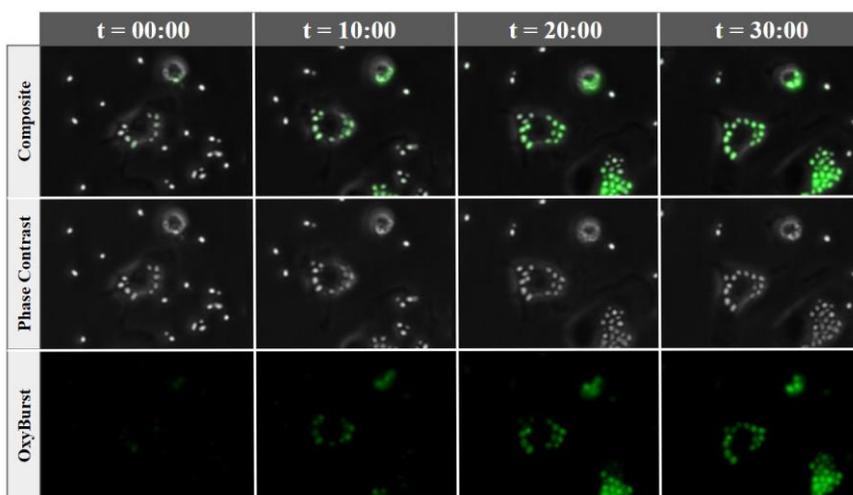


Figura 15: Imágenes representativas de la producción de ROS intrafagosomal en microglías BV2. Las microglías fueron desafiadas con *beads* acoplados a OxyBurst y se registró la fluorescencia a lo largo del tiempo. Se muestra la progresión del estallido oxidativo a los 0, 10, 20 y 30 minutos.

Se procedió a cuantificar y graficar los datos, donde se determinó que el estallido oxidativo tiene una duración de ~20 minutos hasta llegar a un máximo, siguiendo un comportamiento sigmoideo o de función logística (Figura 16A), algo similar a lo reportado en macrófagos (Vander Ven et al., 2009). Al realizar un ajuste de una función logística, se obtuvo una curva bastante coherente y con un $R^2 \sim 0,66$ (Figura 16B). Debido a que la sonda no es reversible ni ratiométrica, no es posible determinar la disminución (reducción) del contenido de ROS intrafagosomal, por lo que solo se pueden observar incrementos acumulativos de ROS a lo largo del tiempo. No obstante, con el fin de identificar adecuadamente la producción de ROS en el tiempo, se calculó la primera derivada de la función del ajuste logístico, para obtener la tasa de cambio de la fluorescencia en el tiempo como un indicativo referencial de la tasa de la producción de ROS (Figura 20C). De forma global, se observa que, la tasa de producción de ROS alcanza su máximo nivel a los ~5 minutos y disminuye la tasa de producción entre los ~20-30 minutos (Figura 16C), reflejando el término del estallido oxidativo. Por otra parte, interesantemente, al calcular la derivada discreta o numérica, se observa una producción de ROS cíclica (Figura 16D). En conjunto, estos datos sugieren que luego de la internalización del sensor OxyBurst, se produce el estallido oxidativo caracterizado por un incremento cíclico de la producción de ROS en el compartimento intrafagosomal.

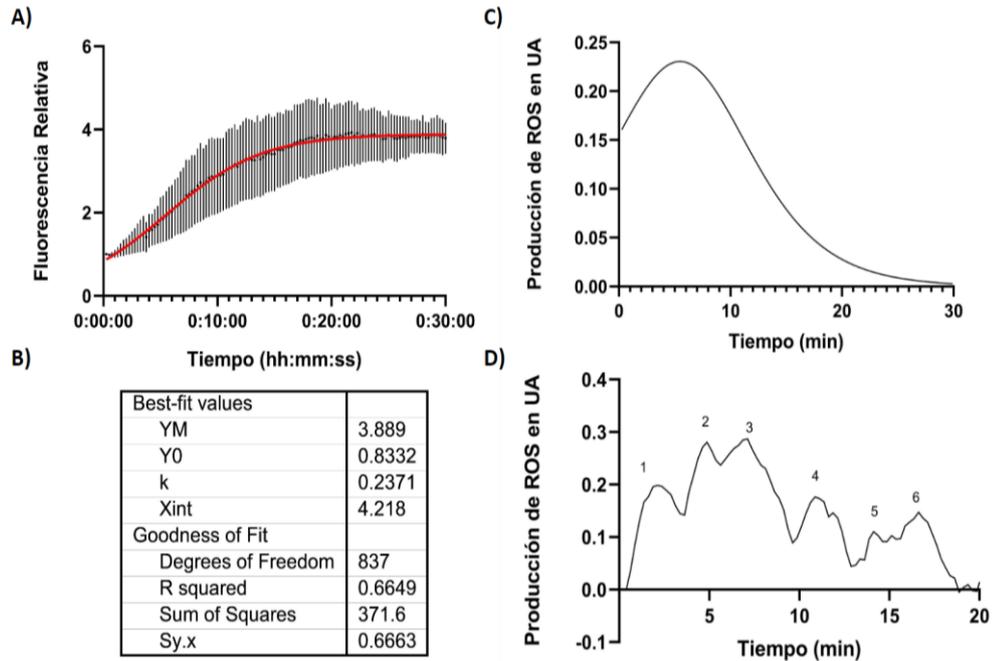


Figura 16: Producción de ROS intrafagosomal durante la fagocitosis de microglías BV2. A)-B) Curva representativa del estallido oxidativo. Se cuantificó la fluorescencia para calcular la producción intrafagosomal de ROS y se realizó un ajuste con una curva logística. La duración del estallido es de 20 minutos. **C)** Derivada dx/dt del ajuste realizado en A), indicando la dinámica de la producción de ROS medido como la tasa de cambio en la fluorescencia. **D)** Derivada discreta obtenida directamente de los datos brutos y suavizada para eliminar el ruido. Los números representan máximos locales de producción de ROS. $n=7$, $N=3$

Por otra parte, existe un subconjunto de datos obtenidos desde los registros que muestran un comportamiento marcadamente escalonado en la dinámica de la fluorescencia (Figura 17A). Al calcular la derivada directa de estos datos y suavizarlos para eliminar el ruido, se observa claramente la naturaleza cíclica de la producción de ROS (Figura 17B). Es notable que la naturaleza cíclica de la producción de ROS se comporta de forma muy similar a los destellos de actina. Además, debido a su relación de co-ocurrencia espacial y temporal, estos datos sugieren un posible *crosstalk* entre ambos procesos durante la maduración fagosomal.

Es importante indicar, que es la primera vez que se reporta la producción de ROS intrafagosomal de células microgliales, y es la primera vez que se resuelve la naturaleza cíclica del estallido oxidativo.

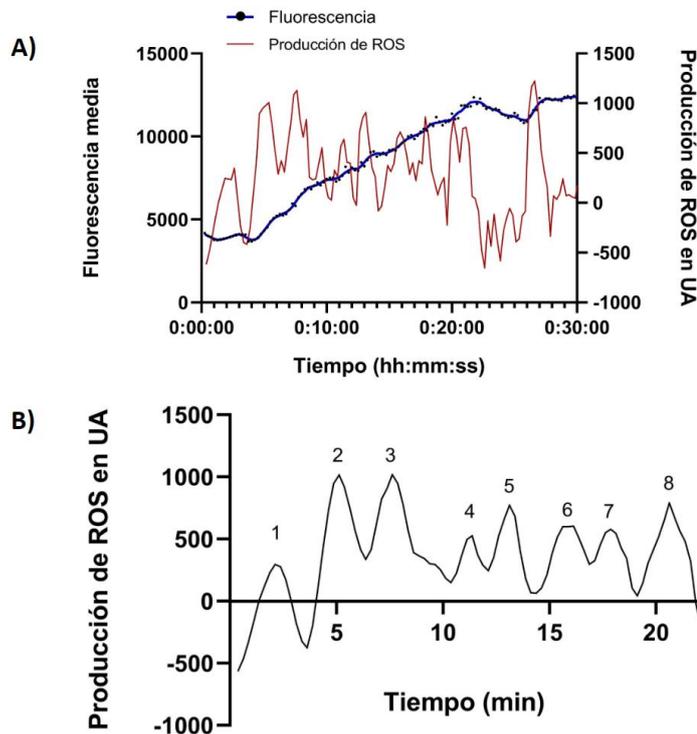


Figura 17: Producción Cíclica de ROS intrafagosomal en microglías. A) Bead representativo de la producción de ROS cíclica durante la maduración fagosomal. La línea azul indica la cuantificación de la fluorescencia mientras que la producción de ROS se muestra en rojo, como la derivada de la fluorescencia **B)** Derivada directa de la fluorescencia suavizada para eliminar ruido. Los números indican la cantidad de máximos locales en la producción de ROS, con un promedio de ~2,6 minutos entre máximos.

Como era de esperar, la temporalidad del estallido oxidativo calza con el desarrollo de los destellos de actina, lo que permite especular que posiblemente haya mecanismos de señalización que aprovechen esta abrupta producción de ROS para generar las cascadas de señalización necesarias para la maduración del fagosoma. De hecho, se ha descrito que la inhibición de RhoA disminuye la producción de ROS (Global, no intrafagosomal) durante el estallido oxidativo en la línea celular BV2 (Scheiblich & Bicker, 2017). RhoA activa a su principal efector; ROCK, el cual es

capaz de fosforilar p47phox para promover su activación y unión con el complejo NOX2 (Tlili et al., 2023), principal generador de ROS durante el estallido oxidativo intrafagosomal. Para explorar esta hipótesis, se cuantificó la producción de ROS intrafagosomal, esta vez en presencia de un inhibidor de ROCK (*ROCK kinase inhibitor*, SigmaAldrich) en distintas concentraciones. Se observó una disminución significativa en la fluorescencia del Oxyburst entre los 7-18 minutos en las microglías tratadas (Figura 18A). Al obtener la derivada del ajuste logístico, se ve que la curva de producción de ROS se “aplana” en los grupos tratados al compararlas con el grupo control (Figura 18B). Esto implica que la fase exponencial de producción de ROS se vuelve menos pronunciada y por ende la producción de ROS es menor en los minutos iniciales del estallido oxidativo en presencia del inhibidor.

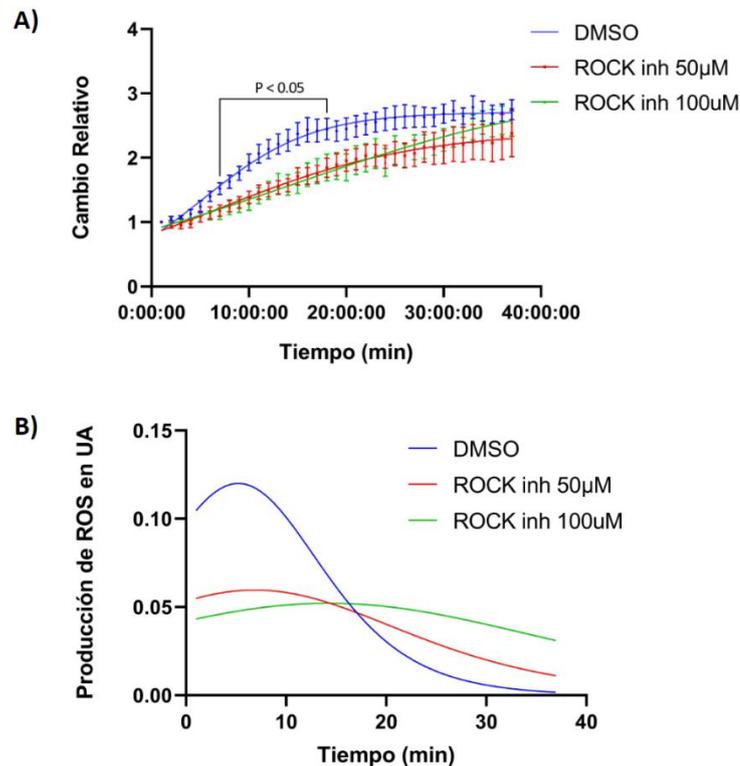


Figura 18: Producción intrafagosomal de ROS en presencia de un inhibidor de ROCK. A) Cuantificación de la fluorescencia de los beads, como medida de la producción intrafagosomal de ROS y ajuste con una curva logística. Las células BV2 fueron sometidas a concentraciones de 50 μ M (n=9), 100 μ M (n= 8) y DMSO (Vehículo; n= 8) por 3h previo al ensayo. Los cambios significativos son indicados en la figura ($p < 0,05$). **B)** Producción de ROS con 50 μ M y 100 μ M de inhibidor de ROCK. Calculado a partir de la derivada del ajuste logístico realizado en A). N=3

Objetivo 3:

Evaluar la actividad de RhoA en la fagocitosis

4. Actividad de RhoA durante destellos de actina

Se ha reportado la acumulación de la RhoGTPasa RhoA junto con la acumulación de actina en fagosomas tempranos en células Raw264.7, sin embargo, no se ha evaluado la actividad de tal RhoGTPasa en microglías, lo que reflejaría su activación o inactivación. Por ende, mediante la utilización de sensores biológicos de RhoA basados en FRET de segunda generación, se evaluó la actividad de esta RhoGTPasa durante los destellos de actina que ocurren luego de la internalización de partículas durante la fagocitosis

Se observó no solo una acumulación de la señal del sensor de RhoA sino también un incremento robusto en la activación del sensor FRET de RhoA de un ~29,8% durante los destellos de actina en comparación con partículas sin destellos (Figura 19C), lo que sugiere una activación localizada de RhoA alrededor de las *beads* durante los destellos de actina

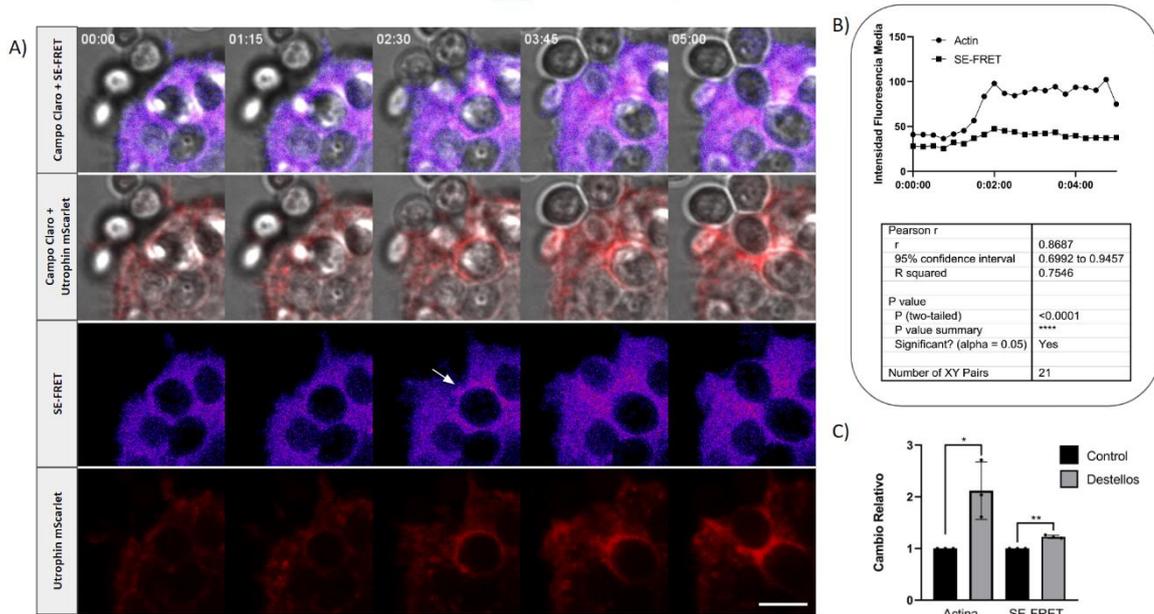


Figura 19: La actividad de RhoA aumenta durante los destellos de actina. A) Imágenes representativas de un destello de actina y la eficiencia del SE-FRET de RhoA por píxel. Se observa que la actividad del SE-FRET aumenta durante los destellos de actina (flecha blanca) alrededor del fagosoma y el aumento local de actividad de RhoA colocaliza con la acumulación de F-actina. B) En la gráfica de intensidad de fluorescencia durante el tiempo se muestran las cuantificaciones de la señal de Utrophin-mScarlet y RhoA-FRET mostradas en A). **B)** Análisis de covarianza, donde se obtuvo una alta probabilidad de que la intensidad de las señales estén correlacionadas en el tiempo ($R^2 \sim 0,75$, $P < 0,0001$; 21 datos). Barra de escala: $5 \mu\text{m}$ **C)** Se cuantificó la intensidad de Utrophin-mScarlet (F-Actina) y la eficiencia del SE-FRET (Actividad de RhoA) durante los destellos de actina y se comparó con la señal basal. La eficiencia del SE-FRET aumenta un $\sim 29,8\%$ en relación al control. $P < 0,005$, $n=30$; $N=3$.

Debido a que RhoA regula la estructuración del citoesqueleto de actina en una manera específica, se evaluó la relación entre la actividad de RhoA y la acumulación del citoesqueleto de actina alrededor de los fagosomas. Para ello, se midió la intensidad de la señal de F-actina con el sensor fluorescente Utrophin-mScarlet y la actividad de RhoA en el transcurso del tiempo. Se observó un incremento de RhoA en los bordes del fagosoma al mismo tiempo que ocurría el destello de actina (Figura 19A). Interesantemente, el incremento de la actividad de RhoA durante todo el destello de actina permaneció alto mientras también se mantuvo alta la señal de F-actina, sugiriendo una relación funcional entre la actividad de RhoA y la acumulación de F-actina. Por tanto, se realizó un test de correlación para evaluar si la actividad de RhoA-FRET estaba relacionada a la señal de Utrophin-

mScarlet. Se encontró que hay una alta correlación de la actividad de RhoA y la polimerización de F-Actina durante los destellos, presentando un R^2 de $\sim 0,75$ (Figura 15B). Por otra parte, durante el destello de actina, se observó una rotación del *bead* de levadura inactivada lo que reveló que éste tenía una yema desde un proceso de gemación fúngica. Durante el *timelapse*, el destello “rompió” su simetría hacia la unión de esta gemación como se ve en la Figura 19A, extendiendo la duración del destello. Este particular fenómeno fue observado en más de un registro, fenómeno que también se reportó durante la fagocitosis de levaduras en la línea celular de macrófagos Raw264.7 en el artículo de Liebl and Griffiths (2009).

En adición a la correlación entre la actividad de RhoA y la acumulación del citoesqueleto de actina durante los destellos, se observó que hay una pequeña pero significativa reducción en la actividad de RhoA previo a su robusto incremento durante el destello de actina (Figura 20), sugiriendo que la modulación del citoesqueleto de actina dependiente de RhoA no solo ocurre durante los destellos, sino que incluso antes, donde otros mecanismos moleculares podrían estar involucrados río arriba del proceso, generando una disminución en la actividad de RhoA. Esta disminución de la actividad de RhoA previo a la acumulación de F-actina probablemente se debe a una inhibición compensatoria que se manifiesta incluso antes del aumento sostenido de RhoA, que podría ser mediado por p190RhoGAP, la cual se acumula durante los destellos de actina (Poirier et al., 2020). De esto se puede inferir que la señalización río arriba para la activación de RhoA precede temporalmente a los destellos de actina y se expresa primeramente como una regulación a la baja en la actividad de RhoA. En la Figura 19B también se observa una pequeña disminución del SE-FRET previo al destello de actina

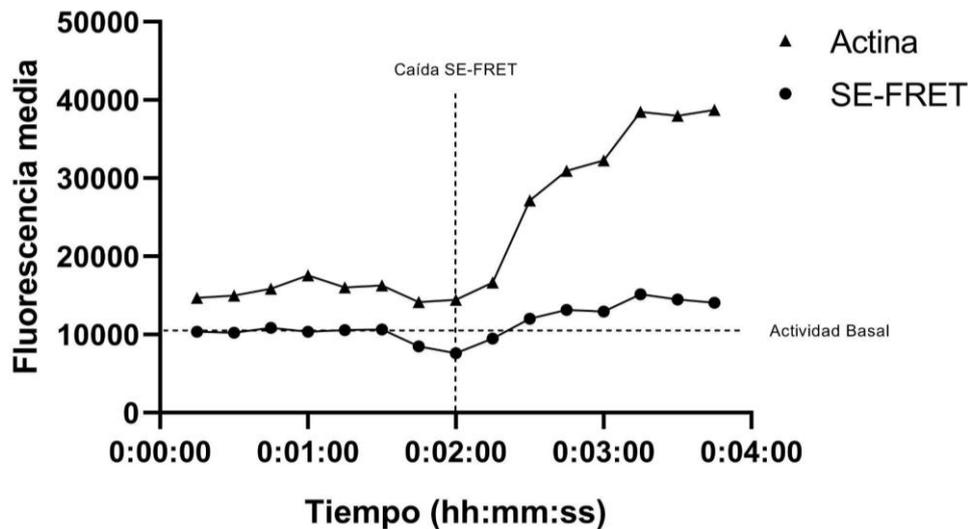


Figura 20: Caída de la actividad de RhoA antes de los destellos de actina. Se cuantificó la fluorescencia del sensor de F-actina (Utrophin-mScarlet) y la actividad de RhoA (eficiencia de SE-FRET) en el tiempo durante los destellos de actina. En el gráfico, se muestra un destello de actina representativo. La línea punteada vertical indica la caída del SE-FRET y marca el comienzo del destello de actina, mientras la línea punteada horizontal muestra la actividad basal del sensor previo al destello.

4.1 Mecanotransducción por destellos de actina

En adición a los cambios localizados en la actividad de RhoA alrededor del fagosoma y su relación con los destellos de actina, se observaron algunos eventos relacionados al citoesqueleto de actina en otros compartimentos intracelulares esenciales. Durante los ensayos fagocíticos se observó (en 3 registros distintos realizados con mayor resolución espacial) una polimerización cíclica de actina o destellos alrededor del núcleo celular. Se ha descrito que este fenómeno está muy relacionado con la mecanotransducción y se caracteriza por una fuerte acumulación de actina perinuclear, denominado como “reseteo de actina dependiente de calcio” o CaAR (por sus siglas en inglés) que desencadena en la transcripción de genes específicos mediante mecanismos de mecanotransducción (Wales et al, 2016). En estos registros puntuales se observaron varias de las características descritas de este proceso, incluyendo una abrupta acumulación de actina alrededor del núcleo y una disminución de la actina cortical (Figura 21,22). Además, se observó una fuerte

disminución en la señal de F-actina rodeando el fagosoma durante el transcurso de la acumulación de actina perinuclear, lo que resultó en la detención completa de los destellos de actina fagosomales. En conjunto, estas observaciones sugieren una relación funcional entre los fagosomas y la función nuclear mediante un mecanismo de mecanotransducción dependiente del citoesqueleto de actina. Sin embargo, los efectos específicos en la transcripción y el *trigger* que produciría este fenómeno se desconocen.

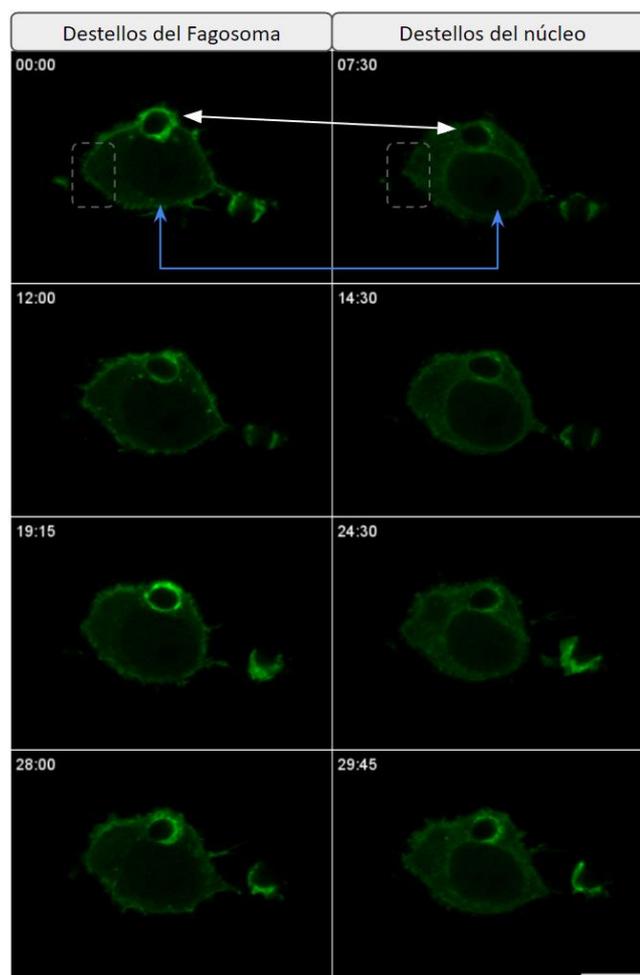


Figura 21: CaAR durante destellos de actina. Imágenes representativas de acumulación perinuclear de actina durante destellos fagosomales. A la izquierda se agrupan imágenes de destellos fagosomales mientras que a la derecha agrupan los eventos de acumulación perinuclear de actina en el tiempo. La flecha blanca indica cómo disminuye la actina fagosomal de izquierda a derecha, la flecha azul indica el aumento de actina perinuclear de izquierda a derecha y el cuadrado gris indica la disminución de la señal de actina cortical de izquierda a derecha. De tal forma, se ve una distribución de la actina distinta en los cuadros a la izquierda en comparación a la derecha. Barra de escala: 10 μm .

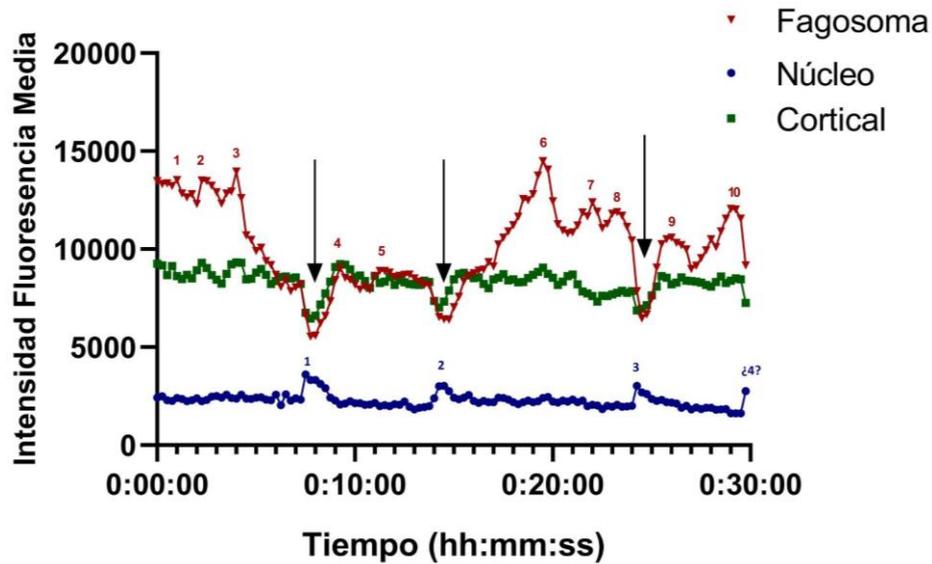


Figura 22: F-actina cortical, perinuclear y fagosomal. La figura representa la cuantificación de la figura 17. En rojo con triángulos invertidos se muestra la dinámica de actina del fagosoma, con los destellos de actina numerados del 1-10. En cuadrados verdes se muestra la actina cortical y en círculos azules la actina perinuclear. Con números del 1-3, se enumeran las acumulaciones de actina perinucleares que coinciden con la caída de actina cortical y fagosomal (Flechas negras).

5. Generación de Mutantes de RhoA

Debido a que tanto los destellos de actina como la producción de ROS intrafagosomal durante la fagocitosis de *beads* en células BV2 presenta una naturaleza cíclica, proceso en el que participa la actividad de RhoA, se propuso que la generación de ROS intrafagosomal pudiera señalar hacia al citoplasma y regular la actividad de RhoA mediante modificaciones oxidativas. Así, para estudiar la oxidación de RhoA durante los destellos de actina, se diseñaron y generaron mutantes insensibles a la oxidación. Para ello, se utilizaron los siguientes plásmidos codificantes para RhoA humana: myc-RhoA WT, EGFP-RhoA WT y RhoA 2G-FRET, con el fin evaluar los efectos de estas mutantes de RhoA en células fijadas (mediante el tag c-myc), en células vivas (por el marcador EGFP) y evaluar su contribución en el destello de actina por FRET, respectivamente. RhoA posee dos cisteínas en su zona catalítica que interaccionan directamente con GTP. Se ha reportado que, en sistemas biológicos, la oxidación de estos aminoácidos (Cys 16/20) puede generar

una versión *fast cycling* de RhoA, lo que se traduce en un mayor intercambio de GTP y GDP, que por el exceso de GTP en el medio intracelular desplazan el sistema hacia una versión activa de la Rho GTPasa (Aghajanian et al., 2009). Para estudiar esta modificación post-traducciona en los destellos de actina, se propuso generar las mutantes C16A, C20A y C16/20A en los plásmidos ya mencionados, mediante mutagénesis sitio dirigida. Hasta el momento, se ha generado la mutación C16A de RhoA de forma exitosa, la cual fue validada por secuenciación (Figura 23). Además, se ha descrito que la mutación de un residuo de cisteína por un ácido aspártico podría generar una versión oxo-mimética (Hobbs et al., 2014). Esto se ha realizado para estudiar la oxidación en otras GTPasas, como Rac1 (C18D). Sin embargo, RhoA posee 2 cisteínas muy cercanas dentro del dominio de unión a GTP, cuya oxidación no ha sido caracterizada. No sabemos qué efectos conformacionales podría conllevar la mutación C16/20D en RhoA y si efectivamente generaría una versión oxo-mimética. Más aún, la formación de un puente disulfuro entre estas cisteínas no se mimetizaría con estas mutantes, por lo que su generación sale del alcance de este estudio.



Figura 23: Validación de mutagénesis sitio dirigida por secuenciación de Sanger. A) Mutante de RhoA C16A. En azul se ve el codón y aminoácido de RhoA WT y en rojo se marca la mutación doble que cambia Cisteína por Alanina.

Ensayos preliminares con Microglías Primarias de Rata

6. Cultivos primarios de microglías.

6.1 Estandarización y caracterización de cultivos primarios de microglías de rata.

Se estandarizó un método reproducible para aislar y estudiar microglías *in vitro* basado en protocolos descritos previamente (Lian, Roy, et al., 2016). Se generaron dos variantes de este protocolo, uno de alta pureza y bajo rendimiento (P1) y otro de pureza media pero alto rendimiento (P2) (ver materiales y métodos 1.1). Los cultivos primarios de microglías obtenidos con ambos métodos fueron fijados y se caracterizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia con marcadores microgliales (IBA1 o CD11b) y de citoesqueleto de actina para evaluar la pureza y morfología celular, respectivamente. Se adquirieron imágenes de fluorescencia desde campos aleatorios y se cuantificó el porcentaje de pureza (células positivas para marcadores microgliales). Se encontró que el protocolo P1 presentó una pureza de 98% mientras que el protocolo P2 presentó una pureza de 91% (Figura 24C). A pesar de que P1 presentó una mayor pureza, mostró un rendimiento significativamente menor (menor número de microglías obtenidas en el cultivo) (Figura 24D) por lo que los posteriores cultivos primarios fueron realizados con el protocolo P2. Por otra parte, en adición a la estandarización de los métodos de purificación y rendimiento, se caracterizaron las microglías primarias por medio de ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal (Figura 24 A y B). Como era de esperar, las células fueron positivas para los marcadores microgliales específicos IBA1 y CD11b. La distribución de CD11b se observó en el citoplasma y en el núcleo

mientras que IBA1 se distribuyó en el citoplasma, el núcleo y en la región perinuclear (similar a lo descrito en la literatura) con ambos métodos (Figura 24A, B), indicando una adecuada obtención y cultivo de microglías primarias. Además, la morfología observada fue predominantemente circular, presentando pocas ramificaciones en comparación con lo descrito en estudios de microglías *in vivo*, lo que sugiere la activación de estas microglías. No obstante, la presencia de microglías activadas en cultivos *in vitro* es normal, donde la rigidez del sustrato, la presencia de suero y la ausencia de otros tipos celulares pueden activar ligeramente a estas células cultivo, generando una morfología predominantemente reactiva (Montilla et al., 2020).

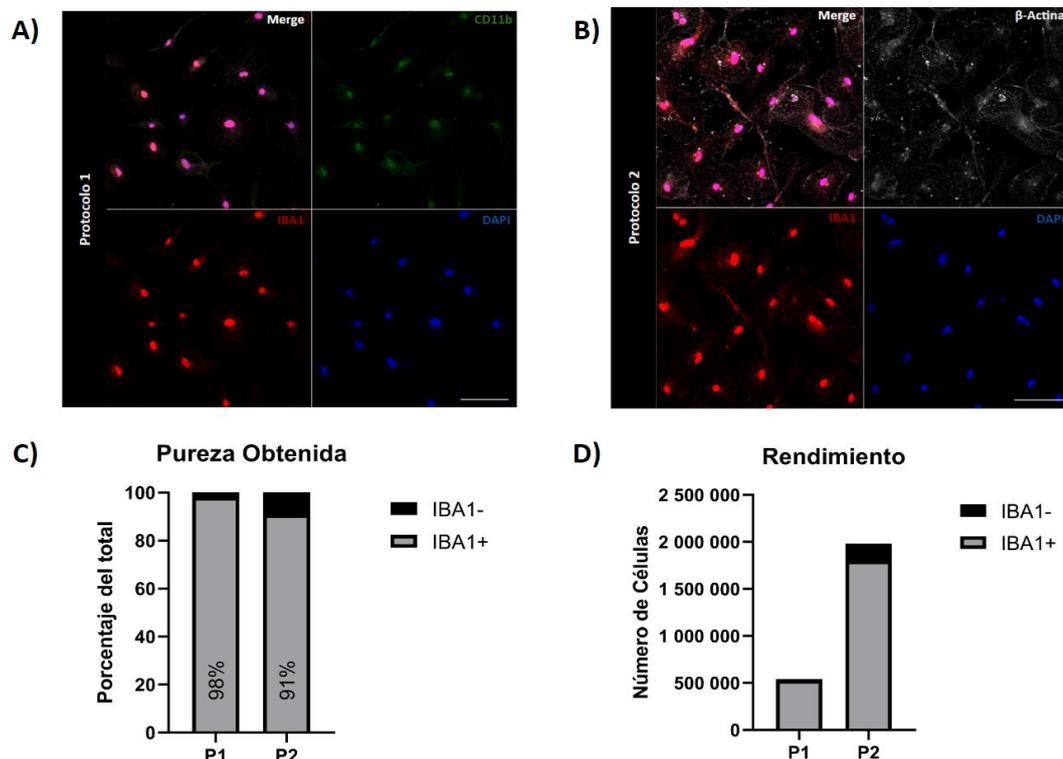


Figura 24: Métodos de purificación de microglías. **A)** Ensayos de inmunofluorescencia con CD11b, IBA1 y DAPI de microglías purificadas con el protocolo 1 (P1). Se observa una fuerte acumulación nuclear de IBA1 y una marca poco específica de CD11b, la cual marcó células IBA1 negativas y debiese concentrarse en la membrana (Integrina), sugiriendo una baja afinidad del anticuerpo a su blanco (almenos para rata) **B)** Ensayos de inmunofluorescencia de β -actina, IBA1 y DAPI de microglías purificadas con el protocolo 2 (P2). Al igual que en P1, se ve una marcada acumulación de IBA1 nuclear y perinuclear. En este caso no se utilizó el anticuerpo contra CD11b por su inespecificidad. **C)** Cuantificación de pureza obtenida con ambos protocolos (P1; n=554, IBA1+ = 535, P2; n= 393, IBA1+ = 357), donde con P1 se obtuvo la mayor pureza. **D)** Número de células viables obtenidas (contadas con cámara de Neubauer y azul de tripano), donde se obtuvo mayor rendimiento en P2, con un leve compromiso en la puridad. Número de microglías estimado con %pureza obtenidos en C). Número de replicas, N=1.

6.2 Prueba Funcional de Microglías Primarias

Además de confirmar y caracterizar el cultivo primario de microglías, se evaluó la capacidad de estas microglías a responder a insultos proinflamatorios canónicos con el fin confirmar su funcionalidad y su posible capacidad fagocítica *in vitro*. Para ello, las células fueron tratadas con LPS a concentraciones de 50 ng/ml o de 100 ng/ml por 24h. Luego, las células fueron fijadas y sometidas a ensayos de inmunofluorescencia. Se observó un aumento significativo del área celular (Figura 25A, C) e índice de circularidad (Figura 25A, D) en las células tratadas en comparación con el vehículo. Estos datos sugieren que las microglías aisladas son capaces de activarse, ya que se observa una disminución de procesos, lo que es concordante con la morfología amebode del fenotipo fagocítico proinflamatorio de tipo M1 (Figura 25A). Además, se evaluó la distribución de IBA1 durante este proceso de activación con LPS. Se observó que la acumulación nuclear se mantuvo constante en presencia de los tratamientos con LPS (Figura 25E). Sin embargo, la colocalización de IBA1 con β -actina disminuyó en presencia de LPS (Figura 25E). IBA1 es un *Crosslinker* de actina en microglías y macrófagos (Sasaki et al., 2001). Sin embargo, cuando se activa el fenotipo proinflamatorio, IBA1 es translocado al núcleo. Debido a que existe una gran acumulación de IBA1 en el núcleo en microglías, la adquisición de imágenes de fluorescencia para determinar la distribución de IBA1 en el citoplasma requería que se saturara la señal nuclear. Probablemente los cambios observados en la colocalización de IBA1 con β -actina se deban a que con el tratamiento con LPS más IBA1 transloca al núcleo, resultando en que menos IBA1 esté unido a actina en el citoplasma y que este aumento esperado de IBA1 en el núcleo no se refleje dado que la señal ya está saturada, lo cual podría

solucionarse al cambiar los parámetros de adquisición y evaluar la señal citoplasmática y nuclear por separado. Interesantemente, hubo una disminución de células no microgliales negativas para IBA1 después del tratamiento con LPS (100 ng/ml) (Figura 25B), lo que podría deberse a una competencia por el sustrato donde el aumento de área de las microglías desplazó a los otros tipos celulares, por toxicidad directa por LPS (100 ng/ml) en otras células o por la muerte inducida por mediadores proinflamatoria de las microglías. A pesar de que no se midió la viabilidad de las células después del tratamiento con LPS, se observaron varios tipos no microgliales con características apoptóticas previo a los lavados, por lo que nos inclinamos a pensar que hubo muerte celular fagoptótica (apoptosis inducida por los fagocitos).

A pesar de que se observó una respuesta dosis dependiente en la circularidad con el tratamiento de LPS, esta no fue significativa entre ambas concentraciones (Figura 25A, D). Sin embargo, la heterogeneidad morfológica, medida con los coeficientes de varianza y desviación estándar de la circularidad y redondez, disminuyó considerablemente con 100 ng/mL de LPS respecto a 50 ng/ml (Figura 25D), consistente con la idea de estados intermedios entre microglías vigilantes y reactivas, mejor conocidos como los estados canónicos M0 y M1, donde las condiciones de cultivo podrían estar activando ligeramente las células, generando estados intermedios y una morfología más heterogénea, mientras que las microglías tratadas con altas concentraciones de estímulos proinflamatorios como el LPS, transicionan totalmente a morfologías tipo M1 más homogéneas y estables en el tiempo. Sin embargo, se ve que hay un claro cambio morfológico indicativo de una respuesta robusta al estímulo proinflamatorio, lo cual es necesario para observar cambios en ensayos fagocíticos. De ser necesario en otras condiciones

experimentales, se podría evaluar el uso de medios condicionados y sustratos menos rígidos para simular condiciones *in vivo* y disminuir la activación basal de los cultivos primarios de microglías.

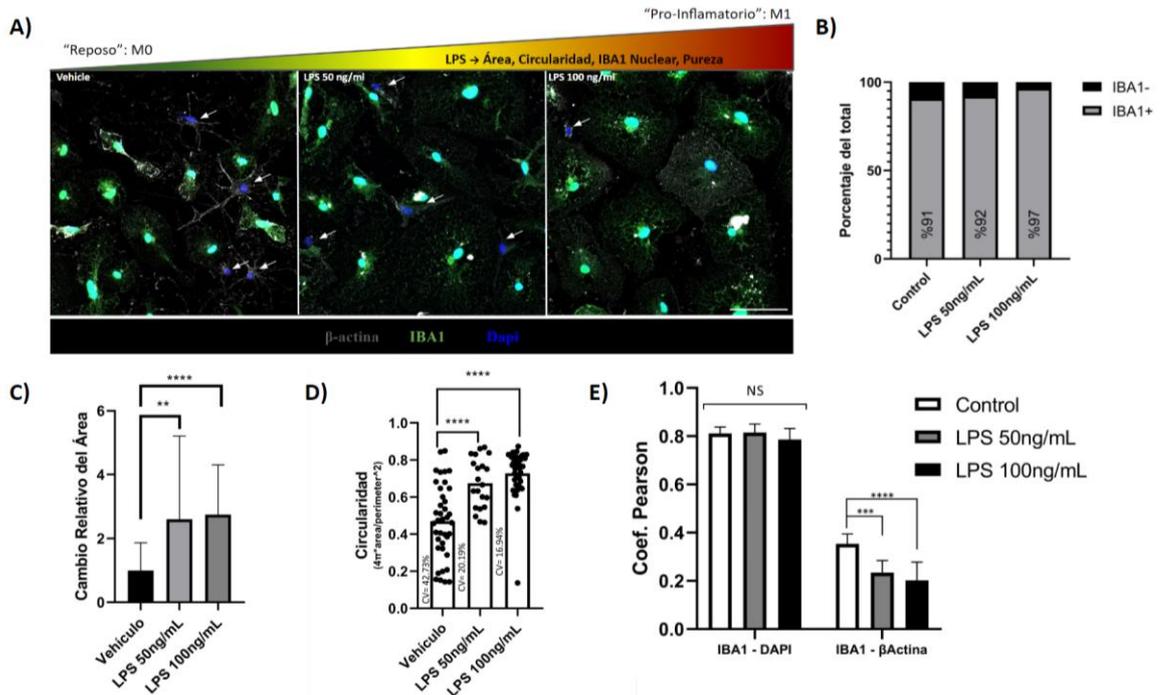


Figura 25: Análisis funcional de microglías primarias de rata estimuladas con LPS. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células tratadas con vehículo (PBS 1X), LPS 50 ng/ml y LPS 100 ng/ml. Las flechas blancas indican la presencia de células no microgliales (IBA1-), probablemente oligodendrocitos por su morfología. Además, se ve un evidente aumento del área y la circularidad. B) Pureza del cultivo al tratar con LPS (Control; n = 393, IBA1+ = 357, LPS 50 ng/ml; n = 116, IBA1+ = 107, LPS 100 ng/ml; n = 123, IBA1+ = 119). El tratamiento con LPS aumenta la pureza del cultivo. C) Cambios relativos de área con distintas concentraciones de LPS. El tratamiento con 50 ng/ml de LPS aumentó en ~2,6 veces el área respecto al control (N = 21, P = 0,0013) mientras que el tratamiento con 100 ng/ml de LPS aumentó en ~2,75 veces el área respecto al control (N = 42, P > 0,0001). D) Circularidad con distintas concentraciones de LPS. El tratamiento con LPS 50 ng/ml y 100 ng/ml resultó en un aumento significativo de la circularidad de ~0,47 a ~0,67 (n = 21, P > 0,0001) o ~0,73 (n = 42, P > 0,0001), respectivamente. A pesar de que el aumento de 50-100 ng/ml de LPS no fue significativo entre ambas concentraciones, se observó una evidente disminución de la varianza (Control = 42,7%, LPS 50 ng/ml 20,2%, LPS 100 ng/ml = 16,9%). E) Análisis de colocalización medido con el coeficiente de correlación de Pearson. Aunque no se ven cambios significativos entre IBA1 y DAPI con el tratamiento, se observa una clara disminución de la colocalización de IBA1 y β-actina tanto con 50 ng/ml, de ~0,35 a ~0,23 (n = 6, P = 0,0001). Con 100 ng/ml hubo una mayor disminución de ~0,35 a ~0,2 (n = 8, P > 0,0001) respecto al control. Barra de escala: 50 μm. N=1

6.3 Destellos de actina en microglías primarias

Luego de caracterizar funcionalmente las microglías primarias, se realizaron ensayos de fagocitosis con el fin de determinar si también presentaban destellos de actina. Para esto se elaboró un ensayo de fagocitosis temprana, basado en el protocolo utilizado en (Poirier et al., 2020) con ligeras modificaciones (Materiales y Métodos, 6.1), para ver destellos de actina en células fijadas. A pesar de que el protocolo evita que tengamos *beads* en proceso de fagocitosis y así evitar confundir los destellos de actina con la copa fagocítica de actina, de igual manera realizamos una inmunotinción contra Rab5, un marcador de endosomas y fagosomas tempranos, para distinguir entre *beads* en proceso de fagocitosis y *beads* ya fagocitados. Bajo esta lógica, cualquier *bead* con señal de Rab5, debiese estar dentro de la célula. Además, utilizamos los *beads* acoplados a Alexa 488, para asegurarnos que efectivamente los fagosomas observados fuesen de los *beads* generados. Mediante microscopía confocal, fue posible identificar estructuras de actina que rodeaban los fagosomas conteniendo los *beads* (Figura 26C). Luego, mediante proyecciones en el eje Z y modelamiento en 3D, se vislumbró que la actina formaba una cubierta que envolvía la totalidad del fagosoma (Figura 26A, B, C).

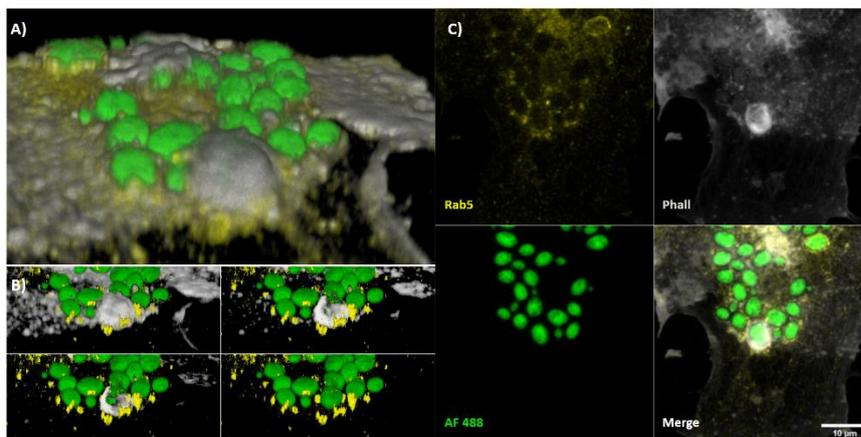


Figura 26: Caracterización tridimensional de destellos de actina en microglías de rata. A) Reconstrucción tridimensional de proyecciones en Z. Se ve claramente un bead cuyo fagosoma está completamente rodeado de actina (gris) **B)** Secciones en el eje Z de la cobertura de actina sobre el bead. **C)** Proyecciones en Z (suma de planos) de los marcadores analizados. 10 µm. N=1

Además, se eligieron campos aleatorios y se vió una prevalencia bastante elevada de destellos de actina, donde un 30% del total de fagosomas cuantificados y un 30,7% de fagosomas por célula, fueron actina-positivos en todo el eje Z (Figura 27). Este resultado está muy por sobre a lo reportado en macrófagos en células fijadas (<15%) (Poirier et al., 2020).

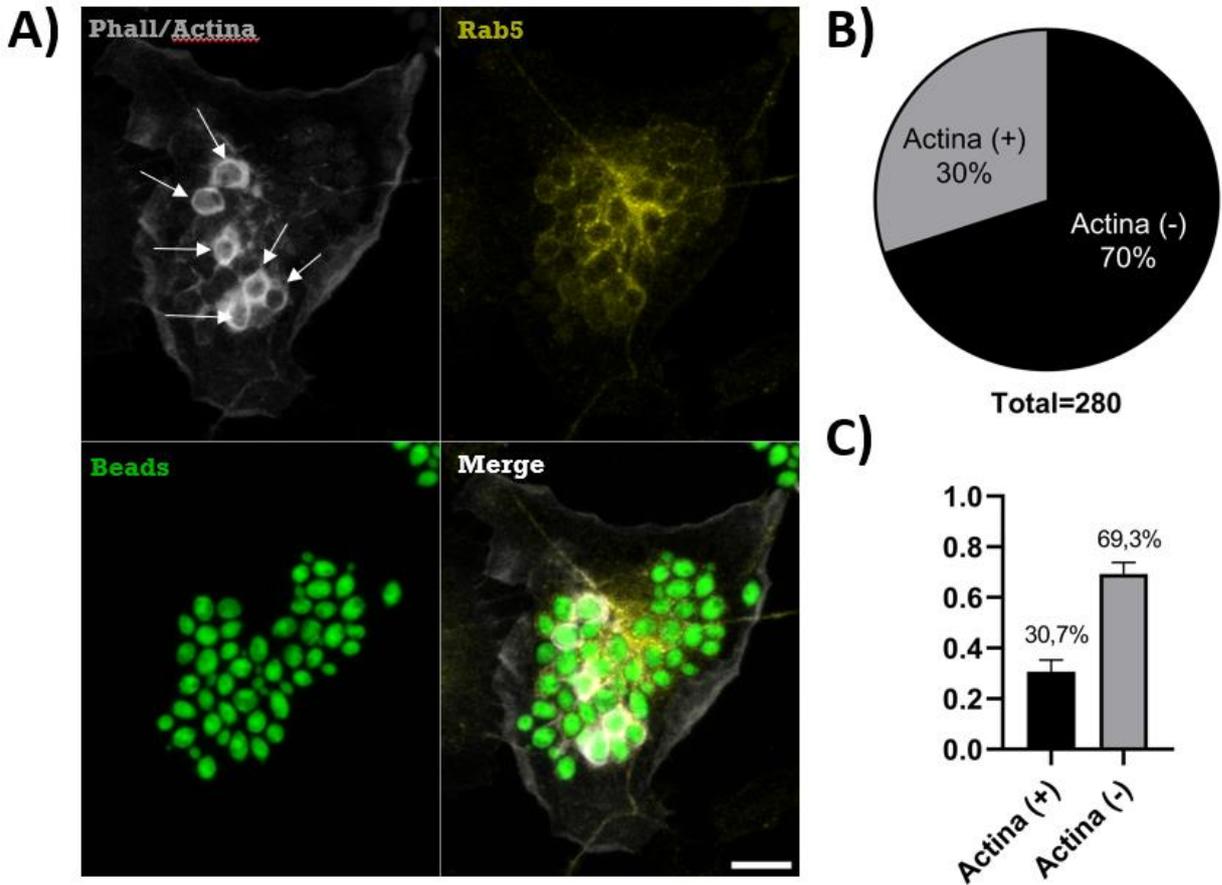


Figura 27: Cuantificación de cobertura de actina en el eje Z en microglías de rata. **A)** Imágenes representativas de microglías con beads positivas para actina alrededor de todo el fagosoma. En las imágenes, se ve la proyección en Z de las distintas inmunotinciones. Con flechas blancas se ejemplifica la marca positiva de actina que recubre el bead en todo el eje Z. **B)** Cuantificación del total de fagosomas positivos para actina (n=15; fagosomas=280) para todo el eje Z. Se ve que un gran porcentaje (30%) de los fagosomas estaba rodeado completamente por actina. **C)** Cuantificación de la cantidad de fagosomas por célula con actina positiva para todo el eje Z. Se obtiene un valor muy similar a lo obtenido en B). Escala: 10 μ m, n=280, N=1

Más aún, la cantidad de fagosomas que tenían actina (marcada con faloidina) alrededor (al menos en un plano en Z) fue mucho mayor, donde el 60.4% de los

fagosomas totales fueron actina-positivos y un 57,8% de los fagosomas por célula fueron actina positivos (Figura 28B, C). En la Figura 28A, se ejemplifica un plano donde se ven 6 fagosomas positivos para la marca de actina, mientras que la proyección en Z de la misma célula (Figura 28A), rodea solamente dos fagosomas.

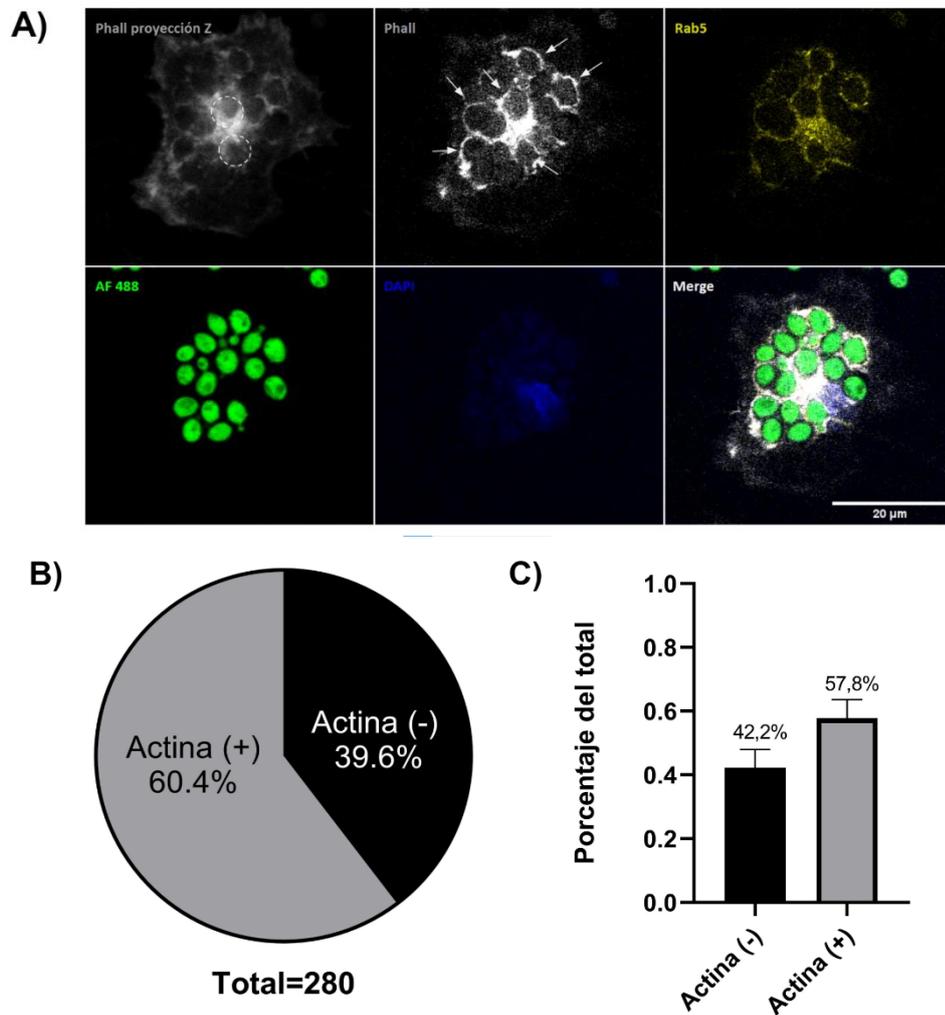


Figura 28: Cuantificación de beads con marcaje de actina positivo en al menos un plano del eje Z en microglías de rata. A) Imágenes representativas de *beads* actina positivos. Se muestran las distintas inmunotinciones adquiridas en un solo plano. Como se puede observar con las flechas blancas, los filamentos de actina rodean a los *beads* de levadura en el plano confocal. Esto en contraste a los beads con actina alrededor de todos los planos confocales, como se observa en los círculos punteados. **B)** Cuantificación de fagosomas positivos para actina en algún plano en Z. **C)** Cuantificación de fagosomas actina positivos por célula. Escala: 20 µm, n=280, N=1

6.3 Producción de ROS intrafagosomal en Microglías Primarias de Rata

Se realizó el mismo ensayo de fagocitosis en microglías primarias de rata y se obtuvieron resultados similares en duración (aproximadamente 30 minutos) y en magnitud (cambio relativo de aprox 2,3 veces) (Figura 29A). Además, el *peak* de producción de ROS se produjo alrededor de los 5 minutos, al igual que en células BV2 (Figura 29B). De esta forma, se determinó que las microglías primarias son funcionales y generan una respuesta oxidativa similar a la línea BV2 durante el estallido oxidativo de la fagocitosis.

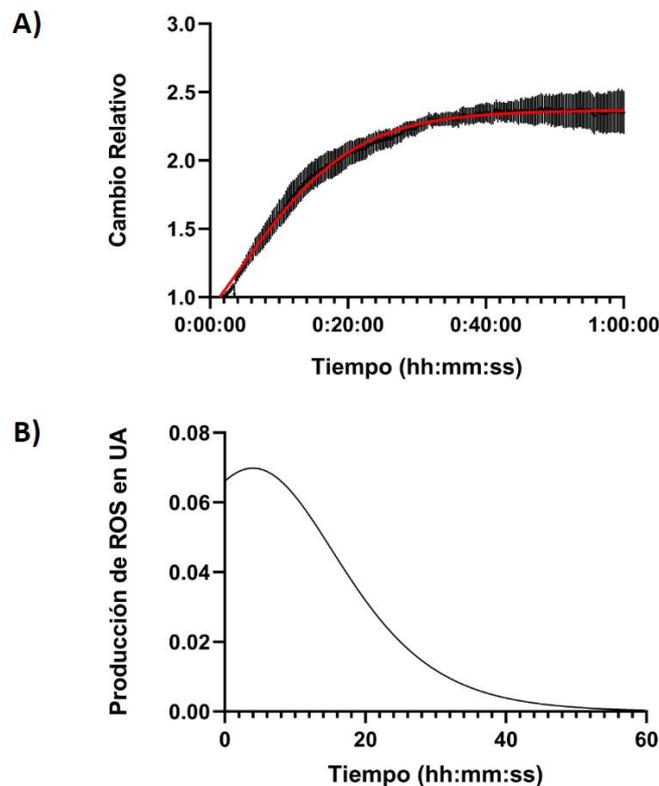


Figura 29: Producción de ROS intrafagosomal durante la fagocitosis de microglías primarias de rata. A) Cambio relativo de la fluorescencia de OxyBurst en microglías primarias de rata. Se realizó un ajuste de curva logística, donde se observa una fase lineal, exponencial y una meseta, al igual que en la línea celular BV2. Sin embargo, la meseta se alcanza a los 30 minutos aproximadamente y con un cambio de magnitud de aproximadamente 2,3 veces la fluorescencia basal. **B)** Derivada de la función logística correspondiente a la producción de ROS en unidades arbitrarias. Se observa que, al igual que en la línea celular BV2, hay un *peak* de producción de ROS a los 5 minutos, que decrece progresivamente con el tiempo. n=7, N=1

Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar distintos componentes de la maduración del fagosoma microglial en un modelo de fagocitosis. Entre los objetivos específicos a abordar, se encontraba evaluar la dinámica del citoesqueleto de actina, la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad de RhoA. La hipótesis, que planteaba que estos tres componentes participaban en la maduración del fagosoma, fue validada, puesto que se evidenció su presencia en fagosomas de células microgliales BV2 y de forma preliminar, en microglías primarias de rata. Más aún, los resultados obtenidos sugieren que existe una comunicación entre el citoesqueleto de actina, las ROS y la actividad de RhoA. Sin embargo, esta comunicación cruzada esta fuera del alcance de este estudio, aunque se generaron herramientas genéticas que permitirán esclarecer esta comunicación cruzada en un futuro cercano. Actualmente, gran parte de lo que se conoce de la fagocitosis microglial fue extrapolado de estudios realizados en macrófagos (Liebl & Griffiths, 2009; Poirier et al., 2020; Yam & Theriot, 2004) u otros fagocitos especializados. Sin embargo, imágenes de alta resolución espacial del citoesqueleto de actina, evidencia directa de la producción de ROS intrafagosomal, y actividad de RhoA, no han sido realizado en modelos microgliales hasta la fecha. Los resultados obtenidos en el presente estudio no solo corroboran lo que se asumía a partir de la evidencia existente en otros modelos, sino que también muestran nuevas aristas que permiten esgrimir conclusiones que se basan en evidencia obtenida directamente de la fenomenología microglial y no de otros modelos.

Objetivo 1:

Estudiar la dinámica de actina durante la maduración fagosomal de microglías BV2

1. Ensayos fagocíticos

Para estudiar la fagocitosis, se utilizó un modelo ampliamente empleado en otros fagocitos especializados, que consistía en usar levaduras inactivadas. Este modelo es especialmente conveniente por dos cosas:

1.- Las proteínas en la membrana de las levaduras permiten conjugar sondas a sus aminas primarias. Gracias a esto, fue posible generar y caracterizar los *beads* acoplados a Alexa 488 (Figura 9) u OxyBurst (Anexo IV). Esto no es fácil de hacer en otros modelos, como *beads* de latex o polyester.

2.- Las microglías reconocen los β -1,3-glucanos de la pared celular mediante Dectina-1, un receptor *bonna fide* de la fagocitosis, por lo que opsonizar los *beads* fue innecesario. La opsonización no es estable en el tiempo y puede ser desigual entre partículas.

Al realizar los ensayos de fagocitosis con células BV2, se evidenció una dinámica de actina consecuente con el *zipper model* de la fagocitosis (Figura 12), lo que se condice con la literatura actual respecto al mecanismo fagocítico mediado por dectina-1. Adicionalmente, durante los ensayos con la línea celular de astrocitos C8D1A, no vimos fagocitosis. Se ha reportado que los astrocitos expresan CR3 (P et al., 1996), otro receptor fagocítico que podría estar involucrado en la fagocitosis de patógenos. Sin embargo, los astrocitos no expresan dectina-1. Los astrocitos también son capaces de secretar C3 y opsonizar agentes dañinos (Lian, Litvinchuk, et al., 2016). Que no haya habido fagocitosis en los ensayos con células C8D1A sugiere

que probablemente no hay opsonización ni *a priori* ni *in situ* con iC3b durante los ensayos. Si hubiese opsonización, los astrocitos podrían realizar *bystander phagocytosis* y veríamos internalización de los *beads*. Esto sugiere, al menos en modelos *in vitro*, que la fagocitosis fúngica esta mediada por microglías y no por astrocitos. Esto tiene relevancia bioclínica, ya que las respuesta inmune ante la encefalitis fúngica, una afección con mortalidad de hasta un 100%, es orquestada precisamente por las microglías (Snarr et al., 2020).

Las *beads* de levadura han sido ampliamente utilizadas para estudiar la fagocitosis en otros fagocitos especializados, pero escasamente en microglías, con la notable excepción de la utilización de *C.albicans* en un modelo murino de microglías de la retina (Maneu et al., 2011). De esta forma, además de ser un modelo *bonna fide* de la fagocitosis, las *beads* de levadura demostraron ser una herramienta única por su versatilidad y alta eficiencia fagocítica durante el desarrollo experimental.

2. Dinámica de actina durante la maduración fagosomal

Existe mucha literatura que evidencia la alta dinamicidad del citoesqueleto de actina durante la formación de la copa fagocítica y la fagocitosis. Durante la fagocitosis microglial, aumenta PI 4,5-P2 que asiste en la polimerización de actina activando Arp2/3 y la actividad de Rac1 para la extensión de pseudópodos. PI 4,5-P2 se transforma rápidamente en PI 3,4,5-P3, de la mano de la caída en la polimerización de actina y empieza a predominar el clivamiento de actina, mediado por cofilina (Desale & Chinnathambi, 2021). Se cree que este proceso es necesario para la unión a endosomas y lisosomas durante la maduración fagosomal. Sin embargo, este paradigma ha sido desafiado por la evidencia de polimerización *de novo* de la cubierta de actina en algunos modelos de fagocitosis (Liebl & Griffiths, 2009; Poirier et al., 2020; Yam & Theriot, 2004). Esto es interesante, ya que refleja

que, en realidad, la dinámica de actina forma parte activa de la maduración fagosomal.

Durante los ensayos de fagocitosis se observó por primera vez en microglías la polimerización *de novo* de la cubierta de actina fagosomal, referido en el presente estudio como "destellos de actina". Estos resultaron ser regularmente espaciados en el tiempo, ocurriendo cada 2 minutos entre destello aproximadamente (Figura 13), consistente con lo reportado en macrófagos Raw 264.7. Esto es indicativo de que el proceso está altamente regulado y no es estocástico. Además, los destellos no ocurren en todos los fagosomas, sino que en una subpoblación de aquellos, lo que según lo reportado en otros estudios, puede llegar a abarcar más del 30% de los fagosomas. Proyectamos a partir de estos resultados que ensayos futuros se utilicen tanto *beads* de látex, como otros cargos de relevancia patológica, como oligómeros de Tau, material apoptótico y bacterias, para ver si cambia la naturaleza de los destellos por el cambio en el receptor estimulado y la dureza del cargo.

A pesar de que se desconoce la función de los destellos de actina en la fisiología de los fagocitos, las posibles vías y mecanismos en acción se discutirán más adelante, además de los mecanismos moleculares que los podrían desencadenar.

Objetivo 2:

Estudiar la producción de ROS durante la maduración fagosomal de microglías BV2

3. Producción de ROS durante la maduración fagosomal: Estallido oxidativo

El estallido oxidativo es esencial para la eliminación de patógenos y para la respuesta inmunológica primaria ante agente dañinos e infecciosos. Sin embargo, sorprendentemente, la duración y magnitud de la producción de ROS intrafagosomal durante el estallido oxidativo no ha sido descrito ni caracterizado en microglías. En este trabajo se reporta por primera vez la magnitud y duración del fenómeno.

Los resultados obtenidos son similares a lo observado en macrófagos (VanderVen et al., 2009). La curva de fluorescencia tiene un comportamiento logístico, que se estanca entre aproximadamente 3-4 veces la fluorescencia basal. Más aún, la producción de ROS parece ser de naturaleza cíclica, en especial en algunos fagosomas, donde se ve un marcado aumento escalonado de la fluorescencia. Este comportamiento cíclico es muy parecido al comportamiento de la señal de actina durante los destellos, por lo que no sería extraño pensar que existe un *crosstalk* entre ambos procesos. Más aún, haciendo una pequeña revisión bibliográfica, se encontró que muchas cuantificaciones de diversos tipos de fagocitos (No microglías ya que no hay literatura), tienen un aumento de fluorescencia escalonado al usar partículas de levadura acopladas a OxyBurst (El Chemaly et al., 2014; Steinckwich et al., 2011; Tlili et al., 2011). Sin embargo, este comportamiento no es abordado por los autores. El manejo matemático de este trabajo permitió

visualizar por primera vez esta naturaleza cíclica, pero cabe dilucidar los mecanismos moleculares detrás de este fenómeno y si son reproducibles en otros modelos.

Al utilizar inhibidores de ROCK, se observó una disminución de la fluorescencia en las etapas iniciales de la fagocitosis (Figura 18). Sin embargo, el efecto se observa solo durante los primeros minutos del estallido oxidativo. Al observar la gráfica de la producción de ROS (Figura 18B), vemos que se aplanan las curvas con el inhibidor, lo que se condice con la “linearización” de la curva de fluorescencia (Figura 18A). Recientemente, se reportó que ROCK es capaz de fosforilar las serinas 304, 315, 320, 328 y 345 de p47phox para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno mediadas por el complejo NOX (Tlili et al., 2023). Sin embargo, existen diversas quinasas capaces de fosforilar estos residuos. Esto sugiere que la inhibición de ROCK inhibe la fosforilación acelerada de p47phox, pero esta fosforilación es compensada posteriormente por la actividad de otras quinasas, como PKC, AKT y ERK1/2 que son capaces de fosforilar estos residuos (El-Benna et al., 2009). Más aún, p47phox es considerado el organizador citosólico del complejo NOX, por lo que su fosforilación condiciona la unión a p22phox y, por ende, a la formación del complejo.

Una limitación de los ensayos con OxyBurst es que las largas grabaciones pueden generar pequeños cambios de foco que alteran la medición de fluorescencia. Esto explica el alto ruido que hay al generar la derivada discreta. Otra limitación de la medición es que no sabemos si se mantiene alta la concentración de ROS intrafagosomal después de la producción abrupta de ROS, o si esta va en disminución por mecanismos compensatorios, ya que la sonda no es reversible. Además, no sabemos qué proporción de las especies reactivas de oxígeno permanecen dentro del compartimento fagosomal y cuántas difunden hacia el

citoplasma, incluso durante el mismo estallido. Estos problemas se podrían superar con una sonda genética ratiométrica de ROS como Hyper 7.

Objetivo 3:

Evaluar la actividad de RhoA en la fagocitosis

4. Actividad de RhoA durante destellos de actina

La literatura sobre la participación de RhoA durante la maduración fagosomal es escasa y muchas veces contradictoria. Como discutimos anteriormente, existen reportes sobre la contribución de RhoA al estallido oxidativo mediante la fosforilación de la subunidad del complejo NOX2 p47phox, mediante la actividad quinasa de su efector ROCK. Sin embargo, esto no ha sido abordado en microglías. Como observamos una disminución de ROS al inhibir ROCK durante el estallido oxidativo, nos preguntamos si la actividad de RhoA también está presente durante la maduración fagosomal. Para nuestra sorpresa, no observamos mayores cambios en la actividad durante la fagocitosis, no así durante los destellos de actina, donde aumentó considerablemente. Más aún, se vio una alta correlación con la señal de actina y la actividad de RhoA. A pesar de que la correlación entre la actividad de RhoA y la polimerización de actina no indica causalidad, es una fuerte evidencia de que el fenómeno es RhoA dependiente. Sin embargo, experimentos que incluyan inhibidores de RhoA o mutantes dominantes negativas puede ser más conclusiva en determinar la dependencia de los destellos de actina de la actividad de RhoA.

En cuanto a la ausencia de actividad de RhoA durante la fagocitosis, esto puede deberse a que la sensibilidad del sensor no permitió detectar cambios significativos.

Otra posibilidad, es que la contribución de RhoA a la producción de ROS suceda precisamente durante los destellos de actina, donde si aumenta de forma robusta la actividad de RhoA. Esto además calza espacio temporalmente con su contribución a la producción de ROS, como se determinó con el uso de inhibidores de ROCK. A pesar de lo tentadora de esta conclusión, se requieren estudios más específicos para esgrimir una conclusión como esta, lo que está fuera del alcance de este estudio.

Hay que destacar que estos resultados no descartan que otras RhoGTPasas, como Rac1 o Cdc42 puedan estar incidiendo en este fenómeno, sumándole aún más complejidad. Algo muy importante, es mejorar la calidad de la transfección de las microglías, ya que la relación señal/ruido era muy alta, por lo que métodos como transducción lentiviral podrían ser más eficientes y fiables, lo que probablemente permitiría un rango dinámico más grande del sensor.

La bajada y posterior subida de la actividad de RhoA nos da un indicio de *loops* de retroalimentación. La proteína p190RhoGAP, que promueve el estado inactivo de RhoA (Unido a GDP), se ha reportado en estos destellos de actina, pero su temporalidad no fue descrita. Interesantemente, esta bajada y posterior subida de actividad se ha reportado en mecanotransducción de señales mediada por RhoA en adhesiones focales (Burrige et al., 2019). Esto sugiere una posible comunicación fagosoma-núcleo mediada por los destellos de actina. Más aún, la polimerización de actina alrededor del núcleo que presenciamos durante la adquisición de imágenes (Figura 21,22) es indicativo directo de un proceso de mecanotransducción. Sin embargo, falta experimentación para obtener un panorama más completo de la función de estas estructuras de actina y si reflejan realmente un cambio a nivel transcripcional, lo que sale del alcance de este estudio.

5. Generación de Mutantes de RhoA

Los datos obtenidos sugieren que hay una correlación entre el citoesqueleto de actina, la producción de ROS y la actividad de RhoA. Por ende, se procedió a generar herramientas que permitieran comprobar las hipótesis ya esgrimidas. Para esto, se diseñaron mutantes de RhoA insensibles a los ROS y que lamentablemente no están disponibles comercialmente. Esta mutantes incluyen a RhoA C16A y/o C20A y C16 y/o 20D. Además, se diseñaron con la intención de incorporar estas mutaciones en sensores FRET (Como RhoA-2G), lo que nos permite evaluar directamente los cambios de actividad subcelular que generan estas mutantes por microscopía en sistemas biológicos y así evitar tener que aislar compartimientos subcelulares para su estudio *in vitro*.

Las mutantes generadas a la fecha incorporan la sustitución C16A en distintos plásmidos, y fue realizada mediante mutagénesis sitio dirigido y validadas por secuenciación (Materiales y Métodos, 8).

Ensayos preliminares con Microglías Primarias de Rata

6.1 Protocolos de purificación

Para la purificación de microglías, se utilizó primeramente un protocolo estándar (Lian, Litvinchuk, et al., 2016) que correspondía al protocolo 1. Sin embargo, la eficiencia de este protocolo era muy baja y muchas microglías permanecían en el co-cultivo original (Figura 24D). Por esta razón, generamos un protocolo más agresivo (protocolo 2), donde la agitación fue realizada por más tiempo. A pesar de que vimos signos de activación con ambos protocolos, no realizamos una prueba funcional con el primer protocolo, en parte por la baja cantidad de células obtenidas. Sin embargo, no vimos signos de activación más allá de lo esperado por dejar el co-cultivo en agitación por más tiempo. Aún creemos que el mayor factor de activación en los cultivos es el medio con 10% suero como se ha reportado en la literatura (Montilla et al., 2020), por lo que sería bueno evaluar la necesidad de usar medios condicionados de composición más fisiológica, para evitar la activación.

El segundo protocolo aumenta ~4 veces la eficiencia comprometiendo en solo un 7% la pureza (~91%) (Figura 24), lo que, para los experimentos realizados, es una pureza bastante razonable, por lo que se optó por el segundo protocolo para realizar los análisis funcionales. Sin embargo, es bueno tener ambos protocolos para experimentos que exijan más o menos pureza.

6.2 Análisis funcional con LPS:

Los análisis funcionales con LPS en las concentraciones utilizadas son muy similares a lo reportado en otros estudios, con un ensanchamiento del soma y retracción de ramificaciones similares en microglías primarias de rata (He et al., 2021). También se ha reportado que IBA1 transloca al núcleo durante la activación,

lo que tiene sentido con la disminución en la co-localización de actina con IBA1. Por ende, se ven claros signos de activación a un fenotipo M1 con el tratamiento con LPS.

Como se adelantaba en la introducción, los fenotipos M1 y M2 son los dos estados canónicos de polarización, donde el primero representa un fenotipo proinflamatorio mientras el segundo representa un fenotipo pro-resolutivo o antiinflamatorio. El Lipopolisacárido (LPS), una endotoxina constitutiva de la membrana externa de bacterias gram negativa, es ampliamente utilizado para inducir la polarización tipo M1. El LPS se une a los receptores tipo toll (TLR4), lo que activa dos rutas M1 principales: NF- κ B: A través de la ruta canónica p50 por la liberación de NF- κ B (p50) y RelA (p65) y MAPK a través de la fosforilación del factor de transcripción AP-1 (Figura 30). Esto genera la transcripción de genes proinflamatorios que cambian la morfología de una ramificada a una ameboide, promueve la producción de ROS y el cambio metabólico a un fenotipo glucolítico, como ya se había mencionado anteriormente. De esta forma, el fenotipo M1 observado en los resultados (Figura 25A) se condice con la literatura y demuestra la funcionalidad de las microglías aisladas, por lo que pueden ser sometidas a ensayos de fagocitosis. Para determinar de forma más específica el fenotipo microglial, se podrían cuantificar mediante RT-qPCR los niveles de transcrito de ciertas interleuquinas (ej. IL-1) o subunidades de NOX2 para determinar el grado de “activación” respecto a la concentración de tratamiento utilizado. Además, el

tratamiento con interleuquinas antiinflamatorias puede ser usado para activar el fenotipo opuesto, es decir, M2.

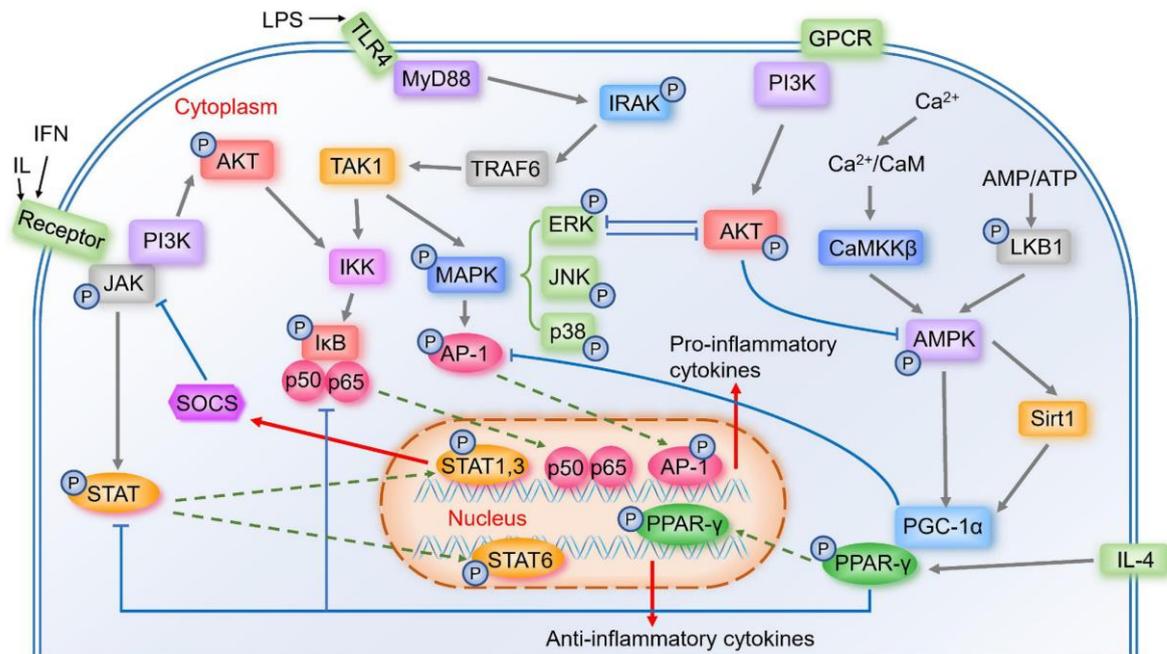


Figura 30: Principales vías de señalización para la inducción del fenotipo M1 y M2. La unión de PAMPs, como el LPS por el receptor tipo toll TLR4, desencadena cascadas de transducción que activan la vía canónica de NF-κB y AP-1, induciendo la transcripción de genes pro-inflamatorios que inducen el fenotipo M1. La unión de ciertas interleuquinas pro-inflamatorias a los receptores de citoquinas también pueden fomentar la vía canónica de NF-κB. Además, paralelamente la señalización mediada por el sistema JAK/STATs, es suficiente para inducir la transcripción de genes pro-inflamatorios mediados por factores de transcripción STAT (ej. 1 y 3). Por otro lado, interleuquinas anti-inflamatorias como IL-4/13 también activan la vía canónica JAK/STAT, pero mediante el factores de transcripción que promueven el fenotipo M2, como STAT6 y PPAR-γ. Imagen de (Guo et al., 2022).

6.3 Destellos de actina en microglías primarias

A diferencia de la línea celular BV2, las microglías primarias no son transfectables, por lo que se ideó una forma de ver los destellos de actina en células fijadas mediante inmunotinción, como se muestra en Materiales y Métodos (6.1). Mediante este método se observó una gran prevalencia del fenómeno, donde 30% de los fagosomas dieron positivo para una cubierta total de actina alrededor de todo el fagosoma, en comparación con el <15% observado en macrófagos por (Poirier et al., 2020). Más aún, si cuantificamos la cantidad de fagosomas rodeados de actina

en al menos un plano del eje Z, se obtienen más de un 60% del total. Como los destellos de actina son un fenómeno dinámico, es de esperar que no todos sean captados, por lo que la prevalencia debe ser aún mayor. Esto da cuenta de que el fenómeno puede ser más recurrente en microglías que en macrófagos. Sin embargo, un mayor número de réplicas biológicas se requiere para llegar a esta conclusión.

6.4 Estallido Oxidativo en microglías primarias

Se logró cuantificar la magnitud y duración del estallido oxidativo de las microglías primarias de rata la cual resultó ser similar a lo obtenido en BV2, con una duración un poco más larga, de 30 minutos aproximadamente y un cambio relativo un poco más bajo, de 2,3 veces la fluorescencia basal. Sin embargo, el *peak* de producción de ROS fue muy parecido (aproximadamente a los 5 minutos) y la naturaleza logística de la curva se mantuvo, por lo que en este respecto los datos de los cultivos primarios son bastante congruentes con los datos extraídos de las líneas celulares.

Las líneas celulares tienen limitaciones en cuanto a recapitular las características de las microglías primarias. De esta forma, obtener tantos destellos de actina y la curva de producción de ROS intrafagosomal durante el estallido oxidativo en un cultivo primario, dan respaldo a los resultados obtenidos en el modelo de la línea celular, lo que sugiere que, al menos la fenomenología general observada, es extrapolable a otros modelos. Sin embargo, hace falta aumentar el número de réplicas biológicas en estos cultivos primarios para poder afirmar con certeza que la cuantificación sea certera.

Resultados y Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo, se logró evaluar la participación del citoesqueleto de actina, la producción de ROS intrafagosomal y la actividad de RhoA durante la fagocitosis de *beads* en células BV2 y microglías primarias.

1. Durante la maduración fagosomal ocurren destellos de actina, por lo que existe una alta dinamicidad del citoesqueleto de actina en fagosomas de células BV2 y en microglías primarias
2. Durante los destellos de actina, aumenta la actividad de RhoA en células BV2. Además, la actividad de RhoA disminuye previo al destello de actina, para luego aumentar.
3. El estallido oxidativo en células BV2 se caracteriza por la producción abrupta de ROS intrafagosomal durante los primeros 20 minutos de la fagocitosis. Además, esta producción presenta un aumento cíclico de alta y baja producción de ROS.
4. La actividad de RhoA, la polimerización F-Actina y la producción de ROS comparten la misma dinámica cíclica y espacio temporalidad en el fagosoma, lo que sugiere que existe un *crosstalk* entre ellas, lo que parece ser esencial para la maduración fagosomal de microglías BV2.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la dinámica de actina, el estallido oxidativo y la actividad de RhoA están funcionalmente conectados durante la maduración fagosomal. Esta conexión funcional desencadena en los ya descritos destellos de actina, cuya función aún es desconocida. Sin embargo, los datos obtenidos sugieren que tendrían un rol señalizador, mediado por mecanotransducción, que podrían mejorar la digestión del contenido fagosomal.

Bibliografía

- Acevedo, A., & González-Billault, C. (2018). Crosstalk between Rac1-mediated actin regulation and ROS production. *Free Radical Biology & Medicine*, 116, 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.008>
- Adams, E. L., Rice, P. J., Graves, B., Ensley, H. E., Yu, H., Brown, G. D., Gordon, S., Monteiro, M. A., Papp-Szabo, E., Lowman, D. W., Power, T. D., Wempe, M. F., & Williams, D. L. (2008). Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(1), 115-123. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133124>
- Aghajanian, A., Wittchen, E. S., Campbell, S. L., & Burridge, K. (2009). Direct Activation of RhoA by Reactive Oxygen Species Requires a Redox-Sensitive Motif. *PLOS ONE*, 4(11), e8045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008045>
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2), 229-237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V)
- Borst, K., Dumas, A. A., & Prinz, M. (2021). Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*, 54(10), 2194-2208. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>
- Burridge, K., Monaghan-Benson, E., & Graham, D. M. (2019). Mechanotransduction: From the cell surface to the nucleus via RhoA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*,

Biological Sciences, 374(1779), 20180229.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0229>

Cap, K. C., Kim, J.-G., Hamza, A., & Park, J.-B. (2020). P-Tyr42 RhoA GTPase amplifies superoxide formation through p47phox, phosphorylated by ROCK.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 523(4), 972-978.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.001>

Carta, A. R., & Pisanu, A. (2013). Modulating Microglia Activity with PPAR- γ

Agonists: A Promising Therapy for Parkinson's Disease? *Neurotoxicity*

Research, 23(2), 112-123. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9342-7>

Chang, D., Hirate, T., Uehara, C., Maruyama, H., Uozumi, N., & Arai, F. (2021).

Evaluating Young's Modulus of Single Yeast Cells Based on Compression

Using an Atomic Force Microscope with a Flat Tip. *Microscopy and*

Microanalysis, 27(2), 392-399. <https://doi.org/10.1017/S1431927620024903>

Cornell, J., Salinas, S., Huang, H.-Y., & Zhou, M. (2021). Microglia regulation of

synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regeneration Research*,

17(4), 705-716. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.322423>

Desale, S. E., & Chinnathambi, S. (2021). Phosphoinositides signaling modulates

microglial actin remodeling and phagocytosis in Alzheimer's disease. *Cell*

Communication and Signaling : CCS, 19, 28. [https://doi.org/10.1186/s12964-](https://doi.org/10.1186/s12964-021-00715-0)

021-00715-0

Diaz-Aparicio, I., Paris, I., Sierra-Torre, V., Plaza-Zabala, A., Rodríguez-Iglesias, N.,

Márquez-Roper, M., Beccari, S., Huguet, P., Abiega, O., Alberdi, E.,

Matute, C., Bernales, I., Schulz, A., Otrókocsi, L., Sperlagh, B., Happonen,

K. E., Lemke, G., Maletic-Savatic, M., Valero, J., & Sierra, A. (2020).

Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the

- Phagocytosis Secretome. *Journal of Neuroscience*, 40(7), 1453-1482.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0993-19.2019>
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., & Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
- El Chemaly, A., Nunes, P., Jimaja, W., Castelbou, C., & Demaurex, N. (2014). Hv1 proton channels differentially regulate the pH of neutrophil and macrophage phagosomes by sustaining the production of phagosomal ROS that inhibit the delivery of vacuolar ATPases. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(5), 827-839. <https://doi.org/10.1189/jlb.0513251>
- El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Marie, J.-C., & Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: Structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.4.058>
- Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(11), Article 11.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
- Freeman, S. A., Grinstein, S., Sergio Grinstein, Grinstein, S., & Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: Receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews*, 262(1), 193-215. <https://doi.org/10.1111/imr.12212>
- 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 (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841-845.
<https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020537.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Guo, S., Wang, H., & Yin, Y. (2022). Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.815347>
- He, Y., Taylor, N., Yao, X., & Bhattacharya, A. (2021). Mouse primary microglia respond differently to LPS and poly(I:C) in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89777-1>
- Henn, A., Lund, S., Hedtjärn, M., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., & Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 26(2), 83-94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
- Heo, J., Raines, K. W., Mocanu, V., & Campbell, S. L. (2006). Redox regulation of RhoA. *Biochemistry*, 45(48), 14481-14489.
<https://doi.org/10.1021/bi0610101>
- Hobbs, G. A., Zhou, B., Cox, A. D., & Campbell, S. L. (2014). Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. *Small GTPases*, 5(2).
<https://doi.org/10.4161/sgtp.28579>
- Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>

- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6, 486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>
- Illes, P., Rubini, P., Ulrich, H., Zhao, Y., & Tang, Y. (2020). Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. *Cells*, 9(5), 1108. <https://doi.org/10.3390/cells9051108>
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., & Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis. *Glia*, 61(8), 1320-1330. <https://doi.org/10.1002/glia.22517>
- Kim, J.-G., Kwon, H.-J., Wu, G., Park, Y., Lee, J.-Y., Kim, J., Kim, S.-C., Choe, M., Kang, S. G., Seo, G.-Y., Kim, P.-H., & Park, J.-B. (2017). RhoA GTPase oxidation stimulates cell proliferation via nuclear factor- κ B activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.013>
- Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: Going through the acid test. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10), 781-795. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>
- Lancaster, C., Fountain, A., Dayam, R. M., Somerville, E., Sheth, J., Jacobelli, V., Somerville, A., Terebiznik, M., & Botelho, R. J. (2021). *Phagosome resolution regenerates lysosomes and maintains the degradative capacity in phagocytes* (p. 2020.05.14.094722). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.094722>
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., & Hickey, W. F. (1993). Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia*, 7(1), 19-24. <https://doi.org/10.1002/glia.440070106>

- Li, B., Bedard, K., Sorce, S., Hinz, B., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K.-H. (2009). NOX4 expression in human microglia leads to constitutive generation of reactive oxygen species and to constitutive IL-6 expression. *Journal of Innate Immunity*, 1(6), 570-581. <https://doi.org/10.1159/000235563>
- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2016). Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 36(2), 577-589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>
- Lian, H., Roy, E., & Zheng, H. (2016). Protocol for Primary Microglial Culture Preparation. *Bio-protocol*, 6(21), e1989. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1989>
- Liebl, D., & Griffiths, G. (2009). Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *Journal of cell science*, 122, 2935-2945. <https://doi.org/10.1242/jcs.048355>
- Lu, N., & Zhou, Z. (2012). Chapter eight—Membrane Trafficking and Phagosome Maturation During the Clearance of Apoptotic Cells. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 293, pp. 269-309). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394304-0.00013-0>
- Maneu, V., Yáñez, A., Murciano, C., Molina, A., Gil, M. L., & Gozalbo, D. (2011). Dectin-1 mediates in vitro phagocytosis of *Candida albicans* yeast cells by retinal microglia. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(1), 148-150. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00829.x>

- Mao, Y., & Finnemann, S. C. (2015). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases*, 6(2), 89-99. <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.989785>
- Medina, C. B., & Ravichandran, K. S. (2016). Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), 979-989. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.13>
- Montilla, A., Zabala, A., Matute, C., & Domercq, M. (2020). Functional and Metabolic Characterization of Microglia Culture in a Defined Medium. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.00022>
- Mortimer, P. M., Mc Intyre, S. A., & Thomas, D. C. (2021). Beyond the Extra Respiration of Phagocytosis: NADPH Oxidase 2 in Adaptive Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.733918>
- Nayak, R. C., Chang, K.-H., Vaitinadin, N.-S., & Cancelas, J. A. (2013). Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunological reviews*, 256(1), 10.1111/imr.12119. <https://doi.org/10.1111/imr.12119>
- Poirier, M. B., Fiorino, C., Rajasekar, T. K., & Harrison, R. E. (2020). F-actin flashes on phagosomes mechanically deform contents for efficient digestion in macrophages. *Journal of Cell Science*, 133(12). <https://doi.org/10.1242/jcs.239384>
- Rio-Hortega, P. (1939). THE MICROGLIA. *The Lancet*, 233(6036), 1023-1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)60571-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)60571-8)

- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., & Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2), 292-297.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5388>
- Scheiblich, H., & Bicker, G. (2017). Regulation of Microglial Phagocytosis by RhoA/ROCK-Inhibiting Drugs. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(3), 461-473. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0379-7>
- Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 71, e50079. <https://doi.org/10.3791/50079>
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: Beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 6.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>
- Simpson, D. S. A., & Oliver, P. L. (2020). ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants*, 9(8), 743. <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>
- Snarr, B. D., Drummond, R. A., & Lionakis, M. S. (2020). It's all in your head: Antifungal immunity in the brain. *Current Opinion in Microbiology*, 58, 41-46.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.011>
- Steffen, A., Stradal, T. E. B., & Rottner, K. (2017). Signalling Pathways Controlling Cellular Actin Organization. En B. M. Jockusch (Ed.), *The Actin Cytoskeleton* (pp. 153-178). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/164_2016_35

- Steinckwich, N., Schenten, V., Melchior, C., Bréchar, S., & Tschirhart, E. (2011). An Essential Role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 Proteins for Ca²⁺ Signaling and Fc gamma R-Mediated Phagosomal Oxidative Activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186, 2182-2191.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001338>
- Timmerman, R., Burm, S. M., & Bajramovic, J. J. (2018). An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00242>
- Tlili, A., Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüsse, O. (2011). Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(3), 438-447.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.024>
- Tlili, A., Pintard, C., Hurtado-Nedelec, M., Liu, D., Marzaioli, V., Thieblemont, N., Dang, P. M.-C., & El-Benna, J. (2023). ROCK2 interacts with p22phox to phosphorylate p47phox and to control NADPH oxidase activation in human monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(3), e2209184120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209184120>
- Tollis, S., Dart, A. E., Tzircotis, G., & Endres, R. G. (2010). The zipper mechanism in phagocytosis: Energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Systems Biology*, 4, 149. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-149>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01066>

- VanderVen, B. C., Yates, R. M., & Russell, D. G. (2009). Intraphagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(4), 372-378. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00877.x>
- Villani, A., Benjaminsen, J., Moritz, C., Henke, K., Hartmann, J., Norlin, N., Richter, K., Schieber, N. L., Franke, T., Schwab, Y., & Peri, F. (2019). Clearance by Microglia Depends on Packaging of Phagosomes into a Unique Cellular Compartment. *Developmental Cell*, *49*(1), 77. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.014>
- Vorselen, D., Labitigan, R. L. D., & Theriot, J. A. (2020). A mechanical perspective on phagocytic cup formation. *Current Opinion in Cell Biology*, *66*, 112-122. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.011>
- Wales, P., Schuberth, C. E., Aufschneider, R., Fels, J., García-Aguilar, I., Janning, A., Dlugos, C. P., Schäfer-Herte, M., Klingner, C., Wälte, M., Kuhlmann, J., Menis, E., Hockaday Kang, L., Maier, K. C., Hou, W., Russo, A., Higgs, H. N., Pavenstädt, H., Vogl, T., ... Wedlich-Söldner, R. (s. f.). Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *eLife*, *5*, e19850. <https://doi.org/10.7554/eLife.19850>
- Xu, Y., Jin, M.-Z., Yang, Z.-Y., & Jin, W.-L. (2020). Microglia in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, *16*(2), 270-280. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.290881>
- Yam, P. T., & Theriot, J. A. (2004). Repeated Cycles of Rapid Actin Assembly and Disassembly on Epithelial Cell Phagosomes. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(12), 5647-5658. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0509>

Anexo

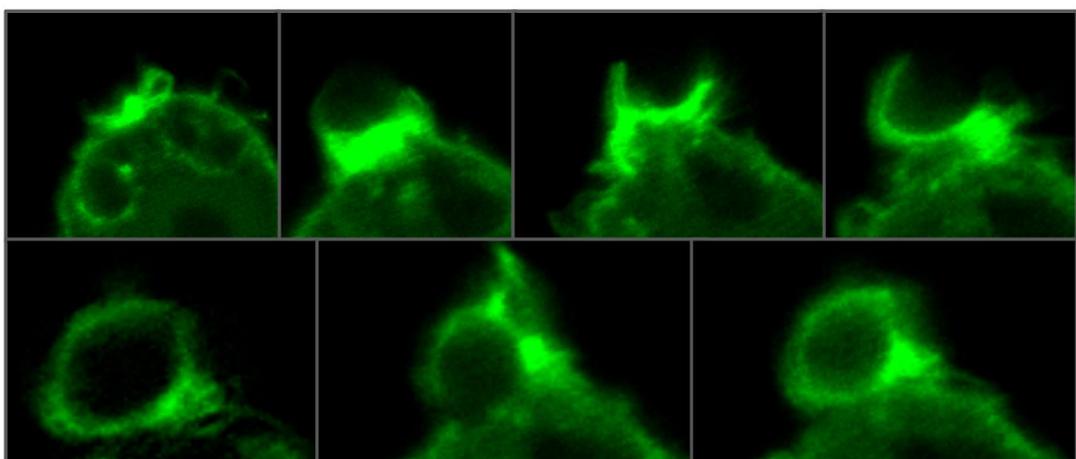
Anexo I: Tablas de datos obtenidos por la colocalización

Control (vehículo 1)					
#Foto	IBA1+DAPI	IBA1+beta Actin	#cells	Contribución al promedio (DAPI)	Contribución al promedio (Actina)
1	0.81	0.32	4	0,0139	0,0055
4	0.83	0.34	20	0,0712	0,0292
6	0.82	0.35	21	0,0739	0,0315
7	0.83	0.36	22	0,0784	0,0340
8	0.84	0.35	26	0,0937	0,0391
9	0.81	0.31	17	0,0591	0,0226
10	0.84	0.3	33	0,1190	0,0425
Control (vehículo 2)					
2	0.75	0.38	19	0,061	0,031
8	0.80	0.45	24	0,082	0,046
9	0.78	0.37	18	0,060	0,029
10	0.81	0.36	29	0,101	0,045
Resultados ponderados	0,811	0,354	233	0,814	0,355

LPS 50ng/ml					
#Foto	IBA1+DAPI	IBA1+beta Actin	#cells	Contribución al promedio	Contribución al promedio
1	0.84	0.28	10	0,102	0,034
3 (Otra glia cortada)	0.78	0.32	12	0,114	0,047
4	0.81	0.23	13	0,128	0,036
5	0.88	0.19	10	0,107	0,023
7 (Glia cortada)	0.81	0.18	8	0,079	0,018
8	0.81	0.21	11	0,109	0,028
9 (glia cortada)	0.78	0.23	18	0,171	0,050
Resultados ponderados	0,816	0,234	82	0,811	0,237

LPS 100ng/ml					
#Foto	IBA1+DAPI	IBA1+beta Actin	#cells	Contribución al promedio	Contribución al promedio
1 (Excluyendo glia)	0.79	0.13	11	0,081	0,013
2 (Excluyendo glia)	0.85	0.16	11	0,087	0,016
3	0.75	0.25	14	0,098	0,033
4	0.81	0.24	15	0,114	0,034
5	0.84	0.11	11	0,086	0,011
6 (Excluyendo lisis)	0.71	0.3	9	0,060	0,025
8	0.81	0.11	11	0,083	0,011
9	0.77	0.23	11	0,079	0,024
10 (excluyendo glia)	0.75	0.29	14	0,098	0,038
Resultados ponderados	0,787	0,202	107	0,787	0,206

Anexo II: Imágenes Originales representadas en la figura 11



Anexo III: Determinación del rango dinámico del FRET-2G

Para ver el rango dinámico del sensor, generamos una variante constitutivamente activa (Q61L) y dominante negativa (T17N) del mismo constructo con la GTPasa Rac1 mediante mutagénesis sitio dirigida. Los resultados fueron validados por secuenciación de sanger (Figura 31A,B) y probados en la línea celular COS7, donde se obtuvo aproximadamente un ~33% de variación entre el sensor activado y el sensor control, pero no grandes diferencias en el control negativo (Figura 31C). Esto es indicativo de que la actividad basal de las RhoGTPasas al medir la célula completa no es detectable como lo podría ser al medir zonas específicas (Lamelas por ejemplo)

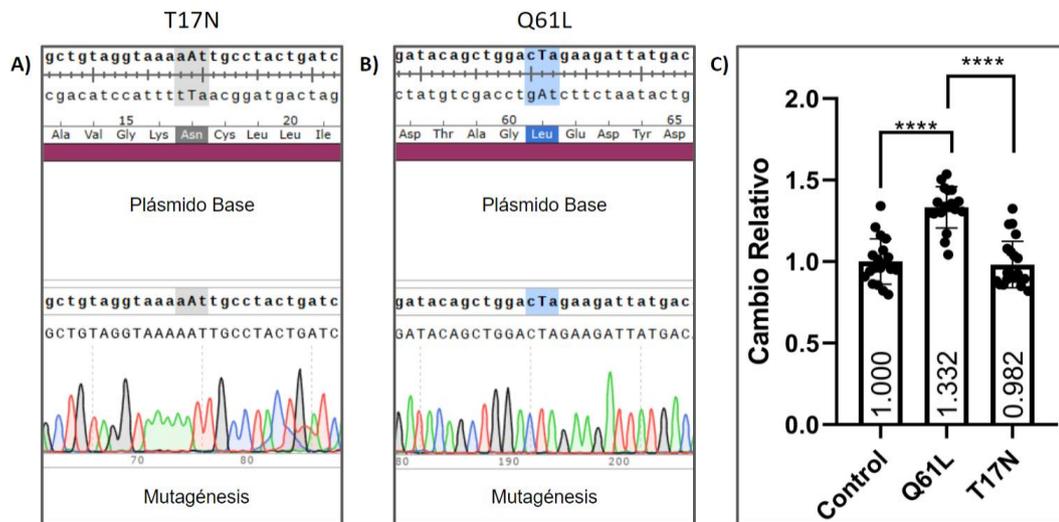


Figura 31: Determinación del rango dinámico del sensor FRET-2G mediante variantes constitutivamente activas y dominante negativo. A) Secuencia de mutante T17N, arriba se ve el plásmido base con la mutación esperada (codón en gris) y abajo el resultado de la mutagénesis (gris), con la calidad de secuenciación. La A mayúscula indica el *mismatch* esperado. **B)** Secuencia de la mutante Q61L, donde arriba se ve el plásmido base con la mutación esperada (codón en azul) y abajo el resultado de la mutagénesis (azul) con la calidad de la secuenciación. La T mayúscula indica el *mismatch* esperado. **C)** Cambio relativo de la eficiencia del FRET entre el grupo control, la mutante constitutivamente activa (Q61L) y la dominante negativa (T17N). El aumento en la Q61L sobre el control, al igual que una baja no significativa en la dominante negativa, lo que responde a una actividad basal no detectable al medir la célula completa.

Anexo IV: Determinación del Rango dinámico del OxyBurst

Para evaluar si el cese de la producción de ROS no era un artefacto generado por la saturación de la sonda, se estimó el rango dinámico de la fluorescencia de las levaduras respecto a su fluorescencia basal mediante la fotooxidación de la misma (Figura 22D). A pesar del abrupto aumento de ROS, la sonda está lejos del punto de saturación (Figura 22C).

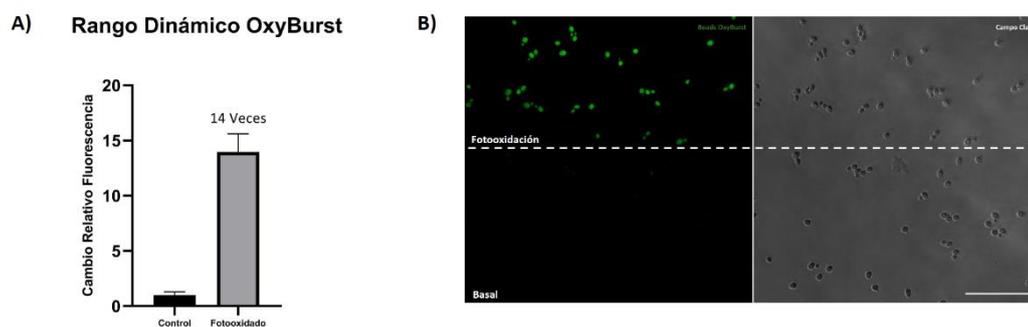


Figura 32: Características de la sonda OxyBurst. **A)** Rango dinámico del OxyBurst determinado mediante la fotooxidación de *beads*. El rango dinámico de fluorescencia es de ~14 veces **B)** Imagen representativa del rango dinámico del OxyBurst, donde solo la mitad del campo fue fotooxidado. A la izquierda se muestra la fluorescencia del Oxyburst y a la derecha el campo claro.