



MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES INMUNITARIOS: NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL DAÑO AGUDO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Carme Solà Subirana

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Lydia Giménez Llort

Institut de Neurociències UAB

Juan Sayós Ortega

CIBBIM - Nanomedicina Hospital Universitari Vall d'Hebron

Hugo Peluffo Zavala

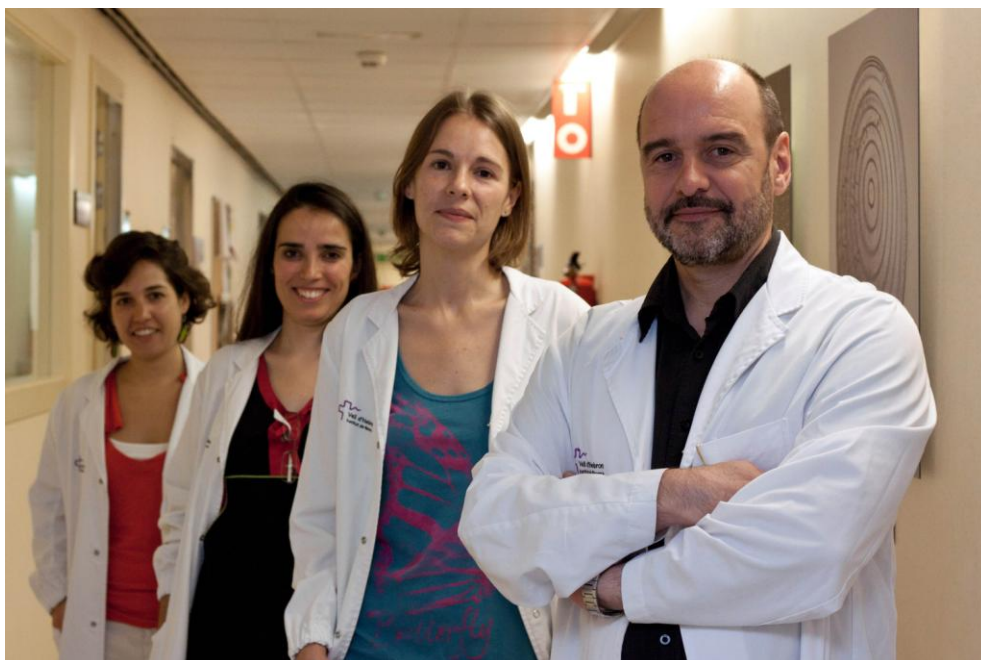
Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguai

Jordi Villà Freixa

Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida UPF







1. Resumen del proyecto

En respuesta a una lesión medular o cerebral se produce un daño agudo en el sistema nervioso central (SNC) que puede resultar en una pérdida de función más o menos importante. En este contexto, se inicia un proceso neurodegenerativo caracterizado por la presencia de daño neuronal y de un proceso inflamatorio en el cual células gliales (microglía y astrogía), endoteliales y del sistema inmune periférico (macrófagos, linfocitos, células dendríticas) pueden hallarse involucradas en diferente medida en función del tipo de daño neuronal y de la magnitud del daño tisular inducido.

Las células de la microglía son las principales representantes del sistema inmune endógeno del SNC. En condiciones fisiológicas se encuentran patrullando en el parénquima nervioso y, gracias a una amplia variedad de receptores de membrana, son capaces de reconocer un entorno sano, así como detectar alteraciones que pueden suponer un peligro para el buen funcionamiento del SNC (agentes patógenos, daño neuronal, agentes neurotóxicos exógenos, productos endógenos anómalos resultantes de procesos patológicos). Como consecuencia de una lesión aguda del SNC, se altera la homeostasis y las células de la microglía se activan con el fin de neutralizar el daño inducido y recuperarla. Pero esta activación puede ir asociada a la producción de una serie de factores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno potencialmente neurotóxicos, por lo que la regulación y la resolución de este proceso es muy importante para evitar efectos secundarios nocivos.

Se cree que un proceso inflamatorio prolongado contribuye a la magnitud del daño final en el caso de lesiones agudas del SNC; por tanto, esta respuesta inflamatoria constituye una diana potencial a tener en cuenta desde el punto de vista terapéutico. Como consecuencia, una actuación sobre factores reguladores involucrados en el inicio, mantenimiento y resolución de la respuesta inflamatoria microglial puede constituir una posible estrategia terapéutica para modular dicha respuesta.

Como se ha comentado anteriormente, las células de microglía actúan como sensores de la actividad del SNC, y las neuronas juegan un papel importante en el mantenimiento de la microglía en un estado no activado en condiciones fisiológicas. En este control participan una serie de señales inhibitoras dependientes o independientes de contacto. El objetivo del presente proyecto es estudiar el potencial de unos

receptores inmunológicos reguladores de la función microglial –CD200R1, TREM2 y la familia CD300– como diana terapéutica en las lesiones medulares y cerebrales. Creemos que la expresión de estos receptores o de sus ligandos puede estar alterada en estas patologías y que la modulación de la respuesta inflamatoria mediante una acción sobre estos receptores puede tener un papel neuroprotector.

Para llevar a cabo el proyecto se utiliza un abordaje pluridisciplinar. Así, en el proyecto intervienen cinco equipos de investigación de diferentes instituciones, que trabajan en bioinformática, inmunología molecular, neurobiología, neuropatología, neurociencia cognitiva y terapia génica. Por una parte, se utilizan aproximaciones *in vitro*, tanto para estudiar las interacciones ligando-receptor como para determinar el papel de estos receptores en la respuesta inflamatoria microglial y el potencial neuroprotector de su modulación. Por otra parte, se consideran aproximaciones *in vivo*, en las que se estudia la implicación de estos receptores y su modulación en modelos animales de daño agudo del SNC (encefalopatía por hipoxia/isquemia perinatal y lesiones traumáticas medulares o cerebrales). A través de estudios de comportamiento se valoran alteraciones funcionales y a través de estudios bioinformáticos (*in silico*) se caracterizan las interacciones moleculares ligando-receptor al objeto de identificar en las bases de datos existentes moléculas con potencial de unión.

2. Resultados

CD200-CD200R1

Estudios *in vitro* utilizando diferentes tipos de cultivos de células gliales han permitido observar la respuesta del sistema CD200-CD200R1 en un contexto inflamatorio, identificar factores de transcripción involucrados en su regulación y poner de manifiesto cómo la modulación del receptor CD200R1 puede tener un efecto en el perfil inflamatorio de las células microgliales y su potencial neurotóxico. Así, el bloqueo de la interacción ligando-receptor potencia la respuesta inflamatoria microglial, mientras que la sobreexpresión de CD200R1 o su estimulación mediante una molécula agonista resulta en la inhibición de esta respuesta inflamatoria y la neurotoxicidad asociada. Estudios *in vivo* utilizando modelos animales de lesiones medulares o cerebrales adquiridas han permitido detectar la presencia de alteraciones en la expresión del receptor CD200R1. La inhibición de este receptor, utilizando diferentes estrategias

experimentales, ha mostrado que este es necesario para limitar el daño resultante en estas lesiones. Estudios *in silico* de la estructura CD200-CD200R1 han permitido caracterizar energéticamente la región de interacción e identificar los *hotspots*, lo que ha conducido a iniciar la búsqueda de pequeñas moléculas moduladoras potenciales en bases de datos de moléculas con capacidad conocida para cruzar la barrera hematoencefálica. Desgraciadamente, la información estructural es aún poco concluyente para conseguir encontrar agonistas del sistema.

CD300

Respecto a los receptores CD300, hemos obtenido una información valiosa a distintos niveles. Nuestro trabajo se ha centrado especialmente en el receptor CD300f. Estudios *in vitro* nos han permitido identificar la esfingomielina como uno de los ligandos fisiológicos de este receptor en humanos. Además, hemos comprobado que es necesaria la presencia de una proteína presentadora para que se produzca la unión entre CD300f y este esfingolípido. Este dato es muy importante, pues esta proteína puede convertirse en una diana terapéutica gracias a su capacidad de regular la señalización de este receptor. A través de estudios *in silico* de un modelo del complejo ligando-receptor se ha llegado a postular una región de interacción mediada por iones calcio. Estudios *in vitro* también han mostrado la expresión del receptor CD300f y de su ligando en neuronas y células gliales y su papel dual pro y antiinflamatorio, e igualmente que la inhibición de CD300f en cultivos mixtos neurona-glía induce muerte neuronal. Conforme a los resultados *in vitro*, estudios *in vivo* utilizando modelos animales de lesiones medulares o cerebrales adquiridas han permitido detectar alteraciones en la expresión de CD300f en estas situaciones, y han mostrado que si se interfiere en la interacción de CD300f con su ligando, incrementa el daño derivado de las lesiones. A partir de estos datos diseñamos una estrategia terapéutica basada en la sobreexpresión de CD300f después de trauma cerebral. A corto plazo se observó una disminución del volumen de lesión, aunque a largo plazo la sobreexpresión resultó tóxica. Por tanto, este enfoque todavía exige mayor afinamiento, por ejemplo sobreexpresando CD300f únicamente en microglía/macrófagos utilizando un promotor específico.

TREM2

En cuanto al receptor TREM2, también se desconoce el ligando fisiológico, como ocurre con los receptores CD300, dificultando el estudio de este sistema ligando-receptor. A

través de estudios *in vitro* hemos mostrado que la expresión de TREM2 se altera en un contexto inflamatorio. Estudios *in vivo* nos han permitido observar que su patrón cerebral de expresión se va modificando durante el desarrollo posnatal y que su expresión está asociada a diferentes fenotipos microgliales. Además, también hemos observado que la expresión de TREM2 está alterada en un modelo de daño cerebral inducido por hipoxia/isquemia perinatal. Estas observaciones, junto al hecho de que su ausencia da lugar a una patología neurodegenerativa, sugieren un interés adicional al estudio de este receptor en el contexto de hipoxia/isquemia.

En el caso del modelo experimental de hipoxia/isquemia perinatal, también se ha estudiado la evolución temporal del patrón de expresión cerebral de citocinas pro y antiinflamatorias y la implicación del factor de transcripción STAT-3 en la regulación de esta respuesta inflamatoria. En este modelo también se han caracterizado alteraciones funcionales mediante tests de comportamiento.

Globalmente, los resultados obtenidos sugieren que la respuesta inflamatoria asociada a lesiones cerebrales y medulares puede ser modulada mediante una acción sobre receptores inmunológicos reguladores de la función microglial. El desarrollo de herramientas que permitan modular la función de estos receptores, ya sea actuando sobre su expresión o sobre su activación, puede resultar útil para inhibir el daño neuronal en lesiones cerebrales y medulares adquiridas.

Desde el punto de vista técnico, debe destacarse la utilización de herramientas bioinformáticas que han contribuido a estudiar la interacción molecular ligando-receptor de CD300 y CD200R1. Respecto a CD300 ha permitido comprender las bases de la interacción con el ligando que se ha identificado, mientras que en el caso de CD200-CD200R1 ha permitido fijar las bases para la búsqueda de moléculas que puedan funcionar como ligando de CD200R1.

También es necesario destacar la puesta a punto de estrategias de terapia génica para el trauma cerebral utilizando vectores lentivirales no integrativos y nanovectores modulares recombinantes. Ambos tipos de vectores son útiles, ya que muestran tiempos de inducción de la expresión del transgén rápidos, no inducen un incremento en la neuroinflamación ni en el daño tisular *per se*, y producen niveles de proteína transgénica capaces de inducir efectos biológicos. Es importante señalar que los dos

vectores no solo no fueron tóxicos tras ser inyectados intracerebralmente, sino que además resultaron neuroprotectores, tanto a nivel histológico como funcional.

3. Relevancia y posibles implicaciones

Aunque se trata de un proyecto de investigación básica, el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo del daño neuronal en las lesiones agudas del sistema nervioso central es imprescindible en la búsqueda de dianas potenciales desde un punto de vista terapéutico. Nuestra hipótesis de trabajo es que el control de la respuesta inflamatoria microglial puede resultar en neuroprotección después de un daño agudo al SNC.

Por un lado, los resultados obtenidos muestran que, a través de una acción sobre determinados receptores inhibitorios inmunes presentes en las células microgliales, podemos contribuir a inhibir la respuesta inflamatoria y hacer disminuir el daño que esta respuesta induce de forma secundaria en lesiones agudas del SNC. Estos resultados pueden ayudar a diseñar estrategias terapéuticas para procesos de daño neuronal donde la neuroinflamación juega un papel, y ponen de manifiesto el interés de desarrollar aproximaciones terapéuticas que tengan una acción sobre la expresión o la función de estos receptores.

Por otro lado, también hemos demostrado la posible aplicación de dos estrategias de terapia génica para el tratamiento del trauma cerebral y medular. Se trata de la demostración de que tanto vectores lentivirales como nanopartículas recombinantes son efectivas para producir una proteína transgénica de forma rápida después de un trauma, a niveles biológicamente relevantes y sin inducir neuroinflamación ni alteraciones neurológicas. Así, puede escogerse una u otra estrategias en función del nivel de expresión y la ventana temporal necesaria según la función del transgén neuroprotector elegido. Hasta el inicio del proyecto, no se había realizado ningún estudio en que se evaluara la utilización de vectores de terapia génica inyectándolos después del trauma y en un contexto de aplicación preclínica que incluye su inyección intracerebral 4 h después de la lesión. Estos resultados deberían ser confirmados en modelos experimentales con animales de mayor tamaño. Es importante destacar que esta estrategia terapéutica puede ser utilizada tanto para la sobreexpresión de

inmunorreceptores como de cualquier tipo de gen con potencial terapéutico.

Globalmente, el proyecto ha contribuido, tanto a la identificación de posibles dianas terapéuticas que actúen disminuyendo la neuroinflamación y la expansión secundaria del daño después de una lesión del SNC, como al desarrollo de estrategias farmacológicas incluidas en el concepto de terapias avanzadas (en este caso la terapia génica).

4. Bibliografía generada

Artículos publicados

Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, Saura J, Solà C.
Inhibition of CD200R1 expression by C/EBPbeta in reactive microglial cells.
Journal of Neuroinflammation, 9:165 (2012).

Shrivastava K, Llovera G, Recasens-Torné M, Chertoff M, Gimenez-Llort L, Gonzalez B, Acarin L.
Temporal expression of cytokines and signal transducer and activator of transcription factor 3 activation after neonatal hypoxia/ischemia in mice.
Developmental Neuroscience, 35(2-3):212-25 (2013).

Chertoff M, Shrivastava K, Gonzalez B, Acarin L, Giménez-Llort L.
Differential modulation of TREM2 protein during postnatal brain development in mice.
PLoS One, 8(8):e72083 (2013).

Dentesano G, Serratosa J, Tusell JM, Ramón P, Valente T, Saura J, Solà C.
CD200R1 and CD200 expression are regulated by PPAR- γ in activated glial cells. **Glia**, 62:982-998 (2014).

Ejarque-Ortiz A, Solà C, Martínez-Barriocanal A, Schwartz Jr S, Martín M, Peluffo H, Sayós J.
The receptor cmrf35-like molecule-1 (clm-1) enhances the production of LPS-induced pro-inflammatory mediators during microglial activation.
PLoS One, 10: e0123928 (2015).

Peluffo H, Solari-Saquieres P, Negro-Demontel ML, Navarro X, Sayós J, Lago N.
CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype.

Journal of Neuroinflammation, 12:145 (2015).

Negro ML, Saccardo P, Giacomini C, Yáñez-Muñoz RJ, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A, Peluffo H.

Comparative analysis of lentiviral vectors and modular protein nanovectors for traumatic brain injury gene therapy.

Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 1:14047 (2014).

Peluffo H, Unzueta U, Negro ML, Xu Z, Vázquez E, Ferrer-Miralles N and Villaverde A.
BBB-targeting, protein-based nanomedicines for drug and nucleic acid delivery to the CNS. **Biotechnology Advances**, 33(2):277-287 (2015).

Manuscripts en preparación

Valente T, Dentesano G, Rabaneda-Lombarte N, Pulido-Salgado M, Serratosa J, Santalucía T, Saura J, Solà C.

Modulation of neuroinflammation by the microglial inhibitory receptor CD200R1.

Giménez-Llort L., Muntsant A, Shrivastava K, Gonzalez B, Acarin L, Shrivastava K.
Behavioral profile of C7BL6/C mice following neonatal hypoxia-ischemia.

Muntsant A, Shrivastava K, Gonzalez B, Acarin L, Giménez-Llort L.

Perinatal hypoxia-ischemia induces long-term sensorimotor deficits, anxiety-like behaviors and cognitive impairment in a gender-selective manner that can be reversed by early- postnatal handling.

Lago N, Negro-Demontel ML, Alí D, López-Valez R, Sayós J, Peluffo H.

CD300f immune receptor regulates microglial activation.

Agulló L, Sayós J, Rubio S, Villà-Freixa, J.

Modelling of Calcium mediated activation of CD300 by esphingomyelin.

Agulló, Solà C, Villà-Freixa J.

Computational characterisation of agonists for CD200R1 activation.