

Administración de α B cristalina como nueva terapia para promover recuperación funcional en lesiones agudas de la médula espinal

Administration of α B crystallin as a new therapy to promote functional recovery after acute spinal cord injury

Klopstein A, Navarro X, López-Vales R

Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Institut de Neurociències, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Caracterizar la expresión y función de α B cristalina en la lesión medular.

Material y método: En un modelo animal murino *–mus musculus* (ratón) de la cepa C57/Bl6– se realizó lesión medular mediante contusión, y los segmentos medulares fueron extraídos a los 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días post-lesión. Se valoraron los niveles de ARNm de α B cristalina. Asimismo, se administró α B cristalina recombinante humana tras la lesión medular y se valoró su efecto sobre la recuperación funcional.

Resultados: Los niveles de expresión de α B cristalina no se incrementan hasta los 21 días post-lesión. La administración de dicha proteína promueve recuperación funcional tras la lesión medular.

Conclusión: La administración de α B cristalina podría ser una nueva terapia para tratar las lesiones agudas de la médula espinal

Palabras clave:

α B cristalina, *heat shock protein*, inflamación, lesión de médula espinal.

Abstract

Objective: Characterize the expression and role of α B crystallin in spinal cord injury

Material and method: In a murine animal model (*mus musculus* (C57/Bl6 mouse) spinal cord injury was induced by contusion and the spinal cord segment corresponding to the injury site was extracted at day 1, 3, 7, 14, 21, 28 post-injury and α B crystallin mRNA levels were assessed. In addition, the effects of the administration of the human α B crystallin recombinant protein after spinal cord injury was evaluated.

Results: α B crystallin mRNA levels did not increase until day 21 following spinal cord injury. Administration of α B crystallin resulted in increased functional recovery after lesion.

Conclusion: Administration of α B crystallin could therefore be valuable for the treatment of acute spinal cord injury

Key words:

α B crystallin, Heat Shock Protein, Inflammation, Spinal Cord Injury.

Introducción

Las lesiones traumáticas en la médula espinal producen pérdida de la función motora, sensorial y autonómica por debajo de la lesión, dejando parapléjicos o tetrapléjicos a

los sujetos que las padecen. Este tipo de lesiones afectan mayoritariamente a personas jóvenes, el 80% de las cuales están comprendidas en un rango de edad de 16 a 32 años. Dependiendo del país, las causas primarias de las lesiones medulares son los accidentes de tráfico y los accidentes laborales o deportivos [1]. En Estados Unidos se dan, anualmente, entre tres y cinco nuevos casos de lesiones en la médula espinal por cada 100.000 habitantes (10.000-15.000), proporción que se mantiene en la mayo-

Correspondencia

R López-Valés
Facultad Medicina M4-114.
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. Barcelona. España.
e-mail: ruben.lopez@uab.cat

ría de países industrializados [2]. En España se dan más de 500 casos anuales.

Durante el transcurso de una lesión medular se pueden diferenciar dos etapas causantes de las pérdidas funcionales: la lesión primaria y la lesión secundaria. La primera es el resultado directo del propio traumatismo sobre la médula espinal, mientras que la segunda engloba el conjunto de fenómenos celulares y moleculares que ocurren en la médula espinal como consecuencia del traumatismo primario, y es el principal inductor de muerte celular, tanto de glía y neuronas, de disrupción axonal, y déficit funcional [3]. Uno de los principales procesos que contribuye al desarrollo de la lesión secundaria es la respuesta inflamatoria. Aunque en la mayoría de tejidos las células del sistema inmunológico juegan un papel esencial en la eliminación de desechos celulares originados tras la lesión, en el sistema nervioso central estas células ejercen un efecto tóxico sobre el tejido dañado, incrementando así la severidad de esta [4].

Las evidencias experimentales que sugieren que las células del sistema inmunológico, especialmente los macrófagos, ejercen un efecto nocivo en la lesión de la médula espinal proceden de los resultados experimentales obtenidos con la administración de fármacos anti-inflamatorios como la metilprednisolona o minociclina, entre otros [5-8]. Estos estudios muestran que la administración de dichos fármacos promueve mejoras funcionales en los animales y mayor preservación de tejido medular. Hay que resaltar que estos fármacos tienen distintos modos de acción, y por ello no puede descartarse que su efecto protector sea independiente de sus propiedades anti-inflamatorias. Otros trabajos muestran que el bloqueo de la invasión de monocitos mediante la aplicación de anticuerpos contra moléculas de adhesión celular como ICAM-1 o α D β 2 integrina (CD11d/CD18) reduce la lesión secundaria y los déficits funcionales [9-10]. Sin embargo, las evidencias directas que involucran la respuesta inflamatoria con el desarrollo de la lesión secundaria proceden de trabajos experimentales que demuestran que la eliminación de macrófagos promueve protección del tejido medular tras una lesión por contusión o isquemia [11]. Aunque actualmente no está del todo claro como las células inmunológicas ejercen efectos tóxicos en el sistema nervioso central, se cree que la generación de radicales libres de oxígeno y la liberación de enzimas lisosomales, proteasas e citocinas por dichas células podrían ser procesos implicados [4].

Las *heat shock proteins* (HSP) son proteínas de respuesta que ayudan a mantener la homeostasis celular y/o tisular bajo ciertas condiciones de estrés, incluyendo inflamación [12]. Alfa-B cristalina (α B cristalina) es un miembro de las HSP [12]. Varios trabajos sugieren que α B cristalina promueve resisten-

cia en diferentes eventos patológicos mediante la modulación de la respuesta inflamatoria. Algunos estudios demuestran que la α B cristalina podría jugar un papel protector en algunas patologías, incluyendo aquellas que afectan al sistema nervioso central, como la esclerosis múltiple [13]. Sin embargo, ningún trabajo se ha centrado en estudiar si dicha proteína podría jugar un papel protector en las lesiones de la médula espinal. Por ello, el presente trabajo pretende caracterizar la expresión y función de α B cristalina en la lesión medular.

Material y método

Lesión de la médula espinal

En condiciones de asepsia, bajo anestesia con ketamina: xilacina (90:10 mg/kg; i.m.) y bajo un microscopio estereoscópico se realizó una laminectomía de la vértebra T11 de ratones (C57/Bl6) de 8-10 semanas de edad para dejar expuesta la médula espinal subyacente. Inmediatamente después se indujo la lesión medular mediante un sistema de contusión computerizado (Infinite Horizon). Este contusionador tiene un sensor que calcula la fuerza y la compresión que se aplica sobre la médula espinal, lo que permite causar lesiones con elevada reproducibilidad. La médula espinal se contusionó aplicando una fuerza de 60 Kdynes y produciendo una compresión de 500-700 μ m.

PCR a Tiempo Real (QPCR)

Con anterioridad a la lesión medular, y a los días 1, 3, 7, 21, 28 tras esta, se sacrificaron tres ratones por día y la médula espinal correspondiente con la zona de lesión se homogeneizó en 1 ml de Qiazol (Quiagen) y el ARNm se extrajo mediante el *kit* RNeasy Lipid (Quiagen). A continuación se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa utilizando el *kit* RT Omniscript kit (Quiagen) Para la realización de la PCR a tiempo real (QPCR), 1 μ l del producto de la transcripción reversa se añadió a 24 μ l de SYBR Green y los niveles de expresión de α B cristalina y GAPDH, como gen control, se analizaron utilizando el aparato de PCR a Tiempo Real MX4000 (Stratagene) y el método de cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Histología

Animales no lesionados, y a los tres días tras la contusión medular, se anestesiaron tres animales por día y se perfundieron intracardiamente con 4% de paraformaldehído tamponado con PBS (0.1M, pH=7.4). Los segmentos de médula espinal intacta y lesionada se retiraron y se crioprotegieron con una solución de 30% de sacarosa en tampón fosfato, y se embebieron en Tissue-Teck. Posteriormente se realizaron secciones transversales seriadas de la médula es-

pinal (15 μm de grosor) que se recogieron directamente en portas pre-gelatinados. Las diferentes series se incubaron toda la noche en la nevera utilizando anticuerpos policlonales contra αB cristalina (Novus), iba1 (Abcam), y anticuerpos monoclonales contra CD31 (Abcam), GR1 (BD Bioscience), GFAP (Dako), NeuN (Chemicon) y posteriormente, tras varios lavados con PBS, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios de burro marcados con los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 594 (Invitrogen). Las secciones se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

Administración de αB cristalina

Una hora después de la lesión medular se administró por vía intravenosa una solución de 80 μl de salino conteniendo 10 μg de la proteína αB cristalina recombinante humana (US Biologicals). Posteriormente, se administraron diariamente 10 μg de la proteína αB cristalina durante los primeros siete días post-lesión. A los animales control se les inyectó salino siguiendo la misma pauta.

Evaluación locomotora

El grado de recuperación locomotora se evaluó haciendo caminar al animal por una superficie lisa de dimensiones limitadas (campo abierto) durante cuatro minutos, valorándose según la escala BMS (*Basso Mouse Scale*). Esta escala, que comprende valores entre 0 (ausencia de movimiento) y 9 (deambulación normal), ha sido diseñada para evaluar la función locomotora en ratones con lesión medular por contusión (Basso *et al.* 2006). La evaluación locomotora se realizó el día previo a la lesión medular, y a los 1, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 días tras ésta.

Análisis estadístico

Los cambios en la expresión de ARNm tras la lesión medular se realizaron mediante ANOVA, mientras que los resultados funcionales se analizaron mediante ANOVA de dos factores con medidas repetidas y con el análisis *post hoc* de Tukey. Todos los datos se representan como media \pm error estándar.

I Resultados

Analizamos los cambios en la expresión de αB cristalina en el parénquima medular tras la lesión por contusión de la médula espinal. El traumatismo medular no indujo un aumento en la expresión de αB cristalina hasta el día 21 post-lesión (Figura 1). Estos resultados, por tanto, sugieren que durante las dos primeras semanas post-lesión, cuando la mayoría de los efectos tóxicos asociados a la lesión medular ocurren, uno de

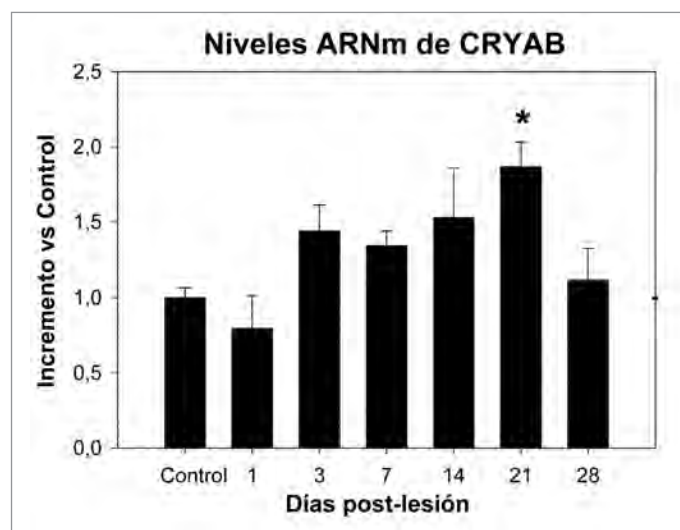


Fig. 1. Niveles de expresión de ARNm de αB cristalina en tejido medular intacto y a diferentes días post-lesión valorados mediante PCR a tiempo real. Los valores corresponden a las medias \pm error estándar de tres animales por tiempo. * $p < 0.05$.

los mecanismos protectores endógenos para frenar dichos procesos y evitar la muerte de las células dañadas, como es la inducción en la expresión de αB cristalina, no se activa.

A continuación analizamos qué células son responsables de sintetizar αB cristalina en el parénquima medular intacto y lesionado. Las tinciones de tejido medular mediante inmunofluorescencia revelaron que la proteína αB cristalina se expresa constitutivamente en oligodendrocitos (Figura 2). Tras la lesión medular, dicha proteína también se observó en oligodendrocitos. No se detectó colocalización de αB cristalina en microglía/macrófagos, astrocitos, granulocitos, células endoteliales o neuronas.

Posteriormente se evaluó si la administración de αB cristalina promovía recuperación funcional tras la lesión por contusión de la médula espinal. Para ello, se administró 10 μg diarios de αB cristalina intravenosamente durante los primeros siete días a la lesión en ratones C57/Bl6, iniciándose el tratamiento a la hora tras una lesión severa de la médula espinal (60 Kdynes). Los resultados muestran que la administración de αB cristalina promueve una mejora significativa en recuperación locomotora a partir del día 5 post-lesión (Figura 3). Al final del seguimiento (día 28 post-lesión) la recuperación funcional fue dos puntos superior en la escala del BMS en aquellos ratones tratados con αB cristalina que en aquellos inyectados con salino (control). Mientras los animales inyectados con salino eran capaces de mover extensamente la extremidades inferiores o incluso posar la planta del pie sin soportar su propio peso, ni deambular, todos los animales inyectados con αB cristalina mostraron locomoción, aun-

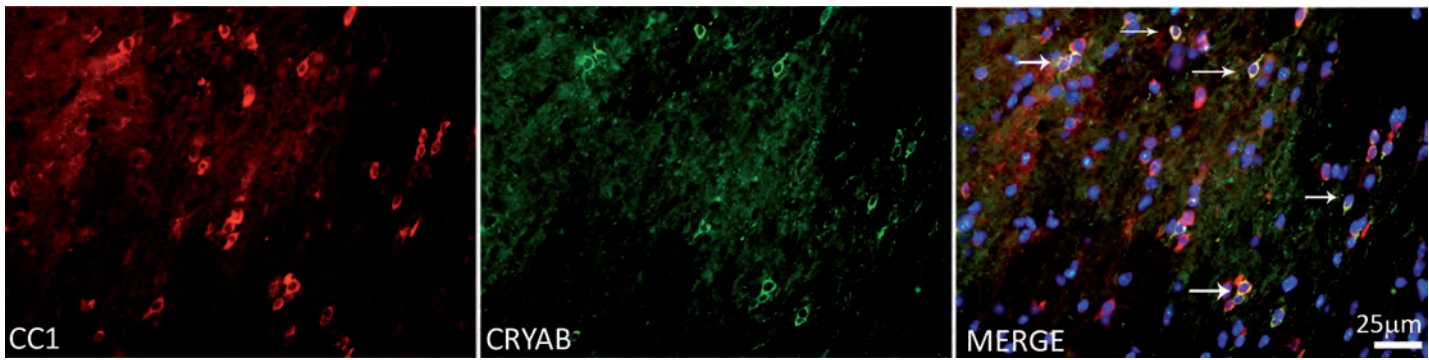


Fig. 2. Muestras histológicas de médula espinal lesionada (3 días post-lesión) inmunoteñidas contra α B cristalina y CC1 (oligodendrocitos). Ver en la imagen solapado como la expresión de α B cristalina colocaliza con los oligodendrocitos.

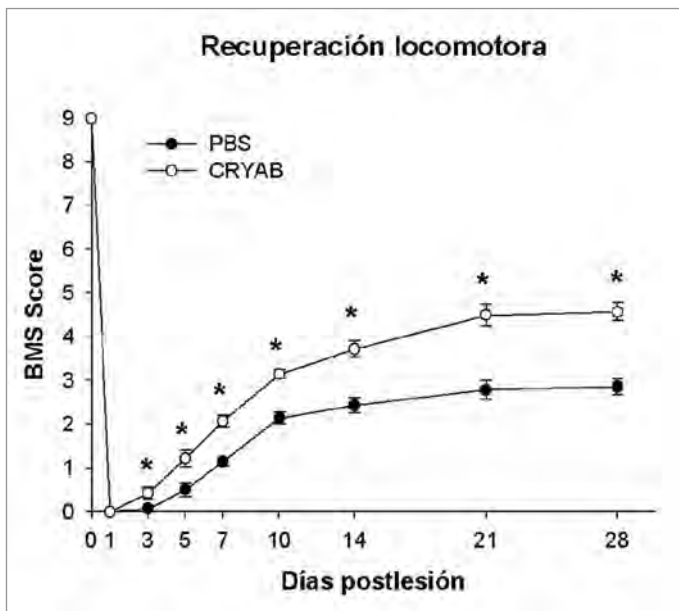


Fig. 3. Efectos de la administración de α B cristalina tras la lesión medular sobre la recuperación locomotora. Observen cómo el tratamiento con α B cristalina promueve mayor recuperación locomotora a partir del día 5 post-lesión. * $p < 0,05$.

que sin presentar coordinación entre las extremidades superiores e inferiores y mostrando inestabilidad del tronco.

Discusión

Demostamos que la proteína α B cristalina se expresa en oligodendrocitos en el parénquima medular intacto y lesionado del ratón, y que sus niveles no se incrementan tras la lesión medular. Asimismo, observamos que la administración de α B cristalina tras la lesión medular promueve recuperación funcional.

La α B cristalina es una HSP con propiedades protectoras y anti-apoptóticas. Un trabajo experimental muestra que α B

cristalina es el gen con mayor transcripción en lesiones activas de la enfermedad de esclerosis múltiple, mientras que dicho gen no se expresa en tejido cerebral sano [14]. Un estudio reciente demuestra que la proteína $\alpha\beta$ cristalina ejerce efecto protector en un modelo animal de esclerosis múltiple (EAE) [13]. Dicho trabajo muestra que α B cristalina actúa como freno en diferentes vías pro-inflamatorias, tanto en el sistema nervioso central como en el sistema inmunológico. Los animales que carecen de α B cristalina presentan mayor infiltración de células inmunológicas en el parénquima medular y pérdida funcional, mientras que la administración sistémica de α B cristalina ejerce un efecto protector en la EAE [13]. α B cristalina también ha mostrado propiedades protectoras en diferentes patologías como la enfermedad de Alexander, cataratas y cardiopatías [12]

La expresión de α B cristalina en alteraciones del sistema nervioso central no se restringe a la enfermedad de esclerosis múltiple. La presencia, pero no función, de la α B cristalina también se ha observado en astrocitos y microglía reactiva en la zona de penumbra en modelos animales de isquemia cerebral, o en áreas asociadas a placas seniles de la enfermedad de Alzheimer [15-16]. El presente trabajo de investigación muestra, por primera vez, la expresión y función de α B cristalina en el parénquima medular lesionado. Nuestros datos demuestran que α B cristalina se expresan en oligodendrocitos en el parénquima medular, como ya se había descrito anteriormente en tejido cerebral [13]. Una diferencia importante observada en nuestro estudio respecto a otras patologías es que tras la lesión medular no se induce sobreexpresión de α B cristalina. Esta observación es importante, ya que sugiere que tras la lesión medular no hay una activación de uno de los mecanismos protectores que podría ayudar a reducir los efectos de nocivos de la lesión secundaria, y por tanto, evitar déficits funcionales. Ello podría ser debido, en parte, al hecho de que α B cristalina se exprese exclusiva-

mente en los oligodendrocitos, un tipo celular muy susceptible a los procesos de lesión secundaria y que experimenta un alto grado de muerte celular en la zona de lesión y en zonas adyacentes a esta [17].

El dato más relevante del presente estudio es que la proteína α B cristalina recombinante humana promueve recuperación locomotora si se administra durante los primeros siete días tras la lesión medular, iniciando el tratamiento a la hora post-lesión. Estos resultados podrían tener un gran interés para su traslación clínica por dos motivos: el primero de ellos es que la proteína α B cristalina administrada es la forma humana, y por tanto, demuestra que la proteína humana promueve recuperación funcional tras la lesión medular; el segundo es que el tratamiento con α B cristalina promueve recuperación locomotora tras el traumatismo medular cuando se administra con una demora de una hora tras la lesión, lo que podría facilitar la utilización clínica. Futuros estudios en el laboratorio se centrarán en caracterizar la ventana terapéutica de α B cristalina en la lesión medular.

En conclusión, el presente estudio muestra que los niveles de expresión α B cristalina, una HSP con funciones neuroprotectoras y anti-apoptóticas, no se incrementan tras la lesión medular, y que la administración de la proteína α B cristalina recombinante humana promueve recuperación locomotora tras la lesión medular. Por tanto, la administración de α B cristalina podría tener un gran potencial de traslación clínica para el tratamiento de las lesiones agudas de la médula espinal, patología que actualmente carece de tratamiento efectivo. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutierrez PA, Young RR, Vulpe M. Spinal cord injury. An overview. *Urol Clin North Am* 1993; 20:373-82.
2. Girolami U, Frosch MP, Tator CH. Regional neuropathology: diseases of the spinal cord and column. En: Greenfield's Neuropathology: Lantos GDI (ed). P Mamond Corp 1997; 1063-101.
3. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 1996; 76:319-70.
4. Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci* 2008; 9:481-93.
5. Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol* 1996; 138:261-76.
6. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg* 2000; 93:1-7.
7. Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, *et al.* Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:3071-6.
8. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VM. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 2003; 126:1628-37.
9. Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, *et al.* Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J Neurosci* 2004; 24:4043-51.
10. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, *et al.* Involvement of an intercellular adhesion molecule 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 1996; 66:1525-31.
11. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, Van Rooijen N, Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999; 158:351-65.
12. Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, *et al.* Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 2007; 581:3665-74.
13. Ousman SS, Tomooka BH, Van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, *et al.* Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007; 448:474-9.
14. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, *et al.* The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294:1731-5.
15. Mao YW, Liu JP, Xiang H, Li DW. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11:512-26.
16. Piao CS, Kim SW, Kim JB, Lee JK. Co-induction of alphaB-crystallin and MAPKAPK-2 in astrocytes in the penumbra after transient focal cerebral ischemia. *Exp Brain Res* 2005; 163:421-9.
17. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997; 3:73-6.

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.