



Fundació
La Marató de TV3

XVII SIMPOSIUM

Lesions medul·lars i cerebrals adquirides



PAPER TERAPÈUTIC DE LA INTERLEUCINA-37 EN LESIÓ DE LA MEDUL·LA ESPINAL

Rubén López Vales

Facultat de Medicina UAB



1. Resum

La resposta inflammatòria a compleix un paper essencial en la protecció de l'organisme després d'una lesió o invasió per microorganismes. Aquest procés ha de ser controlat molt atentament, ja que si no pot ocasionar danys als teixits o, fins i tot, ocasionar una patologia inflammatòria.

La resposta inflammatòria és un procés crucial en la regeneració axonal en el sistema nerviós, tal com s'ha demostrat de manera consistent en diversos models de lesió de nervi perifèric. No obstant això, després d'una lesió medul·lar (LM) es produeix un control ineficaz de la resposta inflammatòria, la qual cosa exacerba el dany tissular i dificulta l'eliminació eficient de la mielina en degeneració. Tot això contribueix a l'absència de la regeneració axonal.

La interleucina 37 (IL-37) és una citocina de la família de la interleucina 1 (IL-1) que té característiques úniques, ja que limita marcadament la immunitat innata i adaptativa. Els ratolins transgènics per a IL-37 humana exhibeixen menys signes patològics en diversos models animals, com en el cas de l'endotoxèmia, lesió pulmonar aguda, colitis química, isquèmia de miocardi, síndrome metabòlica i trastorns del son. Malgrat això, si la IL-37 promou accions antiinflamatòries en el sistema nerviós central, fins ara era desconegut. Per tant, en aquest treball es va investigar si la IL-37 redueix la resposta inflammatòria després de l'LM i si això comporta una reducció del dany tissular i dels dèficits funcionals associats a aquesta. Per dur a terme aquests experiments vam proposar els objectius següents:

1. Avaluar si la IL-37 redueix la inflamació després de l'LM en un model de ratolí.
2. Estudiar la implicació de la IL-37 en la reducció del dany secundari, els dèficits funcionals i el dolor neuropàtic després d'una lesió per contusió a la medul·la espinal en el ratolí.
3. Elucidar si la IL-37 promou regeneració axonal després d'una LM en el ratolí.

2. Resultats

OBJECTIU 1. AVALUAR SI LA IL-37 REDUEIX LA INFLAMACIÓ EN L'LM EN UN MODEL DE RATOLÍ.

Atès que la IL-37 no s'expressa en el ratolí, vam generar un transgènic que expressa la forma humana d'aquesta citocina (hIL-37tg) per estudiar-ne els efectes. L'ús d'aquest ratolí va demostrar que l'expressió d'IL-37 a la medul·la espinal és mínima/indetectable en condicions fisiològiques. Aquest baix nivell ve donat per la presència d'una seqüència d'inestabilitat en el transcrit de la IL-37 que limita dràsticament el seu temps de vida. No obstant això, després de la lesió per contusió es va observar la inducció d'IL-37 al parènquima medul·lar. El perfil d'expressió de la IL-37 va mostrar pics d'expressió: a les 12 hores i el dia 3 després de postlesió, fases en què els nivells d'IL-37 van augmentar ~17 i ~35 vegades, respectivament. El pic inicial d'IL-37 coincideix amb la inducció de citocines a la medul·la espinal lesionada (6-24 hores després de la lesió), mentre que el segon es correlaciona amb la infiltració de monòcits procedents de la circulació sanguínia (dia 3).

A continuació vam examinar si l'augment inicial d'IL-37 modula l'expressió de citocines a la medul·la espinal lesionada. Vam observar que la inducció d'IL-37 va reduir significativament l'expressió de 23 de les 32 citocines avaluades després del dany medul·lar, incloent-hi una reducció del 80% en els nivells proteics d'interleucina 6, citocina amb gran activitat proinflamatòria.

Atès que les citocines regulen el reclutament i l'activació de les cèl·lules immunes a la medul·la espinal lesionada, seguidament vam estudiar si la IL-37 redueix el nombre d'aquestes cèl·lules al teixit medul·lar lesionat. A les 24 hores després de la lesió, quan l'acumulació de granulòcits té nivells màxims a la medul·la espinal, els ratolins hIL-37tg van mostrar una reducció propera al 40% del nombre d'aquesta població leucocitària. Per contra, no es van observar diferències en el recompte de cèl·lules microgials o de macròfags. No obstant això, 7 dies després de la lesió medul·lar, moment en què l'acumulació de micròglia i macròfags en medul·la espinal lesionada aconsegueix el seu

punt àlgid, la IL-37 va reduir significativament el percentatge d'aquestes cèl·lules immunològiques.

Per tant, els resultats d'aquest objectiu demostren que la IL-37 exerceix un efecte antiinflamatori potent després d'una lesió en la medul·la espinal.

OBJECTIU 2. ESTUDIAR LA IMPLICACIÓ DE LA IL-37 EN LA REDUCCIÓ DEL DANY SECUNDARI, ELS DÈFICITS FUNCIONALS I EL DOLOR NEUROPÀTIC DESPRÉS D'UNA LESIÓ PER CONTUSIÓ A LA MEDUL·LA ESPINAL EN EL RATOLÍ.

Es va avaluar si la reducció de la resposta inflamatòria exercida per la IL-37 a l'LM redueix els dèficits funcionals i el dany tissular. Les nostres dades revelen que l'expressió d'IL-37 va millorar significativament les habilitats locomotores dels animals després de l'LM. I 28 dies després de la lesió tots els ratolins *wild type* (WT) van mostrar moviment extens dels turmells, i només el 50% d'aquests van ser capaços de posar la planta del peu a terra, sense ser capaços de suportar el seu propi pes. Per contra, tots els ratolins hIL-37tg van mostrar moviment extens dels turmells, col·locació de la planta del peu a terra suportant el seu propi pes i la majoria van fer passos, per bé que sense presentar coordinació entre potes davanteres i del darrere. A més, els ratolins hIL-37tg van aconseguir velocitats ~2,5 vegades superiors sobre una cinta rodant. Aquestes troballes demostren l'efecte protector de la IL-37 davant de les pèrdues funcionals de l'LM.

Posteriorment es va avaluar si la millora de les habilitats motores observada en els ratolins hIL-37tg després de l'LM s'associa a una reducció del dany tissular. L'estudi histològic va revelar més preservació de mielina en els ratolins hIL-37tg en comparació amb els WT. La prevenció de la pèrdua de mielina per l'expressió d'IL-37 va ser especialment evident a l'epicentre de la lesió, així com en regions adjacents a aquesta. Els estudis de preservació neuronal també van posar de manifest que la IL-37 fa disminuir significativament la pèrdua de neurones.

Per avaluar el potencial terapèutic de la IL-37 en l'LM es van administrar dues formes recombinants de la IL-37 (rIL-37). En primer lloc es va avaluar l'efecte de l'administració del precursor de la IL-37 (longitud completa de la isoforma b), ja que estudis previs

n'havien demostrat la eficàcia *in vivo*. També es va aplicar una forma processada de la IL-37 amb l'extrem N-terminal a valina 46. Atès que la barrera hematoencefàlica impedeix l'entrada de la majoria de les molècules al sistema nerviós central, es va administrar la rIL-37 al lloc de la lesió, 5 minuts després de produir-se el dany, utilitzant un capil·lar de vidre (diàmetre 30 micres). Els resultats d'aquests estudis van demostrar que la injecció intraespinal de les dues formes d'rIL-37 va minimitzar els dèficits locomotors dels animals.

També vam avaluar si l'expressió transgènica d'IL-37 atenua el dolor neuropàtic després de l'LM. Les nostres dades van revelar que els ratolins hIL-37tg presentaven menor hipersensibilitat a estímuls dolorosos tèrmics, però no mecànics.

Per tant, les dades obtingudes en aquest objectiu mostren que la IL-37 minimitza els dèficits locomotors i el dany neural, així com el dolor neuropàtic a estímuls tèrmics després del dany medul·lar per contusió.

OBJECTIU 3. ELUCIDAR SI LA IL-37 PROMOU REGENERACIÓ AXONAL EN LESIONS DE LA MEDUL·LA ESPINAL EN EL RATOLÍ.

Atès que els macròfags inhibeixen el creixement axonal mitjançant l'alliberament de factors solubles i per contacte cel·lular, en aquest objectiu vam avaluar si la IL-37 promou regeneració axonal després de l'LM. Vam realitzar una secció completa a la medul·la espinal als ratolins hIL-37tg i WT. Els dos grups d'animals van presentar paràlisi completa de les extremitats posteriors després de la lesió i no es va observar recuperació del moviment en les 10 setmanes que va durar l'estudi. L'avaluació histològica de la medul·la espinal va revelar que l'expressió transgènica d'IL-37 no va induir la regeneració dels axons del tracte corticoespinal en regions caudals a l'epicentre de la lesió. Així mateix, el recompte d'axons en regions rostrals adjacents a la lesió tampoc no va revelar diferència entre els ratolins hIL-37tg i els WT, tot suggerint que la IL-37 promou neuroprotecció però no regeneració axonal.

3. Impacte dels resultats

Les lesions de la medul·la espinal (LM) tenen com a conseqüència greus dèficits de la funció motora, sensorial i autonòmica. Tot i que diversos estudis mostren que la inflamació contribueix a la fisiopatologia de l'LM, assajos clínics utilitzant altes dosis de metilprednisolona no han resultat en millores significatives. La IL-37, un membre de la família de la IL-1, exerceix potents efectes antiinflamatoris en diversos models animals de malalties inflamatòries. Aquest projecte mostra per primera vegada en ratolins transgènics per a la IL-37 que aquesta citocina redueix la magnitud de la resposta inflamatòria al sistema nerviós central i en minimitza les discapacitats funcionals. Així mateix, es demostra que l'administració exògena d'aquesta proteïna millora les habilitats motores en ratolins amb dany medul·lar per contusió. Aquests resultats, per tant, suggereixen que la IL-37 podria ser una nova estratègia terapèutica per limitar els efectes nocius de la resposta inflamatòria en malalties neurològiques.

4. Publicacions

Els resultats presentats, excloent-ne aquells que fan referència als estudis de dolor neuropàtic, s'han publicat recentment a *Proceedings of the National Academy of Sciences*, una de les revistes científiques amb més factor d'impacte.

Coll-Miro M, Francs-Quijorna I, Sants-Nogueira E, Torres-Espin A, Bufler P, Dinarello CA, López-Vals R (2016).

Beneficial effects of IL-37 After Spinal Cord Injury in Mice.

PNAS 113: 1411-1416. Factor d'impacte: 9,8.

Aquestes troballes també es van posar en relleu als diaris més importants del mercat espanyol, entre els quals destaquen *La Vanguardia*, *El Periódico*, *La Razón*, *ABC* i *El Mundo*, entre d'altres.