



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

Tesi doctoral presentada per

**Sònia Solé i Tost**

Barcelona, Maig del 2005

## Discussió general

## **DISCUSSION GENERAL**

Darrerament s'està relacionant les metal·loproteases de matriu extracel·lular (MMPs) amb diverses patologies com són: el càncer, l'alzheimer, l'esclerosi múltiple, l'artritis, l'infart de miocardi o l'infart cerebral. Com s'ha comentat en la introducció es tracta d'enzims amb una regulació molt complexa i dels que encara no es coneix massa el seu funcionament.

Segons diversos autors les MMPs podrien estar implicades en alguns processos que tenen lloc després d'una isquèmia amb reperfusió com són: processos d'inflamació, migració cel·lular de la glia reactiva, pas dels neutròfils a través de la barrera hematoencefàlica, degradació de la làmina basal, degradació de la mielina, remodelació de teixits després d'una lesió i angiogènesi, formació d'edema, i la transformació hemorràgica, encara que alguna contribució de les MMPs en la regeneració no es pot excloure.

En aquesta tesi s'ha estudiat el possible paper de les MMPs en el nostre model d'isquèmia cerebral focal en la rata per tal d'intentar esbrinar una mica més sobre el paper d'aquests enzims en la isquèmia cerebral. Hem centrat el nostres estudis en les MMPs: -2, -9, i -3 així com en un possible substracte de la MMP-3: la forma neuronal de l'agrina. També hem estudiat el possible paper de la MMP-9 en la divisió cel·lular.

### **A) LES MMPs EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL:**

#### **A1. Les gelatinases (MMP-9 i MMP-2) i la isquèmia cerebral focal en la rata:**

#### **La isquèmia cerebral provoca un fort increment del contingut i l'activitat de la MMP-9 i la MMP-2:**

En el nostre primer article hem estimat que el cervell normal té un contingut de gelatinases d'uns 0.44 ng prot/mg. Les neurones són la font principal de MMP-9 constitutiva al cervell, mentre que la MMP-2 es troba en moltes cèl·lules neuronals incloent-hi: neurones, cèl·lules de glia i endoteli, d'acord amb dades prèvies (Gottschall i Deb, 1996; Taraboletti et al.,2000). La funció de les gelatinases en la fisiologia del cervell adult es desconeix actualment tot i que hi ha indicis de que la MMP-9 podria estar relacionada amb la plasticitat neuronal (Dzwonek et al.,2004).

Hem comprovat amb diversos mètodes (Western blot, zimografia de gel i zimografia in situ) que el contingut i l'activitat de les gelatinases (MMP-9 i MMP-2) augmenta de forma considerable després d'una isquèmia cerebral.

La **MMP-9** augmenta a les 4 hores postisquèmia i té un màxim a les 24 hores. Es localitza en els cossos neuronals i les fibres nervioses (apareixen engruiximents axonals), en els vasos sanguinis, així com en els neutròfils.

Respecte a la **MMP-2**, veiem que presenta un pic puntual d'augment d'activitat a les 4 hores i posteriorment un increment massiu als 4 dies postisquèmia. La MMP-2 es troba en la majoria de les cèl·lules, sobretot en les cèl·lules endotelials i en la microglia reactiva als 4 dies postisquèmia.

Després de la isquèmia cerebral focal s'observa un patró espai-temporal específic d'expressió i activació de la MMP-9 i la MMP-2 que podria ajudar a entendre el paper de les gelatinases després de la isquèmia cerebral. Ja que els seus increments d'expressió observats coincideixen amb el trencament de la barrera hematoencefàlica després de la isquèmia es creu que podrien estar implicades en aquest fet.

Se sap que l'activació de les MMPs porta a la pèrdua dels components de les làmines basals, el que pot contribuir a una pèrdua de la integritat microvascular durant les primeres 24 hores postisquèmia (Hamann et al., 1995). En aquesta consideració, Rosenberg et al. (1998) relacionen un augment en la MMP-2 a les 3 hores després d'una isquèmia focal transitòria en rates amb un trencament temporal de la barrera hematoencefàlica.

Tanmateix, uns quants estudis impliquen a la MMP-9 més que a la MMP-2 en la pèrdua de la totalitat de la BHE després de la isquèmia (Gasche et al., 1999; Fujimura et al., 1999), i nivells elevats de MMP-9 després d'una isquèmia estan associats amb la transformació hemorràgica en mandrils (Heo et al., 1999). També la MMP-9 està implicada en el trencament de la barrera de hematoencefàlica després de la infusió intracerebral del TNF  $\alpha$  (Rosenberg et al., 1995). Les nostres observacions coincideixen amb les d'aquests autors, ja que veiem un pic transitori d'augment d'activitat de la MMP-2 a les 3 hores, coincidint amb aquesta primera obertura transitòria de la barrera hematoencefàlica i un augment de la MMP-9 a les 24 hores, que és quan es produeix el trencament més important de la BHE.

A més d'aquest possible paper en el trencament de la BHE, l'increment tant fort de MMP-2 als 4 dies postisquèmia localitzat en la microglia reactiva ens porta a pensar que la MMP-2 podria tenir un paper en la facilitació de la migració i/o l'acció fagocítica (per exemple sobre la mielina, que és un substrat de la MMP-2) d'aquestes cèl·lules durant la intensa remodelació del teixit que es produeix en aquest temps.

### **La MMP-9 s'allibera a l'espai extracel·lular després de la isquèmia i és concomitant amb el reclutament dels neutròfils**

Se sap que les MMPs són alliberades a l'espai extracel·lular però no es coneix el destí d'aquests enzims secretats en el cervell, si queden lliures o bé s'uneixen a la membrana de certs tipus cel·lulars. Per tal d'esbrinar una mica més sobre aquest tema vam realitzar microdiàlisi in vivo en l'estriat de rates control i en rates sotmeses a isquèmia focal amb reperfusió.

L'anàlisi dels dialitzats ens va mostrar que la isquèmia provoca un alliberament i una acumulació a l'espai extracel·lular abans de 24 hores, sobretot de la proforma i el dímers de la MMP-9, i en menor mesura de la forma activa de 70KD, però no de la forma de 88 kD observada prèviament en el teixit. Això implica que la forma de 88 kDa, no és soluble en el fluid extracel·lular. Aquesta forma podria ser que estigues atrapada a la matriu extracel·lular, o lligada a les cèl·lules. No es van observar canvis en els nivells de MMP-2 a les 24 hores.

La MMP-9 també es detectava en els dialitzats d'alguns cervells de rates control, encara que això no implica necessàriament que estigui normalment lliure en l'espai extracel·lular. En efecte, tenim evidències per pensar que la lesió mecànica provocada per la implantació de la sonda microdiàlisi podria ser responsable de l'acumulació de MMP-9 en els dialitzats dels controls. Primer, l'hemisferi del cervell sotmès a microdiàlisi en rates controls (a les que no es realitzava la isquèmia) mostrava un augment de l'activitat gelatinasa en les zimografies en relació amb l'hemisferi al que no s'havia implantat la sonda i a rates no sotmeses a l'implant de la sonda. Segon, aquest augment es relacionava amb la presència de neutròfils en el teixit al voltant del lloc d'implantació de la sonda, comprovat tant per Western blot de l'enzim mieloperoxidasa (MPO) com per immunohistoquímica amb MPO. Les rates control que no mostraven cap augment de MMP-9 en els dialitzats, ni en el cervell, no expressaven MPO.

Està descrit que la implantació de la sonda de microdiàlisi provoca una lesió i una interrupció de la barrera hematoencefàlica en la proximitat de la sonda, que condueix a un edema vasogènic (Dykstra et al., 1992). Aquesta alteració és transitòria i la integritat de la BHE es pot recuperar després d'una hora de la implantació de la sonda (Benveniste et al., 1984; Terasaki et al., 1992). Tanmateix, la barrera hematoencefàlica roman permeable a molècules petites durant uns quants dies després de la implantació de la sonda, encara que es recupera més d'hora per a la permeabilitat a proteïnes (Morgan et al., 1996). Així que al realitzar la microdiàlisi a la barrera ja estaria al menys parcialment recuperada, encara que la lesió inicial facilita el dany capil·lar i el reclutament de neutròfils.

Així doncs, el dany vascular i la infiltració de neutròfils semblen estar implicats en l'alliberament de MMP-9 a l'espai extracel·lular detectat en les rates control després de la implantació de la sonda.

Encara que és probable que la lesió mecànica provocada per la sonda de microdiàlisis provoqui l'acumulació de MMP-9 en l'espai extracel·lular, en els dialitzats de rates sotmeses a isquèmia en relació amb les controls s'observava un increment força més acusat de la MMP-9. Aquest augment d'expressió de la MMP-9 degut a la isquèmia cerebral coincideix amb la infiltració de neutròfils que té un màxim entre les 24-48 h postisquèmia (Garcia et al., 1994). De fet, els neutròfils són rics en MMP-9 (Kjeldsen et al., 1992) i s'ha detectat marcatge de MMP-9 per immunohistoquímica en neutròfils infiltrats en el teixit cerebral isquèmic (Romanic et al., 1998; Rosenberg et al., 2001).

Així doncs l'alliberament de MMP-9 a l'espai extracel·lular del cervell isquèmic sembla ser concomitant amb el reclutament de neutròfils tant en les lesions mecàniques com en la isquèmia focal.

### **Els neutròfils són una important font de l'augment de la MMP-9 després de la isquèmia però no contribueixen a augmentar el dany tissular a les 24 hores.**

En base a aquestes observacions vam decidir comprovar si els neutròfils són una font important de l'augment de MMP-9 que s'observa després de la isquèmia.

Per aconseguir-ho vam bloquejar la infiltració de neutròfils per mitjà de dues estratègies: causant neutropènia (eliminació dels neutròfils circulants) a l'animal amb el fàrmac vinblastina i impedit l'adherència, i per tant el traspàs al teixit, dels neutròfils a la paret endotelial dels vasos amb l'ús d'anticossos contra la ICAM (la molècula d'adhesió més important per la infiltració dels neutròfils). Es comprovava l'eficàcia dels tractaments en impedir l'entrada de neutròfils al teixit infartat mirant si el cervell isquèmic a les 24 h no presentava expressió de MPO (marcador dels neutròfils).

En tots dos casos, en les rates en que el tractament havia funcionat, vam observar una forta reducció dels nivells de MMP-9 en el teixit postisquèmic pel que fa als dímers i la proforma de la MMP-9 però no a la forma de 88 kD.

L'augment de la forma de 88-kDa de la MMP-9 provocat per la isquèmia encara es trobava després de la neutropènia o el bloqueig de la ICAM-1, suggerint que l'augment en aquesta forma de MMP-9 no prové dels neutròfils sinó que és intrínseca al teixit isquèmic. De fet, seguíem trobant expressió de la MMP-9 en les fibres neuronals, sobretot en els engruïments axònics després de la isquèmia (que probablement reflecteixen alteracions dinàmiques en els axons) i en els vasos sanguinis, d'acord amb observacions d'altres grups (Mun-Bryce et al., 2002). També es seguia detectant un augment en l'activitat gelatinasa per zimografia in situ en neurones i vasos sanguinis a les 24 h després de la

isquèmia, com altres autors (Gu et al., 2002) suggerint una activació intrínseca de les gelatinases en el cervell després de la isquèmia.

Així doncs, els neutròfils són una important font de l'increment de la MMP-9 que observem després de la isquèmia. Són els responsables de l'augment dels dímers i la proforma de 95-kDa de la MMP-9 que es troba al cervell (lliure al medi extracel·lular), però no modifiquen l'augment de la forma endògena de la MMP-9 de 88-kDa (no trobada en els dialitzats) que prové segurament de les neurones i els vasos sanguinis isquèmics.

Una altra observació força interessant no mostrada en l'article, és que la infiltració de neutròfils al teixit isquèmic no contribueix significativament a incrementar el volum de l'infart *cerebral* a les 24 h en el nostre model. Per tant, la diana terapèutica per inhibir la MMP-9 seria la forma endògena del cervell.

En resum, les gelatinases podrien estar relacionades amb diversos fenòmens relacionats amb la isquèmia: el trencament de la BHE, la infiltració de neutròfils, la reacció glial i la destrucció de la mielina.

## **A2. La MMP-3 i el seu possible substrat : la forma neuronal de l'agrina en la isquèmia cerebral :**

Hem observat que la isquèmia produeix una activació de la MMP-3 a les 24 hores i als 4 dies postisquèmia (per Western blot i ús d'un substrate fluorogènic). I que l'expressió de la MMP-3 després de la isquèmia es localitza : en neurones que degeneren a les 24 hores ,en la microvasculatura, en la micròglia reactiva/macròfags a partir del 4 dies i en els oligodendròcits augmentada als 14 dies postisquèmia .

Per confirmar l'origen cel·lular de la MMP-3 vam estudiar l'expressió de la MMP-3 per Western blot en cultius cel·lulars i vam trobar-ne sobretot en neurones i, en menor mesura, en oligodendròcits madurs, però no en progenitors d'oligodendròcits, astròcits o micròglia. La zimografia de caseïna ens va revelar activitat de la MMP-3 en els cultius de neurones. Així doncs, les neurones semblen ser el tipus cel·lular més ric en MMP-3, seguit dels oligodendròcits madurs. Aquests resultats coincideixen amb els trobats en el teixit a excepció de la micròglia reactiva. Aquesta diferència es podria explicar pel fet que la micròglia en cultiu no estaria activada.

Ja que s'ha descrit que la MMP-3 pot degradar l'agrina de l'unió neuromuscular (VanSaun et al.,2000) ens va semblar interessant estudiar si podria també tenir com a substrate la forma neuronal de l'agrina en el cervell que està molt menys estudiada. I vam veure que, efectivament, la MMP-3 pot degradar in vitro l'agrina neuronal present en homogenats de cervell .

Vam estudiar també l'expressió i la localització de la forma neuronal de l'agrina en el cervell normal i després de la isquèmia. Per Western blot vam observar que després de la isquèmia (als 1, 4 i 7 dies) es genera una forma de pes molecular més baix de la forma neuronal de l'agrina, deguda segurament a proteolisi.

Després de la isquèmia veiem l'agrina localitzada en les neurones, en els astròcits reactius als 7 dies, en acúmul al voltant dels vasos sanguinis als 4 dies i en les vesícules de fagocitosi de la microglia reactiva als 4 i als 14 dies.

En cultius cel·lulars l'agrina s'expressa en neurones i astròcits .

També hem estudiat un possible substracte de la MMP-3: la forma neuronal de l'agrina (forma SN), un heparan sulfat proteoglicà localitzat a les sinapsis neuronals del que es coneix molt poc i que podria estar relacionat amb processos d'excitotoxicitat (fenomen que es produeix en la isquèmia).

Veiem l'agrina localitzada en les neurones, en els astròcits reactius als 7 dies i en les vesícules de fagocitosi de la microglia reactiva als 4 dies. També hem vist que després de la isquèmia ( a les 24 hores i als 4 dies) es genera una forma de més baix pes molecular que podria ser deguda a la proteolisi d'aquesta molécula per la MMP-3. De fet hem vist ,in vitro, que la MMP-3 és capaç de digerir aquesta proteïna.

El fet que veiem la MMP-3 localitzada en les neurones fa pensar que podria tenir un paper en la degradació de l'agrina neuronal , mentre que la localització en la microglia reactiva podria indicar una implicació de la MMP-3 en funcions bàsiques d'aquesta com la migració i la fagocitosi de substàncies com l'agrina, dins del procés de remodelació que pateix el teixit després d'una isquèmia cerebral.

### **MMP-3 en neurones del cervell isquèmic**

Hem demostrat l'activació de la MMP-3 després d'una isquèmia cerebral transitòria amb reperfusió amb l'aparició d'una banda activa de 45 kDa que no era present al cervell de control. L'expressió de la MMP-3 després de la isquèmia s'ha mostrat prèviament en neurones isquèmiques i cèl·lules de micròglia a 24 h després d'una oclusió transitòria de l'artèria cerebral mitjana (ACM) en rates (Rosenberg et al.,2001). D'acord amb aquest estudi, trobàvem una forta expressió de la MMP-3 en neurones isquèmiques al centre de l'infart, mostrant una morfologia triangular típica, que és compatible amb un procés de mort cel·lular isquèmica (Deb et al.,1996). Així, a més a més del seu paper extracel·lular degradant components de matriu, és probable que la MMP-3 neuronal es torni activa dins de les cèl·lules i actui com un enzim proteolític que degrada components cel·lulars durant la mort cel·lular isquèmica. Això no implica necessàriament que la MMP-3 sigui causant de la mort cel·lular, també podria ser simplement una conseqüència del procés de mort cel·lular.



### **La MMP-3 trenca l'agrina transmembranal neuronal**

Hem vist que la MMP-3 pot degradar in vitro l'agrina del cervell, que està situada en les neurones, i que l'agrina neuronal desapareix de les membranes cel·lulars després de la isquèmia. Alhora, hem observat l'aparició d'un fragment d'agrina de pes molecular més baix que no romanía associat amb les membranes, suggerint alliberament de l'agrina trencada al parènquima.

S'ha demostrat que la MMP-3 pot realitzar la proteolisi de l'agrina de la làmina basal sinàptica en la sinapsi neuromuscular (VanSaun et al.,2000) per a la isoforma de l'agrina, anomenada forma LN, però no s'ha descrit prèviament per a l'isoforma de l'agrina de cervell, anomenada forma SN. Encara que aquestes dues isoforms de l'agrina s'obtenen del mateix gen, tenen diferent el fragment N-terminal el que fa que difereixin en la seva localització subcel·lular, distribució de teixits i funció.

L'agrina LN s'uneix a la làmina basal, mentre l'agrina SN és una proteïna de transmembranal del tipus-II amb un domini N-terminal intracel·lular.

L'anticòs que utilitzàvem en l'estudi present contra l'agrina de rates reconeix un epítop situat a la vora de l'estació C-terminal de les formes d'agrina que contenen el 8aa, 11aa, o inserció de 19aa al lloc que empalma Z; aquestes formes es restringeixen al SNC.

Aquí mostrem que els fragments C-terminals de l'agrina trencada després de la isquèmia no romanen associats a la membrana. Si això té una implicació funcional altra que la pèrdua de l'agrina neuronal de les membranes queda per veure's. La proteolisi de l'ectodomini per la MMP-3, podria representar un control regulador de la funció de l'agrina en el SNC.

El fet que, en el SNC, l'agrina sigui una proteïna transmembrana suggereix l'existència d'un receptor que aconsegueix la translocació de senyals des de l'espai extracel·lular fins al citoplasma (Neumann et al.,2001). En neurones del SNC, l'agrina fa senyals a través de receptors sinàptics (Hoover et al.,2003) que s'han identificat com a integrines (Burgess et al.,2002). L'agrina regula la diferenciació de la sinapsi en neurones d'hipocamp (Böse et al., 2000; Ferreira et al.,1999) i s'ha proposat una regulació de l'expressió de l'agrina dependent de l'activitat elèctrica i el contacte cel·lular (Lesuisse et al., 2000). Una disminució en el nombre de sinapsis diferenciades i una transmissió sinàptica defectuosa s'han trobat al gangli cervical superior deficient en agrina (Gingras et al.,2002).

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

Tenint en compte això, la pèrdua de l'agrina de les membranes cel·lulars en la isquèmia podria contribuir a un deteriorament de la transmissió sinàptica, però podria conferir resistència a l'excitotoxicitat. No obstant això, el destí i funció dels fragments d'agrina trencats no es coneix. Aquests fragments podrien provocar la fosforilació de CREB i expressió de c-fos, hi ha evidències que suggereixen que lliguen a un receptor neuronal discret a les sinapsis (Smith et al. 2002,). Segons aquest punt de vista, els fragments d'agrina terminals alliberats a l'espai extracel·lular en la isquèmia podrien estimular l'afluència de  $Ca^{2+}$  a l'interior de les neurones i exacerbar la cascada excitotòxica.

### **La MMP-3 no s'expressa en els astròcits en estat normal del cervell, però l'agrina es troba en els astròcits reactius després d'una isquèmia/reperfusió**

L'agrina no es troba en els astròcits residents del cervell control. Tanmateix, només quan es forma la cicatriu glial als 4 dies postisquèmia, observem que els astròcits reactius són immunoreactius per l'agrina. És probable que aquesta localització de l'agrina nova resulti d'una síntesi de novo en aquests astròcits reactius.

L'expressió de l'agrina també es detecta en astròcits en cultiu, estudiats en estat confluent. Aquests astròcits cultivats mostren expressió basal de Hsp-27 (Fauconneau et al.,2002), que no es troba normalment en astròcits residents del cervell de control (Kato et al.,1995), suggerint que tenen algun grau de reactivitat.

És concebible que l'agrina en els astròcits reactius pugui contribuir a la connexió astrocítica i a la comunicació i podria estar implicada en la formació d'un ambient no permissiu al creixement dels axons, ja que el fragment C-terminal de l'agrina inhibeix l'allargament dels axons en neurones d'hipocamp en cultiu (Manty et al.,2001).

L'agrina dels astròcits reactius estaria protegida de la proteolisi, ja que aquestes cèl·lules estan desproveïdes de MMP-3, oferint una explicació de per què romandria a la cicatriu de glial durant uns quants dies.

### **La MMP-3 s'expressa en els oligodendròcits madurs i la seva expressió augmenta en els oligodendròcits després d'una isquèmia/reperfusió**

Els oligodendròcits són immunoreactius a la MMP-3 en el cos callós dels cervells control. Després de la isquèmia, la intensitat de tinció de la MMP-3 s'augmenta de forma remarcable en els oligodendròcits situats en l'àrea isquèmica, incloent-hi aquells en el cos callós ipsilateral i també al còrtex i estriatal en la proximitat i dins de la cicatriu glial.

En el SNC lesionat, els oligodendròcits es tornen reactius; mostren signes d'hipertròfia, i es divideixen per proporcionar oligodendròcits nous per la remielinació (Levine et al.,2001).

No vam trobar MMP-3 en els precursors dels oligodendròcits pel que aquestes cèl·lules serien incapaces de degradar l'agrina, i això podria explicar l'observació que els astròcits de la cicatriu glial inhibeixin la migració dels precursors d'oligodendròcits (Fawcett et al.,1999). L'agrina no es detectava en oligodendròcits del teixit o en cèl·lules cultivades.

### **La micròglia/macròfags reactius expressen la MMP-3 i contenen dipòsits d'agrina**

La MMP-3 també es detecta en la micròglia/macròfags reactius després d'una isquèmia/reperfusió. Aquestes cèl·lules estan situades dins del cor de l'infart, on els dipòsits discrets immunoreactius a l'agrina s'observaven envoltant vasos sanguinis i dins del parènquima infartat.

Aquests macròfags podrien degradar acumulacions d'agrina en la matriu de les regions infartades. També s'observa en la micròglia/macròfags reactius una acumulació de Blau Luxol fet que és compatible amb la degradació de la mielina.

La mielina és també un substrat de la MMP-3, així és probable que la MMP-3 dels macròfags contribueixi a la degradació de l'agrina i la mielina .

### **L'agrina i la MMP-3 en el microvasculatura**

L'agrina és un component de la làmina basal (Magill-Solc et al.,1988;Rupp et al.,1991; Godfrey et al.,1991), que és una estructura matricial extracel·lular especialitzada que dóna suport estructural a la microvasculatura i que en el cervell té un paper essencial en el manteniment de la integritat de la BHE.

La isquèmia provoca un trencament de la BHE i hi ha extravasació de proteïnes del plasma al parènquima, amb un màxim entre 1-2 dies.

Vam detectar MMP-3 envoltant els vasos sanguinis després de la isquèmia, que una altra vegada podria ser responsable de degradació de l'agrina en aquesta localització i així contribuir a augmentat la permeabilitat de la BHE. No obstant això, abans de 4-7 dies postisquèmia detectàvem dipòsits d'agrina immunoreactiva que envoltant els vasos sanguinis dins de l'infart, suggerint que certs fragments de l'agrina neuronal formada després de la isquèmia s'acumulen en aquest lloc.

En resum, aquest estudi mostra l'activació de la MMP-3 després d'una isquèmia/reperfusió, que es trobava en neurones, oligodendròcits i micròglia/macròfags reactius; l'habilitat de MMP-3 per trencar l'agrina neuronal del cervell ; la desaparició de l'agrina de les membranes neuronals després de la isquèmia, amb la generació de fragments d'agrina trencats que no romanen associats amb membranes cel·lulars; i l'expressió de l'agrina pels astròcits reactius. Aquests resultats confirmen que la isquèmia/reperfusió

provoca l'activació de la MMP-3 que ocasiona la proteolisi de certes proteïnes, com l'agrina i la mielina. Aquest estudi també suggereix que el trencament de l'agrina transmembranal neuronal podria deteriorar la neurotransmissió sinàptica i realçar l'excitotoxicitat durant l'acció de fragments d'agrina C-terminalis alliberats, i l'expressió de l'agrina pels astròcits reactius podria contribuir a la generació d'un ambient no permissiu per al creixement dels axons.

### **B) POSSIBLE PAPER DE LA MMP-9 EN LA DIVISIÓ CEL·LULAR:**

Els resultats obtinguts en els nostres estudis realitzats en cultius de cèl·lules de neuroblastoma (línia SHSY5Y) evidencien que la MMP-9, o una proteïna que s'assembla a la MMP-9, pot tenir alguna funció durant la divisió cel·lular.

Hem observat (amb dos anticossos diferents) una tinció i una activitat més intensa de la MMP-9 en cèl·lules en mitosi i que aquesta tinció de MMP-9 es distribuïx al voltant dels cromosomes d'una manera dinàmica i ben orquestrada en les diferents etapes de la mitosi.

Per altra banda els inhibidors de la MMP-9 interfereixen amb el cicle cel·lular inhibint l'entrada de les cèl·lules en la mitosi i reduint el creixement del cultiu.

Finalment hem observat que l'estimulació de la proliferació cel·lular amb el factor de creixement TGF- $\zeta$  està associat a l'activació de la MMP-9.

L'expressió de MMP-9 més alta es troba a les primeres fases de mitosi. Mentre la divisió cel·lular progressa i el fus mitòtic es forma, la MMP-9 es situa envoltant els microtúbuls.

Durant la progressió des de la metafase fins a l'anafase, quan augmenta la llargada del fus mitòtic, la MMP-9 apareix entre les dues cromàtides que progressivament es separen l'una de l'altra cap als pols oposats del fus mitòtic. Aquesta localització indica que l'activitat de la MMP-9 podria participar en la reestructuració de la matriu cel·lular per facilitar la separació de les cromàtides germanes, que es mantenen unides a través del complex de cohesina (Biggins i Murray, 1998; Orr-Weaver, 1999).

De les observacions presents pensem que mereix ser més explorada la possibilitat que l'activitat de la MMP-9 pugui contribuir al trencament de les membranes nuclears i/o a la reorganització de la matriu nuclear durant la separació de les cromàtides.

També hem observat que el tractament amb TGF- $\zeta$ , un factor de creixement mitogènic que augmenta el creixement cel·lular i la proliferació actuant sobre el receptor del factor de creixement epidèrmic, l'EGFR (Massagué, 1983, Reynolds et al., 1983; Derynck, 1988), provoca l'activació de la MMP-9.

Segons la bibliografia el 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).

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). En els nostres experiments, el creixement cel·lular induït per TGF- $\zeta$  era també sensible a l'acció d'inhibidors de la MMP-9, suggerint que l'activació de la MMP-9 està implicada en aquest procés.

Aquests fets estan en consonància amb l'evidència de que les vies de senyalització del EGFR són un objectiu pel tractament de certs tipus de càncer (Humphreys i Hennighausen, 2000).

Així doncs, la MMP-9 además de tenir un paper en l'espai extracel·lular podria tenir un paper en el compartiment cel·lular i estar implicada en certs passos de la divisió cel·lular.

