



## ORIGINAL

## Los MicroRNAs neuroprotectores en el daño secundario de la lesión medular traumática

### Neuroprotective microRNAs in the secondary damage of the traumatic spinal cord injury

Yunta M<sup>1</sup>, Nieto-Díaz M<sup>1</sup>, Esteban F J<sup>2</sup>, López-Rodríguez M<sup>1</sup>, Navarro-Ruiz R M<sup>1</sup>, Reigada D<sup>1</sup>, Pita-Thomas D W<sup>1</sup>, Maza R M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Neuroprotección Molecular, Dpto. de Neurología Experimental, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, Spain. <sup>2</sup> Departamento de Biología Experimental, Unidad de Biología de Sistemas, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén, Jaén, Spain.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

#### Resumen

**Objetivo:** Identificar microRNAs cuyos niveles varían específicamente tras una lesión medular traumática.

**Material y método:** en un modelo animal murino (*Rattus norvegicus* (rata) de la cepa Wistar) se realizó lesión medular mediante contusión, y los fragmentos medulares fueron extraídos a las 24 horas, 3 días y 7 días post-lesión. Los patrones de expresión de los animales lesionados se compararon con animales control en los que se realizó laminectomía sin lesión y con un grupo de animales en los que no se realizó ninguna cirugía anterior a la extracción.

**Resultados:** Entre los microRNAs que mostraron una alteración tras la lesión de la médula espinal destaca miR-21, el cual ha sido implicado en el proceso de apoptosis en el sistema nervioso.

**Conclusión:** la lesión de la médula espinal produce alteraciones importantes en los niveles de expresión de microRNAs que participan en los procesos que acontecen en dicha lesión, tales como apoptosis e inflamación.

**Palabras clave:**

MicroRNA, lesión de médula spinal, apoptosis.

#### Abstract

**Aim:** Identify microRNAs whose levels change specifically after traumatic spinal cord injury.

**Materials and methods:** in a murine animal model (*Rattus norvegicus* (rat) Wistar), spinal cord injury was induced by contusion and the medullar fragments were extracted 24 hours, 3 days and 7 days post-injury. The expression patterns of the injured animals were compared with animals that had laminectomy without injury and animals that had no surgery before the extraction.

**Result:** among the microRNAs that change after spinal cord injury it is miR-21 that has been implicated in apoptosis in the nervous system.

**Conclusion:** spinal cord injury causes dramatic changes in the microRNA expression pattern that have a role in the processes that take place in the injury as apoptosis and inflammation.

**Key-words:**

MicroRNA, spinal cord injury, apoptosis.

#### Correspondencia

M. Yunta González  
Laboratorio de Neuroprotección Molecular.  
Unidad de Neurología Experimental. Planta 3ª NE  
Hospital Nacional de Paraplégicos.  
Finca La Peraleda s/n. Toledo 45017, España  
myunta@sescam.jccm.es



## Introducción

La lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) es una de las principales causas de muerte y discapacidad en los países desarrollados [1]. La mayoría de los casos de lesión medular se producen por accidentes, en particular de tráfico, y el daño inflingido resulta en la fractura o dislocación de la columna vertebral que produce una combinación de compresión y flexión de la médula espinal torácica o cervical [2]. La lesión de la médula espinal (LME) produce un daño tisular inicial seguido del desencadenamiento de procesos nocivos que se extienden durante días o años e incrementan el área de lesión. Es posible distinguir dos etapas durante la LME, una fase aguda inicial denominada lesión primaria durante la cual se destruye el tejido nervioso afectado directamente por la acción traumática y una fase subaguda denominada lesión secundaria, en la que la lesión inicial se ve exacerbada con la acción de procesos celulares y moleculares nocivos que conducen a la muerte celular del tejido nervioso no afectado inicialmente y a la generación de una barrera que impide la neuroreparación [3-5].

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas reguladoras de la expresión de RNA mensajeros (mRNA). Constituyen segmentos de unos 22 nucleótidos no codificantes que suelen localizarse en secuencias intrónicas. Una vez transcritos y procesados, los microRNAs maduros entran a formar parte del denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde también se dirigen los mRNAs, que son silenciados por apareamiento de bases. Recientemente se ha descrito el patrón de expresión de miRNAs en el sistema nervioso [6-8] y cómo los niveles de expresión de varios de ellos cambian en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [9-11].

Aunque se han probado numerosas terapias en modelos animales para tratar la lesión de médula espinal [12], no existe un tratamiento regenerador de la función nerviosa. En este trabajo hemos identificado el patrón de expresión de microRNAs propio de la lesión medular dañada por contusión y validado aquellos implicados en apoptosis como candidatos a inferir una actividad neuroprotectora potencialmente capaz de prevenir la apoptosis en la lesión medular secundaria.

## Materiales y métodos

Incluimos en el estudio 35 ratas (*Rattus norvegicus*) de 12-14 semanas, con un peso nunca inferior a 200 g. Se realizaron 7 grupos experimentales, atendiendo al tipo de tratamiento quirúrgico, con un total de 5 ratas por grupo. Así se realizó un grupo control, que no sufrió cirugía previa a la extracción del tejido, y grupos con una laminectomía sin

contusión y con contusión medular, sacrificados a tres tiempos: 24 horas, 3 días y 7 días. La lesión medular se realizó mediante laminectomía y contusión a nivel torácico de T8, tras asegurar la médula en un aparato estereotáxico, con pinzas a nivel de T7 y T9. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 40 mg/Kg (Dolethal, Vetoquinol, Lure Cedex, Francia). La contusión se realizó con un aparato IH (Spinal Cord Impactor de Precision System & Instrumentation, LLC, Va) con el cual se aplicó un impacto de 200 kilodinas. Los animales lesionados, previamente a su sacrificio, fueron sometidos al test de Basso, Beattie y Bresnahan, que evalúa la función motora en base a la articulación de la cadera, rodilla y tobillo [13]. Los fragmentos medulares, de 1,5 cm de la médula comprendiendo el área de lesión y parte del tejido adyacente, se extrajeron en fresco, sacrificando a los animales justo antes de la extracción. Los fragmentos medulares fueron mantenidos en RNAlater (Qiagen) hasta el momento de la extracción del RNA.

## Aislamiento de RNA

Se extrajo el RNA total mediante QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) y a continuación se purificó mediante el kit de aislamiento de RNA miRNeasy (Qiagen). La calidad y concentración del RNA total se determinó midiendo la absorbancia en el ultravioleta a 260/280 y 260/230 con un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000, y el índice RQI, que determinó la integridad del RNA total, se valoró con un sistema de análisis electroforético Experion (BioRad). Las muestras incluidas en el estudio presentaron ratios 260/280  $\geq 1,8$  y  $\leq 2,2$  y el índice RQI  $\geq 7,5$ .

## Análisis mediante microarray de microRNA

Las muestras de RNA total se hibridaron con miRCURY LNA® microRNA Array Kit de Exiqon, que contiene sondas para la base de datos Sanger mirBASE 9.0 completa. Para la hibridación se utilizó, en todas las muestras, 1  $\mu$ g de RNA total marcado con Hy3 y 1  $\mu$ g de muestras marcado con Hy5. Ambos marcajes se mezclaron previamente a la hibridación, que se efectuó en un horno de hibridación con rotación a 20 rpm a 65° C, empleando las cámaras de hibridación SureHyb hybridization chambers (Agilent Technologies). La lectura de la señal se efectuó mediante un aparato Axon GenePix 4000B microarray scanner (Axon Instruments).

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el *software* Axon GenePix Pro y a continuación se normalizaron con el método de estabilización de la varianza de Huber. Las compa-



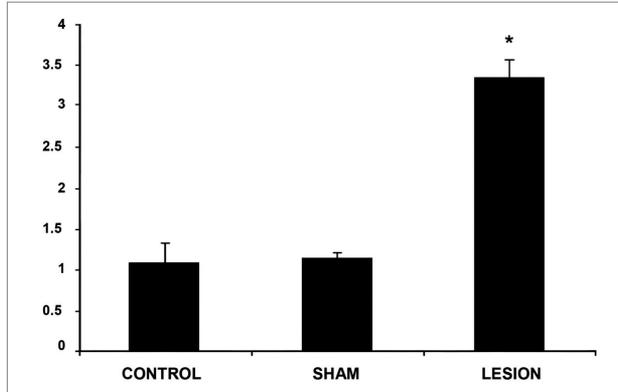


Fig. 3. Aumento en el grupo intervenido de los niveles de expresión de miR21 7 días post-lesión (\*  $p < 0,05$ ).

## Discusión

En el presente trabajo de investigación estudiamos los efectos de la contusión medular sobre los niveles de expresión de microRNAs. Encontramos que, en nuestro modelo de contusión, 345 microRNAs cambian significativamente sus niveles de expresión. Las diferencias en los cambios de expresión aumentan a lo largo del tiempo tras la lesión, encontrándose un total de 257 cambios en la lesión de 7 días respecto a la laminectomía a igual periodo de tiempo. Cabe destacar que la gran mayoría de los cambios de expresión se debe a una represión. Esta represión general de los microRNAs ya ha sido descrita para otros procesos biológicos [14, 15]. Otros estudios realizados en ratón, donde la lesión se realizó por compresión, indican el mismo número de microRNAs con aumentos de expresión y con disminución, (un total de 5 microRNAs), aunque no indican el número total de cambios [16]. Así mismo, en un estudio en rata donde el modelo de lesión es también contusión aunque a diferente nivel (T10 respecto a T8 en nuestro estudio) y realizada la contusión con instrumental menos preciso y reproducible que en nuestro estudio, también encuentran un número similar de microRNAs con aumento y con disminución de los niveles de expresión [17].

Los tiempos escogidos para detectar los cambios de expresión que acontecen tras una lesión medular son 1, 3 y 7 días. Los procesos biológicos que ocurren en una lesión de este tipo en este periodo temporal conducen fundamentalmente a inflamación y apoptosis. La respuesta a un trauma de estas características presenta 2 oleadas de infiltración celular [18]. En rata, los neutrófilos aparecen en la zona de lesión a las 4-6 horas tras el daño, siendo máximos a las 12-24 horas y desapareciendo a los 5 días [19]. Los macró-

fagos infiltrados aparecen en la lesión a los 2 días, y permanecen durante meses. Por tanto, la elección de los tiempos de 24 horas y 3 días se justifica debido al gran número de procesos inflamatorios causados por la infiltración de neutrófilos y células T en el área de lesión, mientras que tanto en las primeras horas tras la lesión como a los 7 días se produce una oleada de apoptosis que afecta al área de lesión y al tejido adyacente [20].

Numerosos estudios sobre mejora de la función motora y sensorial tras la lesión medular traumática se apoyan en el hecho de que es posible proteger el tejido que ha sufrido un daño traumático medular, favoreciendo así la regeneración. Si bien es difícil evitar la muerte inicial de tipo necrótico de las células en el área de lesión, sí es posible diseñar estrategias que protejan a aquellas células no dañadas que durante la lesión secundaria inician el programa apoptótico, haciendo posible una mejora en la función nerviosa [4, 20]. Atendiendo a las propiedades neuroprotectoras de distintas sustancias se han desarrollado estrategias que interfieren con los factores nocivos que participan en los procesos desencadenados durante el daño secundario. Así en la fisiología de LME se han utilizado corticosteroides, gangliósidos, antagonistas opioides, inhibidores de receptores glutamatérgicos y de canales iónicos, inhibidores de ciclooxigenasa 2, antibióticos como minociclina, inmunosupresores (FK506 o ciclosporina), eritropoyetina (EPO) y proteínas anti-apoptóticas [21].

El microRNA miR-21 se ha encontrado sobreexpresado en procesos traumáticos del sistema nervioso central tanto en cerebro como en la médula espinal [17, 21] y ha sido descrito como una molécula con efectos antiapoptóticos en un gran número de procesos biológicos. En el sistema nervioso produce un efecto antiapoptótico en una línea celular de glioblastoma humano [22] y su disrupción limita el crecimiento celular e incrementa la susceptibilidad a apoptosis de un glioma [23]. En diversos tipos de cáncer confiere al tumor resistencia frente a la apoptosis y reduce la eficacia de los tratamientos quimioterápicos [24-27]. A pesar de que estos efectos resulten adversos en oncología, podrían ser muy beneficiosos a la hora de minimizar la pérdida de tejido neural en una lesión medular. En este estudio hemos descrito que se produce un incremento en los niveles de expresión de miR-21 en la lesión medular y que dicho aumento se incrementa a medida que transcurre el tiempo tras la lesión. Sin embargo, los efectos antiapoptóticos que esta expresión pueda tener en el proceso lesivo no son suficientes, puesto que no previenen la manifestación clínica de la lesión. Sin embargo, éste efecto antiapoptótico podría verse potenciado si fuésemos capaces de inducir unos niveles elevados de



miR-21 en los primeros momentos de la lesión, acelerando el efecto protector endógeno, por lo que proponemos al micro-RNA miR-21 como potencial herramienta terapéutica.

El hecho de que los microRNAs en general actúen de manera directa sobre las moléculas diana, de forma rápida, y su pequeño tamaño, las convierte en prometedoras herramientas terapéuticas en cuanto a la capacidad de conferir especificidad y eficacia al tratamiento. Así, en este estudio se postula que la aplicación de microRNAs de acción neuroprotectora en los primeros momentos tras sufrir un trauma medular, permitirá atenuar el daño secundario, favoreciendo la recuperación funcional y permitiendo el éxito de las terapias regenerativas. Estas terapias podrían aplicarse a otras enfermedades del sistema nervioso central, en las que la muerte celular juega un papel decisivo, tales como enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer o Huntington) y la lesión cerebral traumática. **I**

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratsos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2004; 15:415-36.
2. Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2004; 42:549-63.
3. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2003; 41:369-78.
4. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4:451-64.
5. Waldmeier PC. Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27:303-21.
6. Bak M, Silahtaroglu A, Moller M, Christensen M, Rath ME, Skryabin B, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *Rna* 2008; 14:432-44.
7. Hohjoh H, Fukushima T. Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing. *Gene* 2007; 391:39-44.
8. Zhao JJ, Hua YJ, Sun DG, Meng XX, Xiao HS, Ma X. Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Childs Nerv Syst* 2006; 22:1419-25.
9. Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis* 2008; 14:27-41.
10. Nelson PT, Wang WX, Rajeev BW. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 2008; 18:130-8.
11. Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Zuchner S, Scott WK, et al. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 2008; 82:283-9.
12. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:628-43.
13. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12:1-21.
14. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834-8.
15. Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* 2007; 21:578-89.
16. Nakanishi K, Nakasa T, Tanaka N, Ishikawa M, Yamada K, Yamasaki K, et al. Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord* 2009; doi:10.1038/sc.2009-89.
17. Liu NK, Wang XF, Lu QB, Xu XM. Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol* 2009; 219:424-9.
18. Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9(suppl 1):S83-91.
19. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 1998; 151:77-88.
20. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 2004; 1:80-100.
21. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302:1-12.
22. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:6029-33.
23. Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* 2007; 67:8994-9000.
24. Eitan R, Kushnir M, Lithwick-Yanai G, David MB, Hoshen M, Glezerman M, et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2009; 114:253-9.



25. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3998-4008.
26. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383:280-5.
27. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Naba T, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 2009; (en prensa).

---

**Conflicto de intereses**

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.