

Implicaciones clínicas de la investigación básica

Metaloproteinasas en la inflamación intestinal

CARLOS MEDINA Y ALFREDO SANTANA

Servicio de Aparato Digestivo y Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife. España.

Concepto y clasificación

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son un conjunto de enzimas dependientes de calcio-cinc capaces de degradar la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo. Clásicamente se han dividido en 3 grandes grupos¹⁻⁵, según su especificidad de sustrato (colagenasas, gelatinasas y estromelisininas), aunque más recientemente se han identificado las denominadas metaloproteinasas de membrana (MT-MMP), cuya función es activar las MMP liberadas al espacio extracelular^{6,7} (tabla 1). Todas las MMP tienen una estructura molecular similar, y son liberadas al es-

Puntos clave

- Las metaloproteinasas de matriz son enzimas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular del tejido conectivo cuya actividad es controlada por los TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), y participan en diferentes procesos fisiológicos.
- La hiperactivación de las metaloproteinasas de matriz puede estar implicada en la lesión tisular asociada con la inflamación en diferentes procesos patológicos.
- La adición directa de las metaloproteinasas de matriz sobre el tejido intestinal fetal humano produce una lesión tisular directamente proporcional a la cantidad de enzima utilizada.
- Existe un aumento de actividad y de expresión de las metaloproteinasas de matriz en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, lo que sugiere que estas enzimas tienen un papel importante en la lesión tisular que se produce en esta enfermedad.
- Se ha observado un efecto beneficioso de diversos inhibidores sintéticos específicos de las metaloproteinasas de matriz en diferentes modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal.

pacio extracelular como zimógenos inactivos (proformas) que requieren un proceso proteolítico para su activación y necesitan, en muchos casos, la participación de plasmina⁸, elastasa⁹ o radicales de oxígeno¹⁰. La actividad y la expresión de estas enzimas puede detectarse por diferentes métodos de laboratorio¹¹⁻¹⁴ (tabla 2).

En condiciones normales, las MMP participan en diversos procesos fisiológicos y su actividad está regulada por inhibidores endógenos de éstas, denominados TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Sin embargo, un aumento de la síntesis y de la actividad de las MMP puede dar lugar a la degradación excesiva de los diferentes componentes de la matriz extracelular y a la lesión tisular, como se ha observado en diferentes procesos tumorales e inflamatorios¹⁵⁻²⁷. En la actualidad, se han desarrollado diversos agentes terapéuticos específicos capaces de bloquear la actividad de estas enzimas de forma reversible y competitiva, como el batimastato y el marimastato. Datos preclínicos en modelos animales experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) sugieren un efecto beneficioso de estos fármacos en el tratamiento de la enfermedad.

Metaloproteinasas y procesos inflamatorios intestinales

Diferentes citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), pueden estimular la síntesis y liberación de las MMP por parte de células del tejido conectivo degradando la matriz extracelular (fig. 1). El efecto lesivo directo de las MMP en el intestino se conoce a partir de un estudio realizado por Pender et al²⁸. En este trabajo se demostró que la activación de los linfocitos T de la lámina propia de un modelo *in vitro* con tejido intestinal fetal humano mediante *pokeweed mitogen* (PWM), producía una gran lesión tisular mediada por las MMP, fundamentalmente por la MMP-3. Además, se observó que la lesión tisular inducida por el PWM se abolía al añadir un inhibidor de las MMP, y que la adición directa de las MMP sobre el tejido intestinal producía una lesión tisular dependiente de la dosis similar a la observada con el PWM.

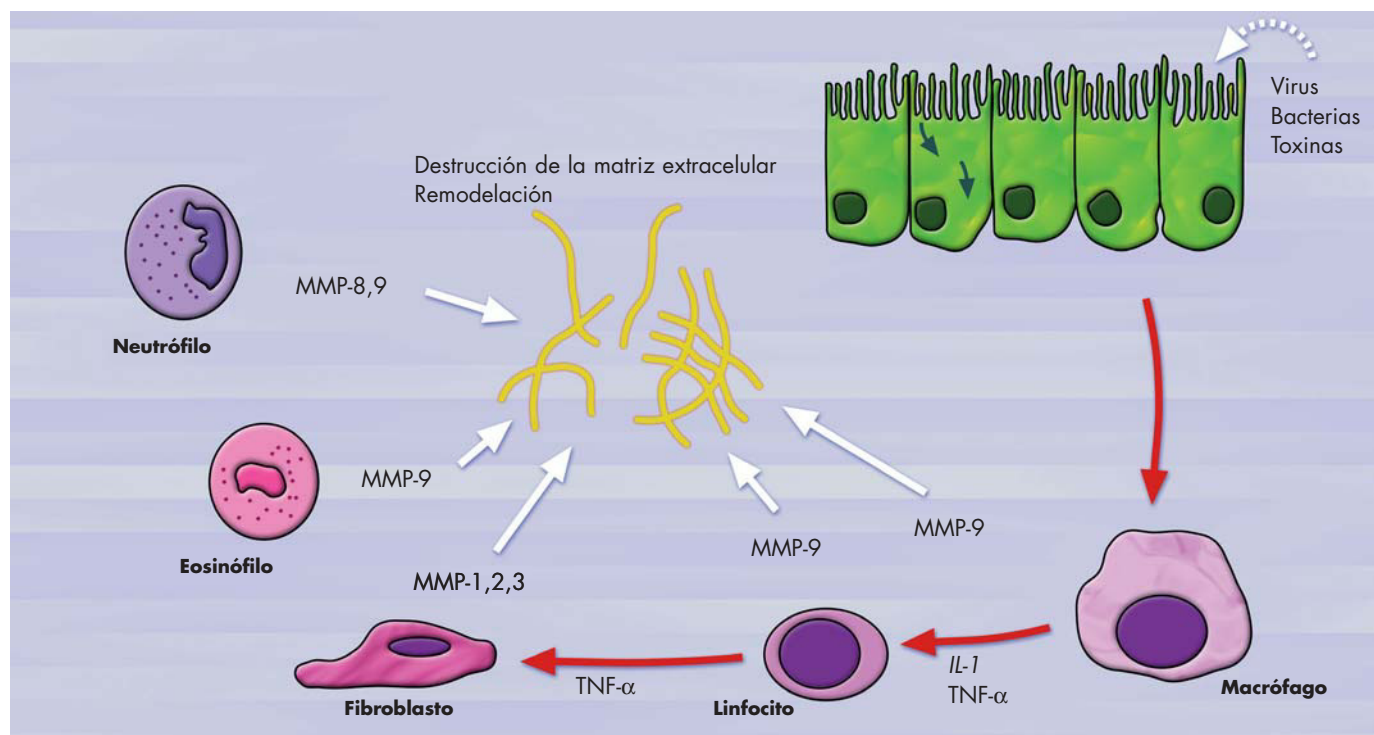


Figura 1. La presencia de virus, bacterias o toxinas de la luz intestinal puede desencadenar una respuesta inmunitaria, con activación de macrófagos, linfocitos T y fibroblastos y la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) que, a su vez, activan leucocitos neutrófilos y eosinófilos. Todas estas células activadas son capaces de liberar diversas metaloproteinasas al espacio extracelular, degradando los diferentes componentes de la matriz del tejido conectivo.

Tabla 1. Clasificación general de las metaloproteinasas de matriz (MMP)

Familia de MMP	Nombre	Número	Sustrato
Colagenasas	Colagenasa intersticial Colagenasa neutrofílica Colagenasa-3	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colágeno tipo I, II, III
Gelatinasas	Gelatinasa A Gelatinasa B	MMP-2 MMP-9	Colágeno tipo IV, V
Estromelisin	Estromelisin-1 Estromelisin-2 Matrilisina Estromelisin-3	MMP-3 MMP-10 MMP-7 MMP-11	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágeno
MMP-membrana	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-21	Indefinido

Recientemente se han demostrado concentraciones elevadas de MMP en zonas intestinales inflamadas en pacientes con EII, lo que sugiere que estas enzimas tienen un papel importante en la lesión tisular asociada con la inflamación intestinal. Así, Bailey et al²⁹ observaron por inmunofluorescencia indirecta que existía un aumento de la expresión de la MMP-9 en las células inflamatorias y de la MMP-1 en las zonas fibróticas en pacientes con enfermedad de Crohn, además de un aumento de la MMP-1 en la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa. Además, Baugh et al³⁰ encontraron un aumento de la actividad y de la expresión de la MMP-9 y de la MMP-2 en pacientes con EII, y la MMP-9

Tabla 2. Métodos diagnósticos más frecuentes para el estudio de las metaloproteinasas de matriz

Técnica	Utilidad
Cimografía	Detección de actividad gelatinolítica
Western blot	Análisis de expresión proteica mediante anticuerpos específicos
RT-PCR	Análisis de expresión génica
Inmunohistoquímica	Expresión y localización proteica mediante anticuerpos específicos

fue la enzima más sobreexpresada (fig. 2). Von Lampe et al³¹ también demostraron una marcada sobreexpresión de la MMP-1 y MMP-3 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con EII frente a sujetos sanos, mientras que Heuschkel et al³² encontraron una sobreexpresión de la MMP-3 en niños con EII mediante RT-PCR cuantitativa y *Western blot*. Además, en pacientes con reserorititis ("pouchitis"), se ha observado un aumento de la expresión de la MMP-1 y la MMP-2 mediante ELISA, así como una disminución significativa de las concentraciones de ambas enzimas y mejoría histológica tras 6 semanas de tratamiento médico con metronidazol³³.

Finalmente, se ha observado una sobreexpresión de las MMP en otras enfermedades digestivas donde los linfocitos T pueden desempeñar un papel importante, como la enfermedad celíaca. Así, Daum et al³⁴ demostraron un aumento de la expresión de la MMP-1 y la MMP-3 en fibroblastos y macrófagos subepiteliales en pacientes con enfermedad celíaca, mientras que una dieta sin gluten producía una disminución significativa de las concentraciones de estas enzimas, conjuntamente con la mejoría de la lesión histológica.

Metaloproteinasas y modelos animales experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Se ha demostrado un aumento de la actividad y de la expresión de las MMP en diversos modelos animales experimentales de colitis. Así, en un modelo de colitis transmural inducido en ratones inmunodeficientes, se observó un aumento de la actividad y de la expresión de la MMP-2 y de la MMP-9 mediante cimografía e inmunohistoquímica en el tejido lesionado, así como un aumento de las serinproteasas³⁵. Más tarde, en un modelo de EII inducido por dextra-

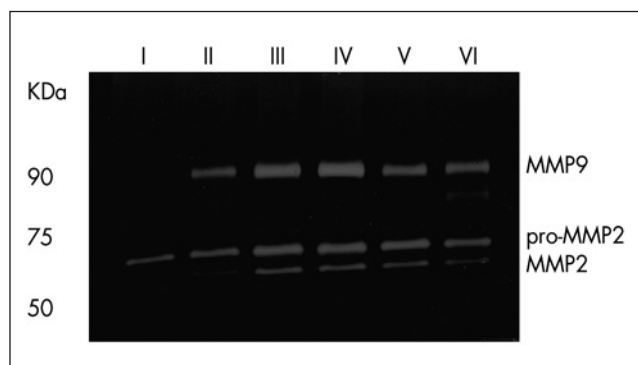


Figura 2. Cimografía de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Se aprecia una banda de actividad gelatinolítica a 92 KDa que corresponde a la MMP-9 en las muestras tisulares de los pacientes con EII (III, IV, V) frente a sujetos sanos (I, II). También se pueden observar bandas a 72 y 68 KDa, que corresponden a la proforma y a la forma activa de la MMP-2, respectivamente.

no sulfato sódico en ratas, también se observó un aumento de la actividad y de la expresión de la MMP-9 mediante cimografía y *Western blot*, respectivamente³⁶, mientras que la MMP-2 permanecía inalterada. En otro trabajo, en ratones con colitis inducida por dextrano sulfato sódico, también se demostró mediante inmunohistoquímica un aumento de la expresión de las colagenasas, concretamente de la MMP-8, en las zonas que rodean las criptas lesionadas³⁷. En este modelo experimental en ratas, se observó que el empleo de un inhibidor específico de las MMP, el CGS 27023 A, redujo de forma significativa el grado de lesión histológica en el grupo tratado con el inhibidor, pero no modificó la liberación de mediadores de la inflamación (mieloperoxidasa tisular y eicosanoides intraluminales), lo que sugiere que este fármaco no tenía efecto sobre el reclutamiento de las células inflamatorias³⁶. Además, también se ha observado un efecto terapéutico beneficioso de diferentes inhibidores sintéticos de las MMP, como la fenantrolina, el marimastato o el batimastato, en el modelo experimental de colitis inducido por el ácido trinitrobenzensulfónico³⁸⁻⁴⁰.

Conclusiones

Las MMP son enzimas capaces de degradar la matriz extracelular del tejido conectivo, por lo que un aumento de su actividad en respuesta a diferentes señales bioquímicas puede dar lugar a la lesión tisular en diferentes procesos inflamatorios digestivos. Datos preclínicos en modelos animales experimentales de colitis sugieren un efecto beneficioso de los inhibidores sintéticos de éstas, por lo que sería razonable pensar que estamos ante una posible nueva estrategia terapéutica en procesos inflamatorios intestinales, como la EII. Sin embargo, es necesaria la elaboración de más estudios para conocer exactamente la implicación de estas enzimas en la lesión tisular mediante el empleo de ratones Knock-out de una determinada MMP en los diferentes modelos experimentales de colitis.

Bibliografía



● Importante ● Muy importante

1. Woessner FJR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 1991;5:2145-54.
2. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14:455-63.
3. Woessner FJR. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:11-21.
4. Borkakoti N. Matrix metalloproteinases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol* 1998;70:73-94.
5. ● Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Bio Med* 1993;4:197-250.

6. Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, et al. MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 1996;109:953-9.
7. Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation: evidence that MT1-MMP and gelatinase A are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124-31.
8. Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 1997;405:157-62.
9. Vissers MC, Winterbourn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteases. *Biochem J* 1988;249:327-31.
10. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foams cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-9.
11. Heussen C, Dowle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrate. *Anal Biochem* 1980;102:196-202.
12. Sawicki G, Salas E, Murat J, Mistza-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase B during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 1997;386:616-9.
13. Jin CF, Mata M, Fink DJ. Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1994;3:252-5.
14. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.
15. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
16. Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413-7.
17. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998;43:791-7.
18. Tryggvason K, Hoyhta M, Pyke M. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-18.
19. Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, Maeda K, Sawada T, Ogawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999;4:73-7.
20. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arnd M, Breuer B, Fass J, et al. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001;92:2680-91.
21. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbes T, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1876-83.
22. Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, et al. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2003;107:183-8.
23. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift SI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;107:541-50.
24. Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002;122:60-71.
25. Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003;200:568-76.
26. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontol Res* 1989;24:207-13.
27. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic disease: inversion of paradigm. *N Periodontol* 1998;3:108-20.
28. ●● Pender S, Tickle S, Docherty A, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-90.
29. Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994;47:113-6.
30. ●● Baugh M, Perry M, Hollander A, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;117:814-22.
31. Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.
32. Heuschkel RB, MacDonald TT, Montealeone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin 1 and TIMP 1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:57-62.
33. Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:415-22.
34. ● Daum S, Bauer U, Foss HD, Wahnschaffe U, Schuppan D, Stein H, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.
35. Tarlton JF, Whiting CV, Tunmore D, Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH, et al. The role of up-regulated serine proteases and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of a murine model of colitis. *Am J Pathol* 2000;157:1927-35.
36. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G116-G122.
37. Pirila E, Ramamurthy NS, Sorsa T, Salo T, Hietanen J, Maisi P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8) and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci* 2003;48:93-8.
38. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, et al. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1535-42.
39. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Therapeutic effect of phenanthroline in two rat models of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1314-9.
40. Di Sebastiano P, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pertnhaler H, et al. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 2001;63:234-9.

Bibliografía recomendada

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Bio Med* 1993;4:197-250.

Excelente revisión del concepto y la clasificación de las metaloproteinasas, así como de sus inhibidores endógenos.

Pender S, Tickle S, Docherty A, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-90.

Importantisimo trabajo donde se demuestra, en un modelo in vitro de tejido intestinal fetal humano, el poder lesivo de las MMP mediante la adición directa de estas enzimas sobre el tejido intestinal, con lo que se produce una lesión mucosa con atrofia vellositaria.

Baugh M, Perry M, Hollander A, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;117:814-22.

Estudio en el que se demuestra, por primera vez, un aumento de la actividad de las gelatinasas (MMP-9 y MMP-2) mediante cimografía en muestras tisulares de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal frente a sujetos sanos.

Daum S, Bauer U, Foss HD, Wahnschaffe U, Schuppan D, Stein H, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.

Estudio en el que se demuestra un aumento de la expresión de las MMP en biopsias de pacientes con enfermedad celíaca en el momento del diagnóstico, mientras que una dieta sin gluten produjo una disminución de las concentraciones de estas enzimas durante el proceso de reparación del tejido.