

# Modulación farmacológica de la cicatriz glial para la reparación de lesiones del SNC

## Pharmacological modulation of the glial scar for CNS injury repair

Romero-Ramírez L<sup>1</sup>, Barreda-Manso MA<sup>1,2</sup>, Dámaso-Riquelme E<sup>2,3</sup>, Yanguas-Casás N<sup>2</sup>, Nieto-Sampedro M<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Plasticidad Neural. Unidad de Neurología Experimental. Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, España.

<sup>2</sup> Laboratorio de Plasticidad Neural. Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas. Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España.

<sup>3</sup> Máster Interuniversitario de Genética y Biología Molecular. Programa conjunto de la Universidad de Alcalá, la Universidad Autónoma de Madrid y la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

### Resumen

**Objetivo:** Estudiar la actividad de la neurostatina obtenida enzimáticamente y purificada mediante un nuevo método, en cultivos de células implicadas en la formación de la cicatriz glial.

**Material y métodos:** La neurostatina se obtuvo mediante una reacción enzimática a partir del gangliósido GD1b comercial y se purificó con un método nuevo simplificado. La actividad de la neurostatina se probó en ensayos de proliferación con MTT en pericitos y microglía de rata.

**Resultados:** La actividad de la neurostatina purificada fue similar a la obtenida mediante purificación a partir de cerebro de mamífero. La neurostatina inhibió la proliferación de los pericitos inducida por el factor de crecimiento PDGF-B y la proliferación de la microglía de rata inducida por la toxina bacteriana LPS a concentraciones nanomolar.

**Conclusión:** La nueva metodología de obtención y purificación de la neurostatina y su actividad justifican su ensayo en modelos de lesión del SNC en animales, para evaluar su posible uso como terapia en pacientes con lesiones del SNC.

**Palabras clave:**

Cicatriz glial, microglía, inflamación, neurostatina, pericitos.

### Abstract

**Objective:** To study the activity of neurostatin obtained enzymatically and purified using a new method, in cultures of cells involved in the formation of the glial scar.

**Material and methods:** Neurostatin was obtained from the commercial ganglioside GD1b, using enzymatic O-acetylation, and was purified by a new simplified method. The activity of neurostatin was tested by an MTT proliferation assay in pericytes and rat microglial cells.

**Results:** The activity of neurostatin obtained and purified by this new method was similar to the neurostatin obtained by the purification from mammalian brain. Neurostatin inhibited the PDGF-B growth factor induced proliferation of pericytes and LPS bacteria toxin induced proliferation of rat microglial cells at nanomolar concentrations.

**Conclusion:** This new methodology to synthesize and purify neurostatin and its activity justify further studies to test its effect in animal models of CNS injuries and to evaluate its possible use as a therapy in patients with CNS injuries.

**Key words:**

Glial scar, microglia, inflammation, neurostatin, pericytes.

---

#### Correspondencia

M Nieto-Sampedro  
Instituto Cajal, CSIC, Avda. Doctor Arce 37, 28002 Madrid, España.  
E-mail: mns@cajal.csic.es.

## Introducción

Las lesiones severas en el sistema nervioso central (SNC) originadas por patologías cerebrovasculares o daño mecánico (como las lesiones medulares) representan una de las principales causas de discapacidad en Europa [1]. Las neuronas lesionadas en el SNC adulto no se regeneran, y el resultado son importantes déficits funcionales permanentes, con graves consecuencias humanas y económicas [2]. La ausencia de regeneración en el SNC está relacionada con la muerte neuronal primaria y secundaria [3] y con el microambiente inhibitor del crecimiento axonal en la zona de lesión [4].

En las lesiones traumáticas, las células gliales, entre las que se encuentran astrocitos, oligodendrocitos y microglía, se transforman en células reactivas, produciendo diferentes sustancias inhibitoras de la regeneración axonal. Además, la barrera hematoencefálica pierde su integridad física. Los vasos sanguíneos lesionados liberan su contenido al parénquima nervioso; y células sanguíneas (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) y fibroblastos procedentes de las meninges migran hacia la zona afectada, produciendo una reacción inflamatoria alrededor de la lesión [4]. Para limitar el paso de sustancias y células procedentes de los vasos sanguíneos, las células gliales, las células de musculatura lisa (pericitos) y los fibroblastos intentan restablecer la barrera hematoencefálica, formando una nueva frontera recubierta por una lámina basal. A esta estructura se le llama cicatriz glial. A pesar de que la cicatriz glial tiene un efecto beneficioso evitando el paso de sustancias tóxicas y células procedentes del torrente sanguíneo, y reduciendo la muerte celular y la respuesta inflamatoria, es una de las principales causas de la inhibición de la regeneración axonal. Aunque la cicatriz glial contiene sustancias favorecedoras de la regeneración axonal, como fibronectina o laminina, sus principales componentes son un grupo de glicoproteínas (como tenascinas) y proteoglicanos inhibitorios del crecimiento axonal [5][6].

La inducción de la cicatriz glial está regulada por citoquinas y factores de crecimiento liberados por plaquetas, células sanguíneas y células endógenas del SNC, que responden a la lesión inicial y a la reacción inflamatoria posterior [7]. Entre los factores de crecimiento que aumentan la transcripción, traducción y secreción de los proteoglicanos y de otras proteínas inhibitoras del crecimiento axonal, destacamos miembros de la familia del factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF $\beta$ ), del factor de crecimiento epidérmico (EGF), la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF). Hay otra serie de citoquinas y factores de crecimiento que se liberan en la lesión, favoreciendo el estado proinflamatorio y la reactividad glial. Entre ellos están: la interleuquina 1 (IL-1), el interferón-gamma

(IFN $\gamma$ ) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). La neurostatina es un gangliósido aislado de cerebro normal de mamífero, identificado como el gangliósido GD1b O-acetilado, preferentemente en el hidroxilo en posición 9 de su siálico terminal [8-10]. Los gangliósidos son compuestos anfipáticos que contienen una porción hidrofóbica, la ceramida, unida a una cadena hidrofílica de azúcares por la que se clasifican. En concreto, los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se caracterizan por presentar en su estructura el azúcar modificado ácido siálico. Los gangliósidos se encuentran preferentemente en la región externa de la membrana plasmática de las células eucariotas, y juegan un papel fundamental en los procesos de relación de una célula con su microambiente, como adhesión celular [11], reconocimiento celular [12], transducción de señales [13] y desarrollo neural [14]. La neurostatina inhibe la proliferación de astrocitos en cultivo primario y de células de glioma (tanto de rata como humano) a concentración nanomolar, tanto en presencia de mitógenos definidos (como EGF, PDGF o FGF básico) como de suero fetal bovino [8-10]. Sin embargo, no inhibe la proliferación ni de fibroblastos (cultivos provenientes de meninges o la línea celular NIH-3T3), ni de líneas celulares de neuroblastoma (línea de ratón N2A o la línea humana SH-SY5Y), lo que sugiere que la actividad antimitótica de la neurostatina está dirigida selectivamente a células de linaje glial [9]. La O-acetilación es fundamental para la actividad inhibitoria de la proliferación de la neurostatina y de otros gangliósidos O-acetilados. La simple O-acetilación convierte un gangliósido mitogénico (GD1b) en un gangliósido inhibitorio de la proliferación de astrocitos y de líneas celulares de glioma. Este cambio en la actividad de los gangliósidos O-acetilados con respecto a los gangliósidos normales no sólo ocurre con GD1b y la neurostatina, sino con todos los gangliósidos ensayados [10].

Nuestro grupo ha demostrado que la neurostatina y otros miembros de la familia inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* de líneas celulares de glioma humano en modelos ortotópicos en animales inmunodeprimidos [15]. La neurostatina ejerce este efecto, en parte, inhibiendo la activación de la ruta del receptor del factor de crecimiento EGF (EGFR) en las células tumorales. La activación de la ruta de EGFR no sólo es importante en el crecimiento y progresión tumoral, sino que juega un papel fundamental en la proliferación glial y en la expresión de proteínas (proteoglicanos y otras glicoproteínas) necesarias para la formación de la cicatriz glial [16][17] y, por lo tanto, en la inhibición de la regeneración axonal [18]. Además, nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento con neurostatina tiene un efecto inhibitorio de la reactividad glial, en concreto, en las células de microglía, tanto

*in vitro* como en modelos animales de inflamación [19-20]. La microglía colabora en la activación de la respuesta inflamatoria, es fundamental para la modulación de la cicatriz glial y, por tanto, de la regeneración axonal. En resumen, el tratamiento con neurostatina y otros miembros de su familia ejercería un papel doblemente beneficioso en lesiones traumáticas del SNC, como antiinflamatorio y modulador de la cicatriz glial.

El estudio de la actividad biológica de la neurostatina y de otros gangliósidos O-acetilados ha estado limitado por su escasez en la naturaleza. Aunque se han descrito varios procedimientos de O-acetilación de gangliósidos comerciales, tanto de tipo químico como enzimático, por nuestro grupo [10][21] y por otros [22,23], todos presentan escasa especificidad. Se obtienen muchos productos con muchas O-acetilaciones y en varios grupos hidroxilos de la misma molécula, reduciendo considerablemente el rendimiento de la reacción. Recientemente se ha clonado de la bacteria *Campylobacter jejuni* una enzima con actividad O-acetiltransferasa llamada SOAT (del inglés, *Sialic acid O-Acetyl Transferase*), que cataliza la O-acetilación de oligosacáridos unidos a ácido siálicos, con alta especificidad por los siálicos terminales unidos por un enlace  $\alpha(2,8)$  [24]. Utilizando esta enzima, hemos conseguido O-acetilar específicamente el gangliósido comercial GD1b, para producir neurostatina en cantidades suficientes como para su posible uso clínico [25].

## ■ Material y métodos

La síntesis enzimática de la neurostatina y su desalado se realizaron como se ha descrito previamente [25]. Se añadieron 2 mg del gangliósido GD1b (Carbosynth) a una solución tamponada de 0,5 M MES, pH 7, que contenía 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 1 mM acetyl-Coenzima A (Sigma-Aldrich), 0,1% (peso/volumen) colato sódico y 1 U del enzima bacteriano SOAT (*Sialate-O-Acetyl-Transferase*). La reacción se incubó a 37° C, en agitación (300 rpm), durante siete horas en un termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf). La reacción se finalizó añadiendo un volumen de metanol equivalente al volumen final de reacción. La muestra se centrifugó a máxima velocidad en una microfuga 5415R (Eppendorf), a 4° C, durante cinco minutos. En estas condiciones, el enzima precipitó en el fondo del tubo y retiramos el sobrenadante, que se conservó a -20° C hasta su uso. El producto de reacción se desaló mediante un cartucho de fase reversa Sep-Pak C18 (Waters), siguiendo las instrucciones del fabricante [25]. Una vez eluido con metanol, el producto de reacción se secó en un *speed-vac* UVS400A (Savant) y se conservó a -20° C hasta su uso. La purificación de la neurostatina se realizó en una columna (2,5 mm de diámetro x

70 mm de largo) con una matriz de sílica Iatrobeads 6RS-8060 (Iatron Inc.). La matriz fue suspendida en cloroformo y sonicada durante 10 minutos. La muestra se disolvió en una solución de cloroformo:metanol (85:15, v/v) y se añadió a la columna. Los compuestos retenidos en la matriz se eluyeron en diferentes fracciones, incrementando la proporción de metanol respecto al cloroformo de la fase móvil, empezando por cloroformo: metanol en proporción 7:3 (v/v), hasta metanol puro. Las fracciones se secaron en un *speed-vac* y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de metanol. El contenido de cada fracción se comprobó mediante cromatografía de capa fina (TLC), utilizando cromatofolios Silica gel 60 (Merck) y una fase móvil de cloroformo:metanol:0,2%  $CaCl_2$  (45:55:10, v/v/v) en una cubeta de cristal (Altech). El cromatograma se secó con un secador de pelo y se roció con una solución al 3,5% de ácido sulfúrico en metanol. El cromatograma se volvió a secar y se calentó a 100° C durante unos minutos hasta observarse las bandas de los productos de reacción. Se utilizaron los gangliósidos comerciales GM1a y GD1b como estándares de la cromatografía. Las fracciones que contenían neurostatina se juntaron y se cuantificó su concentración mediante una nueva cromatografía de capa fina, donde se utilizaron concentraciones conocidas de gangliósido GD1b comercial.

Las líneas celulares utilizadas fueron A7r5 de musculatura lisa de rata, la línea de astrocito C6 de rata, la línea de astrocitoma T98G humana, la línea de fibroblastos NIH3T3 de ratón y células de microglía procedentes de ratas recién nacidas o postnatales de hasta dos días de edad. La línea celular A7r5 fue cultivada en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio DMEM-F12 (DF), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y una mezcla para cultivos celulares de los antibióticos penicilina y estreptomycin (Sigma-Aldrich). Las líneas celulares C6, T98G y NIH3T3 fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco) y antibióticos.

Las células de microglía fueron obtenidas de un cultivo mixto de células gliales de cerebro de ratas Wistar [26]. Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, recubiertos con poli-L-lisina (PLL, 10  $\mu$ g/mL) en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 10% suero de caballo (HS, Gibco) y los antibióticos penicilina y estreptomycin. Una vez que el cultivo llegó a confluencia, los frascos fueron agitados a 230 rpm durante tres horas a 37° C. Las células en suspensión se centrifugaron a 168 x g durante 10 minutos. El *pellet* con las células de microglía se resuspendió en medio DMEM con 10% FBS.

Los ensayos de proliferación se realizaron en placas de 96 pocillos mediante un ensayo de MTT. Las células A7r5 se

plaquearon a razón de 10.000 células por pocillo en DF-10% FBS y se mantuvieron así durante 72 horas. Se cambió el medio a DF sin suero y se mantuvieron durante 24 horas, tras las cuales se realizaron los tratamientos en DF-1% FBS. Se añadió primero la neurostatina a diferentes concentraciones (desde 0.5 a 4  $\mu$ M) y se incubó durante una hora. A continuación se añadió el mitógeno PDGF-B (25 ng/mL, Peprotech) y se incubó durante 72 horas. En el caso de las células de microglía, se cultivaron 20.000 células por pocillo en medio RPMI 1.640 con 10% FBS en placas recubiertas con PLL (10  $\mu$ g/mL). Al día siguiente, las células se cultivaron durante seis horas con RPMI sin suero. Una vez retirado este medio, la microglía se pretrató con diferentes concentraciones de neurostatina durante una hora, para más tarde añadir la toxina bacteriana lipopolisacárido (LPS, 10 ng/mL, Sigma-Aldrich) como mitógeno, y se incubó durante 48 horas. En el caso de las líneas celulares C6, NIH3T3 y T98G se plaquearon a razón de 7.500 células por pocillo en medio DMEM-10% FBS. Al día siguiente, se retiró el medio y se añadió medio DMEM sin suero. Después de 24 horas, se pretrató con diferentes concentraciones de neurostatina durante una hora, para más tarde tratar con los diferentes mitógenos, según el caso, EGF, PDGF-B o bFGF (a una concentración de 10 ng/mL), que se incubaron durante 48 horas.

Una vez cumplido el tiempo de tratamiento para cada tipo celular, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100  $\mu$ L por pocillo de una solución 0,5 mg/mL del reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromido (MTT, Sigma-Aldrich), disuelto en medio DMEM sin virador de pH y sin suero. Después de tres horas de incubación con MTT, se retiró el medio de los pocillos y se añadieron

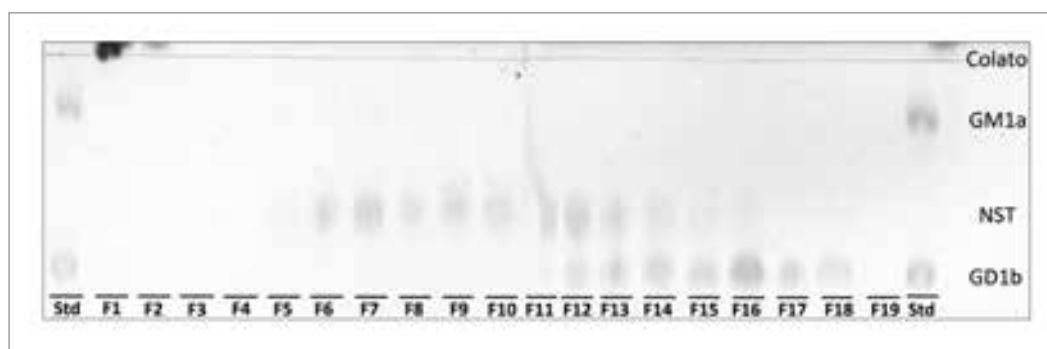
100  $\mu$ L por pocillo de dimetilsulfóxido para solubilizar el colorante formazán, y la densidad óptica de los pocillos se determinó mediante la lectura a una absorbancia de 595 nm en un espectrofotómetro Spectramax Plus (Molecular Devices Corporation). El porcentaje de inhibición (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{Y-A}{B-A}\right) \times 100$$

donde «Y» corresponde al valor de proliferación para una concentración de gangliósido, «A» corresponde al valor del control bajo de la placa (pocillos sin suero ni mitógeno) y «B» corresponde al valor del control alto de la placa (pocillos con mitógeno pero sin gangliósido).

## Resultados

El protocolo inicial de purificación de la neurostatina que habíamos desarrollado era muy laborioso e incluía el desalado de la muestra de reacción mediante un cartucho de Sep-Pak de fase reversa C18 y la purificación mediante una columna preparativa de Silicagel 60 o mediante una columna amino de intercambio iónico acoplada a un HPLC [25]. A lo largo del proyecto, hemos optimizado un procedimiento de purificación más sencillo mediante el uso de una columna con una fase sólida formada por partículas de sílica Iatrobeads y utilizando una mezcla de los disolventes cloroformo:metanol como fase móvil. Con este procedimiento hemos conseguido que el colato sódico, principal reactivo contaminante de la reacción, se eluya en las primeras fracciones y también que exista una separación óptima entre la neurostatina y el gangliósido GD1b no reaccionado, que favorece su purificación (Figura 1). Además, esta técnica evi-



**Fig. 1.** El nuevo procedimiento de fraccionamiento de la reacción para obtener neurostatina mediante una columna de Iatrobeads reduce considerablemente los pasos de purificación. Cromatografía de capa fina de las diferentes fracciones obtenidas de la reacción enzimática con SOAT para producir neurostatina. En las fracciones 1-2 se consigue eluir el colato sódico, principal contaminante de la reacción, mientras que la neurostatina se separa parcialmente (fracciones F5-F10) del gangliósido GD1b. Como gangliósidos estándares (Std) se utilizaron GM1a y GD1b.

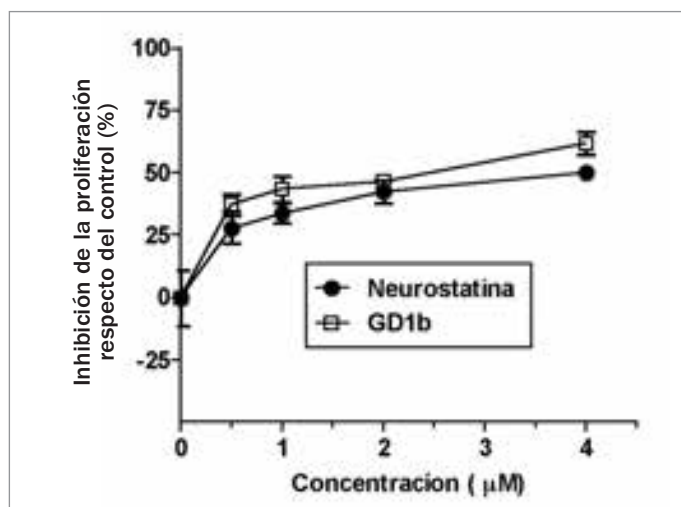
ta el uso de cromatografía líquida HPLC y el posterior desalado de las neurostatinas, reduciendo el número de pasos de purificación y, por lo tanto, simplificando considerablemente el procedimiento.

La neurostatina obtenida con este nuevo método de síntesis enzimática y de purificación (Tabla 1) tiene una actividad similar a la neurostatina purificada a partir de extractos de cerebro porcino y bovino mediante otros métodos ya descritos en publicaciones de nuestro grupo [8-10].

Resultados previos de nuestro grupo mostraron que la neurostatina inhibía la proliferación de la línea de glioma T98G inducida por el factor de crecimiento PDGF-B [10]. Las células de musculatura lisa o pericitos participan en la formación de la cicatriz glial. El factor de crecimiento PDGF-B juega un papel fundamental en la proliferación de estas células y su expresión aumenta tras la lesión traumática en el SNC, siendo necesaria para su división en el tejido lesionado y la formación de la cicatriz glial. Hemos utilizado la línea de pericitos A7r5 para realizar un estudio del efecto de la neurostatina sobre la ruta proliferativa del PDGF-B. Como se puede observar (Figura 2), la neurostatina y también GD1b inhiben la proliferación de PDGF-B en la línea A7r5. Estos resultados son similares a los obtenidos con la línea de glioma T98G (Tabla 1), en la que tanto la neurostatina como GD1b inhiben la proliferación inducida por PDGF-B [10].

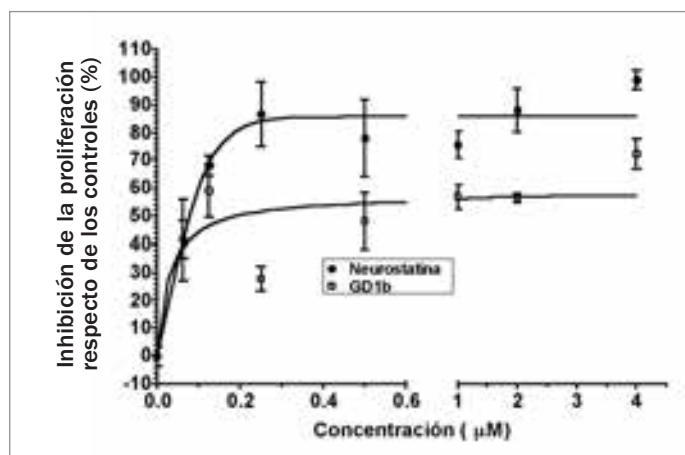
		EGF	bFGF	PDGF-B
C6	GD1b		+	
	NST		2 $\mu$ M	
NIH3T3	GD1b	+		
	NST	> 4 $\mu$ M		
T98G	GD1b			4 $\mu$ M
	NST			3.2 $\mu$ M

**Tabla 1.** Resumen de la actividad de las neurostatinas (ID<sub>50</sub>, concentración de compuesto que produce una inhibición de la proliferación del 50% respecto del control con mitógeno) sobre la proliferación inducida por diferentes mitógenos en las líneas de glioma C6 y T98G, y también en la línea de fibroblastos NIH3T3. En blanco se señalan los ensayos en los que no se obtuvo proliferación con la adición del mitógeno indicado en la línea celular correspondiente, o que ésta no fue significativa. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos por triplicado. Los símbolos «+» significan que el gangliósido probado tiene actividad mitogénica adicional a la del factor de crecimiento añadido.



**Fig. 2.** La neurostatina y GD1b inhiben la proliferación inducida por PDGF-B en la línea de pericitos A7r5. Las células fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones de neurostatina durante una hora y después se añadió PDGF-B (25 ng/ml) durante 72 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de un triplicado.

La microglía o macrófagos residentes del SNC y los monocitos del torrente circulatorio que se extravasan al parénquima neural tras la lesión juegan un papel fundamental en el proceso inflamatorio. Además, liberan radicales libres y citoquinas que provocan la muerte de las neuronas circundantes e inhiben la regeneración axonal. La microglía migra hacia el tejido lesionado y participa en la respuesta inflamatoria y en el establecimiento del microambiente inhibitorio de la regeneración. La toxina bacteriana LPS o lipopolisacárido se une a un receptor en la microglía llamado TLR4 y la activa a un fenotipo proinflamatorio similar a la microglía de una lesión traumática. El LPS a bajas concentraciones (10 ng/ml) induce la proliferación de las células de microglía. Los resultados muestran una actividad inhibitoria de la proliferación de la microglía inducida por LPS a muy bajas concentraciones de neurostatina (ID<sub>50</sub> inferior a 100 nM) (Figura 3). La actividad de la neurostatina a esta concentración sugiere la existencia de un posible receptor con afinidad media-baja. Resultados preliminares con un reportero de NFκB muestran que la neurostatina inhibe la ruta proinflamatoria activada por LPS mediante la inhibición de la activación de este reportero (resultados que no se muestran). Por lo tanto, existe un punto en la ruta de LPS-TLR4 en el que la neurostatina está interfiriendo. Este mecanismo anti-inflamatorio de la neurostatina podría jugar un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio tras una lesión en el SNC.



**Fig. 3.** La neurostatina inhibe la proliferación de células de microglía inducida por la toxina bacteriana LPS. Las células de microglía de rata fueron pretratadas una hora y después se añadió LPS (10 ng/ml) durante 48 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos por triplicado. Los resultados obtenidos con cada compuesto se ajustaron a una curva sigmoide con la que se calculó el ID<sub>50</sub>.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que la neurostatina actúa en diferentes tipos celulares implicados en la respuesta a la lesión del SNC, interfiriendo en las rutas de diferentes factores de crecimiento y estímulos proinflamatorios. Nuestros resultados muestran que la neurostatina tiene un efecto anti-inflamatorio capaz de inhibir la ruta activada por estímulos proinflamatorios (como la toxina LPS). Recientemente, inhibidores de TLR4, que es el receptor de LPS, inhiben la activación de la microglía en cultivos celulares y en modelos animales de isquemia [27]. Además, estos inhibidores reducen la extravasación de sustancias procedentes de la sangre al interior de la médula espinal producidas por el proceso de isquemia/reperfusión [28] y, por lo tanto, reducen el daño neuronal [29]. El control de la respuesta inflamatoria es fundamental para reducir el daño celular tras la lesión [3]. La microglía es fundamental en la respuesta inflamatoria y tras su activación durante el proceso proinflamatorio participa en la muerte neuronal secundaria a través de la producción de radicales libres y citoquinas proinflamatorias. La neurostatina reduce la activación de la microglía inducida por LPS, por lo que podría reducir la muerte neuronal. Además, la microglía activada produce y secreta sustancias con actividad inhibitoria del crecimiento axonal. Por lo tanto, la neurostatina podría tener un efecto beneficioso adicional sobre la inhibición del crecimiento neurítico.

A la vez que ocurre la reacción inflamatoria y regulada por ella misma, se activa un proceso de formación de la ci-

catriz glial que intenta restablecer la glía *limitans* [30]. Esta estructura es fundamental para restaurar la homeostasis en el parénquima neural y así limitar el paso de sustancias y células del torrente sanguíneo. Entre las células que participan en la formación de la cicatriz glial mediante la producción y secreción de proteínas de matriz extracelular se encuentran los astrocitos y los pericitos (o células de musculatura lisa). El factor de crecimiento EGF juega un papel fundamental en la reactividad astrogliar y en la proliferación de estas células durante la formación de la cicatriz glial [17]. La neurostatina inhibe la proliferación inducida por EGF en astrocitos [8-9], interfiriendo sobre la activación del receptor de EGF [15]. El factor de crecimiento PDGF-B es fundamental para la proliferación de los pericitos que van a participar en la formación de la cicatriz glial [30]. La neurostatina inhibe la proliferación inducida por el factor de crecimiento PDGF-B en las células A7r5 de musculatura lisa. Aunque estos experimentos son muy preliminares y es necesario realizarlos en células de vasculatura lisa procedentes de cultivos celulares, abren la posibilidad de que el compuesto tenga un papel adicional en la regulación de la fibrosis. Por lo tanto, la neurostatina podría tener un efecto doble en la regulación de la formación de la cicatriz glial y en la fibrosis, de forma directa sobre la regulación de las poblaciones de astrocitos y pericitos, e indirecta reduciendo la inflamación inicial. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2004; 15:415-36.
2. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología sobre la Medida del Impacto en la Salud de las Lesiones por Traumatismos. Lesiones Medulares Traumáticas y Traumatismos Craneoencefálicos en España, 2000-2008. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad; 2011.
3. Loane DJ, Faden AI. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31:596-604.
4. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 2008; 209:294-301.
5. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:146-56.
6. Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res* 2001; 132: 611-9.

7. Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol*. 2014; 253:197-207.
8. Abad-Rodríguez J, Vallejo-Cremades MT, Nieto-Sampedro M. Control of glial number: Purification from mammalian brain extracts of an inhibitor of astrocyte division. *Glia* 1998; 23: 156-68.
9. Abad-Rodríguez J, Bernabé M, Romero-Ramírez L, Vallejo-Cremades M, Fernández-Mayoralas A, Nieto-Sampedro M. Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division from mammalian brain. *J Neurochem* 2000; 74:2547-56.
10. Romero-Ramírez L, Nieto-Sampedro M. Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids. *J Med Chem* 2004; 47:4983-4.
11. Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S. GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *J Biol Chem* 1998; 273:9130-8.
12. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 1990; 265:18713-6.
13. Hakomori S, Igarashi Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* 1995; 118:1091-1103.
14. Méndez-Otero R, Constantine-Paton M. Granule cell induction of 9-O-acetyl gangliosides on cerebellar glia microcultures. *Develop Biol* 1990; 138: 400-9.
15. Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Nieto-Sampedro M. Neurostatin blocks glioma cell cycle progression by inhibiting EGFR activation. *Mol Cell Neurosci*. 2011; 46:89-100.
16. Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP, Valencia F, Silldorff MD, Oshiro M, *et al*. The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. *J Neurosci*. 2009; 29:1093-104.
17. Yang Q, Wang EY, Huang XJ, Qu WS, Zhang L, Xu JZ, *et al*. Blocking epidermal growth factor receptor attenuates reactive astrogliosis through inhibiting cell cycle progression and protects against ischemic brain injury in rats. *J Neurochem*. 2011; 119:644-53.
18. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:617-27.
19. Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Suardiá M, Taylor JS, Nieto-Sampedro M. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. *J Neurochem*. 2008; 107:1741-52.
20. Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Nieto-Sampedro M. Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NfκappaB, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia* 2010; 58:264-76.
21. Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Nieto-Sampedro M. Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth. *Eur J Med Chem* 2010; 45:2034-43.
22. Takayama M, Livingston P, Wong C. Synthesis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-Acetyl GD3 through regioselective enzymatic acetylation of GD3 using subtilisin. *Tetrahed Lett* 1996; 37:9271-4.
23. Hubl U, Ishida H, Kiso M, Hasegawa A, Schauer R. Studies on the specificity and sensitivity of the influenza C virus binding assay for 9-O-acetylated sialic acids and its application to human melanomas. *J Biochem* 2000; 127:1021-31.
24. Houlston RS, Endtz HP, Yuki N, Li J, Jarrell HC, Koga M, *et al*. Identification of a sialate O-acetyltransferase from *Campylobacter jejuni*: demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminal alpha-2, 8-linked sialic acid. *J Biol Chem*. 2006; 281:11480-6.
25. Romero-Ramírez L, García-Álvarez I, Campos-Olivas R, Gilbert M, Goneau MF, Fernández-Mayoralas A, *et al*. Specific synthesis of neurostatin and gangliosides O-acetylated in the outer sialic acids using a sialate transferase. *PLoS One* 2012;7:e49983.
26. Mecha M, Mestre L, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach. *Protocol Exchange* 2011; 218.
27. Yao L, Kan EM, Lu J, Hao A, Dheen ST, Kaur C, Ling E. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J Neuroinflammation* 2013; 10:23
28. Li XQ, Lv HW, Tan WF, Fang B, Wang H, Ma H. Role of the TLR4 pathway in blood-spinal cord barrier dysfunction during the bimodal stage after ischemia/reperfusion injury in rats. *J Neuroinflammation* 2014;11:62.
29. Bell MT, Puskas F, Agoston VA, Cleveland JC Jr, Freeman KA, Gamboni F, *et al*. Reece TB. Toll-like receptor 4-dependent microglial activation mediates spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2013; 128(11 Suppl 1):S152-6.
30. Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. 2011; 333:238-42.

#### 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.