



LES METAL·LOPROTEINASES DE MATRIU EXTRACEL·LULAR EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

Tesi doctoral presentada per

Sònia Solé i Tost

Barcelona, Maig del 2005

La interessada:

SÒNIA SOLÉ I TOST

Vist i plau del tutor:

Dr. JORDI ALBERCH I VIÉ

Professor titular del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Vist i plau de la directora:

Dra. ANNA MARIA PLANAS I OBRADORS

Col·laboradora científica del Departament de Farmacologia i Toxicologia

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

CSIC-IDIBAPS

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Farmacologia i Toxicologia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona del CSIC, dins del projecte FIS (00/0957). Na Sònia Solé i Tost ha gaudit d'una beca predoctoral de l'IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona August Pí i Sunyer) entre els anys 2000-2004.

Agraïments:

Aquest treball ha estat realitzat gràcies a la col·laboració de diverses persones. Voldria expressar el meu agraïment:

Especialment a la Dra. Anna Planas per haver dirigit aquesta tesi, per la seva paciència amb mi i per tot el que m'ha ensenyat. Crec que és una dona molt treballadora a la que li apassiona la seva feina i li desitjo molta sort tant a nivell personal com professional .

Als companys de grup: a la Valérie, a qui he vist tenir dues nenes ben maques (l'Elia i la Cloe) i amb qui he compartit molt bones estones; al Carles, per ajudar-me amb les rates , i als més nous: la Roser , l'Eduardo, l'Abraham i el Santi amb els que m'he rigut molt i als que desitjo que tot els vagi molt bé . Als tècnics del laboratori: el Josep (que ja no hi és) , l'Albert i a la Noelia (que ha pogut comprovar com costen els westerns de l'agrina) .

Als metges que veuen en la investigació una manera d'ajudar als seus pacients. Crec que és molt important que diferents grups de persones col·laborin i aportin diferents punts de vista sobre el mateix tema per avançar en recerca.

Als altres soferts becaris del Departament de Farmacologia i Toxicologia de l'IIBB: la Maria , la Lola, el Gero, la Kamil ...

A les secres: la Juani, la Marta, la Mònica... I a la Montse per les bones estones que hem passat a la cantina.

Als seniors del departament : en especial a la Coral Sanfeliu, al Jou (gran activista del NO A LA GUERRA) i al Dr. Joan Serratosa per estar sempre disposats a donar un cop de mà a tothom . I també a: la Núria de Vera, l'Emili , la Rosa, la Lluïsa, la Carme Solà, el Pablo Garcia de Frutos ...

A tota la gent dels altres departaments (Neuroquímica, Bioanalítica Mèdica, Espectrometria de masses...) que han complementat la meua visió de les neurociències amb la seva bona manera de treballar i la seva simpatia: el Ramon Trullàs, la Lupe Mengod, la Pau, el Paco Artigas, el Sebastià Pons, el Dani Closa... Sobretot a l'Albert Adell, pels seus consells en la microdiàlisi, en la qual n'és un expert. I als seus becaris, amb els que he compartit força estones a la cantina: la Vicky, el Llorenç, la Letícia, l'Emma, l'Anna, la Montse....

A la gent de Bellvitge del grup del Joan Blasi per la seva col·laboració: la Mireia, el Benja, l'Àlex, l'Adriana...

A tots els científics als que he tingut d'oportunitat d'escoltar en les moltes conferències a les que he assistit i a tota la gent que es dedica a la ciència a Espanya. M'agradaria que la societat i l'estat valoressin més la recerca i els seus científics.

A totes les pobres rates que han caigut en les meves mans perquè pogués fer aquesta tesi, tot i que sempre he mirat que patissin el menys possible .

Als meus amics: de l'escola , de la Facultat, de Sant Llorenç... per les bones estones que passem junts i que espero siguin moltes més.

I especialment : A la meva família i

*al Jordi, sense els quals no hauria acabat aquesta tesi,
per estar sempre al meu costat .*

ABREVIATURES

ACV	Accident cerebrovascular
ACC	Artèria caròtida comuna
ACE	Artèria caròtida externa
ACI	Artèria caròtida interna
ACM	Artèria cerebral mitja
Agrina-LN	Agrina-Long N-terminus
Agrina-SN	Agrina-Short N-terminus
AMPA	Àcid ζ -amino-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
BHE	barrera hematoencefàlica
CREB	Proteïna d'unió a l'element de resposta al AMP cíclic
DNA	Àcid desoxiribonucleic
ERK	Cinases de Regulació Extracel·lular
EGF	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
EM	Esclerosi Múltiple
ETA	Receptor de l'endotelina-1
ET-1	Endotelina-1
FSC	Flux sanguini cerebral
GFAP	Proteïna acídica fibril·lar glial
HSE	Element de xoc tèrmic
HSF	Factor de transcripció de xoc tèrmic
HSP	Proteïna d'inducció per xoc tèrmic
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1
ICE	Interleuquina-1 Converting Enzyme
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IP	Iodur de propidi
IP3	Inositoltrifosfat
LPS	Lipopolisacàrids
MAPK	Quinases Activades per Mitògens
MBP	Proteïna bàsica de la mielina
MCP-1	Proteïna quimioatracent pels monòcits 1

MEC	Matriu extracel·lular
MMP-2	Metal·loproteinasa de matriu 2
MMP-3	Metal·loproteinasa de matriu 3
MMP-9	Metal·loproteinasa de matriu 9
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromidi)
NfκB	Factor Nuclear Kappa-B
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Òxid nítric
NOS	Òxid nítric sintasa
PKC	Protein Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
P-Selectina	Selectina plaquetar
ROS	Espècies d'oxígen reactives
SNC	Sistema nerviós central
TAC	Tomografia Axial Computeritzada

I. INTRODUCCIÓ1

1. QUÈ ÉS LA ISQUÈMIA CEREBRAL?

1.1 Els accidents cerebrovasculars o ictus	1
1.1.1 Generalitats.....	1
1.1.2 Anatomia de la vascularització cerebral i fisiopatologia del flux sanguini cerebral.....	10
1.2 Models experimentals in vivo d'isquèmia cerebral	12
1.3 Canvis desencadenats per la isquèmia cerebral	15
1.3.1 Progressió de l'infart al llarg del temps.....	15
1.3.1.1 La zona de penombra metabòlica.....	15
1.3.2 Processos de mort neuronal després d'una isquèmia cerebral :	16
1.3.2.1 Causes de la mort neuronal	17
1.3.2.2 Tipus de mort neuronal	21
1.3.3. Resposta glial a la isquèmia cerebral:	24
1.3.3.1 Reacció astrogliàl.....	24
1.3.3.2 Reacció microglial	24
1.3.4. Resposta inflamatòria a la isquèmia.....	25

2. LES METAL·LOPROTEINASES DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

2.1 Concepte i classificació	30
2.2 Estructura	33
2.3 Mecanismes que regulen la seva activitat	34
2.4 Paper fisiològic i patològic de les MMPs i els TIMPs	41
2.4.1 Les MMPs en l'ontogènesi del S.N., la plasticitat neuronal i la migració.....	41
2.4.2 Les MMPs en diverses patologies neurològiques :	44
2.4.2.1 Generalitats: Relació de les MMPs amb...	
- L'excitotoxicitat i la mort neuronal.....	46
- La permeabilització de la BHE, la infiltració leucocitària i la neuroinflamació	47
2.4.2.2 Les MMPs i l'ictus :	49
- Ictus isquèmic.....	49
- Hemorràgia intracerebral.....	52
2.4.3 Les MMPs i la inflamació.....	54
2.4.4 Les MMPs i el càncer :	57
2.4.5 Les MMPs i el cicle cel·lular.....	60
2.5 Substrats de les MMPs: L'agrina com a possible substrate de la MMP-3	62

II. OBJECTIUS	69
----------------------------	-----------

III. MÈTODES	71
---------------------------	-----------

A) IN VIVO

A1. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ D' ANIMALS DE LABORATORI

1.1 Animals	71
1.2 Tècnica d'isquèmia cerebral focal transitòria en la rata	72
1.3 Microdiàlisi intracerebral en rata desperta	76
1.3.1 Implantació de les sondes amb guia estereotàxica	76
1.3.2 Obtenció de mostres per diàlisi.....	77
1.4 Tractaments:.....	79
1.4.1 Inducció de neutropènia en rates	79
1.4.2 Administració d'anticossos anti-ICAM-1	79

A2. TÈCNiques RELACIONADES AMB ELS NEUTRÒFILS

2.1 Aïllament dels neutròfils de la sang fresca de rata.....	80
2.2 Mesura de l'activitat enzimàtica de la mieloperoxidasa (MPO).....	81

A3. TÈCNiques D'HISTOLOGIA

3.1 Fixació del teixit: Perfusió transcardíaca i postfixació	83
3.2 Obtenció dels talls amb criostat i amb micròtom	85
3.3 Tinció d'hematoxilina.....	86
3.4 Immunohistoquímica i reaccions histoquímiques.....	87
3.4.1 Immunohistoquímica per talls de parafina i de criostat.....	87
3.4.2 Doble marcatge per immunohistoquímica.....	89
3.4.3 Marcatge de la microglia amb lectina de tomàquet biotinilada.....	90
3.4.4 Marcatge de la substància blanca amb Luxol fast blue (Klüver-Barrera).....	90

B) IN VITRO

B1. CULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

1.1 Material.....	91
1.2 Descongelació de línies cel·lulars.....	92
1.3 Subcultiu de línies cel·lulars.....	92
1.4 Congelació de línies cel·lulars.....	92

B2. CULTIUS PRIMARIS

2.1 Cultius enriquits en neurones.....	93
2.2 Cultius glials enriquits en astròcits.....	93
2.3 Cultius microglials.....	94
2.4 Cultius d'oligodendròcits.....	94

B3. MÈTODES REALITZATS EN ELS CULTIUS CEL·LULARS:	
3.1 Tractaments amb inhibidors de metal·loproteases	95
3.2 Immunocitoquímica	95
3.3 Tinció nuclear amb bisbenzimidà (Hoechst).....	97
3.4 Assajos de creixement cel·lular i citotoxicitat:	
MTT, blau de tripà, iodur de propidi.....	98
3.5 Anàlisi per citometria de flux de :	
3.5.1. La quantitat de MMP-9 en les diferents fases del cicle cel·lular.....	100
3.5.2. L'efecte dels inhibidors de MMPs en el cicle cel·lular	101
C) TÈCNiques PER ESTUDIAR L'EXPRESSIÓ I L'ACTIVITAT DE LES MMPs I	
PROTEÏNES RELACIONADES :	
C1. TÈCNiques RELACIONADES AMB EL WESTERN-BLOT:	
1.1 Homogenització del teixit o de les cèl·lules del cultiu.....	102
1.2 Determinació de la concentració de proteïnes	103
1.3 Extracció de membranes cel·lulars.....	104
1.4 Western-Blot.....	104
1.5 Densitometria.....	107
C2. TÈCNiques PER MESURAR L'ACTIVITAT DE LES MMPs:	
2.1 Extracció de gelatinases (MMP-2 i MMP-9) d'un teixit o d'un cultiu.....	108
2.2 Zimografia de gelatina i de caseïna :	111
2.2.1 Activació in vitro amb organomercurials (AMPA).....	115
2.2.2 Inhibició amb EDTA i inhibidors de MMPs.....	115
2.3 Zimografia de gelatina in situ (sobre teixit i sobre cultiu cel·lular).....	115
2.4 Assaig enzimàtic de l'activitat de la MMP-3.....	116
2.5 Degradació de l'agrina per la MMP-3.....	116
D) TAULA DELS ANTICOSSOS UTILITZATS	
D1. Anticossos primaris.....	117
D2. Anticossos secundaris.....	118
IV. RESULTATS	119
1. Resum de resultats.....	119
2. Articles:	
Article 1- Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia.....	123
Article 2- Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia	131

Índex

Article 3- Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion	147
Article 4- Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats.....	157
Article 5- Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischaemia/reperfusion.....	171
Article 6- A protein resembling matrix metalloproteinase-9 is specifically and dynamically expressed during mitosis.....	185
V. DISCUSSIÓ GENERAL	201
VI. CONCLUSIONS	213
VII. BIBLIOGRAFIA	215