



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

Tesi doctoral presentada per

**Sònia Solé i Tost**

Barcelona, Maig del 2005

# *I* PART

---

## Introducció

## INTRODUCCIÓ

### 1. QUÈ ÉS LA ISQUÈMIA CEREBRAL?

#### 1.1 ELS ACCIDENTS CEREBROVASCULARS (ACV) O ICTUS:

##### 1.1.1. Generalitats:

##### Concepte i classificació:

Com a ACV ens referim als trastorns pels quals una àrea de l'encèfal sofreix un procés patològic d'origen vascular. Els accidents cerebrovasculars es presenten com episodis aguts denominats genèricament "ictus" paraula d'origen llatí que significa *cop* ("stroke" en llengua anglesa) paraula que descriu perfectament el caràcter brusca i sobtat del procés (Castillo 1999).

Existeixen dos grans tipus d'ictus: l'*isquèmic*, que apareix en el 80% dels casos, causat per una disminució del reg sanguini en una zona del cervell i l'*hemorràgic*, el 20% restant, resultat de la ruptura d'un vas, provocant l'extravasació de sang a l'encèfal.

Nosaltres ens centrarem en l'ictus isquèmic ja que és el tipus d'ictus més freqüent. Segons la duració del procés isquèmic diferenciem entre: un atac isquèmic transitori (AIT) o un infart cerebral, en funció de si el dèficit funcional reverteix o no abans de les 24 hores.

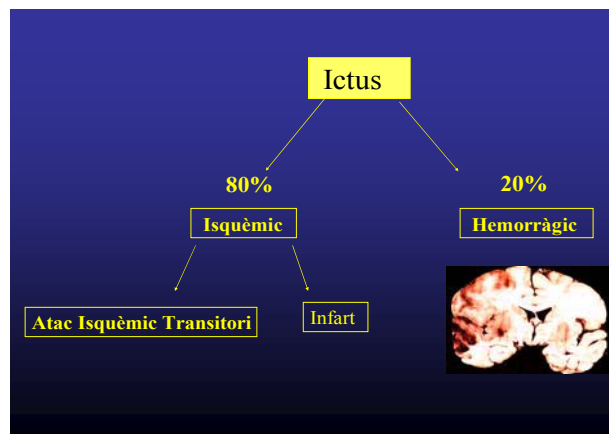


Figura 1: Tipus d'ACV o ictus.

La isquèmia cerebral es defineix com la interrupció del flux sanguini en una zona de l'encèfal; mentre que l'infart cerebral és l'àrea de lesió tissular produïda com a

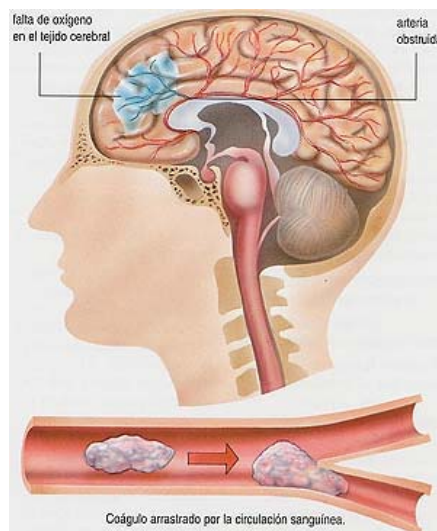
conseqüència d'una isquèmia cerebral. L'extensió de l'infart cerebral està en funció de la durada de l'episodi isquèmic, de la magnitud de la caiguda del flux sanguini i de la susceptibilitat a la isquèmia de la regió cerebral afectada (per exemple l'hipocamp és molt vulnerable).

La isquèmia cerebral pot ser focal o global. La isquèmia cerebral focal es produeix per l'oclusió d'una artèria cerebral, afectant-se només una zona discreta de l'encèfal. En la isquèmia cerebral global l'aport sanguini al cervell s'interromp globalment en tot l'encèfal degut a una aturada cardíaca o un xoc epilèptic. La incidència d'aquest tipus d'isquèmia és molt inferior a la de la isquèmia focal, per això ens hem centrat en l'estudi de la isquèmia focal.

### Tipus d'infarts cerebrals focals:

Els infarts cerebrals focals podem classificar-los també segons la seva etiologia en 3 grans grups:

- Els *aterotrombòtics*: quan són deguts a plaques d'ateroma que es formen preferentment en caròtides, vertebrals, tronc basilar i ACM, que s'acaben desprenent i taponant el vas,
- Els *cardioembòlics*: provocats per èmbols d'origen cardíac que arriben a la vasculatura cerebral i
- Els *lacunars*: causats per l'arteriolosclerosi i la lipohialinosi que obstrueixen vasos cerebrals de petit diàmetre.



**Figura 2:** La falta d'irrigació sanguínia, produïda per exemple per l'obstrucció d'una artèria cerebral per un trombus, pot provocar un infart cerebral.

### Impacte socioeconòmic :

L'impacte socioeconòmic dels ACV és considerable arreu del món. Constitueixen un greu problema de salut pública especialment en els països industrialitzats on l'edat mitja de vida de la població és alta.

Segons la OMS l'ictus és la segona causa de mort i la primera de minusvalia en el món occidental. Es calcula que es produeixen 5 milions de morts cada any a causa dels ACV en el món.

Cal ressaltar també la importància dels diferents graus d'invalidesa que genera a les persones que sobreviuen a l'ACV, que acaben sent dependents per moltes de les activitats de la vida diària.

A Espanya es produeixen anualment uns 120.000 nous casos d'ictus, això és, 1 cada 6 minuts, o més de 200 casos nous per 100.000 habitants i any.

Cada any més de 400.000 espanyols moren per causa de l'ictus cerebral, el qual representa a Espanya la segona causa de mortalitat en les dones i la tercera, després de l'infart cardíac i el càncer, en els homes. Aquest problema també és el principal responsable de la invalidesa permanent i el segon motiu de demència.

Aquest procés neurològic és responsable de que el 71% dels afectats deixi de treballar, el 30% necessiti cures de per vida i el 20% necessiti ajuda per caminar.

La realitat demostra que més del 30% dels pacients que sobreviuen a la fase aguda de l'ictus queden amb seqüeles o discapacitats més o menys greus.

Sols 2 de cada deu malalts que han patit aquest episodi cerebrovascular poden valer-se per sí mateixos cinc anys després i que la majoria dels pacients que han patit un ictus presenta un problema de dependència, que afecta en major o menor grau la seva qualitat de vida. Després de cinc anys un terç dels pacients mor i un altre terç segueix arrossegant alguna discapacitat.

### Una malaltia no massa coneguda:

Curiosament a Espanya sols un 4% de la població coneix el terme i sols una de cada deu persones està adequadament informada sobre aquesta malaltia i les mesures de que es disposa per a la seva prevenció. Aquestes dades són il·lustratives de la necessitat d'informació que té la societat davant d'aquest greu problema de salut.

Personatges públics com don Jaime de Marichalar o el cantant Joaquín Sabina

han contribuït directa o indirectament a donar una major difusió del coneixement d'aquesta malaltia.

Així doncs s'hauria de sensibilitzar a la societat de la importància del control de factors com la pressió sanguínia, ja que la hipertensió arterial està considerada el primer factor de risc per patir un ictus cerebral.

En un informe recent de l' Organització Mundial de la Salut (OMS) es constata que una senzilla combinació d'esforços nacionals (campanyes informatives, xerrades divulgatives...) i de mesures individuals (adopció d' uns hàbits de vida saludables i estricte control de la pressió arterial, entre d'altres) contribuirien a reduir en més del 50% la xifra de dotze milions de morts anuals que les malalties cardio i cerebrovasculars causen en tot el món.

### La gent gran , els més perjudicats:

Aquesta patologia sol presentar-se a edats avançades (a partir dels 55-60 anys), encara que també s' observa amb menor freqüència en adults joves.

L' impacte de l' ictus en un adult jove sol ser en principi major, però a la llarga aconsegueix fer front millor a les seqüeles i presenta una major recuperació de les seves funcions bàsiques.

Dels 120.000 nous casos d' ictus que anualment es diagnostiquen en Espanya, el 80% es donen en majors de 60 anys. Aquest procés produeix més discapacitat física i mental que la malaltia de l' Alzheimer. Més de la meitat de la gent gran que sobreviu a un ictus arrossega un problema de dependència.

Un terç de la gent gran espanyola que pateix un ictus mor abans d' un any i un altre terç pateix seqüeles associades a la malaltia com: invalidesa, depressió o demència.

A aquesta elevada prevalència de l' ictus en la població de gent gran s'hi ha de sumar la pitjor disposició amb la que, en general, aquest grup d' edat afronta la malaltia. La gent gran es deixa abatre més fàcilment pels problemes de solitud, desvaliment i depressió ,el que dificulta les possibilitats de recuperació.

### Un problema en creixement

L' ictus afecta generalment a persones d'edat avançada i l'Organització Mundial de la Salut (OMS) calcula que per l' any 2040 quasi la meitat de la població espanyola superarà els 65 anys d' edat.

Aquesta malaltia sol deixar seqüeles neurològiques amb deficiències motores, sensitives i mentals, que representen uns costos socio-sanitaris i de patiment humà molt elevats. Per tant, és obvi preveure que amb el progressiu envelliment de la població dels països occidentals, l'ictus es convertirà en un problema encara més important de salut pública.

### Factors de risc:

Els principals factors de risc per desenvolupar aquesta patologia són: la hipertensió, la hipercolesterolèmia, la diabetis i el tabaquisme. També destacarem la fibril·lació auricular i l'infart recent de miocardi com a factors que predisposen a embòlies cerebrals d'origen cardíac.

Cal ressaltar el paper decisiu que tenen les campanyes de salut pública contra aquests principals factors en la prevenció de l'ictus, sobretot el control de la tensió arterial. Tot i així es calcula que es registrarà un increment en el nombre de pacients que patiran un ACV, sobretot per l'envelliment de la població.

### Les principals causes :

La causa més comú és l'arteriosclerosi, una patologia directament relacionada amb factors com: el tabac, una alimentació massa rica en grasses, la diabetis, un nivell elevat de lípids en la sang, l'obesitat, l'edat avançada, les malalties cardíques i especialment la hipertensió arterial no controlada per fàrmacs.

En persones joves, les causes més freqüents són: el trencament d'un aneurisma, una malformació en la paret d'una artèria o un traumatisme cranial.

### Què es pot fer per evitar-la?

Cal evitar tots els factors que augmenten el risc d'arteriosclerosi. És a dir: la hipertensió, el tabac i l'excés de colesterol en sang.

### Simptomatologia:

L'ictus sempre és una patologia neurològica que ha de tractar-se amb la màxima urgència (idealment, entre les tres i les sis primeres hores). Per això és molt important saber reconèixer els símptomes i buscar assistència sanitària urgentment, ja que el pronòstic dependrà en gran mesura de la rapidesa en la instauració del tractament.

L'ictus es manifesta amb l'aparició sobtada d'un o més dèficits neurològics, que poden ser molt variats : alteracions de la sensibilitat i pèrdua de força en una meitat de la cara, un braç, una cama o tota una meitat del cos; trastorns de la visió ; dificultat per entendre o parlar ; mals de cap d' inici sobtat i intensitat inhabitual ; sensació de vertigen intens i inestabilitat ; incapacitat per a caminar o aparició de caigudes inexplicables...

### Tractament:

En la primera fase s'aplica un tractament d' urgència, és a dir, es controla la pressió arterial, l'equilibri hidrosalí i la coagulació. Al mateix temps, s'intenta reduir la pressió en el cervell i parar la hemorràgia si n'hi ha.

Es realitzen els exàmens clínics pertinents: un examen cardiovascular i neurològic complet, a més del corresponent anàlisis de sang. En determinats casos, el metge pot considerar necessari realitzar un electroencefalograma, un TAC, una angiografia o una arteriografia cerebral, un electrocardiograma, un Doppler de las artèries o altres proves més específiques. De fet, es veu necessari, cada vegada més, l'ús de la ressonància magnètica nuclear per tal de realitzar el diagnòstic de l'ictus.

Una vegada determinades les causes de l'ictus gràcies als resultats de les anàlisis comença la segona etapa del tractament. Les mesures a prendre no són les mateixes en el cas d' una hemorràgia produïda pel trencament d'una artèria, per exemple, que en el d'una obstrucció deguda a un coàgul de sang. És important intentar millorar la circulació sanguínia en el cervell tant aviat com es pugui .

De vegades és necessària la intervenció quirúrgica, com passa en el casos següents: atacs de feridura produïts pel trencament d' un vas com a conseqüència d' un aneurisma; presència d' un hematoma causat per un traumatisme craneal o obturació d'una artèria caròtida. Els ictus deguts a problemes cardíacs requereixen un tractament específic.

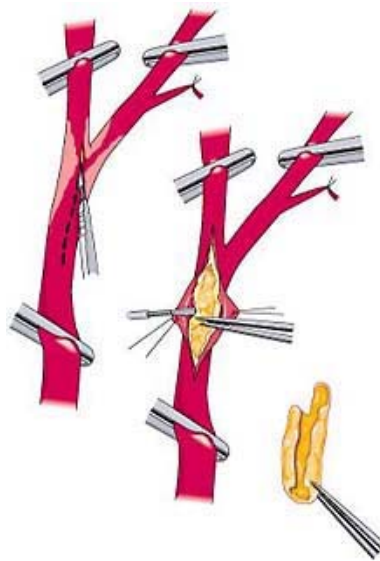
En el cas que l'obstrucció del flux sanguini es degui a un trombus, el reestabliment precoç de la circulació sanguínia es pot aconseguir amb l'ús d'agents fibrinolítics com el rtPA (Activador tissular del plasminogen) i es poden prevenir les recurrències amb l'ús de fàrmacs que eviten la formació de nous trombus: anticoagulants (Heparina) i antiagregants plaquetaris (Àcid Acetilsalicílic). També s'estan fent estudis dels efectes beneficiosos que pot tenir l'heparina en l'infart cerebral no només per les seves propietats anticoagulants sinó també per les seves propietats antiinflamatòries (Chamorro, 2000).



El rtPA és actualment l'únic tractament que ha donat resultats positius en assajos multicèntrics i aleatoritzats. Existeixen evidències científiques dels beneficis del rtPA a nivell de la disminució de la mortalitat. Se sap que el rtPA reestableix la circulació de forma immediata si és administrat durant les tres primeres hores després de l'inici de la clínica. Els criteris clínics d'aplicació dels trombolítics són però molt restrictius, degut a l'alt risc d'hemorràgia que comporta el seu ús, i per tant, el nombre de pacients susceptibles de rebre aquesta teràpia és molt baix (un 5-10% del total).

Per aquest motiu és tan important seguir buscant nous fàrmacs més eficaços i més segurs pel tractament de l'ictus. Cal dir que, tot i que s'han fet molts estudis en animals d'experimentació utilitzant diferents fàrmacs amb els quals s'han obtingut resultats significativament positius, quan s'han testat aquests fàrmacs en assajos clínics no han demostrat ser efectius en les persones.

De moment encara no existeix cap tractament neuroprotector en humans eficaç per prevenir la mort neuronal quan la isquèmia ja està instaurada (Lee 1999). D'aquí radica la importància que té l'estudi dels mecanismes implicats en la isquèmia cerebral, per buscar dianes farmacològiques que evitin la necrosi tissular quan el quadre està evolucionant.



**Figura 3:** En els quadres d' isquèmia cerebral per arterioesclerosi de l' artèria carotídea es realitza l' endarterectomia de l' artèria afectada. Aquesta intervenció es realitza a través d' una incisió en el coll, per accedir a l'artèria caròtida, s'obre i es realitza una neteja de les plaques d'ateroma que hi ha en el seu interior.

### Què ha de fer el pacient?

És imprescindible que el pacient realitzi els exercicis de rehabilitació amb regularitat i constància per a recuperar el més aviat possible les funcions afectades. També és important tenir una actitud positiva i lluitar contra el desànim. Les persones properes al pacient tenen un paper molt important en la seva recuperació.

### Acudir a urgències:

Els experts aconsellen que, davant la menor sospita d' un ictus cerebral, és convenient acudir a urgències hospitalàries. Els facultatius determinaran si es tracta d' un episodi transitori i adoptaran les mesures oportunes de prevenció d'un altre ictus més greu, o diagnosticaran amb major precisió el tipus d' ictus que el pacient està patint i instauraran el tractament precoç.

### Més unitats d'ictus:

Seria interessant la creació de més unitats d' ictus que, segons l' experiència clínica, redueixen un 30% les morts, així com la gravetat i el nombre de seqüeles, i un 18% la despesa sanitària.

Segons un treball realitzat el 1999 pel Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares (GEECV) de la Sociedad Española de Neurología (SEN), existeixen dotze unitats d' ictus en els hospitals del Sistema Nacional de Salud (SNS) i sols el 16% d'elles disposa d'un neuròleg de guàrdia amb presència física les 24 hores del dia. I estem en una situació semblant al Regne Unit o França.

De fet, fins als anys vuitanta hi havia la creença mèdica de que "davant d' un ictus cerebral quasi no es podia fer res".

No se sap molt bé per qué, però les unitats d' ictus, que es van començar a crear en els països desenvolupats a finals de la dècada dels 80 per tractar precoçment el problema, no estan tenint el mateix ritme de creixement que les unitats coronàries per l'atenció precoç de l' infart de miocardi.

Les unitats d' ictus no requereixen de grans inversions e infraestructures. Tant sols la presència física durant les 24 hores del dia d'un especialista en neurologia i l' accés immediat i directe a proves de TAC, ressonància magnètica i laboratori.



**Figura 4:** Sala de Tomografía Axial Computerizada (TAC).

Idealment hauria d'haver, al menys, una unitat d'ictus en cada capital de província, ja que les 3-6 primeres hores després de l' accident cerebrovascular són vitals per a augmentar la supervivència i reduir les seqüeles i complicacions, que poden convertir l' afectat en un ser dependent per hemiplègia (paràlisi d' una meitat del cos), demència i altres dèficits cognitius i motors.

És de vital importància que el pacient, davant la sospita d'un ictus cerebral, vagi ràpidament a l' hospital; és a dir, en les sis primeres hores i, molt millor encara, si fos possible, en les tres primeres hores.

Encara que qualsevol neuròleg està facultat per atendre la fase aguda d' un episodi d' ictus, les unitats especialitzades redueixen sensiblement la morbimortalitat (complicacions i morts), gràcies a disposar les 24 hores del dia del personal sanitari i dels mitjans tècnics necessaris.

El pla assistencial de l'ictus a Catalunya, en actual fase de desenvolupament, contempla la implantació d'un nombre d'unitats d'ictus pel territori català que garanteixi la màxima cobertura possible, donat el seu reconegut resultat clínic.

Es calcula que sols la meitat dels afectats ingressa en un centre hospitalari en les sis primeres hores de produir-se l' ictus, fenomen que es dona sobretot en àrees on la població està molt més informada i té un accés més ràpid i directe als recursos sanitaris. Però encara un gran nombre de pacients sol·licita ajuda mèdica quan ja és massa tard.

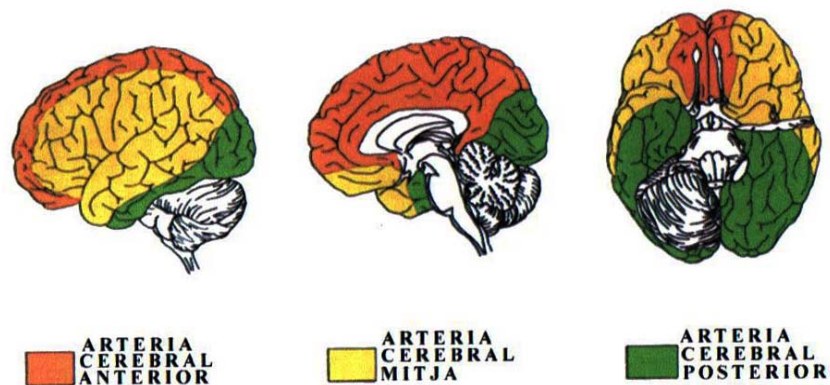
### 1.1.2 Anatomia de la vascularització cerebral i fisiopatologia del flux sanguini cerebral :

#### Anatomia de la vascularització cerebral :

La irrigació cerebral té lloc per *dues vies principals*: la carotídia i la vertebral. La *via carotídia* està formada per les dues artèries caròtides internes. La *via vertebral* la formen les dues artèries vertebrales, que s'uneixen a l'interior del crani, formant l'artèria basilar. L'aport sanguini total de cada un dels tres vasos principals no és el mateix. Les *artèries caròtides* internes aporten un 70% del total de la perfusió, mentre que l'altra 30% és aportat per l'*artèria basilar* (Edvinson et al., 1993).

Entre els eixos vasculars principals s'estableixen nombroses anastomosis i xarxes de circulació col·lateral. La comunicació més important és la que estableix *el polígon de Willis*, que comunica el territori carotidi amb el vértebro-basilar a través de la comunicant posterior, i també comunica la caròtida dreta amb l'esquerra a través de la comunicant anterior. Aquesta estructura permet una distribució més uniforme de la sang en el cervell, i alhora dóna un marge de seguretat en la seva perfusió.

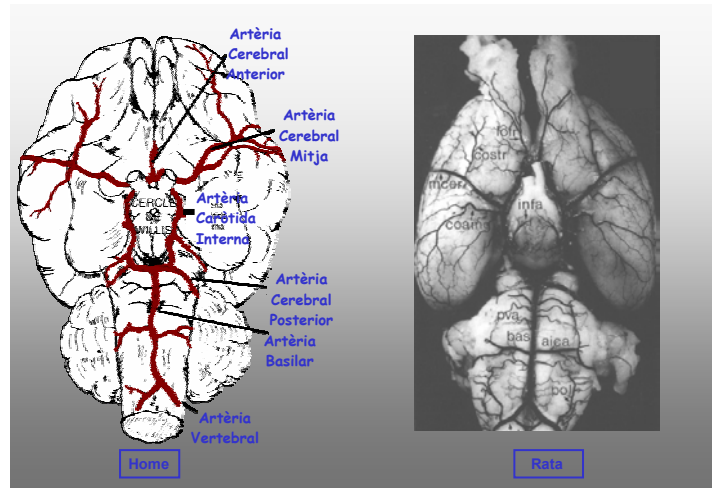
L'*artèria caròtida interna* es divideix a l'interior del crani en *quatre branques*: cerebral anterior, coroidal anterior, cerebral mitja, i comunicant posterior. L'*artèria cerebral mitja* (ACM) és la branca major de l'artèria caròtida interna. Irriga la major part dels laterals dels hemisferis: els ganglis basals, la càpsula interna i una part important de l'escorça lateral. En clínica és l'artèria que s'observa més freqüentment obstruïda.



**Figura 5:** Esquema de les àrees d'irrigació de les principals branques arterials cerebrals.

(Adaptat d'Edvinson et al., 1993)

*L'anatomia vascular de l'home és molt similar a la de la rata.* Les artèries caròtides internes es ramifiquen formant cinc branques, una més que en l'home. La cinquena branca és l'artèria que irriga el nervi òptic. Els territoris de distribució de les tres artèries cerebrals en la rata són molt similars a les de l'home, així com el patró de bifurcacions d'aquestes en la superfície cortical. Això fa que la rata sigui un bon model per a estudiar la isquèmia cerebral en el territori de l'ACM.



**Figura 6:** Semblances entre la irrigació cerebral de l'home i de la rata.

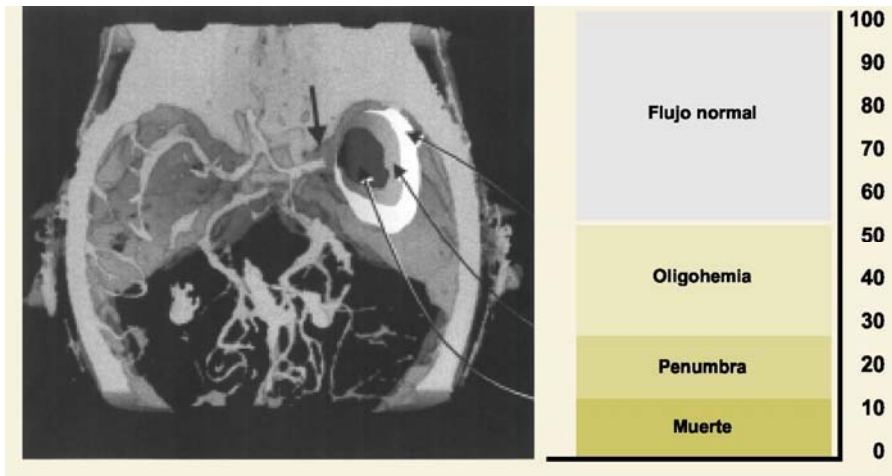
#### Fisiopatologia del flux sanguini cerebral :

El grau òptim d'activitat cerebral depèn de l'existència d'un adequat FSC que proporcioni al teixit nerviós un aport suficient de glucosa i oxigen. Per tant és necessari que el FSC es mantingui estable enfront a variacions importants de la pressió arterial sistèmica o de les resistències vasculars intracranials.

La circulació cerebral és en gran part independent de la pressió de perfusió gràcies a l'existència d'uns mecanismes d' autoregulació cerebrovascular, que actuen a través de variacions en el diàmetre de les arterioles i capil·lars de la microcirculació que responen a factors neurals i bioquímics (especialment el  $pCO_2$  i el pH). Aquesta fina autoregulació fa que grans variacions de la pressió arterial es tradueixin només en petits canvis en el FSC.

El FSC mig és de 50 ml/100g de teixit/minut (Figura 7). Per sota de 10 ml/100g de teixit/minut es pot produir una lesió isquèmica irreversible. L'obstrucció de l'artèria cerebral mitja (fletxa curta de la figura 7) origina un gradient de pressions. En la zona central, amb  $FSC < 10 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$ , es produeix una ràpida mort cel·lular. Envoltant a aquest nucli intensament isquèmic, hi ha una zona de "penombra" amb un  $FSC < 22 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$ . Més perifèricament, en la zona d'oligohèmia, amb  $FSC > 22 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$ , el risc de convertir-se en infart sols succeeix en circumstàncies adverses.

L'extensió de l'infart està en funció de la de disminució del FSC, que dependrà directament de tres paràmetres: el grau d'oclusió, el temps que duri aquesta oclusió i la irrigació col·lateral i les anastomosis que es formin.

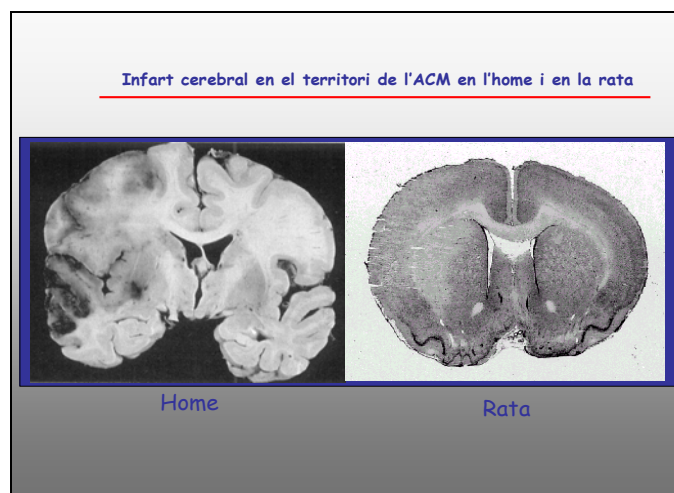


**Figura 7:** En funció de la disminució del FSC es creen diferents zones en el cervell: el nucli isquèmic, la zona de penombra i la zona amb oligohèmia. (Castillo, 2001).

## 1.2. MODELS EXPERIMENTALS IN VIVO D'ISQUÈMIA CEREBRAL:

Els models d'isquèmia cerebral en animals intenten reproduir els ictus isquèmics en l'home amb la màxima fidelitat possible. Són sempre aproximacions a la realitat però aporten una informació valuosa i indispensable per tal d'esbrinar la mecànica de la malaltia i dissenyar futures estratègies terapèutiques per aquesta.

Com els infarts que es donen més freqüentment en l'home són els que afecten l'àrea d'irrigació de l' ACM (McAuley, 1995), la majoria de models d'isquèmia focal se centren en l'oclusió d'aquesta artèria.



**Figura 8:** Infart cerebral en el territori de l'ACM en l'home i en la rata.

Hi ha nombrosos models per estudiar la isquèmia cerebral *in vivo*. Els primers models que van aparèixer es basaven en accedir directament a l'ACM mitjançant una craniectomia temporal i l'electrocoagulació de l'artèria (Tamura,1981), però aquests tenen els inconvenients de que l'oclusió és irreversible i que són molt invasius i agressius.

La **tècnica de l'oclusió mecànica intraluminal** va ser descrita per primer cop per Koizumi i col·laboradors (Koizumi, 1986) i és una tècnica que permet realitzar tant una oclusió permanent com una oclusió transitòria, fent possible l'estudi del fenomen de la reperfusió. Consisteix en fer avançar un fil de niló per l'interior de l'artèria caròtida interna fins la bifurcació de l'ACM i l'artèria cerebral anterior. Un dels inconvenients d'aquesta tècnica és el dany que provoca el filament sobre l'endoteli dels vasos per on avança (Macrae, 1992).

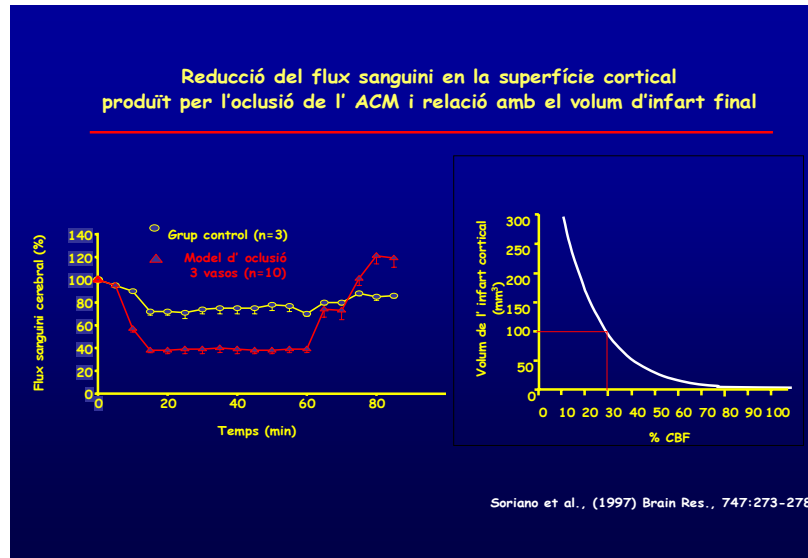
El nostre grup va optar per aquest tipus de model, utilitzant una variant del mètode descrit per Karibe (Karibe, 1995). Vàrem escollir aquest mètode com a model experimental perquè és un dels més rellevants per l'estudi de l'ictus isquèmic en clínica ja que permet estudiar els efectes de la reperfusió fenomen que en l'home sovint s'esdevé de forma espontània (Mc Auley,1995). Malgrat que comporta certa dificultat tècnica a nivell de la microcirurgia que requereix, es pot realitzar en el laboratori amb uns nivells de reproduïbilitat que, lluny dels ideals, són acceptables. Aquest model es basa en l'oclusió intraluminal de l'ACM en la seva part més pròxima i comporta una afectació principalment de l'estriat, i de l'escorça dorso-medial en menor grau de l'hemisferi ipsilateral a l'oclusió (Back, 1998). La modificació sobre el mètode de Karibe consisteix en l'oclusió transitòria de les artèries caròtides comunes (Oliff i col.,1995) fet que permet disminuir la variabilitat.

Vam escollir la rata perquè els models en rosegadors són el més utilitzats arreu per reproduir els ACV degut a la similitud de l'anatomia cerebrovascular amb la de l'home, la major reproduïbilitat (gràcies a l'alta homogeneïtat de les soques) i el relatiu baix cost d'aquests animals. S'ha vist que existeixen diferències en el tamany de l'infart i la variabilitat obtinguda, segons el tipus de soga estudiada (Oliff, 1995).

L'extensió de l'infart que es produirà després de la isquèmia depèn de: la severitat de l'oclusió, el temps que duri i de si la irrigació col·lateral pot suplir la manca de flux. Perquè una isquèmia produeix un infart cerebral (mort de part del teixit cerebral) és important que el flux sanguini decaigui per sota d'uns valors mínims (20-30% del total) , però també que la privació d'oxigen i glucosa sigui prou mantinguda en el temps com per a que els seus efectes siguin irreversibles.

En el nostre model si la isquèmia és de 10 minuts no es produeix infart, però si l'oclusió és d'una hora de durada es produeix un infart ben definit en el territori de l'ACM.

Si allarguéssim el temps d'oclusió a més de 3 hores el volum final d'infart seria semblant al resultat d'una oclusió permanent. Per aquest motiu es realitza l'oclusió de l'ACM durant una hora.



**Figura 9:** Reduïció del FSC normal al 30% durant una hora en la superfície cortical produïda per l'oclusió intraluminal de l'ACM i relació entre la severitat de la isquèmia i el volum final d'infart. (Adaptat de Soriano et al., 1997).

**L'increment de la Hsp 70 permet comprovar si s'ha induït la isquèmia cerebral:**

Per comprovar que les rates estan isquèmiques després de l'operació es mira per Western Blot si hi ha augment de l'expressió de la proteïna d'estrès Hsp 70 a les 24 hores.

La Hsp 70 pertany a la família de les heat shock proteins (HSP) o proteïnes induïbles per xoc tèrmic .

Les HSPs constitueixen una família de proteïnes que tenen la funció d'actuar d'acompanyants ("chaperones" en anglès) d'altres proteïnes que es troben desplegadas, ajudant-les a recuperar la seva estructura i funció i evitant que formin agregats proteïcs. En condicions fisiològiques les HSPs s'uneixen a proteïnes just acabades de sintetitzar que encara no han adoptat una conformació espacial o bé a proteïnes desplegadas perquè han de travessar alguna barrera.

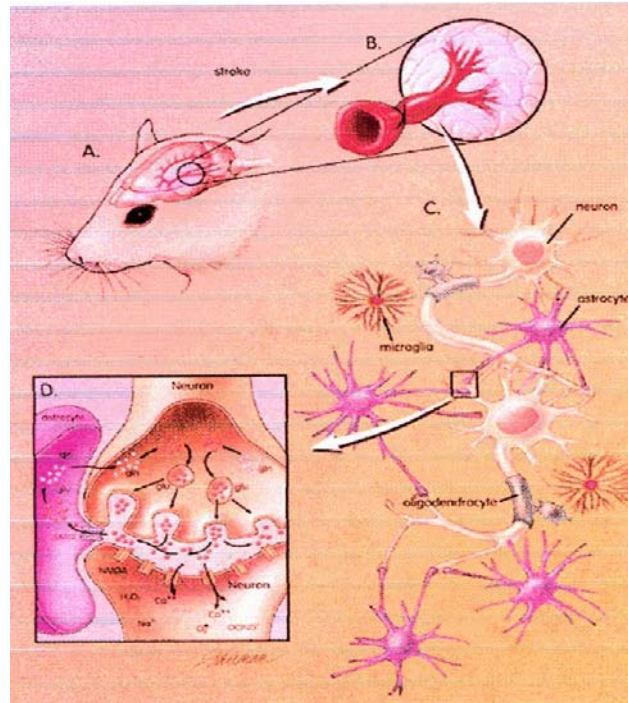
Les HSPs responen a increments de temperatura però també s'activen en altres situacions d'estrès com: excitotoxicitat, toxines, metalls o la isquèmia (Massa, 1996; Planas,1997). En aquestes situacions d'estrès es creu que les proteïnes es podrien desnaturalitzar i desplegar-se, aleshores les HSPs s'unirien a aquestes proteïnes malmeses evitant que es formessin agregats proteïcs que precipitarien.

A nivell cerebral la Hsp70 és la més important i abundant de totes les HSPs induïbles i la seva sobreexpressió s'utilitza com a marcador d'estrès cel·lular (Sharp ,1999). En l'infart cerebral la zona d'expressió principal d'aquestes proteïnes, coincideix



amb la zona de penombra de l'infart, sobretot la Hsp70, que té el seu màxim d'expressió a les 24 hores de la isquèmia.

### 1.3. CANVIS DESENCADENATS PER LA ISQUÈMIA CEREBRAL:



**Figura 10:** La isquèmia cerebral provoca moltes alteracions en la fisiologia de totes les cèl·lules del sistema nerviós.

#### 1.3.1 Progressió de l'infart al llarg del temps:

L'infart és un procés dinàmic que segueix una evolució temporal. Degut a la falta d'oxigen i glucosa comença a aparèixer una zona d'infart a partir de les poques hores de produir-se la isquèmia. Però l'infart continuarà la seva expansió: durant les primeres 24 hores s'extindrà arribant a una mida d'infart propera al màxim; i en els següents 3 dies encara pot créixer fins a un 30% del total. Aquesta extensió de l'infart afecta bàsicament la zona de penombra i les regions afectades de degeneració secundària. Aquests conceptes s'expliquen a continuació:

##### 1.3.1.1 La zona de penombra metabòlica:

En relació a la isquèmia focal apareix el concepte de penombra metabòlica que es fonamenta en el següent principi: L'oclusió d'un vas causa una reducció del flux sanguini que és màxima en la zona central més pròxima al vas (nucli de l'infart o core), però a mesura que ens anem allunyant d'aquesta zona central, existeix una àrea en la que el flux es va normalitzant gradualment (zona de penombra) fins a un punt a partir del qual el flux sanguini és estrictament normal.

Astrup et al.(1981) va definir el terme de penombra metabòlica com la regió amb un flux sanguini per sota del mínim necessari per a mantenir l'activitat elèctrica però suficient com per conservar els gradients iònics cel·lulars, cosa que implica que inicialment les cèl·lules estan vives. La penombra metabòlica seria com la zona pont entre el nucli de l'infart i l'àrea de teixit sa.

A la zona de penombra se li dóna una gran importància ja que es considera l'àrea de teixit potencialment salvable de la mort amb fàrmacs neuroprotectors.

Una de les característiques més rellevant de la penombra metabòlica és que es tracta d'una situació limitada en el temps; ja que si la hipoperfusió s'allarga molt en el temps aquesta àrea susceptible al rescat va fent-se cada cop més petita incrementant la proporció d'àrea necrosada ja irrecuperable, a mesura que l'extensió de la lesió progressa en el temps (Obrenovitch, 1995).

S'ha vist que en aquesta zona incrementa l'extracció d'oxigen, apareix una acidosi important i augmenta el consum de glucosa (Kita et al., 1995). També s'ha observat que coincideix en la zona on s'expressen majoritàriament les proteïnes de xoc tèrmic (Planas et al., 1997).

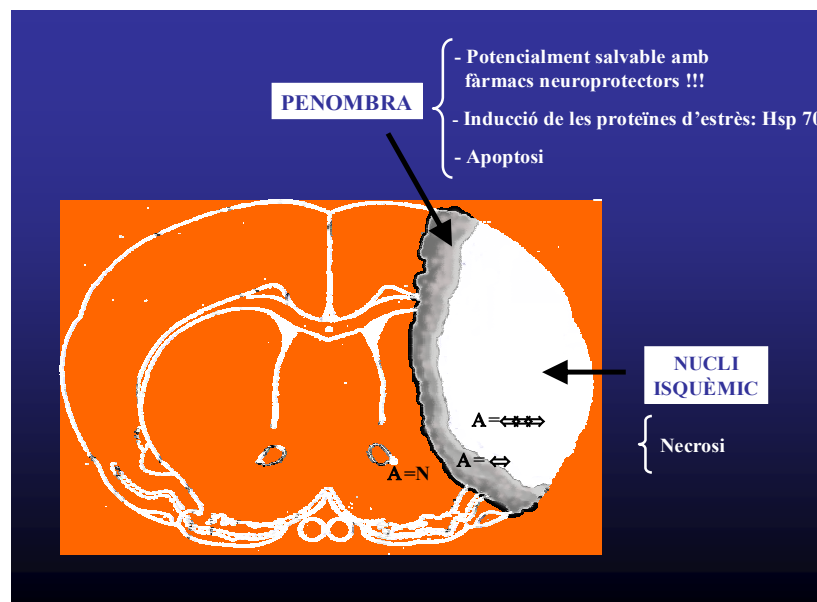


Figura 11: Esquema dels conceptes de nucli isquèmic i zona de penombra.

### 1.3.2 Processos de mort neuronal després d'una isquèmia cerebral:

Moltes de les funcions que porten a terme les neurones i cèl·lules glials per mantenir la seva integritat són dependents d'un aport energètic constant, que només és possible si es manté un adequat flux sanguini. En la isquèmia, la interrupció del flux sanguini condueix a alteracions importants en l'homeòstasi cel·lular que porten, en ocasions, a la mort cel·lular irreversible.

Com veurem, les conseqüències de l'obstrucció d'un vas en l'encèfal són moltes i molt importants. Degut a la manca d'aport de glucosa i oxigen s'activen mecanismes

d'excitotoxicitat, els quals determinaran l'alliberació al medi extracel·lular de molts factors com: el calci, el glutamat i les espècies reactives d'oxigen. També es produirà una inflamació post-isquèmica i la formació d'edema. Tots aquests factors acabaran provocant la mort cel·lular.

### 1.3.2.1 Causes de la mort neuronal :

Les neurones requereixen energia per mantenir la seva integritat i per dur a terme la tasca enormement especialitzada que tenen en el cervell: la recepció, integració, i transmissió de la informació. Per altre banda, les cel·lules no neuronals del sistema nerviós, les cel·lules glials i endotelials, també requereixen energia, per tal de mantenir un ambient extern i intern adient perquè les neurones puguin realitzar la seva funció.

El cervell té una elevada demanda energètica i un requeriment obligatori i quasi exclusiu de glucosa. De fet, sent el cervell el 2 % del pes corporal rep el 15 % del cabal sanguini cardíac i és també el responsable del 20 % del consum total d'oxigen i del 25 % de l'utilització total de la glucosa (Edvinson et al., 1993).

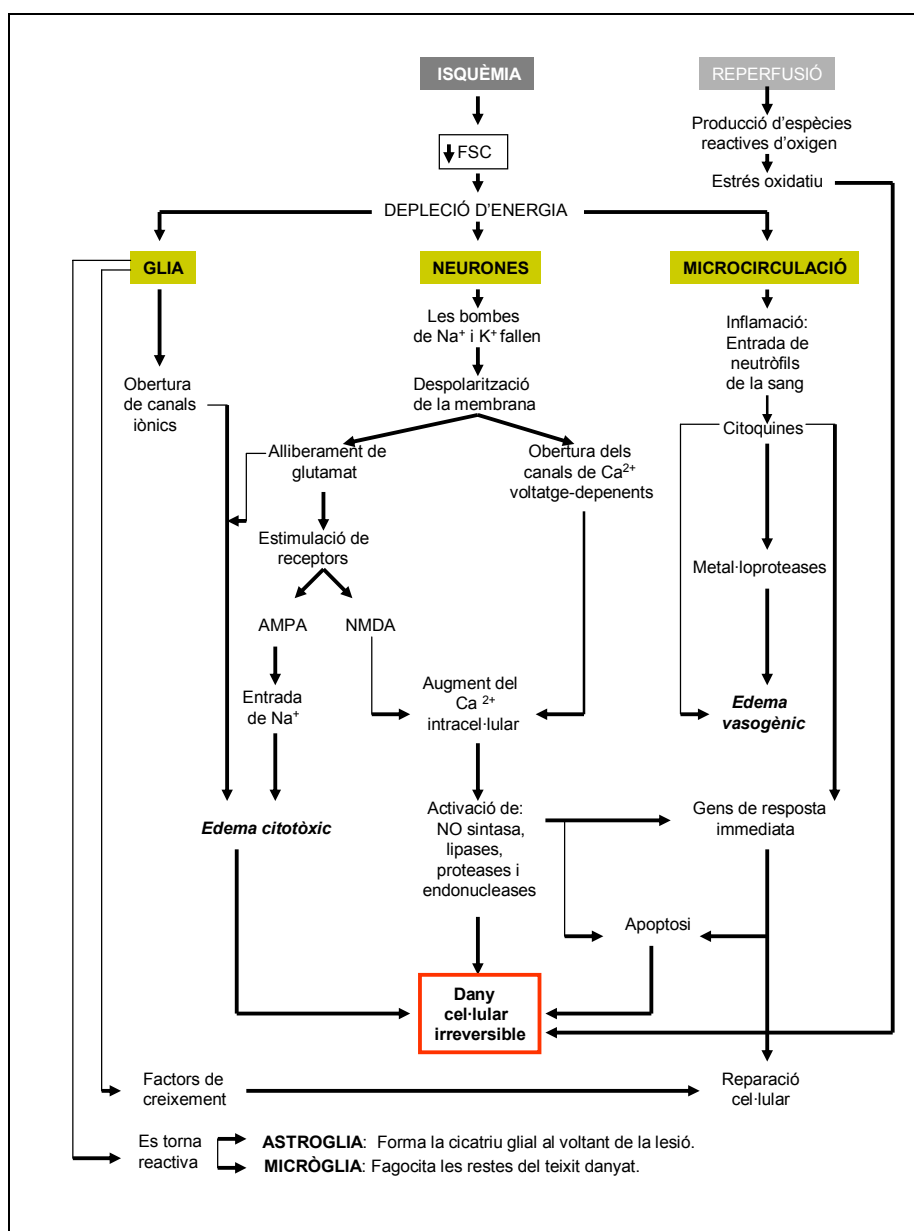
En el focus isquèmic la interrupció brusca del flux sanguini fa que ràpidament s'anul·li el subministre de glucosa i oxigen en el teixit. La manca d'aquests substrats farà que es desencadenin certs mecanismes que conduiran a la mort cel·lular entre ells:

- la caiguda energètica
- l'alliberament d'aminoàcids excitotòxics
- l'acumulació intracel·lular de calci
- l'acumulació d'espècies d'oxigen reactives (ROS)
- l'edema

### 1. La caiguda energètica :

La manca de subministrament d'oxigen fa que en un primer moment, es mantingui la síntesi d'ATP, gràcies a la fosfocreatina i al metabolisme anaeròbic de la glucosa. L'ús de glucosa per via anaeròbica però, fa que s'acumuli lactat que provocarà l'acidificació del medi (Symon et al., 1994). Aviat però, la manca absoluta de glucosa i oxigen fa que les neurones perdin la seva capacitat per generar ATP. Sense ATP fallaran els mecanismes ATP dependents, que s'encarreguen de mantenir el gradient iònic transmembranal (entre ells la bomba Na/K ATPasa ) i això conduirà a la despolarització de la cèl·lula. Aquest desequilibri iònic provoca :

- L'alliberament de grans quantitats de glutamat al medi (Nichols i Atwell 1990).
- L'entrada de calci dins de la cèl·lula a través de canals dependents de voltatge.



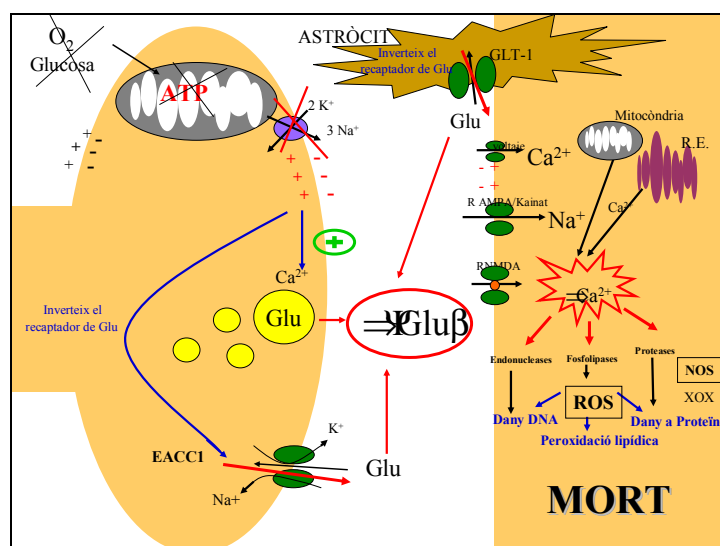
**Figura 12:** Esquema dels canvis desencadenats per la isquèmia amb reperfusió. (Adaptat de Castillo, 2001).

## 2. L'alliberament d'aminoàcids excitotòxics :

En la isquèmia, a conseqüència de la despolarització cel·lular, el glutamat intracel·lular surt massivament cap a l'espai extracel·lular on s'acumula en excés. Al principi s'allibera glutamat al medi per la fusió de les vesícules presinàptiques, procés dependent de Ca<sup>2+</sup> (Nishizawa, 2001), però en etapes més tardanes, la sortida de glutamat al medi es dona principalment a través de recaptadors de glutamat que operen de forma reversa que en condicions fisiològiques (Taylor et al., 1995; Rossi et al., 2000) tant en el terminal presinàptic (EACC1) com en els astròcits (GLT-1). Aquests transportadors enlloc de protegir les neurones capturant el glutamat del medi alliberen més glutamat a l'espai extracel·lular, el que provoca un excés de glutamat al medi.

Es creu que és principalment el transportador de glutamat GLT-1 dels astròcits, actuant en forma reversa, el principal responsable, ja que tant en ratolins deficientes en de GLT-1, com en rates injectades amb oligonucleòtids de DNA antisentit contra el RNAm de GLT-1, s'observa una reducció del volum d'infart, mentre que la injecció amb oligos antisentit contra el RNAm de EACC1 no aporta cap avantatge significativa (Rao et al., 2001).

Se sap que concentracions elevades de glutamat en el medi extracel·lular són neurotòxiques (Benveniste, 1991). El glutamat alliberat activarà els receptors ionotròpics de NMDA, AMPA i kainat provocant l'entrada massiva de calci a les neurones postsinàptiques (Hossmann, 1994; Choi, 1988). El glutamat lliure en les sinapsis cerebrals també activarà els seus receptors metabotròpics, i tot i que aquests no participen en l'entrada de calci, la seva activació també condueix a modificacions importants en l'homeòstasi cel·lular. L'activació dels receptors de glutamat també obre canals iònics, per on entra  $\text{Na}^+$  i surt  $\text{K}^+$ .



**Figura 13:** Les sinapsis neuronals glutamàtiques en cas d'hipòxia poden produir mort cel·lular per excitotoxicitat.

### 3. L'augment intracel·lular de calci :

L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivell citosòlic es dona a 3 nivells (Choi, 1992): via receptors glutamàtics, via canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge i per la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars (reticle endoplasmàtic i mitocondries).

L'increment dels nivells de calci intracel·lular activarà un conjunt de vies enzimàtiques que tenen com a resultat final la mort cel·lular. Cal destacar l'activació de fosfolipases que hidrolitzaran els fosfolípids de membrana perdent-se així la integritat de la membrana cel·lular, endonucleases que fragmentaran el DNA, així com diverses proteases. Alguns d'aquests enzims  $\text{Ca}^{2+}$ -dependents, són la xantin-oxidasa, la sintasa

de l'òxid nítric (NOS) i la fosfolipasa A2 (PLA2), que en presència d'oxigen (en el moment de la reperfusió) condueixen a la formació de radicals lliures, els quals són molt lesius per les cèl·lules.

#### 4. L'acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS):

Les ROS són espècies químiques que contenen un o més electrons desaparellats, fet que els hi confereix una reactivitat molt alta. Entre les ROS més importants destaquen: l'òxid nítric (NO), l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i el radical hidroxil ( $OH^-$ ). El  $H_2O_2$  no és estrictament una espècie reactiva, ja que no té un electró lliure, però es considera com a tal per la seva capacitat de donar ions hidroxil.

Les ROS es produeixen degut al metabolisme oxidatiu dels organismes aeròbics, principalment a nivell de les mitocòndries (Halliwell, 1992). Les principals vies de formació de les ROS actuen a través de mecanismes dependents de  $Ca^{2+}$  i són: la PLA2 /àcid araquidònic, la xantina oxidasa i la sintasa de l'òxid nítric.

Les cèl·lules han desenvolupat mecanismes endògens encarregats d'eliminar l'excés de ROS, entre els que hi ha: sistemes enzimàtics com la superòxid dismutasa, i la catalasa i sistemes no enzimàtics com el glutatió i la vitamina E.

En condicions fisiològiques normals, existeix un equilibri entre els mecanismes oxidants i els antioxidants. Quan aquest equilibri es trenca, es produeix una acumulació de ROS, que és potencialment molt tòxica. L'excés dels ROS condueix a una situació d'estrès oxidatiu, ja que provoca la peroxidació de lípids (alterant així la integritat de les membranes cel·lulars), oxidació de proteïnes i dany estructural a nivell del DNA. Totes aquestes modificacions alteren l'homeòstasi cel·lular i condueixen inevitablement a la mort.

En la isquèmia, la reperfusió del teixit després d'un període d'oclusió és la principal responsable de la generació de ROS i de la producció d'aquest dany oxidatiu. El paper de les ROS en els processos de mort neuronal es veu reforçat a partir d'experiments que han demostrat certa neuroprotecció amb agents segrestadors de radicals lliures (com la  $\zeta$ -fenil-n-tert-butil-nitrona o PNB) o amb substàncies antioxidants (Yang et al., 2000). A més cal tenir en compte que el cervell és un dels òrgans més vulnerables a la generació de ROS, degut a la seva elevada taxa metabòlica, la presència d'un gran contingut de lípids oxidables i el fet que presenta uns nivells d'enzims antioxidants més baixos que la resta de teixits.

## 5. L'edema:

Un component important en l'evolució de l'infart és l'edema, el qual es pot definir com l'acumulació anormal de fluid en el parènquima cerebral que produeix un increment en el volum del teixit. En funció del lloc on s'acumula el fluid, que pot ser a l'interior de les cèl·lules o bé extracel·lularment, podem diferenciar dos tipus d'edema: el citotòxic i el vasogènic.

El component **citotòxic** és el degut al desequilibri osmòtic en els nivells de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , degut a les disfuncions de les bombes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases, i per l'efecte neurotòxic dels aminoàcids excitadors com el glutamat que provoquen l'obertura de canals iònics, que permeten l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ . El desequilibri iònic fa que les cel·lules recaptin més aigua, el que provoca un increment transitori del volum cel·lular, que pot contribuir al dany de la membrana cel·lular (Choi, 1988). Els primers afectats són els astròcits a nivell de les dendrites, que augmenten de volum.

El component **vasogènic** es deu a que la barrera hematoencefàlica es veu afectada per la diferència de pressió arterial durant el període d'oclusió i la posterior reperfusió i experimenta problemes d'autoregulació en la permeabilitat a molts components plasmàtics. Proteïnes plasmàtiques com ara l'albumina es poden localitzar a la zona d'infart a les 6 hores de l'oclusió, i s'estenen cap a la perifèria, contribuint a l'extensió del dany al provocar una entrada d'aigua al teixit per osmosis que n'incrementa el volum. Aquesta extensió es fa, preferentment, a través de la substància blanca, ja que ofereix menor resistència. La desaparició de les proteïnes plasmàtiques de l'espai extracel·lular coincideix amb el descens del contingut d'aigua del teixit fins a valors normals. Els astròcits són els principals recaptadors d'aquestes proteïnes plasmàtiques.

### 1.3.2.2 Tipus de mort neuronal:

Molts són els factors que poden desencadenar la mort neuronal, com ara l'estrès oxidatiu, l'excitotoxicitat, disfuncions mitocondrials, alteracions en l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , la manca de factors neurotròfics, etc.

En la isquèmia cerebral, la manca d'oxigen i glucosa comporta un conjunt de canvis metabòlics que poden conduir les neurones inexorablement a la mort. Segons criteris histològics, està descrit que després d'un episodi isquèmic es poden observar dos patrons de mort cel·lular: la necrosi i l'apoptosi. Es produirà l'un o l'altre tipus de mort dependent de la severitat del dany infringit i la zona que estudiem. Així quan l'insult és sever predominarà la necrosi, mentre que en àrees allunyades del punt d'oclusió, com la zona de penombra, veurem apoptosi.

La mort cel·lular en la isquèmia focal té un component necròtic molt important, tot i que en la perifèria del nucli isquèmic es donen processos de mort programada. En molts



casos, però la mort neuronal no encaixa en cap d'aquestes dues categories, manifestant-se simultàniament aspectes dels dos tipus de mort (Castagne et al., 1999).

A continuació resumiré a grans trets les diferències principals entre aquests dos tipus de mort .

<b>APOPTOSI -Mort activa-</b>	<b>NECROSI-Mort passiva-</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- compromet a cèl·lules individuals</li> <li>- la cromatina forma agregats densos en la vorera de la membrana nuclear</li> <li>-patró en 'escala' del gel de DNA</li> <li>-reducció del citoplasma i del volum cel·lular</li> <li>- manteniment de la integritat dels orgànols cel·lulars</li> <li>- la cel·lula es trenca en fragments petits</li> <li>- els fragments cel·lulars son fagocitats</li> <li>- no hi ha inflamació</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- compromet de forma massiva a cèl·lules contigües</li> <li>- la cromatina es condensa en petits agregats en la vorera de la membrana nuclear</li> <li>-patró difús del gel de DNA</li> <li>-increment del citoplasma i del volum cel·lular</li> <li>- els orgànols (mitocondris i reticle endoplasmàtic) sofreixen tumefacció</li> <li>- la cel·lula reventa</li> <li>- el contingut cel·lular és alliberat al medi</li> <li>- hi ha una extensa inflamació</li> </ul>

**Taula 1.** Característiques diferencials entre la mort cel·lular apoptòtica i la mort cel·lular necròtica.

Cal puntualitzar que la mort apoptòtica, amb totes les característiques anomenades en la taula 1, és la que es dona al cervell durant el desenvolupament . En la isquèmia cerebral s'aplica el terme apoptosi a processos de mort que tenen només algunes característiques d'aquesta apoptosi clàssica però que si que impliquen el desenvolupament d'un programa de mort (Ferrer i Planas, 2003) .

### 1. La necrosi :

La necrosi és un tipus de mort passiva, causada per un insult intens i sobtat i que sol afectar a cèl·lules contigües de tota una regió. Es caracteritza perquè les cèl·lules no poden mantenir l'homeòstasi cel·lular, això fa que s'alteri la permeabilitat de la membrana, el citoplasma s'infla i finalment la cèl·lula es lisa. Les neurones necròtiques es poden identificar per microscopia perquè presenten picnosi, cariorexi, cariolisi i una marcada eosinofília (Garcia et al.,1995).

En la isquèmia, les cèl·lules necròtiques es poden classificar en tres estadis. En un primer moment les cèl·lules que es necrosen adopten un canvi edematós i empal·lideixen, el citoplasma s'infla i el reticle endoplasmàtic i l'aparell de golgi deixen de ser visibles. En un segon estadi les cèl·lules experimenten un enfosquiment i el nucli i el citoplasma s'encongeixen. En el citoplasma generalment s'observen grans vacuoles que



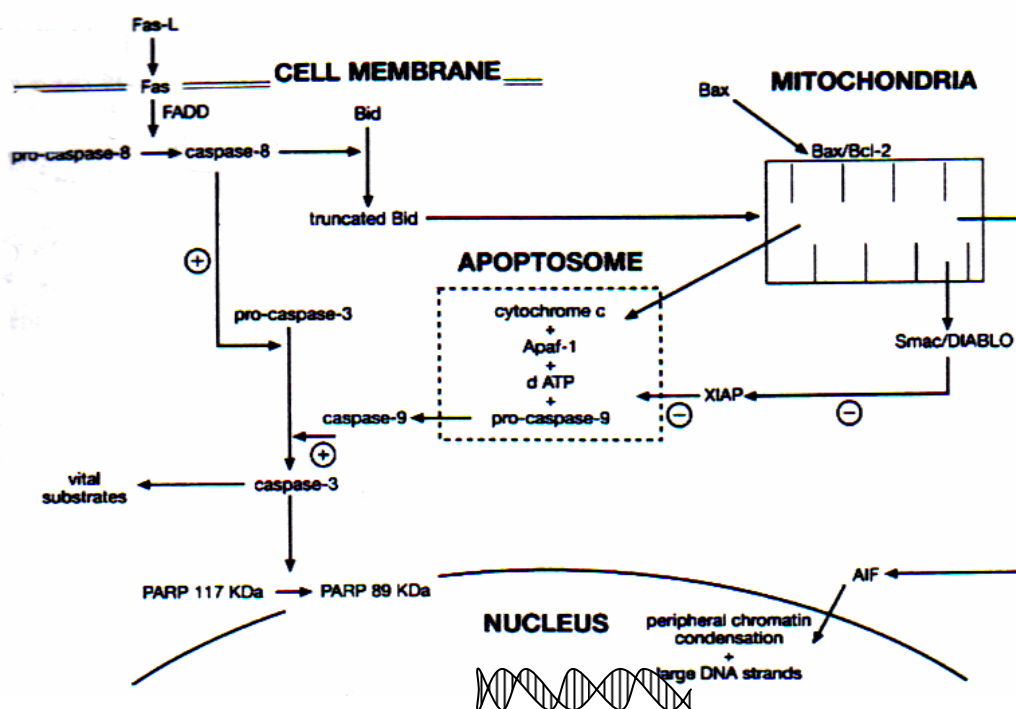
corresponen a les mitocòndries, aparell de golgi i reticle endoplasmàtic hipertrofiats. La cèl·lula acaba adoptant una morfologia triangular. La membrana es fa molt irregular i finalment es trenca. El contingut cel·lular es vessa a l'espai extracel·lular fet que dóna lloc a una resposta inflamatòria. En una última fase més evolucionada, a partir de les 18-24 hores de l'episodi d'isquèmia, les cèl·lules esdevenen molt menys eosinofíliques que les cèl·lules normals, perden totalment l'afinitat per l'hematoxilina, fet que el hi confereix un aspecte absolutament pàl·lid i la denominació de cèl·lules fantasma.

## 2. L'apoptosi :

L'apoptosi és un procés de degeneració activa, que per tant consumeix energia. Es tracta d'una mort programada en la qual la cèl·lula activa de forma seqüencial una sèrie de mecanismes que porten a la seva autodestrucció. Sol afectar a cèl·lules aïllades.

Es caracteritza perquè té lloc la condensació de la cromatina i la fragmentació internucleosomal de l'ADN. Els orgànuls cel·lulars es mantenen intactes. El volum cel·lular experimenta una reducció i en la superfície cel·lular es formen unes protuberàncies amb segrest del contingut cel·lular que acaben formant els cossos apoptòtics. A diferència de la necrosi no hi ha reacció inflamatòria.

En la penombra isquèmica s'ha detectat in vivo activació de senyals de mort programada, tant dependents com independents de caspases, com la promoguda pel Factor Inductor d'Apoptosi (AIF) (Ferrer et al., 2003; Ferrer and Planas, 2003).



**Figura 14:** Esquema dels diferents mecanismes d'apoptosi: la *via extrínseca* (via receptor de mort: Fas) i la *intrínseca* (via mitocòndria) que poden ser caspasa dependents o no. (Ferrer and Planas, 2003).

### 1.3.3. Resposta glial a la isquèmia cerebral:

Les cèl·lules de glia també són sensibles a la isquèmia però en menor grau que les neurones. Així tenim que la isquèmia, com qualsevol trauma en el SNC, provoca que les cèl·lules glials es reactivin. Aquesta reacció glial és molt complexa, té aspectes que es consideren perjudicials en la fase aguda de la isquèmia perquè potencien la inflamació, mentre que també té aspectes beneficiosos per la recuperació del teixit.

Les cèl·lules glials en el SNC en condicions normals actuen de suport per les neurones. Després de la isquèmia les cèl·lules glials experimenten canvis morfològics i funcionals. En un primer moment, reaccionen per tal d'evitar el dany neuronal en la mesura que sigui possible, però a partir del 4rt dia després d'un episodi isquèmic s'ha vist que les cèl·lules glials responen desencadenant una intensa gliosi (Planas et al., 1998) que és perjudicial. Aquesta gliosi es caracteritza per una hipertrofia dels astròcits i una migració i proliferació microglial a nivell de la zona afectada.

#### Reacció astrogliàl:

Els astròcits són un tipus de cèl·lules glials que participen en el suport cel·lular, l'homeòstasi d'ions, l'equilibri redox i en la recaptació d'alguns neurotransmissors com el glutamat. Els astròcits responen a qualsevol trauma a nivell del SNC, intentant preservar la integritat dels teixits i creant una barrera entre la zona danyada i la zona sana que es coneix com **cicatriu glial**.

En resposta a la isquèmia, els astròcits primer intenten mantenir els diferents equilibris alterats (recaptant el glutamat del medi i eliminant el CO<sub>2</sub> format) però també acaben morint en el nucli isquèmic, mentre que en la perifèria es tornen reactius, s'hipertrofien i proliferen donant lloc al fenomen d'astrogliosi (Landis, 1994). Aquesta astrogliosi és el pas dels astròcits d'un estat quiescent a un estat reactiu amb els conseqüents canvis morfològics i funcionals. Quan els astròcits esdevenen reactius presenten una sèrie de marcadors que els diferencien de la resta de població astrogliàl quiescent, els més coneguts dels quals són l'increment en l'expressió de la GFAP (Proteïna Àcida Fibril·lar Glial) i l'aparició de l'expressió de la proteïna Vimentina.

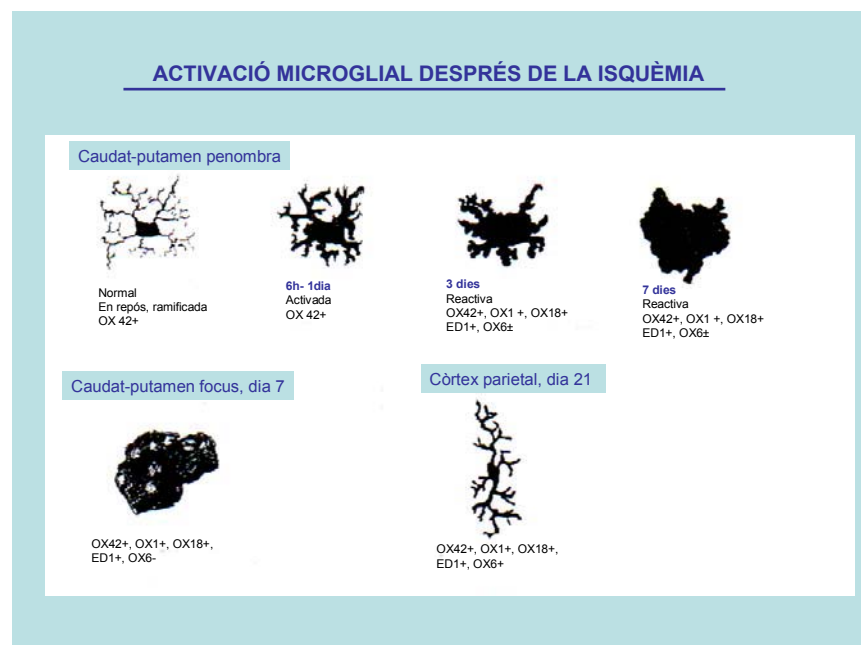
#### Reacció microglial:

Es creu que les cèl·lules microglials que trobem en el SNC deriven dels monòcits presents en sang perifèrica (Ling i Wong, 1993). La principal funció de la microglia és la de fagocitar cèl·lules en degeneració i restes de teixit mort (Banati et al., 1993).

La **microglia ramificada o quiescent** és la que trobem en condicions basals en el cervell adult, en aquest estat aquestes cèl·lules presenten una morfologia estrellada, amb extenses i fines prolongacions. Quan hi ha una lesió cerebral, com ara una isquèmia, les cèl·lules de microglia s'activen i experimenten canvis d'expressió gènica

(incrementen l'expressió de la OX-42 i expressen nous marcadors, entre ells la OX-6). També presenten canvis morfològics (prenen una forma més arrodonida) i es converteixen en el que coneixem com **microglia ameboide o activada**. Aquesta microglia activada sintetitza i secreta al medi un gran nombre de substàncies que participen en la inflamació com: citocines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), proteïnes del sistema del complement, radicals lliures d'oxigen i òxid nítric (Giulian et al.,1993 ).

El paper de la resposta microglial després d'un insult en el SNC sembla tenir dues vessants, certa acció neurotòxica desencadenant processos inflamatoris i de mort neuronal i certa acció neurotròfica, eliminant detritus cel·lulars i promovent la reparació tissular (Kreutzberg,1996). Després d'una isquèmia cerebral, en l'àrea afectada, a part de la microglia pròpia del SNC, també podem trobar macròfags que provenen dels monòcits reactius de la sang que han invaït el teixit lesionat.



**Figura 15:** Esquema dels canvis que es produeixen en la microglia cerebral després d'una isquèmia cerebral. (Adaptat de Lehrmann et al.,1997).

### 1.3.4 Resposta inflamatòria a la isquèmia:

El procés isquèmic desencadena l'aparició d'un procés inflamatori tant a nivell del parènquima com de la paret dels vasos sanguinis cerebrals.

En les reaccions inflamatòries en l'isquèmia cerebral aguda estan implicades: les citoquines, les quimioquines i les molècules d'adhesió intercel·lular.

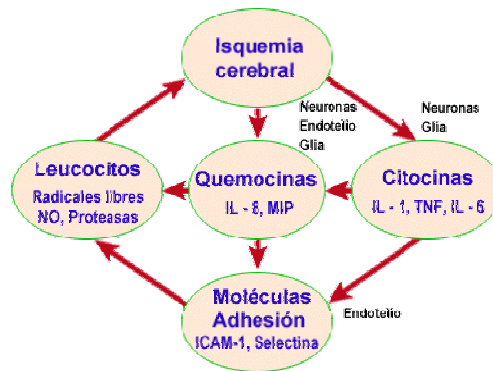
La resposta inflamatòria té com a objectius la protecció i l'aïllament de l'organisme davant estímuls que causen lesió cel·lular. No obstant això, la resposta inflamatòria pot ser també perjudicial i afavorir el dany tissular.

L'activació de la inflamació després de l'isquemia cerebral aguda és un fet conegut des de fa diverses dècades, encara que es desconeixien les seves implicacions fisiopatològiques. El coneixement recent d'alguns dels mecanismes bàsics de la inflamació com l'alliberament de citoquines i quimoquines, o la migració i posterior adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular, ha permès la realització en els últims anys d'estudis que avaluen la repercussió d'aquests mecanismes en la fisiopatologia de la isquèmia cerebral aguda.

La resposta inflamatòria que es desencadena després de l'isquèmia del teixit cerebral està modulada per l'acció de les **citoquines** (figura 16).

La isquèmia aguda provoca una alteració de l'intercanvi iònic a través de la membrana neuronal per fallada energètica de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , que ocasiona un augment del calci intracel·lular i alliberament d'àcids grassos lliures i leucotriens. Aquestes substàncies semblen ser les responsables de la inducció de l'expressió de les citoquines a les neurones i a les cèl·lules gials.

Les principals citoquines que intervenen en la inflamació induïda per l'isquèmia cerebral són: la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosi tumoral (TNF), i l'interleuquina-6 (IL-6).



**Figura 16:** La resposta inflamatòria que es desencadena després de l'isquèmia del teixit cerebral està intervinguda i modulada per l'acció de les citoquines .

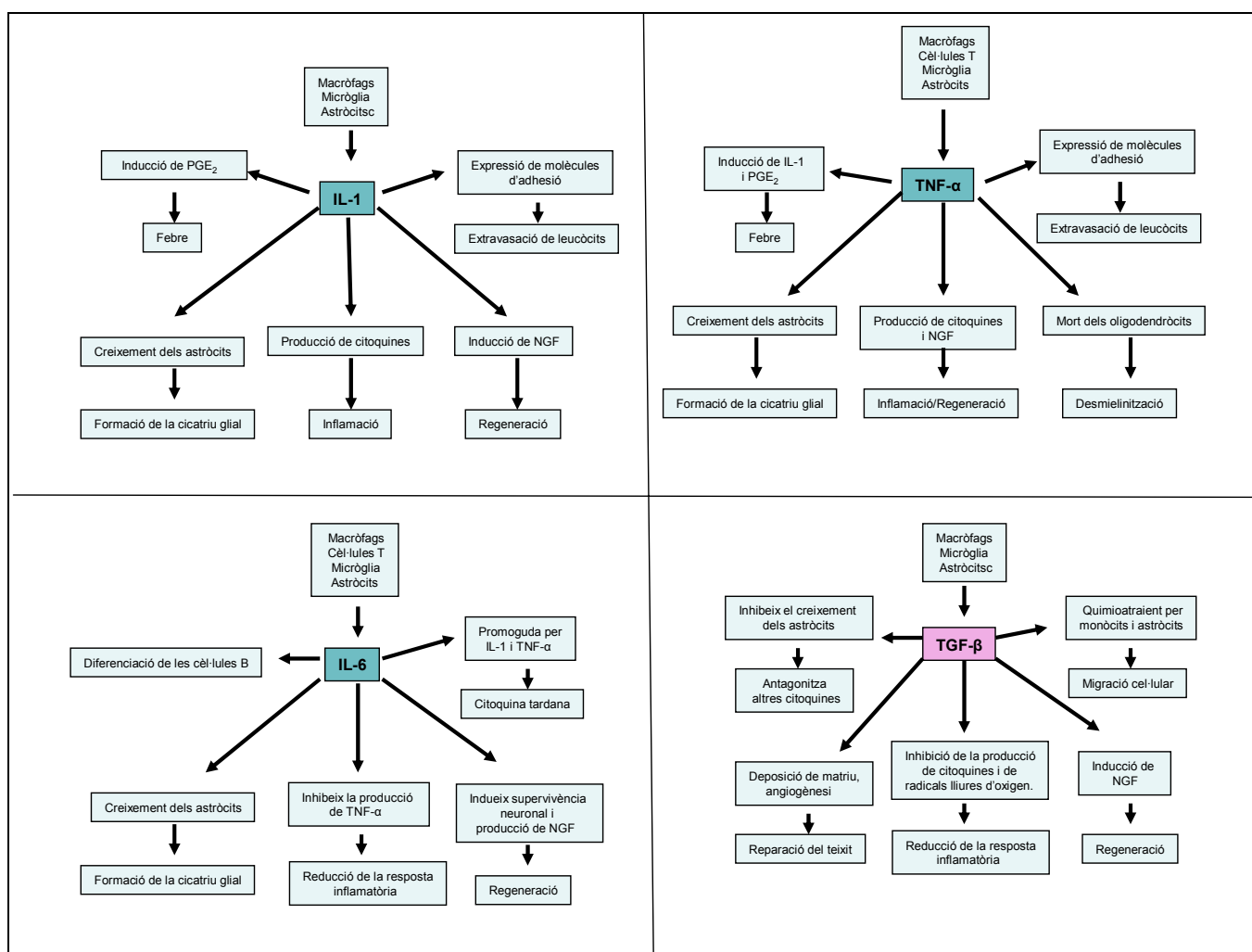
En models d'isquèmia animal s'ha detectat en el teixit cerebral isquèmic un augment de l'expressió del mRNA i de la proteïna del **TNF**, de l'**IL-1**, i de l'**IL-6** una hora després de l'oclusió de l'artèria cerebral mitja, assolint un pic màxim d'expressió al voltant de les 3-6 hores, i aquest increment és major si després de l'oclusió arterial es produeix la perfusió del teixit isquèmic.

En pacients amb infart cerebral en fase aguda s'han corroborat aquestes troballes, i s'ha pogut detectar un increment d'IL-1 i d'IL-6 al líquid cefaloraquídi i en el plasma. A més, les concentracions plasmàtiques d'aquestes citoquines s'han correlacionat amb un major volum de lesió i, en alguns estudis, amb un pitjor pronòstic funcional.

Les citoquines indueixen l'alliberament de **quimioquines**, importants per a la quimiotaxis dels leucòcits cap a la regió isquèmica. La més important és la interleuquina-8 (**IL-8**) que intervé en el reclutament dels neutròfils, i l'alliberament de la qual està induït per la IL-1 i el TNF.

En models animals, els neutròfils apareixen als capil·lars del teixit isquèmic als 30 minuts de l'inici de la isquèmia encara que el pic de màxima infiltració es produeix a les 12-24 hores.

En pacients amb infart cerebral s'ha observat un augment de l'expressió cel·lular del RNAm de la IL-8, així com un increment dels seus nivells plasmàtics durant les primeres 24 hores. El perfil temporal de reclutament leucocitari en pacients amb infart cerebral agut ha estat estudiat amb SPECT seriats amb leucòcits marcats amb Tc-HMPAO( Fassbender et al.,1995). La infiltració de neutròfils es va detectar a les 6 hores de l'inici de l'infart cerebral, i el grau d'infiltració leucocitària en el SPECT es va correlacionar amb el volum de l'infart cerebral i el pronòstic funcional .



**Figura 17:** Resum dels efectes produïts per les principals citoquines produïdes després d'una isquèmia.

Reclutats els leucòcits en l'àrea isquèmica, aquests interaccionen amb l'endoteli a través dels mecanismes d'adhesió, activació i transmigració. En aquests complexos mecanismes intervenen **les molècules d'adhesió** del leucòcit i de l'endoteli, l'expressió del qual a la superfície és prèviament induïda per l'acció de les citokines i les quemoquines (figura 18). Les **selectines** intervenen en la primera fase de l'adhesió leucocitària, encarregant-se del procés de marginació leucocitària, on el leucòcit s'adhereix de forma feble a l'endoteli. Les immunoglobulines **ICAM-1** i **VCAM** són importants per a l'adhesió estable i posterior transmigració endotelial dels leucòcits. En aquest procés l'ICAM-1 de l'endoteli s'uneix a l'integrina LFA-1 i MAC-1 del leucòcit, i la VCAM a l'integrina VLA-4, formant unions estables.

En models experimentals d'isquèmia animal s'han detectat increments de l'expressió del mRNA en el teixit cerebral isquèmic i en pacients amb infart cerebral agut augments de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM, i selectina E i P durant la fase aguda (Tarkowski et al.,1995).

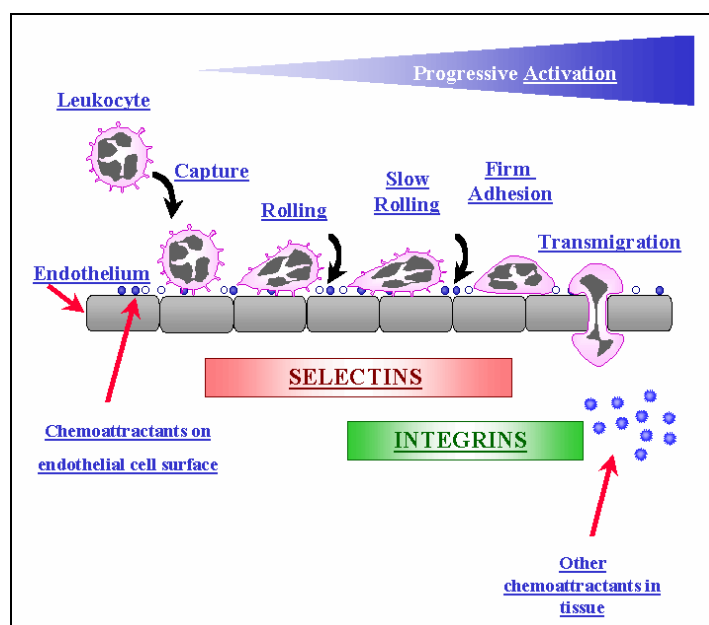
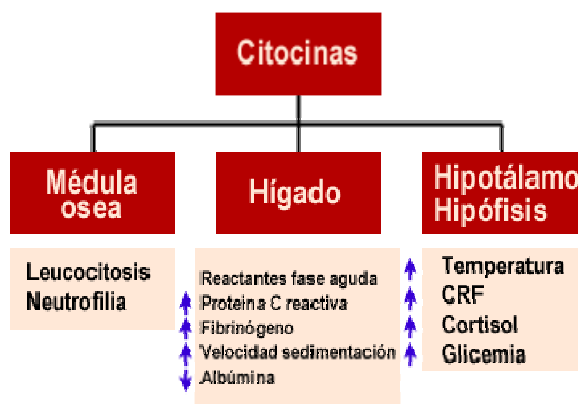


Figura 18: Esquema de la interacció entre els leucòcits i l'endoteli.

Les citokines proinflamàtores a més d'aquests efectes locals, exerceixen **accions sistèmiques** (figura 19). La IL-1 és una de les substàncies capaces de desencadenar la resposta d'estrés mitjançant l'activació de l'eix hipotàlem-hipofisari-adrenal. Com a conseqüència, després d'un infart cerebral s'eleva els nivells de factor alliberador de corticotropina (CRF) i de cortisol plasmàtics. L'estimulació hipotalàmica en la fase aguda de l'infart cerebral podria ser responsable dels increments de temperatura i de glicèmia freqüentment observats en pacients amb infart cerebral. La IL-1, mitjançant l'acció de la IL-6, induïx la síntesi hepàtica dels reactants de fase aguda com la proteïna C reactiva i el fibrinogen, i disminueix altres reactants com l'albumina. Diversos estudis

han demostrat una bona correlació entre les concentracions plasmàtiques de citocines i reactants de fase aguda com la proteïna C reactiva i la velocitat de sedimentació, per la qual cosa aquests paràmetres podrien ser marcadors accessibles de l'activitat de les citocines durant la fase aguda de l'infart cerebral.



**Figura 19:** Efectes sistèmics de les citocines.

### La inhibició de la inflamació podria tenir un paper neuroprotector en la isquèmia cerebral?

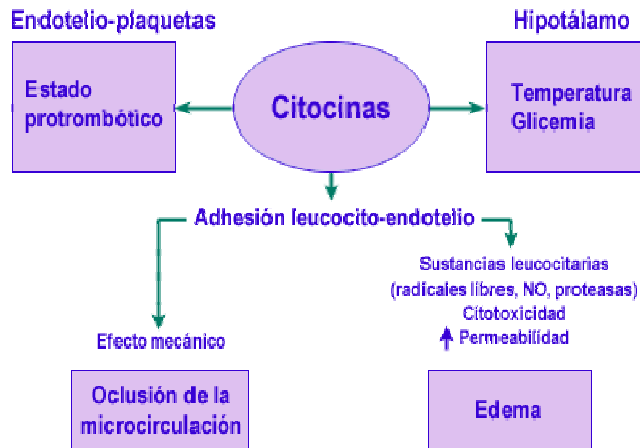
La inhibició o modulació de les citocines pot disminuir el dany cerebral isquèmic en la fase de reperfusió. Diversos estudis en models experimentals d'isquèmia han demostrat una reducció de la mida de l'infart cerebral, de la formació d'edema i de l'infiltrat leucocitari amb la inhibició de citocines (antagonista del receptor d'IL-1), o de les molècules d'adhesió (anti ICAM-1, antiCD11a, antiCD18).

A més, ha estat possible augmentar la finestra terapèutica del tractament amb fibrinolítics amb la utilització d'anti-ICAM-1 en models experimentals. No obstant, els estudis en pacients no han estat concloents. L'Enlimomab Acute Stroke Trial va estudiar de forma randomitzada l'eficàcia i seguretat d'un inhibidor de la ICAM-1, ja en la fase III, en 625 pacients amb infart cerebral de menys de 6 hores d'evolució i va concloure que la seva administració endovenosa durant 5 dies no millorava el pronòstic funcional avaluat amb l'escala de Rankin als 90 dies (The Enlimomab Acute Stroke Study Investigators, 1997).

Les citocines poden empitjorar la isquèmia tissular en l'infart cerebral agut per diversos mecanismes (figura 20). Els leucòcits activats poden alliberar substàncies com: òxid nítric, elastasa, mieloperoxidasa, radicals lliures, etc, que en conjunt tenen un efecte citotòxic sobre les membranes i l' endoteli, i també produeixen vasodilatació i augment de la permeabilitat (Kim,1996) que porta al pas de proteïnes i aigua desde l' espai vascular a l' 'espai extracel·lular amb formació d'edema. Els leucòcits també intervenen en el "fenomen del no reflux". Estudis experimentals amb microscopia electrònica han demostrat que els leucòcits obstrueixen la microcirculació en el teixit isquèmic encara que hi hagi una ràpida reperfusió arterial. Per tant, el teixit cerebral sotmés a isquèmia pot seguir en aquesta situació encara que la restauració del flux a través de l' artèria prèviament ocluida es doni

aviat (Kochanek et al.,1992). Las citoquines tenen també efectes protrombòtics ja que inhibeixen l'efecte anticoagulant de l'endoteli mediat per la proteïna C, i activen les plaquetes.

Un altre mecanisme pel que les citoquines poden empitjorar la isquèmia és per la inducció hipotàlam-hipofisària de l'augment de la temperatura i de la glicèmia. Estudis clínics han observat que són factors predictius de mal pronòstic funcional en pacients amb infart cerebral agut.



**Figura 20:** Mecanismes inflamatoris de lesió tissular en la isquèmia cerebral aguda.

## 2. LES METAL·LOPROTEINASES DE LA MÀTRIU EXTRACEL·LULAR:

### 2.1 Concepte i classificació:

Les metal·loproteïnases de matriu (MMP) constitueixen una família multigènica de proteases dependents del zinc i calci, secretades o membranals (tipus membranals de MMP, MT-MMP) que, actuant a pH neutres, tenen com a principal finalitat la degradació de la majoria dels components de la matriu extracel·lular (MEC) (Matrisian,1990 ;Murphy,1995).

Les MMP controlen per proteolisi l'activitat de components de la matriu extracel·lular i de molècules membranals o solubles implicades en la transmissió dels senyals intercel·lulars tals com: les citoquines, els quimioquines, els factors tròfics, les proteïnes d'adherència i diferents receptors.

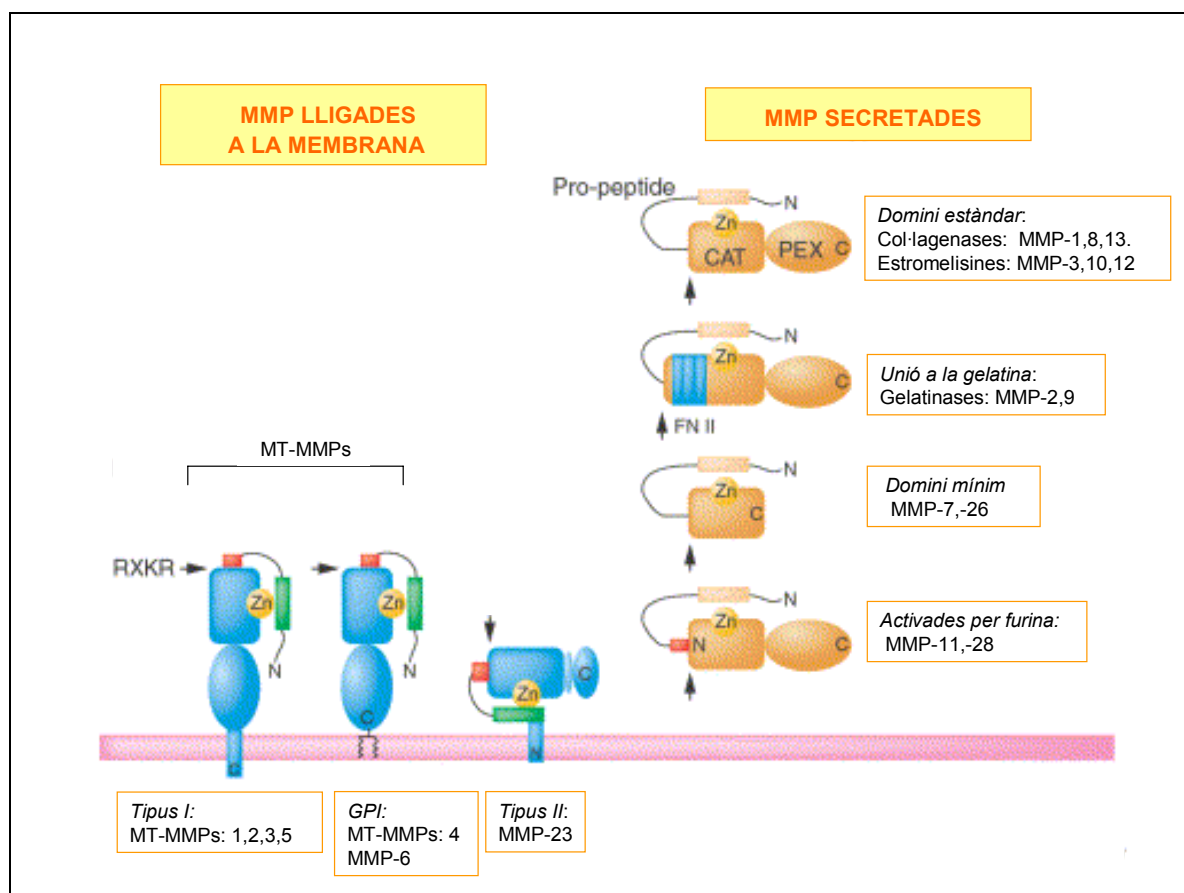
Les MMPs són part important en la majoria de processos fisiològics que requereixen el recanvi de la MEC i tenen un paper ben definit en diversos processos cel·lulars com: la proliferació, l'apoptosi i la morfogènesi tissular. A més d'aquesta finalitat reparadora i remodeladora també han estat implicades en una àmplia varietat de processos patològics: disseminació de metàstasis tumorals, artritis, formació d'aneurismes, aterosclerosi, emfisema pulmonar, etc. Més recentment, ha estat descrita



la seva implicació en el processament de citoquines i factors de creixement (Suzuki et al.,1997), en l'apoptosi (Kayagaki et al.,1996) i en l'activació del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Black et al.,1997).

Fins ara, s'han identificat uns 25 membres de la família de les MMPs. Són una família d'enzims en continua expansió i, és probable que en el moment actual s'estiguin incorporant nous membres a la ja extensa llista que es coneix.

De forma sintètica, les MMPs poden definir-se per les següents característiques: 1) comparteixen seqüències aminoacídiques comunes, 2) la seva acció proteolítica és inhibida pels inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases o TIMPs, 3) són secretades com a proenzims o bé existeixen com a proenzims transmembrana, però, en qualsevol cas, requereixen ser activades per dur a terme les seves accions com a MMPs, 4) el lloc actiu conté cinc ( $Zn^{2+}$ ) i requereix un segon cofactor com el calci ( $Ca^{2+}$ ), i 5) l'activitat enzimàtica és òptima en pHs fisiològics.



**Figura 21:** Classificació actual de les MMPs segons l'estructura en dominis de la proteïna. Existeixen MMPs secretades i MMPs lligades a la membrana cel·lular. (Seiki, 2002).

Tot i que la tendència actual és la de classificar-les segons l'estructura en dominis de la proteïna (veure figura 21), el criteri clàssicament usat per a la seva classificació és el substrate sobre el que les MMPs han mostrat especificitat (Taula 2). Així actualment es coneixen sis subfamílies de MMPs:

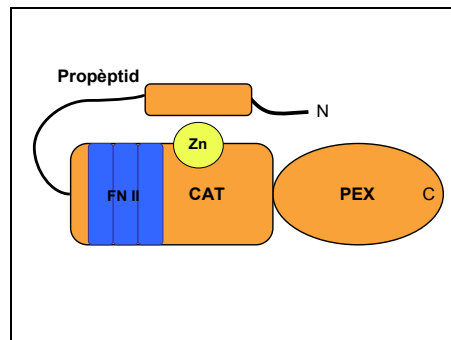
- 1) les *col·lagenasses*, que degraden el col·lagen del teixit connectiu.
- 2) les *gelatinasses*, que actuen sobre els col·lagens tipus IV, V, VII i X, l'elastina i els col·lagens desnaturalitzats.
- 3) les *estromelissines*.
- 4) la *matrilissina*, que degraden el nucli de proteoglicans de les proteïnes, la laminina, la fibronectina, l'elastina i la gelatina.
- 5) la *metal·loelastassa macrofàgica*, que actua sobre l'elastina insoluble, el col·lagen IV, la fibronectina, la laminina i els proteoglicans.
- 6) les *MMPs de membrana* (MT-MMP), que degraden la fibronectina, la laminina i altres MMPs .

GRUP	IDENTIFICACIÓ	NOM COMÚ
Col·lagenasses	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Col·lagenassa intersticial Col·lagenassa dels neutròfils Col·lagenassa-3
Gelatinasses	MMP-2 MMP-9	Gelatinasa-A Gelatinasa-B
Estromelissines	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Estromelissina-1 Estromelissina-2 Estromelissina-3
Matrilissines	MMP-7	Pump-1, Matrilissina
Metal·loelastassa	MMP-12	Metal·loelastassa macrofàgica
Metal·loproteïnasses de membrana	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	MT-MMP-1 MT-MMP-2 MT-MMP-3 MT-MMP-4
Miscel·lània	MMP-19 MMP-20	RASI-1 Enamelissina

**Taula 2.** Classificació clàssica de les Metal·loproteïnases de la matriu segons el substrate.

## 2.2 Estructura

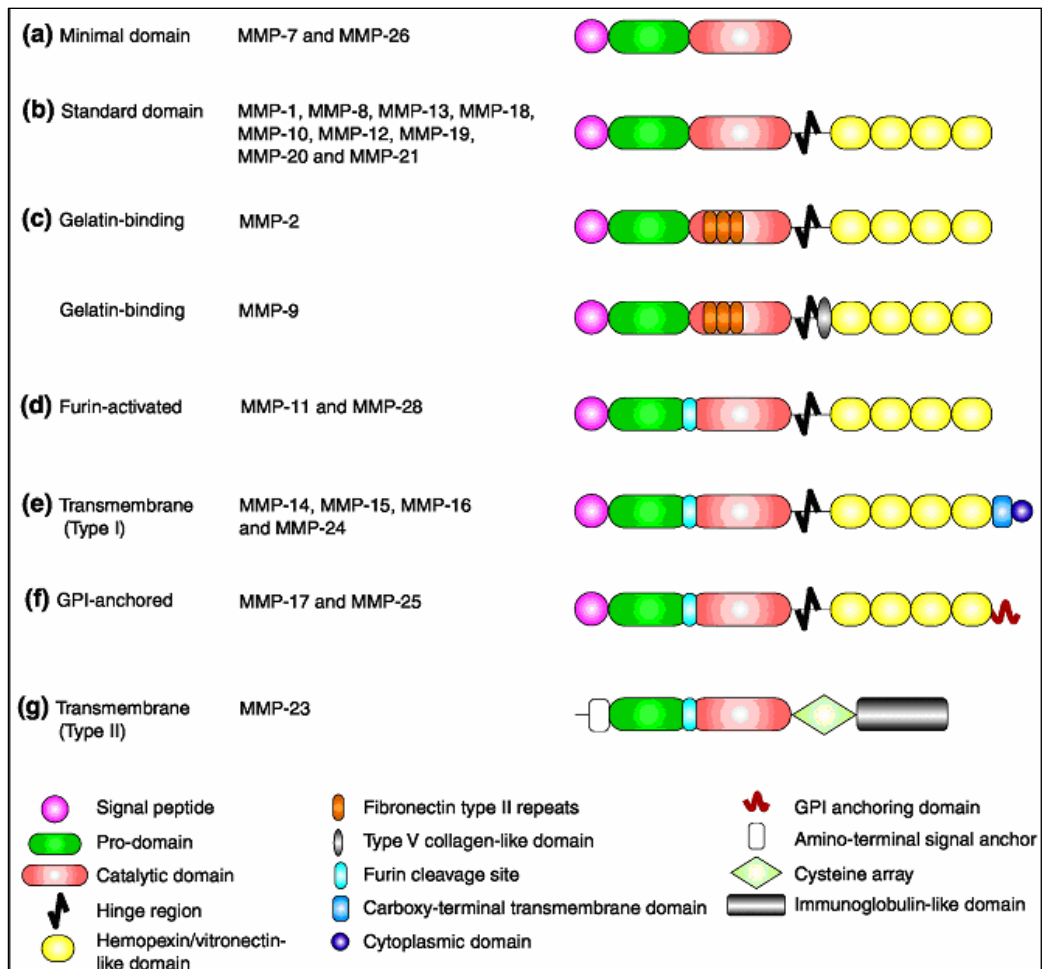
Totes les MMPs contenen *tres dominis* diferents: el propèptid (extrem N-terminal), el domini catalític i el domini similar a la pexina (extrem C-terminal), que poden ser identificats en la seqüència de DNA d'aquestes proteïnes, cadascun dels quals desenvolupa una funció específica.



**Figura 22:** Estructura de les gelatinases (MMP-2 i MMP-9) amb els tres dominis: propèptid, domini catalític i domini similar a la pexina.

L'estructura en dominis de les gelatinases A i B (MMP-2 i MMP-9) és el prototipus de la família de MMPs (Figura 22). S'hi han identificat els següents dominis: el **propèptid**, d'aproximadament 100 residus, conté un segment de 8 aminoàcids estables, PRCGVPDV, l'escisió dels quals activa les MMPs latents. El **domini catalític**, format per 162 a 173 residus, conté el lloc actiu que s'unirà a  $Zn^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  per tal de dur a terme la seva acció. Les gelatinases presenten una seqüència similar a la fibronectina inserida al domini catalític que les diferencia de la resta de MMPs. El domini C-terminal similar a la pexina conté entre 202-213 aminoàcids, i és comú a totes les MMPs, a excepció del Pump. La gelatinasa B conté una inserció pel col·lagen a l'extrem C-terminal del domini catalític. Aquests dominis extrems, específics de les gelatinases, venen determinats exogènica.

Les seqüències aminoacídiques de totes les MMPs són similars, i presenten un alt grau de conservació entre cada tipus d'enzim en les diferents espècies de mamífers (un 80% de similitud entre col·lagenases i estromelissines). La semblança entre enzims és menor, tot i que es manté al voltant d'un 50%.

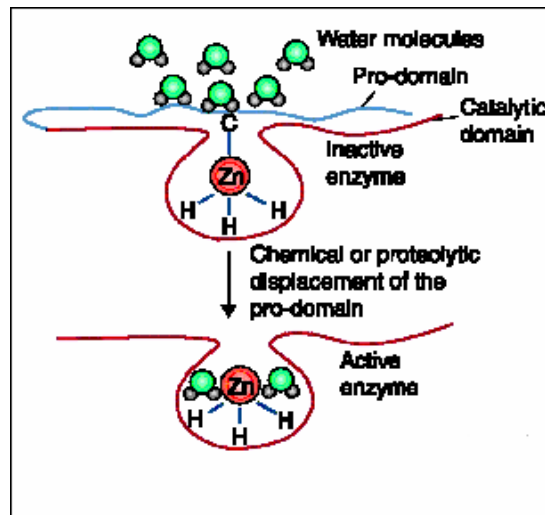


**Figura 23:** Similituts i diferències estructurals del diversos tipus de MMPs.

### 2.3 Mecanismes que regulen la seva activitat:

Donada la quantitat de substrats sobre els que actuen les MMPs, la seva regulació espacial i temporal és necessàriament restrictiva i es produeix a diversos nivells, tant a nivell de la seva *expressió gènica*, com a nivell de control de la *seva activitat* enzimàtica mitjançant l'activació de les formes proenzimàtiques i la seva inhibició pels TIMPs i altres inhibidors naturals.

Les MMPs són enzimàticament activades per la proteolisi del propèptid. Aquest procés pot ser iniciat per l'activitat proteolítica exògena o pel desplaçament químic del pro-domini mitjançant reaccions autocatalítiques (figura 24).



**Figura 24:** Les proMMPs es secreten com a zimògens inactius que tenen ocult el centre actiu. Es poden activar per proteolisi o pel desplaçament químic del pro-domini.

La regulació de l'expressió i l'activitat de les MMPs sembla ser un procés molt complex. Com exemple es pot prendre el cas de la MMP-9 (Dzwonek et al., 2004). **L'activació de la MMP-9 en neurones comporta molts nivells de regulació** (Figura 25):

- A nivell transcripcional existeixen seqüències reguladores de l'expressió gènica de la MMP-9 entre les que destaquen: AP-1 i NF- $\kappa$ B.
- Una vegada produït el RNAm de la MMP-9 és regulat el seu nivell d'estabilitat per òxid nítric (NO); i pot ser translocat en neurones cap a les dendrites activades. La MMP-9 conté seqüències ARE-like que recentment s'estan implicant en la translocació dels ARNs missatgers.
- La proteïna es sintetitza al reticle endoplasmàtic, on la glicosilació de la MMP-9 li confereix un nivell addicional de regulació. El pròxim pas és l'exportació de la proteïna MMP-9, en vesícules, a l'espai extracel·lular.
- Les MMPs són produïdes per les cèl·lules en una forma inactiva (proMMP) on el residu de cisteïna de la regió del propèptid està unida a un àtom de zinc present en el domini catalític. L'activació completa de la proteïna és produïda per la interrupció de la interacció entre la cisteïna i el zinc per proteolisi enzimàtica del propèptid. L'activació del proenzim està controlada per una cascada de passos que impliquen a unes altres MMPs i al sistema de la plasmina.

La MMP-2 pot activar la pro-MMP-9. A més, la pro-MMP-9 pot formar un complex amb el TIMP-1, unint el seu domini C-terminal (no catalític) amb el domini C-terminal (no inhibitori) del TIMP-1. Aquest complex pot interactuar amb la MMP-3 i llavors dissociar-se en la pro-MMP-9 lliure i un complex format per TIMP-1 i MMP-3.

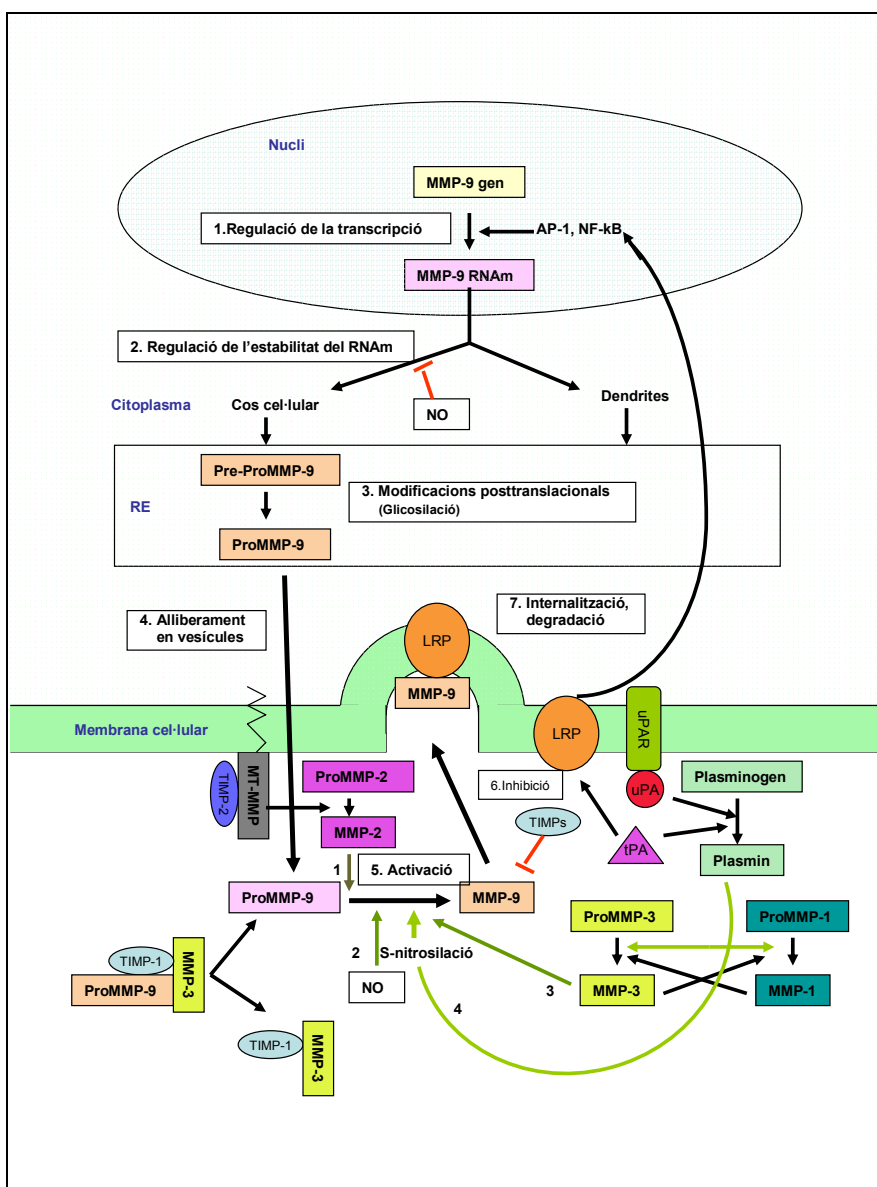
La S-nitrosilació de la MMP-9 és un altre mecanisme d'activació de la MMP-9.

La plasmina generada a partir del plasminogen pot activar a la MMP-9 per via directa o indirecta(via l'activació de la MMP-1 i la MMP-3). Aquesta plasmina és produïda pels l'activadors del plasminogen: tant el tissular (tPA) com el de tipus uroquinasa (uPA).

El tPA però, pot actuar sobre la MMP-9 també d'una manera plasmina-independent, ja que pot unir-se a la proteïna relacionada amb el receptor de la lipoproteïna de baixa densitat (LDL-RP) i regular indirectament la transcripció gènica de la MMP-9.

- La LRP també pot actuar com a receptor de la MMP-9 i mediar la internalització i degradació de l'enzim.

- Finalment, l'activitat de la MMP-9 pot ser inhibida pels TIMPs.



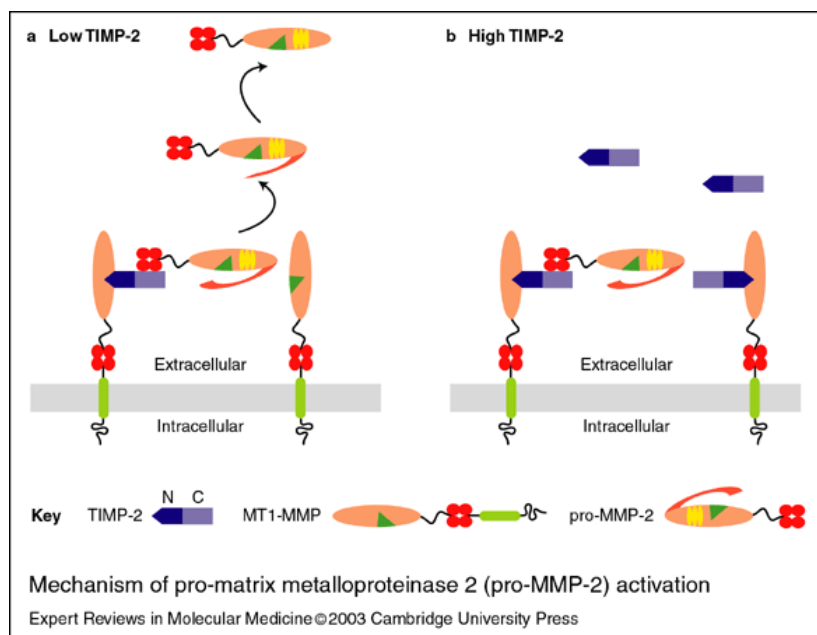
**Figura 25:** Representació esquemàtica dels nivells de regulació implicats en l'activació de la MMP-9.(Dzwonek et al., 2004).

Un altre exemple de la regulació de l'activitat de les MMPs seria el **mecanisme d'activació de la pro-metal·loproteïna 2 (pro-MMP-2)** que apareix en la figura 26.

La metal·loproteïna de membrana-1 (MT1-MMP) en la superfície cel·lular actua com un receptor de l' inhibidor tissular de metal·loproteïnases- 2 (TIMP-2). El TIMP-2 s'uneix via el seu domini N-terminal al lloc actiu de la MT1-MMP. Aquest complex binari actua com un receptor de la pro-MMP-2, unint-se el domini C-terminal de TIMP-2 al domini C-terminal de la pro-MMP-2. Una molècula lliure de MT1-MMP pròxima pot llavors tallar el propèptid de la pro-MMP-2, generant una espècie intermitja. Després de la proteolisi del propèptid mitjançant un mecanisme autocatalític es genera l'enzim actiu. L'activació de la pro-MMP-2 en aquest model és sols possible si la concentració de TIMP-2 és baixa, amb la quantitat suficient de TIMP-2 per generar el complex trimolecular però no suficient per a saturar totes les MT1-MMPs necessàries per la proteolisi del propèptid (Figura 26 a).

Però si els nivells de TIMP-2 són elevats, aquest pot unir-se i inhibir tota l'activitat de la MT1-MMP, impedit l'activació de la pro-MMP-2 . (Figura 26 b).

Es pot observar que els TIMPs no sols actuen com a inhibidors de les MMPs sinó que també participen en la seva activació. Així doncs, seria més apropiat considerar-los reguladors de l'activitat de les MMPs i no sols inhibidors.



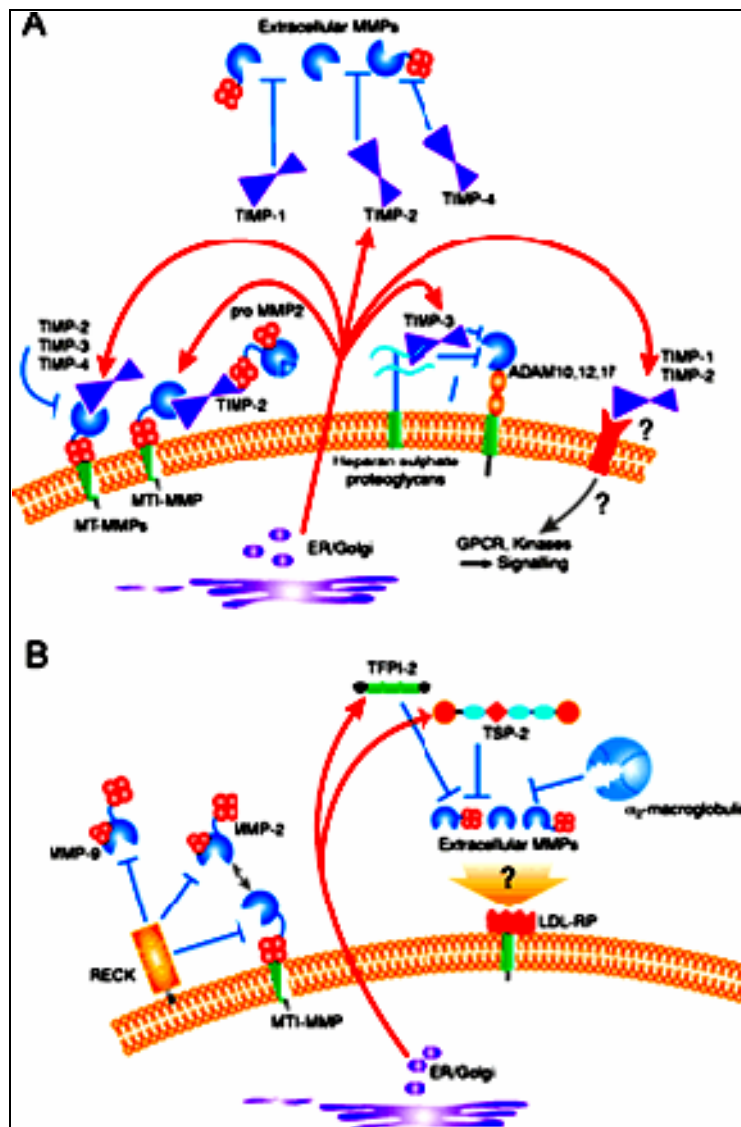
**Figura 26:** Mecanisme d'activació de la pro-metal·loproteïna 2 (pro-MMP-2) .

### ***Inhibidors fisiològics de les MMPs:***

Existeixen dos tipus principals d'inhibidors fisiològics de les MMPs: una família d'inhibidors específics de les MMPs (els TIMPs) i uns altres menys coneguts. (Figura 27 ).

Entre els inhibidors de les MMPs menys coneguts hi ha:

- La proteïna *RECK* (reversion inducing cysteine rich protein with Karal motifs): és una GPI-glicoproteïna lligada a la membrana (Oh et al.,2001) però que no s'ha localitzat en el cervell (Takahashi et al.,1998).
- La  *$\alpha$ 2-macroglobulina*: té una activitat restringida donat el seu gran volum (780 kD) però té accés a l'espai pericel·lular en els teixits vascularitzats i podria estar involucrada en l'endocitosis de les MMPs via la " low density lipoprotein receptor-related protein" (LDL-RP).
- La *LDL-RP*: té un paper en l'eliminació de la MMP-2 via la formació d'un complex amb la trombospondina-2 (TSP-2) i en l'eliminació directa de la MMP-9.
- L'Inhibidor de la via del factor tissular o "tissue factor pathway inhibitor" (*TFPI-2*): s'ha descrit com un agent inhibidor de les MMPs (Herman et al.,2001) present en les neurones del cervell normal i disminuït en els gliomes humans (Rao et al.,2001).



**Figura 27:** Inhibidors de les MMPs en l'entorn pericel·lular. (A) Inhibidors Tissulars de les metal·loproteinases (TIMPs). (B) Altres inhibidors. (Baker et al., 2002).



Els inhibidors de les MMPs més coneguts són els Inhibidors Tissulars de les Metal·loproteïnases o **TIMPs**.

Hi ha dos trets característics de la interacció entre TIMPs i MMPs: 1) una afinitat molt elevada i 2) diferències pel que fa a l'especificitat dels diversos TIMPs, tot i l'alt grau de semblança entre les seves seqüències.

En el moment actual s'ha identificat quatre inhibidors en mamífers: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. La pluralitat dels TIMPs suggereix que podrien tenir propietats funcionals diferents i en aquest sentit s'ha publicat algunes diferències pel que fa a les seves accions inhibidores, tot i que cadascun dels TIMPs poden unir-se a la majoria de MMPs. Així TIMP-2 i TIMP-3, a diferència de TIMP-1, són inhibidors efectius de les MT-MMPs, mentre que TIMP-3, però no TIMP-1, -2 o -4, és un bon inhibidor de l'enzim convertidor del TNF- $\alpha$  (TACE). També la forma com TIMP-1 i TIMP-2 interaccionen amb la MMP-2 és diferent. El TIMP-2 actua en conjunció amb la MT1-MMP com a receptor de la pro-forma de la MMP-2 en la superfície cel·lular, permetent-ne una eficient activació. En alguns tipus cel·lulars, el TIMP-1 i el TIMP-2 poden tenir receptors directament units a vies de transducció de senyals que regulen el comportament cel·lular.

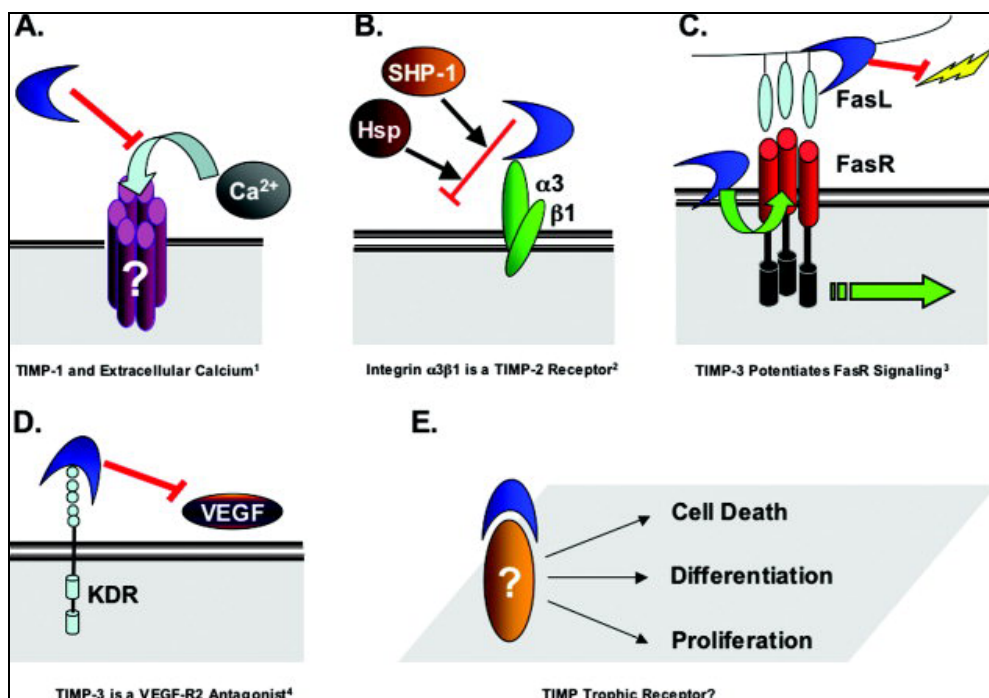
	Locus del Gen	Gens de sinapsines que els contenen <sup>1</sup> , i en quin intró.	Tamany de la proteïna	Localització Extracel·lular	Proteases que inhibeix	Funcions Adicionals
<b>TIMP-1</b>	X11p11.23–11.4	I (intró V)	28.5 KD	Secretat i en l'interior cel·lular	Totes menys la MT1-MMP ADAM-10	- Neurotrofisme - Translocació nuclear durant el cicle cel·lular
<b>TIMP-2</b>	17q23-q25	IV	21 KD	Secretat i unit a la membrana associat a pro-MMP-2.	Inhibeix totes les MMPs	- "gen de resposta immediata" - Antiapoptòtic - Neurotrofisme
<b>TIMP-3</b>	22q12.1-q13.2	III (intró V)	24–36 KD	Membranal	MMP-1, -2, -3, -7, -9 MMP-14 ADAM-10, -12S, -17 ADAM-TS4, -TS5	- Activa pro MMP- 2, MT-MMP-1. - Inhibidor de l'angiogenesis - Antagonista de VEGF-R2 - Estabilitza receptors amb dominis de mort . - "Supressor de tumors"
<b>TIMP-4</b>	3p25	II (intró V)	23 KD	Secretat	MMP-1, -2, -3, -7, -9	- No es coneixen

**Taula 3.** Característiques de la família de proteïnes TIMPs dels mamífers .<sup>1</sup>El TIMP-2 no s'ha localitzat dins dels gens de les sinapsines però sí molt pròxim al de la sinapsina IV en el cromosoma 1. (Crocker et al., 2004).

Sembla ben clar que el paper fonamental d'aquestes mol·lècules té lloc en la remodelació tissular, mitjançant la seva capacitat per inhibir les MMPs al formar complexos enzim-inhibidor. Nombrosos estudis han mostrat que els TIMPs poden aturar la invasió cel·lular, la tumorigènesi i l'angiogènesi.

Ademés d'aquestes activitats dels TIMPs, atribuïdes a la inhibició de certes MMPs, avui en dia es coneixen tot un seguit d'altres funcions independents de la seva acció inhibidora sobre les MMPs (Crocker et al.,2004) (figura 28):

- La neuroprotecció amb TIMP-1 de les neurones d'hipocampals cultivades enfront de la mort per excitotoxicitat està relacionada amb un menor augment del calci intracel·lular provocat pel glutamat (Figura 28a).
- S'ha identificat molt recentment la integrina  $\alpha 3\beta 1$  com un receptor de TIMP-2 que ocasiona la inhibició del factor de creixement dels fibroblasts (FGF) i de l'angiogènesis provocada per VEGF bloquejant l'associació de HSP60 i SHP-1 a aquest receptor (Figura 28b).
- L'expressió augmentada de TIMP-3 augmenta la mort cel·lular mediada per Fas a través de l'estabilització del receptor Fas (FasR) així com evitant la proteolisi de FasL en la matriu extracel·lular (Figura 28c).
- El TIMP-3 s'uneix directament al domini KDR dels receptors de VEGF (VEGF-R2) i bloqueja la senyalització provocada per VEGF (Figura 28d).
- S'han observat efectes notables de proteïnes TIMP sobre la proliferació, diferenciació i mort cel·lular que han portat a especular que els receptors dels TIMPs (p. ex., la integrina  $\alpha 3\beta 1$  per a TIMP-2) poden intervenir en aquestes funcions auxiliars, encara que aquests receptors són encara desconeguts (Figura 28e).



**Figura 28:** Accions dels TIMPs (mitges llunes blaves), no relacionades amb les MMP.(Crocker et al., 2004).

## 2.4 Paper fisiològic i patològic del sistema MMP/TIMP:

### 2.4.1 Les MMPs en l'ontogènesi del sistema nerviós, la plasticitat neuronal i la migració :

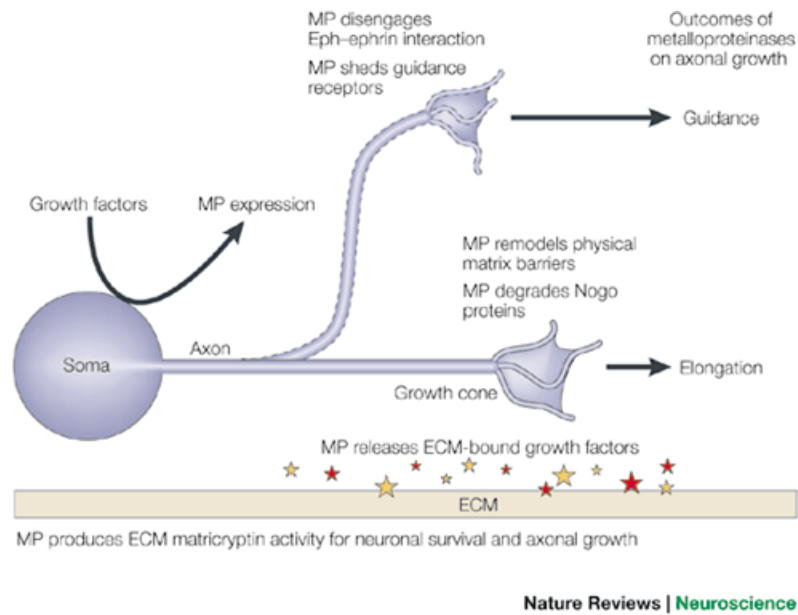
La distribució espai-temporal de nombroses MMP i dels quatre TIMP varia segons els diferents estadis de desenvolupament del sistema nerviós suggerint un paper en la seva **ontogènesi**. Així, les variacions d'expressió de TIMP-1,-2 i -3 i de MMP-2,-3 i -9 estan estretament vinculades a les etapes successives del desenvolupament postnatal del cerebel (Valliant et al.,1999). L'expressió de la MT5-MMP, una MMP membranar essencialment expressada al cervell, varia en el transcurs de l'ontogènesi, amb un pic en el naixement. Aquesta expressió continua sent elevada en estructures considerades com plàstiques (cerebel, hipocamp i bulb olfactiu), suggerint igualment una implicació de la MT5-MMP en els processos fisiològics de plasticitat neuronal (Jaworski et al.,2000).

La primera al·lusió a una contribució del sistema MMP/TIMP en la **plasticitat neuronal** es remunta a 1993, quan Y. Citri i el seu equip van mostrar una forta inducció del TIMP-1 a les neurones dels grans del girus dentat en el transcurs de la potenciació a llarg termini en un model d'estudi de la plasticitat (Rivera et al.,1999). El *gen timp-1* es va incloure llavors entre els gens potencialment implicats en la plasticitat (candidate plasticity gene).

La plasticitat neuronal es caracteritza, entre d'altres, per processos de creixement de les neurites i algunes dades permeten ja implicar el sistema MMP/TIMP en l'axogènesi: en preparacions de medul·la espinal, els inhibidors de metal·loproteases inhibeixen la proteolisis de DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma), un receptor de la netrina-1, factor que permet la conducció dels axons. D'aquest fet en resulta una potencialització dels efectes de la netrina-1 i s'ha proposat que l'activitat de les metal·loproteases podrien controlar la migració axonal modulant el nombre de receptors de netrina-1 en la superfície dels axons (Galko et al.,2000).

El creixement axonal està potenciat per diferents factors neurotròfics però ens queda molt per aprendre en quant als seus «efectors». Ara bé, s'ha vist en neurones dels ganglis dorsals que el NGF (nerve growth factor) indueix la síntesi de MMP-2: l'estimulació de l'axogènesi pel NGF està vinculada a la degradació per MMP-2 de condroitin sulfat proteoglicans (CSPG) de la matriu extracel·lular que inhibeixen el creixement neurític (Rivera et al.,1999).

Alguns factors de creixement, incloent el factor de creixement nerviós (NGF), augmenten l'expressió de les metal·loproteïnases (MMPs) per les neurones. Les MMPs, a canvi, regulen l'activitat del factor neurotròfic, per exemple alliberant factors de creixement que estan ancorats a la matriu extracel·lular.



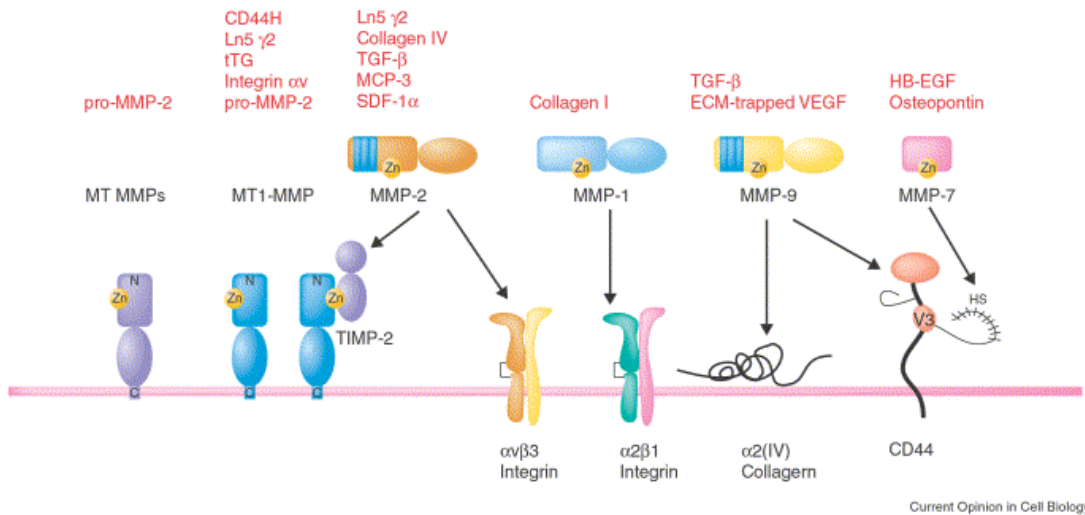
**Figura 29:** Les metal·loproteïnases regulen el creixement axonal.  
(Yong et al., 2001)

Les MMPs que estan situades en la proximitat dels cons de creixement poden promoure l'allargament d'axons a causa de la seva habilitat per remodelar la matriu extracel·lular i degradar molècules inhibidores com les proteïnes Nogo. Interaccionant amb molècules implicades en la guia axonal, per exemple, alliberant els receptors de DCC o trencant la unió entre el receptor d'Eph i la efrina, les MMPs poden afectar el creixement direccional dels axons.

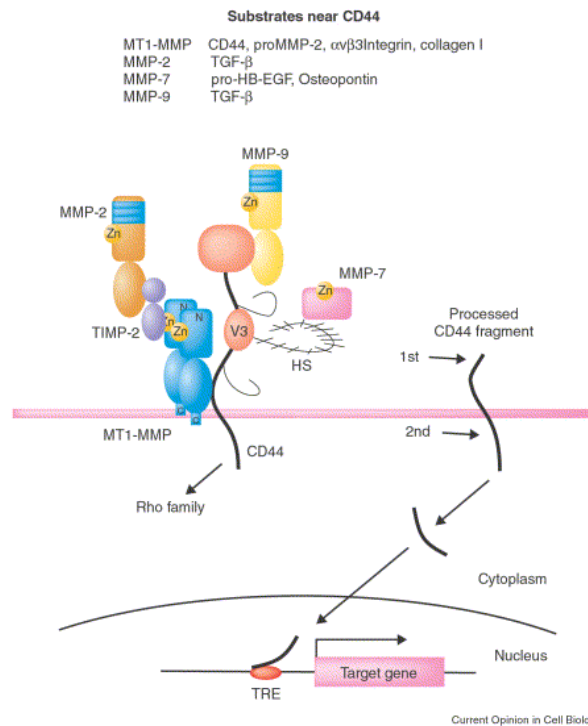
Més recentment, s'ha vist in vivo que els inhibidors de les MMP pertorben la progressió i la conducció dels axons de la retina del xenopus (Webber et al.,2002).

La implicació de les metal·loproteases en l'axogènesis i en la conducció axonal es veu reforçada per la conservació filogènica dels mecanismes i dels sistemes proteics diana d'aquestes proteases. Així, Dm1-MMP, una de les dues MMP descrites fins avui en *Drosophila melanogaster*, s'expressa específicament a les cèl·lules gials que s'associen al desenvolupament de les comissures de la corda ventral i que tenen un paper essencial en l'axogènesis (Llano et al.,2000). Sempre en *D.melanogaster*, Kuzbanian o ADAM-10 (amb domini disintegrina i metalloproteïnasa10), una metal·loproteasa que pertany a la família dels adamalines, intervindria en la conducció axonal i permetria la repulsió dels cons de creixement modulant, per proteolisi, les interaccions entre les efrines i els seus receptors: proteïnes implicades en l'axogènesis (Hattori et al.,2000).

Les MMPs també poden regular els processos de **migració cel·lular** ja que es poden unir a proteïnes de la superfície cel·lular com les integrines o la proteïna CD44 (figures 31 i 32).



**Figura 30:** MMPs que s'associen a la superfície cel·lular i els seus substrats que modulen la migració cel·lular. (Seiki, 2002).



**Figura 31:** La proteïna CD44 actua com a plataforma per l'ensamblatge de diverses MMPs i els seus substrats i modula la migració cel·lular. (Seiki, 2002).

## 2.4.2 Les MMPs en diverses patologies neurològiques :

### 2.4.2.1. Generalitats :

El control de l'activitat de les MMP pels seus inhibidors fisiològics, els TIMPs, contribueix a l'homeostasi dels teixits orgànics. En canvi, la pèrdua d'aquest control es pot associar a processos de proliferació o de mort cel·lular i als canvis en els teixits orgànics que caracteritzen les malalties malignes i degeneratives de nombrosos teixits no neurals. Resultats recents mostren que les MMP tenen igualment un paper central en la fisiopatologia del sistema nerviós i en el fet que podrien constituir nous blancs terapèutics en diferents malalties del sistema nerviós.

Encara que el sistema MMP/TIMP està molt estudiat fora del sistema nerviós, no atreu l'interés dels neurobiòlegs més que des de fa uns deu anys. Dades recents però indiquen que el sistema MMP/TIMP té un paper important en diferents aspectes de la fisiologia i la patologia del sistema nerviós i que les MMP podrien constituir noves dianes terapèutiques en diferents neuropaties.

L'expressió de les MMP i dels TIMP en el sistema nerviós de l'animal adult sa és en general neuronal. Tanmateix, en el transcurs de diferents malalties del sistema nerviós, la neuroglia reactiva, les cèl·lules de la barrera hematoencefàlica (BHE) i les cèl·lules infiltrants del sistema immunitari esdevenen una font important d'aquestes proteïnes.

Les MMPs han estat implicades en diversos processos relacionats amb la fisiopatologia del SNC (figura 32):

#### 1. Trencament de la barrera hematoencefàlica (BHE) i infiltració de leucòcits: (Figura 32-1)

Les MMP participen en la resposta inflamatòria al cervell així com en les interaccions neurones/cèl·lules gials, controlant l'activitat de les citokines (membres de la família del TNF i les interleuquines), de les molècules d'adhesió cel·lular (CAM) i de les quimioquines (fractalquina). Les MMP debiliten la BHE i faciliten la infiltració de leucòcits (macròfags, limfòcits T, neutròfils polinuclears...), els quals participen en la resposta neuro-inflammatòria.

#### 2. Desestabilització de la matriu extracel·lular, de les interaccions amb el citosquelet i de les interaccions cèl·lula-cèl·lula: (Figura 32-2)

Una activitat metal·loproteasa no controlada desestabilitza la matriu extracel·lular i altera les interaccions: cèl·lula-matriu i proteïnes d'adherència-citosquelet i pot induir la mort neuronal. Inversament, l'inactivació per proteolisis de factors d'apoptosis com FasL (ligand de Fas) té efectes neuroprotectors.

### 3. Desmielinització: (Figura 32-3)

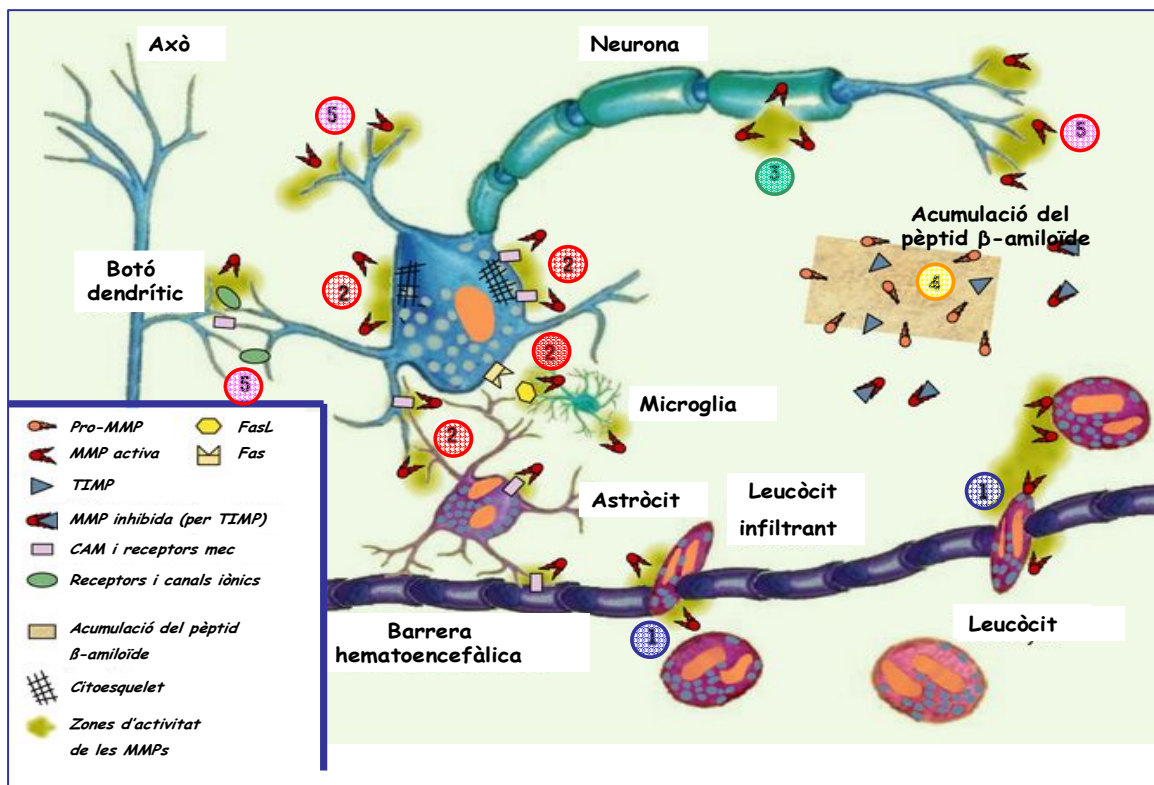
Les MMP degraden la proteïna bàsica de la mielina (MBP), substrat de les MMP-1, -2, -3, -7 i -9. Aquesta activitat metal·loproteasa a nivell dels oligodendròcits contribuiria al procés patològic en les plaques d'esclerosi.

### 4. Plaques senils: (Figura 32-4)

Una activitat reduïda de les MMP pot contribuir a processos de fibrosi provocats per l'acumulació de substrats tòxics, com el pèptid  $\beta$ -amiloïde de les plaques senils en la malaltia de l'Alzheimer. L'acumulació del pèptid seria facilitada per un augment de les concentracions de TIMP-1 i una activació menor de la MMP-9 (acumulada en la seva forma latent).

### 5. Creixement dendro-axònic, plasticitat neuronal: (Figura 32-5)

Les MMP participen en: el creixement de les neurites, l'axogènesi i la conducció dels cons de creixement per la matriu en el transcurs del desenvolupament i en la plasticitat reactiva.



**Figura 32:** Papers i mecanismes d'acció potencials de les metal·loproteïnases de la matriu (MMP) en la fisiopatologia del sistema nerviós central. (Adaptat de Rivera et al., 2004).



## Relació de les MMPs amb l'excitotoxicitat i la mort neuronal

L'hiperactivitat neuronal induïda per un agent convulsivant com el caïnàt (un agonista del glutamat que actua sobre un subtipus de receptors i que s'utilitza per estudiar models animals d'epilèpsia), o per un alliberament massiu de glutamat després d'una isquèmia cerebral, pot provocar lesions neuronals irreversibles de tipus excitotòxic. Aquestes lesions són aparents en diferents estructures cerebrals, sobretot en l'hipocamp, les neurones piramidals del qual (però no les neurones dels grans) són particularment vulnerables.

En la rata, l'expressió de TIMP-1 augmenta fortament en les neurones dels grans de l'hipocamp alguns minuts després de la reperfusió isquèmica o a la fi de crisis convulsives. Alguns dies més tard, la síntesi de TIMP-1 s'indueix en astròcits reactius propers a les neurones perjudicades, però no en la microglia reactiva (Rivera et al., 1997 i 2002). S'ha igualment descrit un augment de les concentracions de la MMP-9 i -2 després d'una crisi d'epilèpsia o d'una isquèmia cerebral en la rata (Rivera et al., 2002; Jourquin et al., 2003).

Encara que és important estudiar l'expressió espacial i temporal de les MMPs i dels seus inhibidors en el sistema nerviós, sobretot en el transcurs dels processos patològics, sols les mesures de l'activitat proteolítica, que permetent evaluar el balanç net de la coexpressió de les proteases i dels seus inhibidors, tenen un significat en l'aspecte funcional. Les tècniques de zimografia in situ permeten estudiar, amb una resolució cel·lular, les modulacions de l'activitat de les MMPs en el transcurs de diferents processos patològics. Les dades obtingudes en la rata per aquests mètodes indiquen que després d'una isquèmia cerebral (Rivera et al., 2002) o de les convulsions epilèptiques, té lloc un augment de l'activitat de les MMP primer a les neurones, abans de la seva mort, i ulteriorment en les cèl·lules glials reactives i els vasos sanguinis.

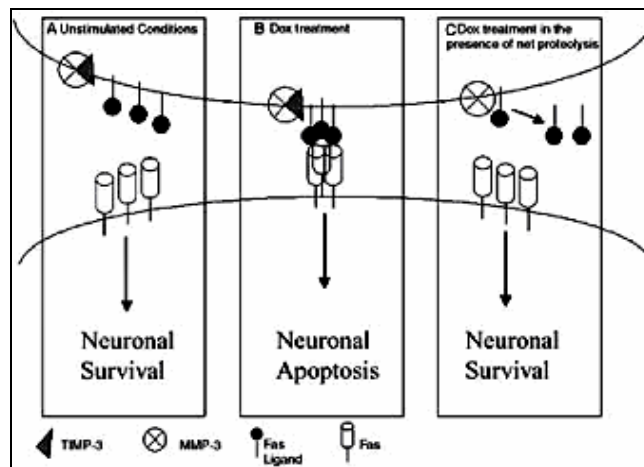
Encara que els mecanismes no es coneixen, sembla que les MMPs podrien contribuir de manera directa a la mort neuronal, com ha demostrat l'aplicació de MMP-9 sobre talls d'hipocamp (Jourquin et al., 2003) i de MMP-1 en explants de medul·la espinal (Vos et al., 2000).

En les situacions patològiques com la isquèmia cerebral, l'òxid nítric (NO) augmenta en el teixit nerviós i activa la MMP-9 induint la mort de les neurones corticals per **anoiquis**, una forma particular d'apoptosis que resulta de la pèrdua de les interaccions cèl·lula-matriu (Gu et al., 2002).

Les MMPs també podrien tenir una acció neurotòxica indirecta vinculada al seu paper modulador de la comunicació intercel·lular. Les MMPs poden realitzar la proteolisi de la **fractalquina**, una quimioquina expressada principalment en la superfície de les neurones, la forma soluble de la qual atreu cap a les neurones cèl·lules microglials reactives de tipus macròfags citotòxics (Chapman et al., 2000).



Inversament, les MMP poden tenir també un **paper neuroprotector** ja que modifiquen l'activitat biològica de molècules que condueixen a les cèl·lules a vies apoptòtiques. Els efectes neurotòxics del péptid  $\beta$ -amiloïde es poden inhibir o potenciar segons si el lligand de Fas (FasL), que indueix la mort cel·lular per apoptosi després de la interacció amb Fas, es degrada o no per les MMP, sobretot per la MMP-7 (Ethell et al.,2002). D'altra banda, s'ha mostrat que el receptor DCC, en l'absència del seu lligand (la proteïna netrina-1), provoca l'apoptosis (Mehlen et al.,1998). Com la proteïna DCC és una de les dianes de les MMPs es pensa que la proteolisi d'aquest receptor podria protegir les cèl·lules neurals de l'apoptosi en l'absència de netrina-1.



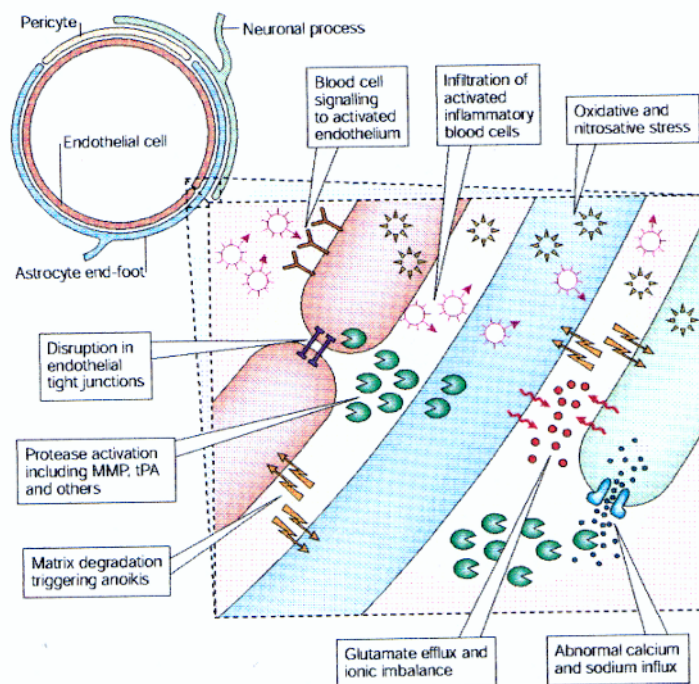
**Figura 33:** Relació de la MMP-3 i el TIMP-3 en la mort cel·lular apoptòtica dependent de FAS.(Wetzel et al., 2003).

### Relació de les MMPs amb la permeabilització de la barrera hematoencefàlica, la infiltració leucocitària al sistema nerviós i la neuro-inflamació.

La integritat de la BHE, considerada com la primera línia de defensa del sistema nerviós, és essencial. Nombrosos estudis impliquen les MMP, MMP-2 i -9 en particular, en el trencament de la BHE fruit d'un procés neuropatològic.

La injecció intracerebral de la MMP-2 debilita la BHE mentre que anticossos que bloquegen la MMP-9 o inhibidors de les MMPs la protegeixen després d'una isquèmia cerebral (Rivera et al.,1999) o un traumatisme de la medul·la espinal (Noble et al.,2002).

La BHE dels ratolins KO pel gen de la MMP-9 és menys fràgil després d'una isquèmia cerebral que la dels ratolins salvatges (Asahi et al.,2001).



**Figura 34:** Les MMPs i el trencament de la barrera hematoencefàlica després d'una isquèmia cerebral. (Lo et al., 2003).

En situacions patològiques, els macròfags perivasculars activats, que expressen concentracions elevades de MMP-9 i -2, podrien participar en la degradació de la làmina basal, rica en col·lagen IV. Les MMP expressades pels leucòcits circulants faciliten la seva extravasació desde la sang o la limfa. Així, l'interacció de la MMP-2 limfocitària amb les integrines de la superfície endotelial és determinant per a l'extravasació dels limfòcits T i la infiltració al parènquima nerviós en l'encefalomielitis autoimmune experimental (EAE), un model d'esclerosi en plaques (SEP) en la rata (Graesser et al.,2000).

En pacients afectats de SEP o en rates sotmeses a una EAE, les concentracions de MMP-9 són molt elevades al líquid cefalo-raquidi. La MMP-9, -1, -2 i -3 s'expressen en les plaques de desmielinització en els pacients. En l'EAE, les concentracions elevades d'ARNm MMP-9 i -7 coincideixen amb el pic de severitat de la malaltia.

La modulació de l'expressió de les MMPs i els TIMPs en el sistema nerviós en condicions patològiques està estretament vinculada a la producció i a l'alliberament al parènquima nerviós de factors tròfics i de citocines proinflamatòries, que són inductors o en alguns casos repressors eficaços del sistema MMP/TIMP.

A més del seu paper en la fragilització de la BHE i la neuro-inflamació, certes MMPs (sobre tot les MMPs: -1, -2, -3, -7 i -9) s'han implicat en la desmielinització associada a la SEP o a l'EAE ja que degraden la MBP. La digestió de la MBP per MMP-9 exposa epítops immunodominants, amb l'injecció dels quals n'hi ha prou per induir l'EAE en la rata (Opdenakker et al.,2001). La sobreexpressió de la MMP-3 en un ratolí transgènic posa en marxa una malaltia desmielinitzant espontània (D'Souza et al.,2002).

En l'EAE o en lesions de la medul·la espinal, els processos de desmielinització són atenuats per IMMP que permeten respectivament una millora sensible dels signes clínics (Rivera et al.,1999) i de la locomoció (Noble et al.,2002).

Els trastorns neurològics causats per infeccions virals s'acompanyen de processos neuro-inflamatoris amb alteració de l'equilibri del sistema MMP/TIMP. Nivells elevats de MMP-9 s'han trobat al líquid cefalo-raquidi de pacients de mielopatia progressiva crònica vinculada al virus humà limfotròfic-1. In vitro, els limfòcits T que infiltrin infectats activen els astròcits tenint com a conseqüència un augment de l'expressió de la MMP-3 i -9 (Giraudon et al.,2000).

Les causes de les demències associades a les infeccions pel virus d'immunodeficiència humana-1 no han estat determinades clarament, però l'inducció de les MMP per diferents proteïnes virals i l'atenuació de la seva toxicitat per inhibidors de les MMPs suggereixen igualment una contribució del sistema MMP/TIMP en els processos neurodegeneratius vinculats a la sida (Rivera et al.,1999 ; Yong et al.,2001).

### 2.4.2.2 Les MMPs i l'ictus :

#### L' Ictus isquèmic:

Es conegut que la isquèmia cerebral origina un allau d'aconteixements a nivell cel·lular amb una cronologia determinada, cadascun dels quals és susceptible de ser considerat com una diana terapèutica. Així l'alliberació de glutamat i calci té lloc en els primers minuts, mentre que altres fenòmens com la formació d'edema es desenvolupen ja des de les primeres hores i fins uns dies després. Sabem que la formació d'edema combina elements citotòxics i vasogènics que assoleixen un màxim al voltant del segon dia després de l'inici de la isquèmia.Segons el seu grau pot, en alguns casos, arribar a representar una complicació letal i la seva gènesi està relacionada amb canvis en la microvasculatura.

Rosenberg et al. (1996) han mostrat, en un model animal d'isquèmia cerebral focal, que existeix un increment en l'activitat de la gelatinasa B (MMP-9) des de les 12 hores i fins al cinquè dia, mentre que la gelatinasa A (MMP-2) s'eleva a partir del cinquè dia postisquèmia. L'activitat de la MMP-9 es detecta ja a les 6 hores postictus; està significativament incrementada a les 12 hores; és màxima a les 24 hores i resta incrementada de forma màxima fins als cinc dies postisquèmia. L'expressió de MMP-2 es detecta a les 24 hores posteriors a l'ictus però es màxima als cinc dies.

Clark et al. en un estudi necròptic en humans que havien mort en diferents intervals després d'un ictus isquèmic (2 hores després, 2-4 dies després, des de 4 a diversos mesos després i 7 anys després) van mostrar que la zimografia no revela canvis

en l'activitat de les gelatinasses en el cas en que la mort es produïu dues hores després de l'ictus. En tots els altres casos, les gelatinasses es trobaven elevades en la zona infartada si es comparava amb altres zones sanes del teixit cerebral. La zimografia en gel va detectar un increment significatiu de la gelatinasa A (MMP-2) en els casos en que la mort va tenir lloc quatre mesos o més després de l'infart, mentre que només van apreciar-se canvis subtils en els casos que moriren entre 2-4 dies després de l'ictus. D'altra banda, la gelatinasa B (MMP-9) mostra increments màxims en els casos que moriren en l'interval 2-4 dies després de l'ictus i persistiren increments més modestos en els casos que s'analitzaren entre 4 mesos a 7 anys després de l'infart.

En condicions normals, el plasma conté gelatinasa A i B. L'edema cerebral vasogènic, en que es filtren elements plasmàtics al teixit cerebral, podria originar l'augment de la gelatinasa B com a efecte, més que com a causa, de l'increment de la permeabilitat vascular. Però el fet que la gelatinasa A es trobi només mínimament incrementada en la setmana posterior a l'ictus, quan l'increment de la gelatinasa B és màxim, suggereix que la contribució plasmàtica a aquests canvis és modesta; és a dir, que l'augment de gelatinasa B seria la causa del trencament de la BHE.

En l'interval que va de les 6 a les 24 hores després de la isquèmia s'acumulen neutròfils que romandran elevats fins uns nou dies després. Els neutròfils produeixen gelatinasa B i, com és sabut, ha estat d'interés el potencial terapèutic de controlar el seu flux en la isquèmia cerebral. En el treball de Romanic et al. (1998) es corrobora, en un model animal, que en la fase aguda de la isquèmia cerebral focal apareix una infiltració neutrofílica conjuntament amb una expressió elevada de MMP-9. Els macròfags podrien ser importants en les fases tardanes de superactivitat de la gelatinasa B, ja que constitueixen una estirp cel·lular molt abundant en els mesos posteriors a la isquèmia i poden produir gelatinasa B.

Romanic et al. (1998) en analitzar l'expressió del TIMP-1 en el parènquima cerebral isquèmic i comparar-lo amb mostres de l'hemisferi contralateral sa (control) no va trobar diferències significatives en l'activitat del TIMP-1.

De quina manera aquestes i altres variables es combinen i influeixen tot el seguit de fets que succeeixen in vivo es deconeix. La hiperactivitat en fases tardanes de la gelatinasa A, probablement es correlaciona amb els fenòmens de remodelació capilar postictals més que amb l'edema. Els fenòmens d'angiogènesi que tenen lloc després d'un infart de miocardi experimental s'associen amb un increment en l'activitat de gelatinasa A i B i tPA, i amb una decreixent activitat dels TIMPs. En aquest marc, l'activitat elevada de les gelatinasses podria ser essencial en l'èxit de la revascularització, mentre que la inhibició de les gelatinasses podria ser perjudicial.

El dany per reperfusió afegeix un nou grau de complexitat a la isquèmia. La reintroducció de sang al teixit isquèmic origina canvis complexos. Quan el temps

d'isquèmia és curt, el restabliment del flux sanguini cerebral és beneficiós i aconseguix retornar la funció neurològica a la normalitat, però si el temps d'isquèmia és prolongat el retard en la reperfusió comportarà el "dany per reperfusió". Aquest, entre d'altres, origina un augment de l'edema cerebral (Yang et al., 1994), i un increment del risc d'hemorràgia. Múltiples factors influeixen en el risc de sagnat: la durada de l'oclusió, el tamany de la lesió i l'edat del pacient. El trencament de la BHE derivat de la reperfusió succeeix de forma bifàsica: els radicals lliures, citoquines i proteases estarien implicats en la lesió dels capil·lars cerebrals, mentre que les MMPs actuarien degradant la làmina basal que envolta aquests capil·lars.

S'ha vist com l'administració intracerebral de gelatinasa A origina l'obertura de la BHE i com el TIMP-2, inhibint aquesta gelatinasa, en bloqueja l'obertura (Rosenberg et al., 1992). El TNF- $\alpha$  que es forma al teixit isquèmic incrementa la gelatinasa B a les 24 hores, coincidint amb el moment de màxima obertura de la BHE, i el Batimistat, un altre inhibidor de MMPs, ha mostrat la seva capacitat per reduir el dany al capil·lar (Rosenberg et al., 1995).

Evidències procedents d'estudis experimentals en rates (Rosenberg et al., 1996), en els que l'activitat de la gelatinasa B ja estava elevada a les 12 hores postictus, fan pensar que aquesta superactivitat origina una disrupció de la làmina basal endotelial i, per tant, un efecte nociu en els primers dos dies postisquèmia. Això podria jugar un paper decisiu en el desenvolupament d'edema i transformació hemorràgica postisquèmia (Hamann et al., 1995).

Rosenberg et al., (1998) demostra com el dany de la BHE i l'expressió de MMPs en un model animal d'isquèmia cerebral es produeixen al mateix temps. L'obertura precoç i la pèrdua de la funció de la BHE a les 3 hores de la isquèmia, presumiblement relacionada amb l'expressió de MMP-2, va minimitzar-se amb l'administració d'un inhibidor sintètic de MMPs (BB-1101). Malgrat això, les fases més tardanes de disfunció de la BHE, relacionades amb l'expressió de MMP-9, no van mostrar modificacions amb l'administració de l'inhibidor. Aquest estudi i d'altres del mateix grup que el precedeixen, mostren com les MMPs i els TIMPs s'afecten dramàticament per la reperfusió i com contribueixen de forma complexa al dany per reperfusió.

En aquesta línia d'investigació, Lapchak et al. (2000), treballant amb un model animal (conill) d'isquèmia cerebral focal tromboembòlic, han demostrat que l'inhibidor de MMPs, BB-94, atenua el risc de transformació hemorràgica post-fibrinolisi, demostrant d'aquesta manera que la combinació de fàrmacs amb dianes diferents podria suposar una millora en el tractament d'aquesta patologia.

Asahi et al. (2000) parteix de la hipòtesi que la gelatinasa B o MMP-9 podria formar part de la cascada de dany tissular neuronal posterior a la isquèmia cerebral focal. Amb aquest supòsit, i mitjançant un model animal, demostren: primer, que després de la

isquèmia existeix una sobreexpressió de formes latents de MMP-9 a l'hemisferi afectat (no al contralateral ni als animals control); segon, que entre les 12 i les 24 hores posteriors a l'inici de la isquèmia cerebral permanent, els nivells de RNAm MMP-9, mesurats mitjançant un tipus de reacció en cadena de la polimerassa ("reverse transcription PCR"), estan augmentats. Tercer, que en realitzar l'experiment amb una estirp d'animals genèticament manipulats per tal que siguin deficitaris en el gen que codifica per la MMP-9, van observar que aquests animals eren més resistents a la isquèmia focal i que això resulta en lesions més petites en aquest grup. Quart, que en administrar un inhibidor sintètic de les MMPs, el BB-94, als animals control, el volum de la lesió isquèmica a les 24 hores era significativament més petit mentre que en realitzar el mateix experiment en el grup deficient en MMP-9, les lesions romanien iguals. D'aquesta forma els autors demostren el paper deleteri de la MMP-9 en la isquèmia cerebral focal.

En els pacients també existeix una sobreexpressió plasmàtica de la MMP-9 en la fase aguda de l'íctus isquèmic, presentant un pic a les 24 hores. Aquesta sobreexpressió és dependent del temps d'isquèmia. Existeix una correlació estreta entre l'expressió de la MMP-9 i la condició neurològica del pacient en la fase aguda especialment a les 48 hores. Els pacients amb nivells de MMP-9 i MMP-2 més elevats tenen una evolució més desfavorable. (Montaner et al., 2001)

L'expressió de la MMP-9 es correlaciona amb el tamany de l'infart cerebral mesurat per tomografia computeritzada cranial.

Existeix una relació estreta entre l'expressió de la MMP-9 i de les citoquines proinflamàtores, com la IL-6, després de la isquèmia cerebral (Montaner et al., 2001).

El fet que s'hagi demostrat una reducció del tamany de l'infart inhibint la MMP-9 en rates, i veient que en humans els seus valors també són més elevats després de l'íctus, converteix a la MMP-9 en una diana potencial pel seu tractament .

## *2- Hemorràgia intracerebral:*

Les gelatinases MMP-2 i MMP-9 poden afectar la integritat de la matriu neurovascular. La MMP-9 promou la mort neuronal trencant les interaccions cèl·lula-matriu (Gu et al.,2002), i el ratolí knockout de la MMP-9 presenta una reducció del trencament de la barrera hematoencefàlica i del volum d'infart després d'una isquèmia cerebral (Asahi et al.,2001).

Encara que la trombolisis amb l'activador del plasminogen tissular (tPA) és una teràpia per l'infart cerebral aprovada per la US Food and Drug Administration, la seva eficàcia podria estar limitada pels seus efectes neurotòxics (del Zoppo et al.,1998; Hacke et al.,1999). En models experimentals d'infart cerebrals embòlics s'ha vist que l'ús d'inhibidors de les MMPs disminueixen l'hemorràgia cerebral i el dany després del tractament amb tPA (Lapchak et al.,2000; Sumii et al.,2002).

Recentment s'ha constatat la relació entre el tPA i la MMP-9. S'ha vist que el tPA augmenta l'expressió de la MMP-9 tant en cultius cel·lulars com in vivo a través del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat LRP (Wang et al.,2003).Els nivells de MMP-9 són més baixos en ratolins deficients en tPA després d'una isquèmia cerebral focal. En cèl·lules endotelials microvasculars humanes de cervell els nivells de MMP-9 augmenten quan s'afegeix tPA recombinant. RNA interference (RNAi) sugereixen que aquesta resposta està mediada per la LRP, que s'uneix al tPA (Zhuo et al.,2000) (té un paper en la potenciació a llarg termini) i té propietats de transductor de senyals (Herz et al.,2001).Trobar les vies de senyalització del tPA i el LRP en el cervell podria ajudar a disminuir la neurotoxicitat del tPA i millorar la teràpia de l'infart cerebral.

Rosenberg et al.(1997) en un model experimental d'HIC en rates, van mostrar que les gelatinases A i B estaven significativament elevades a les 24 hores després de l'inici d'una HIC i que la seva elevació coincidia amb el moment de màxim edema. Tot i trobar increments significatius de la gelatinasa A, fou la gelatinasa B, conjuntament amb l'uPA, els que mostraren increments més elevats. La possibilitat que aquests enzims proteolítics fossin els responsables de l'edema que apareixia a les 24 hores de l'HIC es confirmà al mateix treball: els animals que havien rebut un inhibidor de les MMPs desenvoluparen una quantitat d'edema significativament menor.El treball suggereix que la formació d'edema en la fase aguda de l'HIC podria estar dirigit per MMP-9 i uPA, mitjançant la lesió o disrupció de la BHE, i que l'administració d'un inhibidor específic de les MMPs pot reduir la formació d'edema vasogènic en un model experimental d'HIC.

En pacients s'ha comprovat que els nivells basals de MMP-9, influeixen en l'aparició d'un infart hemorràgic posterior (del cinquè al setè dia després de l'ictus). El seu pic a les 24 hores s'associa amb la presència d'un hematoma parenquimatós (Montaner et al., 2001).

### 2.4.3. Les MMPs i la inflamació:



**Figura 35:** Els neutròfils atravesen la barrera hematoencefàlica i penetren en el teixit isquèmic.

Cada vegada hi ha més evidències de que la resposta inflamatòria juga un paper fonamental en la isquèmia cerebral i de que la invasió del teixit cerebral infartat per leucòcits provoca lesions neuronals secundàries (Kochanek et al.,1992). Gran part d'aquesta resposta es deu a l'acció de les interleuquines. L' adhesió i la migració dels neutròfils està dirigida per diversos tipus de glicoproteïnes entre les que es troben les molècules d'adhesió, les quals són activades per la producció de les citoquines proinflamatòries.

Algunes citoquines (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) podrien tenir un paper destacat en la regulació de les metal·loproteinases. En cultius neuronals s' ha demostrat que l' expressió de la MMP-9 s' incrementa després de l'administració de IL-1 (Vecil et al., 2000). També el TNF- $\alpha$ , estimula la producció de les MMPs en cultius d' astròcits i micròglia (Gottschall et al., 1995).

Un estudi fet en pacients d'isquèmia cerebral mostra l'existència d'una correlació entre l'expressió de la MMP-9 i la de la citoquina proinflamatòria IL-6 a les 24 hores postisquèmia (Montaner et al.,2001). Aquesta correlació, però, no permet assegurar quin dels dos fenomens passa primer. De fet les MMPs poden activar el TNF- $\alpha$  (Gearing et al.,1994), hi aquesta citoquina pot amplificar l'expressió de la IL-6.

La mateixa relació entre la MMP-9 i la IL-6 s'ha suggerit recentment en patologies no neurològiques. En patologies tumorals s'ha vist que la IL-6 estimula la producció de MMP-9 i MMP-2 . També en pacients afectats d'esclerosi múltiple s' ha pogut observar una relació entre citoquines proinflamatòries i MMPs de forma indirecta, ja que el tractament amb interferó-beta (INF- $\beta$ ) disminueix de forma similar i paral·lela tant els nivells de IL-6 com els de MMP-9 (Ozenci et al., 2000).



La regió promotora del gen de la MMP-9 conté una zona d'unió per a la proteïna activadora 1 (AP-1) i pel factor de transcripció NF-kB, que responen a una gran varietat d'estímuls inflamatoris. Els gens de resposta immediata (*c-fos* i *c-jun*) formen heterodímers que activen la zona d'unió amb AP-1 del gen de la MMP-9.

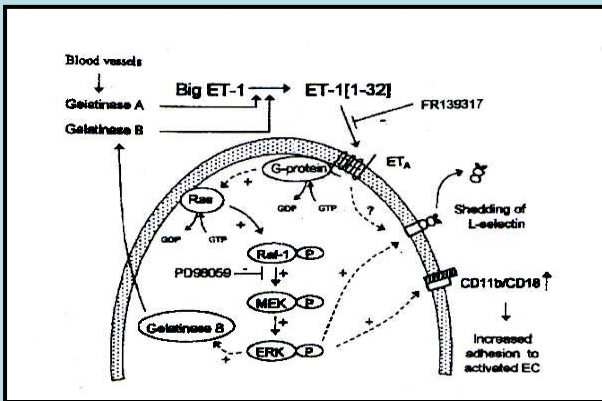
Una altra de les possibles connexions entre ambdues famílies és produïda a través dels neutròfils. La IL-6 estimula la producció de molècules d'adhesió com la ICAM-1, el que fa que un gran nombre de cèl·lules de la sèrie blanca arribin a la zona de l'infart. Els neutròfils utilitzen la producció de MMPs per migrar a través de l'endoteli (Weiss *et al.*, 1986) i per aquest mecanisme poden ampliar el dany en la zona al desestructurar la BHE, el que contribueix a la producció d'edema i facilita la transformació hemorràgica de l'infart.

Els neutròfils no produeixen MMP-2 però contenen formes de MMP-9 especials que no estan en d'altres tipus cel·lulars. No produeixen TIMP-1 i per tant no hi ha complexos MMP-9-TIMP-1. Per contra tenen complexos covalents específics de 200 KD (homodímers) i de 120 KD (heterodímers) de MMP-9 amb NGAL (Neutrophil Gelatinase B-Associated Lipocalin) que no es dissocien amb SDS però sí amb  $\beta$ -mercaptoetanol. La desgranulació de MMP-9 per part dels neutròfils és un procés ràpid que passa en menys d'una hora, el que contrasta amb els monòcits que són deu vegades més lents en produir MMP-9, ja que necessiten sintetitzar MMP-9 de novo.

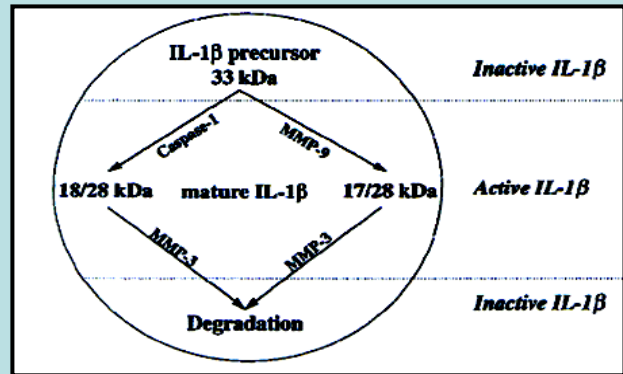
La gelatinasa B o MMP-9 funciona com a regulador i efector de la biologia dels leucòcits (Opdenakker *et al.*, 2001). El principal quimioatrant dels neutròfils humans, la IL-8, estimula la ràpida desgranulació de vesícules que contenen MMP-9 des dels neutròfils. La MMP-9 funciona com un regulador de la biologia dels neutròfils tallant a la IL-8 per l'extrem aminoterminal i convertint-la en una quemoquina deu vegades més potent, que resulta en un important feedback positiu de l'activació i la quimiotaxis dels neutròfils. Les quimioquines-CXC: GRO- $\alpha$ , CTAPIII, i PF-4 són degradades per la gelatinasa B, però no les quimioquines-CC: MCP-2 i RANTES.

Les MMPs: -9, -3 i -2, ordenades per eficàcia, poden generar IL-1 $\beta$  biològicament activa (Schönbeck *et al.*, 1998) per un mecanisme independent de caspasa-1 o ICE (IL-1 $\beta$  Converting Enzyme). La serpina inhibidora de la  $\alpha$ 1-proteinasa ( $\alpha$ 1-PI) és un substrat de la MMP-9 *in vivo* (Liu *et al.*, 2000).

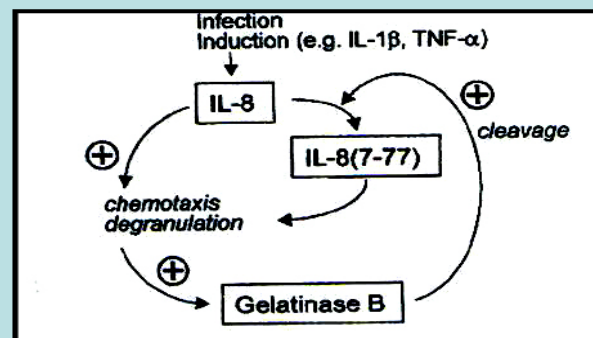
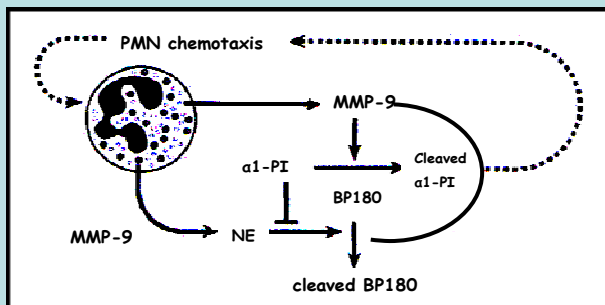
Procesa l' Endotelina-1



Potencia els efectes de la IL-1 i la IL-8



Potencia l'activació de les serin proteases



**Figura 36:** Efecte de les MMPs sobre components de la reacció inflamatòria: l'endotelina-1, les serin proteases i les interleuquines : IL-1 i IL-8. (Adaptat de: Fernández-Patrn et al.,2001; Schönbeck et al.,1998; Opendakker et al.,2001).

Les MMPs regulen l'adhesió dels neutròfils a les cèl·lules endotelials mitjançant la generació d'endotelina-1[ 1-32] (Fernández-Patron et al.,2001). L'endotelina és un pèptid la concentració del qual augmenta en la isquèmia cerebral, que es alliberat principalment per l'endoteli vascular, però també per les neurones i les cèl·lules glials,i és responsable d'una potent vasoconstricció (efecte que realitza a través de l'activació d'uns receptors denominats ET<sub>A</sub>, presents en els vasos cerebrals). Aquest pèptid també pot afectar l'adhesió dels neutròfils a les cèl·lules endotelials, ja que els neutròfils també tenen aquests receptor ET<sub>A</sub>.La MMP-2, talla l' endotelina-1 (ET-1), produint el pèptid vasoactiu ET-1[1-32] que actua sobre els receptors d'ET<sub>A</sub> dels neutròfils produint una ràpida disminució de l'expressió de la L-selectin i un augment de l'expressió de CDI Ib/CD18 en la superfície dels neutròfils.La ET-1[1-32] provoca l'alliberament de la MMP-9 dels neutròfils,la qual també pot convertir la ET-1 en ET-1[1-32], resultant-ne un feedback positiu de la generació d'ET-1[1-32]. La ET-1[1-32] augmenta l'expressió de CDI Ib/CD18 i l'alliberament de gelatinasa via la proteïna Erk. La ET-1[1-32] també provoca un petit increment de

l'expressió de ICAM-1 i E-selectina en les cèl·lules endotelials, i facilita l'adhesió depenent de la integrina  $\beta_2$  dels neutròfils a l'endoteli activat. Les MMPs, via la conversió de l' ET-1 en ET-1 [ 1-32], activen els neutròfils i promouen l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli i, conseqüentment, l'entrada de neutròfils al teixit inflammat.

### 2.4.3 Les MMPs i el càncer

Observant els fenotips dels ratolins knockout pels gens de les diferents MMPs s'aprecia la seva relació amb certs tipus de càncers (taula4).

**Fenotips dels ratolins knockout pels gens de les MMP**

Genotip	Fenotip
<i>MMP2<sup>-/-</sup></i>	Supressió de la carcinogènesi pancreàtica induïda experimentalment; supressió de l' angiogènesis i el creixement tumoral; diferenciació retardada de les glàndules mamàries; petit retard del creixement .
<i>MMP3<sup>-/-</sup></i>	Acceleració de l' adipogènesis de la glàndula mamària; retard en la recuperació de les ferides per incisió; resistència a la dermatitis de contacte; empitjorament <i>ex vivo</i> de la reabsorció del discs herniats.
<i>MMP7<sup>-/-</sup></i>	Supressió del creixement de l'adenoma experimental; immunitat innata intestinal defectuosa; pitjor re-epitelització de les ferides de la tràquea; defectes en la involució de la pròstata després de la castració; empitjorament <i>ex vivo</i> de la reabsorció del discs herniats; pitjor migració transepitelial dels neutròfils; reducció de l'alliberament de sindecà-1.
<i>MMP9<sup>-/-</sup></i>	Supressió de la carcinogènesis de pell i de pàncreas induïda experimentalment ; disminució de la metastasis experimental; retràs en la vascularització de la placa de creixement; anormal ossificació endocondrial ,reclutament dels osteoclasts defectuosos; resistència als aneurismes aòrtics experimentalment induïts; prolongació de la dermatitis de contacte; protecció enfront la dilatació ventricular i del trencament cardíac després de l' infart de miocardi; disminució de la infiltració perifèrica de mononucleòcits en la nefritis glomerular; empitjorament de la migració de les cèl·lules del múscul llis i de la remodelació arterial; pitjor infiltració cel·lular i hiper-resposta bronquial durant la inflamació induïda per al·lèrgens; pitjor reclutament de cèl·lules progenitores des del moll de l'ós després de la irradiació; protecció del miocardi després d'una isquèmia amb o sense reperfusió.
<i>MMP11<sup>-/-</sup></i>	Supressió de la carcinogènesi mamària induïda experimentalment; disminució de la supervivència i el creixement de les cèl·lules tumorals; acceleració de la formació de la neointima després d'un dany dels vasos.
<i>MMP12<sup>-/-</sup></i>	Resistència a l'emfisema induït pel fum del tabac .
<i>MMP14<sup>-/-</sup></i>	Severes anomalies en l'ós i el teixit connectiu; reducció del recanvi del col·lagen; pitjor ossificació endocondrial ; angiogènesis defectuosa.

**Taula 4 . Fenotips dels ratolins knockout pels gens de les MMP .**

En els teixits, es controla l'activitat proteolítica de les MMP amb quatre inhibidors de MMP, els TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) que posseeixen igualment propietats tròfiques o, a l' inversa, proapoptòtiques.

El sistema MMP/TIMP controla les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu implicades en nombrosos processos fisiològics, sobretot: la proliferació, la diferenciació, la migració i la mort cel·lular. Tanmateix, la ruptura de l'equilibri proteasa-inhibidor pot portar en nombrosos teixits a la pèrdua de l'homeostasi i al desenvolupament de processos degeneratius o cancerosos, en particular les metastasis. Les MMPs tenen

funcions promotores i inhibidores en la progressió del càncer (figura 37) i aquestes vies amb efectes oposats són sovint iniciades pel trencament del mateix substracte:

- Les MMPs promouem el creixement de les cèl·lules canceroses degradant la proteïna d'unió al factor de creixement d'insulina (IGF-BP) alliberant IGF; tallant precursors transmembrana de factors de creixement com el Factor de Creixement Transformant- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ); i regulant la matriu extracel·lular (ECM) la qual promou el creixement indirectament via interaccions entre molècules de la matriu extracel·lular i les Integrines. Les MMPs poden inhibir el creixement de les cèl·lules canceroses alliberant el factor de creixement transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) del complex latent del TGF-  $\beta$ . (Figura 37 a).

- Les MMPs promouen la supervivència de les cèl·lules canceroses alliberant IGF i tallant el lligant FAS-L. Les MMPs també promouen l'apoptosi indirectament canviant la composició de la matriu extracel·lular que influeix en la senyalització per integrines. (Figura 37 b).

- Les MMPs promouem l'angiogènesi incrementant la biodisponibilitat de factors de creixement pro-angiogènics com el el Factor de Creixement Endotelial Vascular (VEGF), el Factor de Creixement dels Fibroblasts- 2 (FGF-2), i el TGF- $\beta$ . Aquests factors estimulen la proliferació i la migració de les cèl·lules endotelials. El FGF-2 és alliberat pel trencament de la proteïna de la matriu extracel·lular Perlecan. El mecanisme responsable de l'increment de la biodisponibilitat de VEGF és desconegut.

Les MMPs promouen la invasió de les cèl·lules endotelials tallant components estructurals de la matriu extracel·lular, com els col·lagens: I, IV i la Fibrina. El Col·lagen IV actua com a Pro-angiogènec unint-se a la Integrina  $\alpha\beta_3$ . Les MMPs actuen com a antiangiogènics quan tallen el Plasminogen i el Col·lagen XVIII, generant Angiostatina i Endostatina. També a partir del Col·lagen IV les MMPs generen Tumostatina. També tallen el receptor de l'activador del Plasminogen de tipus Uroquinasa a la superfície cel·lular de les cèl·lules endotelials inhibint l'angiogènesi. (Figura 37 c).

- Les MMPs regulen la invasió degradant components estructurals de la matriu extracel·lular. Promouen la invasió i la migració mitjançant la proteolisi de la laminina-5 (Ln-5). També tallen les mol·lècules d'adhesió CD44 i E-Cadherina. La CD- 44 tallada per la MMP-9, promou la invasió de les cèl·lules canceroses. La part tallada de la E-Cadherina pot unir-se i inhibir la funció d'altres mol·lècules E-Cadherines no tallades. Les MMPs poden inhibir la metastasi tallant la CXCL-12, una quimoquina de la família CXC que promou la metastasi del càncer de mama. (Figura 37 d).

- Les MMPs promouen la transició de l'epiteli al mesènquima (transició associada als tumors malignes), tallant la mol·lècula d'adhesió cel·lular E-Cadherina i alliberant TGF- $\beta$ . Les MMPs també promouen la diferenciació. Els tumors del ratolí deficient en MMP-9 estan menys diferenciats que els del ratolí control. El mecanisme es desconeix, però podria ser degut a canvis en la composició de la matriu extracel·lular que influeixen en la senyalització per integrines. (Figura 37 e).

- Les MMPs tallen el receptor- $\alpha$  de la Interleuquina-2 (IL-2 R $\alpha$ ) en els limfòcits T, inhibint-ne la proliferació ; també alliberen TGF- $\beta$ , un important supressor de les reaccions de les cel.lules T en front de les cèl.lules canceroses ; tallen l'inhibidor de la proteinasa-  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -PI), baixant la sensibilitat de les cèl.lules canceroses a les cèl.lules NK, i tallen diferents membres de les famílies de les quimoquines CC i CXT, fent que aquests factors deixin de ser atraients pels leucòcits. (Figura 37 f).

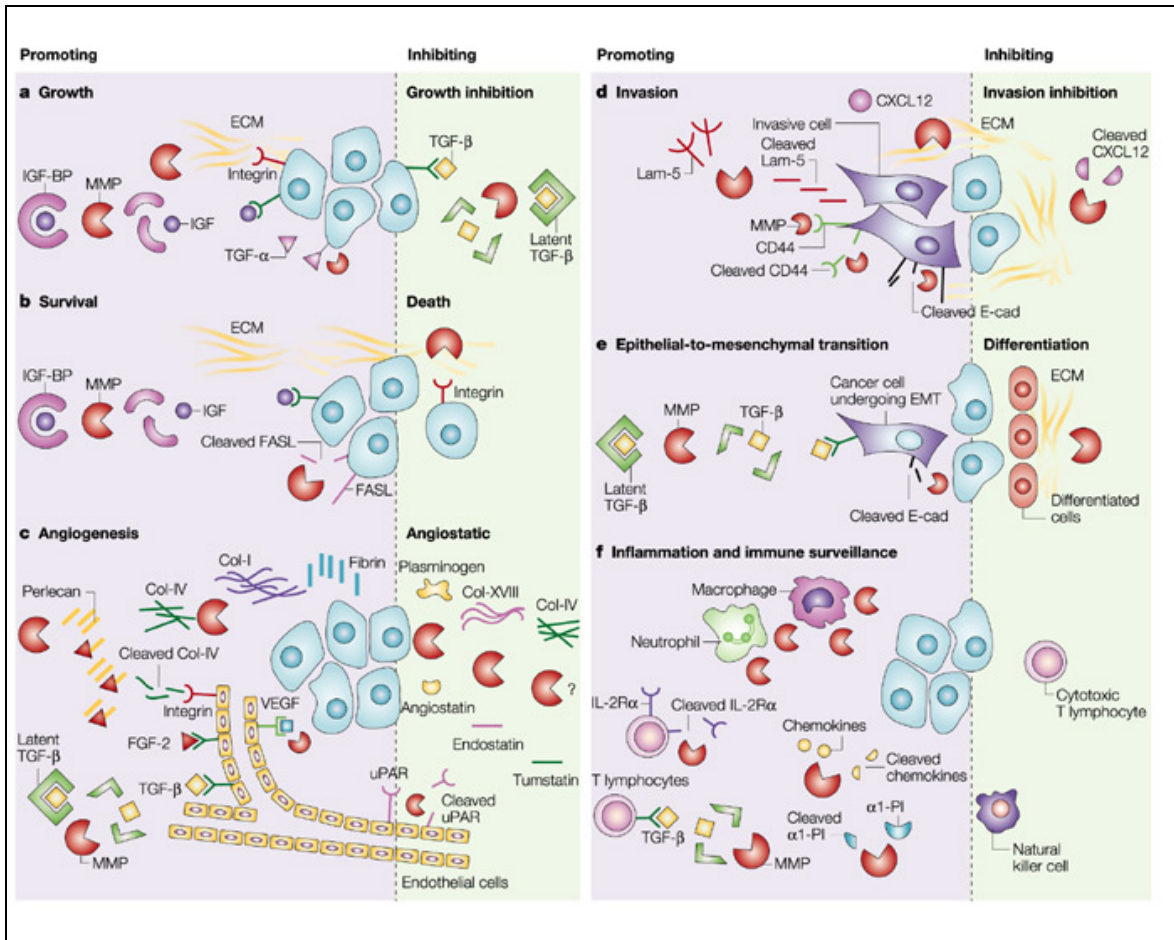


Figura 37: Les MMPs tenen funcions promotores i inhibidores de la progressió del càncer. (Egeblad and Werb,2002).

2.4.5 Les MMPs i el cycle cel·lular :

Els estudis que presentarem al final d'aquesta tesi suggereixen que la MMP-9 pot estar implicada en el cycle cel·lular. Per aquest motiu incloem les figures 38 i 39 que esquematitzen les diferents fases de la divisió cel·lular per facilitar la lectura d'aquest darrer treball.

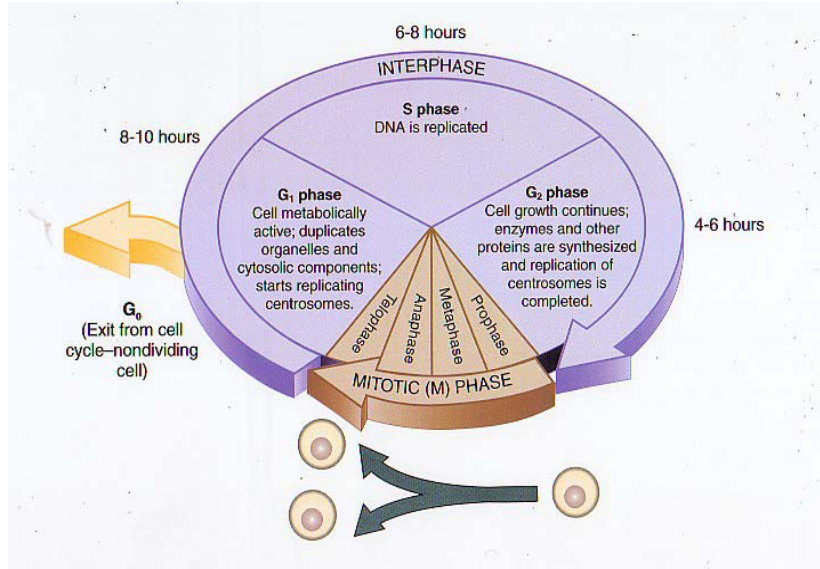


Figura 38: Esquema de les fases del cycle cel·lular: Interfase (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) i mitosis (M).

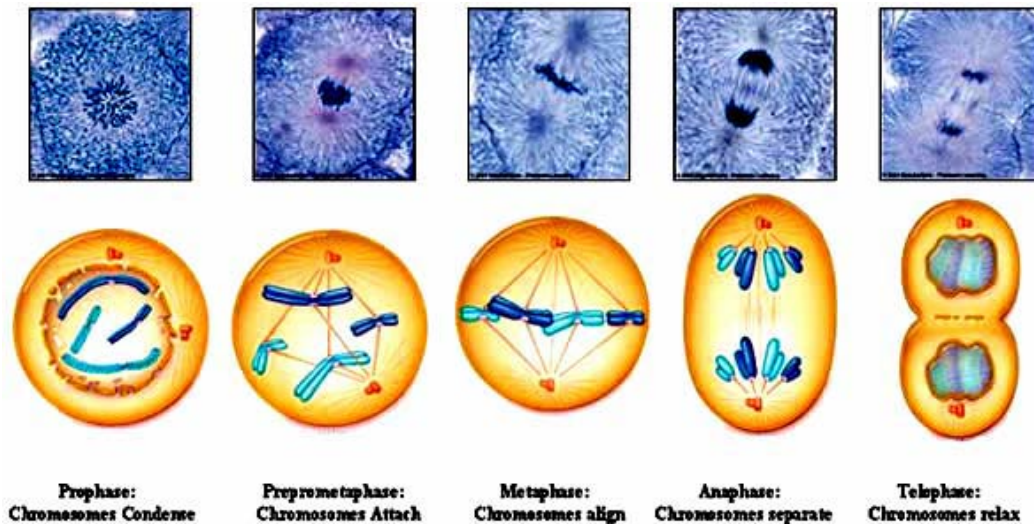


Figura 39: Esquema de les fases de la mitosi: Profase, metafase, anafase, i telofase.



Encara que la divisió cel·lular és un procés del que es coneixen moltes coses, encara resten foscos alguns punts, entre ells com es trenquen les membranes nuclears i es reorganitza la matriu nuclear.

La matriu nuclear manté no solament l'arquitectura nuclear sinó que és també un important regulador del cicle cel·lular (Loidl i Eberharter, 1995). Es compon de la làmina nuclear, que és localitzada entre la membrana nuclear interna i la cromatina perifèrica, i consta de les laminines, el nuclèol i les proteïnes de matriu nuclears arranjades en una xarxa fibrillogranular (Bosman, 1999).

Hi ha evidències que suggereixen que les làmines nuclears són també present dins del nucleoplasma i formen part de la matriu nuclear (Neri et al., 1999), i que les proteïnes de la làmina nuclear específicament interaccionen amb la cromatina (Goldberg et al., 1999; Gotzmann i Foisner, 1999; Gruenbaum et al., 2000).

La làmina nuclear es desmunta durant la mitosi amb un procés que és dependent de la fosforilació de les laminines (Ottaviano i Gerace, 1985). Interessantment, l'estructura matricial nuclear canvia profundament per processos de malignitat, que impliquen perturbacions en el plegament de les proteïnes, en la fidelitat de la replicació del genoma, i en l'expressió gènica (Nickerson, 1998).

La cohesió de cromàtides germanes i la separació a la transició de la metafase a l'anafase és essencial per permetre la segregació precisa dels cromosomes, però el mecanisme que controla aquest procés no s'entén encara plenament (Biggins i Murray, 1998).

Certes proteïnes, com la securina, mantenen la cohesió entre cromàtides germanes, mentre que les proteïnes proteolítiques com l'endopeptidasa separasa romanen inhibides fins a la metafase per l'afinitat a la securina i per la fosforilació inhibidora específica.

La progressió des de la metafase fins a l'anafase exigeix en diversos passos pèrdua de cohesió entre les cromàtides germanes per proteòlisi dependent d'ubiquitina (Yanagida, 1995). La divisió proteolítica del complex de cohesina és necessària per a la separació de les cromàtides germanes en els dos pols de la cèl·lula durant l'anafase (Nasmyth, 1999; Uhlmann et al., 1999; Nasmyth et al., 2002). Les separases es tornen actives quan les seves proteïnes inhibidores pateixen proteòlisi pel complex que promou l'anafase (Nasmyth, 1999). Encara, a l'anafase la separasa mateixa pateix proteòlisi en tres llocs adjacents concomitants amb la seva activació (Zou et al., 2002).

En la transició de la metafase a l'anafase la separació de les dues cromàtides germanes necessita complexos processos per l'allargament dels fusos i la seva estabilitat. En els llevats en gemmació hi ha implicades proteïnes dependents de securina que sembla que siguin independents de la separasa Esp1 (Severin et al., 2001). Aquests descobriments evidencien la complexitat d'aquest procés altament coordinat i el fet que

certes proteases que romanen inidentificades participin tant en la separació de les cromàtides germanes, com en assegurar l'estabilitat del fus mitòtic.

En aquesta tesi, donat que es va veure MMP-9 dins de les cèl·lules, es va voler estudiar si la MMP-9 té un paper intracel·lular i vam observar una possible relació d'aquesta proteïna amb la divisió cel·lular.

No hi ha antecedents sobre aquesta possible relació tret d'un estudi que va veure l'acumulació de TIMP-1 (l'inhibidor de la MMP-9) en el nucli de fibroblasts humans associada al cicle cel·lular, produint-se el màxim en la fase S del cicle (Zhao et al., 1998). També es coneix que el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) regula a l'alça l'expressió de la MMP-9 (Kondapaka et al., 1997; Visscher et al., 1997; Reddy et al., 1999; O-charoenrat et al., 2000) i que els inhibidors de la MMP-9 redueixen el creixement cel·lular de tumors (Price et al., 1999; Rabbani et al., 2000; Tonn et al., 1999).

## 2.5 Substrats de les MMPs: L'agrina com a possible substrate de la MMP-3.

La idea simplista segons la qual les MMP s'impliquen essencialment en la degradació de proteïnes i tenen per tant un paper deleteri, mentre que seus inhibidors, endògens o de síntesi, tenen efectes més aviat benèfics deixa progressivament lloc a una visió més complexa de la biologia del sistema MMP/TIMP.

Les MMPs modulen l'activitat de nombroses proteïnes extracel·lulars i són veritables reguladors de l'entorn cel·lular. Observar quins són els substrats de les MMPs pot ajudar a explicar el paper de les MMPs en la fisiologia i patologia del cervell. Les MMPs tenen diversos substrats, i és la seva activitat, temporal i espacialment molt restringida, la que en determina l'especificitat.

Associades a membrana			
MMP-14/MT1-MMP	Pro-MMP-2,13 CD44 unit a la superf.cel. Transglutaminasa de teixit (tTG) unida a la superf. cel.	MMP-2,13 Alliberament de CD44 Alliberament de tTG	
MMP-15/MT2-MMP	Transglutaminasa de teixit (tTG) unida a la superf. cel.	Alliberament de tTG	Gelatina, fibronectina, vitronectina, col·lagen, agregà
MMP-16/MT3-MMP	Pro-MMP-2 Transglutaminasa de teixit (tTG) unida a la superf. cel.	MMP-2 Alliberament de tTG	
MMP-24/MT5-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2	
MMP-17/MT4-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2	Gelatina
MMP-25/MT6-MMP	Pro-MMP-2	MMP-2	Gelatina, col·lagen IV, fibrina, fibronectina Laminina-1
MMP-23			Gelatina
<b>Altres MMPs</b>			
MMP-12/Metal·loelastasa	Plasminogen	Angiostatina	Elastina, fibronectina, fibrina/fibrinogen, Laminina, proteoglicans
MMP-19/RAS 1			Gelatina, tenascina, fibronectina Col·lagen IV, laminina, entactina Fibrina/fibrinogen, agregà COMP
MMP-20/Enamelisina MMP-28/Epilisina			Amelogenina, agregà, COMP



## Introducció

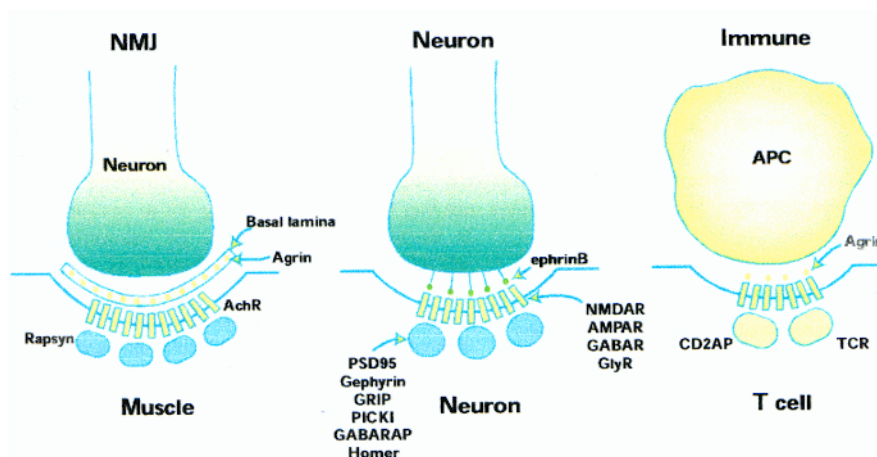
MMP	Substrates no tradicionals	Efectors resultants	Substrates de la matriu extracel·lular
<b>Domini Mínim</b>			
MMP7/ Matrilisina	Pro- $\alpha$ -defensina Decorina FAS-L unit a la superfície cel·lular  Integrina B4 E-Cadherina Plasminogen Pro-TNF $\alpha$ Pro-MMP-2,7	$\alpha$ -Defensina Biodisponible TGF $\beta$ FAS-L soluble actiu FAS-L soluble inactiu  Integrina B4 alliberada Ectodomini E-Cadherina Bioactiu Angioestatina TNF- $\alpha$ Biodisponible MMP-2,7	Proteoglicans, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Col·làgens: -III -IV -V -IX -X -XI, Fibrina/Fibrinogen, Entactina, Tenascina, Vitronectina
MMP-26/ Matrilisina-2	Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 MMP-9	Serpina Inactiva Pro-MMP-9	Gelatina, Col·lagen IV, Fibronectina, Fibrinogen
<b>Col·lagenasses</b>			
MMP-1/ Col·lagenassa-1	Prelecà IGFBP-2,3 Antiquimiotripsina $\alpha$ 1 Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 Pro-MMP-1,2 Pro-TNF- $\alpha$	FGF Biodisponible IGF Biodisponible Serpina Inactiva Serpina Inactiva MMP-1,2 TNF- $\alpha$ Biodisponible	Col·làgens: I-II-III-VII-X, Gelatina Entactina, Agrecà, Tenascina.
MMP-8/ Col·lagenassa-2	Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 Pro-MMP-8	Serpina Inactiva MMP-8	
MMP-13/ Col·lagenassa-3	Antiquimiotripsina $\alpha$ 1 Pro-MMP-9,13	Serpina Inactiva MMP-9,13	
<b>Estromelisinés</b>			
MMP-3/Estromelisinina-1	Prelecà Decorina Pro-HB-EGF Pro-IL1-B Plasminógen E-Cadherina IGFBP-3 Antiquimiotripsina $\alpha$ 1 Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 Pro-MMP-1,3,7,8,9,13 Pro-TNF $\alpha$	FGF Biodisponible TGF- $\beta$ Biodisponible HB-EGF IL-1 $\beta$ Angioestatina Ectodomini Bioactiu E-Cadherina IGF Biodisponible Serpina Inactiva Serpina Inactiva MMP-1,3,7,8,9,13 TNF- $\alpha$ Biodisponible	Proteoglicans, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Col·làgens: III -IV -V -IX -X -XI, Fibrina/Fibrinogen, Entactina, Tenascina, Vitronectina
MMP-10/Estromelisinina-2	Pro-MMP-1,8,10	MMP-1,8,10	
MMP-11/Estromelisinina-3	Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 IGFBP-1	Serpina inactiva IGF Biodisponible	Laminina, Fibronectina, Agrecà
<b>Gelatinasses</b>			
MMP-2/Gelatinasa A	Decorina Pro-TGF-B2 Pro-IL1-B MCP-3 IGFBP-3/5 ProTNF $\alpha$ FGF-R1 Pro-MMP-1,2,13	TGF- $\beta$ Biodisponible TGF- $\beta$ 2 IL-1 $\beta$ activa Quimioatracient inactiu IGF Biodisponible TNF- $\alpha$ Ectodomini Bioactiu FGF-R1 MMP-1,2,13	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Col·làgens: I-IV-V-VII-X-XI, Laminina, Agrecà, Vitronectina
MMP-9/Gelatinasa B	Desconeguda Pro-TGF-B2 Pro-IL1-B Unió de superfície Cel. IL-2Ra Plasminogen Inhibidor Proteinasa $\alpha$ 1 Pro-TNF $\alpha$	VEGF Biodisponible TGF- $\beta$ 2 IL-1 $\beta$ Alliberament de IL-2Ra Angioestatina Serpina inactiva TNF- $\alpha$	

**Taula 5 .** Classificació de les Metal·loproteïnases de la matriu i els seus substrates.

(Adaptat de McCawley and Matrisian, 2001).

Els substrats de matriu extracel·lular de la MMP-3 inclouen: la fibronectina, la laminina, l'elastina, el col·lagen IV, i els proteoglicans (Murphy et al., 1991), l'osteopontina (Agnihotri et al., 2001) i la proteïna SPARC (Sage et al., 2003). A més, la MMP-3 degrada uns altres substrats com: la MBP (Chandler et al., 1995), les immunoglobulines IgG (Gearing et al., 2002), i activa per proteolisi la MMP-9 en carcinomes de pit humans (Ramos et al., 1999). També podria tenir un paper antiinflamatori beneficiós a causa de la seva habilitat per trencar la proteïna quimioatracent dels monòcits, generant antagonistes dels receptors d'aquesta quimioquina (McQuibban et al., 2002).

La MMP-3 també degrada un component de la làmina basal de la sinapsi neuromuscular: l'**agrina** (VanSaun et al., 2000). L'agrina és un heparan sulfat proteoglicà (Tsen et al., 1995), que alliberat per les neurones motrius indueix l'agregació dels receptors d'acetilcolina en els cultius de miotúbuls (Reist et al., 1992).

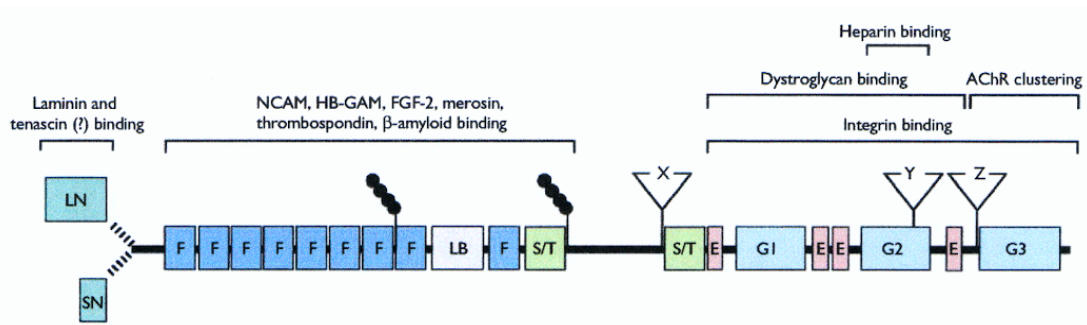


**Figura 40:** L'agrina és una proteïna comú a diversos tipus de sinapsis: neuromusculars, neuronals i immunològiques.  
(Shaw and Allen, 2001)

L'agrina és una proteïna comú a diversos tipus de sinapsis, està present en les unions neuromusculars, les neuronals i les immunològiques (figura 40).

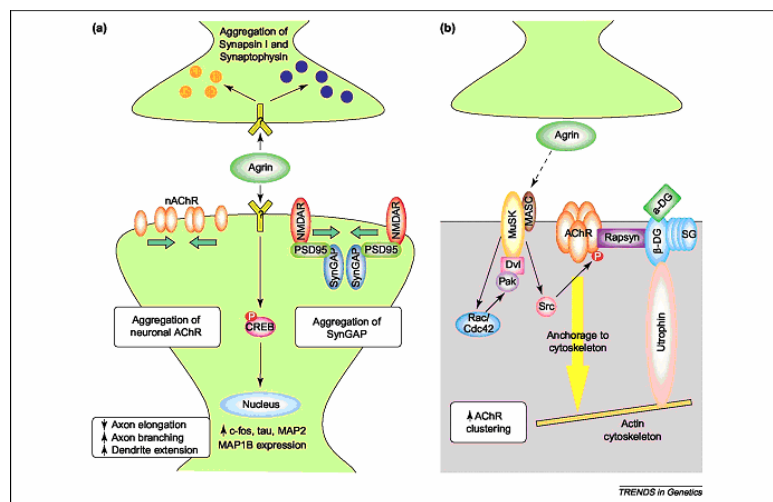
L'agrina presenta dues isoformes: l'**agrina-LN** (Long N terminus) i una isoforma característica del cervell, l'**agrina-SN** (Short N terminus). Aquestes dues isoformes de l'agrina s'obtenen del mateix gen però corresponen a proteïnes amb fragments Amino-terminals diferents que difereixen en la seva localització subcel·lular, distribució de teixits, i funció (Burgess et al., 2000).

Les dues isoformes s'exterioritzen des de les cèl·lules, però mentre l'agrina-LN s'uneix a la làmina basal, l'agrina-SN està associada a les cèl·lules com a una proteïna transmembranaral del tipus-II amb un extrem Amino-terminal intracel·lular i un extrem Carboxi-terminal extracel·lular (Neumann et al., 2001). Cal remarcar que el domini d'unió a la laminina present en l'agrina-LN té una estructura molt similar a la del TIMP-1.



**Figura 41:** L'agrina presenta dues isoformes amb diferents dominis N-terminals: un de llarg (l' agrina-LN) i un de curt (l' agrina-SN). (Smith and Hilgenberg,2002).

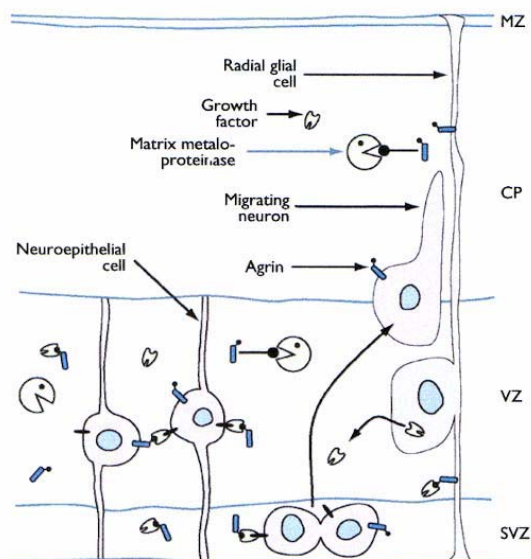
La isoforma de l'agrina més curta (agrina-SN) s'expressa al cervell, on roman lligada a diversos tipus de cèl·lules neuronals (Burgess et al., 2000) i no es restringeix a regions colinèrgiques (O'Connor et al., 1994).L'agrina està associada estretament amb una unió de tipus no covalent (Kroger et al.,1996) amb les membranes axonals i sinàptiques de les neurones. L'agrina que deriva de la làmina basal de sistema nerviós central és funcionalment diferent de les isoformes de l'agrina de la sinapsi neuromuscular, com l'anterior no provoca agregació de receptors d'acetilcolina en miotubs cultivats (Kroger et al.,1996).



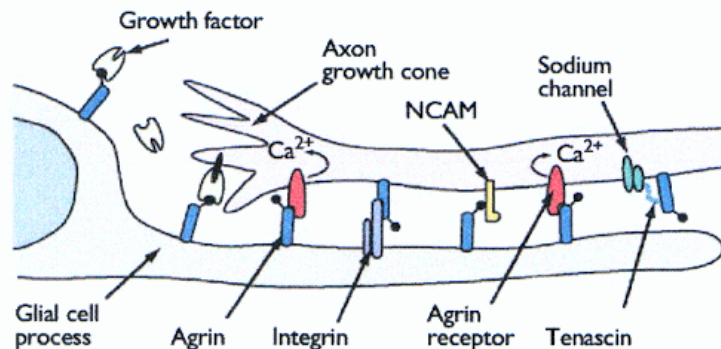
**Figura 42:** Transducció de senyals de l'agrina en la neurona i en la cèl·lula muscular (Lai and Ip, 2003).

Encara que la funció de l'agrina del cervell no s'entén plenament (Smith et al., 2002) se'n coneixen algunes funcions importants tant en el SNC en desenvolupament com en el SNC adult:

En el **SNC en desenvolupament** l'agrina juga un paper en la **neurogènesi** i l'**axogènesi** (Smith and Hilgenberg, 2002). L'agrina s'uneix a molècules d'adhesió cel·lular com són: la NCAM (Molècula d'Adhesió de les Cèl·lules Neurals) i les integrines; i a factors de creixement com: el FGF-2 (Factor de Creixement dels Fibroblasts) i el HBGAM (Molècula Associada al Creixement d'Unió a l'Heparina) influint en la migració neuronal i l'axogènesi. També activa els seus receptors neuronals provocant canvis en la concentració de calci intracel·lular que podrien influir en el comportament del con de creixement i l'estabilitat del citoesquelet axonal. Alhora regula la distribució dels canals de sodi voltatge dependents a través de la proteïna tenascina . També pot influir en la migració cel·lular modulant l'activitat de les MMPs, ja sigui directament o inhibint l'activació via plasmina (Figura 43).



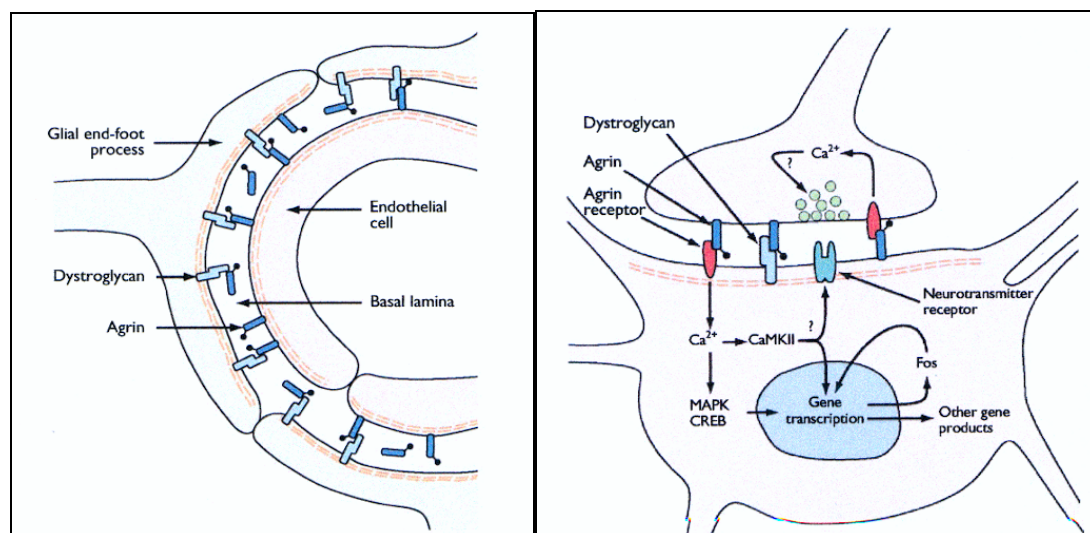
**Figura 43:** L'agrina participa en la neurogènesi.  
(Smith and Hilgenberg, 2002).



**Figura 44:** L'agrina i l'axogènesi.  
(Smith and Hilgenberg, 2002).

L'agrina **en el SNC adult** es troba en la BHE i en les sinapsis neuronals (Smith and Hilgenberg, 2002).

L'agrina forma part de la làmina basal de la **BHE** i contribueix a l'adhesió dels peus dels astròcits a les cèl·lules endotelials i a les propietats de filtració de la barrera (Figura 45).



**Figura 45:** L'agrina en el SNC adult es troba en la BHE i en les sinapsis neuronals. (Smith and Hilgenberg, 2002).

L'agrina afecta la diferenciació i la funció de les **sinapsis**, pot induir senyalització transinàptica (Burgess et al., 2002) i regula les respostes neuronals a neurotransmissors excitadors.

L'agrina regula la diferenciació de les sinapsis en les neurones de l'hipocamp (Ferreira et al., 1999; Böse et al., 2000) i la seva expressió en aquestes cèl·lules està regulada pel contacte cel·lular i l'activitat elèctrica (Lesuisse et al., 2000). En el gangli cervical superior deficient en agrina s'ha trobat una disminució en el nombre de sinapsis diferenciades i una transmissió sinàptica defectuosa (Gingras et al., 2002).

L'agrina provoca l'agregació de les proteïnes sinàptiques sinapsina i sinaptofisina en el terminal presinàptic, així com l'agregació dels receptors d'acetilcolina i synGAP en el terminal postsinàptic de neurones hipocampals. També regula l'expressió gènica de proteïnes del citoesquelet i afecta l'extensió de les neurites (figura 42).

A més, tant els ratolins com les neurones corticals cultivades deficientes en agrina són resistents a les lesions excitotòxiques, suggerint que l'agrina està implicat en la transmissió glutamatèrgica i en l'homeostasi neuronal del  $Ca^{2+}$  (Hilgenberg et al., 2002).

En les neurones del SNC, l'agrina transmet senyals a través de receptors sinàptics (Hoover et al., 2003). Els fragments C-terminal de l'agrina de cervell poden provocar la fosforilació de CREB i l'expressió de c-fos, i existeixen receptors neuronals a les sinapsis (Smith et al., 2002) que s'han identificat com integrines (Burgess et al., 2002).

Un estudi genòmic recent del cervell de rates isquèmiques mostra l'expressió reduïda del RNAm de l'agrina (Lu et al., 2003), però no s'ha estudiat si la proteïna agrina es modifica després de la isquèmia.

Veient les funcions de l'agrina en el SNC ens va semblar interessant estudiar si aquesta es veu afectada per la isquèmia/reperfusió, i, en cas afirmatiu, si la MMP-3 podria estar relacionada amb la seva proteolisi (de manera similar a com degrada l'agrina en la sinapsi neuromuscular).