

## EFFECTO DE LA MINOCICLINA EN LA EXPRESIÓN DE METALOPROTEASA-9 EN RATAS CON TRAUMA CRANEOENCEFÁLICO DIFUSO

**Jhonatan Andrés Vergara Arce**

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.  
correo electrónico: jhonatan.vergara@correounivalle.edu.co*

**Diana Marcela González Duque**

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.  
correo electrónico: diana.marcela.gonzalez@correounivalle.edu.co*

**Andrés Castillo Giraldo**

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.  
correo electrónico: andres.castillo.g@correounivalle.edu.co*

### RESUMEN

El Trauma Craneoencefálico (TCE) representa un reto epidemiológico a nivel mundial debido a la elevada tasa de comorbilidades relacionadas con las lesiones a las que conduce. El papel que juegan las metaloproteasas (MMP) en la remodelación de la matriz extracelular es ampliamente conocido, pero hay poca información de su participación en el TCE. Una de las MMP que actúa en el proceso de remodelación de la matriz extracelular es la MMP9, la cual se expresa en las diferentes fases del desarrollo del tejido cerebral en humanos, siendo fundamental en los procesos de aprendizaje dependientes del hipocampo. Además, se ha reportado en biomodelos murinos con TCE contuso en la fase aguda, la MMP9 se sobre-expresa y aumenta su actividad, lo cual podría ocasionar daños en el tejido cerebral post TCE. Por lo tanto, MMP9 podría ser un posible blanco farmacológico. En la presente investigación se evaluó la expresión de los ARN mensajeros del MMP9 en el hipocampo de ratas Wistar con TCE difuso de intensidad moderada tratadas con minociclina, en la fase subaguda y crónica de la lesión. En la cuantificación relativa de MMP9 se obtuvo que la expresión del gen disminuyó a los 7 y 14 días con respecto al grupo control, sin embargo, a los 30 días post trauma el efecto fue nulo. Estos resultados sugieren que el fármaco minociclina reduce la expresión de MMP9 en la fase subaguda, lo cual podría ayudar a reducir la inflamación y disminuir el daño en el tejido cerebral post TCE.

*Palabras clave: ARN mensajeros, Metaloproteasas, Minociclina, PCR en Tiempo Real, Retrotranscripción, Trauma Craneoencefálico.*

### ABSTRACT

Traumatic Brain Injury (TBI) represents a global epidemiological challenge due to the high rate of comorbidities related to the injuries it leads to. The role played by metalloproteases (MMPs) in the remodeling of the extracellular matrix is widely known, but there is little information about their participation in the TBI. One of the MMP that act in the remodeling process of the extracellular matrix is the MMP9, which is expressed in the different phases of brain tissue development in humans, being fundamental in the learning processes dependent on the hippocampus. In addition, it has been reported in murine biomodels with blunt TBI in the acute phase, MMP9 is over-expressed and increases its activity, which could cause damage to brain tissue after TBI. Therefore, MMP9 could be a possible pharmacological target. In the present investigation, the expression of MMP9 messenger RNA's in the hippocampus of Wistar rats with moderate intensity diffuse TBI treated with minocycline was evaluated in the subacute and chronic phase of the lesion. In the relative quantification of MMP9 it was obtained that the gene expression decreased at 7 and 14 days with respect to the control group, however, at 30 days post trauma the effect was null. These results suggest that the drug minocycline reduces the expression of MMP9 in the subacute phase, which could help reduce inflammation and decrease brain tissue damage after TBI.

*Key words: Messenger RNA, Metalloproteinases, Minocycline, Real-Time PCR, Retrotranscription, Traumatic Brain Injury.*

### INTRODUCCIÓN

El Trauma Craneoencefálico (TCE) se puede definir como una interrupción en la función normal del cerebro producto del influjo de fuerzas mecánicas tales como: caídas; ondas explosivas; impactos por proyectiles; aceleración y desaceleración rápida, lo cual puede conducir a déficits neurológicos como: pérdida o disminución del nivel de conciencia; pérdida parcial de la memoria; cambios en la visión; pérdida del equilibrio; y alteración en el estado mental (Pervez *et al.* 2018, Maas *et al.* 2008). A largo plazo el TCE puede verse asociado con enfermedades neurodegenerativas como

el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la encefalopatía traumática crónica entre otras (Ikonovic *et al.* 2017).

Faul *et al.* (2010) reportó que entre los años 2006 a 2010 en los Estados Unidos aproximadamente 1,7 millones de personas por año fueron diagnosticadas con TCE, entre los cuales, los jóvenes y los adultos mayores fueron los más propensos a sufrir este tipo de lesión representando el 1,4% de las visitas a emergencias; adicionalmente el TCE genero alrededor de 52.000 muertes por año; adicionalmente Syed *et al.* (2007) estableció que para el 2007 en la India la incidencia de TCE leve fue de 1131 casos por cada 100.000 habitantes, para el TCE moderado y severo fue de 15 y 14

casos por cada 100.000 habitantes respectivamente. Bra-zinova *et al.* (2015) indicó que en la Republica Eslovaca los accidentes de tránsito y las caídas son los mecanismos más comunes de TCE, siendo esta última la mayor causa de esta lesión en adultos mayores. Se calcula que la tasa de mortalidad por trauma en Colombia es de 125 por cada 100.000 habitantes y en Cali el TCE genera aproximadamente 1200 muertes por año, afectando cerca del 60 % de los casos a hombres jóvenes (Santacruz 2008).

Marmarou *et al.* (1994) desarrolló en ratas Sprague-Dawley, con un promedio de peso entre 350-375g, un modelo de TCE que simula un trauma axonal difuso similar al generado en humanos, el cual incluye los mecanismos dinámicos del trauma y su heterogeneidad. Esto se logró dejando caer un cilindro metálico de 450g desde una altura que varía entre 1.5 a 2m, rango que define la severidad del trauma entre leve a severo. El cilindro se deja caer a través de un tubo de plexiglás que impacta sobre un disco metálico adherido al cráneo, lo cual permite la difusión de la energía evitando fracturas. Previamente el animal es acomodado bajo anestesia en decúbito prono sobre un bloque de espuma permitiendo generar los movimientos de aceleración y desaceleración rápida.

Las metaloproteinasas (MMP) son endopeptidasas dependientes de zinc que tienen actividad proteolítica en componentes de la matriz extracelular como el colágeno y la elastina. Igualmente, estas endopeptidasas participan en procesos celulares como: proliferación, migración; angiogénesis y apoptosis (Deng *et al.* 2013). Se han descrito más de 20 tipos de MMP, las cuales son traducidas como zimógenos que por activación proteolítica adquieren su conformación funcional (Rosenblum *et al.* 2007). Candelario *et al.* (2009) reportó un incremento de la actividad de la MMP9 en respuesta a la inflamación en un modelo hipóxico/isquémico en ratones y primates no humanos. El gen que codifica a la MMP9 está ubicado en el cromosoma 20 en los humanos, y se ha descrito que citoquinas y factores de crecimiento pueden regular su expresión (Nagase *et al.* 2006). La activación del gen MMP9 es regulada por señales extracelulares mediadas principalmente por quinasas como ERK (Clark *et al.* 2008). En contraste, los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 regulan negativamente la expresión de MMP9 (Vandooren *et al.* 2014).

La proteína MMP9 presenta un dominio catalítico al cual se le une un ion metálico para su activación. El dominio catalítico presenta una hendidura molecular compuesta por un aminoácido glutamina en la posición 402, al cual se le une un ion  $Zn^{2+}$ , además, los aminoácidos leucina 397 y alanina 406, pueden participar en la activación del sitio catalítico. Además, otros aminoácidos como la Asparagina 410 y la Prolina 415 pueden participar en la degradación del colágeno tipo V y la gelatina (Vandooren *et al.* 2013). El hipocampo es una estructura cerebral ubicada en el lóbulo temporal del encéfalo humano perteneciente al sistema límbico y juega un papel preponderante en el proceso de aprendizaje a largo plazo, memoria episódica y la ubicación espacial (Müller & Remy 2017). Para tales procesos se requiere una alta plasticidad sináptica, altos requerimientos energéticos y una conectividad con otras regiones del tejido cerebral. Cabe señalar que debido a la ubicación en el lóbulo temporal, el hipocampo puede ser más susceptible a verse afectado al sufrir un TCE. Nagy *et al.* (2006) reportó en ratas Sprague-Dawley adultas que la MMP9 se expresa en la fase tardía de la potenciación sináptica a largo plazo en el hipocampo y su inhibición conduce a un rápido retorno de este potencial a niveles basales. En otros estudios en biomodelos murinos privados de sus sistemas sensoriales, la MMP9 se expresa actuando como un mecanismo compensatorio que ayuda a la plasticidad sináptica cortical (Kaliszewska *et al.* 2012). Además, se ha reportado que la MMP9 puede degradar colágeno tipo IV, laminina y

fibronectina, los cuales son los principales componentes de la lámina basal de los vasos sanguíneos (Liu *et al.* 2014). lo anterior se confirma en estudios realizados por Rosell *et al.* (2006) en donde se encontró en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico y hemorrágico un incremento en la expresión de MMP9, similares resultados reportó Zhang *et al.* (2016) en ratones C57Bl6 con trauma cortical contuso, en donde la expresión de MMP9 incremento debajo de las áreas de impacto post TCE.

Recientemente se ha sugerido que los niveles de la MMP9 pueden ser modulados con el fármaco minociclina, el cual podría usarse en el tratamiento de los efectos adversos ocasionados por la sobre-expresión de MMP9 en un accidente cerebrovascular isquémico (Fagan *et al.* 2011). La minociclina es una tetraciclina semisintética de segunda generación antiinflamatoria que puede atravesar la barrera hematoencefálica después de su administración sistémica. Este fármaco ha presentado efectos neuroprotectores en biomodelos experimentales de isquemia cerebral, TCE contuso y tratamientos con ácido kaínico; como también, en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Hanlon *et al.* 2017, Kim & Suh 2009). En humanos, la minociclina es usada en el tratamiento de infecciones bacterias, del acné vulgaris, y de algunas enfermedades de transmisión sexual y artritis reumatoide (Garrido-Mesa *et al.* 2013). Además, diferentes estudios han demostrado que la minociclina reduce la inflamación generada en diferentes lesiones cerebrales como la isquemia o el TCE contuso, Cikla *et al.* (2016) reportó en un modelo hipóxico-isquémico en ratas neonatales y juveniles que el uso de la minociclina disminuyó la activación microglial reduciendo la respuesta inflamatoria, aminorando así el daño neuronal generado por la lesión.

No es claro si en el TCE difuso, donde no se evidencian regiones contusas, la minociclina presente algún efecto sobre la expresión de MMP9, por lo cual el objetivo de esta investigación fue cuantificar la expresión de los ARN mensajeros del gen MMP9 en el hipocampo de ratas Wistar macho con TCE difuso tratadas con el fármaco minociclina.

## MÉTODOS

Se analizaron 12 muestras de hipocampo, previamente almacenados en RNA<sup>later</sup> (Sigma-Aldrich®) a -70°C. Estos tejidos fueron obtenidos del encéfalo de ratas Wistar machos con un peso promedio de 350g. Las ratas habían sido sometidas a un TCE difuso de intensidad moderada siguiendo las indicaciones propuestas por el "Modelo de Marmarou", modificando el peso del cilindro en 476g y la altura en 1,7m. Los tejidos de hipocampo analizados en el estudio fueron tomados en diferentes periodos de sobrevida: 7; 14; y 30 días post TCE. En cada periodo de sobrevida se tomaron cuatro tejidos: dos de ratas tratadas con el fármaco minociclina y otros dos de ratas sin tratamiento como control. El fármaco minociclina se suministró a una dosis de 50 mg/Kg diluido en 0,9 ml de solución salina al 0,9 % y 0,1 DMSO (dimetilsulfóxido) intraperitoneal tres horas posterior al TCE. Las siguientes dosis fueron de 25 mg/Kg a las 6, 12, 48 y 72 horas post-trauma por la misma vía y con las mismas diluciones. Este estudio contó con el aval del comité de ética animal, código 012-017, de la Universidad del Valle.

### Extracción de ARN y verificación de su calidad

El ARN total de las muestra fue extraído usando el kit RNeasy® (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cuantificar la cantidad de ARN extraído y descartar la contaminación por proteína o agentes químicos, se empleó un espectrofotómetro NanoDrop™2000, con el cual se obtuvieron las relaciones a 260/280 nm y

260/230 nm, en donde las cercanas o mayores a 2 fueron aceptadas como óptimas. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con una enzima DNasaI (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante, y por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 1% se verificó la calidad e integridad del ARN a través de la visualización de los ARNr 18 y 28s.

### RT-qPCR

La retrotranscripción y la cuantificación relativa por PCR en tiempo real se realizaron en dos pasos. En el primer paso se realizó la retrotranscripción y síntesis del ADNc usando el kit SuperScript® II (Invitrogen™) a partir de 250ng de ARN y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el segundo paso, se cuantificaron los niveles de expresión de los ARNm de MMP9 mediante qPCR relativa usando el kit SYBR® Select Master Mix for CFX (applied biosystems®) en un termociclador CFX96 (BIO RAD). Los niveles de expresión del gen GAPDH fueron usados como referencia para la cuantificación relativa de MMP9.

Para la reacción de la qPCR, cada tubo contenía 7,8µl de agua libre de nucleasas, 10µl de la molécula SYBR Green, 0,6µl de cada cebador y 1,25ng de ADNc. Los cebadores para MMP9 fueron diseñados usando la herramienta informática Primer-BLAST de la base de datos del NCBI y se realizó el análisis termodinámico de la formación de estructuras secundarias con la herramienta online OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). Los cebadores diseñados fueron: MMP9-F 5'-GCA TCT GTA TGG TCG TGG CT-3', y MMP9-R 5'-TGC AGT GGG ACA CAT AGT GG-3' que amplifican un fragmento del gen de 100 pares de bases. Para la amplificación del GAPDH se tomaron los siguientes cebadores reportados por Lie *et al.* (2003): GAPDH-F 5'-TGC ACC ACC ACC TGC TTA GC-3' y GAPDH-R 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3', los cuales generan un fragmento de 87 pares de bases.

Las condiciones de la PCR en tiempo real implementadas fueron las siguientes: 95°C por 5min, 95°C por 15seg, 61°C por 30seg, 72°C por 30seg; para 40 ciclos y una extensión final de 72°C por 5 min.

En la cuantificación relativa se usó el método comparativo de  $\Delta Ct$ . Para obtener el  $\Delta Ct$  de MMP9 se realizó el cálculo:  $\Delta Ct = Ct_{MMP9} - Ct_{GAPDH}$ , tanto para biomodelos tratados como no tratados con el fármaco. Posteriormente, se calculó el  $\Delta\Delta Ct$  mediante la resta del  $\Delta Ct$  de los biomodelos tratados menos el  $\Delta Ct$  de los biomodelos no tratados. El resultado obtenido para  $\Delta\Delta Ct$  fue reemplazado en la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , con lo cual se obtiene el valor de la cuantificación relativa para el gen MMP9 en biomodelos tratados. Con relación a los biomodelos no tratados con el fármaco, al ser los grupos controles del tratamiento, se asume que el  $\Delta\Delta Ct$  es igual a cero, por lo que el valor de cuantificación relativa para el gen MMP9 en sería igual a uno.

### Análisis estadístico

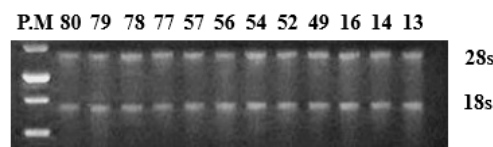
Los datos fueron analizados usando el software PAST. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t-student con una significancia de  $p < 0,05$  comparando el  $\Delta Ct$  del tratamiento *vs.* control para cada tiempo.

## DISCUSIÓN

En este estudio se reporta que la expresión del gen MMP9 fue menor en los días 7 y 14 en el hipocampo de ratas con TCE difuso, tratadas con minociclina con relación al grupo control, sugiriendo que el fármaco presenta un efecto modulador en las vías que regulan la expresión de MMP9.

## RESULTADOS

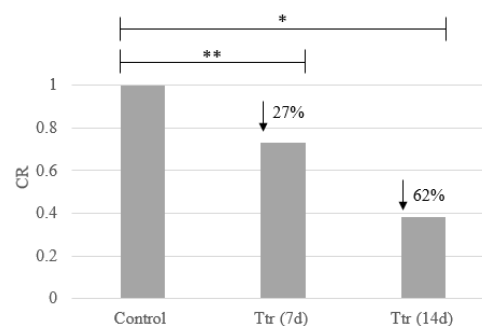
En la tabla 1 se observa la concentración del ARN extraído, el cual presento un mínimo de 117,3ng/µl y un máximo de 257,4ng/µl. En la verificación de la pureza del ARN se midieron relaciones 260/230 y 260/280 cercanas a 2, por lo que se descartó la contaminación con agentes químicos o proteínas. Con relación a la calidad e integridad del ARN, en la figura 1 se logró visualizar los ARNr 18s y 28s, descartando la fragmentación de las muestras.



**Figura 1.** Visualización de los ARN 18s y 28s posterior al tratamiento con DNasa.

En la Tabla 2 se encuentran reportados los resultados de la cuantificación relativa de los ARN mensajeros de MMP9 *vs.* GAPDH.

En la figura 2, se presenta la expresión del gen MMP9 a los 7 y 14 días en los biomodelos tratados con minociclina respecto a los no tratados. Los resultados muestran que a los 7 días hay una menor expresión de MMP9 con relación al control, una disminución del 27%, e igual ocurre a los 14 días, con una disminución del 62%. Sin embargo, a los 30 días post trauma el efecto del fármaco fue nulo y no se evidenció una disminución en la expresión de MMP9. La significancia estadística obtenida en la prueba t-student para los grupos tratados a los 7 y 14 días fue de 0,01 y 0,04 respectivamente; indicando que existen diferencias significativas entre los biomodelos tratados con minociclina *vs.* grupo control.



**Figura 2.** Cuantificación relativa de MMP9 a los 7 y 14 días post-trauma en modelos murinos tratados con minociclina *vs.* control. CR: Cuantificación Relativa. Ttr: Tratamiento con minociclina. \* $p < 0.05$ . \*\* $p = 0.01$

Crack *et al.* (2009) reportó en ratones C57/B6 con trauma focal cerrado que el fármaco minociclina presenta un efecto modulador sobre múltiples vías regulatorias y de comunicación celular. Además, Siopi *et al.* (2012) sugiere que la minociclina ayuda a disminuir los efectos negativos a corto y largo plazo que puede generar el trauma focal cerrado en ratones "Swiss" al evaluar el deterioro cognitivo

**Tabla 1.** Medición de la concentración de ARN.

Código	Tiempo	ng/ $\mu$ l	260/230	260/280
WDM80	7 DÍAS	240,7	1,99	2,09
WDM79	7 DÍAS	161,2	2,01	2,08
WDM78	7 DÍAS	151,8	1,83	2,09
WDM77	7 DÍAS	257,4	2,01	2,09
WDM57	14 DÍAS	138	1,93	2,08
WDM56	14 DÍAS	117,3	1,91	2,08
WDM54	14 DÍAS	122	1,95	2,06
WDM52	14 DÍAS	174,9	1,79	2,08
WDM49	30 DÍAS	159,5	2,09	2,07
WDM16	30 DÍAS	156,7	1,91	2,07
WDM14	30 DÍAS	124,3	1,99	2,07
WDM13	30 DÍAS	181,4	2,03	2,10

**Tabla 2.** Cuantificación relativa de MMP9 usando el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ .

	Ct MMP9	Ct GAPDH	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<b>No Ttr (7d)</b>	32,45 $\pm$ 1,61	22,80 $\pm$ 0,45	9,66	0	1
<b>Ttr (7d)</b>	33,47 $\pm$ 0,61	23,36 $\pm$ 0,74	10,11	0,46	0,73
<b>No Ttr (14d)</b>	32,89 $\pm$ 0,52	23,62 $\pm$ 0,04	9,27	0	1
<b>Ttr (14d)</b>	32,88 $\pm$ 0,20	22,23 $\pm$ 1,10	10,65	1,38	0,38
<b>No Ttr (30d)</b>	32,22 $\pm$ 1,38	21,87 $\pm$ 0,63	10,35	0	1
<b>Ttr (30d)</b>	32,82 $\pm$ 1,87	22,78 $\pm$ 0,42	10,04	-0,31	1,24

No Ttr: Control de referencia. Ttr: tratamiento con minociclina.  
d: número de días post trauma.

tardío y estados de ansiedad en estos animales. Otro estudio en ratas Sprague Dawley que fueron sacrificadas a los 7, 12 y 16 días y habían sido sometidas a impacto cortical controlado y tratadas con minociclina cada 24 h posterior al trauma, se evidenció histológicamente una reducción de la activación microglial en la corteza y el hipocampo mejorando así las funciones cognitivas (Lam *et al.* 2013). Adicionalmente, Vonder Haar *et al.* (2014) en un biomodelo murino similar con trauma focal cerrado que habían sido tratadas con minociclina y sacrificados a las 24h, 72h y 7 días, reportó que al evaluar la expresión génica de MMP9 en la corteza lesionada, esta disminuía a las 72h post-trauma, sugiriendo que la expresión del gen MMP9 se ve incrementado por el trauma durante los primeros días y que dicho incremento puede ser regulado indirectamente por el fármaco. Igualmente, Hayashi *et al.* (2009) indicó en ratas Sprague-Dawley adultas, las cuales fueron sometidas a un trauma contuso en el hemisferio derecho y sacrificadas entre 1-48h post-trauma, que la expresión del gen MMP9 se incrementa significativamente a las 24h post-trauma y en ensayos de inmunohistoquímica se presenta un aumento de inmunoreactividad a la MMP9 en el tejido afectado a las 24 y 48h de ocurrida la lesión.

En contraste, Hanlon *et al.* (2016) reportó que en ratas neonatales Sprague-Dawley con trauma repetitivo, tratadas con el fármaco minociclina y que fueron sacrificadas a los 3, 7 y 21 días post-trauma, no hubo ningún efecto sobre la lesión axonal traumática, neurodegeneración, atrofia del tejido; y además en pruebas de ubicación espacial las ratas presentaron déficits de aprendizaje espacial.

En un modelo de epilepsia inducido por ácido kaínico, un agonista de receptores para glutamato, generando activación y remodelación en el sistema límbico, se obtuvo un incremento en la actividad de la MMP9 en el hipocampo

a las 2h post tratamiento alcanzando un pico a las 6h, además, en el giro dentado y la neocorteza pasadas 24h; estos resultados sugieren que la MMP9 participa activamente en la remodelación dendrítica (Szklarczyk *et al.* 2002); otros estudios han tenido hallazgos similares (Szepesi *et al.* 2013, Michaluk *et al.* 2011).

La MMP9 se ha visto incrementada en varias formas de inflamación, incluida la inflamación relacionada con el accidente cerebrovascular en ratas, además, en biomodelos murinos knockout de MMP9 se ha evidenciado que en lesiones isquémicas focales hubo una disminución en el daño de la barrera hematoencefálica y disminuyó el tamaño del infarto (Rosenberg 2009), adicionalmente la primera purificación de la MMP9 en humanos mediante el análisis de secuencia amino-terminal, relacionó dicha metaloproteasa con la inflamación debido a que la enzima fue purificada de leucocitos y la producción de esta se incrementó con el uso de citoquinas proinflamatorias (Masure *et al.* 1991).

Aunque los detalles de la activación de MMP9 en las espinas dendríticas no son claros, se ha sugerido un modelo de activación de MMP9 alrededor de esta estructura. El modelo postula que la MMP9 se libera de las espinas dendríticas después de un estímulo, la actividad de MMP9 esta mediada posiblemente por señalización de  $\beta 1$  integrina generando la elongación de las espinas dendríticas e incrementando la movilidad de los receptores de NMDA (receptores de glutamato); el tiempo en que MMP9 permanece activa es breve y la inhibición de esta permite la maduración de las espinas dendríticas incorporando receptores AMPA y formando sinapsis activas (Stawarski *et al.* 2014).

Jia *et al.* (2014) plantea que el uso de un inhibidor selectivo de MMP9 como es SB-3CT, genera una mejora en la recuperación de tejidos afectados como el hipocampo y que dicha recuperación se ve reflejada en pruebas comportamentales

que evalúan la ubicación espacial, memoria y equilibrio en ratas adultas macho Sprague-Dawley expuestas a trauma craneoencefálico mediante percusión fluida; adicionalmente otros estudios revelan que la inhibición de MMP9 reduce el volumen de la lesión cerebral, evita la pérdida neuronal, la degeneración dendrítica y a largo plazo mejora funciones neurológicas, incluida la memoria y el aprendizaje espacial asociado al hipocampo (Lee *et al.* 2015). Zagorchev *et al.* (2016) reportó en 44 pacientes que sufrieron TCE leve, a los cuales se les tomaron imágenes por resonancia magnética, evidenciando una disminución del volumen en estructuras como el tálamo y el hipocampo transcurridos dos meses de la lesión; pero al año post-trauma no se presenta una recuperación del volumen en el hipocampo a diferencia de otras regiones, sugiriendo que esta se ve altamente afectada en un TCE.

La expresión del gen de MMP9 se ve aumentado en respuesta a la secreción local de citoquinas inflamatorias o factores de crecimiento como TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , siendo estos los inductores de la activación de este gen en muchos tipos de células (Yan & Boyd 2007). La investigación pionera de Sato & Seiki (1993) en la estructura promotora de MMP9 reveló que sitios de unión para AP-1, factor nuclear kappa y Sp1 juegan un papel importante en la inducción de la activación del gen MMP9. En la región promotora de MMP9 se encuentra un sitio de unión para AP-1 ubicado en la posición -79 a -73bp, el cual parece ser el más importante porque su delección elimina casi por completo la expresión de MMP9 (Gum *et al.* 1997). Sin embargo, para la máxima expresión de MMP9, AP-1 requiere la intervención de factor nuclear kappa y Sp1 (Lungu *et al.* 2008). Se ha reportado que Kiss-1 es un potencial represor de la expresión de MMP9, esta proteína es un potente supresor de células metastásicas que probablemente suprime la expresión de MMP9 al interferir con la unión de las subunidades de NF- $\kappa$ B al promotor de MMP9 (Chen *et al.* 2016). Otro represor de la expresión de MMP9 es la proteína RECK, esta es una proteína extracelular con dominios de inhibición de proteasas y su expresión está completamente reprimida en tumores y células transformadas por oncogenes (Noda

*et al.* 2010). RECK tiene la capacidad de unirse directamente a la MMP9 y bloquea su función, sin embargo, en tratamientos con ARNs específicos para RECK se ven aumentados los niveles de ARNm de MMP9, apoyando la idea de que esta proteína inhibe la transcripción de la metaloproteasa (Takagi *et al.* 2009). La intervención de los factores ya mencionados en la represión de la transcripción de MMP9 sugiere que en los resultados obtenidos en esta investigación, en los cuales se registró una disminución a los 7 y 14 días de los ARNm de MMP9 no solo se pudo ver afectado por el tratamiento con minociclina, sino también por los diferentes vías regulatorias ya mencionadas. Por lo cual estudios adicionales son necesarios. Con relación al tiempo de sobrevivencia de 30 días, no se observó efecto de la minociclina en la expresión de los ARNm de MMP9, esto debido posiblemente a que la vida media del fármaco había alcanzado su límite (Andes & Craig 2002) y a que las ratas fueron sometidas a procesos de aprendizaje como el laberinto acuático de Morris a los 14 y 30 en donde participa activamente el hipocampo y es requerida la activación de MMP9 (Meighan *et al.* 2006).

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que el fármaco minociclina podría reducir la expresión del gen MMP9, lo cual ayudaría a disminuir la inflamación y aminorar el daño en el tejido cerebral posterior a un TCE difuso.

## AGRADECIMIENTOS

Debo dar gracias a Dios, a mis directores Diana González y Andrés Castillo por su invaluable enseñanza, a la Universidad del Valle por la financiación de este proyecto, al Registro Poblacional de Cáncer en Cali, al Centro de Estudios Cerebrales y al Departamento de Bioquímica de la Universidad del Valle por el aporte de equipos para realizar esta investigación. Agradecer a Mildrey Mosquera, Julio Osorio y Andrés Salgado por su ayuda en la realización de los experimentos y el análisis de datos

## LITERATURA CITADA

- Andes, D. and Craig, W. a. (2002), "Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review", *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 19, pp. 261–268.
- Brazinova, A., Rehorcikova, V., Taylor, M. S., Buckova, V., Majdan, M., Psota, M., Peeters, W., Feigin, V., Theadom, A., Holkovic, L. and Synnot, A. (2015), "Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review", *Journal of Neurotrauma*, Vol. 33, pp. 1-30.
- Candelario-Jalil, E., Yang, Y. and Rosemberg, G. A. (2009), "Diverse Roles of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Neuroinflammation and Cerebral Ischemia", *Neuroscience*, Vol. 158, pp. 983–994.
- Chen, S., Chen, W., Zhang, X., Lin, S. and Chen, Z. (2016), "Overexpression of KiSS-1 reduces colorectal cancer cell invasion by downregulating MMP-9 via blocking PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signal pathway", *International Journal of Oncology*, Vol. 48, pp. 1391–1398.
- Cikla, U., Chanana, V., Kintner, D., Covert, L., Dewall, T., Waldman, A., Rowley, P., Cengiz, P. and Ferrazzano, P. (2016), "Suppression of microglia activation after hypoxia-ischemia results in age-dependent improvements in neurologic injury", *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 291, pp. 18–27.
- Clark, I. M., Swingle, T. E., Sampieri, C. L. and Edwards, D. L. (2008), "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors", *The international journal of biochemistry & cell biology*, Vol. 40, pp. 1362–78.
- Crack, P. J., Gould, J., Bye, N., Ross, S., Ali, U., Habgood, M. D., Morganti-Kossmann, C., Saunders, N. R. and Hertzog, P. J. (2009), "The genomic profile of the cerebral cortex after closed head injury in mice: Effects of minocycline", *Journal of Neural Transmission*, Vol. 116, pp. 1–12.
- Deng, X., Zhong, Y., Gu, L., Shen, W. and Guo, J. (2013), "MiR-21 involve in ERK-mediated upregulation of MMP9 in the rat hippocampus following cerebral ischemia", *Brain Research Bulletin*, Vol. 94, pp. 56–62.
- Fagan, S. C., Cronin, L. E. and Hess, D. C. (2011), "Minocycline Development for Acute Ischemic Stroke", *Translational Stroke Research*, Vol. 2, pp. 202–208.
- Faul, M., Wald, M. M., Xu, L. and Coronado, V.G. (2010), "Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits, hospitalizations, and deaths", *Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control*, pp. 891–904.

- Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. and Gálvez, J. (2013), “Minocycline: Far beyond an antibiotic”, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 169, pp. 337–352.
- Gum, R., Wang, H., Lengyel, E., Juarez, J. and Boyd, D. (1997), “Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades”, *Oncogene*, Vol. 14, pp. 1481–1493.
- Hanlon, L. A., Huh, J. W. and Raghupathi, R. (2016), “Minocycline transiently reduces microglia/macrophage activation but exacerbates cognitive deficits following repetitive traumatic brain injury in the neonatal rat”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 75, pp. 214–226.
- Hanlon, L. A., Raghupathi, R. and Huh, J. W. (2017), “Differential effects of minocycline on microglial activation and neurodegeneration following closed head injury in the neonate rat”, *Experimental Neurology*, Vol. 290, pp. 1–14.
- Hayashi, T., Kaneko, Y., Yu, S., Bae, E., Sthal, C. E., Tawase, T., Van Loveren, H., Sanberg, P. R. and Borlongan, C. V. (2009), “Quantitative analyses of matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in adult rats”, *Brain Research*, Vol. 1280, pp. 172–177.
- Ikonomovic, M. D., Mi, Z. and Abrahamson, E. E. (2017), “Disordered APP metabolism and neurovasculature in trauma and aging: Combined risks for chronic neurodegenerative disorders”, *Ageing Research Reviews*, Vol. 34, pp. 51–63.
- Jia, F., Yin, Y. H., Gao, G. Y., Wang, Y., Cen, L. and Jiang, J. (2014), “MMP-9 Inhibitor SB-3CT Attenuates Behavioral Impairments and Hippocampal Loss after Traumatic Brain Injury in Rat”, *Journal of Neurotrauma*, Vol. 31, pp. 1225–1234.
- Kaliszewska, A., Bijata, M. and Kaczmarek, L. (2012), “Experience-dependent plasticity of the barrel cortex in mice observed with 2-DG brain mapping and c-Fos: Effects of MMP-9 KO”, *Cerebral Cortex*, Vol. 22, pp. 2160–2170.
- Kim, H. S. and Suh, Y. H. (2009), “Minocycline and neurodegenerative diseases”, *Behavioural Brain Research*, Vol. 196, pp. 168–179.
- Lam, T. I., Bingham, D., Chang, T. J., Lee, C. C., Shi, J., Wang, D., Massa, S., Swanson, R. A. and Liu, J. (2013), “Beneficial effects of minocycline and botulinum toxin-induced constraint physical therapy following experimental traumatic brain injury”, *Neurorehabilitation and Neural Repair*, Vol. 27, pp. 889–899.
- Lee, M., Chen, Z., Tomlinson, B. N., Gooyit, M., Heseck, D., Juárez, M. R., Nizam, R., Boggess, B., Lastochkin, E., Schroeder, V. A., Wolter, W. R., Suckow, M. A., Cui, J., Mobashery, S., Gu, Z. and Chang, M. (2015), “Water-Soluble MMP-9 Inhibitor Reduces Lesion Volume after Severe Traumatic Brain Injury”, *ACS Chemical Neuroscience*, Vol. 6, pp. 1658–1664.
- Li, Q., Goodchild, A. K. and Pilowsky, P. M. (2003). “Effect of haemorrhage on the expression of neurotransmitter-related genes in rat ventrolateral medulla: a quantitative real-time RT-PCR study”, *Molecular Brain Research*, Vol. 114, pp. 46–54.
- Liu, C. L., Cheng, C., Lee, H. and Cho, D. (2014), “Matrix metalloproteinase-9 in the ventricular cerebrospinal fluid correlated with the prognosis of traumatic brain injury”, *Turkish Neurosurgery*, Vol. 24, pp. 363–368.
- Lungu, G., Covalada, L., Mendes, O., Martini-Stoica, H. and STOICA, G. (2008), “FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappa;B and activating protein-1”, *Molecular Carcinogenesis*, Vol. 47, pp. 424–435.
- Maas, A., Stocchetti, N. and Bullock, R. (2008), “Moderate and severe traumatic brain injury in adults”, *The Lancet Neurology*, Vol. 7, pp. 728–741.
- Marmarou, A., Foda, M., Brink, W. and Campbell, J. (1994), “A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics”, *J Neurosurg*, Vol. 80, pp. 291–300.
- Masure, S., Proost, P., Van Damme, J. and Opdenakker, G. (1991), “Purification and identification of 91KDa neutrophil gelatinase: Release by the activating peptide interleukin-8”, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 198, pp. 391–398.
- Meighan, S. E., Meighan, P. C., Choudjary, P., Davis, C. J., Olson, M. L., Zornes, P. A., Wright, J. W. and Harding, J. W. (2006), “Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity”, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 96, pp. 1227–1241.
- Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Alot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Müller, D., Wilczynski, G. M., Mozrzymas, J. W., Stewart, M. G., Kczmrek, L. and Wlodarczyk, J. (2011), “Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology”, *Journal of Cell Science*, Vol. 124, pp. 3369–3380.
- Müller, C. and Remy, S. (2017), “Septo-hippocampal interaction”, *Cell and Tissue Research*, Vol. 367, pp. 1–11.
- Nagase, H., Visse, R. and Murphy, G. (2006), “Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs”, *Cardiovascular Research*, Vol. 69 pp. 562–573.
- Nagy, V. (2006), “Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory”, *Journal of Neuroscience*, Vol. 26, pp. 1923–1934.
- Noda, M., Takahashi, C., Matsuzaki, T. and Kitayama, H. (2010), “What we learn from transformation suppressor genes: lessons from”, *Future Oncology*, Vol. 6, pp. 1105–1116.
- Pervez, M., Kitagawa, R. S. and Chang, T. R. (2018), “Definition of Traumatic Brain Injury, Neurosurgery, Trauma Orthopedics, Neuroimaging, Psychology, and Psychiatry in Mild Traumatic Brain Injury”, *Neuroimaging Clinics of North America*, Vol. 28, pp. 1–13.
- Rosell, A., Ortega-Aznar, A., Alvarez-Sabín, J., Fernández-Cadenas, I., Ribó, M., Molina, C. A., Lo, E. N. and Montaner, J. (2006), “Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke”, *Stroke*, Vol. 37, pp. 1399–1406.
- Rosenberg, G. A. (2009), “Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases”, *The Lancet Neurology*, Vol. 8, pp. 205–216.
- Rosenblum, G., Meroueh, S., Toth, M., Fisher, J. D., Fridman, R., Mobashery, S. and Sagi, I. (2007), “Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: Challenging the cysteine switch dogma”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 129, pp. 13566–13574.

- Santacruz, L. F. and Herrera, A. L. (2008), "Trauma: abordaje inicial en los servicios de urgencias", *Salamandra*, Vol. 6, pp. 1–25.
- Sato, H. and Seiki, M. (1993), "Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells", *Oncogene*, Vol. 8, pp. 395–405.
- Siopi, E., Llufríu-Dabén, G., Fanucchi, F., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. and Jafarian-Tehrani, M. (2012), "Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline", *Neuroscience Letters*, Vol. 511, pp. 110–115.
- Stawarski, M., Stefaniuk, M. and Włodarczyk, J. (2014), "Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines", *Frontiers in Neuroanatomy*, Vol. 8, pp. 1–15.
- Syed, A. T., Lone, N. A., Wani, M. A. and Bhat, A. S. (2007), "Clinical management of patients with minor head injuries", *International journal of health sciences*, Vol. 1, pp. 131–40.
- Szepesi, Z., Bijata, M., Ruszczycycki, B., Kaczmarek, L. and Włodarczyk, J. (2013), "Matrix Metalloproteinases Regulate the Formation of Dendritic Spine Head Protrusions during Chemically Induced Long-Term Potentiation", *PLoS ONE*, Vol. 8.
- Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., Mckay, R. and Kaczmarek, L. (2002), "Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus", *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 22, pp. 920–30.
- Takagi, S., Simizu, S. and Osada, H. (2009), "Reck negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription", *Cancer Research*, Vol. 69, pp. 1502–1508.
- Vandooren, J., Van Damme, J. and Opdenakker, G. (2014), "On the Structure and functions of gelatinase B/Matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation", *Progress in Brain Research*. Vol. 214, pp. 193–206.
- Vandooren, J., Van den Steen, P. E. and Opdenakker, G. (2013), "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 48, pp. 222–272.
- Vonder Haar, C., Andreson, D. G., Elmore, B. E., Moore, L. H., Wright, A. M., Kantor, E. D., Farin, F. M., Bammler, T. K., MacDonald, J. W. and Hoane, M. R. (2014), "Comparison of the effect of minocycline and simvastatin on functional recovery and gene expression in a rat traumatic brain injury model", *Journal of neurotrauma*, Vol. 31, pp. 961–75.
- Yan, C. and Boyd, D. D. (2007), "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression", *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 211, pp. 19–26.
- Zagorchev, L., Meyer, C., Sthele, M., Wenzel, F., Young, S., Peters, J., Weese, J., Paulsen, K., Garlinghouse, M., Ford, J., Roth, R., Flashman, L. and McAllister, T. (2016), "Differences in Regional Brain Volumes Two Months and One Year after Mild Traumatic Brain Injury", *Journal of Neurotrauma*, Vol. 33, pp. 29–34.
- Zhang, S., Kojic, L., Tsang, M., Grewal, P., Liu, J., Namjoshi, D., Wellington, C. L., Tetzlaff, W., Cynader, M. S. and Jia, W. (2016), "Distinct roles for metalloproteinases during traumatic brain injury", *Neurochemistry International*, Vol. 96, pp. 46–55.