

Inhibición del crecimiento axonal por proteoglicanos de condroitin sulfato en el sistema nervioso central

Néstor Emmanuel Díaz-Martínez,* Iván Velasco*

* Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

***Axonal growth inhibition
by chondroitin sulfate proteoglycans
in the central nervous system***

ABSTRACT

Chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) are components of the extracellular matrix, consisting of peptides chemically attached covalently to chains of glycosaminoglycans. There are 4 families of CSPG including lecticans, which are found mainly in the central nervous system (CNS) of vertebrates. In vitro studies have shown a negative effect of these proteoglycans on axonal growth, mediated by depolymerization of actin filaments in the neuronal cytoskeleton. In some neurodegenerative diseases, and especially after traumatic injuries of adult CNS, there are increased levels of CSPG expression. Axonal growth inhibition by CSPG has been observed also in vivo, and therefore a strategy aimed to counteract the inhibition of axonal growth might lead to new therapies designed to restore neural circuits. There is compelling in vivo evidence that CSPG degradation by Chondroitinase ABC allows both axonal growth and functional recovery in models of injury in the mammalian CNS. These data suggest that manipulation of the response to damage could result in effective ways to promote recovery of nerve functions in neurological disorders that affect humans, such as spinal cord lesions or Parkinson disease.

Key words. *Extracellular matrix. Neurite regeneration. Central nervous system damage. Axonal growth and inhibition.*

INTRODUCCIÓN

Los proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS) son un grupo de glicoproteínas localizadas en la superficie celular y en el espacio extracelular de los tejidos animales. En lo que se refiere a los vertebrados y en específico al sistema nervioso central (SNC), se ha descrito que están involucrados en varios eventos celulares como la migración, la diferenciación, la

RESUMEN

Los proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS) son componentes de la matriz extracelular que químicamente están constituidos por péptidos unidos en forma covalente a cadenas de glicosaminoglicanos. Existen cuatro familias de PGCS y una de ellas, los lecticanos, se localizan principalmente en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados. Estudios *in vitro* han demostrado una participación negativa de los PGCS en el crecimiento neurítico de células en desarrollo, asociada con la despolimerización de filamentos de actina en el citoesqueleto neuronal. Asimismo, se ha observado una expresión incrementada de los PGCS en algunos padecimientos neurodegenerativos, y más consistentemente en lesiones traumáticas del SNC en organismos adultos. Se ha reportado que estos PGCS también inhiben el crecimiento axonal *in vivo*, por lo que el bloquear esta inhibición podría resultar en terapias efectivas dirigidas al reestablecimiento de circuitos neuronales. Existe suficiente evidencia que muestra que la degradación de PGCS con la enzima condroitinasa ABC *in vivo* permite tanto el crecimiento axonal, como la recuperación funcional en modelos de lesión en el SNC de mamíferos. Estos datos permiten pensar que la manipulación de la respuesta al daño puede resultar en formas eficaces de promover la recuperación de funciones nerviosas en padecimientos neurológicos que afectan al humano, como la lesión medular o la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave. Matriz extracelular. Regeneración de neuritas. Daño al sistema nervioso central. Crecimiento e inhibición axonal.

proliferación, el crecimiento axonal y la sinaptogénesis,^{1,2} por lo que desempeñan un papel importante en la morfogénesis, la citoarquitectura y el mantenimiento de este sistema, tanto en etapas tempranas del desarrollo,³ como en el organismo adulto.

El papel fundamental de los PGCS en el SNC se hace evidente en los procesos iniciales del desarrollo en mamíferos, ya que están involucrados en la formación de conexiones específicas y en el estableci-

miento de las sinapsis neuronales para la generación de circuitos nerviosos.^{1,4} Estos PGCS son sintetizados por las neuronas, así como por las células gliales en patrones de expresión espacio-temporal precisos y bien delimitados.^{5,6} Además, los PGCS pueden presentar interacciones con la matriz extracelular (MEC)⁷, teniendo un papel importante durante la histogénesis del SNC. Sin embargo, en el SNC de mamíferos adultos se ha comprobado una escasa capacidad para la regeneración y crecimiento axonal sobre todo en condiciones patológicas. Esta inhibición en el crecimiento está asociada a cambios en la expresión de componentes estructurales de la MEC,⁸⁻¹⁰ con un incremento en la expresión de PGCS delimitando el sitio de lesiones físicas o químicas¹¹ en los organismos adultos, por lo que adquiere importancia analizar el papel de los PGCS después de estímulos dañinos al SNC. En esta revisión hacemos un recuento de las características estructurales de los proteoglicanos (PG), posteriormente describimos el papel que desempeñan los PGCS en la inhibición del crecimiento axonal y presentamos algunas estrategias que son eficaces para remontar dicha inhibición y promueven la regeneración.

MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEOGLICANOS DE CONDROITIN SULFATO

La MEC está compuesta por varios tipos de moléculas, incluyendo factores neurotróficos, moléculas de superficie para la adhesión celular, colágena, fibronectina, laminina, ácido hialurónico y PG entre otros componentes.^{12,13} Los PGCS son un grupo heterogéneo de glicoproteínas que presentan variaciones importantes aún de un tejido a otro en un mismo organismo. Debido a sus características estructurales y funcionales, los PGCS han adquirido un papel primario durante el desarrollo y más tarde como inhibidores de la plasticidad neuronal en el SNC de organismos mamíferos adultos.¹²

Los PG son macromoléculas de elevado peso molecular compuestas de un cuerpo glicoproteico, constituido por péptidos unidos a cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG) mediante enlaces de tipo covalente. Cada cadena de GAG consiste de múltiples unidades de disacáridos arreglados en forma lineal, las cuales están constituidas por una forma del ácido urónico (ya sea ácido glucurónico o ácido idurónico que son estereoisómeros) y otro carbohidrato que puede ser N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina¹⁴ (Figura 1). Las cadenas de disacáridos pueden llegar a secuencias de hasta cientos de uni-

dades de GAG. Por esta razón, existe una gran variabilidad tanto en el tipo de cuerpo proteico que se puede encontrar en un organismo adulto, así como en la composición y el número de las cadenas de GAG que conforman la molécula completa.¹⁵

Estructura de las cadenas de glicosaminoglicanos

Las cadenas de GAG están conformadas por polímeros de hasta 200 repeticiones de disacáridos unidas al cuerpo proteico en el aminoácido serina por medio de uniones tipo azúcar conformadas por xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucurónico. De esta forma, la xilosa se une a la serina del cuerpo proteico y el ácido glucurónico se une al heterodímero específico del GAG.^{16,17}

Estas cadenas de GAG se pueden clasificar de acuerdo con la repetición del disacárido que lo constituye, de esta forma se tienen al condroitin sulfato, que es un disacárido de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina (Figura 1B), el dermatan sulfato que es un ácido idurónico unido a N-acetilgalactosamina, el heparan sulfato que es conformado por un dímero de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina y finalmente el queratan sulfato que es un dímero de galactosa y N-acetilglucosamina.¹⁷

La presencia de grupos sulfatados en las cadenas de GAG y de los PGCS determina que sean moléculas sumamente aniónicas con tendencia a unirse a moléculas catiónicas. Estas interacciones químicas desempeñan un papel muy importante en la formación de grandes agregados moleculares dentro de la MEC.¹⁸ De acuerdo con las propiedades estructurales de los PG, éstos se pueden clasificar en cuatro familias: los hialectanos o lecticanos, los glipicanos, los sindecanos y un grupo IV o misceláneo que por sus características no es incluido dentro de estas tres familias anteriores, por no tener cadenas de GAG unidas al cuerpo proteico.¹⁷

FAMILIAS DE PROTEOGLICANOS

Grupo 1. Lecticanos en el SNC

Los lecticanos, también conocidos como hialectanos, constituyen el grupo de PG más abundantes dentro del SNC, no así para otros tejidos. Muestran una estructura molecular similar a la de todos los PG conformada por una proteína eje con cadenas laterales de GAG de tipo condroitin sulfato (Figura 1). Debido a sus características, la familia de lecticanos

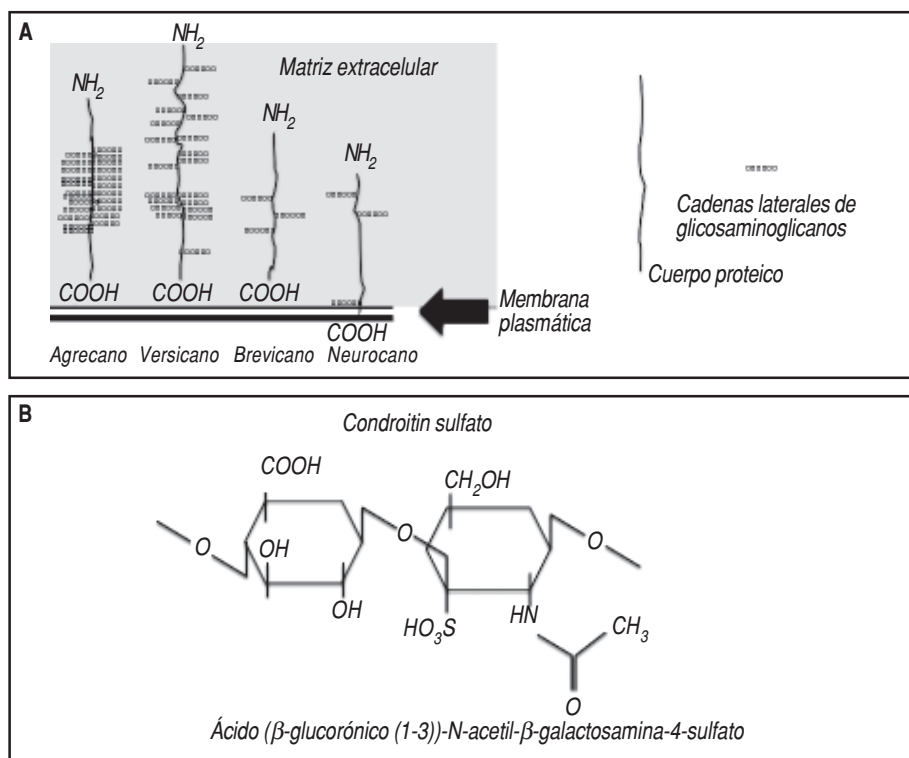


Figura 1. A) Esquema de algunos de los proteoglicanos de condroitin sulfato presentes en el sistema nervioso central de mamíferos, mostrando el extremo carboxilo (COOH) anclado a la membrana celular en el caso del neurocano, mientras que agrecano, brevicano y versicano se localizan en la matriz extracelular (sombreada en gris). Los extremos amino de los péptidos se marcan con NH₂. El cuerpo proteico se representa con una línea y las cadenas de glicosaminoglicanos son representadas con círculos. **B)** Estructura del condroitin sulfato, constituido por ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Modificados de Galtrey y Fawcett (2007)² y Bandtlow y Zimmermann (2000)¹⁷.

sirve como base para describir a todos los PG en general.

El cuerpo proteico está constituido por grandes secuencias de aminoácidos, en donde la unión a cada cadena de GAG se da en el aminoácido serina, además de la presencia de este aminoácido, se requiere de una conformación espacial específica del cuerpo proteico.^{16,19} La síntesis de estas proteínas tiene lugar en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso mediante la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Posteriormente el polipéptido se transportará por el retículo endoplásmico rugoso y llegará al complejo de Golgi mediante vesículas de transición, para que finalmente en los dictiosomas de este complejo, el cuerpo proteico sufra modificaciones específicas, y es a este nivel donde se le unirán las cadenas de azúcares que componen las cadenas de GAG.²⁰

En los lecticanos solubles las interacciones de éstos con otras moléculas de la MEC (tenascinas, hialuronato, etc.) tienen lugar en ambos extremos.²¹ Sin embargo, si la molécula permanece unida a la célula que lo sintetizó (por ejemplo, el neurocano), ya sea neurona o célula glial dependiendo del tipo de PG que se trate, el anclaje se realizará por el extremo carboxilo quedando libre la porción amino terminal que puede relacionarse con otras moléculas de la MEC.

Dentro de esta familia, encontramos al versicano, al neurocano, al agrecano y al brevicano (Figura 1A), todos ellos poseen la característica de que una vez sintetizados por la célula son liberados hacia la MEC.²² El versicano se localiza en la materia blanca del SNC y se relaciona estrechamente con la formación de mielina, ya que es sintetizado por los oligodendrocitos.²³ En los mamíferos, la porción central de la proteína eje del versicano se codifica en dos exones diferentes denominados α y β , que poseen la información de las cadenas de aminoácidos específicas para la unión de aproximadamente de cinco a 20 cadenas de GAG,²² existiendo al menos cuatro isoformas descritas en el ratón (V0, V1, V2 y V3).²⁴

El brevicano posee un dominio central de 300 aminoácidos y al igual que el versicano, es sintetizado por células gliales. El neurocano tiene un cuerpo proteico de 1,257 aminoácidos y un peso molecular de 136 kDa. La región N-terminal de este último está formada por dos dominios de unión al hialuronato, con una porción central no globular de tipo mucina.²² Además de interactuar con el hialuronato, el neurocano puede establecer interacciones con otros tipos de moléculas, principalmente moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM), glicoproteínas axonales y proteínas de adhesión celular como la tenascina R y C.²¹

Una característica importante de este grupo es que presentan patrones de expresión distintos en el

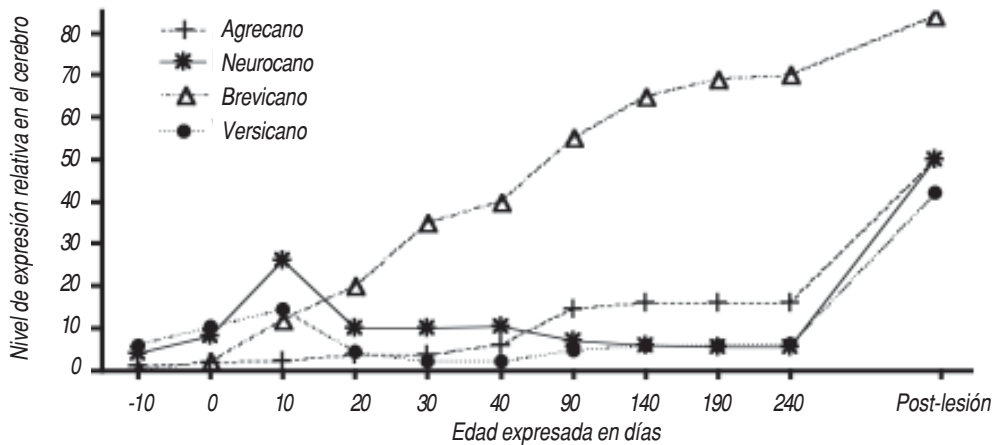


Figura 2. Patrón de expresión de algunos proteoglicanos de condroitin sulfato en el cerebro de rata durante el desarrollo y en el estado adulto. El día -10 representa un estadio embrionario 10 días antes del nacimiento, el valor 0 indica los niveles relativos al nacimiento y los valores positivos (10-240) son los días después del nacimiento. Se representa también la respuesta en la expresión de estos lecticanos después de una lesión. Modificado de Milev et al. (1998)⁵.

SNC. Durante la etapa postnatal de mamíferos, la expresión del neurocano y el versicano tienen un pico que paulatinamente disminuye alrededor del día 20 después del nacimiento, mientras que la expresión del brevicano y del agregcano en ambos casos permanece baja durante la ontogénesis e incrementa en el cerebro adulto.¹² Estos cambios en la expresión de los lecticanos pueden estar asociados con las propiedades biofísicas de la MEC, que pudieran afectar la plasticidad neuronal en el individuo adulto y aún más después del daño, puesto que todos estos PGCS se inducen en el SNC después de una lesión (Figura 2).

Grupos 2 (glicicanos), 3 (sindecanos) y 4 (misceláneo)

Los glicicanos y sindecanos constituyen dos grandes familias de PG cuya principal característica es que ambos presentan cadenas de GAG de tipo heparan sulfato unidas al cuerpo proteico. Sin embargo, poco es sabido acerca de las diferencias funcionales que presentan entre miembros de la familia o incluso entre glicicanos y sindecanos.¹⁷

Los glicicanos se unen a la membrana celular por medio de un anclaje de tipo glicofosfatidilinositol.²⁵ En mamíferos se han aislado por lo menos seis tipos diferentes de glicicanos,²⁶ cada uno con características estructurales bien definidas. El cuerpo proteico, al igual que los hialectanos, posee tres dominios. Otra característica que los separa de otros grupos es que la proteína eje de los glicicanos posee 14 aminoácidos cisteína. Estos aminoácidos forman puentes disulfuro entre cisteínas consecutivas, lo cual determina que el cuerpo proteico tenga una conformación estructural plegada y compacta.²⁷ Por otro lado,

los sindecanos se caracterizan por tener un cuerpo proteico con dominios transmembranales formados por 34 aminoácidos. Además poseen el dominio extracitoplasmático (ectodominio) y el dominio intracitoplasmático.²⁸ Estos sindecanos, al ser pobres en residuos de cisteína, no tienen la capacidad de formar puentes de disulfuro y, por lo tanto, se pueden extender a mayores distancias desde la superficie celular al espacio extracelular, al contrario que los glicicanos, cuya conformación es plegada.^{29,30}

El grupo 4 de PG presenta una gran variabilidad estructural y conformacional basada en el hecho de que pueden tener un cuerpo proteico con características muy distintas en comparación con los tres grupos anteriores, y que en general no presentan cadenas de GAG. Los miembros de este grupo pueden permanecer unidos a la membrana celular o pueden liberarse al espacio extracelular.¹⁷ Un PG de este grupo es el receptor tipo fosfatasa de tirosina beta (RPTP β), del cual se conocen tres isoformas diferentes. Dos de estas proteínas se comportan como ejes para el anclaje de cadenas de tipo condroitin sulfato, mientras que la tercera carece de lugares de unión de cadenas de GAG, siendo ésta una razón suficiente por la cual no puedan ser considerados dentro de las tres familias de PG anteriormente descritas. Una variante del RPTP β es denominada fosfocano; este PG contiene casi toda la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular, incluyendo los sitios de unión para las cadenas de GAG.^{3,31}

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO AXONAL POR PGCS

A continuación se describen ejemplos específicos de cómo los PGCS interfieren con la regeneración axonal y algunas estrategias para contrarrestar es-

tos efectos inhibitorios. La respuesta del SNC al daño neuronal resulta en la proliferación y migración de astrocitos hacia el sitio de lesión, formando una cicatriz glial que contiene en gran proporción moléculas de PGCS, las cuales impiden el crecimiento y la regeneración axonal.³² Particularmente neurocano, versicano y brevicano son sobre-expresados por astrocitos, células precursoras de oligodendrocitos, y aún por células de las meninges si el daño ocurrió superficialmente. Varios grupos de investigación han demostrado el papel que desempeñan las cadenas sulfatadas de GAG o el cuerpo proteico de los PGCS como inhibidores del crecimiento axonal. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta inhibición se presenta no está completamente comprendido.

Se ha sugerido que la inhibición sucede mediante la activación de proteínas pequeñas del tipo GTPasas Rho que reconocen PGCS, bloqueando la polimerización de filamentos de actina en neuritas en crecimiento o en regeneración. Además, las cadenas de GAG presentan una alta capacidad para unirse con otras moléculas inhibitorias del crecimiento axonal. Entre ellas destacan las glicoproteínas asociadas a mielina (MAG), glicoproteínas de mielina en oligodendrocitos (OMgp), la proteína NOGO y su receptor NOGO-66, la semaforina transmembranal 4D, así como la efrina B3.³³ Todas estas proteínas se encuentran directamente en sitios de lesión y poseen en común la activación de la vía RhoA-ROCK mediante sus receptores neuronales, para interrumpir el crecimiento axonal, un mecanismo que aparentemente también presentan los PG.^{34,35} Dada la complejidad de las moléculas de PGCS, se cree que existen varias formas en las que pueden actuar inhibiendo el crecimiento de axones y neuritas. A continuación se darán algunos ejemplos del papel que desempeñan los PGCS en este tipo de acciones.

Estudios *in vitro*

Para determinar la expresión de los PGCS y si el papel que desempeñan durante el desarrollo del SNC es similar al observado en adultos después de la lesión, se han realizado los siguientes estudios: se comparó el crecimiento axonal de cultivos provenientes de tejido embrionario hipocampal de rata, en la presencia de PGCS obtenidos de tejido neonatal y de adulto lesionado con ácido kaínico. En el cerebro postnatal se encontró un PG que tenía un cuerpo proteico similar al de un PGCS inhibidor del crecimiento identificado en adultos después de la lesión. Mas aun, los cultivos de neuronas incubados con el PG proveniente de ratas perinatales mostraron una

menor cantidad de proyecciones en comparación con la condición que no tenía PGCS (grupo control), mientras que en las neuronas cultivadas con el tejido adulto no se observó crecimiento axonal. Este bloqueo se revirtió al incubar estos PGCS con anticuerpos monoclonales en el grupo de tejido postnatal y el crecimiento neuronal se reestableció de manera muy similar al grupo control,³⁶ lo cual indica que estos PGCS son los responsables directos de la inhibición del crecimiento de las neuritas y que estos componentes se encuentran tanto en el desarrollo como en SNC adulto. En otros estudios, al co-cultivar células provenientes de tejido cerebelar al día 4-5 postnacimiento en presencia de PGCS, los procesos dendríticos crecieron en dirección lineal evitando el contacto con la forma purificada del neurocano, evidenciando el papel que desempeñan en la repulsión axonal.³⁷

Por otra parte, en estudios realizados con proteínas de la MEC, se ha demostrado que las NCAM promueven la adhesión celular y la migración, lo cual, a su vez, favorece la proyección dendrítica.^{15,38,39} Sin embargo, en neuronas obtenidas del cerebro embrionario de pollo que fueron cultivadas en superficies previamente cubiertas con NCAM y adicionados con la forma soluble de neurocano, las neuronas no extendieron sus proyecciones, como lo hicieron en la condición control. De igual forma, el grupo del Dr. Peter Milev, utilizando células de médula espinal embrionaria y de cerebelo de ratas neonatales cultivadas con el PG fosfocano, observaron un efecto similar al no permitirse el crecimiento dendrítico de los cultivos.^{15,39} Estos resultados muestran un papel inhibitorio del neurocano y fosfocano al interferir en el crecimiento de neuritas asociado a la unión de moléculas de adhesión celular.

También se ha demostrado que la glía reactiva crea una barrera que impide el crecimiento axonal en lesiones del sistema nervioso,⁴⁰ por lo que se determinaron los efectos de los PGCS y la tenascinas en este fenómeno. Gates *et al.* reportaron un incremento en la expresión de PGCS alrededor del sitio del implante de células provenientes del mesencéfalo ventral fetal en rebanadas obtenidas del SNC de ratones previamente lesionados en el neostriado, con un pico máximo de expresión al día 3-4 post-lesión, sugiriendo que la presencia de tenascina y los PGCS podrían favorecer la unión del tejido mesencefálico implantado en las rebanadas de cerebro. Sin embargo, la expresión de estas moléculas tiene también un efecto negativo en el crecimiento de neuritas, ya que en donde no se observó la expresión de PGCS hubo una mayor proyección dendrítica.⁴¹

Para tratar de revertir la inhibición del crecimiento axonal debida a la presencia de PGCS, se han utilizado varias estrategias de manera experimental, destacando entre ellas la digestión enzimática de los PGCS y la inhibición de la síntesis de su cuerpo proteico mediante ácido ribonucleico (ARN) de interferencia; en este último caso, los ARN inhibitorios decrementan la traducción del factor polimerizante de condroitina, enzima necesaria para la adición de GAG en la biosíntesis de PGCS. Utilizando la línea celular astrocítica Neu7 y astrocitos primarios de ratón, se obtuvieron reducciones de hasta un 70% en los niveles de ARN mensajero en ambas condiciones, lo que resultó en la disminución de los niveles de proteína del factor polimerizante de condroitina y una cantidad significativamente menor de PGCS con cadenas de GAG secretados al medio donde fueron cultivadas estas células. De esta forma, se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento axonal de neuronas granulares de cerebelo de ratón, las cuales fueron cultivadas en presencia del medio condicionado de células con o sin el ARN de interferencia. Estos autores demostraron que la trasfección con el ARN de interferencia disminuyó la actividad inhibitoria en el crecimiento axonal asociada a los PGCS en comparación con el grupo control.⁴²

Otras estrategias plantean la degradación de PGCS mediante la adición de la enzima condroitinasa ABC (ChABC), enzima que rompe los enlaces glucosídicos de las cadenas de GAG entre la N-acetilglucosamina y el ácido urónico de tipo condroitin sulfato. La acción de esta enzima será discutida en la próxima sección de esta revisión.

Estudios *in vivo*

En años recientes se ha llevado a cabo el trasplante de células provenientes del ganglio de la raíz dorsal de la región lumbar y cervical de ratas adultas en el cuerpo caloso de roedores mediante una técnica de microtrasplante estereotáxico que reduce al mínimo la formación de la cicatriz glial. La técnica consiste en inyectar muy lentamente la suspensión celular a través de una micropipeta con un diámetro externo e interno de 90 y 70 micras, respectivamente. En este estudio se observó que las neuronas implantadas podían extender sus axones hacia la sustancia blanca en el sitio donde no había inmunoreactividad para PGCS. Sin embargo, cuando las neuronas injertadas se encontraban rodeadas por una región rica en moléculas de PGCS había detenimiento en el crecimiento de los axones. El marcaje contra la proteína glial fibrilar ácida mostró que la

presencia de PGCS se localizó en el sitio de la microlesión, al igual que los astrocitos reactivos.⁴³ Años más tarde, este mismo grupo demostró que cuando neuronas sensoriales provenientes de un ratón transgénico que expresaba la proteína verde fluorescente de manera constitutiva se trasplantaban unos milímetros adelante o atrás a una zona previamente lesionada en la región cervical de la médula espinal de ratas adultas, la regeneración de los axones era robusta y permitía el crecimiento en ambas direcciones, pero permaneciendo libre del contacto con PGCS,⁴⁴ sugiriendo fuertemente el papel inhibitorio de estas moléculas sobre el crecimiento axonal, que se presenta de manera localizada en el sitio del daño mecánico en el caso del SNC.

En otro estudio, cuando se realizaron cortes de 5 milímetros con una fina cuchilla insertada estereotáxicamente de manera unilateral en la corteza cerebral de ratas adultas, se observó un incremento, después de siete días, en la expresión de neurocano confirmado mediante técnicas inmunocitoquímicas y mediante extractos de PGCS de cerebros que fueron lesionados y de animales intactos, teniendo un incremento significativo en los animales que recibieron un daño previo al estudio, mediante la técnica *Western blot*.³⁷ Asimismo, se han determinado los niveles de ARN mensajero y proteína del neurocano y brevicano en un modelo *in vivo* de gliosis reactiva, el cual consiste en implantar una pieza de nitrocelulosa en la corteza cerebral de ratas adultas, lo cual genera un infiltrado de astrocitos reactivos que se mantuvo de manera crónica en el sitio del implante, evidenciado por la presencia de la proteína glial fibrilar ácida. Treinta días después de la implantación fueron detectados, mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, los PGCS en el sitio de lesión y usando RT-PCR se determinó la cantidad de ARN mensajero en el mismo sitio. Esta expresión fue mayor en el tejido con la cicatriz glial al compararse con adultos sin lesionar y con cultivos de astrocitos. Los autores encontraron que la expresión específica de los PGCS persiste después del daño cortical y en particular el neurocano es sobrerregulado por la presencia de astrocitos reactivos, sugiriendo que estos PGCS pueden contribuir a la escasa regeneración axonal después del daño en el SNC.⁴⁵

Por otra parte, Moon *et al.* realizaron un corte estereotáxico de los axones que comunican la *substantia nigra pars compacta* con el estriado con una cuchilla en ratas adultas, canulando transcranealmente para permitir infusiones repetidas cercanas al sitio de la lesión durante 10 días de solución salina sola, o conteniendo hialuronidasa. Al onceavo día

después del tratamiento, se observó en el grupo control un incremento en la expresión de neurocano y versicano que impidió el crecimiento axonal de las neuronas dopaminérgicas que conforman esta vía nigro-estriatal. Sin embargo, mediante la infusión *in situ* de la enzima hialuronidasa, que degrada al ácido hialurónico, pudieron observar extensiones dopaminérgicas creciendo hasta 800 μm delante del sitio de la transacción, atravesando la cicatriz glial. En paralelo, hubo una disminución en la expresión de los PG en comparación con el grupo que únicamente recibió solución salina.⁴⁶ Sin embargo, la digestión parcial de hialuronato y la concomitante disminución de PG sostuvo la respuesta de crecimiento axonal únicamente en los sitios carentes de PG. Cabe resaltar que el ácido hialurónico, a diferencia de los glicosaminoglicanos presenta azúcares de tipo no sulfatados, y al no estar asociado a proteínas, no forma un proteoglicano como tal.

Todos estos estudios coinciden en el incremento de la expresión de PGCS en el sitio de lesión, hallazgo de particular interés debido a que tanto el cuerpo proteico como las cadenas de glicosaminoglicanos están implicados en la inhibición del crecimiento axonal,⁴⁰ además de bloquear la respuesta regenerativa de las neuronas en el caso del SNC de organismos adultos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos hechos permiten pensar que la inactivación farmacológica o la degradación de PGCS presentes en la cicatriz glial después de una lesión o padecimiento neurológico pudiera detener su acción inhibitoria sobre la regeneración axonal, ya que en lesiones medulares y traumatismos craneoencefálicos uno de los principales problemas es la incapacidad de los axones para crecer después de ser seccionados. Además de que los PGCS se asocian con lesiones agudas en el cerebro, también existen evidencias que muestran un aumento de PGCS en diversas patologías del SNC. Algunos procesos neurodegenerativos cursan con la sobreexpresión de PGCS. Tal es el caso de la esclerosis hipocámpal, el hallazgo patológico más frecuente en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial, la cual está asociada con pérdida de neuronas, gliosis reactiva y crecimiento aberrante en las proyecciones. En pacientes con esta alteración se han observado incrementos significativos en el contenido de PGCS al analizar el tejido proveniente de lobectomías.^{2,47} En la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado la deposición de PGCS con la proteína beta amiloide, lo cual pudiera reflejar una interacción en este proceso neurodegenerativo.^{2,48} También se ha observado que los PGCS co-localizan con los corpúsculos de Lewy presentes

en las neuronas pigmentadas de la *sustancia nigra pars compacta* en pacientes con la enfermedad de Parkinson.⁴⁹ Sin embargo, no se ha establecido una relación causal entre los PGCS y la muerte neuronal de este grupo específico de neuronas.

De forma experimental se ha tratado de eliminar la inhibición del crecimiento axonal mediada por los PGCS mediante la utilización de enzimas como la hialuronidasa, la heparitinasa y la condroitinasa. Esta última ha demostrado tener mejores resultados al ser utilizada en modelos animales de regeneración axonal, razón por la cual actualmente es la enzima más utilizada e investigada en relación con la inhibición del crecimiento relacionada con la sobreexpresión de PGCS.

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL CON CONDRITINASA ABC PARA ABATIR LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO AXONAL DEBIDA A PGCS

Se ha demostrado que la degradación de los PGCS mediante enzimas específicas puede recuperar parcialmente la plasticidad del tejido, tanto de neonatos como de adultos. De esta forma, Mingorance *et al.*, al cortar los axones entorrino-hipocámpales en rebanadas de cerebros de ratones neonatos, demostraron la sobreexpresión del neurocano y el versicano mediante inmunocitoquímica e *immunoblot*. La degradación parcial de estos PGCS con la enzima ChABC promovió el crecimiento axonal en los primeros días posteriores a la lesión.⁵⁰

Recientemente se ha reportado la actividad permisiva de la ChABC, ya que la degradación de las cadenas de GAG presentes en los PGCS mediante el tratamiento prolongado con esta enzima disminuye la actividad inhibitoria sobre el crecimiento de axones, lo cual fue demostrado en ratas adultas con lesiones bilaterales en la médula espinal a nivel dorsal, mediante la detección de transporte axonal retrógrado cerca del sitio de lesión e inmunocitoquímica. En los animales tratados con esta enzima, los autores encontraron una extensa inmunorreactividad contra los PGCS parcialmente digeridos; asimismo, los animales tuvieron una marcada recuperación funcional al ser evaluados anatómica, electrofisiológica y conductualmente en comparación con el grupo que sólo recibió la inyección de solución salina en el sitio de lesión. Estos datos correlacionan positivamente la degradación parcial de PGCS y el crecimiento de axones después del daño medular agudo en ratas adultas.^{51,52}

Un efecto similar pudo observarse al inyectar intraventricularmente la enzima ChABC en ratas con

una lesión medular a nivel cervical, teniendo una mejor respuesta al ser evaluadas en pruebas conductuales de marcha y habilidad de miembros torácicos a los 42 días. El tratamiento enzimático se realizó a los dos, cuatro o siete días después del daño. El marcaje axonal anterógrado con amino dextran biotinilado fue más evidente en los animales tratados poco tiempo después de la lesión en comparación con los que fueron tratados una semana después, o los que sólo recibieron la administración de penicilinas (tratamiento enzimático control). Uno de los mayores objetivos de este estudio fue mostrar que la enzima no requería ser aplicada necesariamente en el sitio de la lesión y que el periodo de tiempo en la aplicación del tratamiento es crítico en la recuperación y en el pronóstico de las ratas lesionadas.⁵³

En otra serie de experimentos se realizaron dos microinyecciones intramedulares de ChABC después de una hemilaminectomía cervical en ratas adultas seguida de la aspiración de un cuadrante medular aproximado de 2-3 mm³. Tejido obtenido del nervio tibial de rata fue trasplantado en el sitio de la lesión y fijado con material de sutura absorbible. Dos semanas después los animales fueron anestesiados nuevamente y se les administró un microlitro de ChABC o solución salina de forma rostral y caudal al sitio de lesión y esta administración fue repetida dos y cuatro días después. Para conocer si estas microinyecciones ocasionaban un daño traumático al tejido y de esta forma limitar aún más su efecto terapéutico por parte de la enzima, se realizaron inmunotinciones en el sitio de la inyección contra un marcador de células fagocíticas del sistema inmune en ambas condiciones, revelando una respuesta similar. En los cortes de animales donde se administró la ChABC, la digestión de los PGCS fue mayor en comparación con el grupo inyectado con solución salina, por lo que el siguiente paso fue relacionar si esta digestión era suficiente para permitir el crecimiento axonal en este modelo de lesión medular. Al evaluar histológicamente el sitio del injerto, se encontró que los axones atravesaron la interfase entre el tejido huésped y el injerto hasta por 500 micras en el caso de los animales tratados con la enzima. El efecto permisivo de la degradación fue muy evidente. Sin embargo, no se realizaron pruebas funcionales en estos animales, por lo que la recuperación funcional deberá ser investigada en próximos estudios.⁵⁴

Por otra parte, para determinar los efectos de una sola administración de ChABC, se utilizaron ratas lesionadas de la vía nigro-estriatal mediante el corte estereotáxico con una cuchilla fina, al tiempo que se infundieron 0.15 unidades de la enzima ChABC o la

cantidad equivalente de penicilinas en el caso de los controles. Para determinar si la administración de la condroitinasa era capaz de degradar los PGCS en el sitio de lesión, se realizaron inmunocitoquímicas contra la forma parcialmente digerida de los PGCS, teniendo como resultado la ausencia en los animales que recibieron la penicilinas y una expresión incrementada en los tratados con la condroitinasa. Paralelamente a estos resultados, la señal debida al anticuerpo que reconoce la forma intacta de los PGCS fue disminuida en el caso de la ChABC, pero no en los controles. Esta degradación fue confirmada por *Western blot* en extractos de tejido próximos a la lesión. Además, para validar la lesión y determinar si la inyección de condroitinasa era suficiente para promover el crecimiento axonal dopaminérgico, se realizaron inmunotinciones contra tirosina hidroxilasa (TH) evidenciando el paso de 2,123 axones positivos a TH cruzando el sitio de lesión. En contraste, menos de 100 axones fueron hallados en el caso de la penicilinas después de 28 días. Para determinar si la enzima tenía actividad *ex vivo* después de tres, siete y 10 días, se utilizaron discos de poliacrilamida conteniendo 7.5 µg de PGCS, a los cuales se les incubó con un homogeneizado de tejido proveniente del sitio de lesión tratado con ChABC. En este ensayo, la degradación de PGCS se observó en todas las condiciones de administración de ChABC, al contrario de los discos incubados con homogeneizados de animales tratados con penicilinas, en los cuales no se observó esta actividad. Estos resultados sugieren que la actividad enzimática de la ChABC está presente hasta por 10 días y esta actividad es suficiente en este modelo para disminuir el nivel de expresión de los PGCS hasta por 28 días, lo que permitió el paso de axones positivos a TH en el sitio de lesión.⁵⁵

Todos estos datos sugieren que la sobre-expresión de los PGCS en el sitio de lesión desempeña un freno importante para la regeneración axonal. La principal consecuencia de esta interrupción del crecimiento neurítico es que se imposibilita la plasticidad anatómica requerida para una correcta recuperación de la función fisiológica de las neuronas involucradas. Resulta interesante que una disminución de los PGCS tenga un efecto benéfico sobre los axones para atravesar la cicatriz glial, lo cual podría ser utilizado para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades o procesos patológicos que involucran la interrupción axonal ocasionados por traumatismos físicos en la médula espinal o el cerebro, o bien por una denervación asociada a procesos degenerativos como las enfermedades de Alzheimer o Parkinson.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo en nuestro laboratorio es financiado por la UNAM, el Conacyt, la Fundación Alemán y los *National Institutes of Health*. N.E. D.-M. es becario del Conacyt.

REFERENCIAS

1. Schwartz NB, Domowicz M. Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* 2004; 21: 329-41.
2. Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 2007; 54: 1-18.
3. Oohira A, Matsui F, Tokita Y, et al. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374: 24-34.
4. Rauch U. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 656-60.
5. Milev P, Maurel P, Chiba A, et al. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 207-12.
6. Melendez-Vasquez C, Carey DJ, Zanazzi G, et al. Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia* 2005; 52: 301-08.
7. Cattaruzza S, Perris R. Approaching the proteoglycome: molecular interactions of proteoglycans and their functional output. *Macromol Biosci* 2006; 6: 667-80.
8. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 703-13.
9. Matsui F, Kakizawa H, Nishizuka M, et al. Changes in the amounts of chondroitin sulfate proteoglycans in rat brain after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* 2005; 81: 837-45.
10. Polito A, Reynolds R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 2005; 207: 707-16.
11. Properzi F, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 335-6.
12. Viapiano MS, Matthews RT. From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med* 2006; 12: 488-96.
13. Ruoslahti E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 1996; 6: 489-92.
14. Rhodes KE, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 2004; 204: 33-48.
15. Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, et al. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1994; 125: 669-80.
16. Aono S, Tokita Y, Shuo T, et al. Glycosylation site for chondroitin sulfate on the neural part-time proteoglycan, neuroglycan C. *J Biol Chem* 2004; 279: 46536-41.
17. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 2000; 80: 1267-90.
18. Engel M, Maurel P, Margolis RU, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol* 1996; 366: 34-43.
19. Bourdon MA, Krusius T, Campbell S, et al. Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 3194-8.
20. Sundblad G, Holojda S, Roux L, et al. Sulfated N-linked oligosaccharides in mammalian cells. II. Identification of glycosaminoglycan-like chains attached to complex-type glycans. *J Biol Chem* 1988; 263: 8890-6.
21. Grumet M, Milev P, Sakurai T, et al. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol Chem* 1994; 269: 12142-6.
22. Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 276-89.
23. Hagihara K, Miura R, Kosaki R, et al. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 410: 256-64.
24. Rahmani M, Wong BW, Ang L, et al. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 77-92.
25. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001; 108: 497-501.
26. De Cat B, David G. Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 117-25.
27. Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev Biol* 1997; 190: 78-93.
28. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 1997; 327(Pt. 1): 1-16.
29. Rapraeger AC, Ott VL. Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 620-8.
30. Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J* 1999; 13(Suppl.): S91-S100.
31. Maurel P, Rauch U, Flad M, et al. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2512-16.
32. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 146-56.
33. Fawcett JW. Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma* 2006; 23: 371-83.
34. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 387-98.
35. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 617-627.
36. Fernaud-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. A neurite outgrowth-inhibitory proteoglycan expressed during development is similar to that isolated from adult brain after isomorphous injury. *J Neurobiol* 1998; 36: 16-29.
37. Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 2000; 20: 2427-38.
38. Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 565-95.
39. Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, et al. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1994; 127: 1703-15.
40. Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 120-7.
41. Gates MA, Fillmore H, Steindler DA. Chondroitin sulfate proteoglycan and tenascin in the wounded adult mouse neostri-

- tum in vitro: dopamine neuron attachment and process outgrowth. *J Neurosci* 1996; 16: 8005-18.
42. Laabs TL, Wang H, Katagiri Y, et al. Inhibiting glycosaminoglycan chain polymerization decreases the inhibitory activity of astrocyte-derived chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 2007; 27: 14494-501.
 43. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, et al. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 1997; 390: 680-3.
 44. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, et al. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1999; 19: 5810-22.
 45. McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 1999; 19: 10778-88.
 46. Moon LD, Asher RA, Fawcett JW. Limited growth of severed CNS axons after treatment of adult rat brain with hyaluronidase. *J Neurosci Res* 2003; 71: 23-37.
 47. Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, et al. Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull* 2002; 58: 509-16.
 48. DeWitt DA, Silver J, Canning DR, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1993; 121: 149-52.
 49. DeWitt DA, Richey PL, Praprotnik D, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans are a common component of neuronal inclusions and astrocytic reaction in neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1994; 656: 205-9.
 50. Mingorance A, Sole M, Muneton V, et al. Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling. *Faseb J* 2006; 20: 491-3.
 51. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002; 416: 636-40.
 52. Barritt AW, Davies M, Marchand F, et al. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26: 10856-67.
 53. Garcia-Alias G, Lin R, Akrimi SF, et al. Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008; 210: 331-8.
 54. Tom VJ, Houle JD. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp Neurol* 2008; 211: 315-19.
 55. Lin R, Kwok JC, Crespo D, et al. Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem* 2008; 104: 400-08.

Reimpresos:

M. en C. Néstor Emmanuel Díaz-Martínez
 Instituto de Fisiología Celular,
 Universidad Nacional Autónoma de México
 AP 70-253,
 04510, México, D.F.

*Recibido el 17 de abril de 2008.
 Aceptado el 22 de enero de 2009.*