



POTENCIACIÓN DE LOS MECANISMOS ENDÓGENOS DE NEUROPROTECCIÓN Y REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO DESPUÉS DE UN DAÑO AGUDO

Catalina Casas Louzao

Institut de Neurociències UAB

Valerie Petegnief

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Assumpció Bosch Merino

Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica UAB





1. Resumen

El objetivo principal del proyecto coordinado era profundizar en los conocimientos científicos sobre los mecanismos endógenos de neuroprotección que de forma natural se activan en las neuronas que sufren las consecuencias de una lesión, para utilizarlos en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento del daño al sistema nervioso. Una de las dianas utilizadas fue SIRT1, una deacetilasa de histonas, que interviene en respuestas celulares en entornos adversos.

Hemos desvelado algunos de los mecanismos moleculares de neuroprotección que se activan en las motoneuronas de la médula espinal cuando son sometidas a rotura de su axón por tracción traumática sobre el nervio periférico.

Esto nos ha permitido descubrir y patentar una nueva combinación de fármacos que ejerce un efecto neuroprotector, antiinflamatorio y regenerador del sistema nervioso en un modelo de trauma grave como la avulsión de la raíz del nervio periférico. Asimismo hemos descubierto una clase de vectores virales adenoasociados (serotipo AAVrh10), que administrados intratecal o intracranealmente, transduce las motoneuronas espinales y neuronas hipotalámicas, respectivamente. Esto nos ha permitido explorar su potencial terapéutico para sobreexpresar la proteína SIRT1. Los resultados obtenidos demuestran que esta estrategia nos permite neuroproteger las motoneuronas espinales avulsionadas y también reducir la transformación hemorrágica, una complicación de mal pronóstico, en un modelo de isquemia cerebral transitoria.

2. Resultados

La gran mayoría de las lesiones neurales se producen por contusión, tracción, compresión o isquemia. Los daños por estiramiento o tracción de los nervios periféricos son frecuentes y se ven asociados a lesiones osteoarticulares, en especial fracturas y luxaciones más comunes relacionadas con lesiones de espalda y cadera. El nervio periférico posee una gran resistencia a la tracción, pero es de muy limitada elasticidad. De ahí que los mecanismos de tracción violenta puedan producir daño neural de gran extensión. Por ejemplo, cuando una persona es proyectada desde una motocicleta y su

espalda impacta con el suelo, puede producirse una fuerte tracción de los componentes del plexo braquial que entronca el circuito nervioso desde la mano al cuello. En estos casos las reparaciones obligan a la entrada en quirófano para reimplante. Pero las oportunidades de éxito del reimplante dependen en gran medida de tratamientos neuroprotectores, en la actualidad inexistentes, que permitan sustentar la población neural que de otro modo morirá como consecuencia de la desconexión nerviosa. Pueden presentarse otras lesiones menos graves, como la que resulta de una simple compresión del nervio, que pueden ocurrir en variedad de situaciones, como por ejemplo por posturas corporales inapropiadas. Uno de los casos más frecuentes dentro de esta categoría es el síndrome del túnel carpiano. En este síndrome, la presión del túnel sobre el nervio mediano causa neuropatía caracterizada por pequeñas molestias, sensaciones de hormigueo, dificultades de movimiento de la mano y dolor.

La recuperación de las lesiones traumáticas depende fundamentalmente de la gravedad de la lesión axonal y la proximidad al SNC. En la médula espinal, las motoneuronas (MN) pueden regenerar sus axones y, de hecho, inician programas moleculares para formar de nuevo sus axones y enviarlos a conformar los nervios. Pero a la vez, la formación de tejido cicatricial glial en la interfase entre la médula espinal y la raíz del nervio afectado actúa como barrera, dificultando la regeneración axonal. Así, solo alrededor de un 50% de los axones consiguen penetrar distalmente. De estos, su crecimiento regenerativo puede ser de un 1 mm por día, en un recorrido amplio en el humano, que presenta dificultades para sostenerse y mientras tanto se le va atrofiando el músculo. Por lo tanto, un número todavía inferior de axones acaban llegando a su destino y reinervándose con cierto éxito, lo cual es altamente insuficiente para la recuperación funcional. En este sentido, las lesiones que afectan a las extremidades inferiores tienden a ser de recuperación más difícil, en parte porque los músculos se encuentran más distantes y precisan más tiempo para la regeneración nerviosa. Por ello, resulta capital encontrar fármacos adecuados que aceleren esta regeneración. Otro tipo de lesión aguda que puede acontecer en el sistema nervioso es la isquemia cerebral. El ictus es una de las enfermedades cerebrovasculares más frecuentes y es produce cuando el tejido neural deja de recibir sangre, ya sea por trombosis o embolia, principalmente, o por hemorragia. La rehabilitación permite la recuperación de las funciones alteradas después de un episodio de ictus, pero en muchos casos permanecen secuelas graves en los enfermos, como la pérdida del habla, depresión y

afectación locomotriz. El cerebro tiene una gran dependencia del flujo sanguíneo, que le aporta el oxígeno y la glucosa necesarios para efectuar sus funciones.

La isquemia cerebral desencadena una serie de procesos que pueden conducir a la muerte celular si la isquemia es de suficiente intensidad y se prolonga en el tiempo. En un inicio se produce una depleción energética y se liberan moléculas que producen excitotoxicidad y estrés oxidativo en el tejido isquémico (cascada isquémica); seguidamente se pone en marcha una respuesta inflamatoria local, que puede amplificar el daño cerebral isquémico (cascada neuroinflamatoria). Una de las complicaciones más temidas del infarto cerebral es la transformación hemorrágica (TH) que aparece en el 10% de los pacientes. Su papel en el pronóstico de los pacientes es discutido, pero la TH sintomática se asocia a una peor evolución. El uso del tratamiento trombolítico favorece la reperfusión del tejido, aunque a su vez el riesgo de extravasación. Por tanto, resulta fundamental conocer mejor tanto la fisiopatología de la TH como los factores predictores de la misma. La alteración de la barrera hematoencefálica es responsable de la TH y se produce por liberación de componentes plasmáticos y del tejido cerebral, provocando un deterioro de la pared del endotelio vascular.

Como se ha dicho, en la práctica clínica no se administra en la actualidad ningún medicamento o solución terapéutica neuroprotectora efectiva, tanto para casos aparentemente distales como el daño a los nervios periféricos, o en casos como la isquemia cerebral. Creemos que en parte puede deberse a que el abordaje científico ha sido obligadamente simplista y se ha basado en la modificación de una única diana para la determinación de terapias. Este conocimiento de base sigue siendo muy importante para construir un conocimiento más complejo, que nos aproximen mejor a la realidad. Hoy en día, con el desarrollo de poderosas herramientas bioinformáticas y computacionales que nos permiten manejar muchas bases de datos de conocimiento molecular disponibles, podemos empezar a realizar otros abordajes que nos aproximen a nuevas terapias neuroprotectoras más efectivas.

En este sentido, nuestro objetivo era ampliar el conocimiento de los mecanismos neurodegenerativos, pero sobre todo compararlos con los que la propia neurona pone en marcha, muy efectivamente en muchos casos, para sobreponerse a lesiones subletales y regenerar sus conexiones neurales. Se trata de un punto común y

deseable en cualquier fisiopatología del SNC. Dentro de nuestras hipótesis iniciales figuraba la consideración de que con la capacidad de potenciar los mecanismos endógenos, naturales y que las propias neuronas activan, quizás seríamos capaces de proporcionarle las herramientas adecuadas para sobreponerse. Por tanto, nuestro objetivo principal era idear y explorar nuevas estrategias terapéuticas en las lesiones traumáticas o daño isquémico en el sistema nervioso. Hemos trabajado con dos estrategias: la farmacológica, basada en una combinación de fármacos de reposición, y la basada en terapia génica.

Para alcanzar el primer objetivo, ideamos un diseño experimental basado en un análisis integral y computacional de datos empíricos recogidos de modelos animales de avulsión de raíces del nervio ciático. Se escogió este modelo por la larga trayectoria de conocimiento experimental que nuestro grupo posee, permitiéndonos fijar con precisión los momentos idóneos de recogida de muestras para efectuar los análisis de los cambios de proteínas (proteómica) en el tejido, en respuesta a una lesión de arranque del nervio (que resultará en muerte masiva de las MN espinales) y compararlo con la respuesta cuando solo se corta el axón y es cosido, permitiendo la supervivencia endógena de las MN y su regeneración. Mediante análisis computacional de estos datos se descubrieron, por una parte, los mecanismos moleculares involucrados en la degeneración y, por otro, los mecanismos endógenos de neuroprotección de forma diferencial. Por otro lado, empleamos los mismos datos en modelos sofisticados de análisis computacional para originar redes de proteínas que conforman mapas específicos asociados a cada condición fisiopatológica. Gracias al uso de herramientas computacionales basadas en la inteligencia artificial neural que aprende de la conducta molecular biológica, preguntamos al sistema qué fármacos eran capaces de cambiarnos un mapa característico de una situación neurodegenerativa en un mapa específico de una situación neuroprotectora y regeneradora. Este rastreo de bancos de datos de drogas de reposición dio lugar a una colección de varias combinaciones de drogas posibles. Seleccionamos tres para su posterior validación como agentes neuroprotectores empleando el modelo de lesión periférica de avulsión de raíz. Una de ellas resultó ser un agente con capacidad neuroprotectora, capacidad de reducción de la reactividad glial, que estimulaba el perfil regenerador de las MN y que, teóricamente, no produciría dolor neuropático, de aparición muy común tras este tipo de lesión. Además, decidimos explorar más allá su capacidad prorregenerativa usando un modelo de compresión del nervio. Así, comprobamos que el tratamiento efectivamente

aceleraba la regeneración nerviosa, mejoraba la reinervación muscular y la recuperación funcional locomotora en los animales lesionados tratados respecto a los tratados solo con vehículo tampón.

La segunda estrategia consistió en explorar el potencial de la terapia génica como novedad en el tratamiento de traumatismos e isquemias del sistema nervioso. En primer lugar, analizamos y establecimos el vector viral ideal para uso como vehículo en este tipo de terapia. Observamos que el serotipo AAVrh10 era el que mejor permitía la sobreexpresión de cualquier gen, específicamente en las MN de la médula espinal y en muchos núcleos del cerebro, incluido el hipotálamo. La administración diferencial de este vector, a través de una punción lumbar para transducir MN, o intracerebral para transducir el hipotálamo, permitió utilizar el mismo vector terapéutico sobre células diana bien diferenciadas.

Produjimos un vector que sobreexpresaba la proteína denominada sirtuina 1 (SIRT1) en las neuronas. Esta proteína está implicada en muchos procesos biológicos y desempeña un importante papel en patologías del sistema nervioso. En enfermedades neurodegenerativas, SIRT1 interviene en la degradación de proteínas agregadas y neurotóxicas que se acumulan en los cerebros de enfermos de Alzheimer, por ejemplo. SIRT1 tiene un papel clave al retrasar el deterioro que se produce durante el envejecimiento celular, ya que tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio y es determinante en los procesos cognitivos del hipocampo. Además, la sobreexpresión de SIRT1 en el hipotálamo protege contra algunos acontecimientos asociados al envejecimiento (alteración del sueño y actividad física mermada). El hipotálamo es el núcleo cerebral que controla la glucemia; su estimulación podría ayudar en este sentido después de una isquemia, ya que la misma provoca hiperglicemia. Basados en estas últimas observaciones, hemos desarrollado un modelo que consiste en la administración del vector viral para sobreexpresar SIRT1 en el hipotálamo en el modelo de infarto cerebral. Encontramos que esta sobreexpresión reducía la TH después de isquemia-reperfusión.

Además, la misma terapia aplicada sobre nuestro modelo de lesión periférica y degeneración de MN demostraba su eficacia como agente neuroprotector, ya que producía la supervivencia de más de un 60% de MN dañadas y actuaba reduciendo la inflamación en el sistema nervioso.

Desde el punto de vista del avance del conocimiento científico, hemos descrito los mecanismos moleculares involucrados en el proceso neurodegenerativo de muerte retrógrada por pérdida del axón, y también los mecanismos endógenos de neuroprotección que suponen un éxito para que la MN sobreviva.

Particularmente alrededor de SIRT1, hemos averiguado que lo más importante es el balance de su actividad respecto a otros parámetros, como por ejemplo los energéticos de cada condición patológica. *In vitro*, por ejemplo, ante un daño excitotóxico en neuronas, el grado de activación de SIRT1 debe depender de la evolución de la lesión. Pero ante un estrés celular que provoque una sobrecarga de proteínas mal plegadas dentro de la célula, la ausencia de SIRT1 confiere protección, probablemente por la producción de chaperonas que reducen la sobreacumulación de proteínas inmaduras. A pesar de ello, como ya se ha mencionado previamente, en los modelos *in vivo* los niveles intracelulares logrados parecen ser óptimos para conferir protección neuronal.

3. Relevancia e implicaciones

La relevancia de este proyecto reside en especial en revelar la posibilidad del uso terapéutico, tanto de los fármacos encontrados como de los vectores víricos desarrollados para las lesiones de nervio periférico y para reducir aspectos relevantes producidos por las isquemias cerebrales.

En el caso de los fármacos, creemos que su aplicación clínica, tanto en trauma grave de nervio periférico como en los casos más moderados de lesiones por compresión, como el síndrome del túnel carpiano o las hernias discales, puede ser de recorrido relativamente corto, por tratarse de una combinación de fármacos de reposición, es decir que su seguridad para uso humano ya está comprobada.

En el caso de los vectores virales para terapia génica, son de gran potencial clínico, ya que hemos desarrollado una plataforma capaz de transducir, en modelos de enfermedad en ratón, un alto porcentaje de MN y neuronas sensoriales utilizando un vector no humano, el serotipo AAVrh10. A través de una única administración intratecal en la región de las vértebras lumbares, una práctica que se realiza habitualmente en consultas externas hospitalarias, el vector llega a través del líquido

cefalorraquídeo a todo el sistema nervioso. La bioseguridad de esta estrategia es relevante no solo por la ruta de administración, sino también por la cantidad de vector que es preciso administrar para obtener una transducción eficiente, del orden de 10-20 veces menor que la necesaria en administración intravenosa. En definitiva, los vectores desarrollados en este proyecto pueden establecer las bases para la propuesta de ensayos clínicos de terapia génica en el futuro.

4. Bibliografía

Casas, C., Herrando-Grabulosa, M., Manzano, R., Mancuso, R., Osta, R., and Navarro, X. (2012).

Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis.

Brain Behav. 3, 145–158.

Petegnief V., Planas AM. (2013).

SIRT1 regulation modulates stroke outcome.

Transl Stroke Res 4:663-671.

Casas, C., Manzano, R., Vaz, R., Osta, R., and Brites, D. (2014).

Synaptic Failure: Focus in an Integrative View of ALS.

Brain Plast. 23 December, 1–16.

Homs, J., Pagès, G., Ariza, L., Casas, C., Chillón, M., Navarro, X., and Bosch, A. (2014).

Intrathecal administration of IGF-I by AAVrh10 improves sensory and motor deficits in a mouse model of diabetic neuropathy.

Mol. Ther. - Methods Clin. Dev. 1, 7.

Casas, C., Isus, L., Herrando-Grabulosa, M., Mancuso, F.M., Borrás, E., Sabidó, E., Forés, J., and Aloy, P. (2015).

Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage. **Sci. Rep.** 5, 9185.

Thwaite, R., Pagès, G., Chillon M., Bosch, A. (2015).

AAVrh.10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy.

Gene Therapy, 22:196-201.

Leiva-Rodríguez, T., Herrando-Grabulosa, M., Romeo-Guitart, D., Bosch, A., Forés, J., Casas, C. (2016)

Deficient Protein Sorting Leads to Autophagy Flux Blockage in Retrograde Motoneuron degeneration after proximal axotomy.

Pendiente de publicación.

Herrando-Grabulosa, M., Romeo-Guitart, D., Leiva-Rodríguez, T., Forés, J., Casas, C. (2016)

Molecular Degenerative Shift Depending on Traumatic Nerve Avulsion Type of Injury.

Pendiente de publicación.

Herrando-Grabulosa M., Mullet R., Pujol A., Mas JM., Navarro X., Aloy P., Coma M. and CASAS C. (2016)

Novel Neuroprotective Multicomponent Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis Designed by Networked Systems.

PlosOne (en prensa).

Romeo-Guitart, D., Forés, J., Herrando-Grabulosa, M., Valls, R., Leiva-Rodríguez, T, Petegnief, V., Bosch, A., Coma, M., Mas, JM, Casas, C (2016).

Network-Centric Therapeutic Approach Success for Retrograde Neurodegeneration after Peripheral Nerve Injury.

Pendiente de publicación por patente previa.

De Vera, N., Latorre, J., Santalucia, T., Vaquero, A., Planas, AM., Petegnief V. (2106)
SIRT1 deficiency leads to heat shock proteins induction and protection against endoplasmic reticulum stress.

Pendiente de publicación.

Leiva-Rodríguez T., Herrando-Grabulosa M., Romeo-Guitart D., Bosch A., Forés J., Casas C. (2016)
Autophagy Flux Blockage in Retrograde Motoneuron degeneration after proximal axotomy.

Pendiente de publicación.