



Déficit de CXCR4 y NGF, e incremento VEGF en la rata *taiep* un modelo animal de hipomielinización–desmielinización.

Guadalupe Rivera Torruco¹, Guadalupe García Robles¹, Guadalupe Soto Rodríguez, Víctor Manuel Blanco Álvarez Daniel Martínez Fong², José Ramón Eguívar³, Araceli Ugarte, Bertha Alicia León Chávez¹.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. ² Dept Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV. ³ Instituto de Fisiología, BUAP, ⁴Hospital regional 1º de Octubre, ISSSTE. alileonch@gmail.com

Introducción: La rata *taiep* es un modelo animal de hipomielinización – desmielinización el cual deriva del acrónimo de los síntomas neurológicos que presenta: (t) temblor, (a) ataxia, (i) inmovilidad (e) epilepsia (p) parálisis; donde se ha encontrado una acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos. Los factores que participan en el proceso mielinizante son las quimiocinas y factores de crecimiento. CXCR4 promueve la maduración de células progenitoras de oligodendrocitos. NGF (nerve growth factor) participa en la diferenciación, proliferación y supervivencia de neuronas, protegiendo a los axones y a la mielina del daño inflamatorio, modulando al sistema inmunológico. VEGF- α favorece la disrupción de la barrera hematoencefálica, causando lesiones inflamatorias y desmielinizantes. Los factores involucrados en el mantenimiento de la mielina están alterados en la rata *taiep*. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de CXCR4, NGF y VEGF en la patología *taiep*. **Metodología:** Ratas machos de 1 y 6 meses se les extrajo el tallo cerebral y cerebelo de ratas *taiep* y Sprague-Dawley. Los niveles proteicos de CXCR4, NGF y VEGF fueron determinados por ELISA. **Resultados:** Los resultados exponen que la rata *taiep* muestra un incremento de los niveles proteicos de CXCR4 al mes de edad tanto en cerebelo como tallo cerebral, mientras que a los 6 meses se encontró un decremento en ambas regiones. Los valores obtenidos de NGF disminuyeron en tallo cerebral. VEGF incrementó en cerebelo y tallo cerebral a los 6 meses de edad. **Conclusión:** Estos resultados muestran que al mes de edad existe una respuesta al proceso hipomielinizante, incrementando CXCR4 para promover el proceso de remielinización. Sin embargo en edades adultas, existe un decremento de CXCR4 y NGF, manteniéndose el estado desmielinizante y neurodegenerativo en la rata *taiep*, que se ve exacerbado por la disrupción de la barrera hematoencefálica debido al incremento de VEGF.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades desmielinizantes son aquellas en las que existe un proceso patológico dirigido contra la vaina de mielina, sin duda la enfermedad más estudiada donde se lleva a cabo dicho proceso es la esclerosis múltiple (EM) una enfermedad autoinmune en la que las células inflamatorias que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) contribuyen al daño



en el SNC (sistema nervioso central) destruyendo la vaina de mielina (desmielinización) de las neuronas (1) y en la que el proceso de remielinización no se favorece (2). Se ha descrito que el proceso desmielinizante en estas enfermedades se genera en dos fases 1) la fase de reclutamiento donde las células precursoras de oligodendrocitos OPCs proliferan y migran rápidamente hacia el área desmielinizada y 2) la fase de diferenciación donde las OPCs reclutadas maduran y se unen a los axones restaurando la vaina de mielina (3,4).

Sin embargo para poder estudiar estos mecanismos de forma natural es necesario emplear un modelo, AK Foote y colaboradores en el 2005 proponen a la rata *taiep* como un modelo de EM dicho animal fue obtenido por cruces consanguíneos de una colonia de ratas de la cepa Sprague-Dawley en 1988 en el bioterio del Instituto de Fisiología de la BUAP, presentando una mutación autosómica recesiva. El nombre de esta mutante de mielina es el acrónimo de la primera letra de los síntomas que presenta: temblor (desde los 15 días de edad), ataxia (4 meses), episodios de inmovilidad (5-6 meses), epilepsia y parálisis (a partir de los 7 meses) (5).

La rata *taiep* es un modelo animal que cursa con una desmielinización progresiva en el SNC, no se presenta de la misma forma en todas las regiones cerebrales y está asociada con una acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos que interrumpe el transporte intracelular de las dos proteínas principales del SNC, la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína proteolípídica (PLP) que constituyen aproximadamente el 30% y el 50% de la cantidad total de proteína, respectivamente. Se ha reportado que las proteínas MAG y el PLP se transportan en vesículas a través del retículo endoplásmico y aparato de Golgi para la exportación a diversos dominios de la vaina de mielina y por otra parte MBP y MOBP, implica el transporte anterógrado de los ARNm a lo largo de MTS a destinos en estrecha proximidad a la membrana de mielina donde son posteriormente traducidos (6,7). Se sabe que presenta hipomielinización y desmielinización crónica seguido de problemas en la remielinización, al no haber una respuesta inmunológica capaz de quimioatraer células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) a los sitios con el daño más severo de manera similar a lo observado en la EM, además se ha reportado la presencia de una astrocitosis reactiva siendo una característica común en las enfermedades desmielinizantes (8). Estudios realizados en un modelo murino el cual se infecta de manera intracraneal con la cepa neurotrópica JHM del virus de la hepatitis murina (JHMV) donde células T y macrófagos se acumulan en el SNC y promueven la desmielinización seguida de un proceso de remielinización de los axones han demostrado que la señalización de CXCR4 contribuye a una diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros favoreciendo el proceso remielinizante (9).

Por otro lado en la EM, la ruptura de la BHE seguida de la infiltración de algunos mediadores del sistema inmune periférico favorece el proceso inflamatorio. Tras éstos procesos NGF, que se produce principalmente por los astrocitos y se almacena en la matriz extracelular, puede prevenir la infiltración de patógenos inflamatorios ya que impide la entrada de mastocitos y macrófagos por la BHE (10). Por el contrario se ha demostrado que VEGF-A es expresado por los astrocitos reactivos a través de VEGFR2. VEGF-A interrumpe la expresión de la claudina CLN-5 la cual junto con otras claudinas juega un papel importante en la



formación de la BHE y la ocludina OCLN que regula propiedades de unión de la BHE favoreciendo así la infiltración celular inmune in vivo (1).

En este trabajo se evaluaron los niveles proteicos de CXCR4, NGF y VEGF para conocer la integridad de la BHE en la rata taiep, un modelo de hipomielinización-desmielinización que cursa con una astrocitosis reactiva que pudiera estar desencadenando una infiltración de células del sistema inmunitario exacerbando el daño presentado en esta mutante de mielina y de esta manera poder entender los procesos de daño en esclerosis múltiple.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Metodología

2. PARTE EXPERIMENTAL

Metodología

Manejo de animales: Las ratas taiep y las ratas Sprague-Dawley fueron obtenidas del Bioterio de Instituto de Fisiología, BUAP. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de luz-oscuridad (12-12 h), con encendido de la luz a las 0700 horas a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con alimento y agua ad libitum. Para el cuidado de los animales se siguió la “Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio” de México NOM-062-ZOO-1999 y aprobada por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, cada uno de los procedimientos se realizó evitando el sufrimiento de los animales.

Cuantificación de proteínas totales: Las proteínas totales serán cuantificadas por el método de Sedmak y Grossberg (1977). Las proteínas se cuantificaran en $1 \mu\text{L}$ del homogenizado más $500 \mu\text{L}$ del reactivo azul de Coomassie 0.06 %, llevándolo a 1 mL con agua destilada. El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpect 3000) a 620 nm. La concentración de proteínas fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de albumina de suero bovino (1 a $10 \mu\text{g}$), la cual fue determinada paralelamente al ensayo.

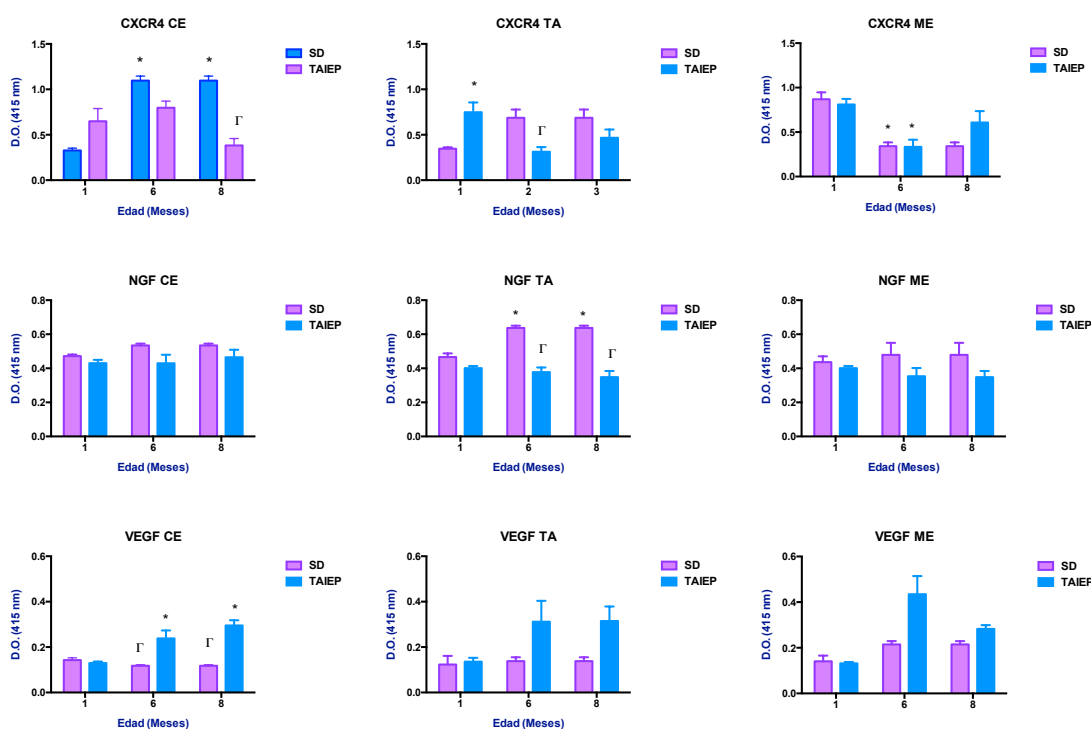
Ensayo inmunoenzimático (ELISA): Se emplean $5 \mu\text{g}$ del homogenizado de proteínas totales de las diferentes muestras se completó a un volumen final de $100 \mu\text{L}$ con buffer de carbonato para sensibilizar las placas de ELISA, y se colocan en cada pozo de la placa durante 16 horas a 4°C . Posteriormente, los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.1%; los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino 0.5% durante 20 min. Inmediatamente se lavó con PBS-Tween 0.1%, y se adicionó el anticuerpo primario para cada proteína durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavó y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, se lavó con PBS-Tween y se le agregó el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbencil-tiazolina-6-sulfónico). Finalmente, la placa se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad Benchmark) a 415 nm.

3. RESULTADOS

Los resultados muestran que el receptor CXCR4 en el cerebelo incrementó a la edad de 6 meses cuando se compara con la edad de 3 meses en la rata control SD, mientras que en la rata taiep se encontró un decremento a la edad de 8 meses, cuando se comparó con la rata SD. En el tallo cerebral, se encontró un incremento de CXCR4 en la rata SD a los 6 meses



de edad, mientras se observó un incremento en la rata taiep al 1 mes de edad. En la médula espinal se observó que en ambas ratas disminuye los niveles proteicos de CXCR4. NGF no mostró diferencia entre ambas ratas en cerebelo y médula espinal, pero en tallo cerebral incrementó en la rata SD desde los 6 meses de edad. VEGF en la rata taiep incrementó a los 6 meses en cerebelo y tallo cerebral. La disminución de CXCR4 en edades tardías podría estar involucrado en el mantenimiento de oligodendrocitos mielinizantes y/o en la migración de células precursoras de oligodendrocitos a los sitios de desmielinización (9). Aunado a esto, la disminución de NGF podría estar asociado a una disminución de la sobrevivencia neuronal, el cual ha sido reportado que incrementa la apoptosis y necrosis con la edad en la rata taiep (11), así como estaría afectado la prevención de la infiltración de células patógenas (10). Por tal motivo, la barrera hematocefálica se ve afectada también con el incremento de VEGF en cerebelo y tallo cerebral desde los 6 meses de edad, cuando se ha reportado que existe la presencia de linfocitos T en el parénquima en la rata taiep (12).



4. CONCLUSIONES

Estos resultados contribuyen a explicar el déficit de factores de remielinización en la rata taiep y factores que contribuyen a la infiltración de células inmunológicas causantes de la desmielinización en las edades adultas.



Bibliografía

1. *Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease.* **Azeb Tadesse Argaw, Linnea Asp, Jingya Zhang, Kristina Navrazhina, Trinh Pham, John N. Mariani, Sean Mahase, Dipankar J. Dutta, Jeremy Seto, Elisabeth G. Kramer, Napoleone Ferrara, Michael V. Sofroniew, and Gareth R. John.** 2012, *The Journal of Clinical Investigation*, pp. 2454-2468.
2. *Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination.* **Blakemore, Foote and.** 2005, *Brain*, pp. 528–539.
3. *Differentiation of proliferated ng2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion.* **Watanabe M, Toyama Y, Nishiyama A.** 2002, *Journal of Neuroscience Research*, pp. 826-836.
4. *Endogenous cell repair of chronic demyelination.* **Armstrong RC, Le TQ, Flint NC, Vana AC, Zhou YX.** 2006, *Journal of Neurological Research*, pp. 245-256.
5. *Selective Myelin Defects in the Anterior Medullary Velum of the taiep Mutant Rat.* **JONATHAN SONG, BRIAN D GOETZ, SARA L KIRVELL, ARTHUR M BUTT IAN DUNCAN.** 2001, *GLIA*, pp. 1-11.
6. *Binding of Microtubules to Transitional Elements in Oligodendrocytes of the Myelin Mutant taiep Rat.* **Eduardo Couve, Juan Francisco Cabello, Juan Krsulovic, and Manuel Roncagliolo.** 1997, *Journal of Neuroscience Research*, pp. 573-581.
7. *Intracellular Distribution of Myelin Protein Gene Products Is Altered in Oligodendrocytes of the taiep Rat.* **Lawrence T. O'Connor, Brian D. Goetz, Eduardo Couve, Jonathan Song, and Ian D. Duncan.** 2000, *Molecular and Cellular Neuroscience*, pp. 396-407.
8. *Regional and temporal progression of reactive astrogliosis in the brain of the myelin mutant taiep rat.* **Bertha A Leon Chavez, Jorge Guevara, Silvia Galindo, Jose Luna, Araceli Ugarte, Olga Villegas, Raul Mena, Jose R. Eguibar, Daniel Martinez-Fong.** 2001, *Brain Research*, pp. 152–155.
9. *CXCR4 Signaling Regulates Remyelination by Endogenous Oligodendrocyte Progenitor Cells in a Viral Model of Demyelination.* **Kevin S. Carbajal, Juan L Miranda, Michelle R Tsukamoto, and Thomas E Lane.** 2011, *GLIA*, pp. 1813–1821.
10. *Targeting NGF-pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases.* **V Colafrancesco, P Villoslada.** 2011, *Archives Italiennes de Biologie*, pp. 183-192.
11. *Nitric oxide production is associated to increased lipoperoxidation and active caspase-3 in demyelinated brain regions of the taiep rat.* **Guadalupe Soto-Rodríguez, Daniel Martínez-Fong, Rosa Arroyo, Patricia Aguilar-Alonso, Hector Rubio, José Ramón Eguibar, Araceli Ugarte, Maricela Torres-Soto, Juan Antonio González-Barrios, Jorge Cebada, Eduardo Brambila, Bertha Alicia Leon-Chavez.** 2012, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, pp. 695-704.
12. *Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the taiep rat during its severe demyelination stage.* **Bertha Alicia Leon-Chavez, Patricia Aguilar-Alonso, Juan Antonio Gonzalez-Barrios, J. Ramón Eguibar, Araceli Ugarte, Eduardo Brambila, Alejandro Ruiz-Arguelles, Daniel Martinez-Fong.** 2006, *Brain Research*, pp. 221-230.