

**Regulació de la producció de gelatinases
(MMP2 i MMP9) pels limfòcits.
Implicació en malalties inflamatòries i
síndromes limfoproliferatives**

Tesi presentada per

Marta Segarra Blasco

per a optar al grau de Doctora en Bioquímica

per la Universitat de Barcelona

Tesi dirigida per la Dra. Ma. Cinta Cid Xutglà

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona, IDIBAPS

Barcelona, Març 2006

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) són uns enzims de gran rellevància biològica en totes les accions relacionades amb la reorganització de la matriu extracel·lular i també en la regulació de molts processos cel·lulars.

Els limfòcits produeixen petites quantitats de gelatinases (MMP2 i MMP9) que són essencials en la migració a través dels teixits, tant en situacions fisiològiques com en els fenòmens patològics d'inflamació i disseminació tumoral.

Diverses citocines i factors de creixement són capaços d'induir la producció de gelatinases pels limfòcits, especialment MMP9. Prèviament, vam poder demostrar (Esparza et al., 1999) que la interacció amb proteïnes de la matriu extracel·lular a través de receptors integrina era un dels mecanismes més efectius no només en la producció sinó també en l'activació de gelatinases en cèl·lules limfòides T. No obstant, els mecanismes que modulen la producció de MMPs a través d'integrines en els limfòcits no estaven identificats. En el conjunt d'aquests treballs hem volgut aprofundir en diferents aspectes de la producció de gelatinases pels limfòcits derivada del contacte cel·lular. Primerament hem estudiat les vies de transducció de senyals involucrades en aquest procés i després hem analitzat les seves implicacions en dos processos fisiopatològics que tenen un vincle important amb el microentorn matricial: una malaltia inflamatòria (arteritis de cèl·lules gegants) i una patologia neoplàsica (síndromes limfoproliferatives).

En el nostre primer treball, Dual Function of Focal Adhesion Kinase in Regulating Integrin-Induced MMP2 and MMP9 Release by Human T Lymphoid Cells, ens hem proposat definir algunes de les vies de la senyalització a través d'integrines que condueixen a la producció de gelatinases pels limfòcits. Ja que la majoria de treballs versats en la transducció de senyals promogudes per integrines estaven realitzats en

fibroblasts, hem partit dels coneixements recollits sobre la senyalització en aquestes cèl·lules com a origen d'aquesta exploració.

A partir de la disrupció de diferents vies de senyalització amb inhibidors específics hem pogut concloure que la secreció de gelatinases en resposta a les senyals promogudes per la unió de fibronectina a receptors integrina de la superfície dels limfòcits estan regulades positivament per Src tirosina cinases i JNK MAPK, i modulades negativament per ERK MAPK i PI3K. L'acció bimodal de les MAPK es fa palesa amb la dosi resposta a la curcumina: a dosis inhibidores de JNK redueix la producció de MMPs, mentre que a dosis superiors bloquejants de ERK MAPK augmenta la secreció de gelatinases. La relació de JNK amb la producció de MMPs ha estat demostrada en altres sistemes i de fet els efectes de la seva inhibició han estat provats en models experimentals d'artritis (Han et al., 2001). En canvi ERK té un comportament dissociat a nivell transcripcional i post-transcripcional. Aquest fet podria indicar que aquesta senyal no només influencia la transcripció gènica sinó que també juga un paper en altres fenòmens cel·lulars relacionats amb la secreció de gelatinases, com és el control de la dinàmica del citoesquelet per afavorir la migració. La senyalització a través de ERK ha estat relacionada amb la fosforilació de MLCK (Klemke et al., 1997), la qual regula l'organització de les fibres d'actina, i amb la dissolució de l'adhesió en el front posterior de la migració cel·lular (Glading et al., 2001).

Hem observat que FAK, eix central en la regulació de la senyalització per integrines, és crucial en la inducció de la producció, alliberament i activació de MMPs en la línia cel·lular T Jurkat i en limfòcits T primaris. En concordança, la transfecció de FAK a cèl·lules limfòides T incrementa la seva invasivitat, la qual és dependent de la producció de gelatinases. Alguns treballs realitzats en altres sistemes havien implicat a FAK amb l'increment de la producció de MMPs (Sein et al., 2000; Zhang et al., 2005). El nostre estudi suporta aquestes troballes i a més l'augment de gelatinases en

resposta a la fibronectina s'apropa més al context biològic de processos fisiològics i trastorns immunopatològics.

A més hem discernit que la capacitat adaptadora de FAK, i no la seva activitat catalítica, és l'element primordial en la seva contribució a la regulació de les gelatinases induïda per la unió a fibronectina. El fet que l'activitat cinasa íntinseca de FAK sigui prescindible per a la producció de gelatinases podria indicar que aquesta pot estar compensada pel reclutament d'altres proteïnes amb acció tirosina cinasa. D'entre les molècules associades a FAK destaca Lck, una proteïna tirosina-cinasa de la família Src característica de limfòcits. Hem demostrat per mitjà de diferents aproximacions experimentals el requeriment de Lck, i la seva interacció amb FAK, per a la producció de gelatinases. De la mateixa manera que FAK, la sobreexpressió de Src s'associa a un increment de la invasió i metàstasi en diferents càncers (Irby et al., 1999; Slack et al., 2001). Durant el transcurs de la nostra investigació han aparegut alguns treballs que també relacionen la producció de MMPs amb les vies de senyalització associades al complex FAK/Src. En concret Hsia *et al.* (Hsia et al., 2003), demostraven que la infecció viral amb v-Src a fibroblasts *fak*^{-/-} era suficient per recuperar la motilitat en aquestes cèl·lules però es necessitava la reexpressió de FAK per augmentar la seva capacitat invasiva i la producció de gelatinases en aquestes cèl·lules. El nostre treball altrament indica que la interacció de FAK amb Lck endògena regula la producció de gelatinases pels limfòcits en resposta a la fibronectina en condicions més afins a les fisiològiques.

A partir de mutants truncats de FAK (FRNK i FAT) hem observat que FAK és capaç de transmetre senyals activadores i inhibidores per a la producció de gelatinases induïdes per integrines a través de diferents dominis en la seva estructura. Com hem vist, FRNK i FAT tenen comportaments oposats en la producció de gelatinases induïda per integrines. La regió rica en prolins de FAK, present en FRNK i però absent en FAT, seria la responsable de la repressió de les gelatinases a través

de pCas i ERK. Donat que FRNK no disposa d'activitat catalítica, es requeriria de Src per accomplir aquesta acció. D'acord amb les nostres observacions, Hauck *et al.* (Hauck et al., 2002) van demostrar que FRNK inhibia la producció de MMP2 en fibroblasts transformats amb v-Src. En canvi, curiosament hem vist que FAT, malgrat només comptar amb la seqüència mínima d'unió a les adhesions focals, és capaç d'alliberar més MMPs que la pròpia FAK. Tot i que no hem pogut establir el mecanisme concret d'aquesta acció, és també Src qui intervé en aquest procés. En la mateixa línia, FRNK i FAT també es comporten de forma oposada respecte l'adhesió a la fibronectina. D'una banda aquest fet suscita que les senyals que controlen la producció de gelatinases estarien relacionades amb els mecanismes d'adhesió promoguts per integrines, i d'altra banda aquesta resposta dual dels dominis de FAK suggereix que l'activació mitjançada per integrines de FAK produiria dosis intermitents de gelatinases a la vegada que controlaria el procés cíclic d'adhesions necessari per a la migració. Per tant, la forma completa de FAK, a diferència de FRNK i FAT, acobla de forma eficient la mobilitat a la proteolisi donant lloc a l'augment de la invasió.

Una qüestió que no ha quedat resolta és si FRNK i FAT tenen senyalització pròpia o bé competeixen amb molècules de FAK endògena. Segons altres treballs (Sieg et al., 1999), FRNK actua com a regulador negatiu de FAK competint amb ella per la localització a les adhesions focals. La mutació de FRNK en la leucina 1034 l'incapacita en la unió a paxil·lina. FRNK mutada en la posició 1034 es distribueix citoplasmàticament i no pot inhibir les funcions biològiques de FAK. Nosaltres hem constatat l'expressió endògena de FAK en la línia cel·lular Jurkat, però per esbrinar el mecanisme d'acció concret de FRNK i FAT en el nostre sistema ens caldrien altres mutants d'aquestes formes o bé seria útil emprar tècniques de siRNA (*small interference RNA*) per a abolir l'aportació de FAK endògena.

Un altre punt interessant del nostre treball és que hem demostrat que la unió a fibronectina estimula un procés post-transcripcional d'alliberament ràpid de

gelatinases. Aquest mecanisme provocaria la secreció pulsàtil de gelatinases en entrar en contacte amb la matriu extracel·lular, amb la qual cosa la cèl·lula es serviria d'un àgil mecanisme per interrompre les barreres fisiològiques a mesura que penetra en els teixits. Anteriorment Taraboletti *et al.* (Taraboletti *et al.*, 2002), van observar la presència de vesícules que contenen MMP2 i MMP9 en forma activa i proenzimàtica, juntament amb MMP14, TIMP1 i TIMP2 en cèl·lules endotelials HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*). Aquestes vesícules s'alliberaven ràpidament en ser estimulades amb factors angiogènics, fet que té transcendència funcional en la invasió i l'angiogènesi conduïda per aquestes cèl·lules. En un treball recent en melanocits (Schnaeker *et al.*, 2004), s'ha observat l'acumulació de MMP2 i MMP9 en vesícules intracitoplasmàtiques associades a la xarxa de microtúbuls del citoesquelet i a l'aparell secretor. A més l'ús d'un fàrmac que afecta a l'organització de microtúbuls, paclitaxel, impedeix l'exocitosis de gelatinases i la invasió cel·lular. Si es demostrés la presència d'aquests grànuls en els limfòcits, aquest fet contribuiria a corroborar la hipòtesi de què l'alliberament de gelatinases està lligat a la dinàmica del citoesquelet.

Una altra qüestió a considerar és la senyalització per Rho GTPases i la seva vinculació amb la producció de gelatinases pels limfòcits. Aquesta família de petites GTPases està molt lligada a la regulació del citoesquelet d'actina, i curiosament FAK presenta un domini d'unió a GRAF (inhibidora de Rho) en la segona regió rica en prolines. Seria molt interessant explorar la vinculació d'aquestes molècules amb la producció de gelatinases atès el seu paper rellevant en la reorganització del citoesquelet i en la migració cel·lular.

En resum, l'activació del complex FAK/Src en resposta al contacte amb la matriu extracel·lular modula senyals estimuladores i inhibidores que coordinen l'alliberament de gelatinases adaptades als canvis del citoesquelet necessaris per a la migració dels limfòcits. Aquesta interpretació mecanística es representa en la Figura 18.

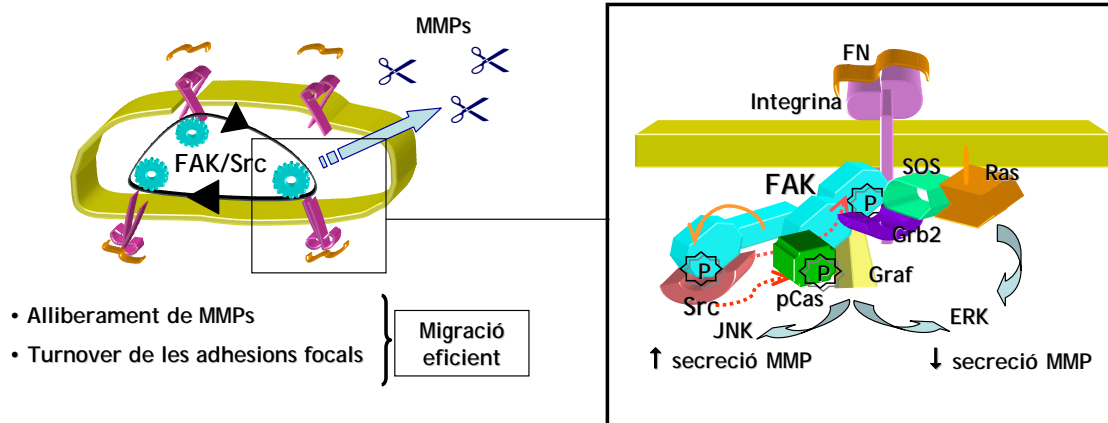


Figura 18. Representació de la secreció de MMPs acoblada al procés de migració coordinada per FAK/Src. La unió a través de receptors integrina a proteïnes de la matriu extracel·lular com fibronectina (FN) augmenta l'adhesió cel·lular i inicia una cascada d'activació de les proteïnes citoplasmàtiques FAK i Src acoblades a la cua intracel·lular de les integrines. Aquest mecanisme conduiria a la reafirmació de l'adhesió al front conductor de la cèl·lula en migració i a un augment de MMPs: FAK es fosforila, recluta a Src i activa a pCas i JNK. Subseqüentment, aquest procés de fosforilació de proteïnes adjacents a FAK continuaria amb l'activació de ERK, la disminució de MMPs i el desacoblament de les adhesions focals amb la conseqüent pèrdua d'adhesió. La coordinació d'aquest procés de forma cíclica afavoriria el fenomen de migració limfocitària. Adaptat de (Segarra et al., 2005).

Dels resultats derivats del primer treball, s'infereix la importància de la senyalització integrina no només en la producció sinó també en l'alliberament i l'activació de les gelatinases i es demostra que l'acció gelatinolítica és necessària per al model d'invasió a través de la membrana basal reconstituïda (Matrigel). Les vies que intervenen en la producció de gelatinases són les mateixes utilitzades en la regulació del citoesquelet la qual cosa ens suggereix que els mecanismes de producció de gelatinases pels limfòcits podrien estar acoblats a la motilitat a través dels teixits, facilitant-ne la invasió.

Conseqüentment, donada l'experiència assolida pel nostre grup en l'arteritis de cèl·lules gegants hem escollit aquesta entitat com a model immunopatològic per explorar l'expressió i activitat de les MMPs en una malaltia inflamatòria: Es postula que els limfòcits s'infiltra en el teixit arterial procedents dels vasos adventicials i en estadis més avançats de l'afectació inflamatòria l'infiltrat, format per limfòcits i macròfags, progressa fins a irrompre en totes les capes de l'artèria. En tot aquest procés la intervenció de les MMPs seria crucial per afavorir la plena invasió tissular.

L'acció de les gelatinases en l'arteritis de cèl·lules gegants sempre s'ha associat amb mecanismes destructius de l'artèria. Però, tal com hem vist en el primer treball, la senyalització a través d'integrines pot coordinar l'alliberament de MMPs amb la migració cel·lular. En aquest segon treball, Gelatinase Expression and Activity in Giant-Cell Arteritis Lesions. Gelatinolytic activity of MMP2 and MMP9 is associated with local co-expression of leukocyte integrins and MMP2-activator MMP14, ens hem plantejat estudiar les MMPs en relació amb els seus possibles inductors (citocines pro-inflamatòries i integrines) per explorar un possible mecanisme inductor de l'acció proteolítica. També hem pretès estudiar la distribució topogràfica de la co-expressió de MMPs i integrines leucocitàries en diferents estadis de la progressió de l'infiltrat inflamatori (des de seccions d'artèria amb només afectació adventicial fins a lesions completament desenvolupades) per observar el fenomen d'invasió limfocitària dirigit per integrines.

Tot i que es presumia el paper de les MMPs en el desenvolupament de la malaltia, els pocs treballs que estudien la presència d'aquests enzims en l'arteritis de cèl·lules gegants parteixen d'un petit nombre de pacients (Sorbi et al., 1996; Tomita and Imakawa, 1998) o bé inclouen pacients tractats amb glucocorticoids (Rodriguez-Pla et al., 2005). En aquest treball hem localitzat la presència de MMP2, MMP9 i MMP14 en un nombre important d'artèries temporals de pacients verges de tractament i hem discernit per Real-Time RT-PCR l'expressió diferencial dels transcrits de MMP9 i

MMP14 en artèries de amb pacients d'arteritis de cèl·lules gegants respecte a artèries normals.

Malgrat s'ha descrit que certes citocines estimulen la producció de MMP9 en limfòcits, no vam poder establir una correlació entre l'expressió de MMPs i entre algunes de les citocines pro-inflamatòries que es detecten els pacients amb arteritis de cèl·lules gegants (IL1 β , IL6 i TNF α) (Hernandez-Rodriguez et al., 2004) ni a nivell immunohistoquímic ni transcripcional, la qual cosa indica que aquestes citocines no són les principals responsables de la inducció de la seva producció. Segons havíem establert en treballs anteriors (Hernandez-Rodriguez et al., 2004), aquestes citocines són les reguladores de la resposta inflamatòria sistèmica que caracteritza els pacients amb aquesta patologia. En canvi, les MMPs mantenen una estreta relació topogràfica amb les integrines leucocitàries, especialment α 4 i α 5. El fet d'estudiar artèries amb diferents graus evolutius del progrés inflamatori ha permès establir una correspondència de les MMPs i les integrines amb concordança amb els fronts invasius dels infiltrats. Una altre aspecte que relaciona les integrines amb les MMPs és l'angiogènesi. α v β 3 és marcador angiogènic validat però degut a l'extensa distribució d'aquesta integrina en el teixit arterial inflammat no vam poder utilitzar-lo per quantificar l'angiogènesi, però hagués estat molt interessant ja que s'ha descrit que la interrupció de la interacció entre MMP2 i α v β 3 suprimeix fortament l'angiogènesi en diferents models animals (Bello et al., 2001; Silletti et al., 2001).

Una de les aportacions diferencials d'aquest treball és l'estudi de l'activitat enzimàtica en les artèries pel mètode de zimografia in situ. Amb aquesta tècnica hem pogut demostrar que les artèries control expressen constitutivament el zimogen de MMP2 i calen altres estímuls per alliberar la seva forma activada. D'altra banda, la expressió concomitant amb el seu activador MMP14 i amb les integrines leucocitàries dóna lloc a la màxima acció gelatinolítica congregada en la zona pròxima a la d'unió de la capa íntima amb la làmina elàstica interna.

Una de les barreres més importants que ha de superar l'infiltrat inflamatori és la làmina elàstica interna, que separa la capa muscular mitja de la zona íntima de l'artèria. Aquesta estructura està formada per polímers d'elastina que mantenen l'estructura dúctil de l'artèria. Les gelatinases posseeixen activitat elastasa (Senior et al., 1991) i com hem vist la seva màxima expressió es localitza principalment en la zona d'intersecció amb la làmina elàstica interna. Aquestes observacions feien suposar que les gelatinases intervenien en la degradació de l'elastina, però no vam poder observar una correlació amb els graus de ruptura de la làmina elàstica i la intensitat d'expressió de les MMPs entre artèries amb extensió similar de l'infiltrat inflamatori. Aquesta manca de connexió suggereix que la regulació de l'activitat enzimàtica és més important que la simple expressió proteica i que possiblement hi ha altres enzims amb activitat elastasa que participen en aquesta acció, com per exemple MMP12. En un treball recent, Rodríguez-Pla *et al.*, s'assumeix que la degradació de la làmina elàstica interna es deguda a l'acció de MMP9 ja que observen la seva expressió en algunes de les artèries positives, les quals presenten majors índexs de degradació de l'elàstica. En aquest treball es troba a faltar una classificació histològica que permeti comparar entre biòpsies d'afectació homòloga, i en aquest cas és possible que també s'hagin considerat en l'estudi artèries amb inflamació adventicial. Segons les nostres observacions, si es té en compte la distribució de l'infiltració limfocitària, les lesions adventicials presenten menys grau de trencament de l'elàstica però també tenen menor expressió de MMPs degut a l'absència d'infiltrat en la zona d'unió amb la làmina elàstica interna.

Un fet peculiar amb relació a la degradació de la làmina elàstica és que el trencament d'aquesta estructura es correspon amb els graus d'hiperplàsia de la íntima. Hi ha treballs que indiquen que els pèptids d'elastina, generats per la seva hidròlisi, estimulen la proliferació de les cèl·lules musculars llises vasculars (Mochizuki et al., 2002) i també aquests pèptids indueixen l'angiogènesi incrementant la migració de

cèl·lules endotelials (Robinet et al., 2005). A més, els ratolins deficientes en el gen de l'elastina moren per causa de l'obstrucció de la llum arterial deguda a la sobreacumulació de la cèl·lules musculars llises subendotelials (Li et al., 1998). Una de les principals complicacions de l'arteritis de cèl·lules gegants són els fenòmens isquèmics causats per l'obliteració de la llum vascular. L'estudi de la preservació d'aquesta estructura vascular i les conseqüències de la seva degradació convida a una exploració més exhaustiva del paper de l'elàstica en aquesta patologia.

Els pacients d'arteritis de cèl·lules gegants responen inicialment de manera satisfactòria al tractament amb glucocorticoids. Segons hem pogut demostrar, els pacients tractats amb glucocorticoids abans de l'escissió de l'artèria temporal presenten menor expressió de MMPs respecte els pacients no tractats. Els glucocorticoids podrien afectar a la producció de MMPs de forma directa per repressió de la seva expressió o bé de forma indirecta inhibint l'activació dels seus inductors. La manca de detecció de MMP9 i MMP2 en un percentatge important de les biòpsies estudiades per Rodríguez-Pla *et al.*, es deuria, al menys en part, a què la gran majoria de les artèries incloses en aquest estudi provenien de pacients tractats.

Molts pacients requereixen tractaments llargs amb glucocorticoids, amb les conseqüents complicacions associades a la perllongació d'aquest tractament. Un dels objectius dels estudis sobre aquesta patologia és l'exploració de noves dianes terapèutiques que millorin l'actual tractament. Del nostre treball es pot concloure que la integrina $\alpha 4$, de la mateixa manera que MMP9 i MMP14, només s'expressa en les artèries patològiques. D'aquesta observació se'n desprèn que una possible teràpia contra la integrina $\alpha 4$ seria beneficiosa per aquests pacients, com ja ha estat demostrat en altres malalties immunològiques. La inhibició de l'extravasació limfocitària a través del bloqueig d'aquesta integrina amb anticossos contra la cadena $\alpha 4$ ha estat validat en diferents malalties inflamatòries com l'esclerosi múltiple, l'artritis reumatoide o la malaltia de Crohn. De fet, l'organització americana Food and Drug

Administration va aprovar al 2004 l'ús d'un anticòs monoclonal humanitzat anti- α 4 (Natalizumab, Tysabri®) per al tractament de l'esclerosi múltiple recidivant (Stacy, 2005). Desgraciadament, la indicació d'aquest tractament s'ha vist qüestionada pel fet que tres dels pacients que seguien aquesta teràpia de forma crònica van patir una leucoencefalopatia multifocal progressiva associada a una infecció vírica. La integrina α 4 té altres papers biològics relacionats amb la generació de la resposta immune i els efectes adversos conseqüents al seu bloqueig podrien estar en relació a una vigilància immunològica deficient (Engelhardt and Briskin, 2005; Gonzalez-Amaro et al., 2005). Per tant, encara que aquesta estratègia terapèutica és molt prometedora cal encara ser cautelós en la seva administració.

A més de la implicació amb la inflamació, la producció de MMPs pels limfòcits té una altra vessant patològica important: la progressió de tumors limfoïdes. Les MMPs tenen un paper cabdal en la progressió tumoral mitjançant múltiples efectes que van més enllà de la simple disrupció proteolítica de les barreres biològiques i que inclouen la regulació de senyals bioactives (factors de creixement, citocines, quimiocines) derivades de la transformació del microentorn tumoral. Les síndromes limfoproliferatives, concretament el mieloma múltiple, necessita de les interaccions amb la matriu estromal per al seu desenvolupament. Com hem vist, les integrines, que són els receptors principals de la matriu extracel·lular, estimulen fortament la producció de MMPs en limfòcits.

La talidomida és un fàrmac amb un passat tràgic pels seus efectes teratogènics (Boylen et al., 1963; Felisati, 1964), però actualment ha ressorgit com una teràpia eficaç per a diferents malalties limfoproliferatives, especialment en el tractament del mieloma múltiple refractari (Singhal et al., 1999). Tot i que se li atribueixen propietats anti-angiogèniques i immunomoduladores, no es coneixen amb exactitud els mecanismes d'acció d'aquest compost.

En el tercer treball, Thalidomide Disrupts Fibronectin-induced Gelatinase Production by Malignant B Lymphoid Cells through Interference with Integrin-mediated Signaling Pathways, hem volgut avaluar si la talidomida causa algun efecte en la producció de gelatinases induïda per fibronectina en diferents línies limfocítiques B.

La interacció amb la proteïna de matriu extracel·lular fibronectina estimula l'expressió de MMP2 i MMP9 en línies limfocítiques d'estirp B. Significativament, la talidomida redueix la producció i activació de gelatinases en resposta a la fibronectina en aquestes línies tumorals, tant a nivell de secreció enzimàtica com transcripcional. Aquest fet respon a un mecanisme fins al moment insòlit per aquest fàrmac i és important dins el context fisiopatològic del mieloma ja que la fibronectina és un constituent important de la matriu extracel·lular del moll de l'os. Curiosament, la talidomida no és eficaç en el tractament de plasmacitomes extramedul·lars (Rosinol et al., 2004), suggerint que els efectes de la talidomida depenen de les interaccions amb el microentorn del moll de l'os i que la senyalització a través d'integrines és necessària per a una resposta adequada a la talidomida. L'expressió i l'activació de MMP14 també es modulen per l'exposició a la talidomida. Ja que MMP14 és el principal activador del zimogen de MMP2, aquest fet podria explicar la concomitant reducció de la producció i l'activació de MMP2.

La talidomida es prescrivia com a tractament sedatiu en els primers mesos d'embaràs, però va haver de ser retirada del mercat perquè tenia efectes teratogènics molt agressius que van afectar a aproximadament 10000 nens en els anys 60. Entre les malformacions fetals derivades del tractament sedatiu amb talidomida s'inclou la degeneració dels braços i les orelles en els nadons. Les MMPs també són essencials en la migració cel·lular durant les etapes de desenvolupament embrionari. Especialment MMP14 és important en el remodelat ossi, i els ratolins *knock-out* de MMP14 presenten greus defectes en la formació óssia i del teixit connectiu (Holmbeck

et al., 1999). La reducció de les MMPs, entre d'altres, podria explicar alguns dels efectes teratogènics de la talidomida.

Com que en el primer dels treballs d'aquest manuscrit hem definit algunes de les vies de transducció de senyals que estaven modulades per les integrines en limfòcits, hem volgut observar quines de les vies de senyalització de la producció de gelatinases s'alteraven per la talidomida. La talidomida reprimeix l'activació de les ERK MAPK, la qual cosa és coherent amb l'efecte transcripcional del fàrmac, en base a què molts dels promotors dels gens de les MMPs estan controlats per factors de transcripció que es troben sota la cascada de senyals de les MAPKs. A més, la talidomida inhibeix l'activació de Src. Com hem demostrat en el primer treball, aquesta via és molt important per a l'increment de l'expressió i de l'alliberament de gelatinases en resposta a la fibronectina. A més, Src és un proto-oncogen que està involucrat en la progressió de molts tumors.

Una altra de les senyals implicades en la producció de les gelatinases és la vehiculitzada per PI3K. Les integrines incrementen l'activació de PI3K (Khwaja et al., 1997) però la seva inhibició mitjançant un inhibidor específic (wortmannin) estimula l'alliberament de gelatinases induïda per fibronectina (Esparza et al., 1999; Segarra et al., 2005). A més l'activació de PI3K ha estat vinculada amb la migració cel·lular (Keely et al., 1997) i la senyalització a través de la via de PI3K/Akt regula moltes altres respostes cel·lulars com la supervivència, la proliferació o el control metabòlic. El tractament de les cèl·lules amb talidomida redueix l'activació de la subunitat reguladora de PI3K (p85) induïda per fibronectina. Un dels principals mediadors de la cascada de senyalització de PI3K és la serina-treonina cinasa Akt. Sorprenentment la talidomida incrementa l'activació de Akt en els dos llocs susceptibles de fosforilació, especialment en el domini catalític (treonina 308). A més, la talidomida augmenta l'activació d'Akt malgrat que PI3K estigui bloquejada per un inhibidor específic (wortmannin). Aquest fet condueix a pensar que la talidomida pot activar a Akt per una via independent de PI3K.

Encara que el model més habitual d'activació de Akt sigui a través de PI3K, altres estudis recents demostren vies alternatives d'activació de Akt a través de PKA regulada per un augment de AMP cíclic (Song et al., 2005). Segons aquests treballs, l'activació de Akt a través de PKA no implica a PI3K i a més aquesta activació de Akt dependent de AMP cíclic és resistent a l'inhibidor wortmannin. Concretament en aquesta via alternativa d'activació de Akt la fosforilació més important és en la treonina 308, tal com nosaltres observem. Donat els nostres resultats seria oportú observar si la talidomida modula la via de AMP cíclic.

Encara que Akt és la principal molècula efectora de PI3K, PI3K pot activar altres senyals de forma independent a Akt que tenen propietats oncogèniques (Vivanco and Sawyers, 2002), com és el cas de les GTPases petites de la família Rho, Cdc42 i Rac, les quals intervenen en processos de migració i motilitat cel·lulars. De manera que la reducció de la capacitat invasiva resultant de la incubació amb talidomida pot deure's també a la disminució de l'activitat PI3K en combinació a l'efecte sobre altres vies igualment implicades en la motilitat cel·lular, com són Src i ERK.

No obstant, ens trobem amb la paradoxa de què l'activació de Akt està estretament associada a la supervivència i la proliferació cel·lular, de manera que les conseqüències del tractament amb talidomida sobre la fosforilació en Akt semblen anar en contra dels efectes anti-tumorals demostrats per aquest fàrmac. Hi ha diverses molècules relacionades amb Akt que es podrien estudiar per explorar la disregulació causada per la talidomida sobre les senyals lligades a Akt. En primer lloc, PTEN és una molècula clau relacionada amb la via PI3K/Akt. PTEN és un agent supressor de tumors i la seva funció està alterada en molts càncers. PTEN és una fosfatasa que és el major regulador negatiu de la via PI3K/Akt perquè defosforila a PIP3 i tal vegada l'efecte de la talidomida sobre l'activació de Akt podria anar associat a una manca d'eficiència en la funcionalitat de PTEN. En segon lloc, es podria mesurar l'estat d'activació d'altres molècules efectores relacionades amb aquesta via que estan

altament implicades en la supervivència (BAD) o el creixement cel·lular (mTOR i p70 S6K).

Com hem vist en el primer treball, l'activació integrina provoca l'alliberament de MMPs coordinades amb canvis en el citoesquelet cel·lular que possibiliten la invasió. De les dues línies utilitzades, Raji (limfoma de Burkitt) presenta capacitat adhesiva a la fibronectina en canvi IM9 (derivada d'una leucèmia de cèl·lules plasmàtiques) no és adherent possiblement degut al seu origen circulant. La talidomida redueix l'adhesió a fibronectina de forma dosi dependent, però aquest efecte no es deu a canvis en l'expressió de les integrines en la superfície dels limfòcits. Aquest fet suggereix que la talidomida podria alterar l'afidésia de les integrines o bé bloquejar mecanismes de recanvi del citoesquelet relacionats amb les vies de senyalització mitjançades per integrines. Significativament, les cèl·lules limfòides Raji tractades amb talidomida no tan sols produeixen menys gelatinases sinó que també tenen reprimida la capacitat invasiva.

Actualment en la teràpia del mieloma s'estan assajant altres fàrmacs anàlegs a la talidomida anomenats genèricament IMiDs: CC-5013 (Revlimid®, Lenalidomide) i CC-4047 (Actimid®). Aquests compostos, que es basen en la modificació estructural de l'anell de talidomida, són més estables i molt més potents en la inhibició de $TNF\alpha$. En concret, CC-5013 és clínicament actiu en pacients resistents a la talidomida i no presenta efectes teratogènics (en models experimentals) i té menys efectes secundaris (Richardson et al., 2002). En canvi, CC-4047 tot i que és molt actiu presenta una gran toxicitat (Schey et al., 2004). En un futur seria interessant explorar l'efecte d'aquestes molècules sobre la producció de MMPs.

Amb el conjunt d'aquests treballs hem contribuït al coneixement sobre el paper i la regulació de les MMPs en processos protagonitzats pels limfòcits, però també hem generat noves preguntes que ens conviden a continuar investigant.