

## Paper de l'apoptosi del neutròfil en el procés inflamatori associat a la síndrome d'isquèmia/reperfusió intestinal

Albert Pérez Ladaga

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Biologia  
Programa de Doctorat de Fisiologia  
Bienni 2006-2008

# PAPER DE L'APOPTOSI DEL NEUTRÒFIL EN EL PROCÉS INFLAMATORI ASSOCIAT A LA SÍNDROME D'ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ INTESTINAL

Tesi doctoral presentada per Albert Pérez Ladaga per optar  
al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Realitzada al Departament de Patologia Experimental de l'Institut d'Investigacions  
Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC-IDIBAPS)



Directora	Tutor	Doctorand
Dra. Anna Sola Martínez	Prof. Luis Palacios Raufast	Albert Pérez Ladaga

Barcelona, Maig de 2010

## INDEX

ABREVIATURES.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
1.1 ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ INTESTINAL .....	5
1.1.1 L'intestí prim .....	5
1.1.2 Lesió per Isquèmia/Reperfusió intestinal .....	8
1.1.3 Classificació histopatològica del dany intestinal després d'una Isquèmia/ Reperfusió.....	8
1.1.4 Classificació i tipus d'isquèmia intestinal .....	9
1.1.5 Estat actual del tema .....	10
1.1.6 Diagnòstic i tractament .....	11
1.1.7 Isquèmia/Reperfusió i disfuncions del metabolisme cel·lular .....	12
1.1.8 Infiltració de neutròfils en la Isquèmia/Reperfusió intestinal.....	14
1.2 ELS NEUTRÒFILS .....	15
1.2.1 Generalitats. Sistema immunitari.....	15
1.2.2 Neutròfils .....	16
1.2.3 Grànuls i vesícules secretores dels neutròfils .....	17
1.2.4 Citocines.....	18
1.2.5 Neutròfils en la inflamació. Del reclutament a l'extravasació. ....	19
1.2.6 Resolució de la inflamació. Paper dels macròfags.....	21
1.3 NEUTRÒFILS EN HIPÒXIA I ISQUÈMIA .....	22
1.3.1 Generalitats .....	22
1.3.2 HIF-1 $\alpha$ .....	23
1.3.3 HIF-1 $\alpha$ en els neutròfils .....	26
1.3.4 Factor de transcripció NF $\kappa$ B .....	26
1.4 APOPTOSI DELS NEUTRÒFILS .....	27
1.4.1 Generalitats. Apoptosi vs. necrosi .....	27
1.4.2 Característiques de la necrosi .....	28
1.4.3 Característiques de l'apoptosi .....	28
1.4.4 Mecanismes moleculars de l'apoptosi. Via intrínseca i via extrínseca. ....	28
1.4.5 Mecanisme apoptòtic dels neutròfils.....	30
1.4.6 Modulació de l'apoptosi dels neutròfils.....	32
1.5 Lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils (NGAL/ <i>24p3</i> ).....	33
1.5.1 Generalitats .....	33
1.5.2 Distribució del NGAL/ <i>24p3</i> .....	34
1.5.3 Funcions del NGAL/ <i>24p3</i> .....	35
1.5.4 <i>24p3</i> i l'apoptosi en els neutròfils .....	36
1.5.5 Receptors de <i>24p3</i> .....	37
1.5.6 Regulació transcripcional de <i>24p3</i> .....	39
1.6 Via WNT .....	40
1.6.1 Via WNT canònica.....	41
1.6.2 Vies WNT no canòniques.....	42
1.6.3 Via Wnt i l'apoptosi .....	43
1.7 Esfingosina-1-fosfat.....	45
1.7.1 Generalitats .....	45
1.7.2 Esfingolípid i apoptosi .....	46

1.7.3 Inhibició de l'apoptosi per S1P i activació de NGAL mitjançant <i>NFKB</i> .....	47
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>52</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>56</b>
3.1 MODEL EXPERIMENTAL IN VIVO .....	56
3.1.1 Model animal.....	56
3.1.2 Anestèsia i sacrifici.....	56
3.1.3 Isquèmia/Reperfusió intestinal.....	56
3.1.4 Recollida de mostres.....	57
3.1.5 Aïllament de neutròfils de sang perifèrica de rata .....	57
3.2. MODEL EXPERIMENTAL IN VITRO .....	58
3.2.1 Cultiu cel·lular .....	58
3.2.2 Model de cultiu cel·lular anòxic.....	58
3.3 GRUPS EXPERIMENTALS.....	59
3.4 DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES I MOLECULARS .....	63
3.4.1 Activitat de caspasa 3 .....	63
3.4.2 Annexina V / PI per citometria de flux .....	64
3.4.3 Tinció DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).....	65
3.4.4 Determinació de la concentració de proteïnes .....	65
3.4.5 Activitat de mieloperoxidasa .....	65
3.4.6 Nivells de lipoperòxid.....	66
3.4.7 Real-Time RT-PCR .....	66
3.4.8 Silenciació de RNA .....	70
3.4.9 ELISA.....	71
3.4.10 WESTERN BLOT .....	72
3.4.11 Activitat de les esfingosina kinases (SPHK1 i SPHK2) .....	74
3.5 HISTOLOGIES I TINCIONS .....	75
3.5.1 Hematoxilina/Eosina .....	75
3.5.2 Tinció de Giemsa May-Grünwalds .....	75
3.5.3 Immunofluorescència de <i>24p3</i> .....	75
3.5.4 Immunocitoquímica de $\beta$ -catenina.....	76
3.5.5 Tinció de les mitocòndries (MITOTRACKER).....	76
3.6 ANÀLISIS ESTADÍSTICS .....	76
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>79</b>
4.1 Objectiu 1. Estudi 1. Caracterització de l'apoptosi dels neutròfils en la inflamació induïda per la isquèmia/reperfusió.....	79
4.1.1 L'apoptosi retardada dels neutròfils es relaciona amb la sensibilitat a la isquèmia. ....	79
4.1.2 L'apoptosi dels neutròfils circulants es troba retardada després d'una IR intestinal. ....	84
4.1.3 La modulació de l'apoptosi retardada dels neutròfils després d'una IR intestinal millora el dany tissular. ....	86
4.2 Objectiu 2. Estudi 2. La proteïna secretada dels neutròfils <i>24p3</i> és determinant en la re-inducció de la seva apoptosi.....	92
4.2.1. Posada a punt del cultiu cel·lular <i>in vitro</i> .....	92
4.2.2 <i>24p3</i> modula l'apoptosi dels neutròfils <i>in vitro</i> .....	96
4.2.3 La modulació de l'apoptosi per <i>24p3</i> implica als ROS.....	99

4.2.4 <i>24p3</i> es troba implicat en l'apoptosi dels neutròfils circulants <i>in vivo</i> .....	101
4.3 Objectiu 3. Estudi 3. La via Wnt està implicada en l'apoptosi dels neutròfils a través de l'expressió del seu gen diana <i>24p3</i> .....	104
4.3.1 La via Wnt i el seu gen diana <i>24p3</i> es troben disminuïts en els neutròfils anòxics. ....	104
4.3.2 HIF-1 $\alpha$ disminueix la via Wnt en condicions d'anòxia. ....	109
4.3.3 La modulació de la via Wnt per HIF-1 $\alpha$ inhibeix l'apoptosi dels neutròfils a través de <i>24p3</i> .....	113
4.3.4 La inducció de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant BIO després d'una IR millora el dany intestinal. ....	116
4.4 Objectiu 4. Estudi 4. L'esfingosina-1-fosfat en l'apoptosi del neutròfil anòxic .....	118
4.4.1 L'esfingosina-1-fosfat modula l'apoptosi dels neutròfils .....	119
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>124</b>
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>141</b>



## ABREVIATURES

ADP:	Difosfat d'adenosina
AMP:	Monofosfat d'adenosina
APAF1:	proteasa apoptòtica activadora del factor 1
ATRA:	àcid all-trans retinòic
AR:	Anòxia/Reoxigenació
ATP:	Trifosfat d'adenosina
BIO:	6-bromoindirubin-3'-oxime
BSA:	Sèrum d'albúmina bovina
cDNA:	DNA complementari
DEVD-AMC:	<i>N</i> -acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin
DPI:	Sulfat de difenileniòde
DNA:	Àcid desoxirribonuclèic
DL:	Lligand extracel·lular <i>death ligand</i>
DPX:	p-xilè-bis-(N-piridini bromide)
DR:	Receptor de membrana <i>death receptor</i>
DTT:	Ditiotreitòl
ELISA:	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
GAPDH:	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GM-CSF:	factor estimulant de colònies de granulòcits/macròfags
GSK3:	quinasa glicogen sintasa 3
GSK3 $\beta$ :	quinasa glicogen sintasa 3 $\beta$
GPCR:	Receptor acoblat a proteïna G
HIF:	factor induïble per la hipòxia
IL-10:	Interleucina 10
IMA:	Isquèmia mesentèrica aguda
IMDM:	medi <i>Iscove's modified Dulbecco</i>
IMP:	Monofosfat d'inosina
IR:	Isquèmia/Rerperfusió
kDa:	KiloDalton
<i>Lcn2</i> :	Lipocalina 2
LPS:	Lipopolisacàrid
MDA:	Malondialdehid
MPO:	mieloperoxidasa
MPRO:	línia cel·lular de ratolí pro-mielocítica
NAD <sup>+</sup> :	Dinucleòtid de nicotinamida i adenina
NADH:	Dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït

NADPH:	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NGAL:	lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils
nM:	Nanòmetre
NO:	Òxid nítric
PBS:	tampó fosfat salí
PE:	Ficoeritrina
PI:	Iodur de propidi
PKC:	Proteïna quinasa C
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoride
PSGL1:	l·ligand 1 de la glicoproteïna P-selectina
RNA:	Àcid ribonuclèic
RNAi:	RNA d'interferència
ROS:	Radicals lliures de l'Oxigen
RT-PCR:	Reacció de la cadena de la polimerasa en transcripció reversa
S1P:	Esfingosina-1-fosfat
SEM:	Error estàndard de la mitjana
SP:	Esfingosina
siRNA:	<i>small interfering</i> RNA
SPHK:	esfingosina quinasa
TBS:	Tampó Tris salí
TMB:	Tetrametil benzidina
WIF:	Factor inhibidor de WNT.
XDH:	Xantina deshidrogenasa
XO:	Xantina oxidasa





# 1. INTRODUCCIÓ



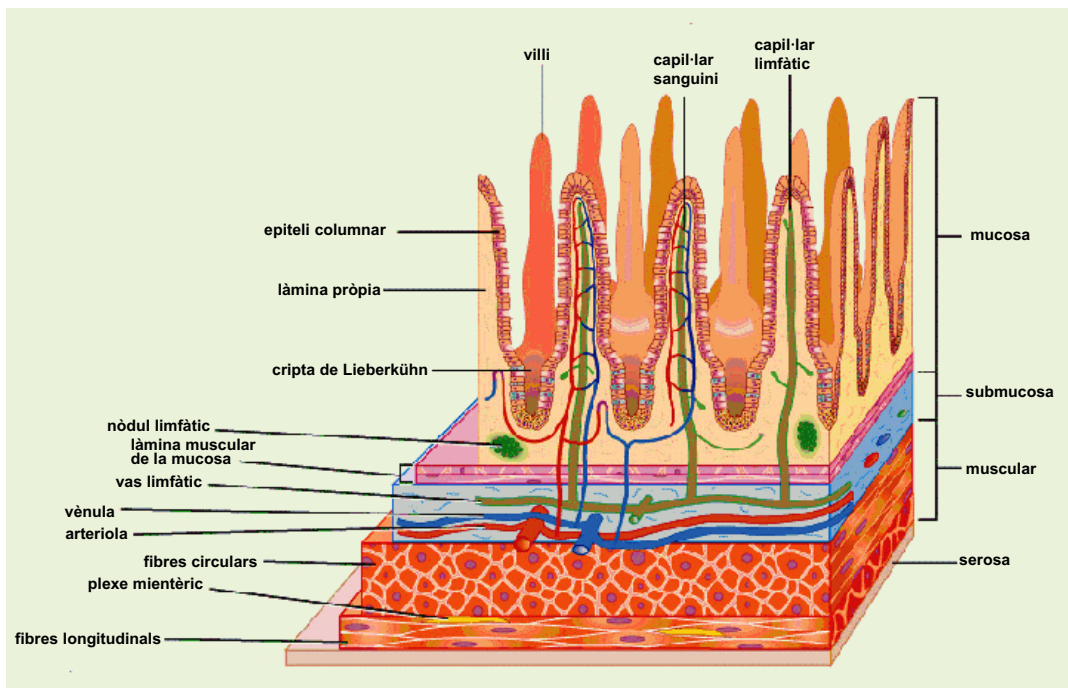
## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ INTESTINAL

#### 1.1.1 L'intestí prim

L'intestí prim és un segment del tub digestiu situat entre l'estómac i el colon o intestí gruixut. Té una longitud de 4 a 7 metres en humans i d'uns 50 a 70 cm en la rata. Es divideix en tres segments: duodè, jejú i ili i, tot i que existeixen petites diferències en la histologia de la mucosa dels tres segments de l'intestí prim, no s'observen límits precisos entre ells.<sup>1</sup> La funció principal de l'intestí prim és l'absorció de nutrients, tot i que també presenta altres funcions, com ara la immunitària, ja que d'una banda conté ganglis limfàtics agrupats formant les anomenades plaques de Peyer i, d'altra banda presenta al llarg de tota la làmina pròpia macròfags amb gran capacitat de fagocitosi, constituint la primera línia de defensa de l'organisme davant dels microorganismes que poden envair la mucosa des de la llum. Una altra funció de l'intestí és l'endocrina, a través d'una població heterogènia de cèl·lules endocrines.<sup>1</sup>

Si partim de la llum intestinal, la primera regió que s'observa és la túnica mucosa. La primera capa d'aquesta regió està formada per una monocapa de cèl·lules epitelials, les quals revesteixen les prolongacions digitiformes denominades vellositats intestinals (villi) i les invaginacions o criptes de Lieberkühn de l'intestí prim. Les cèl·lules de l'epiteli estan organitzades de manera jeràrquica, de manera que es van diferenciant en sentit ascendent, és a dir, al llarg de l'eix cripta-villi (Figura 1).



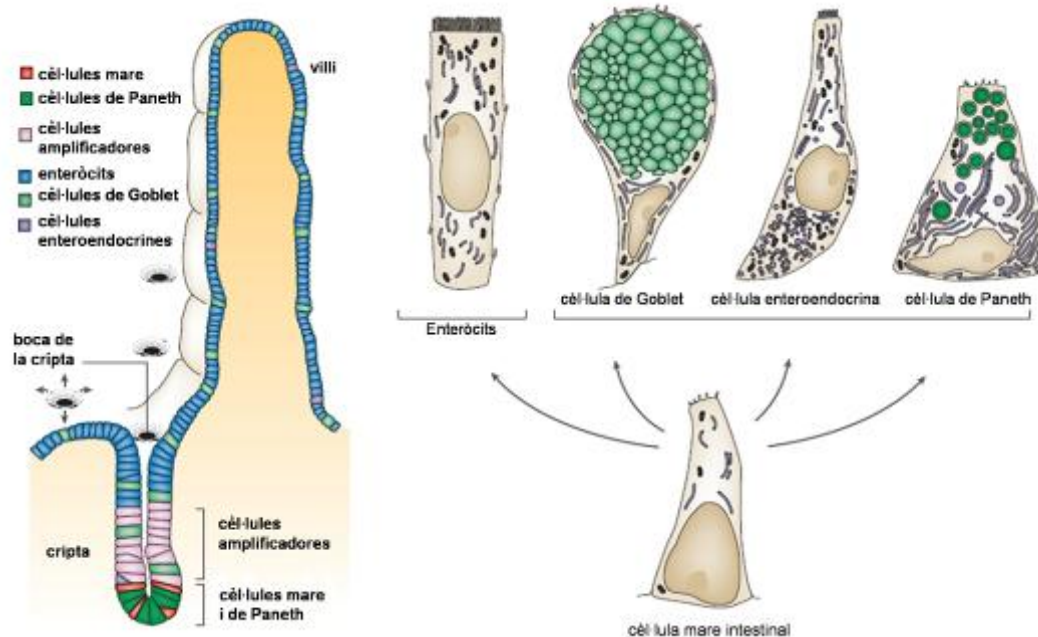
**Figura 1.** Histologia de l'intestí prim. Visió de les capes de l'intestí prim, mostrant també les vellositats intestinals.

---

Per sota de les vellositats s'estén una capa de múscul llis que constitueix la làmina muscular de la mucosa. Entre l'epiteli i la capa muscular de la mucosa hi ha un teixit conjuntiu lax que forma la làmina pròpia. Aquesta làmina pròpia està formada per cèl·lules fixes i mòbils que es situen sobre una delicada trama de fibres elàstiques i reticulars, i que conté una gran xarxa de capil·lars situats sota l'epiteli. A més, conté les branques terminals d'un plexe limfàtic submucós (vasos quilífers) que constitueixen una important via pel transport de lípids absorbits i d'altres nutrients.<sup>1</sup> La làmina muscular de la mucosa separa la mucosa de la resta de capes que constitueixen l'intestí, és a dir, la submucosa, la muscular i la serosa.

Les cèl·lules epitel·lials moren per apoptosi espontània i són o bé fagocitades o bé eliminades quan arriben a la llum intestinal. Això ofereix una estructura polaritzada amb cèl·lules diferenciant-se a mida que envelleixen, migrant des de la base de la cripta cap amunt, en un procés que triga de dos a tres dies en rosegadors i de tres a sis dies en humans. Els processos de regeneració comporta la implicació de cinc línies epitelials diferents (Figura 2), les cèl·lules columnars o enteròcits, que són les cèl·lules més abundants en l'epiteli i estan especialitzades per a l'absorció gràcies a la presència en la part apical de microvilli. Les cèl·lules de Goblet o caliciformes secreten moc per protegir l'epiteli de l'abradió i impedir l'adherència i invasió de les bacteries patògenes.

El tercer tipus cel·lular són les cèl·lules enteroendocrines que secreten diferents substàncies (entre elles hormones peptídes) amb capacitat emulsiva i que afavoreixen la motilitat intestinal. Un altre tipus cel·lular són les cèl·lules de Paneth, les quals es troben quasi exclusivament en la base de les criptes de l'intestí prim, i que expressen i secreten diverses proteïnes, entre elles lisozimes i defensines antibacterianes que ajuden a mantenir la cripta estèril. Aquests tipus cel·lulars són els únics que poden migrar de la base de la cripta durant la diferenciació. El cinquè tipus cel·lular són les cèl·lules M, les quals solament es troben prop de les plaques de Peyer i on se les relaciona amb el transport d'antigens (Figura 2).<sup>2</sup>



**Figura 2.** Distribució dels diferents tipus epitelials en l'intestí prim. A l'esquerra es mostra una villositat amb una cripta que contribueix a la renovació de l'epiteli. A la dreta es mostren les quatre classes de cèl·lules terminalment diferenciades.

El patró de migració cel·lular de la cripta cap al villi està molt ben establert, assumint-se des de fa més de tres dècades que les cèl·lules mare es troben a la base de les criptes.<sup>2,3</sup> Però no ha estat fins l'any 2007 que gràcies a la identificació d'un marcador específic per a les cèl·lules mare intestinals (*Lgr5*) s'ha confirmat aquest fet.<sup>4</sup> Amb aquest marcador s'ha determinat que cada cripta intestinal conté de 4 a 6 cèl·lules mare, cadascuna de les quals tindria la capacitat regenerativa essencial requerida per a produir tots els diferents tipus de cèl·lules epitelials terminalment diferenciades que es troben en l'intestí (Figura 2).<sup>5</sup>

En l'intestí el procés de regeneració opera contínuament, éssent les cèl·lules en divisió (cèl·lules mare i cèl·lules en trànsit) confinades a les criptes de Lieberkühn. La descendència migra cap amunt; una vegada superada la cripta ja no succeeixen més divisions i totes les cèl·lules semblen ser completament diferenciades. Les cèl·lules en trànsit tenen la finalitat d'amplificar el número de progènie que resulta de cada divisió d'una cèl·lula mare. Aquestes cèl·lules anomenades en concret cèl·lules de trànsit amplificadores no es consideren cèl·lules mare ja que tota la seva progènie es diferencia i mor.<sup>6</sup>

L'intestí es caracteritza per tenir una gran densitat i una gran permeabilitat vascular. En estat de repòs la circulació esplàcnica (part de la circulació sistèmica que irriga la porció abdominal del tub digestiu, així com la melsa, el pàncrees i el fetge) representa el 25% de la despesa cardíaca total. La circulació intestinal compleix dues funcions bàsiques: proveir d'oxigen als teixits i transferir els nutrients absorbits a la resta del cos. Almenys un 75% del fluxe intestinal es distribueix a la mucosa i la submucosa, porcions d'elevat requeriment metabòlic per les seves

funcions d'absorció i excreció. La resta del flux correspon a les túniques musculars, responsables de la propulsió del contingut intestinal.<sup>7</sup>

### 1.1.2 Lesió per Isquèmia/Reperfusió intestinal

La lesió isquèmica succeeix quan un òrgan, o part del mateix, es troba amb un dèficit de rec sanguini privant a l'òrgan de l'aport d'oxigen i de nutrients. Quan el flux sanguini es restableix, de manera que la sang i l'aportament d'oxigen i nutrients tornen a arribar a l'òrgan, es produeix l'anomenada lesió per reperfusió. Aquesta lesió, al contrari del que cabria esperar, és superior a la lesió isquèmica. El conjunt d'esdeveniments fisiopatològics que succeeixen com a conseqüència del restabliment del flux sanguini després d'un període d'isquèmia es denomina Síndrome d'Isquèmia/Reperfusió (IR).<sup>8</sup>

El dany per Isquèmia/Reperfusió intestinal succeeix per tant quan hi ha una reducció o tall total del flux sanguini a l'intestí, seguit pel restabliment d'aquest flux o reperfusió del teixit. La IR intestinal provoca un dany al teixit de l'intestí caracteritzat per un augment de la permeabilitat de la mucosa i una disfunció de la barrera intestinal combinat amb canvis hemodinàmics i cardiovasculars<sup>9</sup>. Aquest dany produït per la IR intestinal és un problema clínic amb una elevada mortalitat del 70%, la qual no ha disminuït durant dècades, i que pot ser degut tant per motius patofisiològics com per diferents procediments quirúrgics, com ara un bypass cardiovascular o un transplantament intestinal.<sup>10</sup> Una oclusió de l'artèria mesentèrica, ja sigui deguda a una trombosis, a èmbols o a una vasoconstricció irreversible provocada per un shock hemorràgic o sepsis pot donar lloc a una isquèmia intestinal, essent el diagnòstic difícil de predir ja que el símptoma principal és l'aparició de manera repentina d'un sever mal abdominal.<sup>11</sup> El grau i la importància de la lesió dependrà del temps de privació del rec sanguini cap a l'òrgan.

### 1.1.3 Classificació histopatològica del dany intestinal després d'una Isquèmia/ Reperfusió

Actualment el dany tissular s'avalua segons la classificació descrita per Park l'any 1989, qui descriu una sèrie de criteris microscòpics en el teixit intestinal i els hi atorga un grau (de l'1 al 8) en funció del dany que presenta el teixit (Taula 1).<sup>12</sup>

Els cinc primers graus descrits per Park coincideixen amb la primera classificació realitzada per Chiu l'any 1970, qui va descriure els canvis de la mucosa intestinal després de períodes d'isquèmia i els hi va atorgar una graduació en una escala de l'1 al 5.<sup>13</sup>

Grau	Descripció
0	Mucosa normal
1	Espai sub-epitelial a la punta dels villi
2	Espai sub-epitelial més gran
3	Aixecament epitelial als costats del villi
4	Villi sense epiteli

5	Pèrdua del villi
6	Dany en la cripta
7	Tota la mucosa necròtica
8	Infart transmural

**Taula 1.** Classificació histològica del dany epitelial segons Park.

D'aquesta manera el grau 0 de l'avaluació microscòpica de l'intestí es defineix com a mucosa normal, mentre que els graus 1-5 indiquen diferents nivells (en increment) de dany en el villi. La lesió en el grau 1 és el desenvolupament d'un espai sub-epitelial a les puntes dels villis, el qual és més extens en el grau 2, mentre que en el grau 3 hi ha un aixecament (*lifting*) epitelial pels costats del villi. En el grau 4 el villi es troba sense epiteli mentre que el grau 5 es caracteritza per la pèrdua del villi en sí mateix. En el grau 6 la cripta intestinal es troba danyada i en el grau 7 tota la mucosa intestinal es troba necròtica. El grau 8 ja presenta un infart transmural (per exemple una necrosi de la làmina pròpia i de la mucosa).

#### 1.1.4 Classificació i tipus d'isquèmia intestinal

Durant molt de temps hi va haver certa controvèrsia al voltant de la terminologia referida a la isquèmia intestinal. Alguns investigadors classificaven la isquèmia intestinal d'acord amb la causa d'oclusió dels vasos (Taula 2), mentre que d'altres investigadors es cenyien en la seva patogènesi, independentment de si la causa clínica de la patologia era aguda o crònica.

- |                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Isquèmia intestinal oclusiva <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Oclusió arterial (èmbol o trombus) <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Isquèmia aguda</li> <li>2. Isquèmia crònica</li> </ul> </li> </ul> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- b. Colitis isquèmica
- c. Oclusió de la vena
- 2. Isquèmia intestinal no oclusiva

**Taula 2.** Classificació de la isquèmia intestinal segons el mecanisme d'obstrucció.

L'any 2000 l'Associació Americana de Gastroenterologia (AGA) va publicar un article classificant la isquèmia intestinal en tres grans categories (Taula 3), focalitzant-se en les característiques clíniques: isquèmia mesentèrica aguda, isquèmia mesentèrica crònica (també anomenada angina intestinal) i isquèmia del colon (també anomenada colitis isquèmica).<sup>14</sup>

- 1. Isquèmia mesentèrica aguda
  - a. Oclusió arterial major
  - b. Oclusió arterial menor
  - c. Èmbol major
  - d. Trombosi de vena mesentèrica
  - e. Vasoconstricció esplàcnica (isquèmia mesentèrica no oclusiva)
- 2. Isquèmia mesentèrica crònica (angina intestinal)
- 3. Colitis isquèmica

**Taula 3.** Classificació de la isquèmia intestinal proposada per la Associació Americana de Gastroenterologia l'any 2000.

La isquèmia mesentèrica aguda (IMA) causada per l'obstrucció de l'artèria mesentèrica superior és també anomenada com *síndrome mesentèrica arterial aguda*.<sup>15</sup>

### 1.1.5 Estat actual del tema

La isquèmia mesentèrica aguda és una emergència vascular que presenta una mortalitat entre el 60% i el 80% , el qual s'està comprovant recentment que va en augment.<sup>16</sup> El punt final d'una isquèmia mesentèrica aguda és un procés que resulta en una isquèmia dels budells o necrosi. Tot i els avenços en el diagnòstic i en el tractament, la supervivència no ha millorat gaire durant els últims 70 anys degut a la contínua dificultat en reconèixer l'estat abans de que l'infart hagi ocorregut. Els símptomes característics d'aquest tipus d'isquèmia és un mal abdominal molt fort, desproporcionat amb el resultat d'una exploració física. Moltes vegades es presenten pacients amb símptomes forts i no se'ls hi troba la causa, i s'ha descrit que els pacients que presenten símptomes i tenen més risc de patir una isquèmia mesentèrica aguda són persones majors de 50 anys amb arrítmies cardíques, un infart de miocardi recent, hipovolemia, hipotensió o sepsis.<sup>17</sup> Els pacients amb IMA solen tenir una història de trombos venosos, embolismes arterials, malalties del col·lagen o dany crònic postprandial.<sup>11</sup> Si els pacients no són diagnosticats ràpidament, els hi



succeeixen una sèrie d'esdeveniments que culminen en una múltiple disfunció dels òrgans i la mort. Així doncs, el temps per a fer el diagnòstic i els mètodes terapèutics per a restablir el flux sanguini són els punts primordials per a reduir l'elevada mortalitat associada amb la isquèmia mesentèrica aguda.<sup>18</sup>

LA IMA té quatre causes específiques: embolisme arterial, trombosi arterial, isquèmia mesentèrica no oclusiva i trombosi de la vena mesentèrica. D'aquestes, l'embolisme arterial és la causa més comú, essent la responsable del 40-50% dels casos, mentre que un 25-30% de totes les isquèmies és degut a una trombosi aguda.<sup>16</sup>

### 1.1.6 Diagnòstic i tractament

Com que la isquèmia mesentèrica aguda progressa ràpidament cap a un infart intestinal i la subsegüent mort, un ràpid diagnòstic i tractament són decisius. Una elevada suspicàcia a l'hora d'examinar la història clínica i al realitzar l'examen físic són factors claus per a un diagnòstic inicial de la isquèmia mesentèrica. La IMA ha de ser considerada en el diagnòstic diferencial de qualsevol pacient major de 60 anys que tingui una història recent d'infart miocàrdic i/o èmbols arterials, dolor abdominal postprandial i pèrdua de pes. La supervivència s'acosta al 50% quan el diagnòstic es realitza en les 24 hores següents al primer símptoma, mentre que aquest percentatge disminueix fins a menys d'un 30% quan el diagnòstic es retarda.<sup>16</sup>

El tractament per a la IMA es pot classificar en quatre punts principals: prevenció, ràpid diagnòstic i tractament, una decisió intraoperativa encertada i una gestió agressiva del postoperatori per a evitar el dany produït per la reperfusió, la formació de coàguls i el dany sèptic.

Quan s'ha diagnosticat la IMA mitjançant una angiografia, un catèter angiogràfic s'ha d'introduir en l'intestí prim, sempre que sigui possible, per a administrar vasodilatadors. Si no hi ha contraindicacions per a la utilització d'anticoagulants, s'ha d'administrar heparina intravenosa per tal de reduir la possibilitat d'una futura progressió del trombus arterial. Una vegada s'ha iniciat l'anticoagulació i l'hemodinàmia del pacient ha millorat, l'atenció s'ha de dirigir a reduir l'angiospasmè mesentèric (contracció de les capes musculars del vas sanguini) associat amb la reperfusió. Per a tal efecte s'ha d'administrar glucagó intravenós. L'allopurinol, inhibidors de l'enzima convertidora de l'angiotensina i inhibidors dels radicals lliures d'oxigen poden ajudar a reduir la síndrome de reperfusió i la mortalitat associada.<sup>19</sup> Prevenir les complicacions sèptiques inclou l'ús d'antibiòtics d'ampli espectre per protegir tant de bacteris gram-negatius, com de gram-positius i anaeròbics.

Si es decideix que el pacient ha de ser operat, la revascularització s'ha de realitzar abans de la reseció de l'intestí en un esforç per a intentar salvar tant intestí prim com sigui possible i evitar els efectes devastadors de la "síndrome de l'intestí curt". En situacions en que la viabilitat de l'intestí és qüestionable, s'ha de realitzar una segona operació 24-48 hores després de la

primera.<sup>16,20</sup> Les intervencions quirúrgiques associades a la IMA són l'embolectomia, la trombendaracterectomia, el *bypass* de l'artèria mesentèrica i la resecció de l'intestí.<sup>16</sup>

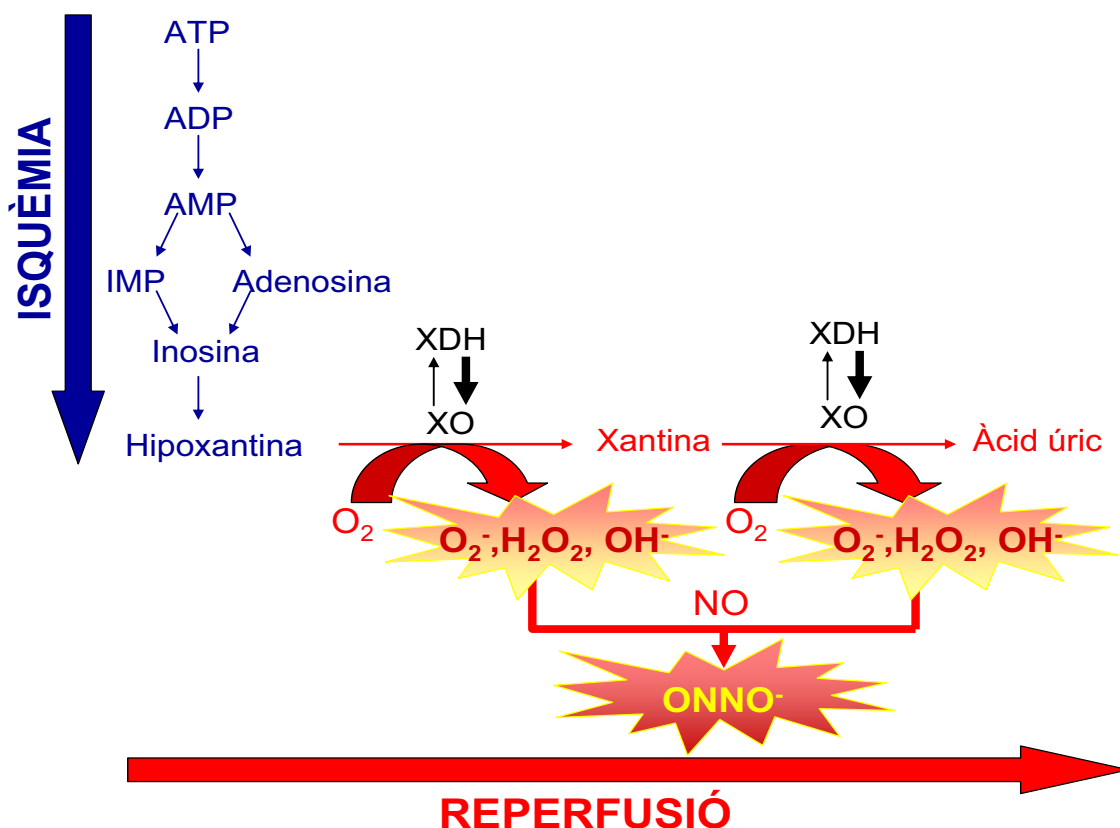
### 1.1.7 Isquèmia/Reperfusió i disfuncions del metabolisme cel·lular

#### Aconteixements cel·lulars durant la Isquèmia/Reperfusió

A nivell cel·lular la isquèmia provoca el pas del metabolisme aeròbic al metabolisme anaeròbic, que resulta en una ràpida disminució dels nivells intracel·lulars d'ATP. Les vies normals del metabolisme energètic es detenen, és a dir, es bloqueja la fosforilació oxidativa a nivell mitocondrial i disminueix la síntesi d'ATP i altres nucleòtids d'adenina productors d'energia. Associat a aquests esdeveniments es troba un augment de NADH i una depleció de  $\text{NAD}^+$  a l'interior de la mitocondria, degut a la detenció dels enzims encarregats de transportar-los a través de la membrana mitocondrial. Per tant, s'acumula NADH i es consumeix ATP. La glucòlisi anaeròbia que es posa en marxa, i que només és capaç d'aprofitar un 5% del potencial energètic de la glucosa origina l'acumulació d'ions lactat i  $\text{H}^+$ . Aquesta acumulació provoca una disminució del pH cel·lular amb la ruptura de la membrana, alliberació d'enzims lisosomals i mort necròtica cel·lular.<sup>21</sup>

Així doncs, la hipòxia produïda durant la isquèmia provoca la degradació d'ATP a AMP i la conseqüent depleció d'energia cel·lular. Aquest AMP és seguidament degradat a adenosina, inosina i finalment hipoxantina i xantina, la qual pot ser metabolitzada a àcid úric en teixits isquèmics.<sup>22</sup> Al mateix temps, la hipòxia provoca la conversió per proteòlisi de la xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO). En una cèl·lula sana, la forma XDH és la predominant, catalitzant el pas d'hipoxantina cap a àcid úric utilitzant  $\text{NAD}^+$  com a acceptor d'electrons, però, com ja s'ha dit, en condicions isquèmiques la XDH es converteix en XO, que utilitza l' $\text{O}_2$  com a acceptor d'electrons, formant radicals lliures. Així doncs, durant la reperfusió l'entrada d'oxigen permet a la XO generar xantina a partir de la hipoxantina acumulada, tot augmentant la producció de les espècies reactives de l'oxigen o radicals lliures de l'oxigen (ROS) i l'amplificació del dany (Figura 3).<sup>23</sup>

Una altra característica de la isquèmia és l'edema cel·lular, que lesiona les membranes citoplasmàtica, mitocondrial i lisosomal. Aquest edema s'origina per l'aturada de la bomba de sodi/potassi ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa) degut a la disminució dels nivells d'ATP, conduïnt a un desequilibri iònic intracel·lular, fet que provocarà la despolarització de la membrana, que pot portar al xoc hiposmòtic.<sup>24</sup> El  $\text{Na}^+$  s'acumula a l'interior de la cèl·lula amb la corresponent pèrdua de la càrrega negativa intracel·lular. Això permet al  $\text{Cl}^-$  entrar dins la cèl·lula i al  $\text{K}^+$  sortir cap a l'interstici. Per altra banda, els ions  $\text{Na}^+$  es mobilitzen cap a l'interior de la cèl·lula arrossegant amb ells aigua per tal de mantenir l'equilibri osmòtic amb l'espai intersticial del voltant. Amb la pèrdua de l'efecte osmòtic i l'entrada d'aigua dins la cèl·lula aquesta s'edematitza i perd l'arquitectura.<sup>25</sup>



**Figura 3.** Esquema de la degradació de fosfats d'alta energia durant la isquèmia i de la producció de radicals durant la reperfusió.

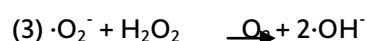
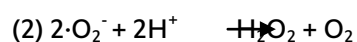
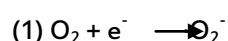
La disfunció dels enzims depenents de l'ATP també afecta a les ATPases depenents de Ca<sup>+</sup>, provocant una ràpida acumulació de calci intracel·lular després de la IR. Aquest calci citosòlic provoca l'activació de diversos enzims sensibles a aquest element, com ara les fosfolipases, degradant els fosfolípids de les membranes.<sup>26</sup>

En condicions normals l'ATP regula la contracció de les fibres d'actina i la seva interacció amb proteïnes i components de membrana plasmàtica, ja que contribueix a l'esterificació d'àcids grassos i resintetitza fosfolípids. La seva desregulació provoca també una desorganització del citoesquelet que dona lloc a una manca de components fosfolipídics de membrana i l'acumulació de productes de degradació fosfolipídica. Tots aquests fets ajuden a les membranes a desestabilitzar-se, perdent les seves funcions estructurals i de membrana.<sup>27</sup>

La irreversibilitat de la lesió isquèmica està relacionada amb la incapacitat per restaurar la funcionalitat de les mitocondries i amb la lesió de les membranes citoplasmàtiques, essent aquesta afuncionalitat de les membranes una característica típica de la lesió isquèmica irreversible.<sup>28</sup>

### Radicals lliures de l'Oxigen i l'Òxid Nítric

El dany iniciat durant la isquèmia es veu agreujat durant la reperfusió, degut majoritàriament a l'entrada d'oxigen al teixit; però al mateix temps, aquest pas és un requisit fonamental per la recuperació del teixit i el restabliment del subministrament d'energia, tot i que paradoxalment sigui el causant de més dany. Aquesta reoxigenació condueix a una producció massiva de ROS, tòxics per a la cèl·lula. La toxicitat dels ROS va associada a la seva alta reactivitat amb un no-radical produït nous metabòlits més o menys reactius que l'original. Hi ha tres radicals lliures de l'oxigen principals: (1) l'anió superòxid ( $O_2^-$ ), (2) el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i (3) el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). El peròxid d'hidrogen, tot i no ser estrictament un radical, ja que no té un electró lliure, és considerat com a tal degut a la seva capacitat com a donador d'ions hidroxil.<sup>23</sup>



L'òxid nítric (NO) és una molècula protectora davant la lesió per IR en diferents teixits, però, en contacte amb els radicals superòxid dona lloc a la generació de peroxinitrit ( $ONOO^-$ ), que és extremadament reactiu en les cèl·lules.<sup>29</sup> En condicions normals, la producció d'NO excedeix en gran mesura la producció de superòxid, cosa que permet a l'NO actuar com a captador endogen (*scavenger*) de superòxid; però després d'uns minuts de reperfusió, en un teixit isquèmic la formació de superòxid supera àmpliament la formació d'NO. En aquestes condicions els nivells d'NO reaccionen amb el superòxid generant el citat peroxinitrit. La resta de superòxid lliure genera, al mateix temps, altres radicals lliures, com són  $\cdot O_2^-$  i  $H_2O_2$ . Aquests no triguen en iniciar o augmentar la inflamació en les vècules i en el sistema circulatori, promovent l'expressió i l'activació de molècules d'adhesió i, en conseqüència, l'adhesió i migració de neutròfils cap a l'interior del teixit, iniciant la reacció inflamatòria.<sup>30</sup>

### 1.1.8 Infiltració de neutròfils en la Isquèmia/Reperfusió intestinal

Després d'un període d'hipòxia o isquèmia, la mucosa intestinal, que és probablement un dels teixits més sensibles al dany per IR,<sup>31,32</sup> pateix com a conseqüència de l'actuació dels ROS una peroxidació lipídica de les membranes cel·lulars amb la subseqüent alliberació de quimioatracients (entre ells, leucotrien  $B_4$  i tromboxan  $A_2$ ),<sup>33</sup> conduïnt a una acumulació de leucòcits polimorfonuclears (neutròfils) en el teixit. Durant la reperfusió, les cèl·lules endotelials són propenses a l'adhesió de neutròfils i plaquetes, incrementant-se la permeabilitat d'aquestes cèl·lules endotelials i l'activació cel·lular, facilitant el transvasament de cèl·lules inflamatòries cap a l'interior del teixit.<sup>34</sup>

Aquesta infiltració de neutròfils activats en el teixit contribueix també de manera molt significativa a la producció de radicals d'oxigen. Els neutròfils després de la reperfusió s'acumulen en els capil·lars i vècules del teixit alliberant grans quantitats de ROS i gran varietat de citocines, les quals a la vegada atrauen i activen a més neutròfils cap a la zona inflamada.<sup>34,35</sup>

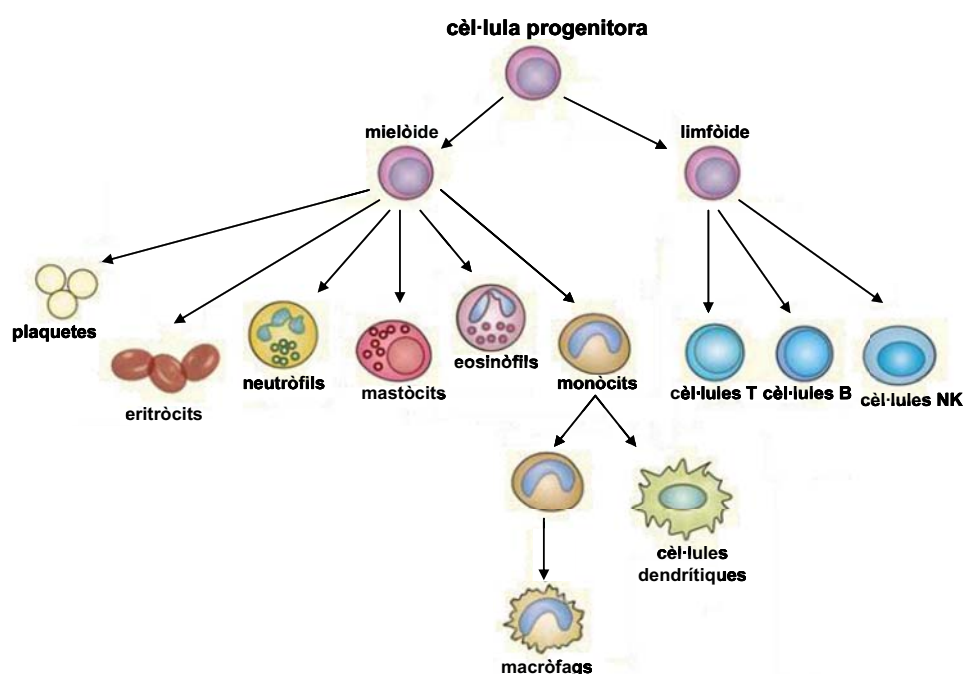
D'aquesta manera, els neutròfils activats incrementen la reacció inflamatòria, essent un dels principals mediadors del dany tissular després d'una IR intestinal i una de les alteracions microvasculars característiques d'aquesta lesió.<sup>36</sup>

## 1.2 ELS NEUTRÒFILS

### 1.2.1 Generalitats. Sistema immunitari

El sistema immunitari és el responsable de que el cos humà tingui la capacitat de resistir les infeccions a les que està constantment exposat. Aquest sistema es compon de dues subdivisions, el sistema immunitari no específic o innat, i el sistema immunitari específic o adaptatiu. Les defenses innates es caracteritzen per una ràpida assimilació, molt important en una situació d'emergència, i per una resposta no específica de duració limitada. Per altra banda, les respostes adaptatives es desenvolupen més tard, però són específiques i de més llarga duració.<sup>37</sup>

Totes les cèl·lules del sistema immunitari tenen el seu origen en la medul·la òssia, i s'inclouen les mielòides (neutròfils, mastòcits, eosinòfils, macròfags i cèl·lules dendrítiques) i les limfòides (limfòcits B, limfòcits T i "natural killers"(NK)) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de les diferents línies cel·lulars hematopoiètiques.

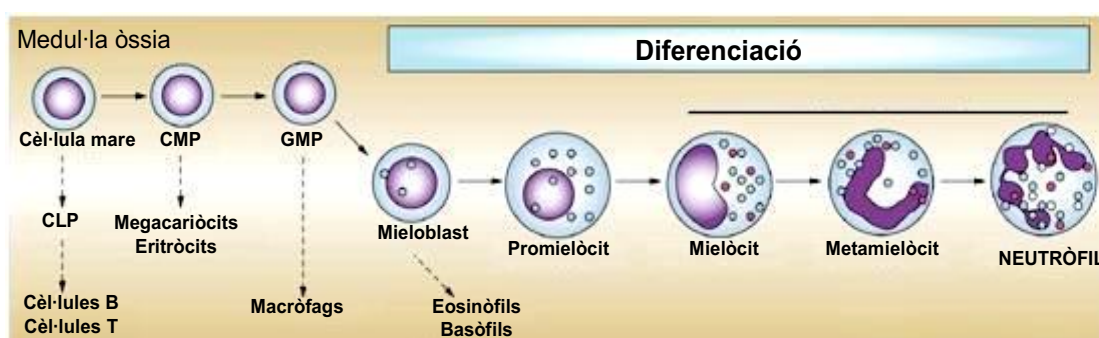
En la resposta innata, són els neutròfils i els monòcits les cèl·lules que juguen el paper principal en la migració dels leucòcits. Els fagòcits mononuclears (monòcits i macròfags) i els neutròfils són bàsics en la reacció inflamatòria aguda de les defenses immunològiques efectores innates, essent agents defensius claus degut a la seva capacitat fagocítica i la seva àmplia distribució per tots els teixits i òrgans del cos.

En determinades situacions però, la resposta inflamatòria pot danyar teixits sans com a conseqüència dels productes tòxics produïts per la pròpia resposta immunitària.<sup>38</sup>

### 1.2.2 Neutròfils

Els neutròfils són cèl·lules polimorfonuclears que representen un 50-60% del total de leucòcits circulants en sang i constitueixen la “primera línia de defensa” de l’organisme contra agents infecciosos o altres substàncies que travessen la barrera física del cos. Un cop s’ha iniciat una resposta immunitària, els neutròfils són les primeres cèl·lules a ésser reclutades a les zones d’infecció o dany.<sup>39</sup>

En la maduració de la línia granulocítica la primera cèl·lula que es diferencia és el mieloblast, cèl·lula que es caracteritza per ésser de tamany gran amb un nucli de cromatina i de 2 a 5 nuclèols ben delimitats (Figura 5). La seva relació nucli-citoplasma és elevada. Aquestes cèl·lules constitueixen del 0.5 al 2% de la medul·la òssia. A mida que maduren, els mieloblasts es converteixen en promielòcits neutròfils, amb un nucli voluminós de cromatina més condensada i on quasi no es veu el nuclèol. El seu citoplasma és dèbilment basòfil, ple de granulacions azuròfiles i neutròfiles. Els promielòcits representen del 2 al 8% de les cèl·lules medul·lars i donen lloc als mielòcits. Aquestes cèl·lules tenen un diàmetre de 15 µm, un nucli lleugerament arrodonit i un citoplasma amb nombroses granulacions neutròfiles i algunes azuròfiles. Aquestes cèl·lules representen del 5 al 20% de les cèl·lules medul·lars i són les últimes de la línia granulocítica amb capacitat de mitosis. Dins l’estadi post-mitòtic, el metamielòcit té un nucli en ferradura i un citoplasma similar al del mielòcit. Finalment el granulòcit neutròfil, de 10 a 15 µm de diàmetre, té un nucli segmentat en diversos lòbuls i el citoplasma ple de grànuls<sup>40</sup>.



**Figura 5.** Diferenciació dels neutròfils en la medul·la òssia. (CLP: progenitor comú dels limfòcits, CMP: progenitor comú dels mielòids, GMP: progenitor granulòcits/macròfags).

Per a realitzar la seva funció defensiva, els neutròfils contenen aquests grànuls citoplasmàtics i vesícules secretores equipats amb tota una sèrie de proteases i substàncies bactericides, a més dels components necessaris per a generar grans quantitats de ROS. Els diversos grànuls citoplasmàtics contenen també una àmplia gama de receptors de membrana per a molècules d'adhesió endotelial, proteïnes de la matriu extracel·lular i mediadors solubles de la inflamació. És la mobilització controlada d'aquests organells citoplasmàtics el que permet la transformació dels neutròfils d'ésser unes cèl·lules circulants passives a ser una potent cèl·lula efectora de la immunitat innata.<sup>41</sup>

### 1.2.3 Grànuls i vesícules secretores dels neutròfils

Els grànuls citoplasmàtics van ésser observats per primera vegada per Paul Ehrlich, descobridor dels leucòcits polimorfonuclears. A mesura que les tècniques de laboratori avançaven es van distingir dos tipus de grànuls amb diferents afinitats per a ser tenyits; els grànuls azuròfils que es tenyien amb la tinció bàsica d'azur A en l'estadi promielocític, i els grànuls específics que no es tenyien. Una clara distinció entre els dos grups de grànuls es va establir quan el mètode de tinció de la peroxidasa mitjançant microscopia electrònica es va adoptar per identificar la mieloperoxidasa (MPO), la qual es troba només en els grànuls azuròfils. Tradicionalment, els grànuls específics es caracteritzen per ser grànuls secretors importants en el inici de la resposta inflamatòria, mentre que els grànuls azuròfils (MPO) es solen considerar com a lisosomes particularment actius en la digestió de material fagocitat. Aquesta visió simplista dels grànuls ha anat variant i per microscopia electrònica s'ha identificat un tercer tipus de grànuls, que apareixen de manera tardia durant la maduració mioide. Així mateix també es va identificar un organell d'emmagatzematge excitòtic addicional, la vesícula secretora.<sup>42,43</sup>

De totes maneres, els grànuls es poden classificar depenent de molts criteris, ja sigui per la seva mida, per la seva morfologia, densitat electrònica o per una proteïna donada. S'ha de tenir en compte però, que qualsevol classificació dels grànuls serà sempre arbitrària, doncs formen un continu des dels grànuls azuròfils fins als de gelatinasa, compartint proteïnes en alguns casos, o, per al contrari, algunes proteïnes es poden utilitzar com a marcadors específics.

Està ben definit que les majors diferències entre els grànuls es troben en la mobilització d'aquests, tant *in vitro* com *in vivo*. Els grànuls de gelatinasa (identificats per la gelatinasa) es mobilitzen més de pressa que els grànuls específics (identificats per lactoferrina), els quals són excitats amb més rapidesa que els grànuls azuròfils (identificats per MPO). Així doncs, sembla lògic que des d'un punt de vista funcional, els grànuls es classifiquin en grànuls peroxidasa-positius (o azuròfils o primaris), definits pels seu contingut de MPO, i sub-dividir els peroxidasa negatius en grànuls específics (o secundaris), definits pel seu contingut de lactoferrina, i els grànuls de gelatinasa (o terciaris) definits per la seva elevada concentració de gelatinasa. El contingut dels diferents grànuls i de les vesícules secretores el trobem en la Taula 4.<sup>41</sup>

	Grànuls		Vesícules secretores
	azuròfils	específics	de gelatinasa
CD63		CD11b/CD18	fosfatasa alcalina
CD68		CD15	citocrom b
ATPasa		CD66	enzim deac. diacilglicerol
àcid b-glicerofosfatasa		CD67	R-fMLP
àcid mucopolisacàrid		citocrom b	SCAMP
Antitripsina		R-fMLP	R-act. plasminogen
a-manosidasa		R-fibronectina	VAMP-2
azurocidina		subunitat prot.G	ATPasa
CAP37		R-laminina	acetiltrans-ferasa
Prot. d'unió a l'heparina		antigen NB1	microglo-bulina
Prot. d'increment permeabilitat bactericida		proteïna 19kDa	gelatinasa
b-glicerofosfatasa		proteïna 155kDa	lisozima
catepsines		Rap1/Rap2	NRAMP-1
defensines		SCAMP	leucolisina
elastasa		R-Trombospondina	SNAP-23,-25
lisozimes		R-TNF	CRISP-3
mieloperoxidasa		R-activador plasminogen	prot. de plasma
N-acetil--b-glucosaminidasa		VAMP-2	C1q/R
proteïnasa 3		R-vitronectina	leucolisina
sialidasa		b <sub>2</sub> -microglobulina	VAMP-2
prot. ubiqüitina		colagenasa	
Preselinina 1		gelatinasa	
Estomatina			
BPI		h-CAP	
B-glucuronidasa		histaminasa	
		lactoferrina	
		lisozima	
		NGAL	
		act.plasminogen	
		sialidasa	
		leucolisina	
		estomatina	
		heparanasa	
		prot. unió vitamina B <sub>12</sub>	

**Taula 4.** Contingut dels grànuls i vesícules secretores dels neutròfils.

### 1.2.4 Citocines

Quan estan estimulats, els neutròfils poden sintetitzar diferents citocines i quimiocines, les quals amplifiquen la inflamació reclutant encara més neutròfils i altres cèl·lules immunològiques a la zona inflamada. S'han descrit a les proteases produïdes pels propis neutròfils importants funcions en la regulació de la xarxa de citocines inflamatòries. Aquestes funcions inclouen la degradació de citocines, activació proteolítica de precursors de citocines, separació de receptors de citocines de les membranes cel·lulars, i activació de factors de creixement mitjançant la degradació de proteïnes d'unió. Moltes citocines i quimiocines que són potents quimioattractius o



activadors dels neutròfils són, a la vegada, dianes de les proteases, el que suggereix un bucle regulador.<sup>44</sup> La majoria d'estudis sobre la síntesi de citocines en neutròfils s'han realitzat *in vitro*, tot i que les observacions posteriors *in vivo* han confirmat la validesa de les dades.<sup>45</sup> El patró d'expressió de les citocines dels neutròfils és similar al dels monòcits/macròfags (Taula 5), ja que són capaços de secretar tant citocines pro-inflamatòries, com quimiocines i factors angiogènics.<sup>46</sup>

IL-3	IP-10	IL-1 $\alpha/\beta$
M-CSF	KC	IL-1ra
G-CSF	GRO $\alpha$	IL-12
SCF	IL-8	IFN $\alpha$
CD30L	MIP-2	GM-CSF
GRO $\beta$	MIP-1 $\alpha/\beta$	IL-6
IL-10	TGF $\beta$	MCP-1

**Taula 5.** Citocines produïdes pels neutròfils.

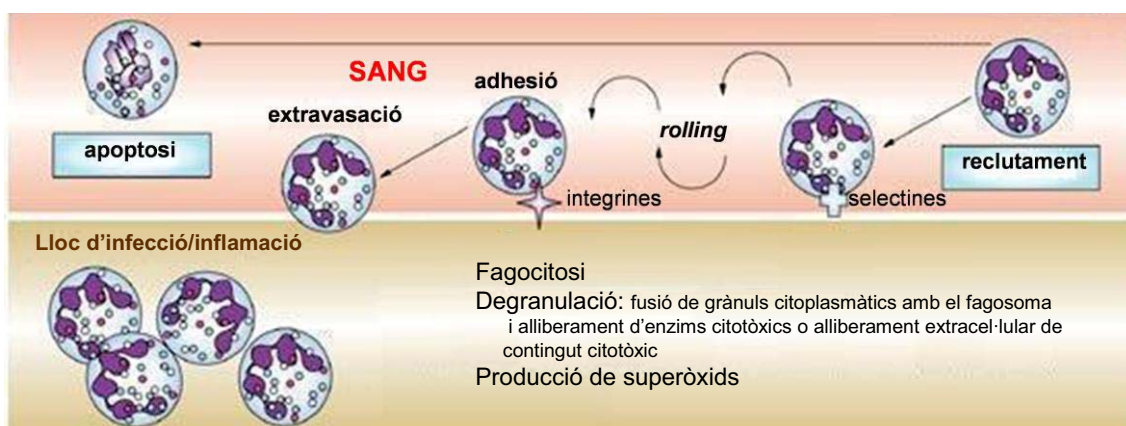
Els neutròfils presenten apoptosi (mort cel·lular programada) espontàniament en absència de citocines o d'altres agents proinflamatoris abans d'ésser retirats pels macròfags. Aquesta eliminació mitjançant fagocitosis dels neutròfils apoptòtics evita que alliberin el seu contingut citotòxic al medi extracel·lular, situació que succeiria si les cèl·lules morissin per necrosi.<sup>47</sup> De totes maneres, si els mecanismes fagocítics es troben sobresaturats, els neutròfils apoptòtics esdevindrien en necrosi secundària. Aquests neutròfils necròtics es desintegren i alliberen molècules citotòxiques. La fagocitosis de les restes cel·lulars per part dels macròfags indueix la producció de citocines proinflamatoris com ara TNF, amplificant la inflamació.<sup>48</sup>

### 1.2.5 Neutròfils en la inflamació. Del reclutament a l'extravasació.

Els neutròfils són reclutats a les zones d'infecció mitjançant senyals quimiotàctiques provinents de quimiocines, citocines, metal·loproteïnases i productes dels microorganismes invasors.<sup>49</sup>

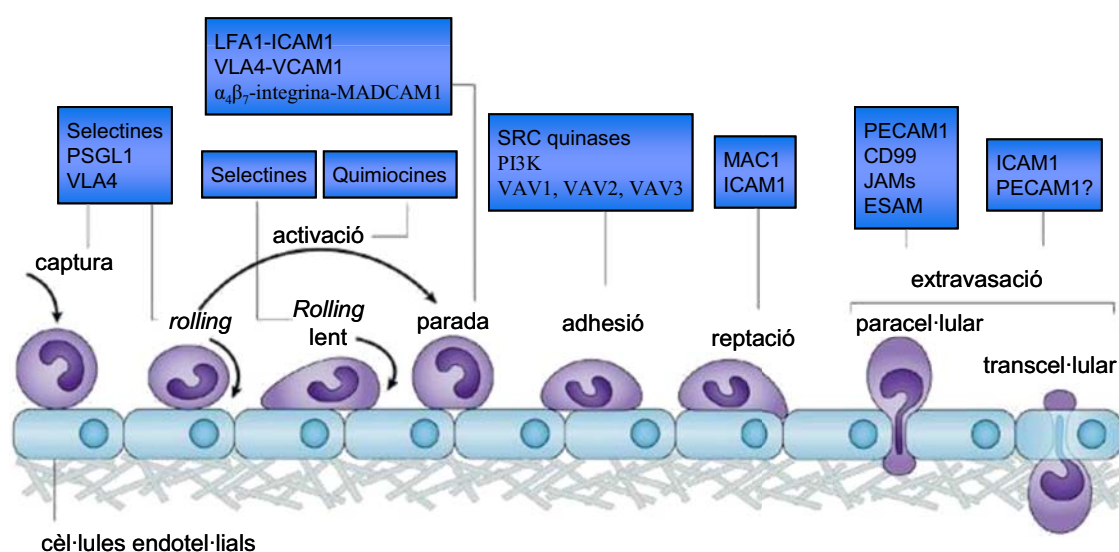
El reclutament dels neutròfils des dels vasos sanguinis cap al teixit danyat succeeix en una sèrie d'etapes perfectament coordinades.<sup>50</sup> L'activació i reclutament d'aquestes cèl·lules per mitjà dels diferents senyals està estrictament regulat, ja que un defecte en l'adhesió leucocitària pot provocar una resposta inflamatòria inapropiada enfront un dany o una infecció.<sup>51</sup>

El model original de reclutament dels neutròfils es va descriure al segle XIX i comprenia les etapes de rodament (*rolling*), adhesió i extravasació. Més endavant, quan es van descobrir les integrines, les selectines i els seus respectius lligands, el model proposava que la cascada d'adhesió leucocitària tenia una especificitat combinatorial en les tres etapes: el rodament mitjançant les selectines, l'activació promoguda per les quimiocines i la parada o adhesió provocada per les integrines, tal com mostra la Figura 6.<sup>52</sup>



**Figura 6.** Model original de reclutament i activació dels neutròfils.

De totes maneres, recentment han aparegut evidències de que succeeixen altres etapes addicionals durant l'adhesió leucocitària, de manera que s'ha proposat una versió ampliada de la cascada original que comprèn les següents etapes (Figura 7): captura, rodament, rodament lent (*rolling* lent), activació, parada i adhesió, forta adhesió, reptació i extravasació (paracel·lular o transcel·lular).<sup>52</sup>



**Figura 7.** Versió ampliada de la cascada d'adhesió leucocitària.

La captura és el primer contacte entre els neutròfils i l'endoteli de les vènules post-capil·lars. En aquesta primera etapa, així com en el rodament, les selectines juguen un paper molt important. Les selectines són glicoproteïnes de membrana de tipus I formades per un domini de lectina de tipus C amino-terminal, un domini EGF-like, de dos a nou petits dominis repetits (SCR), una regió trans-membrana i una cua citoplasmàtica. Aquesta família de proteïnes inclou tres molècules diferents que presenten diferents patrons d'expressió i funció.<sup>51,53</sup>

El rodament és promogut per la L-selectina, la P-selectina i la E-selectina, que interactuen tant amb el lligand 1 de la glicoproteïna P-selectina (PSGL1) com amb d'altres lligands glicosilats. La L-selectina l'expressen la majoria de leucòcits mentre que la E-selectina i la P-selectina són expressades per les cèl·lules endotel·lials inflamades. La unió del PSGL1 a la L-selectina motiva l'aparició d'interaccions entre leucòcits mitjançant les quals els leucòcits adherents i fragments derivats d'ells faciliten la captura de leucòcits secundaris. Aquesta captura secundària permet que leucòcits que no expressen lligands per la E-selectina o la P-selectina també arribin a la zona d'inflamació.<sup>52</sup> Durant el rodament, l'endoteli té un rol actiu, expressant tant E-selectines com P-selectines. Les senyals produïdes per aquestes interaccions de les selectines es transmeten no només directament a través de les seves unions sinó també a través de receptors acoblats a proteïna G (GPCRs), tot hi que aquestes cascades de senyalització encara no es coneixen completament. En aquesta etapa cal destacar també la participació de les integrines, que permeten una forta adhesió dels leucòcits a l'endotel·li i generen senyals intracel·lulars que regulen certes funcions cel·lulars, entre elles la motilitat, fagocitosi, producció de superòxids, degranulació, proliferació i apoptosi.<sup>51,52</sup>

Diversos estudis han demostrat que la frenada dels leucòcits després del rodament és ràpidament promoguda per quimiocines i altres quimioatracients, i que succeeix mitjançant la unió de les integrines leucocitàries (principalment de les subfamílies  $\beta_1$  i  $\beta_2$ ) a membres de la superfamília de les immunoglobulines, com ara ICAM-1 i VCAM-1, expressades per les cèl·lules endotel·lials.<sup>54</sup> La modulació de l'afinitat d'una integrina per al seu lligand és un pas crucial en la parada leucocitària induïda per les quimiocines i en l'adhesió, essent aquesta afinitat depenent de canvis conformacionals de les integrines promoguts per les pròpies quimiocines.<sup>52</sup>

La transmigració a través de les parets dels vasos sanguinis o extravasació és l'últim pas en el procés de reclutament leucocitari cap als teixits inflamats. Abans de travessar les parets de les vècules post-capil·lars, els neutròfils i els monòcits repton pels vasos sanguinis de manera depenent de MAC-1 i ICAM-1, buscant la zona preferent per a la transmigració. Aquesta migració a través de l'endotel·li, que pot ser per via paracel·lular o transcel·lular, succeeix gràcies a la interacció de les integrines leucocitàries amb els lligands expressats en les cèl·lules endotel·lials (ICAM-1 i VCAM-1). La migració paracel·lular succeeix a través de les unions cel·lulars de l'endotel·li. Implica l'alliberament de cadherina vascular endotel·lial (VE-cadherina) i és facilitada per certs compartiments de membrana intracel·lulars i per molècules d'unió de les cèl·lules endotel·lials (nectines). Per altra banda la migració transcel·lular succeeix a través de les cèl·lules endotel·lials, en les zones menys gruixudes de l'endotel·li, de manera que la distància de migració dels leucòcits es menor. En aquest cas es produeixen uns orgànuls vesículo-vacuolars que formen un canal intracel·lular a través del qual un leucòcit pot migrar al teixit inflamat.<sup>49,52,55,56</sup>

### 1.2.6 Resolució de la inflamació. Paper dels macròfags.

La fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques juga un paper molt important en molts processos biològics fonamentals, incloent-hi la renovació tissular, el desenvolupament del sistema immunitari i la resolució de la inflamació.<sup>57</sup> La retirada de cèl·lules apoptòtiques, entre elles neutròfils, per part dels macròfags ja va ser descrita a finals del segle XIX per Elie Metchnikoff. Aquest biòleg rus observà a través d'un simple microscopi òptic com "micròfags" (neutròfils) eren englobats per macròfags en zones on hi havia inflamació.<sup>58</sup>

En els neutròfils, és de vital importància que una vegada han realitzat la seva funció defensiva, entrin en apoptosi i siguin reconeguts, fagocitats i eliminats pels macròfags per tal d'evitar l'alliberació del seu contingut tòxic. El reconeixement dels neutròfils i la seva degradació són processos molt ràpids si es comparen amb el temps que triga el procés apoptòtic en la cèl·lula.<sup>59</sup> Aquesta eliminació és un mecanisme que permet controlar el nombre de neutròfils sense alliberar grànuls tòxics ni factors quimiotàctics al fluid extracel·lular, facilitant, per tant, la resolució de la inflamació.<sup>60</sup> A més, quan les cèl·lules apoptòtiques són reconegudes i fagocitades, provoquen una resposta anti-inflamatòria mitjançant citocines, on es pot destacar una supressió de la producció i alliberació de mediadors com ara TNF- $\alpha$  o l'estimulació de la producció de la citocina anti-inflamatòria TGF- $\beta$ .<sup>57</sup>

La fagocitosi per part dels macròfags es pot veure influenciada per mediadors solubles com ara citocines, prostaglandines o hormones glucocorticòides. S'assumeix que aquests fagòcits reconeixen canvis en la superfície de les cèl·lules apoptòtiques que les distingeix de les resta de cèl·lules vives i sanes, tot i que aquestes alteracions en la superfície cel·lular encara no han estat completament caracteritzades. Es pensa que les alteracions en la membrana confereixen una unió específica per a les opsonines solubles que podrien unir-se a la superfície cel·lular i iniciar el procés de fagocitosi. Les opsonines clàssiques que es troben constitutivament en el sèrum, com ara anticossos o proteïnes del complement podrien unir-se a les cèl·lules apoptòtiques iniciant la fagocitosi, oferint un mecanisme d'eliminació que no requeriria cap receptor cel·lular avui dia desconegut.<sup>57,61</sup>

L'eliminació doncs dels neutròfils apoptòtics per part dels macròfags de manera no inflammatòria mostra l'apoptosi com un mecanisme de resolució de la inflamació, permetent l'erradicació de cèl·lules inflammatòries destructives de manera no perillosa.

### 1.3 NEUTRÒFILS EN HIPÒXIA I ISQUÈMIA

#### 1.3.1 Generalitats

La vida d'un neutròfil sol ser curta (8-20 hores), però es pot allargar quan es troben en una situació d'infecció o en un teixit inflammat. En una inflamació aguda, el nombre de neutròfils infiltrats en els teixits pot ser molt elevat degut a la seva gran aflluència des de la circulació però també degut a que la seva apoptosi constitutiva es veu retardada per l'acció de mediadors locals d'inflamació. Molts estímuls que activen els granulòcits i que estan abundantment presents en les zones d'inflamació (per exemple, GM-CSF, LPS o el fragment de complement C5a) retarden

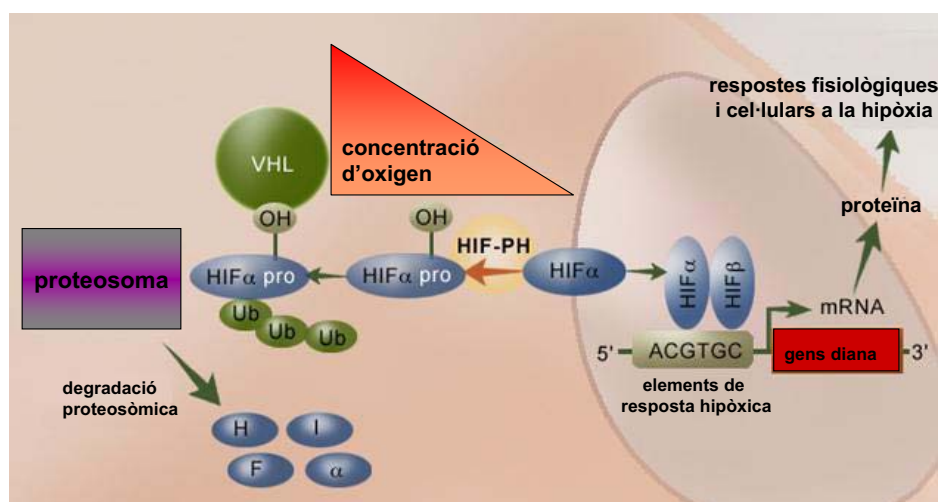
l'apoptosi dels neutròfils.<sup>62,63</sup> Diverses situacions proinflamàtores s'han associat amb un retard de l'apoptosi dels neutròfils, entre les que cal destacar les síndromes coronàries agudes i el dany per isquèmia/reperfusió.<sup>64-66</sup>

Quan els neutròfils migren de la circulació cap a la zona d'inflamació, s'han d'adaptar i funcionar en condicions de tensió d'oxigen molt menors que les que es troben en el sistema circulatori, doncs se sap que en pràcticament totes les zones inflamades els nivells d'oxigen són baixos.<sup>67</sup> En els teixits sans, la tensió d'oxigen es troba generalment entre 20 i 70 mmHg (2.5-9% oxigen), mentre que una inadequada perfusió en els teixits danyats pot provocar la formació de múltiples àrees d'hipòxia, on s'han descrit tensions d'oxigen menors de 10 mmHg (menys d'1% oxigen).<sup>67</sup> En una de les primeres respostes al dany, els neutròfils dels vasos afectats aturen el seu rodament i s'adhereixen, situació que pot comportar la formació d'agregats i, per tant, una oclusió del vas i una reducció del fluxe sanguini. La reducció del fluxe juntament amb l'increment en el nombre de cèl·lules condueix també a una depleció local de l'oxigen.<sup>68</sup> Aquesta disminució d'oxigen o hipòxia també és capaç de provocar una profunda i reversible inhibició de l'apoptosi dels neutròfils tan *in vivo* com *in vitro*.<sup>69</sup> Aquesta inhibició en els neutròfils contrasta amb el majoritari efecte proapoptòtic que té la hipòxia en la majoria de tipus cel·lulars.<sup>70</sup> Els neutròfils a més, al contrari que la majoria de cèl·lules, no utilitzen la respiració mitocondrial encara que es trobin en ambients oxigenats. Aquests neutròfils amb una major longivitat es mantenen funcionalment actius i contribueixen al dany tissular local o a complicacions sistèmiques.<sup>65</sup>

S'ha suggerit que el retard en l'apoptosi dels neutròfils induït pels mediadors inflamatoris és associat a una inhibició de l'activació de les caspases a través de la família de proteïnes Bcl-2, el que li donaria un paper molt important a la mitocòndria.<sup>71</sup>

### 1.3.2 HIF-1 $\alpha$

L'HIF és un factor de transcripció regulat a nivell protèic per l'oxigen. L'estabilitat de la subunitat  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) està regulada per una família de prolil-hidroxilases (PHL) depenent d'oxigen i ferro. La seva acció dirigeix a HIF-1 $\alpha$  cap a la seva degradació mitjançant la via de la ubiquitina-proteosoma, en un procés depenent de la interacció amb la proteïna supressora de tumors von Hippel-Lindau. (vHL). En hipòxia, l'activitat de la prolil-hidroxilasa és inhibida, de manera que HIF-1 $\alpha$  s'acumula i es transloca al nucli, on s'uneix a la constitutivament expressada HIF-1 $\beta$ . L'heterodímer resultant s'uneix a elements de resposta hipòxica (HREs) de seqüències reguladores de gens diana (Figura 8).

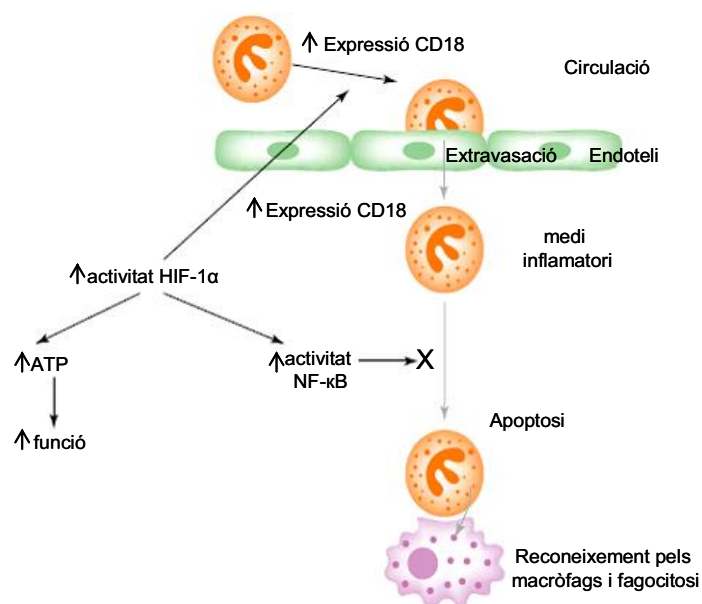


**Figura 8.** Activació de la resposta transcripcional d'HIF. En situacions oxigenades HIF $\alpha$  és ràpidament degradat per la via del proteosoma. En manca d'oxigen, HIF $\alpha$  s'acumula i entra al nucli permetent l'heterodimerització amb la subunitat nuclear HIF $\beta$ , unint-se als elements de resposta hipòxica i conduint a la transcripció dels gens diana.

A part de la seva resposta a la hipòxia, actualment hi ha evidències que el sistema HIF també es veu afectat independentment de l'oxigen. Tot i que és l'O<sub>2</sub> el factor més determinant en l'activitat de les prolil-hidroxilases, l'enzim és sensible també a alteracions en el balanç redox de la cèl·lula, al ferro o a l'homeòstasi de metabòlits.<sup>72</sup> Quan s'analitza un teixit en busca d'HIF-1 $\alpha$ , normalment aquest no es troba o es troba en quantitats molt petites, ja que la concentració d'oxigen tissular es manté relativament alta. El fluxe sanguini, doncs, està adaptat per aportar unes quantitats d'oxigen apropiades, no deixant opció a l'activació d'HIF-1 $\alpha$ . Contràriament, en els teixits inflamats les concentracions d'oxigen es troben per sota les pressions parcials fisiològiques, de manera que grans quantitats d'HIF-1 $\alpha$  s'acumulen, a més, el nombre de cèl·lules inflamatòries augmenta i l'activació d'aquestes produeix gran varietat de citocines, ROS i NO.<sup>73</sup> En aquestes condicions doncs, els neutròfils produeixen grans quantitats de ROS a través de la NADPH oxidasa. Aquesta situació no només és crítica per l'acció bactericida dels neutròfils sinó que també és perillosa per l'hoste si la formació de ROS esdevé incontrolable. L'increment en la formació de ROS comporta també l'estabilització d'HIF-1 $\alpha$  degut a la inhibició de les PHLs a través dels radicals lliures produïts per la NADPH oxidasa.<sup>73</sup>

Diversos grups han confirmat també que el NO, administrat exògenament o produït de manera endògena estabilitza també la proteïna HIF-1 $\alpha$ , produïnt la transactivació d'HIF-1 $\alpha$  en condicions de normòxia. El NO bloquejaria la ubiquitinació d'HIF-1 $\alpha$  *in vitro* i disminuiria l'activitat de les PHLs, suggerint que la hipòxia i el NO utilitzen el mateix mecanisme per a estabilitzar l'HIF-1 $\alpha$ .<sup>74</sup> Així doncs, no només la disminució en les concentracions d'oxigen sinó també l'increment de ROS durant la inflamació o la presència de NO contribuirien a l'acumulació d'HIF-1 $\alpha$  i la seva activació.

HIF-1 $\alpha$  regula l'expressió d'almenys 30 gens, essent els gens diana clàssics enzims glucolítics, transportadors de glucosa, eritropoietina, gens implicats en l'estrés cel·lular, en l'apoptosi o el factor angiogènec VEGF.<sup>67,75,76</sup> El procés de reclutament dels neutròfils en inflamació, que depèn de les integrines, és regulat també per HIF-1 (induint l'expressió del gen CD18 que codifica per la integrina  $\beta_2$ )<sup>77</sup>, essent un altre mecanisme mitjançant el qual l'oxigen pot directament modificar la inflamació (Figura 9).<sup>78</sup> Estudis posteriors han mostrat també que en neutròfils el factor de transcripció NF $\kappa$ B depèn d'HIF i que aquest està clarament relacionat amb la resposta inflamatòria i la inhibició de l'apoptosi en els neutròfils (Figura 9).<sup>79,80</sup>



**Figura 9.** Tres mecanismes dependents d'HIF relacionats amb la regulació de la funció de les cèl·lules mielòides: augment de la funció dels neutròfils, sobre-expressió de la integrina  $\beta_2$  i inhibició de l'apoptosi dels neutròfils a través de NF $\kappa$ B.

Estudis sobre la funció d'HIF-1 $\alpha$  en les activitats bactericides dels neutròfils han demostrat nivells elevats d'aquest factor de transcripció en resposta a gran varietat d'espècies bacterianes, entre elles *Streptococcus aureus* o *Salmonella typhimurium*, suggerint-li un rol en les interaccions bacteri-hoste. Experiments en ratolins on les cèl·lules mielòides careixen d'HIF-1 $\alpha$  han mostrat una major susceptibilitat d'aquests ratolins a les infeccions, a la vegada que experiments *in vitro* han descrit una disminució en la fagocitosi de bacteris per part d'aquestes cèl·lules carents del factor de transcripció, suggerint un important paper d'HIF-1 $\alpha$  en els mecanismes de defensa de l'hoste.<sup>75</sup>

El factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  és el principal regulador del retard en l'apoptosi dels neutròfils en situacions hipòxiques/anòxiques, tot i que el mecanisme a través del qual succeeix encara no està del tot entès.<sup>79</sup>

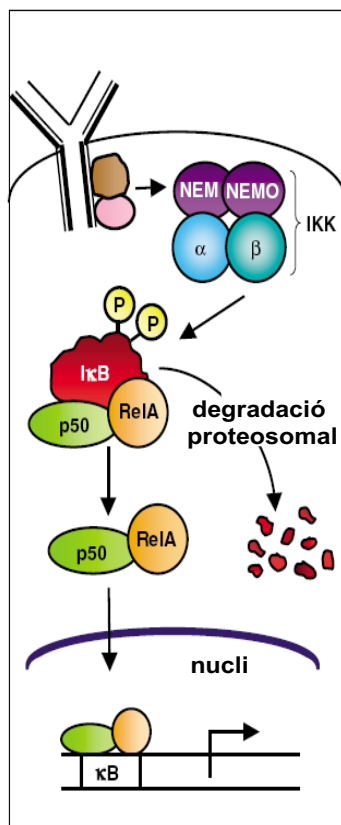
### 1.3.3 HIF-1 $\alpha$ en els neutròfils

La inhibició de l'apoptosi dels neutròfils en condicions hipòxiques pot ser reproduïda per la inhibició competitiva d'enzims d'hidroxisilasa amb una marcada estabilització d'HIF-1 $\alpha$ . El rol directe d'HIF-1 $\alpha$  en la inhibició hipòxica de l'apoptosi dels neutròfils va ser demostrat mitjançant experiments amb neutròfils murins deficients per HIF-1 $\alpha$ , els quals mostraren una reduïda supervivència després de procediments anòxics.<sup>79</sup>

De totes maneres, el mecanisme a través del qual HIF regula l'apoptosi dels neutròfils continua sense ésser establert, tot i que la inhibició de la supervivència hipòxica mitjançant gliotoxina i partenolide implica que el factor NF- $\kappa$ B és un important efector de la resposta depenent d'HIF-1 $\alpha$ . L'estabilització d'HIF-1 $\alpha$  comporta un increment del transcrit p65, la reexpressió de NF- $\kappa$ B i la persistència en la unió al DNA de p65 i p50.<sup>79</sup>

### 1.3.4 Factor de transcripció NF $\kappa$ B

La família NF $\kappa$ B es compon, en els mamífers, de cinc factors de transcripció: p50, p52, RelA (també anomenat p65), c-Rel i RelB. Aquests factors de transcripció contenen un domini Rel a través del qual poden formar homodímers i heterodímers que es poden unir a moltes seqüències diana del DNA (anomenades seqüències  $\kappa$ B) i modular l'expressió de gens. En moltes cèl·lules els complexos de NF $\kappa$ B es troben inactius en el citoplasma, formant un complex amb qualsevol de les proteïnes inhibidores de la família I $\kappa$ B. Quan la via s'activa, la proteïna I $\kappa$ B es degrada i el complex NF $\kappa$ B entra al nucli i modula l'expressió dels gens diana (Figura 10).<sup>81,82</sup>



**Figura 10.** Via de senyalització NF $\kappa$ B. Dímers de NF $\kappa$ B (normalment p50/RelA) es troben en el citoplasma interactuant amb una molècula I $\kappa$ B (normalment I $\kappa$ B $\alpha$ ). La unió d'un lligand al receptor provoca el reclutament del complex IKK, que fosforila I $\kappa$ B en dos residus de serina, el que provoca la seva ubiquitinització i posterior degradació pel proteosoma. NF $\kappa$ B entra aleshores al nucli per a activar els gens diana.



Un dels primers gens induïts una vegada activada la via NFκB és la proteïna inhibidora IκBα, ja que s'ha observat que el promotor d'aquesta proteïna conté una regió d'unió a NFκB. Aquesta IκBα sintetitzada *de novo* pot entrar en el nucli i treure NFκB dels promotors gènics, transportant-lo cap al citoplasma, el que representaria un important mecanisme regulador de la via.<sup>83</sup> Així doncs, aquesta via es troba regulada mitjançant la degradació de IκBα en el citoplasma i la posterior translocació de NFκB al nucli, així com per l'entrada de nova IκBα al nucli cel·lular.<sup>84</sup> En els neutròfils s'ha demostrat que NFκB és important per la seva supervivència, inhibint tant l'apoptosi constitutiva d'aquestes cèl·lules com la induïda per mediadors pro-inflamatoris.<sup>80</sup> A la vegada, NFκB és també un factor clau en la producció d'enzims que generen prostaglandines i espècies reactives de l'oxigen (tant iNOS com Cox són gens diana de NFκB). Les metal·loproteases de matriu (MMPs) són també mediadors crucials de la inflamació local i de la quimiotaxis dels leucòcits, i la seva expressió està també regulada per NFκB.<sup>81</sup> NFκB controla l'expressió de diversos gens de supervivència, entre d'altres els membres de la família Bcl-2, i s'ha observat que la seva inhibició és un potent inductor d'apoptosi en els neutròfils.<sup>85</sup> En situacions anòxiques, l'estabilització del factor de transcripció HIF-1α comporta un augment en l'expressió de la subunitat p65, demostrant que NFκB és una via efectora de la resposta dependent d'HIF-1α en front de la hipòxia.<sup>79</sup> Així doncs, el factor de transcripció NFκB, que en els neutròfils s'indueix en situacions anòxiques, és un factor crucial en la resposta inflamatòria de l'organisme, modulant entre d'altres, l'apoptosi i l'expressió de gens proinflamatoris dels neutròfils reclutats en la zona d'inflamació.

## 1.4 APOPTOSI DELS NEUTRÒFILS

### 1.4.1 Generalitats. Apoptosi vs. necrosi

La paraula apoptosi va ser proposada per Kerr, Wyllie i Currie l'any 1972 per a definir un tipus de mort cel·lular morfològica, bioquímica i molecularment diferent a la necrosi, que realitza una funció reguladora fonamental en el control del manteniment de les poblacions cel·lulars, essent complementària, però oposada, a la proliferació cel·lular.<sup>86</sup> L'apoptosi o mort cel·lular programada succeeix quan una cèl·lula d'un organisme mor mitjançant un mecanisme orquestrat per proteïnes codificades pel propi genoma de l'hoste. El propòsit d'aquest procés és matar cèl·lules que ja no es volen o que és preferible que no visquin, i aquest fet es pot donar per tres situacions: pel desenvolupament i homeòstasi, com a mecanisme de defensa o per envelliment.<sup>87</sup> Per altra banda la necrosi es defineix com una mort cel·lular accidental o com un "assassinat" cel·lular, que pot succeir degut, entre d'altres, a toxines, a la pèrdua de nutrients vitals, a un dany físic o a temperatures extremes. La necrosi primària ve provocada per estímuls tòxics i sol afectar a tot un conjunt de cèl·lules. La característica principal d'aquest tipus de mort és que les cèl·lules que moren es desintegren i alliberen el seu contingut cel·lular al medi, produïnt sempre una resposta inflamatòria. Hi ha un segon tipus de necrosi, anomenada necrosi secundària, que succeeix quan una cèl·lula es desintegra després d'haver patit inicialment apoptosi però no ha

pogut ésser fagocitada pels macròfags. Aquesta necrosi secundària es donaria quan el nombre de cèl·lules mortes supera la capacitat dels mecanismes fagocítics.<sup>48</sup>

#### 1.4.2 Característiques de la necrosi

La necrosi primària és un mecanisme passiu caracteritzat per un inflament de la cèl·lula que condueix a que aquesta s'acabi desintegrant i alliberant els orgànuls i el contingut cel·lular a l'exterior. La necrosi és un procés tòxic i un estímul proinflamatori en la majoria de teixits.<sup>48</sup> L'alliberació dels constituents cel·lulars al teixit del voltant provoca una inflamació que s'associa amb la infiltració de neutròfils i monòcits. S'ha descrit que les cèl·lules necròtiques provoquen l'alliberació de IL-1 $\alpha$  per part dels macròfags o d'altres cèl·lules sensibles, i que aquesta citocina s'uneix al seu receptor en una cèl·lula *responding* la qual allibera quimioatracients que dirigeixen els neutròfils cap a les cèl·lules necròtiques. Aquestes cèl·lules anomenades *responding* no són derivades de la medul·la òssia, de manera que són cèl·lules no immunitàries del teixit danyat.<sup>88,89</sup>

#### 1.4.3 Característiques de l'apoptosi

L'apoptosi d'una cèl·lula es defineix tècnicament per les característiques morfològiques de la cèl·lula que mor, en particular, la condensació de la cromatina acompanyada per la fragmentació nuclear.

La membrana plasmàtica de la cèl·lula apoptòtica s'altera i es formen unes protuberàncies característiques anomenades comunament *blebs*.<sup>90</sup> El volum cel·lular es redueix considerablement i el citoplasma es condensa, mentre que la mitocondria sofreix una sèrie de disfuncions:

- desacoblament de la cadena de transport d'electrons i detenció del metabolisme energètic;
- producció de ROS;
- alliberació de citocrom c al citosol cel·lular;
- fallida en el manteniment del potencial de membrana;
- formació de porus en la membrana mitocondrial a causa de l'actuació de les proteïnes de la família Bcl-2.<sup>91</sup>

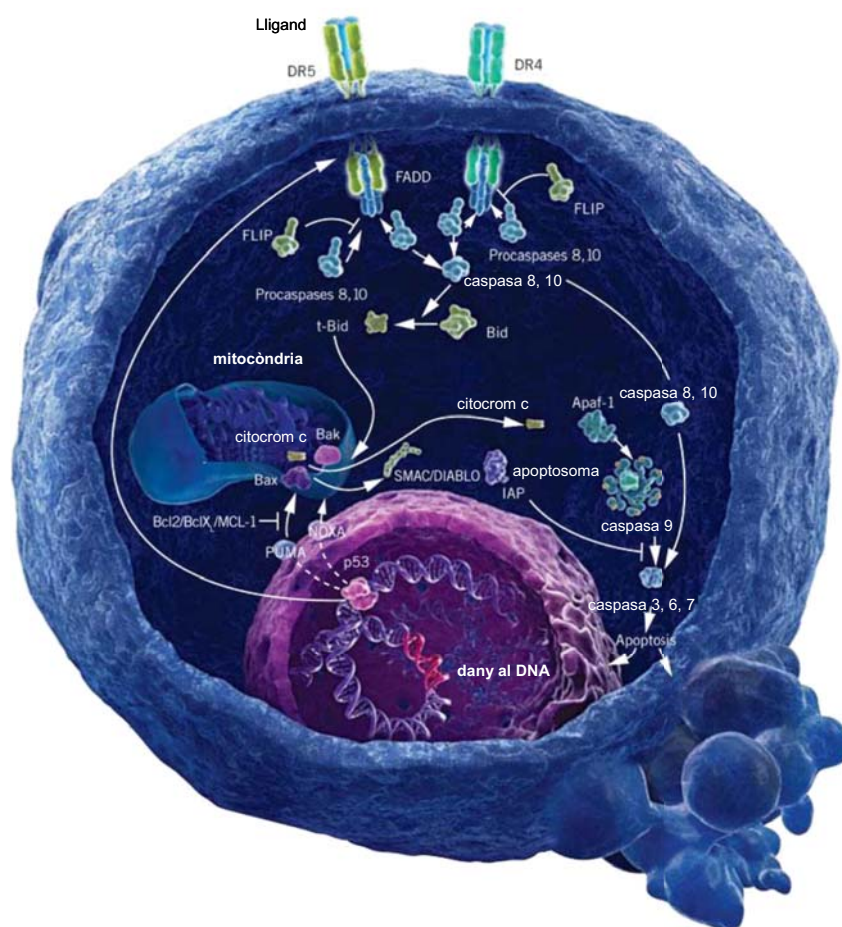
El nucli es redueix, la cromatina es fa més densa i es col·lapsa, i el DNA es fragmenta en subunitats regulars que resulten del tall a l'atzar entre els nucleosomes. Finalment la cèl·lula es trenca en petits cossos apoptòtics, envoltats de membrana. La cèl·lula apoptòtica, així com qualsevol cos apoptòtic, és en general ràpidament fagocitada pels macròfags, evitant qualsevol resposta inflamatòria.<sup>90</sup> Aquest fet en concret constitueix una gran diferència amb els processos necròtics cara a la resposta dels teixits i les cèl·lules adjacents.

#### 1.4.4 Mecanismes moleculars de l'apoptosi. Via intrínseca i via extrínseca.

L'apoptosi cel·lular pot succeir a través de dues vies, la via intrínseca i la via extrínseca. La via intrínseca es dona en resposta a un ampli ventall d'estímuls generats dins la pròpia cèl·lula, com

pot ser l'activació d'oncogens o un dany en el DNA. Per altra banda, la via extrínseca s'inicia per la unió d'un lligand extracel·lular (*death ligand*, DL) al seu receptor de la membrana cel·lular (*death receptor*, DR).<sup>92</sup> Les dues vies convergeixen en l'activació de la caspasa 3, tot i que la via extrínseca es pot creuar també amb la via intrínseca a través del trencament de Bid mitjançant la caspasa 8.<sup>91,92</sup>

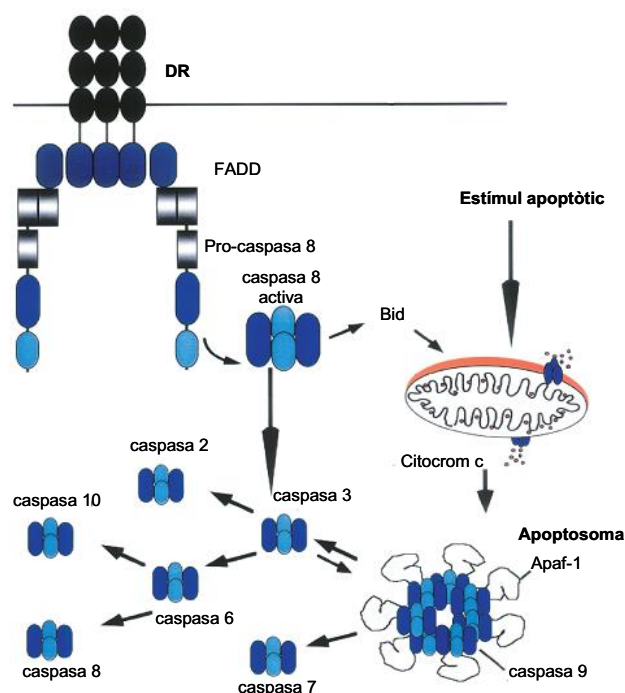
En la via intrínseca la mitocòndria juga un paper principal, alliberant certes proteïnes de l'espai intermembrana al citoplasma en resposta a estímuls apoptòtics (pèrdua de proteïnes anti-apoptòtiques de la família Bcl-2, ROS, deteriorament de DNA...) que provoquen la despolarització de la membrana mitocondrial. Membres pro i anti-apoptòtics de la família Bcl-2 controlen la permeabilitat de la membrana exterior de la mitocòndria i regulen l'alliberació del citocrom c i dels altres constituents de l'espai intermembrana. Els membres anti-apoptòtics de la família, com ara Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> inhibeixen l'alliberació de factors mitocondrials, mentre que els membres pro-apoptòtics, com ara Bax, Bak, Bid, Bad i Bim la promouen.<sup>93</sup> Algunes de les proteïnes alliberades estan molt ben caracteritzades, incloent-hi el citocrom c, SMAC (segon activador de caspases derivat de la mitocòndria)/DIABLO (inhibidor directe de l'apoptosi (IAP)-proteïna d'unió amb baix pl), AIF (factor inductor d'apoptosi) i l'endonucleasa G (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema general de l'apoptosi on apareixen les molècules més característiques de la via.

El citocrom c alliberat s'uneix i activa la proteïna APAF1 (proteasa apoptòtica activadora del factor 1) en el citoplasma, de manera que s'indueix un canvi conformacional que permet a APAF1 unir-se a ATP/dATP i formar l'apoptosoma, juntament amb la caspasa 9. Aquesta caspasa 9 és aleshores activada i permet propagar l'avís de la mort cel·lular mitjançant l'activació de tota la cascada de caspases (Figura 12).<sup>92</sup>

La via extrínseca s'inicia amb la unió, com hem dit, d'un DL, com ara FasL, al seu DR, com ara Fas, de la membrana cel·lular. La unió d'aquests dos components forma un complex que recluta altres factors citosòlics, com ara FADD (proteïna amb domini de mort associada a Fas) i caspasa 8, formant un complex de senyalització anomenat DISC. La formació de DISC permet l'activació de la caspasa iniciadora caspasa 8, la qual s'uneix i activa la caspasa efectora caspasa 3 (Figura 12). La funció de DISC en l'activació de la caspasa 8 es considera anàloga a que fa l'apoptosoma en l'activació de la caspasa 9. Com ja hem comentat, aquesta via es pot creuar amb la via intrínseca a través del trencament proteolític de Bid mitjançant la caspasa 8. Aquest Bid trencat (tBid) es transloca a la mitocòndria on promou l'alliberament de citocrom c promovent la formació de l'apoptosoma.<sup>92,93</sup>



**Figura 12.** Esquema de les vies d'activació de la caspasa durant l'apoptosi. La via extrínseca succeeix mitjançant l'unió d'un lligand a DR, mentre que la intrínseca comporta l'alliberació de citocrom c de la mitocòndria al citoplasma. Les dues vies es poden creuar amb el trencament de Bid per la caspasa 8.

#### 1.4.5 Mecanisme apoptòtic dels neutròfils

En una inflamació aguda el nombre de neutròfils infiltrats és molt elevat i, per tant, el potencial inflamatori per causar dany en el teixit mitjançant l'alliberació de ROS i enzims dels grànuls, com

ara proteases, és molt alt. Una correcta regulació del mecanisme apoptòtic dels neutròfils, que en absència d'estímuls moren espontàniament, és de vital importància per assegurar el manteniment del número de neutròfils en circulació, l'eliminació eficient dels patògens invasors i la resolució de la resposta inflamatòria.<sup>94</sup>

Els neutròfils perden les seves propietats funcionals durant l'apoptosi i presenten les característiques morfològiques i bioquímiques d'una cèl·lula apoptòtica, com ara la compactació de la cromatina o la fragmentació nuclear. També presenten alteracions moleculars en la superfície cel·lular, com per exemple una disminució en l'expressió de membres de la superfamília de la immunoglobulina (com ara CD31, CD50, CD66abcde, CD63 i CD87) i de receptors de membrana (entre ells CD15, CD16, CD32 i CD35). La fosfatidilserina, que és un marcador de cèl·lules apoptòtiques, també apareix en la superfície cel·lular, ja que la simetria dels fosfolípids de membrana està alterada. Aquesta externalització de la fosfatidilserina facilita el reconeixement dels neutròfils apoptòtics per part dels macròfags.<sup>47</sup>

Els neutròfils són unes cèl·lules programades per morir a curt termini, en condicions normals la mort constitutiva dels neutròfils (o mort espontània) està associada tant a una sobre-regulació de les vies que condueixen a la mort com també a una sub-regulació de les senyals de supervivència. Per exemple, s'ha descrit que el factor de supervivència i anti-apoptòtic proteïnasa B(PKB)/AKT decreix durant la mort d'aquestes cèl·lules.<sup>60</sup> Com succeeix en molts altres tipus cel·lulars, l'execució de la via apoptòtica en els neutròfils és promoguda per les caspases. Els neutròfils expressen diverses caspases, tant efectores com reguladores, incloses la caspasa 1, 3, 4 i 8.<sup>47</sup> Aquesta dada, juntament amb el fet que els neutròfils humans no expressen les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 ni Bcl-X<sub>L</sub> però sí expressen constitutivament les proteïnes pro-apoptòtiques Bax, Bid, Bak i Bad, ha suggerit que la mitocondria juga un paper molt important en la seva apoptosi constitutiva. Aquestes proteïnes formen part de la família Bcl-2, que juga un paper crucial en el control de l'apoptosi en molts tipus cel·lulars. Aquesta família de proteïnes, l'acció de les quals succeeix majoritàriament a nivell mitocondrial, pot ser dividida en dos grups, les proteïnes pro-apoptòtiques i les proteïnes anti-apoptòtiques (Taula 6).<sup>95</sup>

Proteïnes pro-apoptòtiques	Proteïnes anti-apoptòtiques
Bax	Bcl-2
Bad	Bcl-X <sub>L</sub>
Bid	Mcl-1
Bik	A1/Bfl1
Bak	

Taula 6. Membres de la família Bcl-2

Els alts nivells de les proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl-2 podrien contribuir de forma important a la curta vida que tenen els neutròfils en la circulació, tot i que encara hi ha molta controvèrsia al respecte.<sup>47,94-96</sup>

L'apoptosi dels neutròfils està associada amb la translocació de Bax citosòlic cap a la membrana externa mitocondrial, així com amb la subseqüent alliberació de citocrom c i l'activació de la cascada de caspases.<sup>96</sup> Els nivells de caspasa 9 són tan elevats tot i la petita quantitat de citocrom c que s'ha suggerit que aquest baix contingut podria ser compensat per l'elevada expressió d'Apaf-1.<sup>60</sup>

Un altre mediador apoptòtic en els neutròfils són els radicals lliures de l'oxigen, que es produeixen en grans quantitats en els neutròfils activats a través, sobretot, de la NADPH oxidasa. Els ROS produeixen una alteració del DNA i una activació de p53, que comunament induïx apoptosi després d'un dany genotòxic. Alternativament, els ROS poden alterar directament l'activitat de vies de senyalització intracel·lulars relacionades amb la supervivència/mort dels neutròfils, com ara NF-κB i MAPK.<sup>60</sup>

També s'ha suggerit a les calpaïnes un rol apoptòtic en els neutròfils.<sup>97</sup> Les calpaïnes són una família de cisteïna-proteases (no caspases) constitutivament actives en els neutròfils aïllats. Durant la mort cel·lular espontània els nivells de calpastatina, un inhibidor intrínsec específic de les calpaïnes, decreix, comportant un augment dràstic de l'activitat de les calpaïnes. Les calpaïnes actives s'uneixen al factor pro-apoptòtic Bax conduïnt a una alliberació de citocrom c de la mitocòndria i la subseqüent activació de la caspasa 3. És important destacar que la inhibició de l'activitat de les calpaïnes per sí sola no és suficient per inhibir la mort constitutiva dels neutròfils. Una important inhibició només es detecta quan tant les calpaïnes com la funció del proteosoma són bloquejades, suggerint un efecte sinèrgic entre aquests dos factors.<sup>60</sup>

#### 1.4.6 Modulació de l'apoptosi dels neutròfils

Diverses malalties inflamatòries, agudes i cròniques, s'han associat a una disminució de l'apoptosi dels neutròfils i a un augment del nombre d'aquests, com ara l'artritis reumatoide o la malaltia inflamatòria intestinal,<sup>98</sup> i cada vegada hi ha més evidències que agents que modulen farmacològicament l'apoptosi, augmentant-la, administrats *in vivo* incrementen la resolució de la inflamació. Per altra banda, també s'ha demostrat el contrari, agents inhibidors de l'apoptosi dels neutròfils administrats *in vivo* retarden la resolució de la inflamació.<sup>99</sup> Així doncs, la modulació de les vies associades a l'apoptosi poden oferir noves dianes terapèutiques per al tractament de diverses malalties inflamatòries.<sup>62,99</sup>

Una de les possibles dianes terapèutiques proposades ha estat la via NF-κB. S'ha demostrat que la seva inhibició augmenta l'apoptosi dels neutròfils d'una manera depenent de caspases, però, com que el paper que juga aquesta via en la inflamació és molt complex, la possibilitat d'inhibir NF-κB per a modular l'apoptosi i millorar la inflamació s'ha de considerar amb cautela.<sup>99</sup>

S'ha demostrat també que la inhibició de l'apoptosi dels neutròfils infiltrats en pulmons danyats pot ser revertida mitjançant la inhalació d'*Escherichia coli* morta i opsonitzada, millorant el dany.<sup>100</sup> En model de rata de dany pulmonar, els neutròfils infiltrats en els pulmons pateixen un retard en la seva apoptosi, promovent el dany tissular. Una vegada els neutròfils reconeixen la *E.coli*, la fagociten i entren en apoptosi promoguda per ROS. Sookhai i col·laboradors demostren que l'augment de l'apoptosi dels neutròfils es correlaciona amb un augment de la millora del dany pulmonar i de la supervivència general del grup tractat. Així doncs, la directa modulació de l'apoptosi dels neutròfils pulmonars pot ser un nou mecanisme per a tractar pacients que presenten una síndrome respiratòria aguda (ARDS).<sup>100,101</sup>

L'apoptosi dels neutròfils pot, per tant, ésser modulada farmacològicament de manera específica, i pot ser clau en el desenvolupament de noves drogues terapèutiques per al tractament de diverses malalties inflamatòries, entre elles les associades a la fallida intestinal. Les primeres aproximacions en aquest sentit es van centrar en la reducció o depleció del nombre de neutròfils o neutropènia, cara a la millora de la malaltia, com va ser el cas de models d'artritis inflamatòria o en models de glomerulonefritis per anticòs.<sup>44</sup>

## 1.5 Lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils (NGAL/24p3)

### 1.5.1 Generalitats

NGAL (lipocalina associada a la gelatinasa dels neutròfils) és una proteïna de la família de les lipocalines de 25 kDa identificada per primera vegada en els grànuls de neutròfils humans associada amb la gelatinasa/MMP9, formant un complex covalent d'una massa molecular de 135kDa.<sup>102</sup> Les lipocalines són una família de diverses proteïnes amb una limitada similitud en les seqüències d'aminoàcids, però amb una estructura terciària comú, amb un tub  $\beta$  de vuit cadenes anti-paral·leles revoltant la zona interior d'unió a un lligand, revestida de residus d'aminoàcids hidrofòbics (Figura 13).<sup>103</sup>



Figura 13. Proteïna NGAL.

Les lipocalines actuen normalment com a molècules transportadores amb una gran afinitat per unir-se a diferents substàncies lipofíliques, entre elles, àcids grassos, retinols, colesterol, prostaglandines, biliverdines i feromones.<sup>104</sup> Anàlisis cristal·logràfics han demostrat però que el lligand del NGAL són sideròfors fèrrics bacterians, utilitzats pels bacteris per agafar el ferro, que és el seu nutrient essencial.<sup>105</sup>

La proteïna NGAL també s'anomena lipocalina humana neutrofílica, mentre que el seu homòleg murí, amb qui comparteix un 62% de la seva seqüència, s'anomena *24p3*, *Sip24*, lipocalina 2 o uterocalina. Per la seva banda, l'homòleg en rata s'anomena NRL i té en comú un 63.5% de la seva seqüència amb el NGAL.<sup>105</sup>

### 1.5.2 Distribució del NGAL/*24p3*

Com ja s'ha comentat, el NGAL es va aïllar per primera vegada en neutròfils humans, en forma de monòmer i d'homodímer, així com unit a un complex de gelatinasa. Experiments de fraccionament subcel·lular en gradients de densitat han demostrat que és un component específic dels grànuls dels neutròfils. Els grànuls peroxidasa negatius dels neutròfils es distribueixen des dels rics en NGAL però amb poc contingut de gelatinasa fins als grànuls rics en gelatinasa però carents de NGAL, passant per aquells grànuls que presenten tant NGAL com gelatinasa.<sup>103</sup> Per la seva banda, l'homòleg murí *24p3* també s'ha trobat en els neutròfils circulants de ratolí.<sup>106</sup>

De totes maneres hi ha d'altres tipus cel·lulars que expressen també aquesta gelatinasa, com per exemple els adipòcits,<sup>107</sup> els condrocits, la microglia,<sup>108</sup> les cèl·lules epitelials i endotel·lials<sup>109</sup> o els macròfags.<sup>110</sup> Estudis de distribució per teixits han mostrat també expressió de NGAL en diversos teixits, entre els que cal destacar la tràquea, els pulmons, l'estomac, les glàndules salivals, l'úter, l'apèndix, els túbuls renals, les glàndules mamàries i l'intestí.<sup>111</sup>

Hi ha diversos estudis que mostren que l'expressió de *24p3* s'indueix en diverses cèl·lules en situacions de dany amb presència de radicals d'oxigen, com ara en un càncer, una intoxicació, una infecció o en una inflamació.<sup>112</sup> Després d'un dany per isquèmia/reperfusió en el ronyó, el transcrit *24p3* és un dels més clarament induïts, i representa un marcador urinari de dany renal isquèmic.<sup>113</sup> En el fetge *24p3* s'expressa durant una fase aguda i es troba sobre-regulat localment en la mucosa epitelial del colon en situacions d'apendicitis i en la malaltia inflamatòria intestinal. A més, la seva expressió es troba incrementada localment en adenocarcinomes de colon i en les cèl·lules epitelials en contacte amb el tumor.<sup>109</sup> Estudis d'exposició a raigs X han demostrat també que en el fetge *24p3* està sobre-regulat degut a l'augment de ROS produïts per la radiació, el que suggeriria que aquesta proteïna actuaria com un protector per a les cèl·lules en front els ROS.<sup>112</sup>

Així doncs, s'ha demostrat que *24p3* s'expressa en diversos teixits, tant normals com patològics, i en molts teixits normalment exposats a microorganismes.<sup>114</sup>



### 1.5.3 Funcions del NGAL/24p3

Les lipocalines es consideren generalment molècules transportadores amb diverses funcions, incloent-hi la regulació de les respostes immunitàries, la modulació del creixement cel·lular i el metabolisme, el transport de ferro i la síntesi de prostaglandines.<sup>104</sup> Fins ara el NGAL s'ha considerat com una proteïna de fase aguda, l'expressió de la qual es troba sobre-regulada, típicament en cèl·lules epitelials, en diverses situacions inflamatòries. Però més enllà d'això, les seves funcions segueixen sense ésser clarament definides.<sup>115</sup> D'una manera generalista, el NGAL es troba implicat en la immunitat innata, la regulació del creixement cel·lular, la diferenciació de certs tipus cel·lulars i en l'apoptosi.

El NGAL sembla ser un component important de la immunitat innata en front d'una infecció bacteriana. Les bactèries produeixen sideròfors per segrestar ferro de l'espai extracel·lular i utilitzen transportadors específics per recuperar el complex "sideròfor-ferro", assegurant-se el subministrament de ferro. El NGAL s'uneix a sideròfors fèrrics carregats negativament actuant com un agent bacteriostàtic prevenint el creixement de les soques bacterianes, segrestant el ferro. Aquest efecte anti-bacterià és absolutament específic per les bactèries que adquireixen el ferro a través dels sideròfors capaços d'unir-s'hi el NGAL, per exemple l'enteroquelina i la micobactina.<sup>105,116,117</sup> De totes maneres, el NGAL sembla tenir unes funcions molt més complexes a part del seu efecte anti-microbià. Hi ha evidències de que modula diverses respostes cel·lulars tan importants com la proliferació, l'apoptosi i la diferenciació, tot i que el mecanisme encara no es coneix completament. Alguns d'aquests efectes però, augmenten quan el NGAL és associat amb sideròfors, i podria ser que en absència d'una infecció bacteriana fossin molècules endògenes les que s'unissin al NGAL per promoure les seves propietats d'unió al ferro.<sup>116</sup>

Una altra funció del NGAL en certs tipus cel·lulars és regular el seu creixement. L'expressió de NGAL en fibroblasts estimulats amb diversos factors de creixement, entre ells sèrum i èsters de forbol, o, la inducció de la seva síntesi en cèl·lules renals durant la transició de l'estat quiescent a l'estat proliferatiu mostraria el rol d'aquesta proteïna en el creixement cel·lular. L'expressió de NGAL en el colon inflammat on suposadament hi ha un recanvi cel·lular molt ràpid o en diversos tumors malignes també suporten aquesta hipòtesi.<sup>103,112</sup> Els factors de creixement IGF i TGF- $\alpha$  indueixen marcadament també l'expressió de NGAL en queratinòcits primaris humans, donant suport a la hipòtesi d'una activitat proliferativa per a aquesta proteïna.<sup>118</sup>

La participació del NGAL en la diferenciació de certs tipus cel·lulars ve reconeguda per diversos estudis que han mostrat que la seva expressió està relacionada amb una desregulació de la diferenciació dels queratinòcits. A més s'ha demostrat *in vitro* que la seva expressió està molt augmentada en la diferenciació de queratinòcits induïda per calci, el que podria suggerir-li un rol en el manteniment de l'homeòstasi de la pell.<sup>119</sup> Per altra banda, el NGAL apareix com un factor clau en la diferenciació de progenitors renals, promovent la diferenciació epitelial a la perifèria del ronyó en desenvolupament on es troben les cèl·lules de l'estroma i les progenitores de l'epiteli.<sup>116</sup> A més, en cèl·lules epitelials tubulars cultivades el NGAL promou l'organització de

les cèl·lules epitelials en estructures tubulars, després d'ésser estimulades amb factor de creixement d'hepatòcits (HGF), un factor que es troba molt sobre-expressat durant el desenvolupament renal.<sup>120</sup>

En un ronyó madur post-isquèmic, el NGAL està sobre-regulat predominantment en els túbuls proximals tot i que també en segments distals de les nefrones. En el túbul proximal es troba co-localitzat, al menys en part, amb les cèl·lules epitelials proliferatives. Aquest fet podria suggerir que els túbuls danyats expressen NGAL per tal d'induir la re-epitelització, ja que a més es sap que l'aportació de ferro a les cèl·lules és crucial per a la regeneració renal després d'un dany nefrotòxic. El NGAL podria ser endocitat pel túbul proximal, reciclant el ferro a les cèl·lules viables, i estimulando la regeneració de l'epiteli renal després d'un dany isquèmic. Estudis han demostrat que l'administració exògena de NGAL provoca una millora del dany estructural provocat per una IR renal.<sup>121</sup>

En d'altres tipus cel·lulars el NGAL té un efecte proapoptòtic. Per exemple, en la línia cel·lular de ratolí pro-B limfocítica, la retirada de citocines resulta en una marcada inducció de NGAL així com un augment de l'apoptosi.<sup>122</sup> Cèl·lules epitelials de glàndules mamàries i de l'úter expressen també alts nivells de NGAL coincidint temporalment amb els períodes de màxima apoptosi.<sup>123</sup> A l'úter, el NGAL s'expressa a nivells molt elevats en els períodes propers al part, quant aquest òrgan pateix una renovació tissular molt extensa degut a l'embaràs i molt estrés i dany del teixit durant el propi part.<sup>124</sup> S'ha descrit també que l'expressió de NGAL és regulada en les glàndules mamàries a través de la gestació i la lactància, i que es troben nivells molt elevats d'aquesta proteïna durant la catagènesi i després del part en les glàndules mamàries i en l'úter.<sup>123</sup> Els alts nivells de NGAL durant la fase de catagènesi han suggerit que aquesta proteïna podria prevenir l'acumulació de leucòcits durant aquest període induïnt l'apoptosi dels neutròfils que entren al teixit.<sup>123,125</sup>

#### 1.5.4 *24p3* i l'apoptosi en els neutròfils

L'apoptosi de les cèl·lules hematopoietiques pot ser induïda mitjançant la retirada de citocines, com ara IL-3. Devireddy i col·laboradors van fer un estudi mitjançant *microarrays* de DNA per buscar gens promotors de mort cel·lular que són transcripcionalment activats en cèl·lules hematopoietiques FL5.12 pro-B limfocítiques privades de IL-3. Aquesta línia cel·lular de ratolí és dependent de la citocina IL-3 per a créixer, de manera que passades 6 hores, en absència d'aquesta citocina les cèl·lules comencen a morir per apoptosi. El resultat del seu estudi mostrà que el major increment en l'expressió gènica entre aquestes cèl·lules amb presència o absència de IL-3 el presentava *24p3*.<sup>122</sup>

A més, l'estudi demostrava que *24p3* promou l'apoptosi de moltes, tot i que no totes, les línies cel·lulars leucocitàries, destacant els timòcits primaris, els limfòcits primaris i els neutròfils. Per altra banda, certes cèl·lules no hematopoietiques i els macròfags derivats de monòcits són

resistents, demostrant que l'habilitat de *24p3* per induir l'apoptosi és específica del tipus cel·lular (taula 7).<sup>122</sup>

La identificació d'un producte cel·lular alliberat que pot induir l'apoptosi en cèl·lules susceptibles, entre elles els neutròfils, implica que aquest mecanisme pot jugar un paper molt important en l'apoptosi espontània dels granulòcits.<sup>126</sup>

Tipus cel·lular	Susceptibilitat a <i>24p3</i>
<b>Cèl·lules no leucocitàries</b>	
HeLa (humanes)	-
COS-7 (mono)	-
NIH 3T3 (ratolí)	-
U2OS (humanes)	-
<b>Cèl·lules primàries</b>	
Timòcits primaris (murins)	+
Esplenòcits primaris (murins)	+
Cèl·lules primàries de la medul·la òssia (murines)	+
Neutròfils primaris (humans)	+
Limfòcits de sang perifèrica (humans)	+
Macròfags primaris (humans)	-

**Taula 7.** Especificitat cel·lular a l'apoptosi induïda per *24p3* (Devireddy LR. Science (2001). 293:829-834).

La resposta inflamatòria implica una infiltració i activació dels leucòcits, de manera que les cèl·lules tissulars corren el risc de ser destruïdes per la forta resposta neutròfila. *24p3* pot ser un mecanisme per a suprimir l'activitat dels leucòcits mitjançant la seva habilitat per induir-los apoptosi. Moderar el nombre de neutròfils pot ser una de les principals funcions de *24p3* durant la resposta inflamatòria, quan hi ha una ràpida expansió de la població de neutròfils.<sup>123</sup>

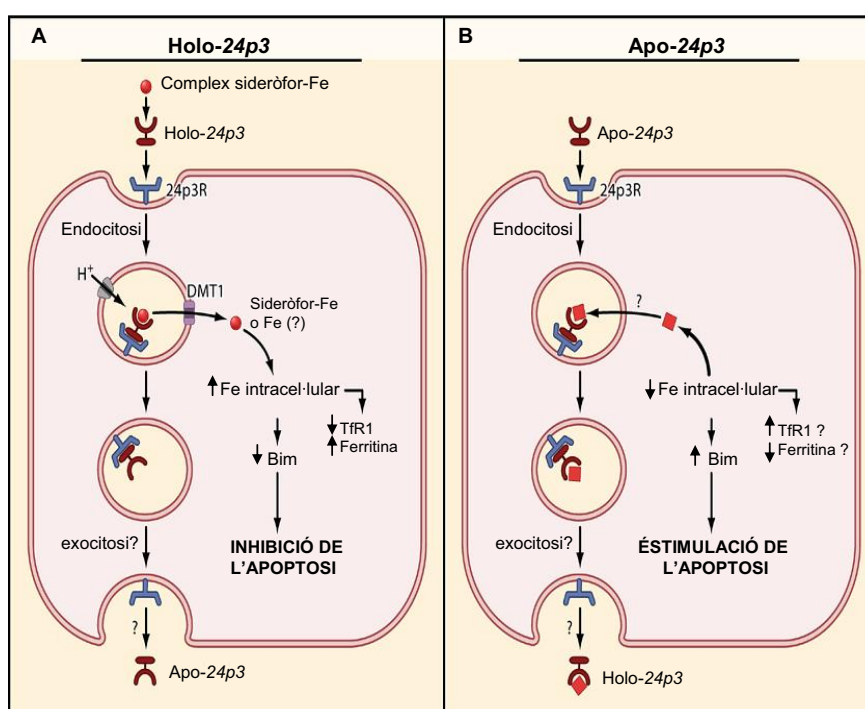
## 1.5.5 Receptors de *24p3*

### 1.5.5.1 *24p3R*

L'especificitat que presenta *24p3* per induir apoptosi depenent del tipus cel·lular només pot ser explicada per la presència d'un receptor amb una gran afinitat per a *24p3* i una distribució cel·lular molt selectiva.<sup>122</sup> Aquest receptor, anomenat *24p3R* va ser descobert i aïllat per Devireddy i col·laboradors (la seqüència de DNA d'aquest receptor coincidia en les bases de dades amb una entrada proposada per a un transportador de cations, NM\_021551), i van veure que l'expressió ectòpica d'aquest receptor conferia a les cèl·lules (en aquest cas, cèl·lules HeLa) la capacitat d'unir i internalitzar *24p3*.<sup>127</sup> S'ha hipotetitzat que la internalització de *24p3* unit a

ferro (forma holo-) impedeix l'apoptosi cel·lular, mentre que la internalització de *24p3* que no conté ferro (forma apo-) indueix apoptosi (Figura 14).<sup>127,128</sup>

D'aquesta manera es proposa que els efectes de *24p3* depenen de si la proteïna en sí conté ferro (unit a un sideròfor) o no. El receptor *24p3R* s'uneix a les dues formes, holo- i apo-*24p3*, i és capaç de la seva internalització per endocitosis. *24p3R* permet a la forma holo- donar ferro a les cèl·lules i prevenir l'apoptosi, mentre que la internalització de apo-*24p3* s'uneix a ferro intracel·lular provinent d'un sideròfor hipotètic, provocant una disminució de ferro que resulta en apoptosi promoguda per Bim. Aquest holo-*24p3* que s'ha generat dins la cèl·lula surt per exocitosis.<sup>127</sup> Els detalls de com succeeix tot aquest procés encara no estan clars i són necessaris més estudis per confirmar aquesta hipòtesi.<sup>128</sup>



**Figura 14.** Model esquemàtic del transport de ferro mitjançant NGAL/*24p3* (Richardson DR. Cell (2005) 123:1175-1177).

L'expressió de *24p3R* pot ser regulada a nivell transcripcional mitjançant la via de senyalització anomenada Wnt, que promou la formació de diferents isoformes del receptor. Aquesta via Wnt també regula l'expressió de *24p3*, de manera independent de ferro. La diferent expressió del gen *24p3* juntament amb la també diferent expressió de les isoformes de *24p3R* pot determinar el rol biològic de *24p3* en cèl·lules que tenen aquesta via Wnt activa.<sup>129</sup>

### 1.5.5.2. Megalina (LRP2)

L'any 2005, Hvidberg i col·laboradors mostraren que la megalina s'uneix a NGAL/*24p3* amb gran afinitat.<sup>130</sup>

La megalina és una glicoproteïna de membrana que pertany a la família de receptors per a lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), anomenada en nomenclatura científica com LRP2 o proteïna gp330. La proteïna té una massa molecular de 519 kDa i consisteix d'una regió extracel·lular de 4398 aminoàcids, una regió transmembrana de 23 aminoàcids i una regió intracel·lular carboxi-terminal de 209 aminoàcids.<sup>131</sup>

S'ha suggerit que la megalina pot participar en cascades de senyalització específiques, possiblement modulant l'activitat de segons missatgers intracel·lulars. Es troba expressada en teixits epitelials, entre ells l'epiteli de l'oïda interna, el neuro-epiteli del tub neural, l'epiteli respiratori o en els glomèruls i els túbuls renals proximals.<sup>131</sup>

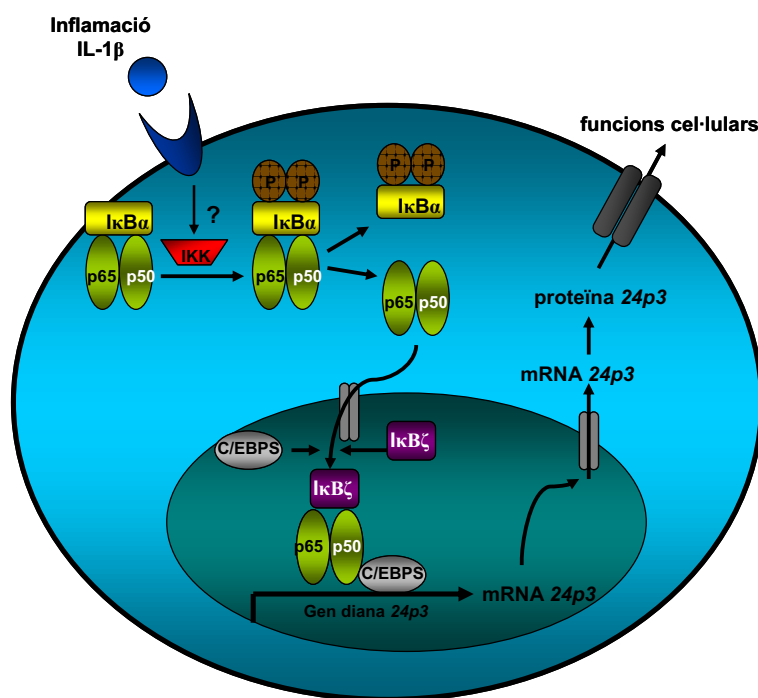
Una particularitat d'aquest sistema és que el mateix receptor s'uneix a gran varietat de lligands que no tenen res a veure ni estructuralment ni funcionalment entre ells. Així doncs, la unió i incorporació de *24p3* no és específica, però podria significar una part important de la internalització de *24p3* en certes cèl·lules, com ara en les cèl·lules epitel·lials tubulars.

#### 1.5.6 Regulació transcripcional de *24p3*

S'ha descrit que *24p3* es troba sobre-regulat en certes condicions inflamatòries, com ara en cèl·lules alveolars i bronquials de pulmons inflamats, d'una manera depenent de la via de senyalització NFκB.<sup>132</sup> De totes maneres, s'havia observat que només IL-1β era capaç d'estimular l'expressió de *24p3*, mentre que TNF-α per sí sola era incapaç d'induir la seva producció. Això va portar a pensar en la presència d'un co-factor induït solament per IL-1β que actuaria conjuntament amb NFκB en l'activació de *24p3*.

Estudis posteriors del promotor van demostrar l'existència d'un co-factor d'unió a NFκB anomenat IκBζ, que controla l'activació transcripcional de *24p3* (Figura 15).<sup>133</sup> Això és particularment important ja que grans quantitats d'estímuls convergeixen en l'activació de la via NFκB, de manera que les cèl·lules han desenvolupat mecanismes addicionals per a respondre apropiadament a estímuls diversos durant els processos inflamatoris.

La inducció de *24p3* mitjançant NFκB s'ha descrit també en estudis de promotors en les cèl·lules de Sertoli, on s'ha vist que *24p3* juga un paper important en el desenvolupament dels testicles.<sup>134</sup>



**Figura 15.** Esquema simplificat de la regulació transcripcional de *24p3* a través de la via NFκB.

Tenint en compte que cada vegada hi ha més observacions que suggereixen un rol crític de NFκB en gran varietat de condicions fisiopatològiques, i que *24p3* juga un paper important en processos inflamatoris, essent regulat per la pròpia via NFκB, aquest sistema pot ser de gran importància per a futures aplicacions farmacològiques i terapèutiques.

Recentment, Ziegler i col·laboradors van identificar *24p3* com un gen diana de la via de senyalització Wnt.<sup>135</sup>

### 1.6 Via WNT

Els *wnts* comprenen una gran família de glucoproteïnes hidrofòbiques secretades responsables d'importants processos en el desenvolupament i l'homeòstasi en tot el regne animal. El nom Wnt denota la relació d'aquesta família amb el gen de polaritat dels segments de la *Drosophila melanogaster* *Wg* (Wingless) i el seu ortòleg en vertebrats *Int1*, un protooncogen de ratolí. S'han aïllat al voltant de 100 gens Wnt de diverses espècies, i en humans s'han identificat 19 proteïnes Wnt que comparteixen entre el 27% i el 83% de la seqüència d'aminoàcids i un patró conservat de 23 o 24 residus de cisteïna. Cal destacar que els membres de la família Wnt es defineixen per la seva seqüència aminoacídica, i no per les seves propietats funcionals.<sup>136,137</sup>

Aquesta família de proteïnes està íntimament relacionada amb vies de senyalització cel·lular que juguen un rol en diversos processos que impliquen proliferació, diferenciació, patrons cel·lulars durant l'embriogènesi, orientació, adhesió, supervivència i apoptosi.<sup>137</sup> Noves observacions impliquen la via Wnt en la renovació de les cèl·lules mare hematopoietiques, la maduració de

cèl·lules dendrítiques, l'activació i migració de les cèl·lules T perifèriques i el desenvolupament de leucèmies; de manera que l'interès per aquesta via ha augmentat recentment de manera considerable per part d'immunòlegs i hematòlegs.<sup>138</sup>

Les proteïnes wnt s'uneixen a receptors transmembrana de la família *frizzled*, concretament es poden unir a set d'aquests receptors (en el genoma humà hi ha 11 membres) els quals poden interactuar amb els co-receptors LRP5 i LRP6 (lipoprotein receptor-related protein-5 i 6) formant un complex ternari. Intracel·lularment, les senyals de Wnt es transmeten a través d'almenys tres vies diferents, la via WNT canònica i les vies no canòniques WNT/Ca<sup>2+</sup> i WNT/PCP (planar cell polarity).<sup>136-138</sup> Els receptors trans-membrana *frizzled* estan implicats en les tres vies diferents, i contenen una zona intracel·lular d'unió a la família de proteïnes *Dishevelled* (DVL1, DVL2, DVL3). En aquest nivell de la via, les senyals de Wnt es poden separar cap a qualsevol de les tres cascades de senyalització diferents, que són dependents dels tres dominis altament conservats de DVL. Com a resultat, DVL és un transductor clau de la senyal de WNT que actua tant a la membrana plasmàtica com al citoplasma en les tres Wnt-frizzled vies de senyalització.<sup>137</sup> Les cascades de senyalització resulten finalment en canvis en la transcripció de gens, essent un dels gens regulats el *24p3*.<sup>129,135</sup>

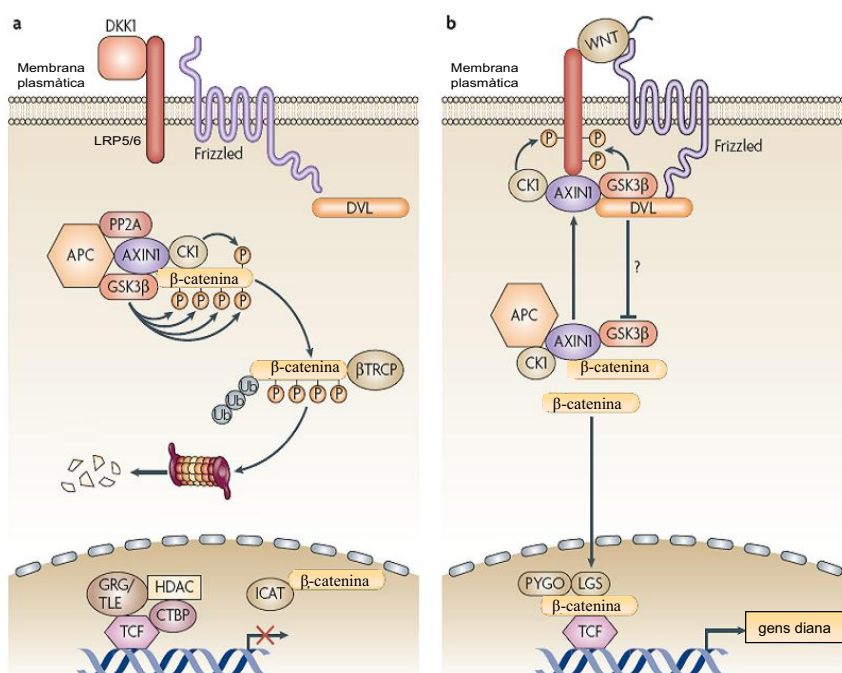
L'estudi que enmarca a *24p3* es va basar en anàlisis de microarrays de DNA on es van determinar diferents gens de resposta a Wnt. Anàlisis del promotor de *24p3* mitjançant construccions amb reporters de luciferasa van demostrar que *24p3* es trobava regulat quan s'activava la via Wnt amb liti. Posteriors estudis del mateix grup van mostrar que *24p3* es trobava regulat de manera independent pel contingut intracel·lular de ferro i per l'activació de la via Wnt.<sup>129</sup> Tenint en compte que la via Wnt regula la proliferació cel·lular, la diferenciació, l'oncogènesi o l'apoptosi, la implicació de *24p3* seria congruent degut a les seves diverses funcions descrites, tant com un factor pro-apoptòtic com proliferatiu.

### 1.6.1 Via WNT canònica

La via canònica és la via més estudiada i més ben coneguda, en la qual la beta-catenina ( $\beta$ -catenina) juga el paper principal. La característica definitiva d'aquesta via és l'acumulació citoplasmàtica de  $\beta$ -catenina i la seva posterior translocació al nucli.

En absència d'un lligand de WNT al seu receptor de membrana, els nivells de  $\beta$ -catenina citoplasmàtics es mantenen baixos a través de l'acció del "complex multiprotèic de destrucció". Aquest complex format per la proteïna de sustentació Axina 1, la proteïna APC (adenomatous polyposis coli), la quinasa glicogen-sintasa 3 (GSK-3) i la quinasa caseïna I (CSK1), fosforila la  $\beta$ -catenina permetent el seu reconeixement per part de la proteïna  $\beta$ TRCP, conduint-la a la seva ubiquitinació i posterior trencament per part del proteosoma (Figura 16a). D'aquesta manera hi ha poca  $\beta$ -catenina citoplasmàtica i els gens diana de la via es troben transcripcionalment reprimits.<sup>136,138,139</sup>

La via canònica s'activa quant una proteïna wnt s'uneix al receptor transmembrana *Frizzled* en presència del co-receptor LRP-5/6.<sup>140</sup> Les proteïnes WNT considerades de la via canònica són Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt6, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A i Wnt10B (Figura 16).<sup>141</sup>



**Figura 16.** Esquema de la via Wnt canònica. a- En absència de wnt els nivells de  $\beta$ -catenina en el citoplasma i en el nucli són baixos degut a la seva fosforilació i posterior degradació pel proteosoma. b- Quan s'uneix una proteïna wnt al complex receptor, s'activa la cascada de senyalització i la  $\beta$ -catenina és translocada al nucli formant un factor de transcripció amb TCF.

Quan un d'aquests lligands wnt s'uneix a *frizzled* es forma el complex *Frizzled-LRP5/LRP6* juntament amb la proteïna *Dishevelled* (*DVL*), promovent-se la fosforilació de *LRP-5/6* a través de les quinases *CK1* i *GSK3 $\beta$*  (les mateixes quinases que fosforilen la  $\beta$ -catenina en el "complex multiprotèic de destrucció"). La fosforilació de *LRP-5/6* permet la unió d'*Axina I* als residus fosforilats de *LRP*, de manera que l'*axina I* deixa de formar part del "complex de destrucció".<sup>142</sup> El reclutament de l'*axina I* a la membrana plasmàtica impedeix la fosforilació i degradació de la  $\beta$ -catenina (Figura 16a), de manera que aquesta s'acumula al citoplasma, permetent la seva translocació al nucli (Figura 16b). En el nucli, la formació del complex  $\beta$ -catenina-TCF factor de transcripció culmina en l'activació dels gens diana de WNT.<sup>138,143</sup>

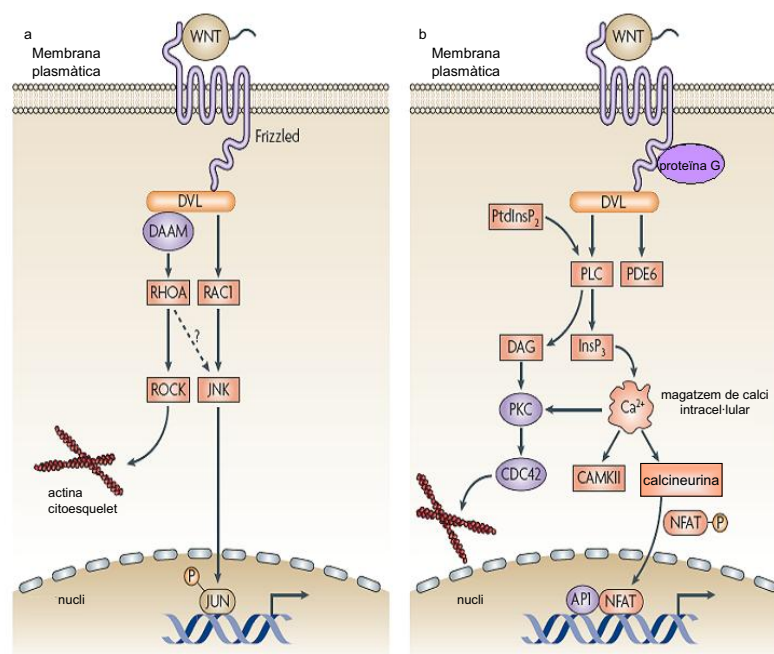
### 1.6.2 Vies WNT no canòniques

L'expressió dels co-receptors *LRP-5/6* i la  $\beta$ -catenina no es requereixen en les vies WNT de senyalització no canòniques. Aquestes vies no canòniques, també anomenades vies de senyalització *Wnt-Frizzled* atípiques, consisteixen en dues cascades de senyalització intracel·lular, la via *Wnt/Ca<sup>2+</sup>* i la via *Wnt/PCP*. Les proteïnes wnt considerades no canòniques són, entre d'altres, *Wnt5A*, *Wnt5B* i *Wnt11*.<sup>141</sup>



La via PCP s'inicia normalment per Wnt5A i Wnt11 a través de *Frizzled* i DVL, el qual s'associa amb DAMM (activador de morfogènesi associat a *Dishevelled*) activant la via RHOA-ROCK, la qual regula la reorganització del citoesquelet.<sup>138,144</sup> A més, DVL també activa la GTPasa RAC1, que juntament amb la petita GTPasa RHOA activen la via de resposta quinasa JUN N-terminal (JNK), que modifica el citoesquelet i regula l'expressió gènica (Figura 17a). La via PCP regula senyals posicionals en diversos organismes i és important en l'adhesió cel·lular i la migració, mitjançant la regulació de canvis en el citoesquelet. A més, DVL pot activar altres vies que regulen l'actina citoesquelètica i la polaritat cel·lular, tot i que en certs tipus cel·lulars, com ara en les cèl·lules del sistema immune encara no s'ha demostrat.<sup>138</sup>

En la via Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , la proteïna wnt s'uneix als receptors trans-membrana *Frizzled* estimulants les proteïnes heterotrimeriques G i activant la fosfolipasa C (PLC). Això condueix a l'escissió del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) en inositol trifosfat ( $\text{InsP}_3$ ) i diacilglicerol (DAG) el qual activa la proteïna quinasa C (PKC) (Figura 17b).  $\text{InsP}_3$  s'uneix al receptor del magatzem de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular conduint a un increment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtics, que normalment es troben baixos. Aquest augment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la fosfatasa calcineurina i diverses quinases dependents de calci, entre elles PKC. L'augment de calcineurina i de PKC comporta una gran varietat d'efectes, com per exemple l'activació de factors nuclears, entre ells NFAT, i d'altres factors de transcripció.<sup>137,138</sup>



**Figura 17.** Esquema de les vies Wnt no canòniques. a- Via PCP, en la que no participa la  $\beta$ -catenina i que condueix a canvis citoesquelètics i en l'adhesió i motilitat cel·lular. b- la via Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  succeeix a través de proteïnes G i condueix a un augment en els nivells citoplasmàtics de calci.

### 1.6.3 Via Wnt i l'apoptosi

Com ja s'ha comentat amb anterioritat, la família de proteïnes WNT està implicada en varies vies de senyalització cel·lulars que participen en diversos processos, entre els quals podem destacar la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi. De totes maneres, com aquesta via regula aquestes funcions encara no està completament descobert, depenent molt del lligand Wnt, les interaccions de les diferents vies Wnt entre elles i amb d'altres vies de senyalització i del tipus cel·lular implicat.

S'ha vist que la sobre-expressió de  $\beta$ -catenina promou l'apoptosi de certes línies cel·lulars mamàries.<sup>145</sup> A més, la inhibició d'aquesta proteïna mitjançant siRNA inhibeix aquesta mort cel·lular, mentre que l'expressió estable de  $\beta$ -catenina provoca apoptosi en cèl·lules epitelials de la superfície dels ovaris humans.<sup>146</sup>

Zhang i col·laboradors han demostrat recentment que Wnt3a indueix apoptosi en cèl·lules H9C2 durant hipòxia/reoxigenació a través també de la via canònica, i que la proteïna Sfrp2 (*secreted frizzled related protein 2*) protegeix aquestes cèl·lules de la mort inhibint l'efecte pro-apoptòtic de Wnt3a. La proteïna Sfrp2 s'uniria a Wnt3a prevenint l'activació de la cascada de senyalització Wnt. En aquest tipus cel·lular la inhibició de  $\beta$ -catenina mitjançant siRNA també resulta en una reducció de l'activitat de les caspases.<sup>147</sup> Per altra banda, s'ha descrit Wnt3a implicat en la proliferació de cèl·lules mare embrionàries, hematopoietiques, neurals i mesenquimals. Així com s'ha descrit un efecte proliferatiu i anti-apoptòtic en cèl·lules HEK2933 sobreexpressant Wnt3a en condicions de falta de sèrum.<sup>148</sup>

Per altra banda, diversos treballs mostren que Wnt1 inhibeix l'apoptosi a través de la  $\beta$ -catenina, i fins i tot que cèl·lules Rat-1 que expressen Wnt1 són resistents a l'apoptosi provocada per la quimioteràpia anti-cancerígena, inhibint l'alliberació de citocrom c i la posterior activació de la caspasa 9. A més, en aquest model es mostra que la inhibició de la  $\beta$ -catenina bloqueja la supervivència cel·lular provocada per Wnt1 i torna les cèl·lules sensibles als estímuls apoptòtics.<sup>149</sup>

Molts gens importants, inclosos c-myc, ciclina D1 i metal·loproteïna, relacionats amb l'oncogènesi, han estat identificats com a gens regulats per l'activació de la transcripció per  $\beta$ -catenina/TCF.<sup>149,150</sup> Mutacions en components de la via Wnt que provoquen una activació constitutiva de la transcripció per  $\beta$ -catenina/TCF han estat associades amb diversos càncers en humans. Per exemple, mutacions somàtiques del gen APC s'associen amb el 80% dels adenomes colorrectals i carcinomes, mentre que mutacions en els llocs de fosforilació per GSK3 $\beta$  en la  $\beta$ -catenina s'han trobat en diversos càncers, com ara el colorrectal, el carcinoma hepatocel·lular i el melanoma.<sup>149</sup>

Generalment es creu que l'activació constitutiva de la via WNT canònica promou la proliferació cel·lular i la tumorigènesi, tot i que hi ha estudis que defensen que nivells relativament alts de Wnt condueixen a l'apoptosi, i que són els nivells relatius de Wnt els que comporten que una cèl·lula proliferi o esdevingui apoptòtica.<sup>151</sup>

Estudis focalitzats en les vies WNT no canòniques han mostrat també un paper pro-apoptòtic quant són induïdes en certs tipus cel·lulars. En el cas dels timòcits diversos articles destaquen la via WNT canònica com a essencial per al seu desenvolupament. De totes maneres, Liang i col·laboradors demostren també que els senyals de Wnt5a a través de la via no canònica Wnt/Ca<sup>2+</sup> regulen la supervivència de la línia de timòcits  $\alpha\beta$ . La pèrdua de Wnt5a disminueix l'expressió de Bax i promou l'expressió de Bcl-2, inhibint l'apoptosi. A més, els seus resultats mostren una inhibició de la  $\beta$ -catenina quan es sobreexpressa Wnt5a, mentre que una deficiència en aquest component comporta un increment de  $\beta$ -catenina en els timòcits. Aquest estudi conclou que l'activació de la via Wnt/Ca<sup>2+</sup> altera la via de senyalització canònica, i és crítica per al desenvolupament de cèl·lules T normals.<sup>152</sup>

Altres estudis també han mostrat una interacció entre les vies no canòniques i la  $\beta$ -catenina, entre d'altres en cèl·lules HEK293 l'addició de Wnt5a induïx l'estabilització de la  $\beta$ -catenina i la sobre-regulació de l'activitat del promotor TCF/LEF, així com provoca una inhibició de la via canònica sense alterar els nivells de  $\beta$ -catenina, depenent del receptor que expressa la cèl·lula. És a dir, Wnt5a pot activar o inhibir les senyals de  $\beta$ -catenina/TCF depenent del receptor, arribant a tenir múltiples i, a vegades, oposats, rols en el creixement cel·lular i desenvolupament.<sup>152,153</sup>

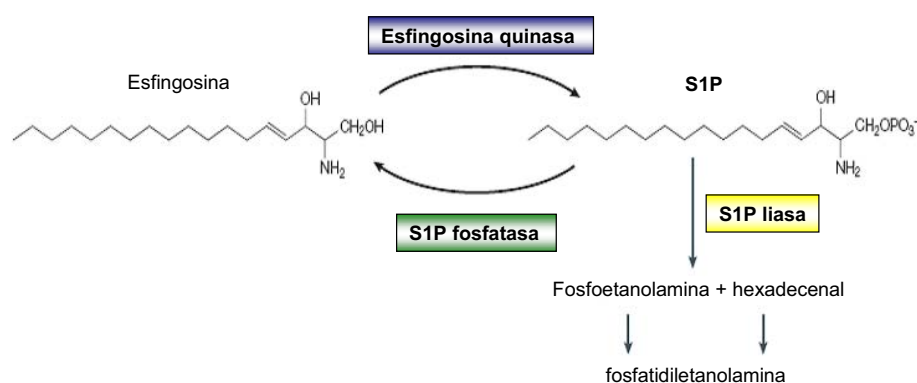
Així doncs, tot i els estudis realitzats fins al moment i el cada vegada més gran coneixement d'aquesta via de senyalització, el complet funcionament d'aquesta i les seves funcions, especialment pel que fa a l'apoptosi i la proliferació no estan encara aclarides, i resten encara moltes preguntes per resoldre, la resposta de les quals podrà ajudar a resoldre situacions patològiques de la sang i el sistema immune.

## 1.7 Esfingosina-1-fosfat

### 1.7.1 Generalitats

Els esfingolípid són segons missatgers implicats en la modulació de senyals bioquímiques intracel·lulars, així com lligands extracel·lulars. Durant els últims anys s'ha vist que els esfingolípid són una font important de molècules de senyalització i que els seus metabòlits, com ara la ceramida o l'esfingosina-1-fosfat, són molècules bioactives molt potents implicades en diversos processos cel·lulars com ara la diferenciació cel·lular, la proliferació i l'apoptosi.<sup>154,155</sup>

L'esfingomielina (SM), el major esfingolípid de membrana, és el precursor de totes les molècules bioactives i quan s'hidrolitza mitjançant les esfingomielinases es forma la ceramida. Per la seva banda la ceramida pot ser metabolitzada per les ceramidases en esfingosina, la qual pot ser a la vegada fosforilada a través de les esfingosina quinases (SPHKs) generant l'esfingosina-1-fosfat (S1P) (Figura 18). Aquest lisofosfolípid bioactiu (S1P) pot actuar com a segon missatger i com a lligand extracel·lular de receptors específics regulant moltes funcions cel·lulars, com ara la proliferació, la diferenciació, la quimiotaxis o la producció de citocines i quimiocines.<sup>156</sup> Hi ha dues d'SPHKs, l'SPHK1 i l'SPHK2, i són aquests enzims els que controlen el balanç entre els diferents mediadors lipídics, la ceramida, l'esfingosina i l'S1P.



**Figura 18.** Via metabòlica dels esfingolípids a partir de l'esfingosina.

En les cèl·lules immunes les SPHKs i l'S1P estan molt relacionats amb els punts principals de l'activació de les cèl·lules immunes i de la diferenciació, i se'ls relaciona amb respostes fisiològiques com la supervivència, la mobilització del calci, la reorganització del citoesquelet i la quimiotaxi. A més, incrementen la inflamació provocant potents senyals pro-inflamatoris en cèl·lules immunes efectores, incloent la producció de citocines i prostaglandines, així com participant en les respostes mitòtiques i quimiotàctils de les cèl·lules immunes i en l'activació de les cèl·lules endotelials vasculares.<sup>154,155,157</sup>

La majoria dels efectes provocats per l'S1P succeeixen a través de 5 receptors de membrana acoblats a la proteïna G (GPCRs) de la família Edg. Els 5 receptors (S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>) s'associen a diverses subunitats de proteïnes G heterotrimèriques: G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, i G<sub>12,13</sub> i es poden unir a S1P amb molta afinitat, activant diferents vies de senyalització intracel·lulars.<sup>158,159</sup>

La degradació de S1P pot succeir per dues vies diferents: una és la reversible defosforilació cap a esfingosina altre cop, duta a terme per fosfatases específiques. La segona via és la degradació irreversible per una S1P liasa piridoxal depenent de fosfat cap a hexadecenal i fosfoetanolamina, que són subseqüentment reutilitzades per a la biosíntesi de fosfatidiletanolamina (Figura 18).<sup>159</sup>

### 1.7.2 Esfingolípids i apoptosi

L'esfingosina-1-fosfat promou el creixement i la supervivència en diversos tipus cel·lulars, mentre que els seus precursors (ceramida i esfingosina) s'han associat generalment amb l'aturada del creixement i la mort cel·lular. Com aquests metabòlits són interconvertibles, s'ha proposat que no són les concentracions absolutes sinó els nivells relatius els que determinen la situació.<sup>159</sup> Tot i que el paper que juguen els esfingolípids en l'apoptosi de diversos tipus cel·lulars està àmpliament descrit, en els neutròfils, on l'apoptosi és qui dirigeix la vida d'aquestes cèl·lules, la seva implicació es troba molt poc estudiada.

La ceramida en concret es considera un lípid amb una funció pro-apoptòtica i s'han descrit relacions d'aquesta molècula amb la proteïna supressora de tumors p53 i amb diversos membres de la família Bcl-2, modulant la fosforilació de bcl-2 i Bax simultàniament. Experiments *in vitro*

han demostrat també que la ceramida incrementa la permeabilitat de la membrana externa mitocondrial a certes proteïnes, incloent-hi el citocrom c. A més, la ceramida activa també la proteasa catèpsina D, un mediador de mort cel·lular depenent de p53.<sup>160</sup> Per altra banda, diversos estudis han mostrat el rol específic de l'esfingosina en la inducció de la mort cel·lular independent de la ceramida. La inducció de l'apoptosi per inhibició de l'SK i la conseqüent acumulació d'esfingosina impliquen a aquest lípid com una molècula activa en la mort cel·lular.<sup>161</sup> En els neutròfils, l'addició d'esfingosina és capaç també d'induir o d'incrementar la seva apoptosi, així com també succeeix en les cèl·lules HL60.<sup>162</sup> L'apoptosi promoguda per l'esfingosina s'ha vist que ocorre per la via depenent de caspasa, induint el trencament de Bim, l'alliberació de citocrom c de la mitocòndria i l'activació de les caspases efectores 3 ò 7.<sup>160</sup>

Antagonísticament als efectes de la ceramida i l'esfingosina es troben els efectes de l'S1P, que promou la proliferació, la supervivència i la inhibició de l'apoptosi. Una de les primeres observacions implicant S1P com a lípid proliferatiu va ser l'habilitat de PDGF i de sèrum fetal de vedella d'induir creixement via l'activació de SK i la formació de S1P, aleshores anomenat com a segon missatger intracel·lular.<sup>163</sup> La inhibició de l'apoptosi per S1P també s'ha vist mitjançant la sobreexpressió de l'SK i la subseqüent acumulació de S1P en cèl·lules de Jurkat,<sup>164</sup> així com en d'altres experiments en diversos tipus cel·lulars, com ara en cèl·lules endotel·lials.<sup>165</sup> A més, recentment, s'ha observat que en condicions d'hipoxia l'SK1 i l'S1P modularien el factor de transcripció HIF-1 $\alpha$ , que com ja hem vist, inhibeix l'apoptosi dels neutròfils. En condicions hipòxiques l'SK1 semblaria que augmenta de manera depenent de ROS, tot i que el mecanisme encara es desconeix.<sup>166</sup>

En el cas dels neutròfils, les esfingosina quinases posseeixen una gran activitat, i una gran part de l'S1P generat per aquesta activitat és alliberat d'aquestes cèl·lules.<sup>167</sup> Conseqüentment, l'alliberació d'S1P dels neutròfils és capaç de generar senyals intra-cel·lulars en aquestes mateixes cèl·lules per un mecanisme autocrí o paracrí, ja que s'ha trobat que els neutròfils posseeixen també receptors Edg per a S1P.<sup>168</sup> L'S1P inhibeix l'apoptosi espontània en els neutròfils segurament mitjançant una proteïna G sensible a PTX, el que suggeriria una implicació dels receptors acoblats a proteïna G. A més, aquest mecanisme de supervivència està, en part, regulat per la via de senyalització p38 MAPK, un mecanisme que seria diferent al que es suposa que succeeix en la majoria de tipus cel·lulars mitjançant ERK.<sup>168</sup>

### 1.7.3 Inhibició de l'apoptosi per S1P i activació de NGAL mitjançant *NFKB*

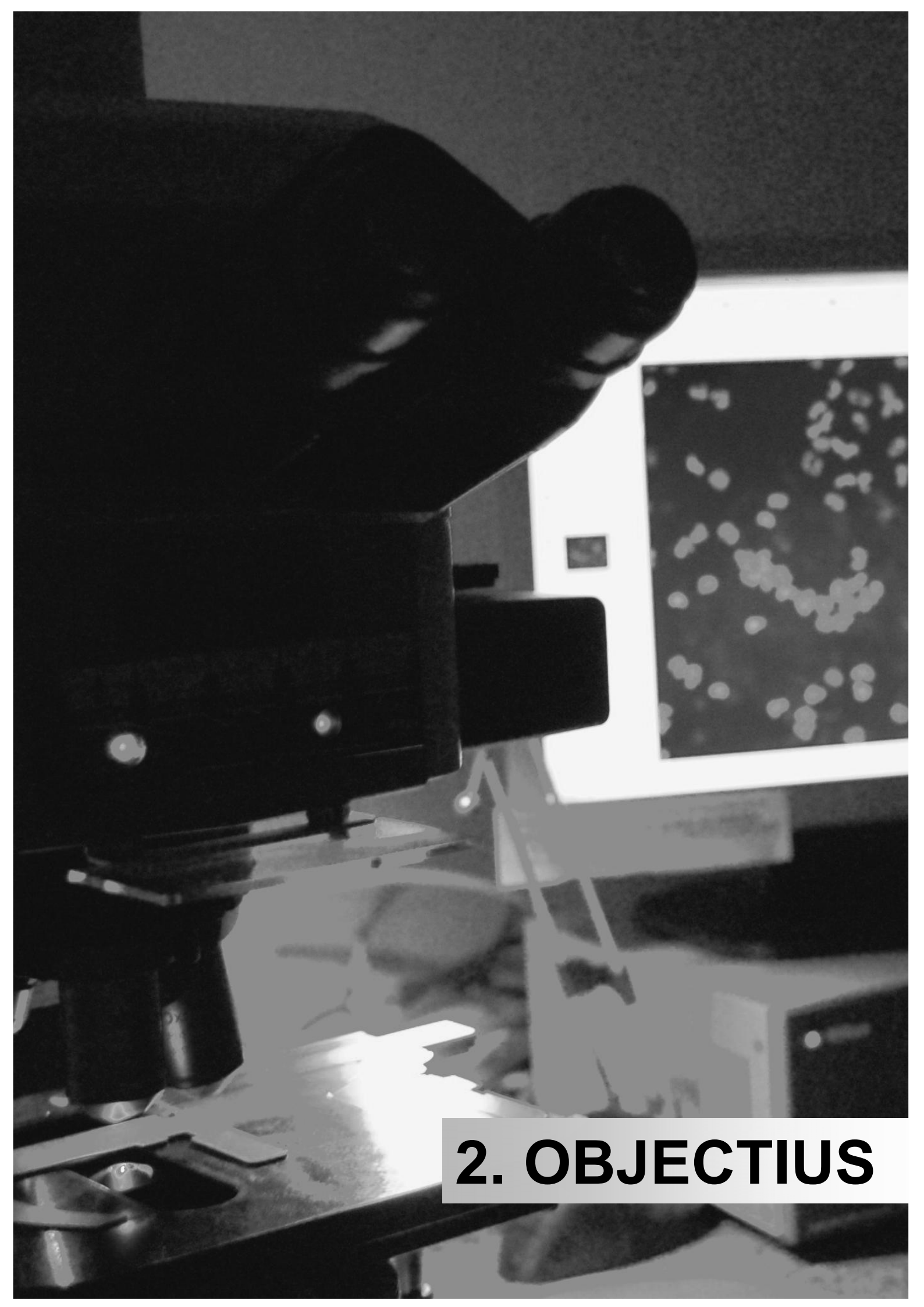
Com ja hem comentat, Chihab i col·laboradors han proposat que l'activitat de p38 MAPK juga un paper important en la inhibició de l'apoptosi per S1P en els neutròfils. Es sap que l'activitat de p38 MAPK està relacionada amb la via NFKB, via que com ja s'ha explicat inhibeix l'apoptosi dels neutròfils,<sup>80</sup> i s'ha vist que aquesta via és activada per S1P a través de receptors Edg en certs tipus cel·lulars. Per exemple, s'ha vist que són els receptors Edg-3 i Edg-5, però no Edg-1, els que

---

promouen l'activació de NFκB en el cas de les cèl·lules HEK293, requerint PKC i calci, probablement per l'activació de G<sub>q</sub>.<sup>169</sup>

A part d'inhibint l'apoptosi, l'efecte biològic de l'activació de NFκB mitjançant S1P és molt important, entre d'altres, sobre-regulant la molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars (VCAM) i la E-selectina.<sup>170</sup> A més, en els últims anys s'ha observat que l'activació de NFκB regula l'expressió de NGAL/*24p3* en diversos tipus cel·lulars, de manera que el promotor del gen NGAL presenta una zona d'unió a NFκB potencialment crítica per a la regulació de l'expressió de NGAL/*24p3*.<sup>171</sup> Aquesta zona d'unió però, necessitaria d'un factor de transcripció anomenat IκBζ (també anomenat MAIL o INAP), altament homòleg de Bcl-3, un altre cofactor de NFκB de la família IκB.<sup>172</sup> IκBζ és una proteïna que s'acumula de manera estable en el nucli on inhibeix o activa la transcripció de NFκB, essent un mecanisme nou de control de la via NFκB.<sup>173,174</sup> Després de ser estimulat (per IL-1β o TLRs, per exemple) IκBζ forma un complex estable amb NFκB, actuant com un activador transcripcional essencial en el promotor de *24p3* amb una zona d'unió a NFκB i l'element *cis*.<sup>175</sup>





## **2. OBJECTIUS**





## 2. OBJECTIUS

La inflamació associada a la IR intestinal es troba majoritàriament mediada pels neutròfils, els quals contribueixen a perpetuar la inflamació i conseqüentment, el dany tissular.

Les diferents teràpies anti-neutrofíliques utilitzades en aquests casos han aportat una protecció limitada enfront del dany, a més de problemes en l'aplicació clínica. Ninguna d'aquestes teràpies s'ha centrat en la modulació de l'apoptosi del neutròfil en la inflamació intestinal derivada de la Isquèmia/Reperfusió.

L'apoptosi té implicacions terapèutiques potencials doncs, al contrari de la necrosi, es tracta d'un procés actiu amb reguladors genètics i efectors bioquímics que poden ser específicament manipulats per a ajudar o alleugerir el dany inflamatori induït per IR.

La nostra hipòtesi és la següent: és possible aconseguir una resolució o reducció fisiològica de la inflamació associada a una IR intestinal mitjançant la modulació de l'apoptosi del neutròfil infiltrat.

Per a verificar la hipòtesi, el nostre **objectiu general** és: descobrir si la modulació de l'apoptosi retardada del neutròfil infiltrat durant la inflamació associada a una IR intestinal facilita la resolució de la malaltia.

Per a tal s'han desenvolupat quatre **objectius específics**:

OBJECTIU 1: Caracteritzar l'apoptosi dels neutròfils en la inflamació induïda per IR intestinal.

OBJECTIU 2: Determinar el mecanisme del retard apoptòtic del neutròfil en el model. Implicació de *24p3*.

OBJECTIU 3: Determinar la implicació de la via WNT i del seu gen diana *24p3* en el control de l'apoptosi del neutròfil.

OBJECTIU 4: Conèixer el paper de l'esfingosina-1-fosfat en l'apoptosi del neutròfil anòxic.





### **3. MATERIAL I MÈTODES**



### **3. MATERIAL I MÈTODES**

#### **3.1 MODEL EXPERIMENTAL IN VIVO**

##### **3.1.1 Model animal**

Els experiments d'aquesta tesi s'han realitzat amb rates mascles de les soques Sprague Dawley i Brown Norway (Charles River, França) amb pesos compresos entre 300 i 350 grams, estabulats a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona com a mínim durant una setmana abans de començar els experiments. Les condicions d'estabularització es mantenien constants, amb una temperatura de 21-22°C i una humitat relativa del 70%. Els cicles de llum/foscors tenien com a duració 12 hores respectivament. Els animals s'alimentaven amb una dieta estàndard (AO4) (Panlab; Barcelona, Espanya) i aigua *ad libitum*.

Tots els procediments als que van ésser sotmesos els animals seguien les directrius del Ministeri d'Espanya (Real Decreto 1201/2005; BOE nº252 de 21/10/2005) i de la Unió Europea (86/609/EU) per a la manipulació d'animals experimentals.

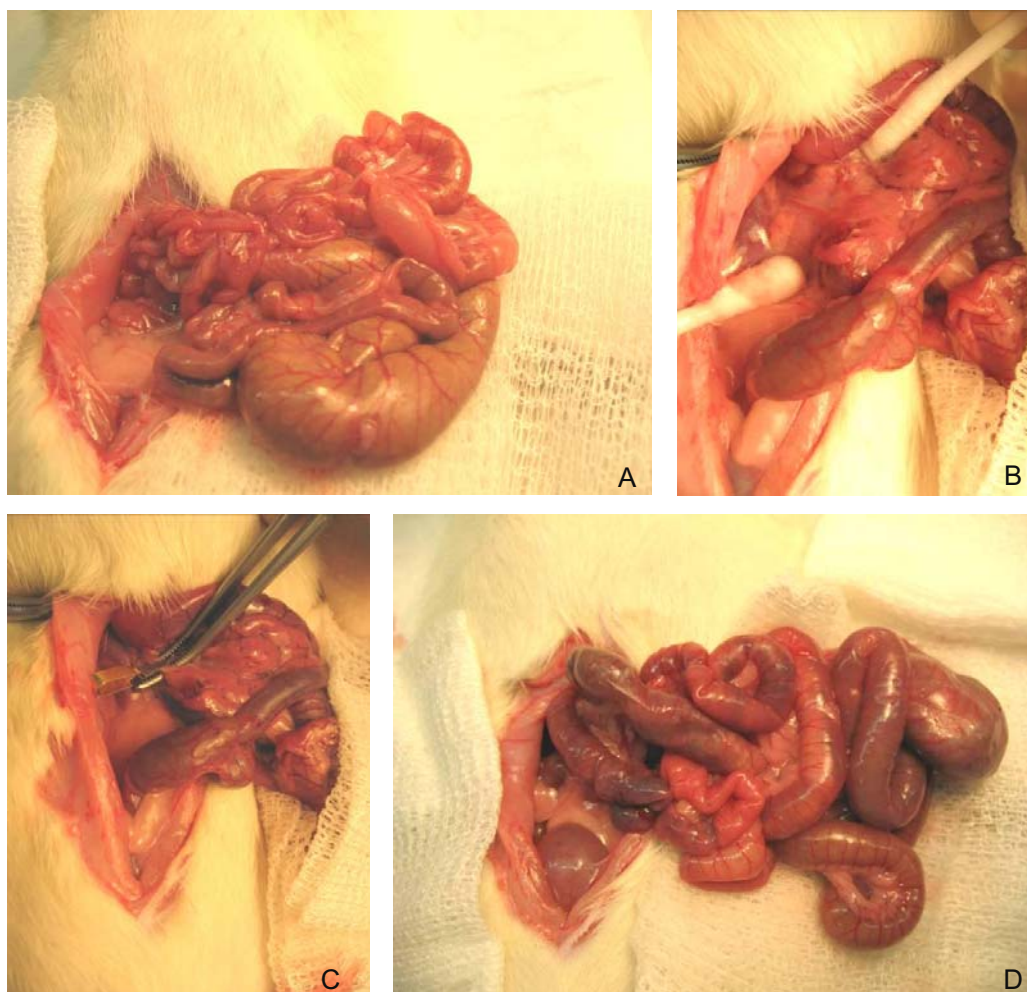
##### **3.1.2 Anestèsia i sacrifici**

Els animals es van anestesiari amb isofluorane (Abott Laboratories, Madrid, Espanya) (4%) amb un flux d'oxigen d'1.5l/min. Durant tot el procediment quirúrgic els animals van ésser mantinguts a un flux constant d'isofluorane de 1.5% i 1.5 l/min d'oxigen. Una vegada finalitzada la intervenció els animals eren sacrificats amb sobredosi d'anestèsic.

##### **3.1.3 Isquèmia/Reperfusió intestinal**

Per a induir la isquèmia intestinal, els animals anestesiats es col·locaven en posició supina amb la temperatura corporal mantinguda durant tot el procés a 36-37°C. Una vegada realitzada la laparotomia, s'aïllava l'artèria mesentèrica i, mitjançant un clamp atraumàtic es procedia al clamatge d'aquesta. La desaparició de moviment en les arterioles intestinals, així com l'immediat canvi de color del teixit de l'intestí confirmaven l'èxit del clamatge (Figura 19). L'àrea abdominal es cobria amb una gasa humida amb salí per a evitar la deshidratació. Una vegada finalitzat el període isquèmic, el clamp era retirat, permetent de nou el pas del flux sanguini i iniciant d'aquesta manera la reperfusió. Durant aquest temps l'àrea abdominal era també coberta amb una gasa humida.

Al finalitzar la reperfusió, el teixit era retirat, la sang recollida i es procedia al sacrifici de l'animal.



**Figura 19.** Procediment de clampatge intestinal per a realitzar la IR. A. Aspecte d'un intestí de rata abans de patir una IR intestinal (situació control). B- aïllament de l'artèria mesentèrica. C- Clampatge de l'artèria mesentèrica. D- Aspecte de l'intestí després dels períodes d'isquèmia i reperfusió.

#### 3.1.4 Recollida de mostres

Al final de la reperfusió, la sang total de la rata era extreta a través de la vena cava i recollida en tubs heparinitzats i immediatament procesada per a l'aïllament dels neutròfils circulants. El teixit intestinal era també recol·lectat per a anàlisis histològics (fixat en formol) o immediatament congelat a  $-80^{\circ}\text{C}$  per a futures determinacions.

#### 3.1.5 Aïllament de neutròfils de sang perifèrica de rata

Les cèl·lules polimorfonuclears van ser aïllades de la sang heparinitzada mitjançant gradients de centrifugació. En tubs de vidre s'afegien 2 mL de mono-poly resolving medium (densitat:  $1.114 \pm 0.002$  g/mL) (Eurobio; Les Ulis, França), 2 mL de Lymphoprep (densitat:  $1.077 \pm 0.001$  g/mL) (Axis-Shield; Oslo, Noruega) i 2-3 mL de sang. El procediment es repetia fins concloure el volum total de sang extreta (aprox. 8 mL). Després d'una centrifugació de 30 minuts a 500g a  $T^{\text{a}}$  ambient els neutròfils quedaven aïllats en un anell situat entre les dues densitats dels productes

comercials. El procediment es repetia de nou amb l'anell extret per a una segona centrifugació de purificació (Figura 20). Per a confirmar la puresa de l'aïllament dels neutròfils es realitzava la tinció de Giemsa May-Grünwalds.

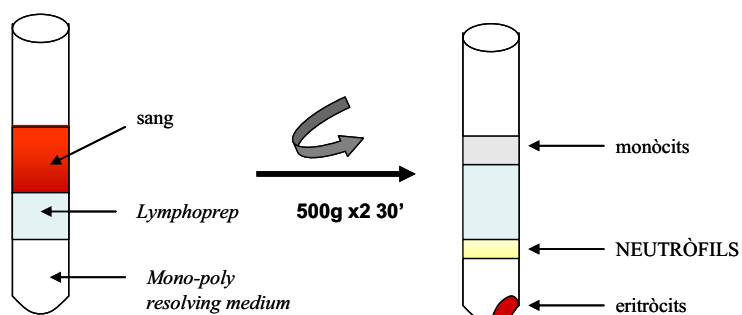


Figura 20. Esquema representatiu de l'aïllament de neutròfils per gradient de densitats.

## 3.2. MODEL EXPERIMENTAL IN VITRO

### 3.2.1 Cultiu cel·lular

Per a l'experimentació *in vitro* s'ha utilitzat la línia cel·lular MPRO, clon 2.1 (ATCC; Manassas, Estats Units). Aquesta línia cel·lular prové de cèl·lules de la medul·la òssia de ratolins mascles BDF1 infectats amb el vector retroviral LRARalpha403SN. Les cèl·lules infectades van ser seleccionades en un medi amb G418 i GM-CSF, les quals proliferaven i es mantenien morfològicament immadures.

Aquesta línia cel·lular progenitora de neutròfils és dependent de GM-CSF i té la característica de diferenciar-se a neutròfils però no a monòcits, mastòcits ni basòfils. Les cèl·lules mostren característiques promielocítiques, entre elles la presència de nombrosos grànuls primaris azuròfils i l'expressió d'antigens específics de membrana cel·lular.

Pel nostre experiment les cèl·lules promielocítiques eren cultivades en medi *Iscove's modified Dulbecco* (IMDM) (LGC Standards; Barcelona, Espanya) suplementat amb 10% de sèrum de cavall (LGC Standards) i GM-CSF (Invitrogen; Nivelles, Bèlgica) seguint les indicacions de la casa comercial. El cultiu es va realitzar en flascons de 75 cm<sup>2</sup> en 25 mL de medi suplementat, no superant mai les 2·10<sup>6</sup> cèl·lules/mL. Aquestes cèl·lules eren diferenciades a neutròfils afegint al medi 10µM d'àcid retinòic (ATRA)(Sigma-Aldrich; Madrid, Espanya) durant 96 hores, tal i com està descrit.<sup>176</sup> Una vegada s'havien obtingut neutròfils complets, els experiments es realitzaven en medi IMDM suplementat amb sèrum de cavall però sense el factor de creixement GM-CSF, per a evitar l'efecte anti-apoptòtic d'aquesta citocina<sup>177</sup>.

### 3.2.2 Model de cultiu cel·lular anòxic

Els experiments d'anòxia es varen dur a terme en un incubador Galaxy R amb control d'oxigen (RSBiotech; Irvine, Escòcia) en condicions anòxiques (0.6% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> amb balanç compensat



amb nitrogen) durant tota la nit (*overnight*). Per a la reoxigenació les cèl·lules anòxiques passaven per tres hores de cultiu normòxic (21% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>).

### 3.3 GRUPS EXPERIMENTALS

#### Estudi 1: Caracteritzar l'apoptosi dels neutròfils en la inflamació induïda per IR intestinal.

La primera part d'aquest estudi tenia com a finalitat obtenir el grau de dany més idoni per l'estudi després d'una IR intestinal i caracteritzar l'estat apoptòtic dels neutròfils circulants en dues soques de rates, Sprague Dawley i Brown Norway. Per aquest efecte es van realitzar els següents grups experimentals:

- Sham (**SHAM**): en aquest grup les rates van ser anestesiades i se'ls hi va realitzar una laparotomia mitja.
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts (**I45/R180**): els animals van ser sotmesos a una isquèmia de l'artèria mesentèrica de 45 minuts seguits per 180 minuts de reperfusió.
- Isquèmia de 90 minuts/Reperfusió de 60 minuts (**I90/R60**): en aquest grup es va realitzar una isquèmia intestinal de 90 minuts seguida per una reperfusió de 60 minuts.
- Isquèmia de 90 minuts/Reperfusió de 180 minuts (**I90/R180**): les rates d'aquest grup van ésser sotmeses a 90 minuts d'isquèmia intestinal seguits per 180 minuts de reperfusió.

En tots els grups, una vegada finalitzada la reperfusió es va extreure la sang perifèrica per a l'aïllament de neutròfils i es va processar el teixit intestinal.

La segona part de l'estudi es va centrar en la modulació de l'apoptosi dels neutròfils circulants i en determinar l'impacte sobre el dany. La soca escollida per aquest estudi va ser la Sprague Dawley i els grups foren:

- Sham (**SHAM**): es va procedir de la mateixa manera que l'explicada anteriorment.
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts (**IR**).
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts amb administració d'*E.coli* morta i opsonitzada (**IR + *E.coli***): els animals van ser sotmesos a una isquèmia intestinal de 45 minuts i, a l'inici de la reperfusió se'ls hi va injectar en l'arteria aorta 500µL d'*E. coli* morta i opsonitzada (Orpegen Pharma; Heidelberg, Alemanya) dissolta en PBS a una concentració final de 10<sup>9</sup>/mL.
- Control amb administració d'*E.coli* morta i opsonitzada (**C + *E.coli***): grup control amb administració en l'arteria aorta de 500µL d'*E. coli* dissolt en PBS a una concentració final de 10<sup>9</sup>/mL durant 180 minuts.

#### Estudi 2: Determinar el mecanisme del retard apoptòtic del neutròfil en el model. Implicació de *24p3*.

Aquest estudi pretenia determinar el mecanisme implicat en el retard de l'apoptosi dels neutròfils centrant l'atenció en la proteïna *24p3*. Per a la seva realització, va ser dividit en dues

parts. En la primera part es va utilitzar una línia cel·lular de neutròfils (MPRO), essent els grups estudiats els següents:

- control (**CONTROL**): cèl·lules amb completa diferenciació a neutròfils, cultivades en condicions normòxiques.
- Anòxia (**A**): neutròfils completament diferenciats cultivats en condicions anòxiques (0.6% O<sub>2</sub>) *overnight* (aproximadament 16 hores).
- Anòxia/Reoxigenació (**AR**): neutròfils cultivats en condicions anòxiques van ser sotmesos posteriorment a una reoxigenació (3 hores).
- Anòxia/Reoxigenació amb addició d'*E.coli* morta i opsonitzada (**AR + *E.coli***): les cèl·lules eren cultivades en les mateixes condicions que el grup AR però amb administració d'*E.coli* (10:1) a l'inici de l'anòxia.
- Anòxia/Reoxigenació amb addició d'*E.coli* morta i opsonitzada i anticòs anti-24p3 (**AR + *E.coli* + Ab24p3**): aquest grup era realitzat igual que el grup AR + *E.coli* però amb administració d'anticòs específic anti-24p3 (80 ng/mL) (R&D systems; Minneapolis, Estats Units) a l'inici de l'anòxia.
- control amb addició d'*E.coli* morta i opsonitzada (**C + *E.coli***): els neutròfils eren cultivats com en el grup control però amb administració d'*E.coli* (10:1).
- control amb addició de DPI (**C + DPI**): grup tractat en les mateixes condicions que el control però amb administració de 25µM de DPI (inhibidor de la NADPH oxidasa) (Sigma-Aldrich) durant les tres últimes hores de l'experiment.
- Anòxia/Reoxigenació amb addició de DPI (**AR + DPI**): les cèl·lules eren sotmeses al mateix procediment que el grup AR però amb administració de 25µM de DPI durant les 3 hores de reperfusió.
- Anòxia/Reoxigenació amb addició de proteïna recombinant 24p3 (**AR + 24p3**): grup amb el mateix procediment que AR però amb administració a l'inici de 80 ng/mL de proteïna 24p3 (ProtEra; Florència, Itàlia).
- Anòxia/Reoxigenació amb addició de proteïna recombinant 24p3 i DPI (**AR + 24p3 + DPI**): les cèl·lules eren tractades com el grup anterior però amb administració de 25µM de DPI durant tota la reperfusió.

La segona part de l'estudi es va focalitzar en l'estudi *in vivo* amb rates Sprague Dawley per a confirmar que el mecanisme apoptòtic dels neutròfils en circulació succeïa a través de 24p3.

- Sham (**SHAM**).
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts (**IR**).
- control amb administració d'anticòs anti-24p3 (**C + Ab24p3**): animals tractats com el grup control amb administració intravenosa de 200 µg d'anticòs Anti-24p3 durant tota la duració de l'experimentació (180 minuts).

- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts amb administració de la proteïna recombinant *24p3* (**IR + 24p3**): grup tractat com IR però amb administració intravenosa de 500µL de proteïna recombinant *24p3* (1mg/mL) a l'inici de la reperfusió.
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts amb administració d'*E.coli* morta i opsonitzada i anticòs anti-*24p3* (**IR + E.coli + Ab24p3**): en aquest grup es sotmetien les rates a una isquèmia intestinal de 45 minuts i, a l'inici dels 180 minuts de reperfusió s'administraven intravenosament 500µL d'*E. coli* dissolt en PBS a una concentració final de 10<sup>9</sup>/mL. Passats 5 minuts s'administraven 200 µg d'anticòs Anti-*24p3*.

### Estudi 3: Determinar la implicació de la via WNT i del seu gen diana *24p3* en el control de l'apoptosi del neutròfil.

En aquest tercer estudi es pretenia averiguar si la via Wnt modulava l'apoptosi dels neutròfils en condicions d'anòxia a través del seu gen diana *24p3*. Així doncs, els grups estudiats amb la línia cel·lular *in vitro* foren:

- control (**CONTROL**).
- Anòxia/Reoxigenació (**AR**).
- Anòxia/Reoxigenació amb addició d'*E.coli* morta i opsonitzada (**AR + E.coli**).
- control silenciats el gen *24p3* (**si24p3 C**): cèl·lules en condicions normòxiques en les quals se'ls afegia RNA d'interferència per silenciar l'expressió del gen *24p3*.
- Anòxia/Reoxigenació silenciats el gen *24p3* (**si24p3 AR**): neutròfils amb el gen *24p3* silenciats es sotmetien a les condicions d'AR.
- Anòxia/Reoxigenació amb addició de BIO (fàrmac activador de la via Wnt canònica) (**AR + BIO**): neutròfils sotmesos a AR se'ls hi administrava 10µM de l'inductor de la via Wnt BIO (Sigma-Aldrich) a l'inici de l'anòxia.
- Anòxia/Reoxigenació silenciats el gen *24p3* amb addició de BIO (**si24p3 AR + BIO**): cèl·lules en les mateixes condicions que el grup *si24p3 AR* però amb administració de 10µM de BIO al principi de l'anòxia.
- Anòxia/Reoxigenació amb addició d'una sonda siRNA no homòloga a cap gen (**scrambled siRNA AR**): grup tractat igual que grup *si24p3 AR* però amb una sonda de silenciament no homòloga a cap gen i, per tant, amb incapacitat d'impedir l'expressió gènica.
- Anòxia (**A**).
- control amb addició de CoCl<sub>2</sub> (compost químic utilitzat com a estabilitzador d'HIF-1α en el citoplasma) (**C + CoCl<sub>2</sub>**): neutròfils cultivats en condicions normòxiques amb addició de 150µM de l'estabilitzador d'HIF-1α CoCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich).
- control amb addició de CoCl<sub>2</sub> i BIO (**C + CoCl<sub>2</sub> + BIO**): neutròfils cultivats com el grup C + CoCl<sub>2</sub> amb addició de 10µM de BIO a l'inici de l'experiment.

- control amb addició de WIF (proteïna secretable que s'uneix a les proteïnes Wnt inhibint la seva activitat) (**C + WIF**): neutròfils cultivats en condicions control amb addició a les 0 hores de 50 nM de WIF (*Wnt inhibitor factor*) (R&D systems).

Seguidament es va voler determinar si la via WNT jugava algun paper en el retard de l'apoptosi dels neutròfils circulants després d'una IR intestinal *in vivo*, i si la seva modulació revertia els efectes tan a nivell cel·lular com tissular. Per a respondre a aquestes preguntes els grups que es van estudiar foren:

- Sham (**SHAM**).
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts (**IR**).
- control amb administració de BIO (**C + BIO**): animals administrats intravenosament amb 10µM de BIO.
- Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts amb administració de BIO (**IR + BIO**): animals tractats com el grup IR però amb administració intravenosa de 10µM de BIO una hora abans de la isquèmia.
- Grup control amb administració d'anticòs específic anti-*24p3* (**C + Ab24p3**).
- Grup Isquèmia de 45 minuts/Reperfusió de 180 minuts amb administració de BIO i anticòs anti-*24p3* (**IR + BIO + Ab24p3**): animals tractats com el grup IR + BIO amb administració intravenosa d'anticòs anti-*24p3* a l'inici de la reperfusió.
- Grup control amb administració d'IgG (**C + IgG**): animals tractats com el grup C + Ab24p3 però amb administració d'IgG (R&D systems) en comptes de l'anticòs anti-*24p3*.

#### **Estudi 4: Conèixer el paper de l'esfingosina-1-fosfat en l'apoptosi del neutròfil anòxic.**

Per a determinar el paper del S1P en els neutròfils anòxics i la relació amb *24p3* es van utilitzar agonistes tant selectius com no selectius (FTY720, SEW2871) i antagonistes competitiu (VPC23019) dels receptors d'aquest esfingolípide així com la tècnica d'interferència del gen SPHK2 (esfingosina quinasa 2) en els neutròfils cultivats *in vitro*. Els grups estudiats van ser:

- control (**CONTROL**).
- Anòxia/Reoxigenació (**AR**).
- control amb addició de FTY720 (anàleg estructural de l'esfingosina, agonista dels receptors S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub>, S1P<sub>5</sub>) (**C + FTY720**): neutròfils en condicions normòxiques als quals se'ls hi administrava overnight 100nM de l'agonista FTY720 (Cayman chemical; Ann Arbor, Estats Units).
- control amb addició de SEW2871 (agonista selectiu d'S1P<sub>1</sub>, no relacionat estructuralment amb S1P, no es fosforila al unir-se al receptor S1P<sub>1</sub>) (**C + SEW2871**): neutròfils en normòxia amb administració de l'agonista de receptors SEW2871 (Cayman chemical) a una concentració de 50 mg/mL.

- control amb addició de VPC23019 (antagonista selectiu dels receptors S1P<sub>1</sub> i S1P<sub>3</sub>) (**C + VPC23019**): neutròfils en normòxia amb administració de 2µM *overnight* de l'antagonista de receptors d'S1P VPC23019 (Cayman chemical).
- Anòxia/Reoxigenació amb addició de VPC23019 (**AR + VPC23019**): cèl·lules cultivades com el grup AR amb administració de 2µM de l'antagonista de receptors d'S1P VPC23019 a l'inici de l'anòxia.
- control silenciatiu el gen Esfingosina-quinasa 2 (**C siSPHK2**): cèl·lules en condicions normòxiques en les quals se'ls hi silenciava l'expressió del gen SPHK2.
- Anòxia/Reoxigenació silenciatiu el gen Esfingosina-quinasa 2 (**ARsiSPHK2**): neutròfils amb el gen SPHK2 silenciatiu eren sotmesos al procés d'AR.

### 3.4 DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES I MOLECULARS

#### 3.4.1 Activitat de caspasa 3

Un dels paràmetres utilitzats per a detectar l'apoptosi va ser mesurar l'activitat de caspasa 3 mitjançant dues tècniques, una per espectrofluorimetria i l'altre per citometria de flux.

##### 3.4.1.1 Detecció de l'activitat de caspasa 3 per espectrofluorimetria

Aquesta tècnica es basa en la mesura del trencament proteolític del substrat *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) (Biomol; Plymouth Meeting, Estats Units). La caspasa 3 s'activa en les primeres fases de l'apoptosi, i participa en la proteòlisi de diverses molècules, entre elles poly-ADP ribosa polimerasa (PARP). Ac-DEVD-AMC és un substrat fluorogènic sintètic de caspasa 3, que conté la seqüència d'aminoàcids per on es trenca PARP. La caspasa 3 trenca la molècula alliberant d'aquesta manera el fluorogènic AMC, que pot ser quantificat mitjançant un espectrofluorímetre a longituds d'ona de 380-nm d'excitació i 450-nm d'emissió.

Les cèl·lules eren lisades i sonicades en un tampó de lisi (100 mM HEPES, pH=7.5, 10% sucrosa, 0.1% (w/v) CHAPS, 1mM PMSF, 1mM dithiothreitol). Els homogenats es centrifugaven a 10.000g durant 10 min a 4°C i els sobrenedants eren recol·lectats. 75µg de proteïna dels sobrenedants eren carregats amb 12µM d'ac-DEVD-AMC a una placa de 96 pouets per a la mesura. L'AMC alliberat es quantificava espectrofluorimètricament a intervals de 5 minuts durant 95 minuts a 37°C.

El teixit intestinal era homogenitzat i sonicat en un tampó de lisi (50 mM HEPES, pH=7.5, 10% sucrosa, 0.1% (w/v) CHAPS, 5 mM GSSG, 10mM dithiothreitol) i es deixava reposar 30 minuts en gel. Posteriorment es centrifugaven els homogenats a 10.000g durant 10 min a 4°C i els sobrenedants eren recol·lectats. Una vegada mesurada la quantitat de proteïna present en els

sobrenedats, 250 µg d'aquesta eren carregats en una placa de 96 pouets amb 12µM d'ac-DEVD-AMC, per a realitzar-se la medició en les mateixes condicions anteriorment explicades.

#### 3.4.1.2 Detecció de l'activitat de caspasa 3 per citometria de flux

Aquesta tècnica es va realitzar amb el kit de detecció de caspasa 3 activa Apo Active 3 (Bachem Immunology; Weil am Rhein, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit utilitza un anticòs policlonal de conill d'elevada afinitat per als aminoàcids 163-175 de la caspasa 3 murina, juntament amb un anticòs de cabra anti-conill conjugat amb ficoeritrina (PE) que permet la visualització de l'anticòs unit.

Els neutròfils eren rentats dues vegades amb PBS i ressuspesos en 500 µl de solució de fixació ( $1 \cdot 10^6$  -  $3 \cdot 10^6$  neutròfils/500 µl). Després de 20 minuts a temperatura ambient es tornaven a rentar les mostres 2 vegades en PBS i es ressuspensien en 1mL de PBS + 1% saponina (Sigma-Aldrich). 100µl de les mostres es passaven a tubs *eppendorffs* de 2 mL i s'afegien 10 µl l'anticòs de conill anti-caspasa 3. Després de vortejar es deixava 60 minuts a temperatura ambient. Una vegada transcorregut el temps, es rentaven les mostres dues vegades en PBS + 1% saponina i en l'últim rentat s'afegia en el pellet 10 µl de l'anticòs secundari de cabra anti-conill carregat amb PE i es deixava 30 minuts a temperatura ambient en foscor. Finalment, s'afegien 2mL de PBS + 1% saponina i es centrifugaven les mostres a 300g durant 5 minuts. El pellet es ressuspensia en 2mL de PBS + 2% BSA (Sigma-Aldrich) i es tornava centrifugar a 300 g 5 minuts. El pellet es ressuspensia en 500 µl de PBS + 2% BSA i les mostres s'analitzaven en un citòmetre de flux Cell labQuanta SC (Beckman coulter; Brea, Estats Units). En tots els experiments es va utilitzar sempre un control positiu en el qual es feia tot el procediment sense afegir l'anticòs primari de conill anti-caspasa 3.

#### 3.4.2 Annexina V / PI per citometria de flux

Aquesta tècnica de detecció de cèl·lules apoptòtiques es basa en la ràpida i alhora selectiva unió de la proteïna Annexina V amb la fosfatidilserina present en la membrana extracel·lular a l'inici del procés apoptòtic. Durant l'apoptosi, la membrana plasmàtica pateix alteracions, entre elles una redistribució de la fosfatidilserina, que passa de la cara interna de la membrana cel·lular a l'exterior d'aquesta, permetent que l'Annexina V se li uneixi. A la vegada aquesta tècnica ens permet visualitzar també les cèl·lules que pateixen necrosi o una apoptosi en estat molt avançat gràcies a l'addició de iodur de propidi (PI). Quan les cèl·lules entren en necrosi, la membrana cel·lular es permeabilitza, permetent que el iodur de propidi entri a l'interior cel·lular i s'uneixi al DNA, emetent fluorescència.

D'aquesta manera, aquesta tècnica ens permet visualitzar quatre estats cel·lulars diferents:

Cèl·lules vives	Annexina V negatives / PI negatives
Cèl·lules iniciant apoptosi	Annexina V positives / PI negatives

Cèl·lules amb apoptosi molt avançada	Anexina V positives / PI positives
Cèl·lules necròtiques	Anexina V negatives / PI positives

Els neutròfils eren rentats en PBS i ressuspesos a  $2-3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL en tampó d'unió (10 mM HEPES/NaOH, pH=7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). Alíquotes de 200 µl s'incubaven en gel amb 1 µl d'Anexina V FITC (Invitrogen; Nivelles, Bèlgica) durant 5 minuts en foscor. Passat aquest temps es centrifugava la mostra i es ressuspenia en 100 µl de tampó d'unió amb 1 µg/mL de PI (Invitrogen) i s'incubava durant 5 minuts en gel en foscor. Passat aquest temps, s'afegien 400 µl de tampó d'unió i s'analitzaven les mostres per citometria de flux.

### 3.4.3 Tinció DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

Aquesta tinció tenyeix els nuclis cel·lulars de color blau quan es mira sota un filtre DAPI en un microscopi de fluorescència. D'aquesta manera s'observen clarament els típics canvis que succeeixen en el nucli, entre ells la condensació de la cromatina i la fragmentació nuclear, deguts a l'apoptosi.

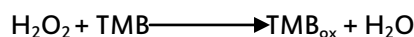
Després d'enganxar els neutròfils en un portaobjectes mitjançant una citocentrifugació, les mostres es fixaven en 4% paraformaldehid durant 5 minuts. Després de rentar dues vegades 5 minuts amb PBS, s'incubava amb solució DAPI (0.2 µg/mL) (Sigma-Aldrich) durant 5 minuts en obscuritat. Una vegada transcorregut aquest temps, les mostres es tornaven a rentar 3 vegades amb PBS, i finalment es muntaven en Mowiol i es guardaven en obscuritat fins a ser quantificades per microscòpia de fluorescència.

### 3.4.4 Determinació de la concentració de proteïnes

La concentració de proteïnes es va determinar mitjançant el mètode colorimètric de Bradford amb un reactiu comercial (Biorad; Munich, Alemanya). Aquesta determinació es basa en la reacció d'una solució àcida del colorant blau de Coomassie en resposta a diferents concentracions de proteïnes. La concentració de proteïnes és directament proporcional a l'absorbància observada a la longitud d'ona de 595 nm. Com que el mètode Bradford és molt sensible al sèrum d'albúmina bovina (BSA), una solució d'aquesta proteïna s'aplicava com a corba estàndard en cada determinació, amb un punt màxim de 4.375 µg/mL.

### 3.4.5 Activitat de mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) del teixit intestinal va ser mesurada espectrofotomètricament tal i com està descrit.<sup>178</sup> El mètode es basa en la reacció de la tetrametilbenzidina (TMB), que és un substrat cromogènic que reacciona amb les peroxidases, catalitzada per la MPO.



La MPO és un enzim que es troba en els grànuls dels neutròfils, i s'ha demostrat que la presència d'aquest enzim en l'intestí és un mètode quantitatiu per a determinar la inflamació.<sup>179</sup>

El teixit intestinal es va homogenitzar en un 1mL de tampó sense detergent (3.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6.0) i es va centrifugar a 20.000g durant 20 minuts per a fer precipitar els grànuls que contenen la MPO, deixant les peroxidases inespecífiques en el sobrenedant. Posteriorment, es ressupenia el pellet amb 1 mL del tampó en presència del detergent hexadecil trimetil amonium bromide (HTMAB), trencant d'aquesta manera els grànuls. Després de sonicar s'incubaren les mostres durant 2 hores a 60°C per a destruir els inhibidors endògens de la MPO del teixit i es van centrifugar a 15.000 g durant 15 minuts. El sobrenedant es va recullir i, abans de la medicació, se li afegí la tetrametil benzidina (TMB) i l' $\text{H}_2\text{O}_2$  i es va procedir a la lectura del TMB oxidat a una longitud d'ona de 620 nm (lectures cada 20 segons durant 3 minuts).

### 3.4.6 Nivells de lipoperòxid

La peroxidació lipídica dels homogenats intestinals va ser determinada com un índex d'estrès oxidatiu mitjançant la reacció del tiobarbiturat, mesurant la formació de malondialdehid (MDA) tal i com està descrit.<sup>180,181</sup>

A les mostres homogenades en tampó (1.15% p/v KCl) se'ls hi afegia 2 mL d'àcid tricloroacètic (TCA). Després de barrejar i centrifugar 10 minuts a 3.000g al sobrenedant se li afegia 5 µl EDTA (0.14 mM), 40 µl BHT (0.2% p/v), 1mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (3%) i 0.6 mL de solució aquosa de tiobarbiturat (TBA 1%). Aquest sobrenedant era bullit durant 60 minuts i, després de parar la reacció amb gel, 0.6 mL de la mostra eren mesclats amb 0.6 mL de butanol i agitats. Després de centrifugar a 2.000 g durant 15 minuts, 200 µl de la fase butòlica superior eren carregats a una placa de 96 pouets i mesurada espectrofotomètricament la densitat òptica a 530 nm.

### 3.4.7 Real-Time RT-PCR

#### 3.4.7.1 Real-Time RT-PCR per SYBR Green

RT-PCRs quantitatives es van dur a terme en un *iCycler iQ Real-time-PCR detection System* (Biorad) utilitzant un kit de detecció de SYBR Green (Biorad), d'acord amb les instruccions del fabricant i seguint el protocol d'amplificació presentat a continuació (Taula 8).

Cicle	Descripció del cicle	Repeticions	Pas	Temperatura, °C	Temps
1	Desnaturalització	1	1	95	5 min
2	Hibridació i extensió	30-40	1	95	15 s
			2	50-60	45 s



3	Corba <i>melting</i>	80	3	72	2 min
			1	55	10 s
				0.5	

Taula 8. Protocol de PCR.

La detecció de l'amplificació amb la tècnica de SYBR Green es basa en la unió de dobles cadenes de DNA, que amb excitació emeten llum. És a dir que, quant més producte s'acumula, més fluorescència hi ha. Un problema que presenta aquesta tècnica és que el SYBR Green s'uneix a qualsevol doble cadena de DNA, inclosos possibles dímers formats pels *primers* mateixos o altres dobles cadenes generades per inespecificitats. Per aquesta raó, la corba de *melting* és molt important i s'ha d'interpretar amb precisió.

Les mostres eren preparades com s'indica a la Taula 9 per a dur a terme la tècnica, i sempre eren carregades per triplicat.

SYBR Green Supermix	10 µl
10 nmol <i>forward primer</i>	1 µl
10 nmol <i>reverse primer</i>	1 µl
Aigua lliure d'RNAsa	7 µl
cDNA	1 µl

Taula 9. Components per a detecció de l'amplificació per SYBR Green.

Com s'indica a la taula anterior (Taula 9), la *Real-Time* RT-PCR la realitzàvem a partir de cDNA de les mostres. Així doncs, abans de començar la tècnica s'havia d'aïllar l'RNA de les cèl·lules o del teixit corresponent i, posteriorment, sintetitzar el seu cDNA, tal i com s'indica a continuació.

### 3.4.7.2 Aïllament de RNA

L'RNA total dels neutròfils es va aïllar utilitzant el RNeasy mini kit (Qiagen; Barcelona, Espanya) seguint el protocol recomanat. En primer lloc, les cèl·lules es lisaven amb un tampó desnaturalitzant, que inactivava les RNases per a assegurar-nos un RNA intacte. Seguidament s'afegia el mateix volum d'etanol per a obtenir les òptimes condicions d'unió a les membranes de les columnes *Mini spin* del kit. Els lisats s'afegien llavors a la columna, on l'RNA s'unia a la membrana, i els contaminants eren eliminats mitjançant una sèrie de centrifugacions. Finalment l'RNA quedava dissolt en 30 µl d'aigua lliure d'RNases.

En el cas del teixit intestinal, l'RNA era extret mitjançant el reactiu de TRIzol (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Aproximadament 50 mg de teixit intestinal eren homogenitzats en 1 mL de TRIzol, i el material insoluble era eliminat de la mostra per mitjà d'una centrifugació de

10 min a 12.000 g i 4°C. El sobrenedant d'aquesta centrifugació contenia l'RNA. Seguidament, s'afegia cloroform i es centrifugava a 12.000 g durant 15 min a 4°C, de manera que es formaven tres fases separades. En la fase aquosa es trobava l'RNA, que precipitava mitjançant l'addició d'isopropanol. Després d'una centrifugació l'RNA es trobava en el pellet, el qual es rentava afegint etanol al 75% i centrifugant a 7.500 g durant 5 min a 4°C. Amb el pellet resultant es començava el protocol d'aïllament de RNA com si de cèl·lules es tractés, per a obtenir un RNA el més pur possible.

Les concentracions de RNA es calculaven a partir de les mesures de  $A_{260}$  realitzades en un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Wilmington, Estats Units). Per a assegurar-nos que no hi havia impureses ni restes de proteïnes en les mostres, es determinava també l' $A_{280}$ , de manera que es calculava l' $A_{260}/A_{280}$ . Un resultat entre 1.8-2.0 era considerat com a òptim.

### 3.4.7.3 Síntesi de cDNA

El DNA complementari (cDNA) es va sintetitzar utilitzant el iScript cDNA synthesis Kit (Biorad) seguint el protocol que recomanava la casa comercial (Taula 10).

5x iScript Reaction Mix	4 $\mu$ l
iScript Reverse Transcriptase (RT)	1 $\mu$ l
Aigua lliure de RNAses	15 $\mu$ l
RNA (1 $\mu$ g)	x $\mu$ l

**Taula 10.** Components per a la síntesi de cDNA seguint les instruccions del fabricant.

La transcriptasa reversa (iScript Reverse Transcriptase) s'utilitza per a generar un cDNA a partir de RNA. Aquest enzim és una DNA polimerasa RNA dependent aïllada d'un retrovirus (MMLV). Afegint l'iScript Reaction Mix, que conté tots quatre deoxinucleotids trifosfats, ions fosfat i ions magnesi i un pH neutre, la transcriptasa reversa sintetitza un cDNA d'acord amb el mRNA que s'ha afegit i que és la seva diana. Les condicions per a la reacció es van optimitzar utilitzant un termociclador MyCycler (Biorad) seguint el procediment descrit en la taula 11.

cicle	Temperatura, °C	Temps, min	Funció
1	25	5	Retrotranscripció Inactivació RT
2	42	30	
3	85	5	
4	4	$\infty$	

**Taula 11.** Protocol de síntesi de cDNA.

### 3.4.7.4 Primers utilitzats

Els primers utilitzats per a dur a terme les Real-Time RT-PCR es mostren en la taula 12, on també s'indica la mida (en parells de bases – bp) i la temperatura d'hibridació, així com la casa comercial que els proveeix.

Gen	Proveïdor	Seqüència	T <sup>a</sup> hibridació, °C	Mida, bp
Mn_GADPH		5'-TGA-AGC-AGG-CAT-CTG-AGG-C-3'		
	Invitrogen		50	102
NM_008084		Revers: 5'-CGA-AGG-TGG-AAG-AGT-GGG-AG-3'		
Rn_GADPH		5'-CCG-CCA-ATG-TAT-CCG-TTG-TG-3'		
	Invitrogen		48	207
NM_017008		Revers 5'-TAG-CCC-AGG-ATG-CCC-TTT-AGT-3'		
Rn_Lcn2		5'-CAA-GTG-GCC-GAC-ACT-GAC-TA-3'		
	Invitrogen		48	192
NM_008491		Revers 5'-GGT-GGG-AAC-AGA-GAA-AAC-GA-3'		
Rn_IL-10				
	Qiagen	Quantitec primer assay	50	69
NM_012854				
Rn_Tp53				
	Qiagen	Quantitec primer assay	50	80
NM_030989				
Mn_Wnt3a				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	86
NM_009522				
Mn_Wnt5a				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	178
NM_009524				

Mn_Wnt1				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	125
NM_0.21279				
Mn_Gapdh				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	140
NM_008084				
Mn_Slc2a1				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	141
NM_011400				
Mn_Vegfa				
	SABiosciences	RT <sup>2</sup> qPCR primer assay	60	191
NM_009505				

Taula 12. Primers utilitzats en les Real-Time RT-PCR.

### 3.4.8 Silenciació de RNA

L'RNA d'interferència (RNAi) és considerat com un mecanisme natural de silenciació gènica utilitzat en recerca degut a la seva alta especificitat, versatilitat i eficiència. La utilització de RNAi va ser descrita per primera vegada en el nemàtode *C. elegans* al 1993.<sup>182</sup>

La silenciació gènica es realitza mitjançant una petita seqüència de RNA anomenada *small interfering RNA* (siRNA), formada per dues cadenes simples de 19-21 nucleòtids de llargada. Una vegada s'ha dut a terme la transfecció en una cèl·lula, els dúplex de siRNA es separen en el citoplasma mitjançant un complex multiprotèic anomenat RISC (*RNA-induced silencing complex*). Aleshores, aquest RISC s'uneix a les molècules complementàries de RNA degut a l'emparellament de la seqüència de siRNA anti-sentit amb la seqüència de mRNA. Aquest mRNA unit al complex és aleshores degradat i, per tant, no es pot formar la proteïna (Figura 21).

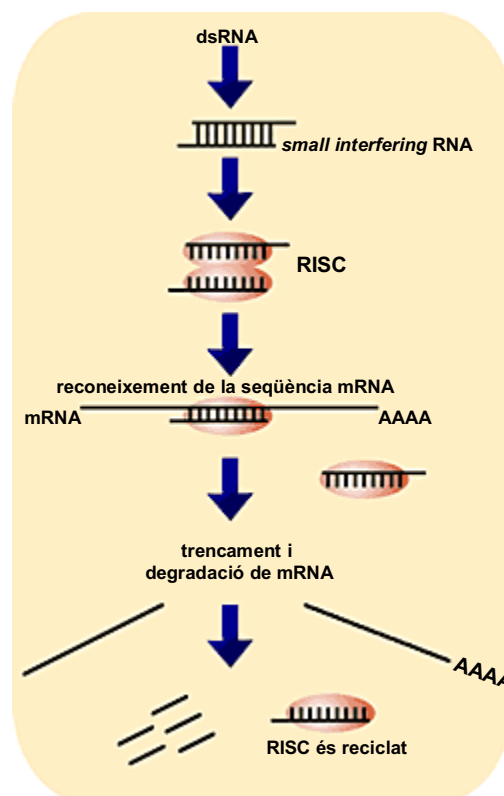
Les dobles cadenes sintètiques d'oligonucleòtids de siRNA van ser incorporades als neutròfils mitjançant el reactiu Lipofectamina 2000, seguint les indicacions del fabricant (Invitrogen). Els neutròfils eren cultivats en 2mL de medi en plaques de 6 pouets a una densitat de  $1.5 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. Per a cada pouet silenciats, 50 µl de siRNA (20 mM) eren dissolts en 500 µl de medi sense sèrum ni GM-CSF i incubats durant 15 minuts a 37°C. Per altra banda, 5 µl de lipofectamina eren dissolts en 250 µl de medi en les mateixes condicions i incubats també durant 15 minuts a 37°C. Passat aquest temps, les dues solucions eren mesclades i incubades 15 minuts més a 37°C. L'absència de sèrum i de GM-CSF era per evitar qualsevol possible interferència en l'eficiència de

la transfecció. Al final d'aquest període d'incubació, els neutròfils cultivats eren centrifugats i ressuspesos en 750 µl de la solució amb 1.250 µl de medi sense sèrum ni GM-CSF. D'aquesta manera les cèl·lules eren cultivades en 2 mL de volum final en les plaques de 6 pouets. Aquests neutròfils amb el medi de silenciament eren cultivats durant 6 hores a 37°C en l'incubador normal. Després d'aquest període, les cèl·lules eren centrifugades i ressuspeses en medi complet. L'eficiència de les transfeccions es mesurava mitjançant Real-Time RT-PCR del gens silenciats. En els experiments de silenciament sempre s'afegia un control negatiu dúplex de RNAi com a control intern de la transfecció (Stealth RNAi negative control; Invitrogen).

Els oligonucleòtids de siRNA utilitzats van ser els següents:

*24p3*: 5'- GCC CAG GAC UCA ACU CAG AAC UUG A - 3' (Invitrogen)

*SPHK2*: Mm\_Sphk2\_1 HP siRNA validat (Qiagen)



**Figura 21.** Esquema representatiu del mecanisme de silenciament gènic.

### 3.4.9 ELISA

La quantificació de la proteïna *24p3* es va dur a terme mitjançant la tècnica d'ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent assay*), tant en els sobrenedants cel·lulars com en els homogenats intestinals. Aquesta tècnica permet la detecció d'una proteïna mitjançant la unió a un anticòs específic. Hi ha diversos mètodes de detecció en aquesta tècnica, en aquest cas, per a la detecció de la proteïna *24p3* es va utilitzar el sistema d'avidina-biotina. La biotina és una molècula que pot

ser fàcilment enganxada a un anticòs o a un antigen, mentre que l'avidina es pot conjugar amb enzims. Aquestes dos molècules, a més, s'uneixen entre sí de manera molt específica.

Els sobrenedants cel·lulars es van obtenir després de centrifugar les mostres a 3.500 r.p.m durant 5 minuts. El teixit intestinal es va homogenitzar en un tampó de lisis (PBS, pH:7.0, 2 $\mu$ M PMSF, cocktail inhibidor de proteases) i es va centrifugar a 15.000 g durant 15 minuts a 4°C, deixant les proteïnes a mesurar en el sobrenedant.

Una placa d'ELISA de 96 pouets era coberta amb l'anticòs anti-Lcn2 de ratolí/Lcn2 anticòs monoclonal (R&D systems) durant 1 hora a temperatura ambient (o *overnight* en càmera freda). Passat aquest temps, la placa era rentada en un tampó de rentat i 100  $\mu$ l de les mostres eren afegides a la placa i incubades durant una hora a temperatura ambient (de manera que la proteïna que es volia determinar s'unia al seu anticòs específicament). Després de rentar, s'afegia l'anticòs biotinitat anti-Lcn2 de ratolí/anticòs Lcn2 (R&D systems). Posteriorment, i després de rentar la placa, s'afegia l'avidina conjugada amb HRP (*Horseradish peroxidase*) (Invitrogen) i es deixava incubar una hora, permetent la unió entre la biotina i l'avidina. Finalment s'afegia a la placa el reactiu colorant (OPD Tablets)(Dako; Glostrup, Dinamarca) que feia de substrat per la peroxidasa, juntament amb 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i es mesurava la formació de color a 490nm.

#### 3.4.10 WESTERN BLOT

La tècnica de Western blot permet la detecció de proteïnes d'extractes cel·lulars o de teixits homeogenats immobilitzant-les en una membrana sintètica. Les proteïnes són inicialment separades mitjançant una electroforesi en un gel de poliacrilamida i posteriorment transferides mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric perpendicular al gel a una membrana sintètica. Seguidament es saturen tots els llocs d'unió de proteïnes de la membrana per a evitar la unió no específica dels anticossos i s'incuba la membrana amb l'anticòs primari de la proteïna d'interès. Una vegada finalitzada aquesta incubació, es torna a incubar la membrana amb un anticòs secundari normalment unit a un enzim (com ara una peroxidasa) que actua de lligant de l'anticòs primari. Finalment les bandes de proteïnes es fan visibles amb els substrats apropiats per l'enzim de l'anticòs secundari, emetent llum.

Per a la detecció de la proteïna  $\beta$ -catenina, les mostres (100  $\mu$ g) eren diluïdes en 4X SDS-PAGE sample buffer (250mM TRIS, pH:6.9, 4% SDS, 20% glicerina, 2 mM DTT, 0.004% Bromofenolblau) i desnaturalitzades a 95°C durant 10 minuts seguits de 5 minuts en gel. Les proteïnes eren llavors carregades en el gel de poliacrilamida al 10% (taula 13) amb 1X SDS running buffer (Running buffer 10X: 250mM Tris base, 1.0 M glicina, 0.05M SDS). Per a la detecció de la proteïna HIF-1 $\alpha$  les mostres eren carregades en un gel de poliacrilamida al 7.5% (taula 13).

Al gel d'acrilamida se li aplicava llavors corrent elèctric (100V) durant 120 minuts de manera que les proteïnes de les mostres es separaven entre sí segons el seu pes. Una vegada transcorregut aquest temps, les proteïnes eren transferides a una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant una

transferència semi-humida en el cas de la  $\beta$ -catenina durant 50 minuts a 70 mA en un tampó especial de transferència (0.025 M Tris base, 0.192 M glicina, 25% MeOH en aigua milliQ). Pel que fa a la proteïna HIF-1 $\alpha$ , la transferència era humida, a un voltatge de 100V durant 90 minuts. Una vegada transferides les proteïnes a la membrana, es comprovava la tècnica mitjançant la tinció de Ponceau (Sigma-Aldrich). Aquesta tinció permet visualitzar de manera ràpida i reversible les bandes de proteïnes en una membrana de nitrocel·lulosa. Una vegada visualitzades les bandes es feia desaparèixer aquesta tinció mitjançant rentats amb 0.6% Tween TBS (TTBS).

	Gel inferior (10%)	Gel inferior (7.5%)	Gel superior (4%)
Acrilamida 40%	2.5 mL	1.87 mL	400 $\mu$ l
SDS 10%	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Perosulfat d'amoni (APS) (0.1 g/mL aigua milliQ)	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	14 $\mu$ l	14 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Aigua milliQ	4.9 mL	5.53 mL	2.6 mL
Tris inferior (1.5M Tris/HCl pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	-
Tris superior (0.5 M Tris pH:6.8)	-	-	1 mL

**Taula 13.** Components dels gels de poliacrilamida.

Una vegada rentada la membrana, es bloquejaven les unions inespecífiques amb tampó de bloqueig (5% llet en TTBS) durant 45 minuts. Seguidament, s'incubava la membrana amb l'anticòs primari monoclonal de ratolí Anti- $\beta$ -catenina (BD biosciences; Madrid, Espanya) a una concentració 1:400 o amb l'anticòs primari de conill Anti-HIF-1 $\alpha$  a una concentració 1:1000 (Novus Biologicals; Cambridge, Regne Unit) en TTBS/5% llet durant dues hores a temperatura ambient o *overnight* a 4°C. Passat aquest temps la membrana era rentada tres vegades amb TTBS i incubada amb l'anticòs secundari anti-ratolí o anti-conill respectivament conjugat amb peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una concentració 1:1000 en TTBS/5% llet durant una hora a temperatura ambient. Una vegada finalitzada aquesta incubació la membrana era rentada tres vegades en TTBS i la detecció de proteïnes després d'afegir el substrat Luminol (Biorad) es duia a terme en un Quantity One imaging system (Biorad).

En la mateixa membrana es detectava també la proteïna Actina (anti-actin; Sigma-Aldrich) o la proteïna GAPDH (anti-gapdh; Sigma-Aldrich) com a marcador de càrrega per a comprovar que s'havia carregat la mateixa quantitat de proteïna en tots el carrils del gel.

### 3.4.11 Activitat de les esfingosina kinases (SPHK1 i SPHK2)

Les esfingosina kinases (SPHKs) fosforilen l'esfingolípide esfingosina (SP) i el converteixen en esfingosina-1-fosfat (S1P). Per mesurar l'activitat d'aquests dos enzims (SPHK1 i SPHK2) varem utilitzar la tècnica de l'assaig enzimàtic fluorescent, tal i com està descrit.<sup>183</sup> Per a aquesta tècnica s'utilitza una esfingosina unida a un grup fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD). Aquest derivat de l'esfingosina té tres grups metilè menys que l'SPH natural i, a més, conté un grup NH que fa la funció de *linker*. Aquest derivat de l'esfingosina s'incuba amb les mostres que es volen analitzar i, després de barrejar bé la mescla es mesura la formació del NBD-S1P fluorescent dels sobrenedants com a marcador d'activitat de les esfingosina kinases.

Les mostres de neutròfils van ser trencades mitjançant sonicació (1 minut) en un tampó de lisis (50 mM TRIS, pH 7.4, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 40 mM 0.44% NaPyroP, 15 mM  $\beta$ -glicerofosfat, 1X cocktail inhibidor de proteases, 2 mM DTT, 2mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF) i la concentració de proteïnes mesurada mitjançant el mètode de Bradford. 10  $\mu\text{l}$  de mostra lisada com a màxim o 15  $\mu\text{l}$  de sobrenedant cel·lular s'afegiren a 100  $\mu\text{l}$  del tampó de la esfingosina a analitzar (Taula 14) i van ser incubats a 30°C durant una hora.

Tampó SPHK1	Tampó SPHK2
50 mM HEPES	50 mM HEPES
15 mM $\text{MgCl}_2$	15 mM $\text{MgCl}_2$
1% Triton-X-100	1 M KCl
1X cocktail inhibidor de proteases	1X cocktail inhibidor de proteases
1 mM ATP	1 mM ATP
10 mM NaF	10 mM NaF
1.5 mM semicarbazida	1.5 mM semicarbazida
10 $\mu\text{M}$ NBD-esfingosina	10 $\mu\text{M}$ NBD-esfingosina
pH: 7.4	pH: 7.4

**Taula 14.** Tampons per a l'anàlisi de l'activitat de les SPHKs.

Passat aquest temps es van afegir 100  $\mu\text{l}$  de tampó de fosfat de potassi (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH: 8.5) i 500  $\mu\text{l}$  de cloroform/metanol (2:1), i les mostres es van vortejar durant 10 segons. Finalment les mostres es van centrifugar durant 1 minut a 15.000 g i 100  $\mu\text{l}$  de la fase aquosa superior dels centrifugats es van dispensar en una placa de 96 pouets opaca. La intensitat de fluorescència es va mesurar a 485 nm d'excitació i 538 nm d'emissió.



### 3.5 HISTOLOGIES I TINCIIONS

#### 3.5.1 Hematoxilina/Eosina

El teixit intestinal era inclòs en blocs de parafina, tallat en seccions de 5 µm i tenyit amb la tinció d'hematoxilina/eosina. Aquest mètode permet l'anàlisi morfològic d'un teixit ja que l'hematoxilina (tint bàsic) tenyeix el nucli, que són àcids, de color blau, mentre que l'eosina (tint acídic) tenyeix els components citoplasmàtics així com els eritròcits d'un color vermell intens.

Amb aquesta tècnica, en un microscopi òptic, s'analitzava el grau de dany que presentava un teixit intestinal basant-nos en la classificació de Park<sup>12</sup>.

#### 3.5.2 Tinció de Giemsa May-Grünwalds

La tinció de Giemsa May-Grünwalds és un procediment molt utilitzat en hematologia, ja que tenyeix de manera diferencial el nucli i el citoplasma de les cèl·lules sanguínies. La solució bàsica (Giemsa) tenyeix el nucli de les cèl·lules degut a les càrregues negatives dels grups fosfat de les molècules de DNA i RNA, així com també tenyeix els grànuls citoplasmàtics dels neutròfils.

Per a dur a terme la tinció es realitzava de manera regular una citocentrifugació per tal de situar les cèl·lules en suspensió en un portaobjectes. Una vegada els neutròfils es trobaven enganxats en el portaobjectes s'afegien 50 µl de la solució de May-Grünwalds 1.5 min. Una vegada passat aquest temps, el portaobjectes era rentat en aigua corrent i s'afegien 50 µl de la solució de Giemsa, prèviament diluïda 1:10 en aigua destil·lada, 10 min. Passat aquest temps, el portaobjectes tornava a ser rentat en aigua corrent i, una vegada seca la mostra es procedia al muntatge amb el medi de muntatge específic DPX (Sigma-Aldrich). Una vegada muntada, la mostra era visualitzada en el microscopi òptic.

#### 3.5.3 Immunofluorescència de *24p3*

Per a visualitzar la proteïna *24p3* en els neutròfils, es va fer servir la tècnica de microscòpia d'immunofluorescència. Els neutròfils (50.000 cèl·lules) eren enganxats en un portaobjectes mitjançant una citocentrifugació a 1.000 r.p.m. durant 10 minuts. Una vegada feta la centrifugació les mostres eren fixades amb 4% paraformaldehid/PBS a 4°C durant 5 minuts i permeabilitzades posteriorment amb acetona en les mateixes condicions. La mostra era aleshores bloquejada durant 60 minuts amb sèrum de cabra i rentada amb PBS. L'anticòs primari (1:500) anti-*Lcn2* de ratolí/*Lcn2* anticòs monoclonal (R&D systems) diluït en PBS amb 2% sèrum de cabra era afegit a la mostra i es deixava incubar durant 60 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps es feien tres rentats amb PBS i s'afegia l'anticòs secundari cabra anti-rata (Invitrogen) 1:1000 dil·luït en sèrum de cabra durant 30 minuts en condicions de foscor. Posteriorment es retirava la resta d'anticòs mitjançant dos rentats amb PBS i la mostra es muntava amb mowiol per a poder ésser visualitzada en el microscopi de fluorescència.

### 3.5.4 Immunocitoquímica de $\beta$ -catenina

Els neutròfils citocentrifugats eren incubats amb l'anticòs de ratolí anti- $\beta$ -catenina a dil·lució 1:50 durant una hora a temperatura ambient seguit per una incubació amb l'anticòs secundari biotinilat de cabra anti-ratolí IgG (Vector Laboratories; Burlingame, Estats Units) a dil·lució 1:100 durant una hora més. Després de diversos rentats les mostres es van tenyir amb el mètode d'avidina-peroxidasa conjugada durant una hora en càmera humida i finalment es va afegir la solució DAB (Vector Laboratories) com a substrat.

Per a poder visualitzar els nuclis cel·lulars, es va realitzar una contratinció d'aquests amb hematoxilina per a complementar el procediment.

### 3.5.5 Tinció de les mitocòndries (MITOTRACKER)

Les mitocòndries dels neutròfils en suspensió van ser visualitzades per microscòpia de fluorescència mitjançant la tinció de Mitotracker (Invitrogen) seguint les indicacions de la casa comercial. Aquesta tècnica tenyeix les mitocòndries cel·lulars mitjançant un producte que no és fluorescent en solucions aquoses, essent només fluorescent quan s'acumula en un ambient lipídic com ara la mitocòndria. D'aquesta manera, la fluorescència inespecífica és pràcticament negligible.

Els neutròfils ( $3 \cdot 10^6$  cèl·lules) que eren cultivats en un pouet d'una placa de sis pouets eren centrifugats (3.500 r.p.m 5 minuts) i ressuspesos en medi de cultiu pre-calentat (37°C) contenint 500nM de Mitotracker. Les cèl·lules eren incubades en un pouet d'una placa de sis pouets en fosc durant 45 minuts en condicions de creixement (en incubador). Passat aquest temps, es recollien les cèl·lules i es tornaven a centrifugar i a ressuspendre en medi de cultiu pre-calentat i tornaven a ser dispensades en un pouet de la mateixa placa. Finalment les cèl·lules eren visualitzades a 490 nm en un microscopi de fluorescència invertit Leica.

## 3.6 ANÀLISIS ESTADÍSTICS

L'estudi estadístic es va realitzar mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA) i la determinació del nivell de significança estadística amb el test Newman-Keuls. Els resultats es presenten com a mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM) i els  $p$  valors menors de 0.05 es van considerar significants.

NaCl: 12.1 g / 100 ml  
TRES: 12.1 g / 100 ml  
→ 100 ml  
→ 50 ml

5 ml ·  $\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$  ·  $\frac{18.1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}$  ·  $\frac{1000 \text{ mmol}}{1000 \text{ mmol}}$  = 292 mg NaCl  
5 ml ·  $\frac{50 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}}$  ·  $\frac{121.1 \text{ g}}{1000 \text{ mmol}}$  = 3017 mg TRES  
10 ml TWEEN 80

# 4. RESULTATS



## 4. RESULTATS

### 4.1 Objectiu 1. Estudi 1. Caracterització de l'apoptosi dels neutròfils en la inflamació induïda per la isquèmia/reperfusió.

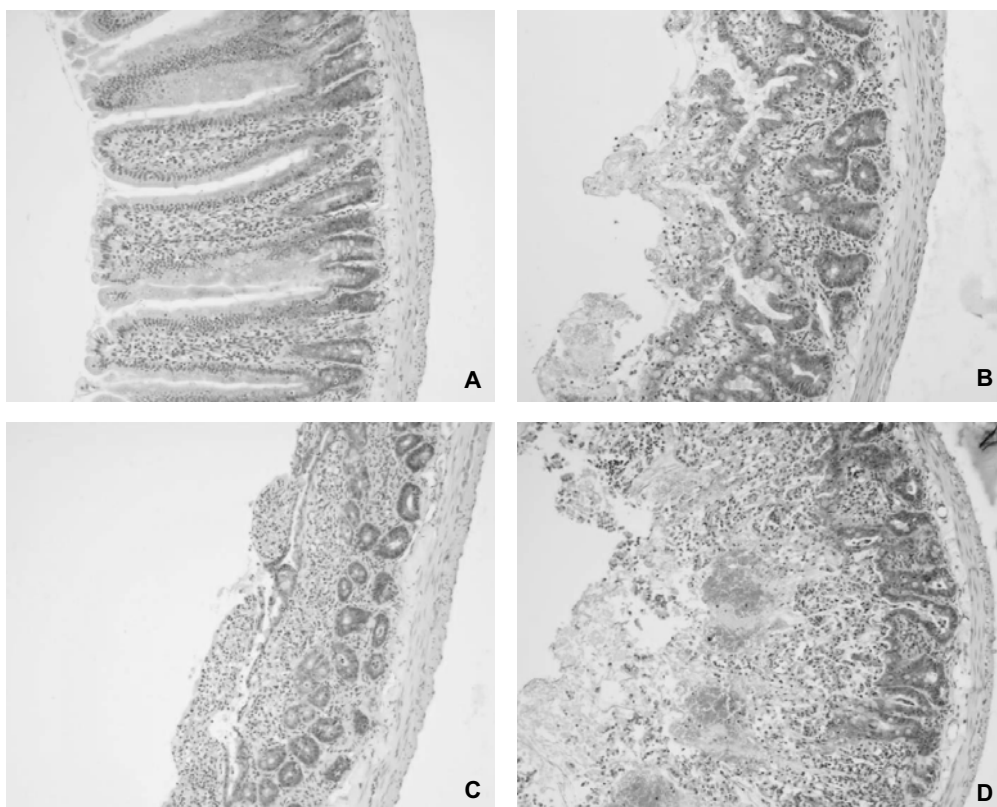
L'acumulació de neutròfils és una de les característiques més ben definides dins de les alteracions microvasculars associades al dany per isquèmia/reperfusió i que juga un paper principal en els fenòmens d'inflamació associats a la síndrome.

Curiosament durant una IR intestinal, encara que està molt ben documentada la gran migració i acumulació de neutròfils, no s'ha determinat si aquestes cèl·lules presenten, igual que en el cas d'altres teixits sotmesos a hipòxia o isquèmia, un retard en l'apoptosi constitutiva.

Per assolir aquest primer objectiu es van utilitzar dues soques de rates prèviament descrites, una com a sensible als processos isquèmics (Sprague Dawley, SD) i l'altre com a resistent en front al dany per isquèmia (Brown Norway, BN)

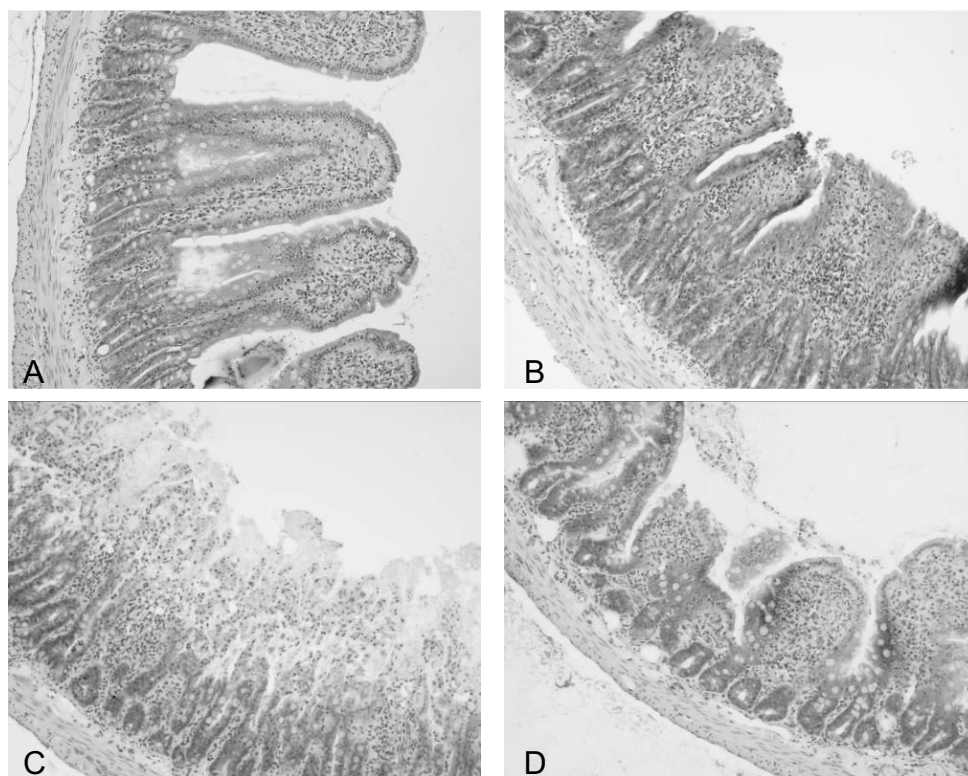
#### 4.1.1 L'apoptosi retardada dels neutròfils es relaciona amb la sensibilitat a la isquèmia.

Amb la finalitat d'obtenir el grau de dany més idoni per l'estudi tenint en compte un procés isquèmic suficient per provocar una inflamació però no excessiu per provocar una pèrdua de teixit, es varen realitzar en les dues soques diferents insults isquèmics. El grau de dany es va avaluar mitjançant mostres histològiques (Figura 22, 23 i Taula 15) i determinant la mort per apoptosi del teixit intestinal. Així els resultats reflexen que en la soca SD les isquèmies de 45 minuts i de 90 minuts amb reperfusions de 180 i 60 minuts respectivament provoquen un dany histològic de grau 4-5 en l'escala de Park, caracteritzat principalment per la pèrdua de villi i exposició de la làmina pròpia (Figures 22B i C). El grup amb un insult més sever (I90/R180) presentava un dany més elevat de grau 6, caracteritzat per la destrucció del villi i dany en les criptes intestinals (Figura 22D). Com era d'esperar el grup sham (Figura 22A) no va mostrar dany tissular, presentant un patró histològic normal.



**Figura 22.** Tinció Hematoxilina/eosina per avaluar el dany histològic en els diferents grups de rates Sprague Dawley. A- grup sham, B- grup I45/R180, C- grup I90R60, D- grup I90/R180.

Seguint la mateixa classificació histològica, els grups de la soca BN va presentar clarament menys dany histològic que la soca SD. Les rates del grup I45/R180 (Figura 23B) presentaven un dany de grau 3 a l'escala de Park exhibint zones amb grans espais sub-epitel·lials, mentre que les sotmeses a una isquèmia de 90 minuts amb una reperfusió de 60 minuts (I90/R60) (Figura 23C) presentaven la lesió més greu (grau 4), amb pèrdua de vellositats. Per la seva banda, les rates del grup I90/R180 (Figura 23D) presentaven un dany de grau 3-4, amb pèrdua de l'epiteli de les vellositats i zones amb grans espais sub-epitel·lials. Les rates sham presentaven un patró histològic normal (Figura 23A).



**Figura 23.** Mostres histològiques de teixit intestinal de rates Brown Norway tenyides amb hematoxilina/eosina. A- grup sham, B- I45/R180, C- grup I90/R60, D- grup I90/R180.

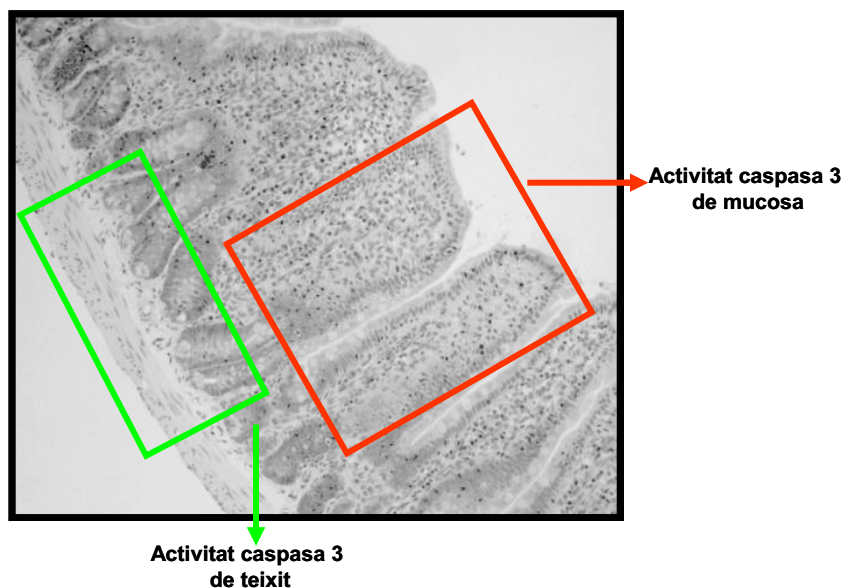
Per tant, les rates Sprague Dawley són més sensibles al dany provocat pel procediment d'IR intestinal.

GRUP	SOCA	DANY (segons Park)	CARACTERÍSTIQUES
SHAM	SD	0	Patró histològic normal. Vellositats allargades amb epitelí normal
	BN	0	Patró histològic normal. Vellositats allargades amb epitelí normal
I45/R180	SD	4-5	Destrucció massiva de les vellositats amb exposició de la làmina pròpia
	BN	3	Zones amb grans espais sub-epitelials i denudació del vèrtex de les vellositats
I90/R60	SD	4-5	Destrucció massiva de les vellositats amb exposició de la làmina pròpia. Pèrdua de teixit vellositari
	BN	4	Lifting massiu de les vellositats i pèrdua de villi
I90/R180	SD	6	Destrucció i pèrdua massiva del villi amb dany a la cripta intestinal.
	BN	3-4	Zones amb grans espais sub-epitelials i zones amb un massiu desprendiment de l'epitelí

**Taula 15.** Taula de dany per IR segons la classificació de Park. SD: Sprague Dawley, BN: Brown Norway.

En els mateixos grups es va analitzar l'activitat de caspasa 3 en homogenats de teixit intestinal (Figura 25) i de mucosa intestinal (Figura 26) com un índex de mort cel·lular i dany tissular mitjançant la tècnica del trencament del substrat DEVD-AMC per fluorimetria.

La següent figura (Figura 24) mostra de manera esquemàtica les zones diferenciades on s'ha mesurat l'activitat de caspasa 3.



**Figura 24.** Esquema representatiu de les seccions d'intestí on es va analitzar l'activitat de caspasa 3 amb tècnica fluorimètrica com a indicador de dany intestinal.

En la soca SD (Figura 25A), l'activitat de caspasa 3 en els teixits homogenats dels grups I45/R180 i I90/R60 presentava un increment significatiu respecte al grup sham, mentre que el grup d'insult isquèmic més sever (I90/R180) presentava uns valors inferiors respecte els altres grups isquèmics. Aquesta disminució era deguda a un major grau de necrosi.

Per la seva banda, en la soca BN (Figura 25B) els resultats mostraven com una IR intestinal en aquestes rates no comporta un augment significatiu de l'activitat de caspasa 3 en el teixit de l'intestí respecte les rates sham. De manera semblant al que succeïa amb la soca SD, el grup I90/R180 presentava també una disminució en l'activitat de caspasa 3, que s'explica amb un augment en l'estat necròtic del teixit.

Els resultats d'activitat de caspasa 3 tissulars confirmen les dades obtingudes prèviament amb les mostres histològiques, concluint que la soca Brown Norway presenta una major resistència al dany produït per una IR intestinal.

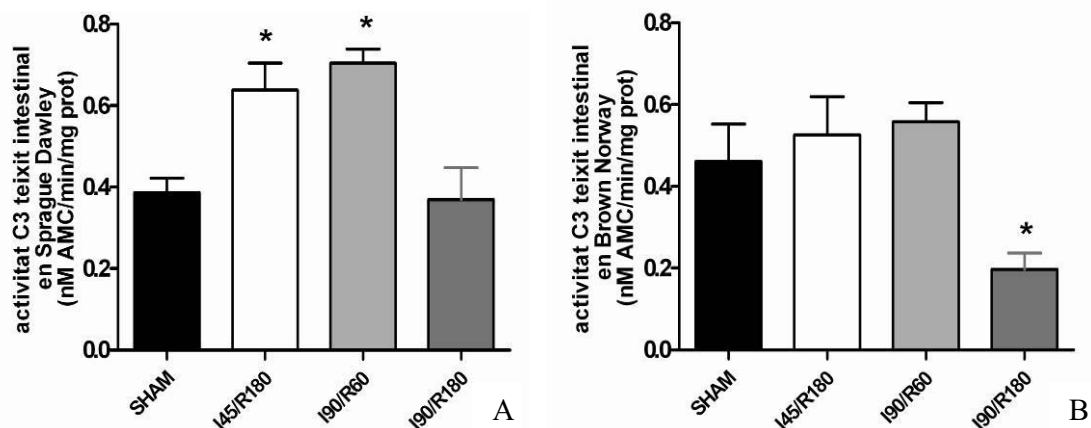
---

soca SD

---

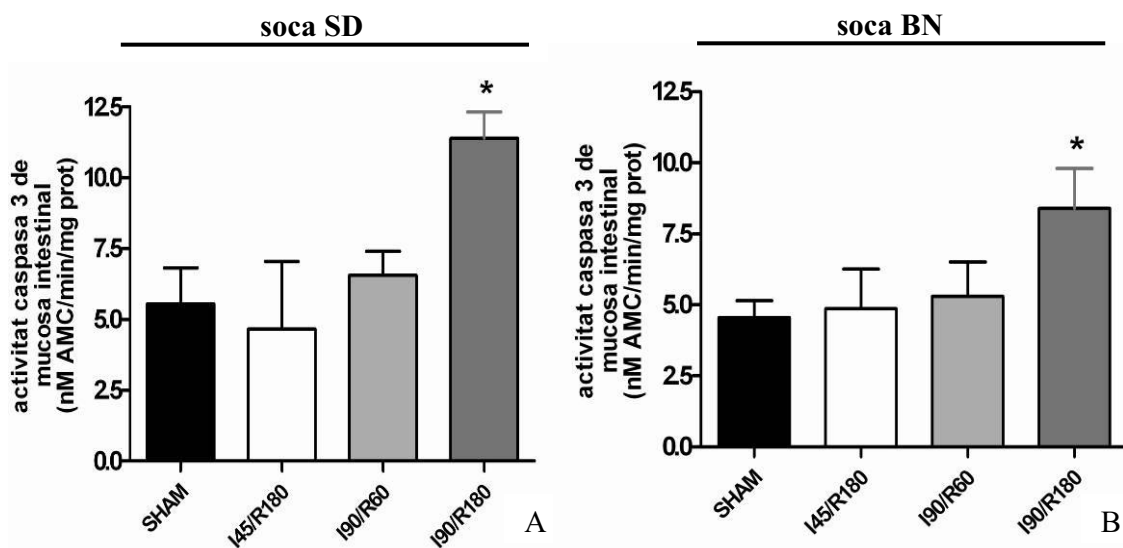
soca BN





**Figura 25.** Activitat de caspasa 3 en homogenats de teixit intestinal (nM AMC/min/mg proteïna). A- soca Sprague Dawley, B- soca Brown Norway. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham.

Seguidament es va mesurar també l'activitat de caspasa 3 en la mucosa intestinal (Figura 26), la qual presentava un major increment en el grup I90/R180, mentre que la resta de grups presentaven valors similars als del grup sham.

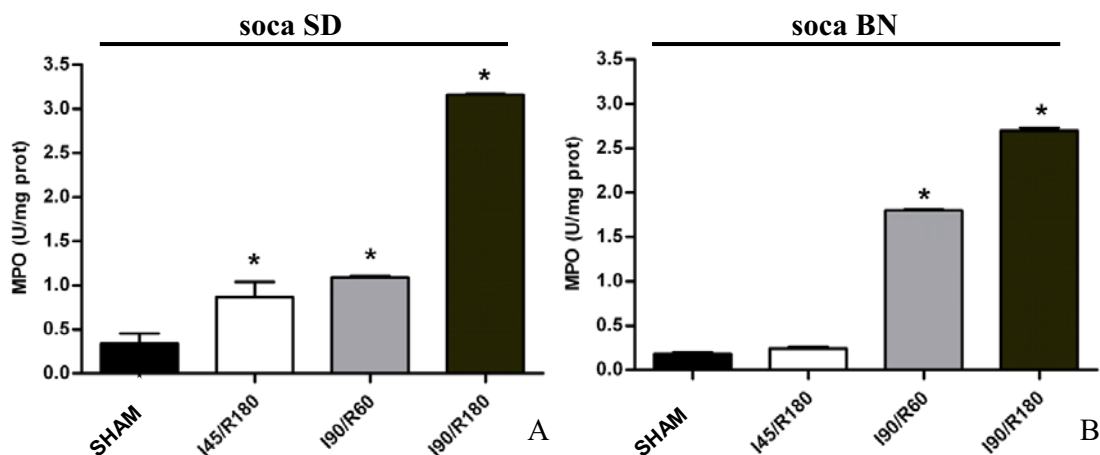


**Figura 26.** Activitat de caspasa 3 en homogenats de mucosa intestinal (nM AMC/min/mg proteïna). A- soca Sprague Dawley, B- soca Brown Norway. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham.

Aquest resultat venia a confirmar el fet de que el grup I90/R180 és el que presentava un dany més elevat.

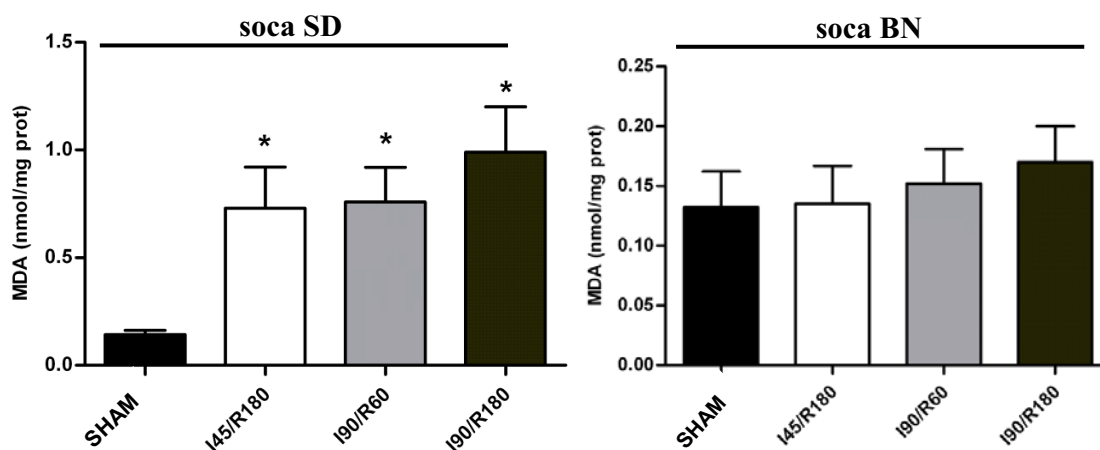
Com a índex d'inflamació intestinal es va mesurar l'activitat de la mieloperoxidasa en tots els grups de l'experiment (Figura 27). Aquest paràmetre mostra també el grau més elevat després d'una isquèmia de 90 minuts seguida per una reperfusió de 180 minuts, en les dues soques, tot i que en la soca BN el valor és considerablement més baix. El grup I45/R180 mostrava una elevada

inflamació en la soca SD, mentre que en la soca BN els valors eren similars als del grup sham, confirmant la resistència d'aquesta soca en front el dany isquèmic.



**Figura 27.** Nivells de mieloperoxidasa intestinal. A- soca Sprague Dawley. B- soca Brown Norway. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham.

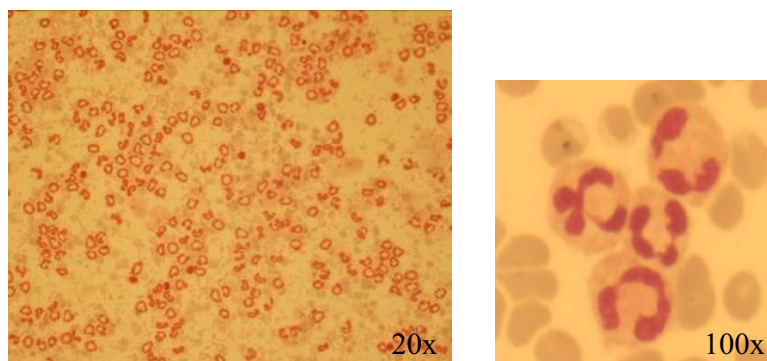
El dany tissular es va determinar mesurant els nivells de malondialdehid (MDA) com un índex de lipoperoxidació (Figura 28). La soca SD presentava valors significativament elevats de MDA en els tres grups IR respecte al grup sham, mentre que la soca BN tornava a mostrar la seva menor afectació per la isquèmia no mostrant diferències significatives entre els grups.



**Figura 28.** Valors de malondialdehid. A- soca Sprague Dawley. B- soca Brown Norway. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham.

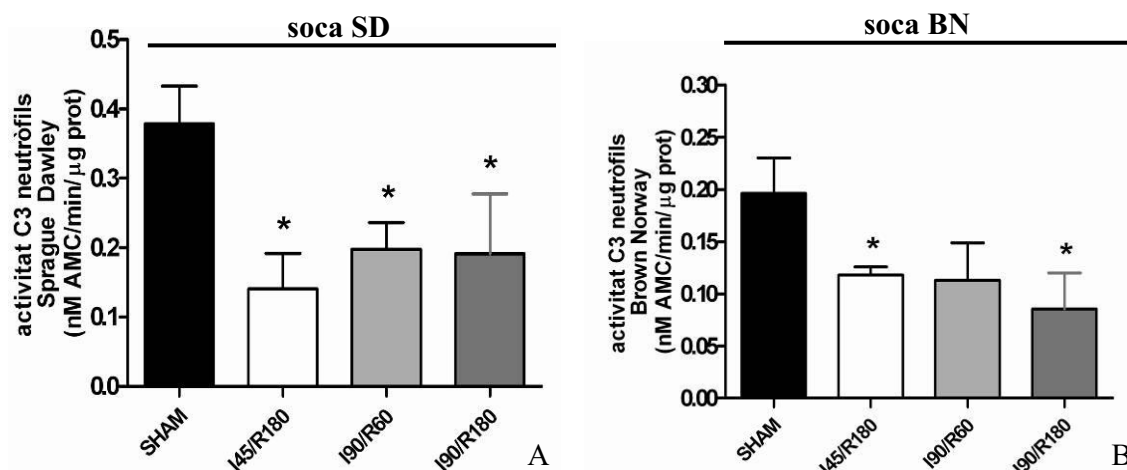
#### 4.1.2 L'apoptosi dels neutròfils circulants es troba retardada després d'una IR intestinal.

Una vegada determinat el dany intestinal produït per la IR en les dues soques de rata, es va voler caracteritzar l'estat apoptòtic dels neutròfils circulants en ambdues soques. Com a comprovació de la puresa de l'aïllament dels neutròfils de sang circulant, es van realitzar tincions de Giemsa May-Grünwalds aconseguint una puresa de neutròfils sanguinis d'un 90% aproximadament, tal i com es mostra a la Figura 29.



**Figura 29.** Imatges representatives a diferents augments de la tinció de Giemsa May-Grünwalds en neutròfils aïllats de sang.

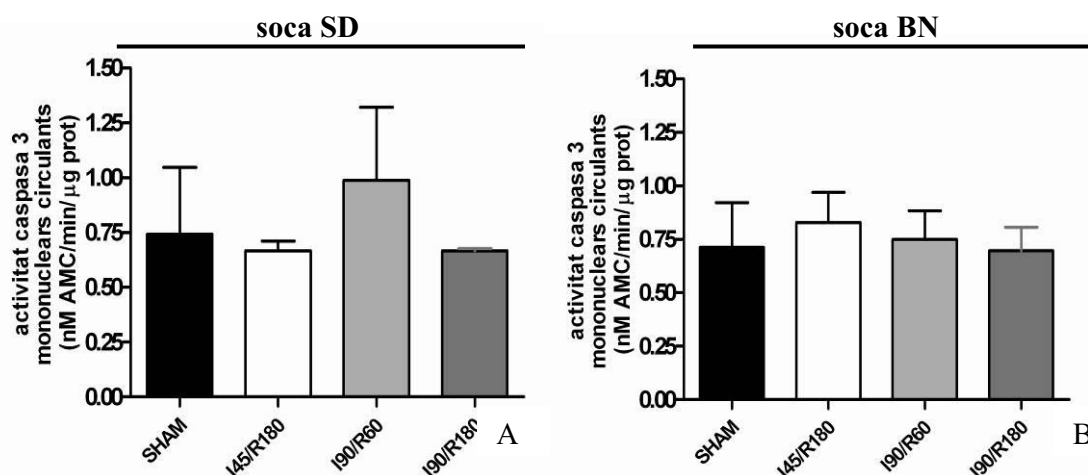
La determinació de l'activitat de caspasa 3 mitjançant la proteòlisi del substrat específic AMC en els neutròfils circulants va mostrar una disminució de l'activitat d'aquest enzim en els grups isquèmics respecte als grups controls en les dues soques de rates (Figura 30A i B) independentment de la seva resistència o no al procés isquèmic. De manera general el grup I45/R180 de la soca SD és el que va mostrar la major diferència respecte als neutròfils del grup sham, tot i que no hi havia diferències significatives entre tots els grups isquèmics entre sí.



**Figura 30.** A- Activitat de caspasa 3 de neutròfils circulants de la soca Sprague Dawley (nM AMC/min/μg proteïna) B- Activitat de caspasa 3 dels neutròfils circulants de la soca Brown Norway (nM AMC/min/μg proteïna). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham.

És interessant destacar que, tot i que les dues soques presentaven un retard en l'apoptosi dels neutròfils després d'un procés isquèmic, els valors d'activitat de caspasa 3 en la soca BN eren considerablement menors. Els nivells de l'activitat d'aquesta caspasa en les rates sham de la soca resistent era pràcticament la meitat en comparació amb els valors obtinguts en la soca SD. Una menor apoptosi constitutiva dels neutròfils podria ser un dels factors implicats en el mecanisme de resistència d'aquestes rates en front d'una IR.

Per a comprovar que el procés d'IR intestinal produïa un retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants, però no en d'altres cèl·lules sanguínies, es va determinar l'apoptosi de cèl·lules mononuclears circulants mesurant l'activitat de la seva caspasa 3 (Figura 31A i B). Cap dels quatre grups d'estudi presentava diferències significatives entre ells, resultat que suggeria que el procés isquèmic no provocava cap efecte en l'apoptosi d'aquestes cèl·lules.



**Figura 31.** Activitat de caspasa 3 de cèl·lules mononuclears circulants aïllats de la sang mitjançant gradients de ficoll. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM.

Aquests resultats van confirmar que una Isquèmia/Reperfusió intestinal provoca un retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants, tal i com està descrit que succeeix en d'altres òrgans.

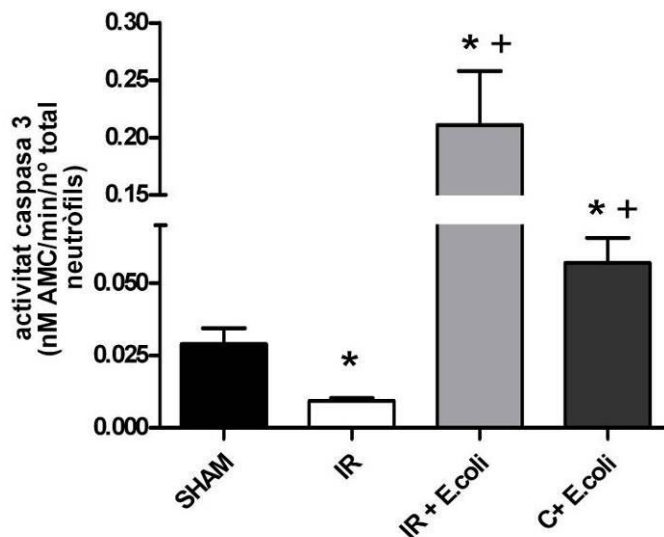
Amb tots els resultats en conjunt fins ara, es va concloure que la soca Sprague Dawley era la idònia per a la realització dels estudis, ja que era més sensible al dany per Isquèmia/Reperfusió intestinal que la soca Brown Norway i, a més, presentava un major retard en l'apoptosi dels seus neutròfils circulants. Per a la continuació dels estudis, el grup escollit va ser I45/R180, doncs els resultats mostraren que presentava un sever dany però sense arribar al nivell d'irreversible, a més d'un significatiu retard en l'apoptosi dels seus neutròfils.

#### 4.1.3 La modulació de l'apoptosi retardada dels neutròfils després d'una IR intestinal millora el dany tissular.

Una vegada determinat el retard apoptòtic del grup isquèmic respecte el sham, es va pretendre modular l'apoptosi dels neutròfils circulants de rates Sprague Dawley després d'una IR intestinal i determinar les conseqüències d'aquesta modulació en el teixit de l'intestí.

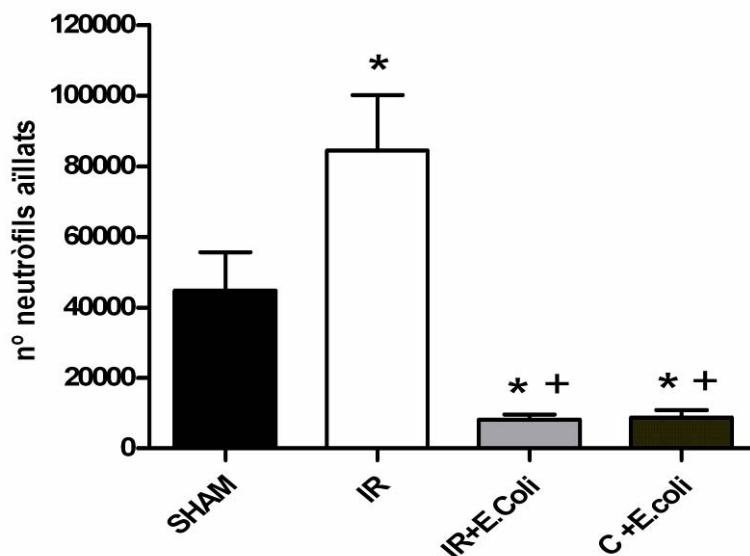
Per modular l'apoptosi constitutiva vam emprar l'administració sistèmica d'*E.coli* morta i osonitzada que havia sigut descrit prèviament com un activador selectiu de l'apoptosi dels neutròfils sense una activació inflammatòria o immunològica per part de les cèl·lules sanguínees.

La mesura de l'activitat de caspasa 3 va ser una de les tècniques utilitzades per a la detecció de l'apoptosi. Els resultats van demostrar que el grup IR mantenia el retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants, mentre que quan s'administrava *E.coli* morta i opsonitzada es revertia aquest efecte, incrementant de manera significativa l'apoptosi dels neutròfils (Figura 32).



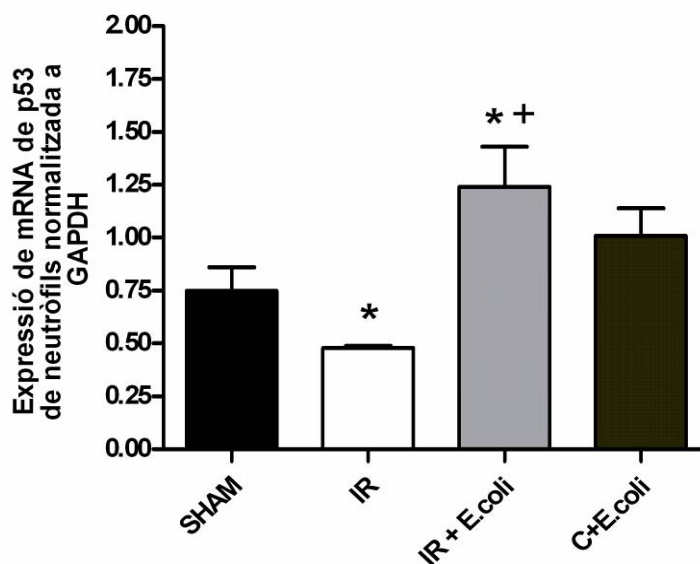
**Figura 32.** Activitat de caspasa 3 de neutròfils circulants (nM AMC/min/nº neutròfils circulants). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR.

El número de neutròfils circulants es va contabilitzar com un paràmetre d'eficiència de la tècnica (Figura 33). Després d'una IR intestinal el nombre de neutròfils circulants augmentava considerablement, dada que suggeria que molts més neutròfils es trobaven en la circulació sanguínia de camí a la zona inflamada i que, segurament, la seva mort programada es trobava retardada. L'administració d'*E.coli* provocava una dràstica disminució de neutròfils en circulació, segurament degut al seu poder inductor de l'apoptosi.



**Figura 33.** Número de neutròfils aïllats de la sang mitjançant gradients de ficoll i contabilitzats per Trypan-blue. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \* p<0.05 vs. sham, + p<0.05 vs. IR.

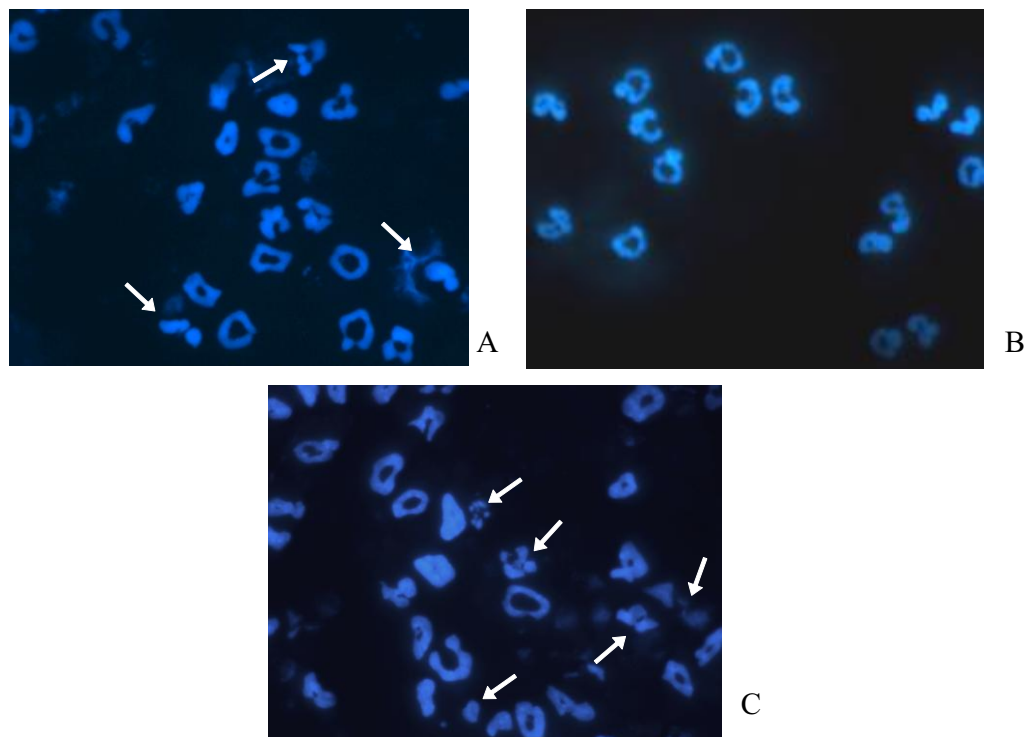
Un altre marcador d'apoptosi utilitzat en les cèl·lules aïllades va ser l'expressió del gen p53 mesurat per Real-Time RT-PCR (Figura 34). Aquest resultat mostrarà el mateix patró que l'activitat de caspasa 3; una disminució en el grup IR respecte el grup sham, així com una re-inducció significativa de l'expressió d'aquest gen després de l'administració d'*E.coli*.



**Figura 34.** Expressió de mRNA de p53 mesurat per RT-PCR en neutròfils circulants corregida per GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \* p<0.05 vs. sham, + p<0.05 vs. IR.

Per visualitzar els nuclis cel·lulars apoptòtics vam utilitzar la tinció fluorescent de DAPI (Figura 35). Com era d'esperar, el grup IR era el que presentava menys cèl·lules amb les característiques

d'apoptosi (Figura 35B), mentre que el grup IR+*E.coli* (Figura 35C) era el que mostrava més cèl·lules apoptòtiques, amb el nucli condensat i la formació de cossos apoptòtics.

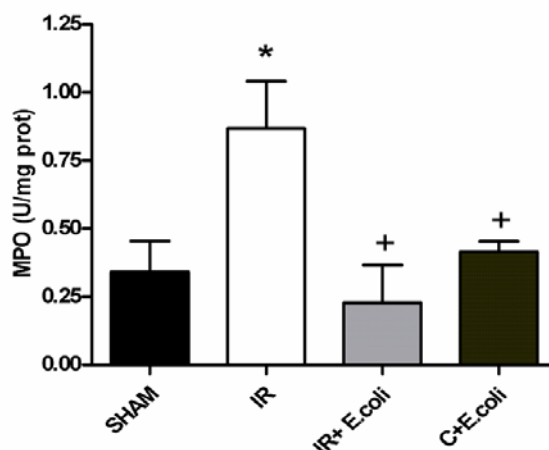


**Figura 35.** Fotografies representatives de la tinció DAPI en els diferents grups d'estudi. A- Imatge representativa dels grups sham i control + *E.coli*, B- grup IR, C- grup IR+*E.coli*. Les fletxes assenyalen les cèl·lules apoptòtiques.

Totes aquestes dades confirmen que els neutròfils circulants presenten un retard en la seva apoptosi després d'un IR intestinal, i que aquest retard pot ser revertit mitjançant l'administració d'*E.coli* morta i opsonitzada.

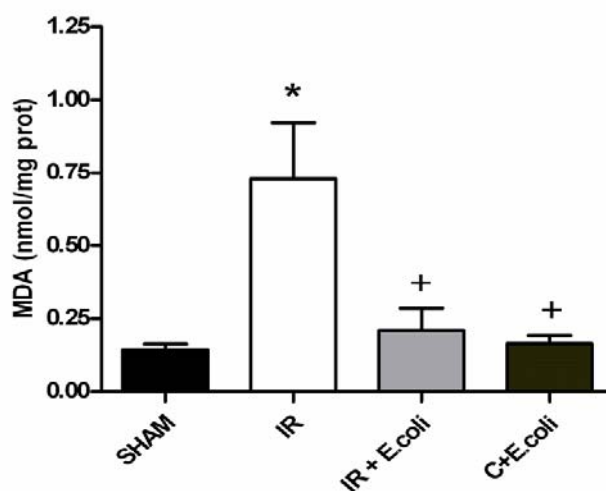
Per a determinar les conseqüències en el teixit de la reversió del retard en l'apoptosi dels neutròfils després d'una IR intestinal es van mesurar diversos paràmetres de dany i inflamació tissulars.

La inflamació intestinal es va determinar mitjançant els nivells de mieloperoxidasa presents en els homogenats tissulars (Figura 36). Els resultats indiquen que el grup IR presentava uns nivells significativament superiors al grup sham, mentre que la reactivació de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant l'administració d'*E.coli* va comportar una disminució significativa de la inflamació intestinal.



**Figura 36.** Nivells de mieloperoxidasa en el teixit intestinal. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR.

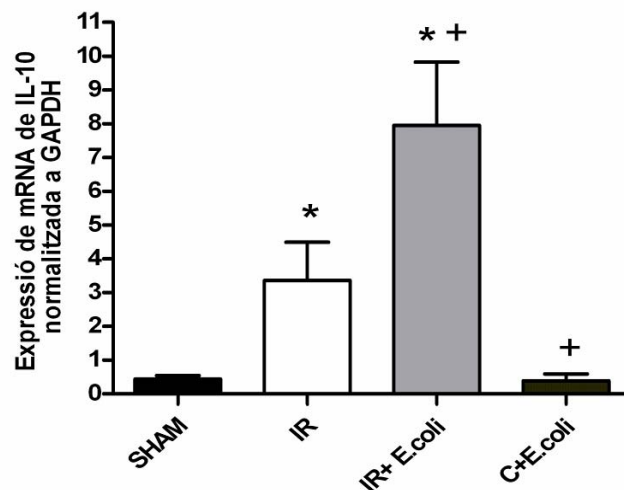
El dany tissular també es va determinar mitjançant la mesura dels nivells de malondialdehid (MDA) com a índex de peroxidació lipídica (Figura 37). Els valors més elevats de MDA els trobem en el grup IR, mentre que el grup IR+E.coli presenta una disminució significativa respecte a IR, indicant una millora del dany quan l'apoptosi dels neutròfils és re-induïda.



**Figura 37.** Valors de MDA en homogenats de teixit intestinal. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR.

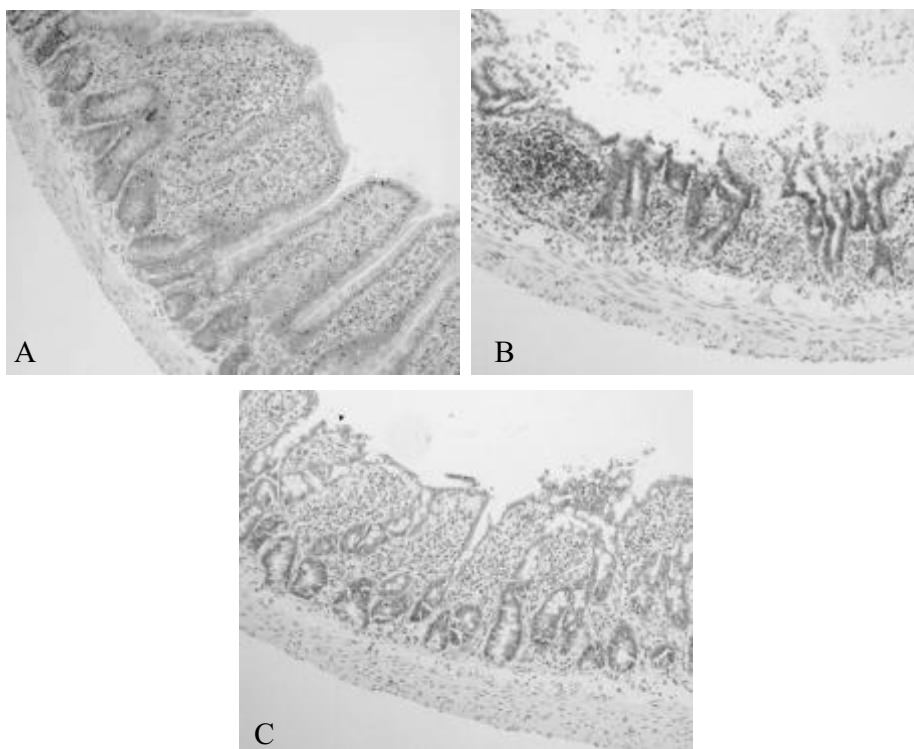
Per altra banda també es va determinar l'expressió de la interleucina anti-inflamatòria IL-10 en el teixit de l'intestí (Figura 38). Els resultats indiquen un augment en la seva expressió després de la IR en resposta al dany, mentre que és significativament superior quan s'administra *E.coli* opsonitzada.





**Figura 38.** Expressió de mRNA de IL-10 mesurat per RT-PCR corregida per GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR.

Finalment les mostres histològiques van ésser emprades també per a determinar el grau de dany intestinal seguint la classificació de Park (Figura 39). Els resultats van confirmar la millora de la integritat del teixit en els grups en que els neutròfils no mostraven una apoptosi retardada. El grup sham i el grup C+E.coli (Figura 39A) presentaven una arquitectura tissular normal (grau 0), mentre que el grup IR (Figura 39B) presentava pèrdua epitel·lial en el villi i dany en la làmina pròpia (grau 4). Per la seva banda el grup IR+E.coli (Figura 39C) mostrava un dany intestinal menor respecte a IR (grau 2-3), amb aixecament epitel·lial en el villi.



**Figura 39.** Imatges representatives de la tinció Hematoxilina/Eosina en els diferents grups d'estudi. A- grup sham i control + *E.coli*, B- grup IR, C- grup IR+*E.coli*.

En resum, les dades d'aquest primer estudi confirmen la participació del retard de l'apoptosi dels neutròfils en el dany produït per una IR intestinal. Després d'una IR intestinal l'apoptosi dels neutròfils circulants es veu retardada, l'administració d'*E.coli* morta i opsonitzada reverteix aquest retard i millora el dany intestinal. La resistència genètica a la isquèmia també va acompanyada d'un menor retard de l'apoptosi dels neutròfils circulants, o dit d'una altra manera, d'un manteniment de l'apoptosi constitutiva després d'un insult per IR intestinal.

#### **4.2 Objectiu 2. Estudi 2. La proteïna secretable dels neutròfils *24p3* és determinant en la re-inducció de la seva apoptosi.**

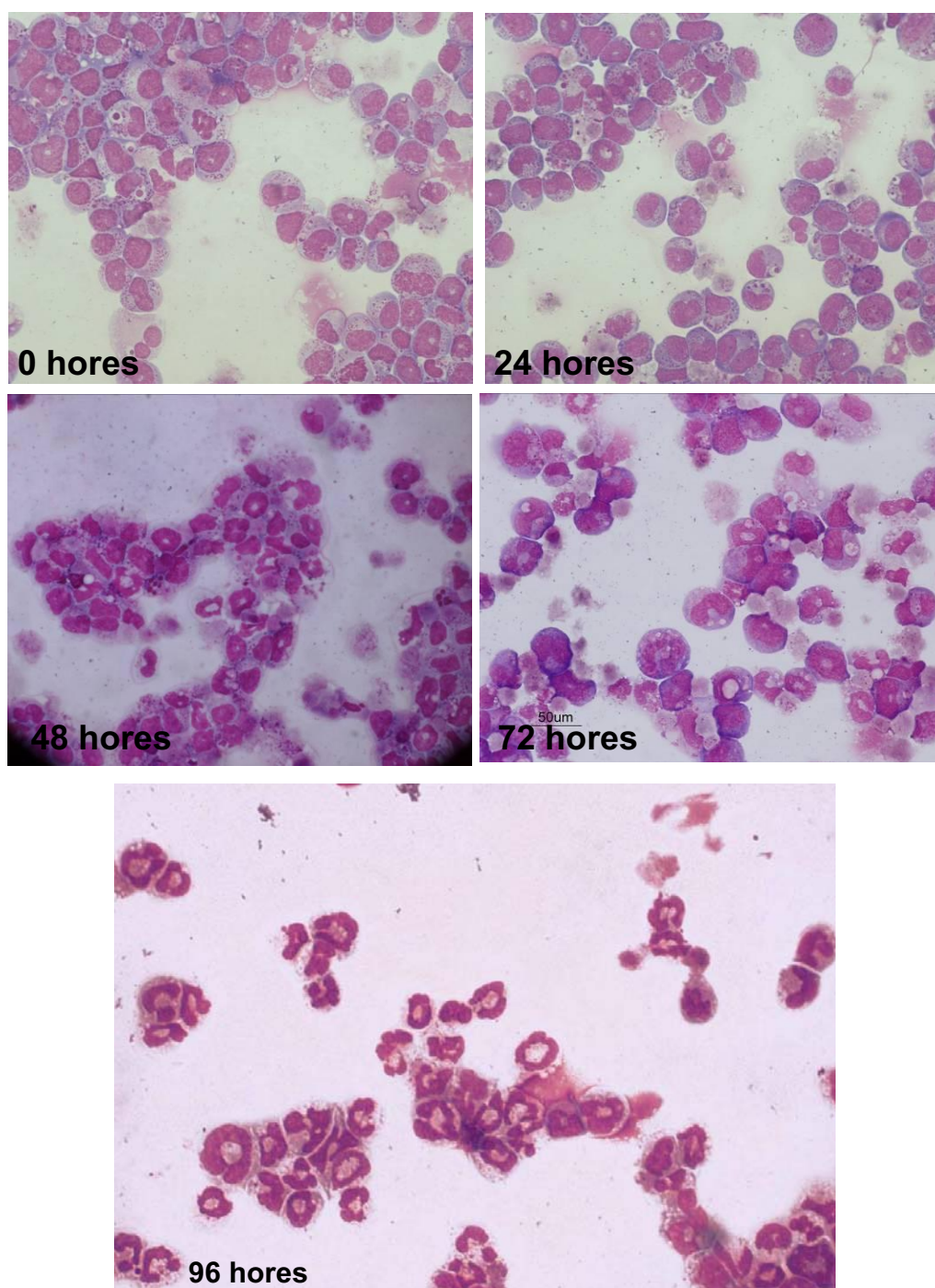
*24p3* ha estat descrit com un inductor de l'apoptosi específic segons el tipus cel·lular en diferents leucòcits, com ara en els neutròfils. Tot i que els neutròfils s'ha vist que produeixen *24p3*, aquesta proteïna secretable s'ha vist involucrada en diversos mecanismes que inclouen l'inici de l'apoptosi en granulòcits en condicions de falta de sèrum. Aquestes evidències otorguen a *24p3* un paper en la inducció de l'apoptosi en granulòcits madurs o en l'homeòstasi dels leucòcits en general. De totes maneres, el seu rol en l'apoptosi constitutiva dels neutròfils no ha estat encara definit, ni tan sols en malalties inflamatòries, on el retard en l'apoptosi dels neutròfils és determinant per la progressió de la patologia.

Per aprofundir en el mecanisme del retard apoptòtic en el nostre model i la seva relació amb *24p3*, ens vam centrar en estudis anòxics *in vitro*, utilitzant la línia cel·lular de neutròfils MPRO clon 2.1.

##### **4.2.1. Posada a punt del cultiu cel·lular *in vitro*.**

La línia cel·lular progenitora de neutròfils MPRO, que mostra clarament característiques promielocítiques, és depenent de GM-CSF i té la capacitat de diferenciar-se a neutròfils, però no a d'altres tipus cel·lulars com ara mastòcits ni basòfils.

Per aconseguir la seva diferenciació a neutròfils, les cèl·lules van ser cultivades amb àcid *all-trans*-retinoic i es va observar la seva morfologia cada 24 hores mitjançant la tinció de Giemsa May-Grünwalds. A les 96 hores de diferenciació ja s'obtingueren neutròfils completament diferenciats (Figura 40).

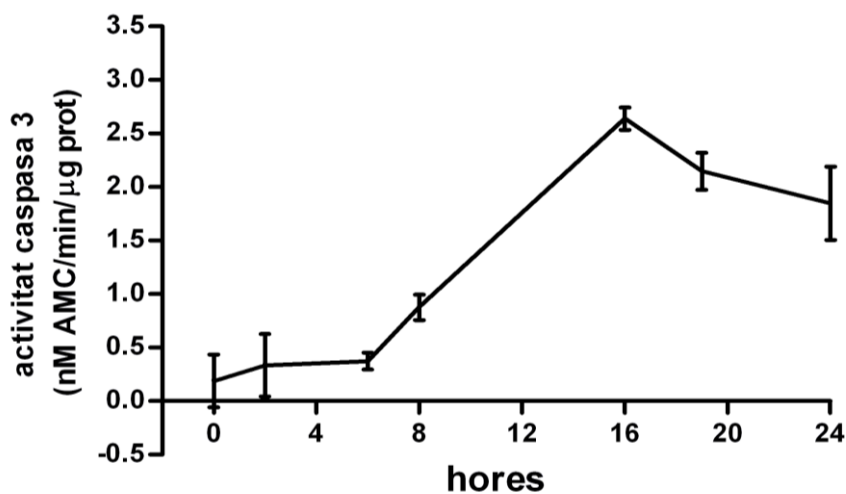


**Figura 40.** Imatges representatives del procés de diferenciació del cultiu cel·lular tenyit amb Giemsa May-Grünwalds.

Una de les característiques principals dels neutròfils és la seva curta vida, doncs pateixen apoptosi constitutiva, arribant a un 70% de mortalitat a les 16-20 hores.

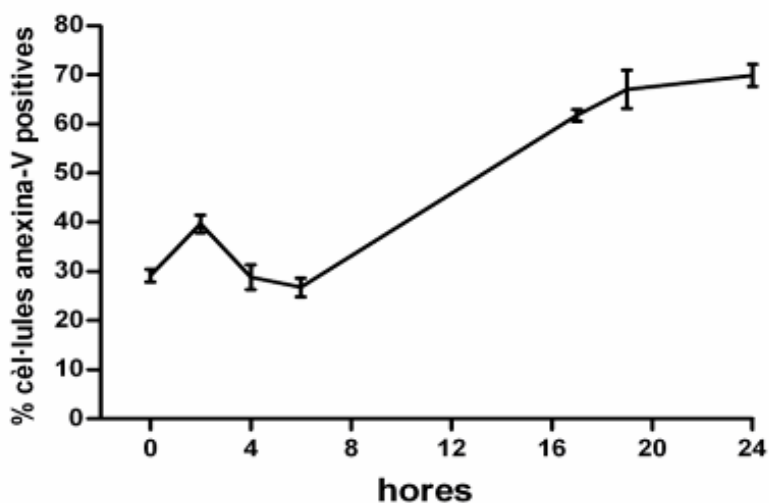
Per comprovar que les cèl·lules diferenciades mantien aquestes característiques, vam mesurar l'apoptosi de neutròfils diferenciats mitjançant la medicació de l'activitat de caspasa 3 en absència de factor de creixement (GM-CSF) al llarg de 24 hores de cultiu (Figura 41). Es va observar com l'apoptosi incrementava al llarg del temps, arribant a un pic màxim a les 16 hores de cultiu. A

partir d'aquest punt l'activitat de caspasa 3 presentava una estabilització amb tendència a remetre, segurament degut a l'augment de cèl·lules necròtiques.



**Figura 41.** Cinètica de l'activitat de caspasa 3 de neutròfils diferenciats in vitro cultivats durant 24 hores. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM.

L'apoptosi dels neutròfils es va determinar també per citometria de flux mesurant l'anexina-V/PI (Figura 42). Les cèl·lules positives per anexina-V (cèl·lules apoptòtiques) augmentaren al llarg de les 24 hores.



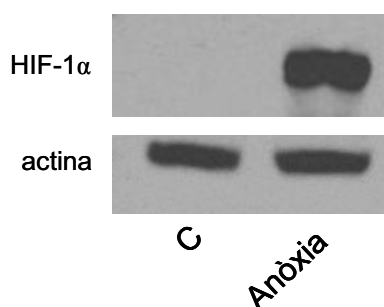
**Figura 42.** Cinètica del percentatge de cèl·lules positives per Anexina-V al llarg de 24 hores de cultiu. Els valors s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM.

Aquestes observacions van confirmar la correcta diferenciació de les cèl·lules MPRO cap a neutròfils completament funcionals.

#### L'Anòxia/Reoxigenació retarda l'apoptosi dels neutròfils *in vitro*

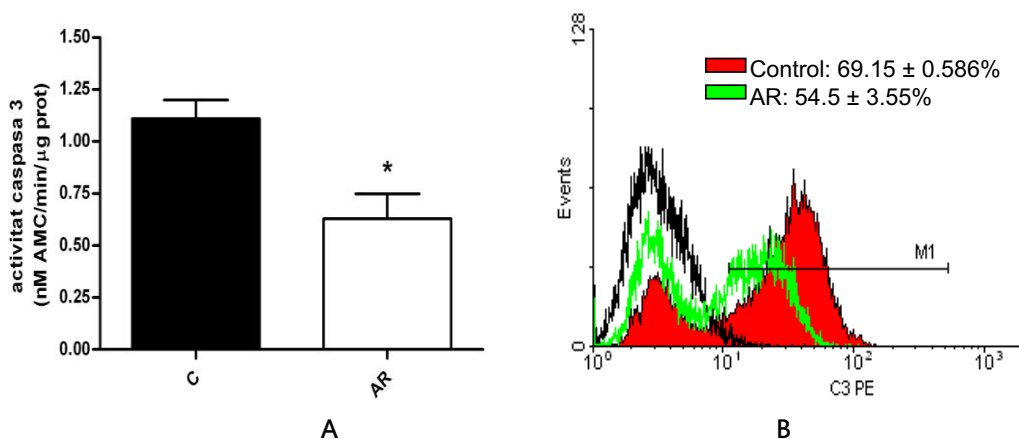
Seguidament es va determinar si, tal i com succeïa en els neutròfils circulants, l'anòxia disminuïa l'apoptosi dels neutròfils en cultiu.

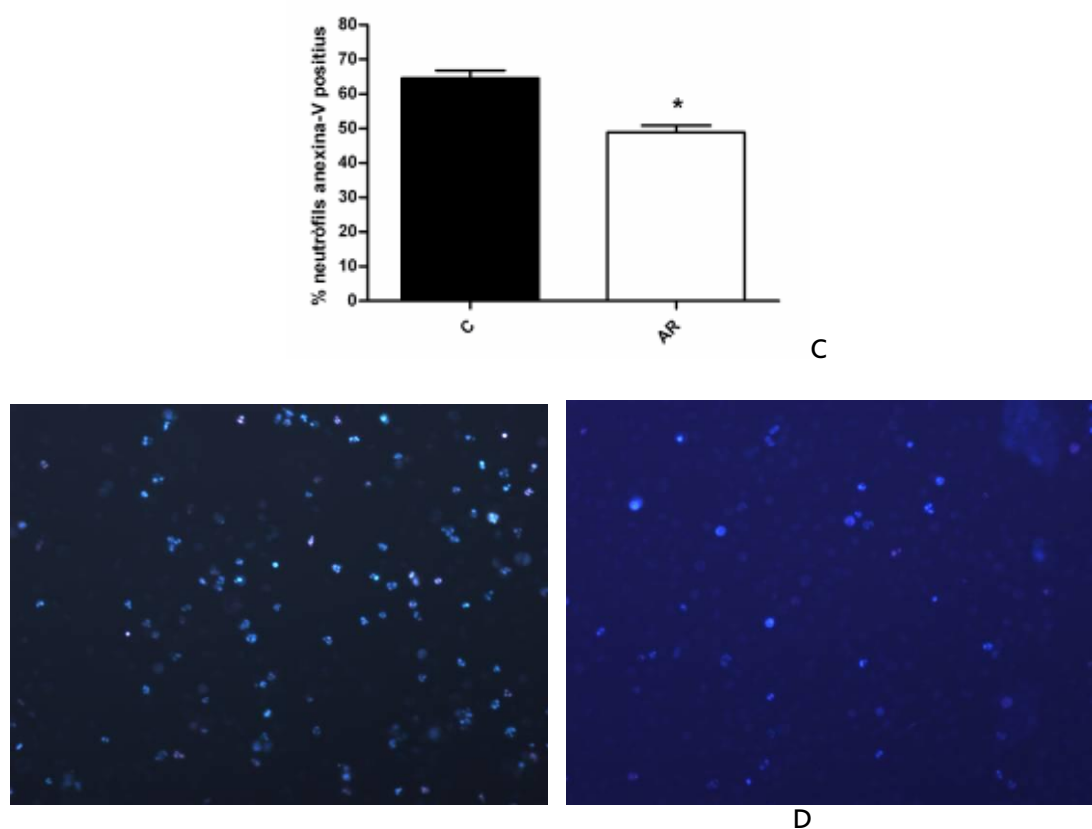
Seguint la prèvia experiència del grup en models anòxics/hipòxics es va escollir una anòxia *overnight* (16 hores). Primerament, per a confirmar l'eficiència en la realització de l'anòxia en els cultius cel·lulars, es va mesurar el Factor Induïble per la Hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ) mitjançant la tècnica de Western Blot. Com es pot observar en la figura 43, després del període anòxic les cèl·lules expressaven de manera contundent la proteïna HIF-1 $\alpha$ , en contraposició amb les cèl·lules control, les quals, com era d'esperar, no expressaven aquest factor. La proteïna actina es va determinar com a control de càrrega. Aquest resultat confirmà l'eficiència del sistema.



**Figura 43.** Western Blot de la proteïna HIF-1 $\alpha$  (105 kDa) i de la proteïna actina (42 kDa) en neutròfils cultivats *in vitro* en condicions control i en condicions d'anòxia (16 hores).

Una vegada confirmada la correcta realització de l'anòxia vam determinar si el dany per anòxia/reoxigenació (AR) era capaç de disminuir l'apoptosi que presentaven els neutròfils *in vitro*, tal i com els hi succeïa als neutròfils *in vivo* després d'una IR intestinal. Per a tal efecte es van mesurar diferents paràmetres d'apoptosi (activitat de caspasa 3, annexina-V/PI i la tinció de Hoetch-PI). En les quatre tècniques es va comprovar que l'apoptosi d'aquestes cèl·lules es trobava també significativament disminuïda després d'una AR (Figura 44).



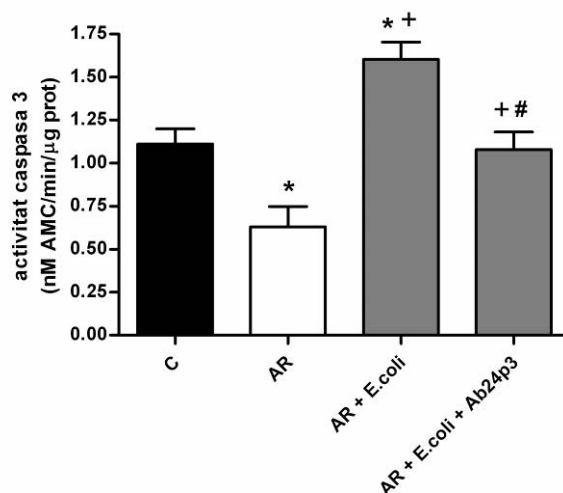


**Figura 44.** Determinació d'apoptosi en els neutròfils diferenciats *in vitro*. A- activitat de caspasa 3 mesurada per fluorimetria, B- activitat de caspasa 3 mesurada per citometria de flux. La línia negra representa el control negatiu. C- cèl·lules positives per Annexina-V/PI, D- Hoetch-PI. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control.

#### 4.2.2 *24p3* modula l'apoptosi dels neutròfils *in vitro*

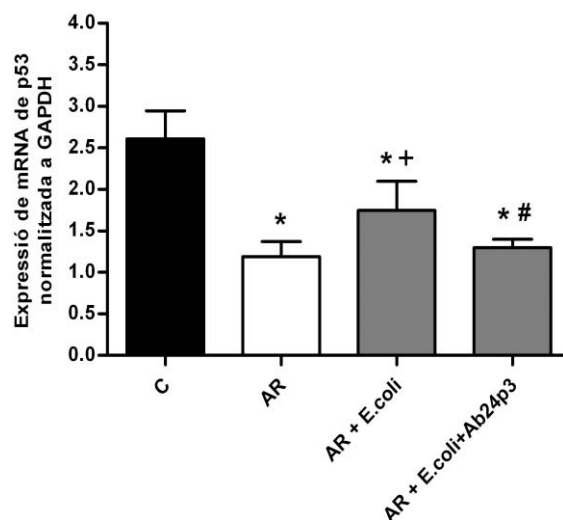
Un cop posat a punt el sistema *in vitro* es va procedir a comprovar si la proteïna *24p3* participava en l'apoptosi. Per aquest propòsit i, al igual que en el sistema *in vivo*, es va utilitzar *E.coli* opsonitzada com a eina reactivadora de l'apoptosi retardada. Per a determinar la implicació de *24p3* vam bloquejar l'acció de la proteïna mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal.

La detecció de l'apoptosi en els diferents grups d'estudi inclosos en aquest experiment es va realitzar mitjançant la medicació de l'activitat de caspasa 3 pel trencament de DEVD-AMC (Figura 45). Els resultats indiquen que, tal i com succeïa *in vivo*, l'administració d'*E.coli* reverteix l'efecte anti-apoptòtic de l'anoxia/reoxigenació, mentre que l'administració d'un anticòs anti-*24p3* en el grup AR+*E.coli* tornava a inhibir l'apoptosi, suggerint de manera directa la implicació de l'activitat de la proteïna *24p3* en la re-inducció de la mort cel·lular programada..



**Figura 45.** Activitat de caspasa 3 de neutròfils diferenciats *in vitro* (nM AMC/min/μg proteïna). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR + *E.coli*.

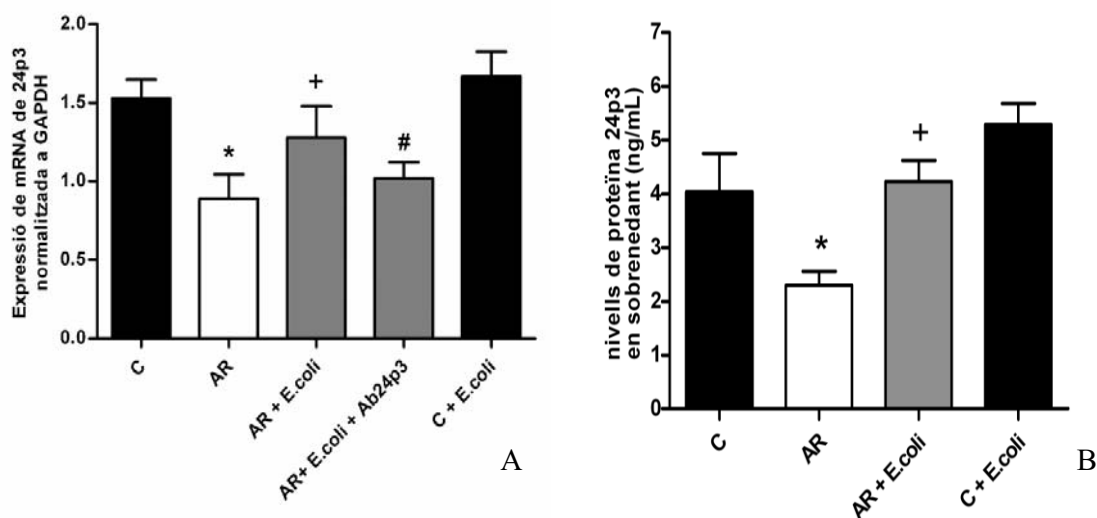
La determinació de l'expressió del gen p53, igual que la mesura de l'activitat de caspasa 3, també mostrà una recuperació en els nivells d'apoptosi després de l'addició d'*E.coli* a les cèl·lules AR, mentre que en el grup amb anticòs anti-24p3 els valors de p53 es trobaven disminuïts significativament (Figura 46).



**Figura 46.** Expressió de mRNA de p53 de neutròfils diferenciats corregida per GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR + *E.coli*.

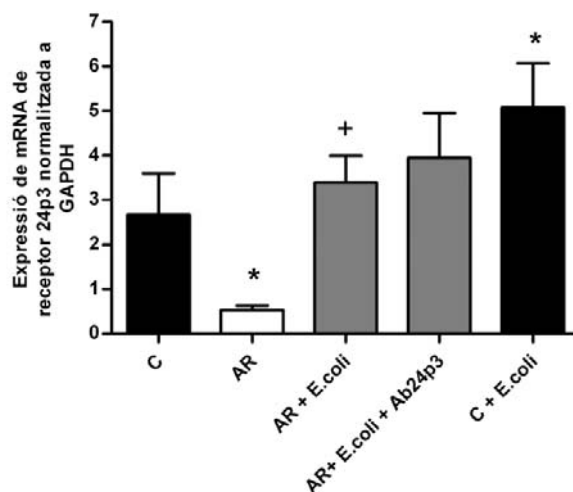
Per a confirmar el rol de 24p3 en els neutròfils es va mesurar l'expressió del seu gen així com la quantitat de proteïna alliberada al medi. L'expressió de 24p3 es va mesurar per Real-Time RT-PCR normalitzada amb el gen GAPDH (Figura 47A), mentre que la quantitat de proteïna alliberada es va mesurar mitjançant la tècnica d'ELISA en els sobrenadants dels cultius cel·lulars (Figura 47B).

Els resultats mostren que el grup AR presenta una disminució en l'expressió d'aquest gen tot i que quan s'administrava *E.coli* aquest valor es revertia. Curiosament, l'expressió de *24p3* també es veia reduïda quan s'administrava anticòs anti-*24p3*, suggerint un resposta de *feed-back* negatiu. Seguint el patró de l'expressió del gen, la quantitat de proteïna expressada es trobava disminuïda en el grup AR, mentre que en el grup AR+*E.coli* la situació es reverteix arribant a nivells com el grup control.



**Figura 47.** A- Expressió de mRNA de *24p3* de neutròfils diferenciats corregida per GAPDH. B- Nivells de proteïna *24p3* mesurats per la tècnica d'ELISA. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. \* p<0.05 vs. control, + p<0.05 vs. AR.

Donat que existeixen receptors coneguts per la proteïna *24p3*, vam mesurar l'expressió del receptor de *24p3* en els nostres grups per Real-time RT-PCR (Figura 48). L'expressió disminuïa significativament en el grup AR respecte el control, mentre que l'administració d'*E.coli* revertia aquest efecte. Per altra banda, l'administració d'anticòs Anti-*24p3* no comportava cap canvi en l'expressió del seu receptor. L'expressió de l'altre receptor descrit per a *24p3* anomenat megalina, es va mesurar també per Real-time RT-PCR, no mostrant diferències entre cap dels grups estudiats.





**Figura 48.** Expressió del gen del receptor de *24p3* en neutròfils *in vitro* normalitzada a GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR.

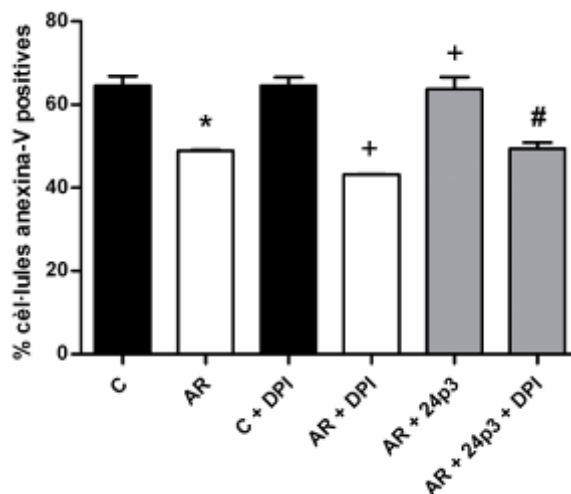
Per tant, aquests resultats van mostrar que després d'una AR, tant l'expressió com la síntesi *24p3* es troben disminuïts en els neutròfils, coincidint amb el retard en l'apoptosi.

Pel contrari, la re-inducció de l'apoptosi mitjançant *E.coli* provoca un augment en l'expressió i la proteïna *24p3*. El bloqueig d'aquesta proteïna durant la re-inducció inhibeix l'apoptosi obtinguda, suggerint que el mecanisme pro-apoptòtic succeeix a través de *24p3*.

#### 4.2.3 La modulació de l'apoptosi per *24p3* implica als ROS

S'ha descrit que *24p3* s'indueix en condicions d'estrés oxidatiu i que la capacitat de *24p3* en modular l'apoptosi es troba mediada per la formació de ROS. El següent pas en l'estudi, doncs, va ser comprovar si la modulació de l'apoptosi dels neutròfils a través de *24p3* implicava la participació de radicals lliures de l'oxigen. Per determinar aquest fet, vam administrar l'inhibidor de la NADPH oxidasa (el principal enzim formador de ROS en els neutròfils) a grups amb elevada presència de *24p3*, i conseqüentment, amb elevat índex d'apoptosi.

La determinació de l'apoptosi en els diferents grups es va mesurar per citometria de flux mesurant el percentatge de cèl·lules apoptòtiques per anexina-V/PI (Figura 49). El grup AR disminuïa significativament la seva apoptosi quan se li administrava l'inhibidor de la NADPH oxidasa DPI, de la mateixa manera que disminuïa quan s'administrava al grup AR + *24p3*. En canvi quan DPI era afegit a un grup control no s'apreciaven diferències en aquest marcador apoptòtic.



**Figura 49.** Percentatge de cèl·lules positives per Annexina-V. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR + *24p3*.

La immunofluorescència de calceïna-AM es va realitzar com un marcador de l'activitat oxidativa dels neutròfils i de la presència de ROS intracel·lulars. La calceïna-AM és un component que no

emet fluorescència, tot i que sota estímuls oxidatius es pot convertir en calceïna, alliberant fluorescència.

La figura 50 mostra la composició de la fluorescència emesa per la calceïna amb la visió òptica obtinguda directament pel microscopi. El grup tractat amb DPI mostrava, com era d'esperar una clara disminució de calceïna respecte el grup control. Per altra banda, el grup AR+*24p3* mostrava un augment en la formació de ROS respecte al grup AR, el qual presentava menys radicals que les cèl·lules control.

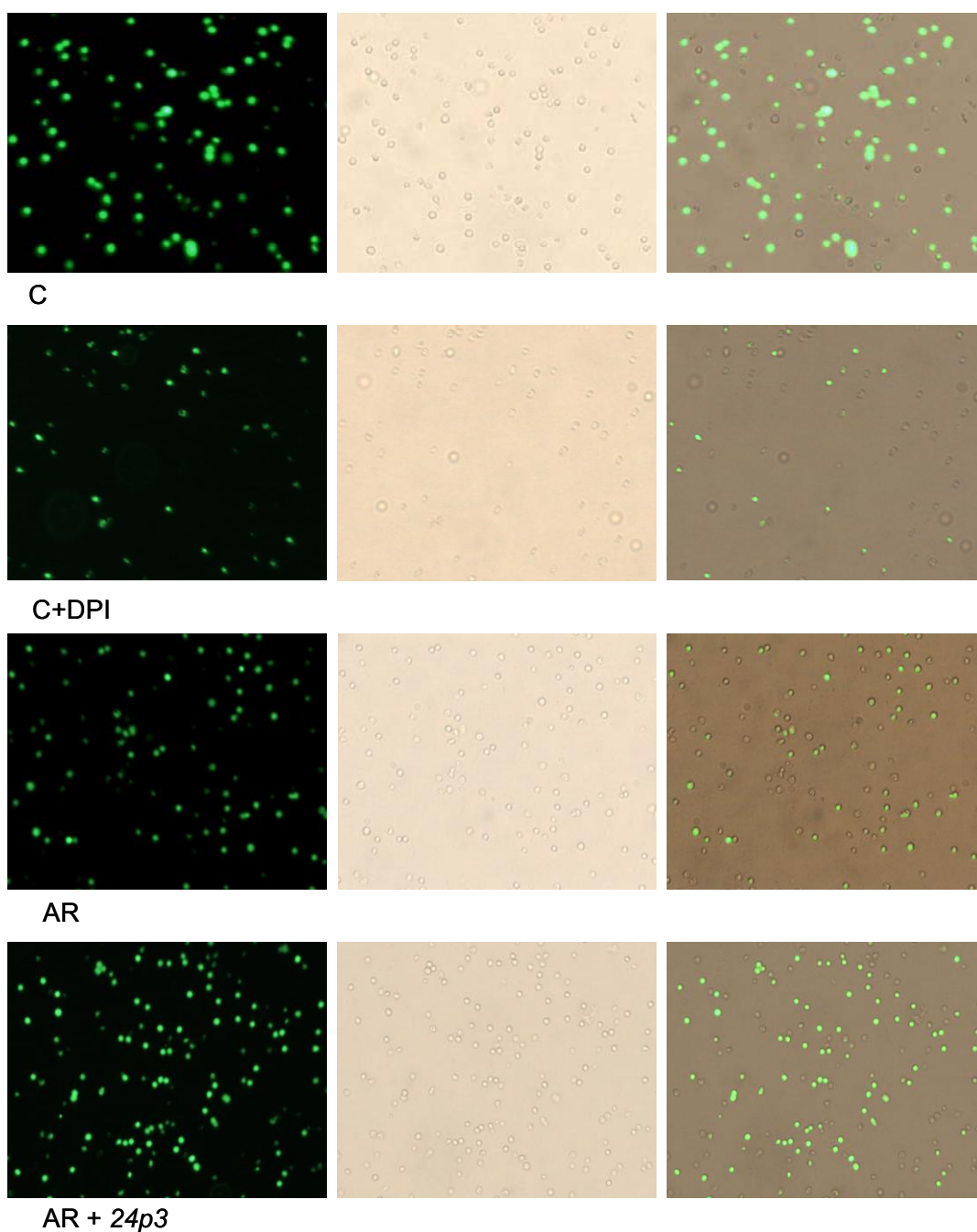
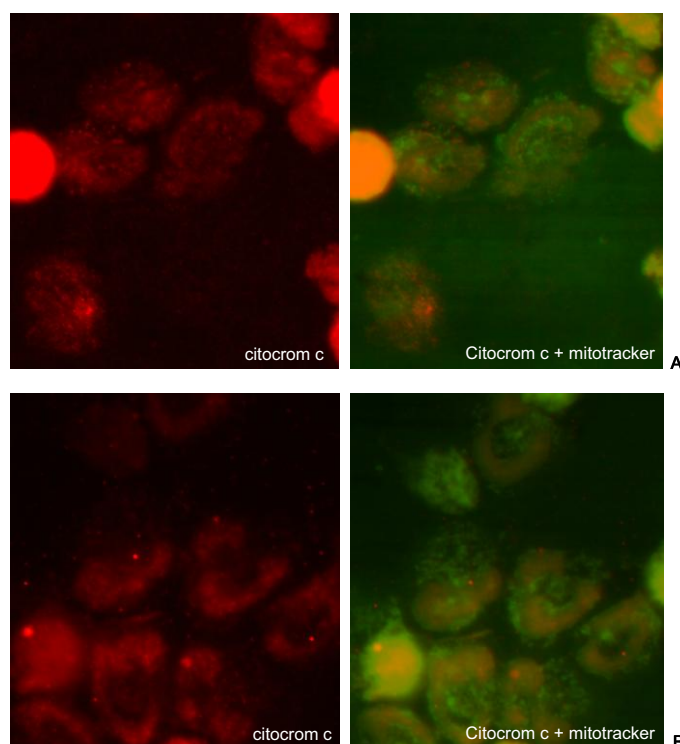


Figura 50. Immunofluorescència de calceïna en els diferents grups d'estudi.

Donada la implicació de la mitocòndria en l'apoptosi i en la producció de ROS, vam determinar per immunofluorescència la localització i integritat de la mitocòndria i l'alliberació de citocrom c en els grups. Els canvis mitocondrials s'observaren per fluorescència amb el marcador específic de mitocòndries Mitotracker (verd), un marcador que es difon passivament a través de la membrana plasmàtica i s'acumula en la mitocòndria activa.

La immunofluorescència de citocrom c combinada amb mitotracker es va realitzar en els grups control i AR (Figura 51). Es va observar com el grup control presentava una fluorescència per al citocrom c en forma de petits grànuls per tota la morfologia cel·lular, mentre que el grup AR presentava una tinció més homogènia i intensa, concentrada sobretot en la zona nuclear.

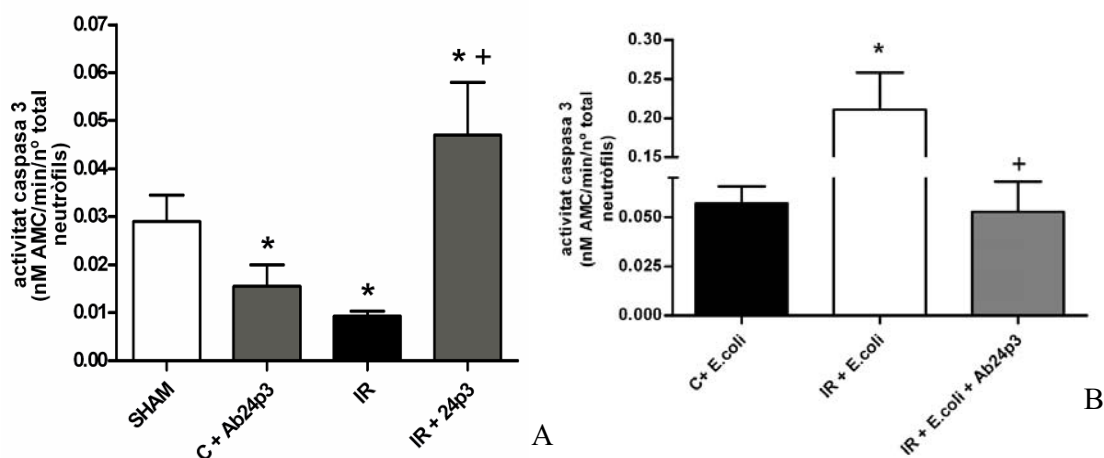


**Figura 51.** Fotografies representatives de la immunofluorescència de citocrom c i mitotracker. A- grup control. B- grup AR.

#### 4.2.4 *24p3* es troba implicat en l'apoptosi dels neutròfils circulants *in vivo*

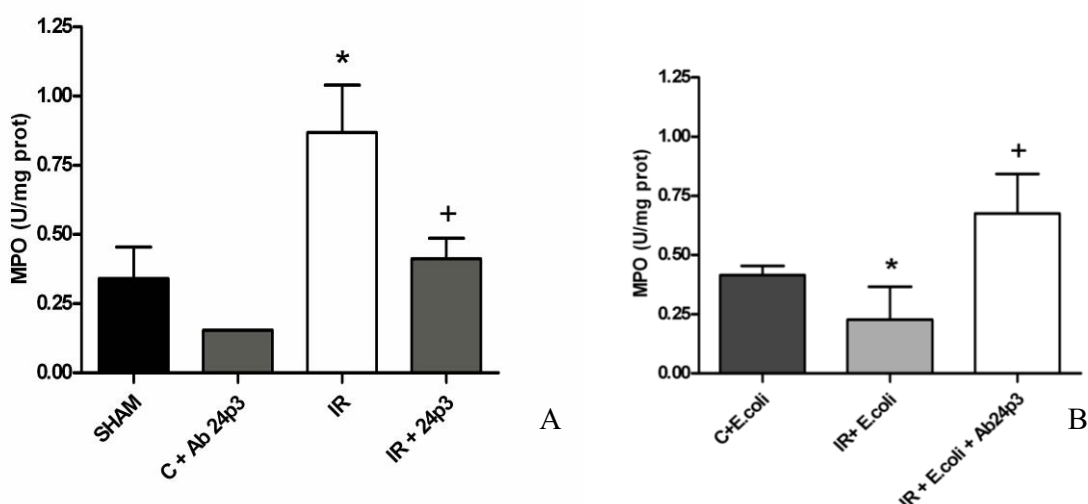
Una vegada confirmat que *24p3* participava en el mecanisme apoptòtic dels neutròfils *in vitro*, vam voler esbrinar si *24p3* es trobava també implicat en l'apoptosi dels neutròfils *in vivo*. Amb aquesta finalitat es van tractar animals isquèmics amb la proteïna *24p3* recombinant o bé amb un anticòs contra aquesta. Els resultats van mostrar que les rates tractades amb l'anticòs anti-*24p3* presentaven una disminució de l'activitat de caspasa 3 i per tant de l'apoptosi respecte al grup sham (Figura 52A) o respecte al grup control+*E.coli* (Figura 52B). Per altra banda, l'administració de la proteïna *24p3* en rates isquèmiques va provocar un augment significatiu de l'apoptosi dels seus neutròfils (Figura 52A).

Aquest resultat confirmava que la proteïna *24p3* juga un paper tant en l'apoptosi constitutiva dels neutròfils, com en l'apoptosi re-induïda per *E.coli*.



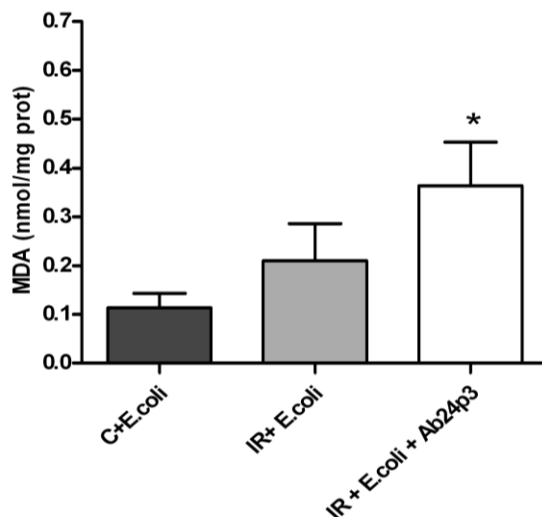
**Figura 52.** Apoptosi de neutròfils circulants mesurada per l'activitat de caspasa 3. A- influència de *24p3* en l'apoptosi dels neutròfils en ratna. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR. B- bloqueig de l'apoptosi induïda per *E.coli* mitjançant Ab*24p3*. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. C+E.coli, +  $p < 0.05$  vs. IR+E.coli.

Les conseqüències en el teixit intestinal es van determinar mesurant els nivells de MPO en homogenats tissulars com a marcador d'inflamació (Figura 53). Els nivells de MPO disminueixen significativament quan s'administra la proteïna recombinant en una ratna isquèmica (Figura 53A), mentre que els nivells augmenten de manera significativa quan s'injecta l'anticòs anti-*24p3* en rates IR + *E.coli* (Figura 53B).



**Figura 53.** Nivells de MPO en el teixit intestinal. A- conseqüències inflamatòries de l'administració de *24p3* en rates IR i anticòs anti-*24p3* en rates sham. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR B- augment dels nivells de MPO en rates tractades amb *E.coli* i anticòs anti-*24p3*. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. C+E.coli, +  $p < 0.05$  vs. IR+E.coli.

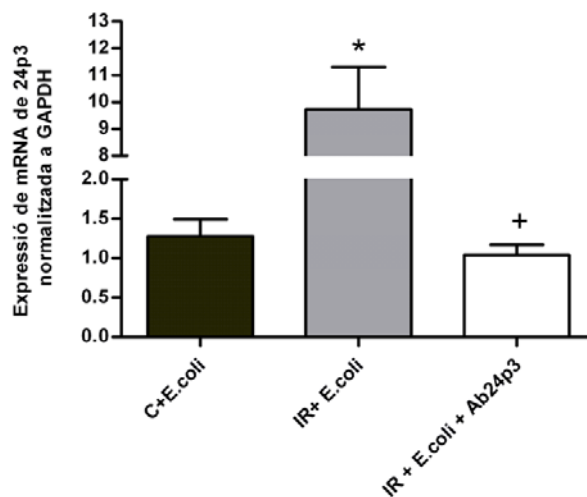
Els nivells de lipoperòxid en el teixit intestinal es van mesurar mitjançant la determinació de MDA (Figura 54). El grup administrat amb l'anticòs anti-*24p3* conjuntament amb *E.coli* presentava els majors nivells de lipoperoxidació.



**Figura 54.** Nivells de MDA en teixit intestinal. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. C+E.coli.

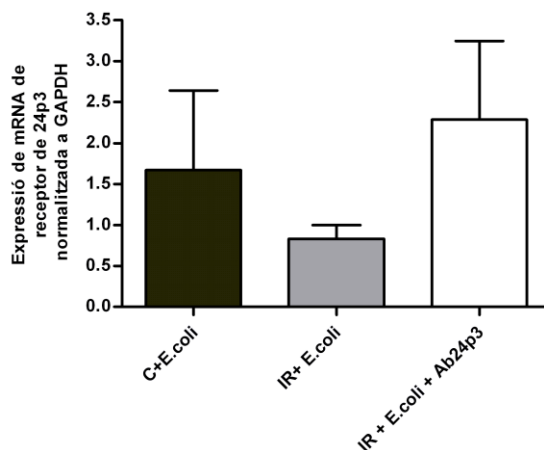
Per tant, les dades obtingudes confirmen que quan es bloqueja l'apoptosi dels neutròfils per mitjà d'un anticòs anti-*24p3* els paràmetres de dany augmenten significativament, revertint l'efecte beneficiós tant de l'administració d'*E.coli* com de l'administració de la pròpia proteïna.

Adicionalment es va mesurar l'expressió de *24p3* en els neutròfils circulants dels grups experimentals implicats en l'estudi. Els resultats indiquen que l'expressió d'aquest gen augmenta de forma significativa quan s'administra *E.coli* opsonitzada a les rates sotmeses a IR, tot i que aquest increment era curiosament revertit quan a les rates se'ls hi injectava l'anticòs anti-*24p3* (Figura 55).



**Figura 55.** Expressió de *24p3* en els neutròfils circulants, normalitzada a GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. C+*E.coli*, +  $p < 0.05$  vs. IR+*E.coli*.

L'expressió del receptor de *24p3* en els neutròfils circulants també es va mesurar per *Real-time* RT-PCR (Figura 56). Tot i que el grup IR + *E.coli* semblava presentar una disminució de l'expressió del receptor respecte el grup C + *E.coli*, aquesta no era estadísticament significativa. Igualment, l'administració de l'anticòs Anti-*24p3* semblava revertir la situació, tot i que tampoc s'observaren diferències estadístiques.



**Figura 56.** Expressió del gen del receptor de *24p3* normalitzada a GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM.

Els resultats, doncs, en aquest estudi indiquen que la proteïna secretable dels neutròfils *24p3* es troba directament implicada en l'apoptosi dels neutròfils, actuant com a factor pro-apoptòtic en aquestes cèl·lules. Durant l'anòxia/reoxigenació el retard apoptòtic és degut a una disminució de *24p3*. El bloqueig de la proteïna mitjançant l'administració d'un anticòs específic inhibeix l'apoptosi tant constitutiva com la que es re-indueix amb *E.coli*, comportant un augment del dany.

#### 4.3 Objectiu 3. Estudi 3. La via Wnt està implicada en l'apoptosi dels neutròfils a través de l'expressió del seu gen diana *24p3*

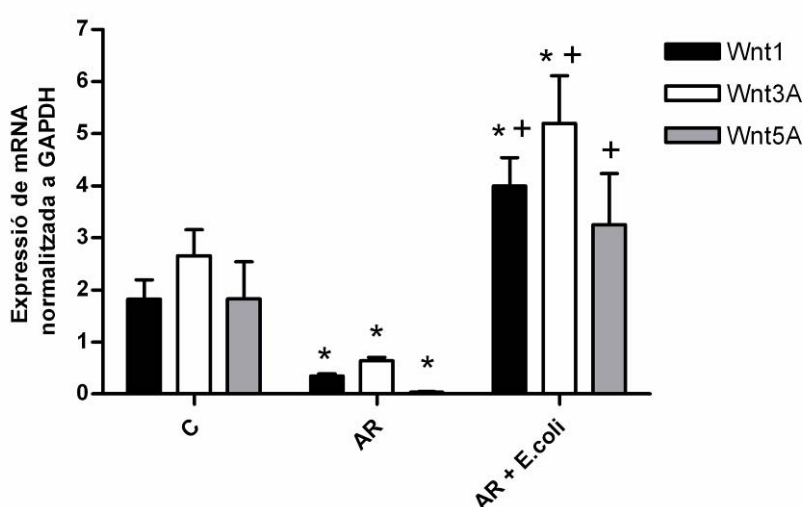
La via Wnt s'ha descrit que participa en diversos processos cel·lulars, entre ells la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi. Curiosament s'ha identificat l'expressió del gen *24p3* com un gen diana de la via de senyalització Wnt. En canvi, la implicació de la via Wnt en neutròfils i la seva relació amb *24p3* no ha estat encara descrita.

En aquest sentit aquest estudi va ser dissenyat per avaluar la importància de la via de senyalització Wnt en l'apoptosi dels neutròfils i per aprofundir en el seu paper com a modulador de l'expressió de *24p3* durant l'anòxia.

##### 4.3.1 La via Wnt i el seu gen diana *24p3* es troben disminuïts en els neutròfils anòxics.

Per determinar la via Wnt vam mesurar l'expressió de tres gens (Wnt1, Wnt3A, Wnt5A) implicats en les vies canònica i no canònica de la via Wnt. Wnt1 i Wnt3A poden activar les proteïnes citoplasmàtiques *dishevelled*, les quals inhibeixen la degradació de la  $\beta$ -catenina (via canònica), permetent la seva translocació al nucli cel·lular. Per altra banda Wnt5A és independent de la  $\beta$ -catenina en un procés que depèn del receptor tirosina-quinasa Ror2 (vies no canòniques).

Es va observar que l'expressió dels tres gens es trobava significativament disminuïda en el grup AR coincidint amb el retard apoptòtic i amb la menor expressió de *24p3*. L'administració d'*E.coli* a aquest grup revertia la situació, arribant a valors significativament més alts que el grup control coincidint amb la reactivació de l'apoptosi i amb un increment en la producció de *24p3* (Figura 57)

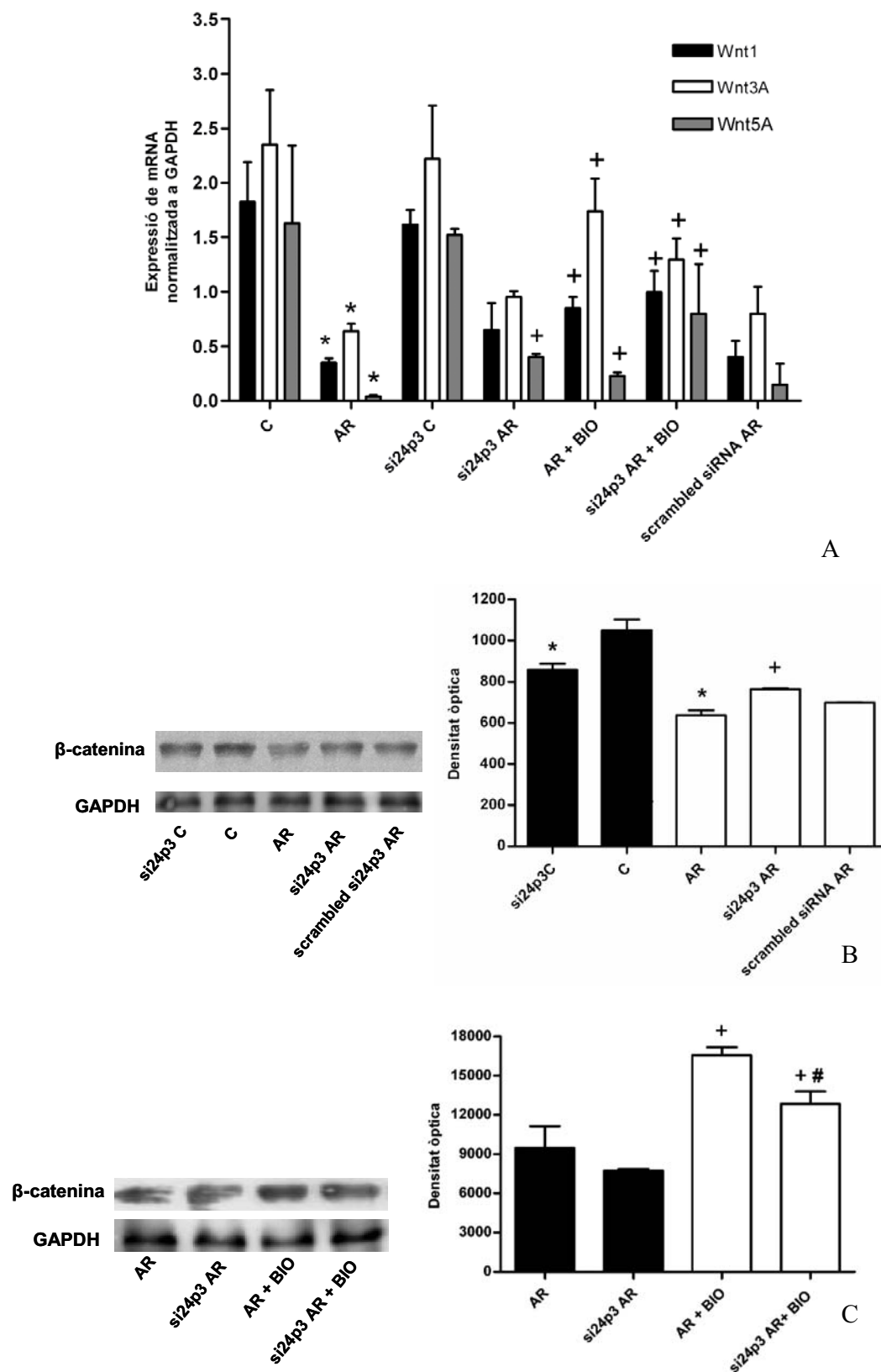


**Figura 57.** Expressió dels gens Wnt1, Wnt3A i Wnt5A normalitzada al gen GAPDH en els tres grups d'estudi. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR.

Aquest resultat mostrà la participació de la via Wnt en els neutròfils anòxics, així com la seva implicació en la re-inducció de l'apoptosi per *E.coli*.

Una vegada confirmat que la via Wnt es trobava disminuïda en els neutròfils anòxics, per tal de confirmar una implicació directa amb *24p3* i l'apoptosi, es va administrar el fàrmac activador de la via Wnt canònica BIO (6-bromoindirubin-3'oxime) i també es va silenciar el gen *24p3* mitjançant siRNA.

L'expressió dels gens Wnt1, Wnt3A i Wnt5A es va mesurar per *Real-Time* RT-PCR en els diferents grups (Figura 58A). En els mateixos grups es va mesurar també la proteïna diana de la via Wnt  $\beta$ -catenina mitjançant la tècnica de Western Blot (Figura 58B i C).



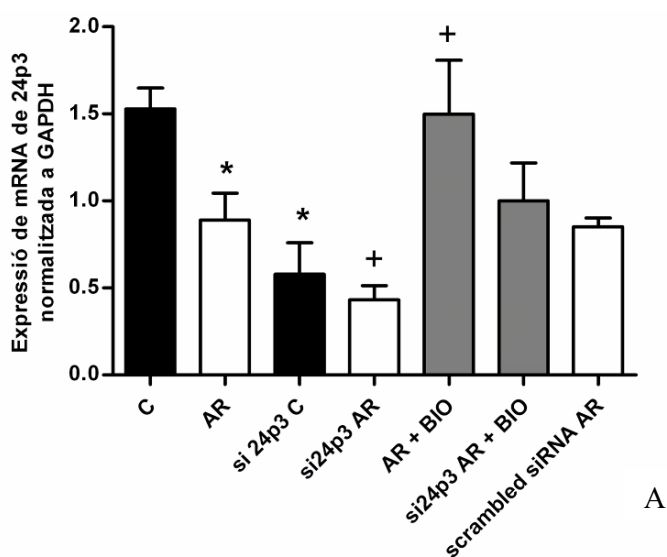
**Figura 58.** Components de la via Wnt. A- Expressió dels gens Wnt1, Wnt3A i Wnt5A en els neutròfils cultivats corregida per GAPDH. B,C – Western Blots de β-catenina (92 kDa) i de la proteïna de càrrega GAPDH (36kDa) dels neutròfils *in vitro*. A la dreta de les imatges es mostra la densitat òptica dels



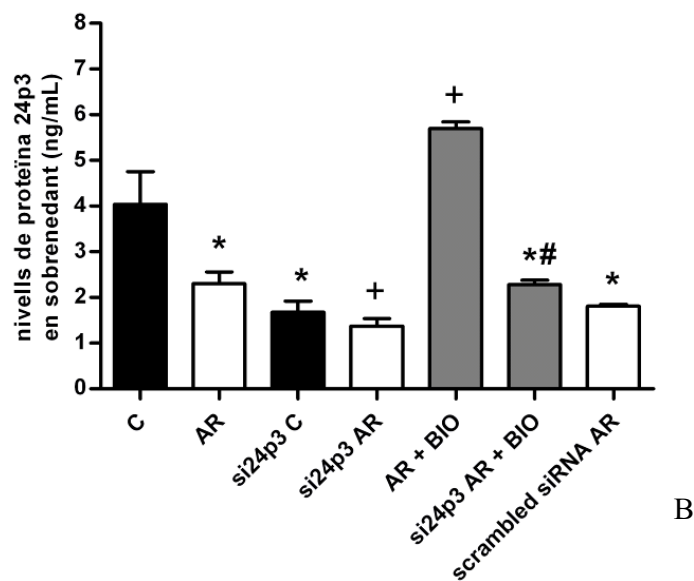
carrils dels Western Blot, corregida pel control de càrrega. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR+BIO.

Els resultats mostren que l'expressió dels gens Wnt, així com la proteïna  $\beta$ -catenina, es trobaven disminuïts en el grup AR, mentre que aquest efecte era revertit quan s'administrava l'activador de la via BIO, tal com era d'esperar. La silenciació de *24p3* no provocava cap efecte significatiu en la quantitat de  $\beta$ -catenina, tot i que l'expressió dels gens sí que variava en els grups anòxics.

L'expressió del gen *24p3* en aquests grups es va mesurar també per Real-Time RT-PCR (Figura 59A) i la quantitat de la proteïna per la tècnica d'ELISA en els sobrenedants cel·lulars (Figura 59B). Les dades mostren que l'expressió de *24p3* i la quantitat de proteïna es troben significativament augmentades quan s'administrava BIO a un grup AR, així com disminuïen de forma molt important (arribant a valors de reducció de més del 50%) en els grups on aquest gen es trobava silenciàt, confirmant d'una part l'eficiència de la tècnica de l'RNA d'interferència, i de l'altra la capacitat de l'activador de la via Wnt en augmentar l'expressió i transducció de *24p3*. Aquesta dada confirma també *24p3* com a gen diana de la via Wnt. Com era d'esperar, el grup scrambled siRNA AR no presentava diferències amb respecte el grup AR.



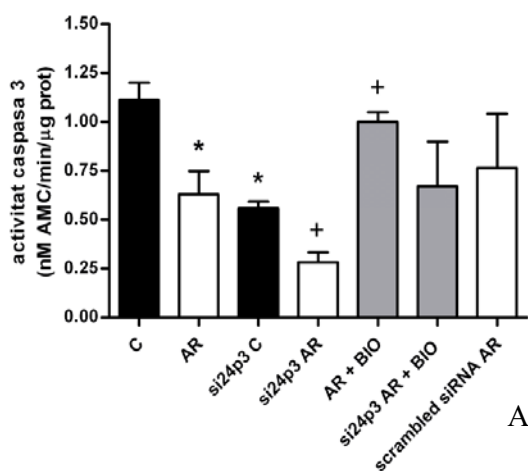
A



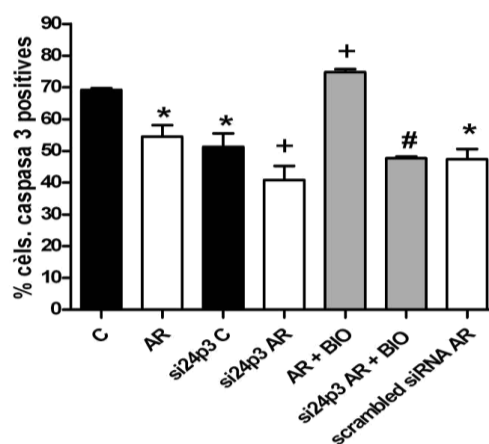
B

**Figura 59.** Determinació de *24p3* en el cultiu cel·lular. A- Real-Time RT-PCR de *24p3* normalitzada a GAPDH. B- ELISA de *24p3* en els sobredants cel·lulars. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR+BIO.

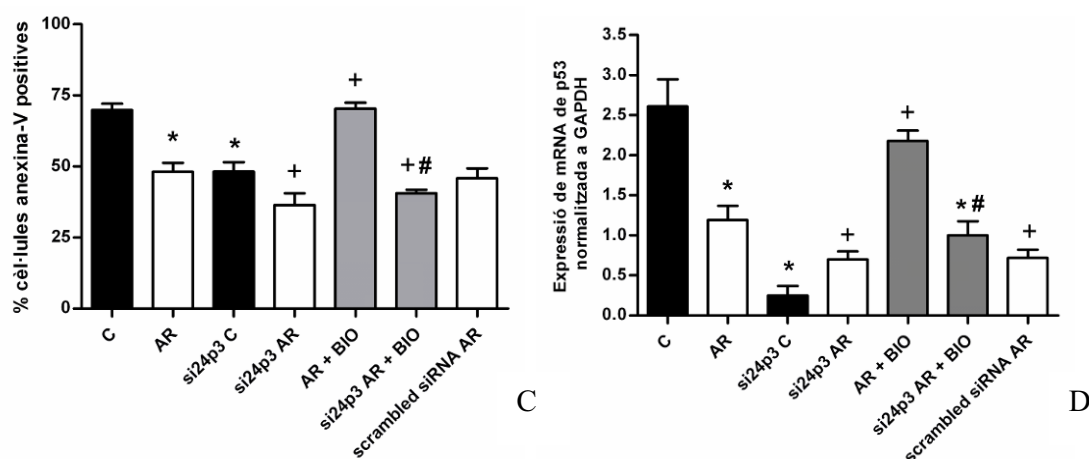
L'apoptosi dels neutròfils *in vitro* es va determinar mesurant l'activitat de caspasa 3 per fluorimetria (Figura 60A), el percentatge de cèl·lules positives per a aquesta caspasa per citometria (Figura 60B), les cèl·lules positives per Annexina-V/PI (Figura 60C) i l'expressió del gen p53 (Figura 60D). Tots aquests paràmetres confirmen que l'administració de l'activador de la via Wnt BIO indueix l'apoptosi d'aquestes cèl·lules, mentre que la silenciació de *24p3* en aquest grup reverteix la situació. Això reafirma que encara que s'indueixi la via Wnt, la producció i presència de *24p3* és indispensable per a l'activació de l'apoptosi dependent de Wnt. Paral·lelament, la silenciació del gen *24p3* tant en situacions control com en AR resultava també en una significativa disminució de l'activitat de caspasa 3 així com del percentatge de cèl·lules positives per Annexina-V/PI i de l'expressió del gen p53.



A



B



**Figura 60.** Apoptosi dels neutròfils cultivats *in vitro*. A- activitat de caspasa 3. B- Percentatge de cèl·lules positives per Anexina-V, C- expressió del gen p53 normalitzada a GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR, #  $p < 0.05$  vs. AR+BIO.

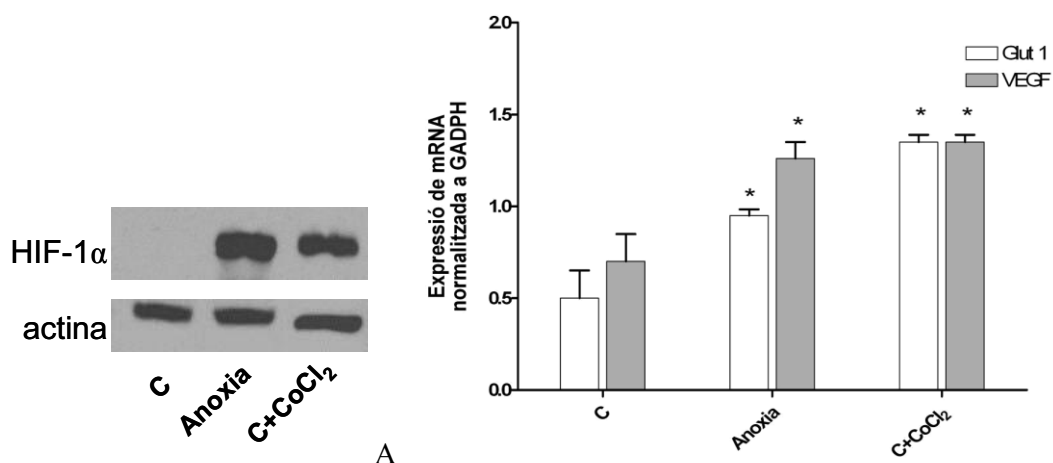
Els resultats obtinguts en aquesta primera part de l'estudi demostraren que l'anòxia disminuïa significativament la via Wnt, presentant el mateix patró que l'expressió de *24p3*. La inducció de la via mitjançant BIO provocà un augment considerable de la proteïna *24p3*, dada que es correlacionava amb la re-inducció de l'apoptosi dels neutròfils. La silenciació de *24p3* mostrà que l'apoptosi es trobava disminuïda tot i la presència del inductor de la via Wnt, el que suggerí que l'activació de Wnt participava en el control de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant la producció de *24p3*.

Tot seguit vam determinar la relació directa de l'anòxia en el procés mitjançant la implicació del factor induïble per la hipòxia HIF-1 $\alpha$ .

#### 4.3.2 HIF-1 $\alpha$ disminueix la via Wnt en condicions d'anòxia.

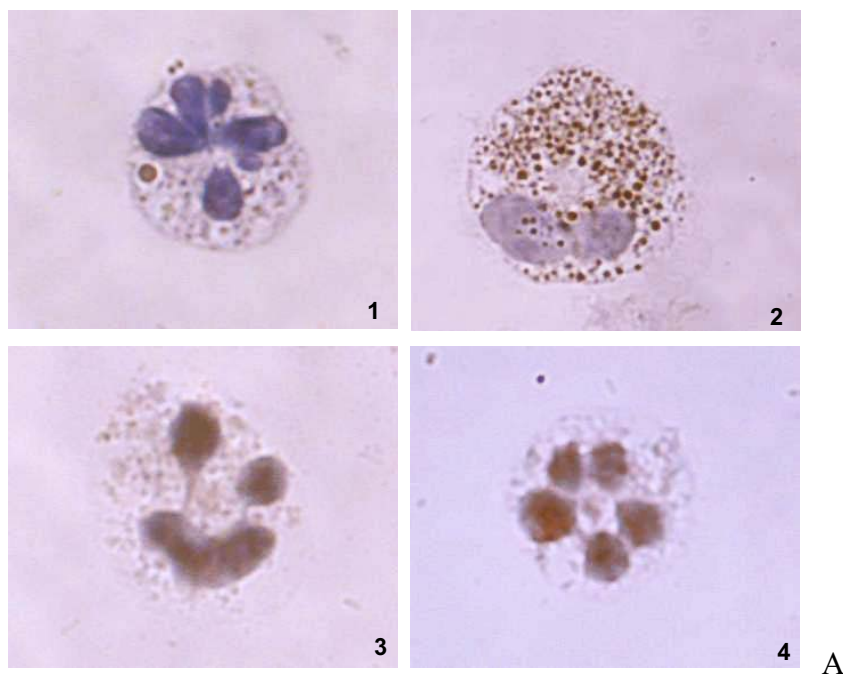
El factor HIF-1 $\alpha$  és descrit com un mediador de l'apoptosi dels neutròfils en anòxia. Com que l'activitat de la via Wnt es troba disminuïda en els neutròfils anòxics es va voler determinar si aquest factor induït per la hipòxia regula la via Wnt.

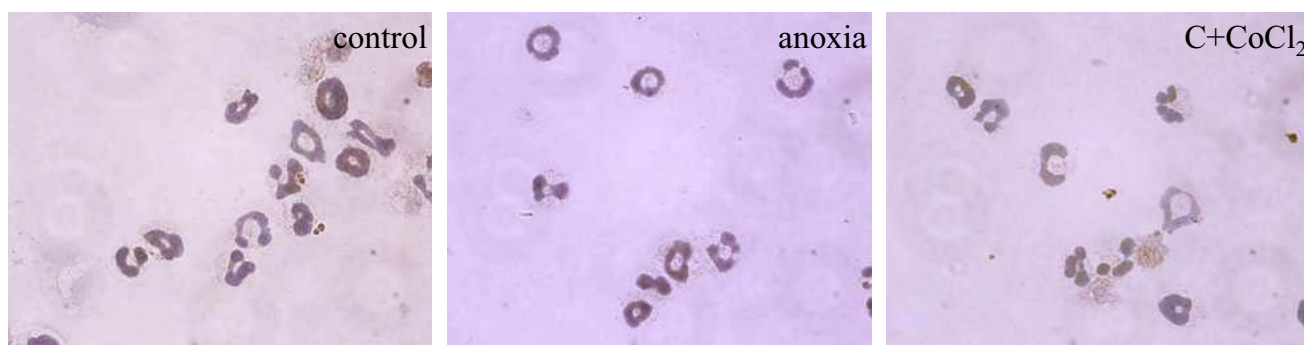
El factor de transcripció HIF-1 $\alpha$  es va determinar mitjançant Western Blot, utilitzant la proteïna actina com a control de càrrega (Figura 61A). Es va utilitzar clorur de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) com a estabilitzador d'HIF-1 $\alpha$  en el citoplasma cel·lular, evitant la seva degradació proteosòmica. Com era d'esperar, el grup control no presentava la proteïna HIF-1 $\alpha$ , mentre que els grups anòxia i C + CoCl<sub>2</sub> presentaven una quantitat similar d'aquest factor de transcripció. La mateixa tendència presentava l'expressió dels gens diana d'HIF-1 $\alpha$ , Glut-1 i VEGF, essent l'expressió d'aquests gens, com era d'esperar, significativament augmentada en els grups que presenten HIF-1 $\alpha$  estabilitzat (Figura 61B).



**Figura 61.** Determinació d'HIF-1 $\alpha$ . A- Western Blot d'HIF-1 $\alpha$  (105 kDa) i del control de càrrega actina (42kDa). B- Expressió dels gens diana d'HIF-1 $\alpha$  Glut-1 i VEGF mesurada per Real-Time RT-PCR i normalitzada a GAPDH. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control.

Aquesta estabilització, ja fos per mitjà de l'anoxia o per l'addició de clorur de cobalt comportà una disminució en la quantitat de  $\beta$ -catenina en les cèl·lules, tal i com es pot apreciar en les immunocitoquímiques de  $\beta$ -catenina amb contratacció del nucli amb hematoxilina (Figura 62B). Aquest resultat demostra com HIF-1 $\alpha$  inhibeix la via Wnt. En la Figura 62A es pot apreciar en detall la tinció de la  $\beta$ -catenina, la qual es pot trobar primerament en el citoplasma i a mesura que avança l'apoptosi es transloca cap al nucli.

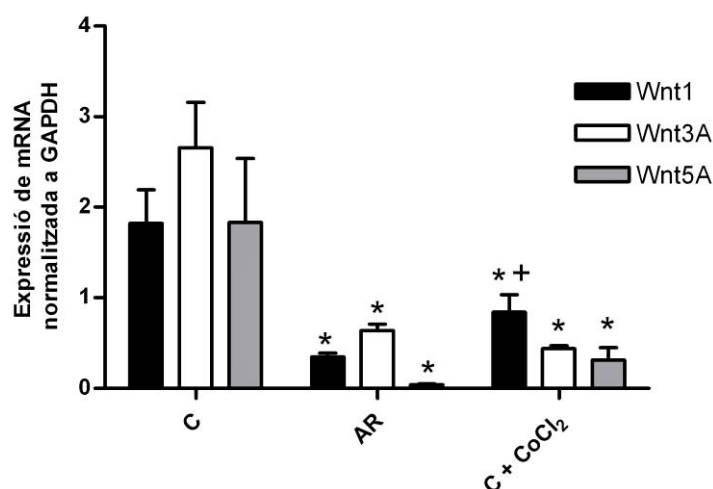




B

**Figura 62.** A- Imatges representatives de la diferent distribució de la  $\beta$ -catenina en els neutròfils. Es pot apreciar com primerament la proteïna es troba citoplasmàtica (1 i 2) i posteriorment es transloca al nucli (3 i 4) B- Immunocitoquímica de  $\beta$ -catenina amb el nucli contratenyit amb hematoxilina en els diferents grups d'estudi. El grup control mostra més presència d'aquesta proteïna respecte als altres dos grups d'estudi. ( $\times 60$ ).

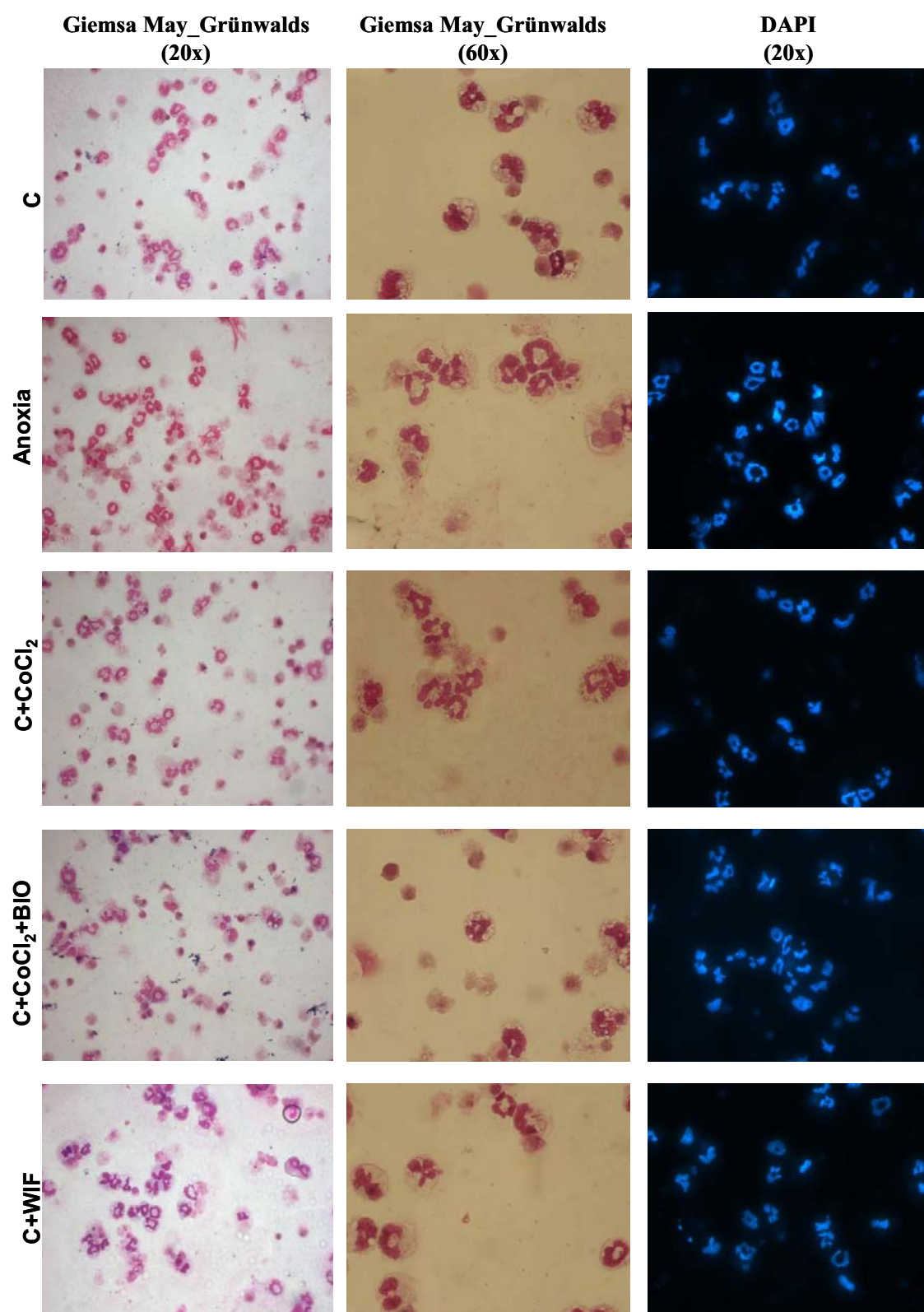
Per a confirmar el resultat anterior es va determinar per Real-Time RT-PCR l'expressió dels tres gens de la via Wnt (Figura 63). En línia amb els resultats de la immunocitoquímica, la presència d'HIF-1 $\alpha$  comportà una disminució en l'expressió de tots 3 gens, confirmant que el factor induïble per la hipòxia-1 $\alpha$  disminueix la via de senyalització Wnt durant l'anòxia.



**Figura 63.** Expressió de mRNA en els tres grups d'estudi. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR.

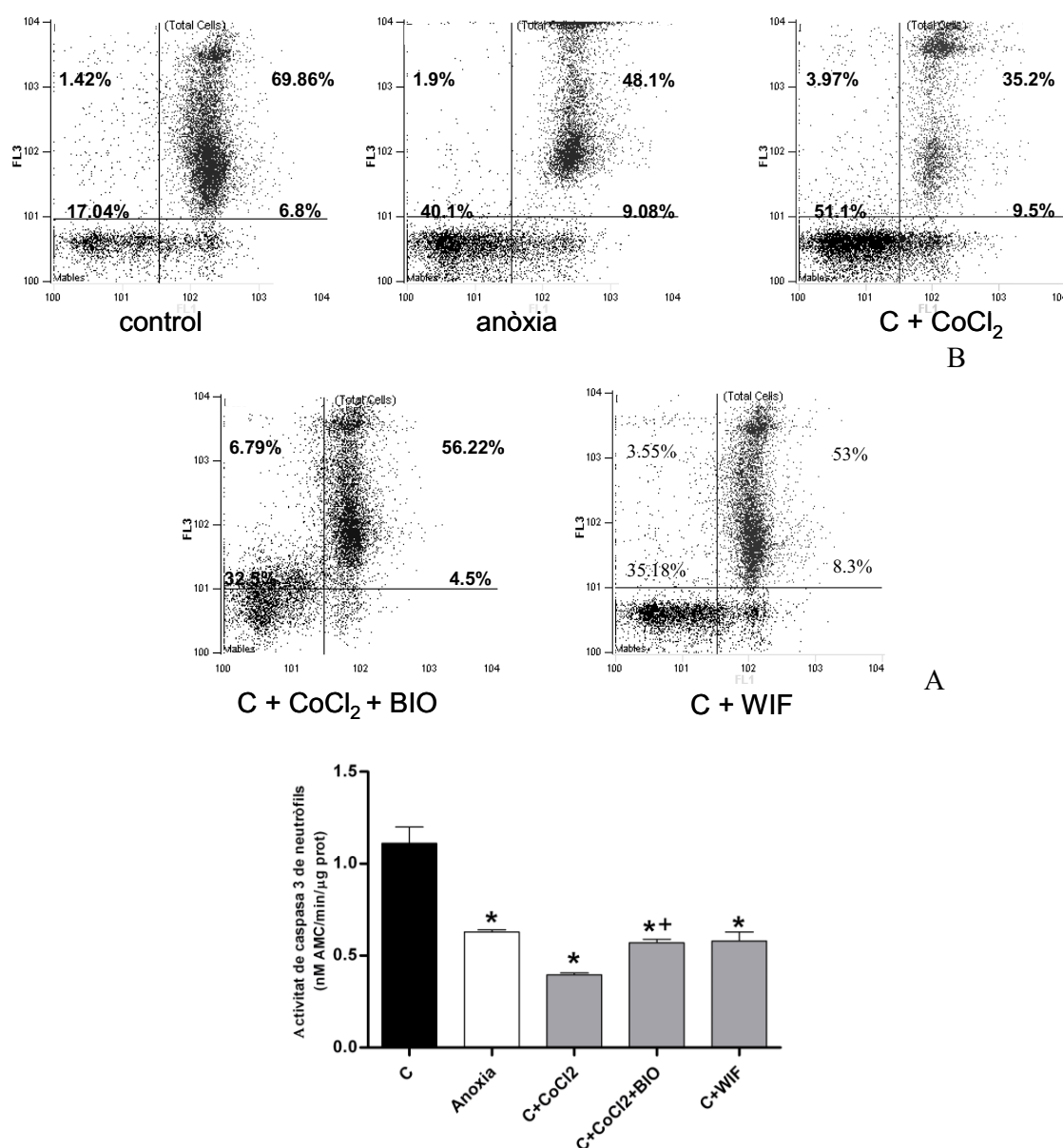
#### L'apoptosi dels neutròfils es veu afectada per la regulació d'HIF-1 $\alpha$ sobre la via Wnt.

En aquest estudi hem determinat que l'apoptosi dels neutròfils es troba retardada com a conseqüència de la inhibició de la via Wnt per l'anòxia.



**Figura 64.** Aspecte del cultiu cel·lular i morfologia dels neutròfils en els diferents grups d'estudi. A- Giemsa May-Grünwalds (20x), B- Giemsa May-Grünwalds (60x), C- DAPI (20x).

Com era d'esperar, l'apoptosi dels neutròfils es trobava disminuïda no només en anòxia sinó també quan s'administrava clorur de cobalt, suggerint que HIF-1 $\alpha$  controlava la mort cel·lular dels neutròfils en absència d'oxigen. La re-inducció de la via Wnt mitjançant l'administració de BIO va revertir el procés i provocà l'increment de l'apoptosi dels neutròfils, tal i com s'observà en els anàlisis citomètrics d'Anexina/PI (Figura 65A), d'activitat de caspasa 3 (Figura 65B) i en els paràmetres morfològics, indicant que l'efecte d'HIF-1 $\alpha$  sobre l'apoptosi dels neutròfils pot ser atribuït a l'efecte d'aquest factor sobre la via Wnt (Figura 64). La inactivació de la via mitjançant el factor inhibidor de Wnt (WIF) bloquejant l'apoptosi constitutiva d'aquestes cèl·lules demostra també la capacitat pro-apoptòtica de la via Wnt activa.

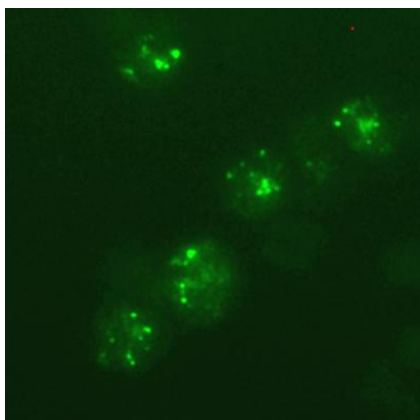


**Figura 65.** Implicació d'HIF-1 $\alpha$  en l'apoptosi dels neutròfils. A- Determinacions per anexina/PI, B- Activitat de caspasa 3. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. C+CoCl<sub>2</sub>.

#### 4.3.3 La modulació de la via Wnt per HIF-1 $\alpha$ inhibeix l'apoptosi dels neutròfils a través de *24p3*

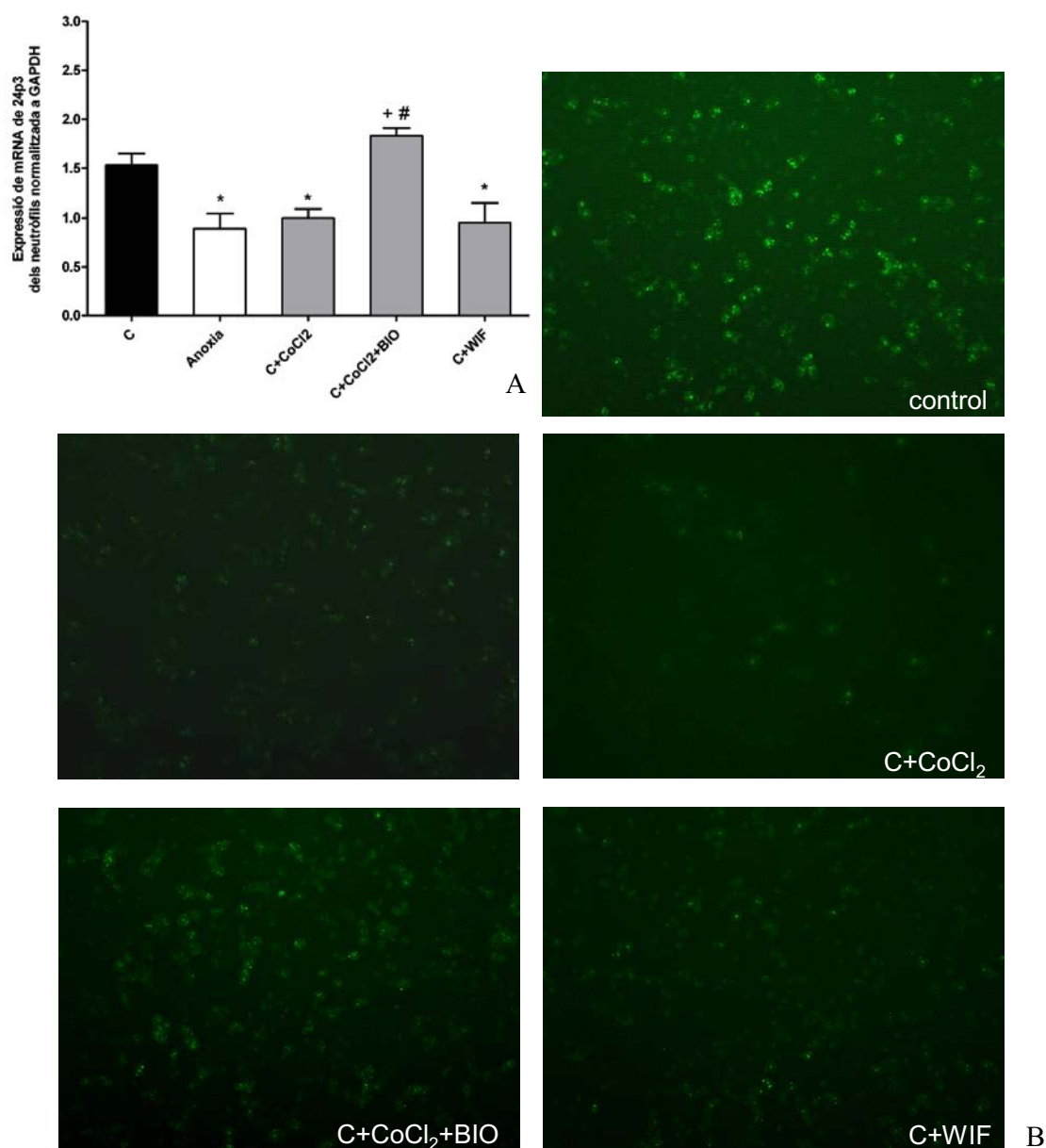
Finalment, per a determinar que HIF-1 $\alpha$  modulant Wnt convergia en un control de *24p3* com a component efector en l'apoptosi, es mesurà l'expressió de *24p3* i la quantitat de proteïna en els diferents grups d'estudi (Figura 67). La proteïna *24p3*, que es troba en poca quantitat en neutròfils anòxics, es mantenia també escassa en cèl·lules control tractades amb CoCl<sub>2</sub>. La mateixa tendència mostrà l'expressió del gen *24p3*, resultats que suggerien una relació directa entre aquesta lipocalina i HIF-1 $\alpha$  en els neutròfils.

L'expressió de la proteïna es pot visualitzar per la presència de fluorescència citoplasmàtica en forma d'acúmul fluorescents repartits per tot l'interior cel·lular, tal i com es veu en l'exemple, de forma ampliada, de la Figura 66.



**Figura 66.** Detall representatiu de la immunocitoquímica de *24p3* en neutròfils (X100).





**Figura 67.** A- Expressió de *24p3* mesurada per Real-Time RT-PCR i normalitzada a GAPDH. B- Imatges representatives de la immunofluorescència de *24p3* en els diferents grups d'estudi. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. Control, +  $p < 0.05$  vs. Anoxia, #  $p < 0.05$  vs. C+CoCl<sub>2</sub>

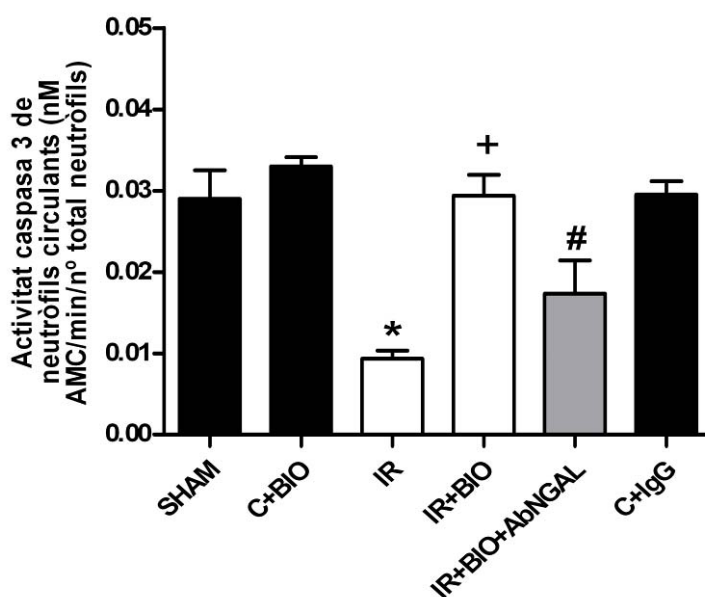
La re-activació de l'apoptosi per mitjà de BIO va revertir els efectes d'HIF-1 $\alpha$ , mostrant un increment significatiu en la quantitat de proteïna *24p3* en el citoplasma dels neutròfils juntament amb una elevada expressió del gen. L'administració de l'inhibidor de Wnt WIF presentà uns resultats semblants als anòxics, mostrant poca quantitat de proteïna *24p3* i poca expressió del seu gen.

Totes aquestes dades confirmaren que en condicions anòxiques, quan l'HIF-1 $\alpha$  es troba estabilitzat, aquest modula la via Wnt i, en conseqüència, el seu gen diana *24p3*, el qual inhibeix l'apoptosi dels neutròfils.

#### 4.3.4 La inducció de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant BIO després d'una IR millora el dany intestinal.

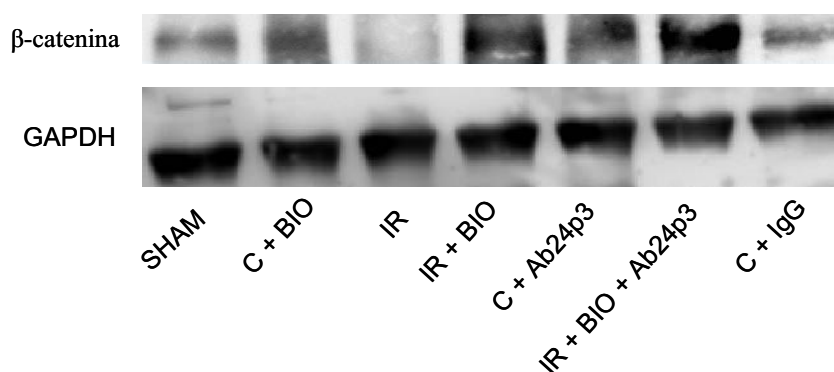
Havent demostrat *in vitro* que el retard en l'apoptosi dels neutròfils succeeix a través de la via Wnt i del seu gen diana *24p3*, vàrem focalitzar aquesta part de l'estudi en re-induir l'apoptosi dels neutròfils després d'una IR intestinal mitjançant l'activació de la via Wnt per tal de reduir el dany tissular.

Amb aquesta finalitat es va administrar BIO intravenosament una hora abans de les isquèmies. La figura 68 mostra l'habilitat de l'inductor de la via Wnt en promoure l'apoptosi dels neutròfils circulants una vegada està disminuïda per la isquèmia. L'administració conjunta de BIO i Ab*24p3* en canvi provocava una disminució en aquest paràmetre.



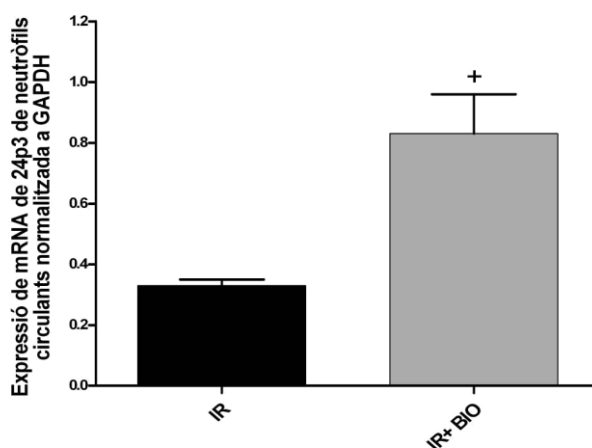
**Figura 68.** Activitat de caspasa 3 dels neutròfils circulants. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. sham, +  $p < 0.05$  vs. IR, #  $p < 0.05$  vs. IR + BIO.

L'activitat de Wnt en els neutròfils circulants dels animals va ser mesurada per la detecció de la proteïna  $\beta$ -catenina per Western Blot (Figura 69). L'administració de BIO provocava una augment en la quantitat d'aquesta proteïna, mentre que l'administració d'un anticòs anti-*24p3* no alterava aquest valor. Els neutròfils de les rates subjectes a una IR presentaven menys quantitat de  $\beta$ -catenina que les rates del grup sham. La proteïna GAPDH es va utilitzar com a control de càrrega.



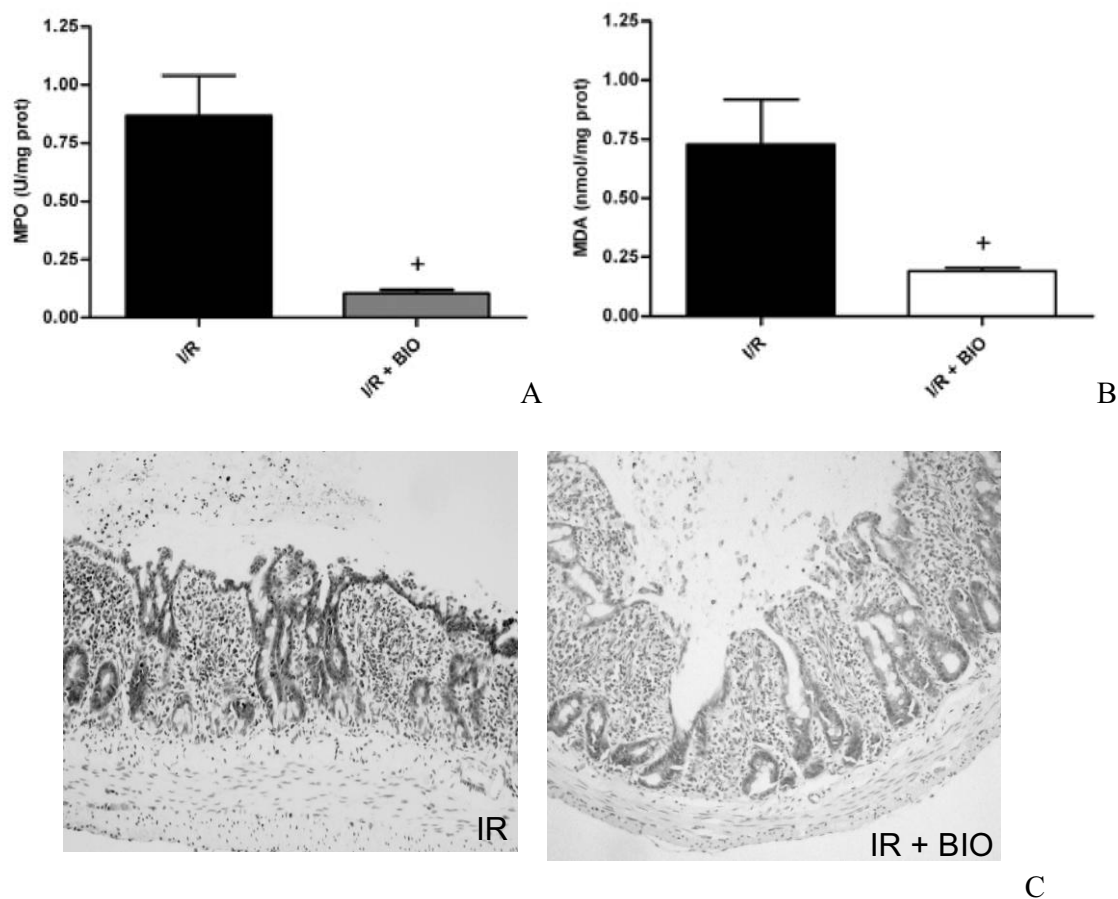
**Figura 69.** Quantitat de proteïna  $\beta$ -catenina (92 kDa) en neutròfils mesurada per Western Blot. El control de càrrega utilitzat fou la proteïna GAPDH (36 kDa).

L'habilitat directa de l'activació de Wnt en promoure l'expressió de  $24p3$  queda palesa en la figura 70.



**Figura 70.** Real-Time RT-PCR del gen  $24p3$  en neutròfils circulants. El resultat s'expressa com a mitjana  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs. IR

Les conseqüències en el teixit intestinal de l'administració de BIO en rates IR es van determinar mesurant l'activitat de mieloperoxidasa en homogenats intestinals (Figura 71A), així com mesurant els nivells de lipoperòxid (Figura 71B) i l'anàlisi histopatològic (Figura 71C). En totes les determinacions el grup IR + BIO presentava una disminució molt significativa del dany respecte al grup IR.



**Figura 71.** Marcadors de dany intestinal. A- nivells de MPO en homogenats de teixit intestinal. B- nivells de lipoperoxidació en l'intestí. C- imatges histològiques representatives de teixit intestinal tenyit amb hematoxilina/eosina. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. +  $p < 0.05$  vs. IR.

Tots aquests resultats mostraren que, una vegada activada la via Wnt *in vivo* l'apoptosi dels neutròfils era re-induïda, conduïnt a una millora significativa del dany intestinal produït per la IR.

#### 4.4 Objectiu 4. Estudi 4. L'esfingosina-1-fosfat en l'apoptosi del neutròfil anòxic

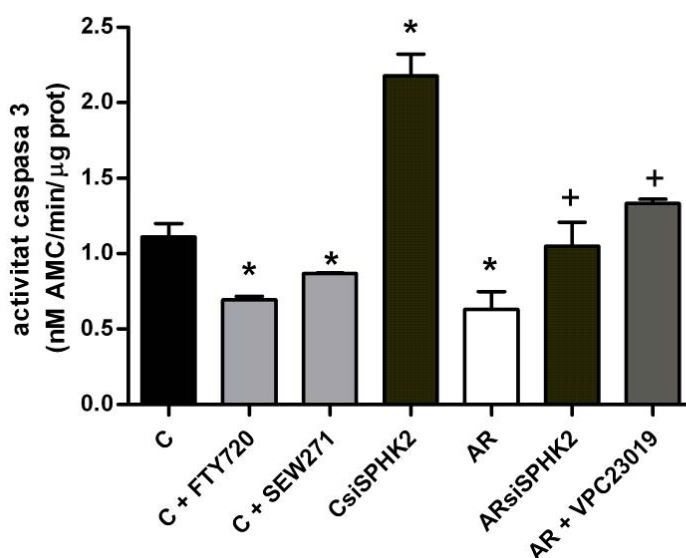
Recentment s'han descrit els metabòlits dels esfingolípid, com ara l'esfingosina-1-fosfat, com a molècules implicades en diversos processos cel·lulars, com ara la proliferació, la diferenciació i

l'apoptosi. La implicació d'aquestes molècules en el metabolisme dels neutròfils i, en concret, en la seva apoptosi ha estat molt poc discutit.

En aquest estudi es pretenia, per tant, averiguar si certs metabòlits dels esfingolípid, com ara l'esfingosina i l'S1P, podien estar implicats en l'apoptosi dels neutròfils i la seva possible relació amb *24p3*.

#### 4.4.1 L'esfingosina-1-fosfat modula l'apoptosi dels neutròfils

L'apoptosi dels neutròfils cultivats es va mesurar fluorimètricament mitjançant la medicació de l'activitat de la caspasa 3 (Figura 72). Els grups tractats amb agonistes dels receptors de S1P (FTY720, SEW2871) presentaven una disminució en l'activitat de caspasa 3, mentre que el grup AR + VPC23019 no presentava el retard de l'apoptosi característic del grup AR. Per altra banda els grups silenciats pel gen SPHK2 presentaven un augment significatiu en la seva apoptosi.

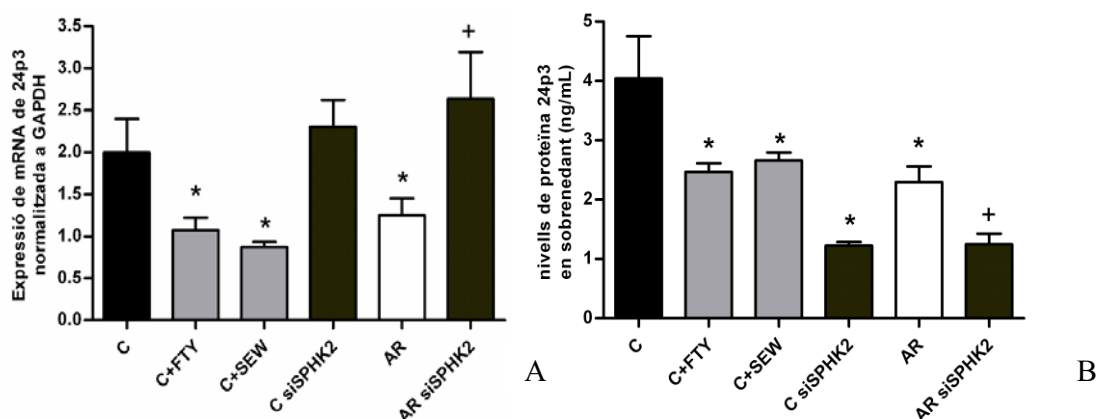


**Figura 72.** Activitat de caspasa 3 de neutròfils cultivats *in vitro*. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR.

Aquesta dada suggeriria la possible implicació del metabolisme dels esfingolípid en l'apoptosi dels neutròfils, essent les molècules agonistes d'S1P aparentment anti-apoptòtiques. La silenciació de l'SPHK2, que evitava la formació d'S1P, acumulant-se per tant, esfingosina, promovia l'apoptosi en els neutròfils.

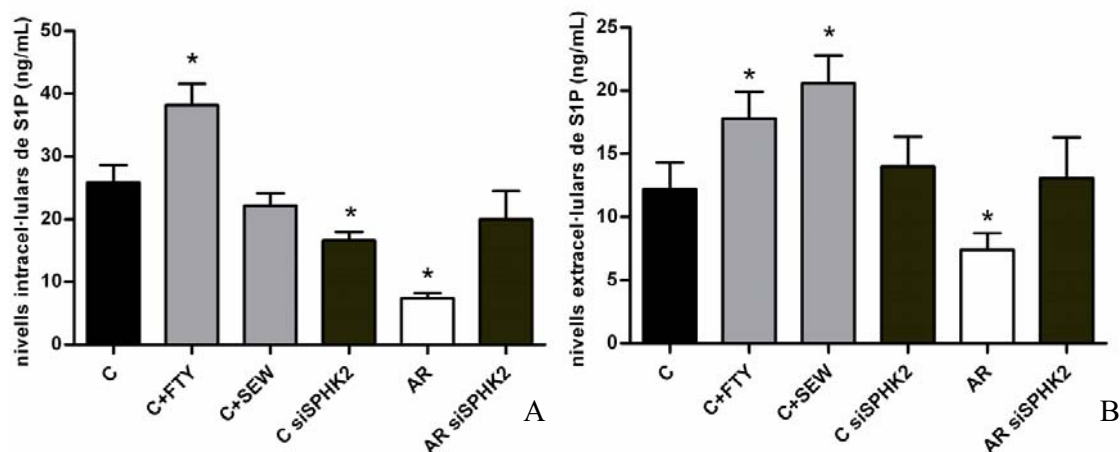
La possible relació d'aquests metabòlits amb *24p3* es va dur a terme mesurant l'expressió del gen *24p3* mitjançant Real-Time RT-PCR (Figura 73A) i quantificant la proteïna present en els sobrenedants cel·lulars amb la tècnica d'ELISA (Figura 73B). Els grups administrats amb agonistes dels receptors de S1P (FTY720, SEW2871) presentaven una disminució tant de l'expressió del gen com de la quantitat de proteïna en el sobrenedant, com és el cas també del grup AR. Per altra

banda el grup AR silenciats per la SPHK2 presentava un augment significatiu en l'expressió del gen, indicant aparentment també que la presència d'S1P inhibiria la formació de *24p3*.



**Figura 73.** Determinació de *24p3*. A- Expressió del gen *24p3* normalitzada a GAPDH. B- Quantificació de la proteïna *24p3* en el sobrenedant cel·lular, mesurat per ELISA. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control, +  $p < 0.05$  vs. AR.

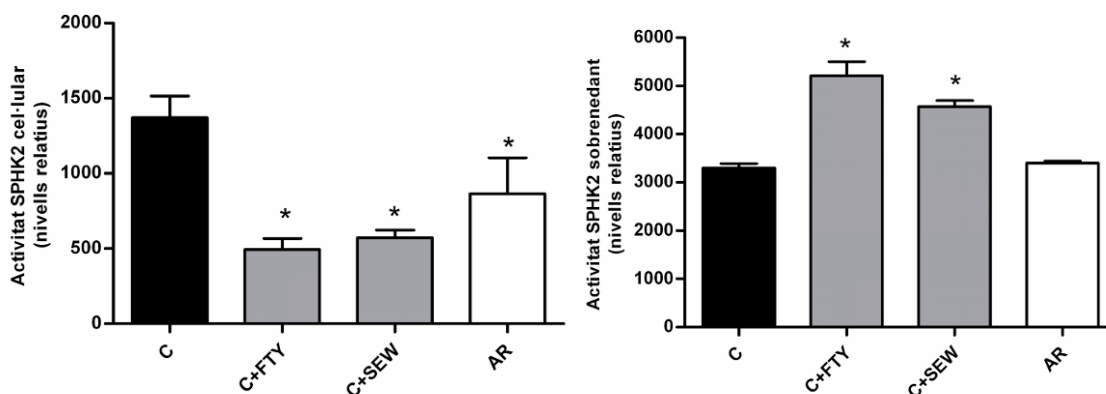
Els nivells de S1P es van mesurar tant intracel·lularment com en els sobrenedants cel·lulars (Figura 74A i B). Les dades ens van confirmar que els grups tractats amb agonistes dels receptors de S1P presentaven, com era d'esperar, nivells alts de l'esfingolípide en els dos casos, mentre que el grup AR, curiosament i al contrari de l'esperat, presentava una disminució d'aquests nivells.



**Figura 74.** Mesura dels nivells de S1P. A- nivells intracel·lulars de S1P (ng/mL). B- nivells extracel·lulars de S1P (ng/mL). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control.

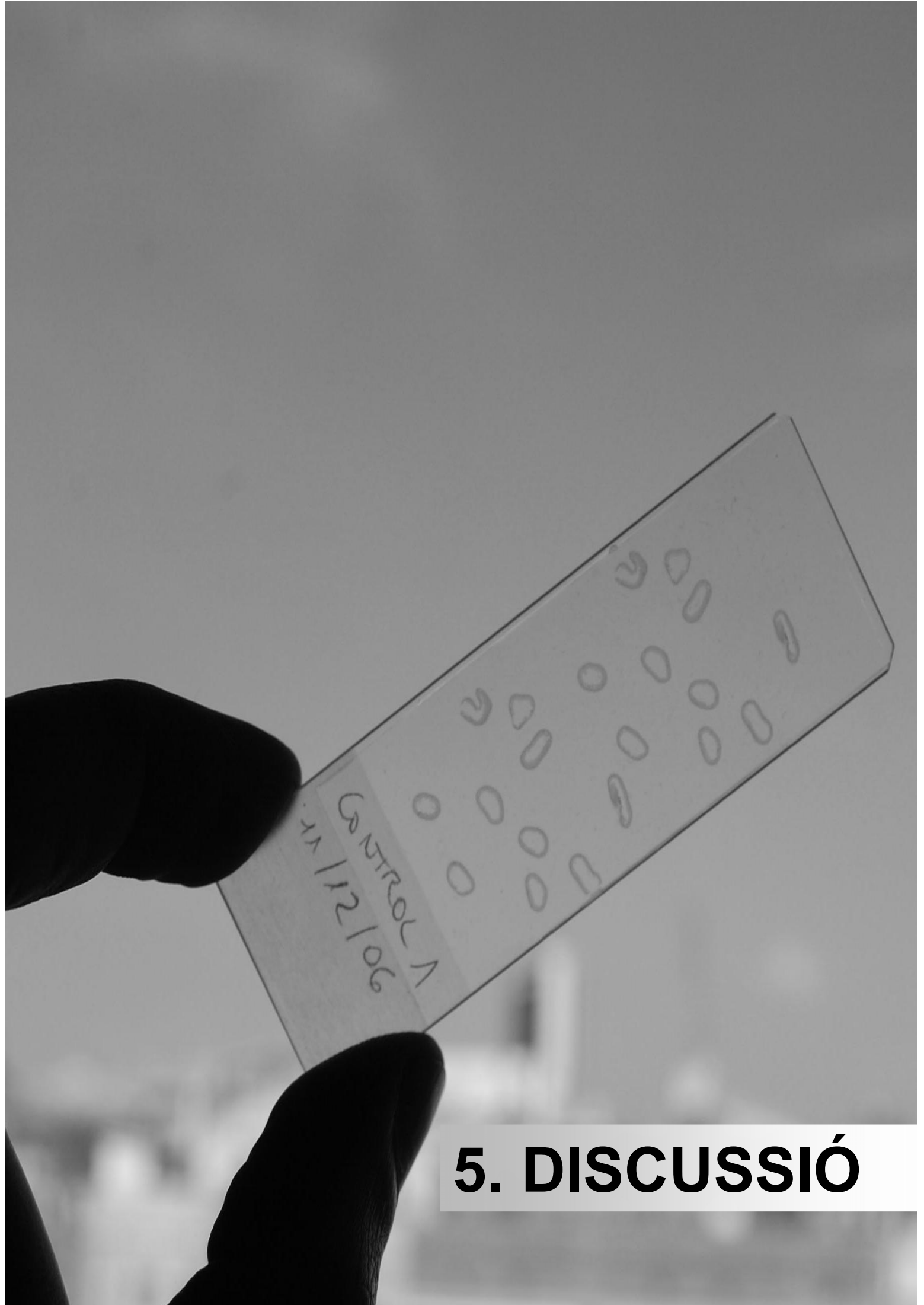
Tot i que quan s'administren els agonistes d'S1P, l'apoptosi dels neutròfils i els valors de *24p3* concorden, els nivells obtinguts d'S1P mostren un comportament diferent entre les cèl·lules anòxiques i les cèl·lules tractades farmacològicament, suggerint que ambdós mecanismes succeeixen per vies diferents.

L'activitat de l'esfingosina quinasa 2 també es va mesurar tant a nivell cel·lular com en els sobrenedants dels cultius (Figura 75), tornant a suggerir que les cèl·lules anòxiques es comporten de manera diferent que les tractades farmacològicament.



**Figura 75.** Activitat enzimàtica de l'esfingosina quinasa 2. Els valors es mostren en unitats relatives. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. control.

Els resultats obtinguts fins ara en aquest estudi mostren una relació entre el metabolisme dels esfingolípids i l'apoptosi dels neutròfils. La implicació d'S1P en els neutròfils anòxics no sembla coincidir amb els tractaments farmacològics, suggerint una via d'actuació diferent. Els resultats suggereixen que farmacològicament l'S1P podria modular *24p3*. En els experiments anòxics sense modulació exògena de l'esfingosina, els nivells d'S1P segueixen la mateixa tendència que *24p3*.



# 5. DISCUSSIÓ





## 5. DISCUSSIÓ

Els processos patològics d'origen isquèmic són la primera causa de mort en els països desenvolupats. En el cas de l'intestí, la isquèmia (sigui quin sigui el seu origen) s'ha convertit en un seriós, freqüent i creixent problema clínic amb una inacceptable mortalitat, que oscil·la al voltant del 70%. El percentatge de supervivència no ha millorat substancialment en els últims 70 anys, degut a que es tracta majoritàriament d'una síndrome poc previsible i amb uns símptomes, moltes vegades sub-clínic, que fan que no es descobreixi abans de l'infart intestinal.<sup>16,17</sup>

Tot i que es desconeix la incidència real, es cita que de cada 1000 intervencions quirúrgiques d'urgències, entre 1 i 4 d'aquestes són degudes o es compliquen amb una isquèmia intestinal. En l'actualitat el tractament més utilitzat és l'administració de vasodil·latadors que arriben a reduir la mortalitat dels pacients fins a un 40-50%. Sigui com sigui, els pacients amb símptomes clínic de fallada intestinal són tractats després de que el dany s'hagi desenvolupat, excepte en el cas de pacients als que se'ls hi practica un transplantament.

Tot i l'impacte clínic de les isquèmies intestinals i dels esforços científics invertits en el seu estudi, el coneixement complert de les causes i mecanismes que originen i formen part d'una isquèmia intestinal és pobre.

Les cèl·lules inflamatores vasculares, principalment polimorfonuclears, tenen un paper clau contribuint a l'amplificació del dany del teixit induït per la IR mitjançant la producció de citocines pro-inflamatòries, radicals lliures d'oxigen i l'alliberació d'enzims hidrolítics. L'acumulació de neutròfils és una de les característiques més ben definides dins de les alteracions microvasculars associades al dany per IR i la que juga un paper primordial en els fenòmens d'inflamació associats a la síndrome.<sup>36</sup>

Aquestes cèl·lules, en circulació, tenen un vida mitja molt curta (8-20 hores), però es coneix que la hipòxia allarga la seva supervivència augmentant-la una vegada penetren en el teixit isquèmic. Això, al contrari de ser una avantatge, permet a la cèl·lula viure més del desitjat, amplificant el dany.<sup>177</sup>

De totes maneres, en el cas concret de la IR intestinal no hi ha dades sobre aquest paper de la isquèmia en el retard apoptòtic dels neutròfils.

**Estudi 1. Caracterització de l'apoptosi dels neutròfils en la inflamació induïda per la isquèmia/reperfusió.**

La mucosa intestinal és probablement un dels teixits més sensibles al dany per isquèmia, essent l'acumulació de neutròfils una de les alteracions microvasculars característiques.<sup>31</sup>

Els neutròfils circulants són cèl·lules d'una vida mitja molt curta, les quals experimenten constitutivament apoptosi. En una situació d'inflamació fisiològica o controlada, després de que aquestes cèl·lules hagin realitzat la seva funció, moren per apoptosi i les seves restes són retirades pels macròfags, conduïnt a una millora de la inflamació. Per contra, un retard en l'apoptosi dels neutròfils s'ha associat a diverses situacions proinflamatòries, com ara en la síndrome respiratòria aguda, en síndromes coronàries agudes i en certs models de dany per isquèmia/reperfusió.<sup>64,65,184,185</sup> Curiosament, després d'una IR intestinal però no s'ha descrit que aquestes cèl·lules presentin un retard en la seva apoptosi constitutiva.

L'apoptosi dels neutròfils és un procés clau en la resolució de la inflamació i una desregulació d'aquest mecanisme contribueix a la progressió del dany i la patogènesi. Per tant, hi ha evidències que suggereixen que una modulació farmacològica de l'apoptosi dels neutròfils pot ésser capaç de millorar el dany en un procés inflamatori.<sup>99</sup>

Tenint en ment que la reducció de neutròfils en teixits isquèmics millora el dany, els diferents tractaments farmacològics dissenyats fins ara s'han basat en mermar la càrrega de neutròfils a través de diferents vies, però cap d'aquests treballs ha intentat modular l'apoptosi del neutròfil i, menys encara, induïr-la per a resoldre la inflamació intestinal derivada de la isquèmia/reperfusió. En la primera part d'aquest estudi, ens vam centrar en l'obtenció del grau de dany més idoni per al nostre estudi, tenint en compte que havíem de provocar una isquèmia suficient per induïr una inflamació però no excessiva que comportés una pèrdua tissular irreversible. Per això vam realitzar primer diferents processos isquèmics en dues soques de rates. D'aquestes dues soques, una és coneguda com a sensible als insults isquèmics (Sprague Dawley), mentre que l'altra està descrita com a resistent (Brown Norway).<sup>186</sup>

Així vam mesurar en el teixit intestinal dels diferents grups amb diferents graus d'isquèmia, activitat de caspasa 3 tissular, anàlisis histopatològics, activitat de MPO i nivells de MDA. Les dades mostraren que el grup I45/R180 de la soca SD presentava una elevada inflamació i un dany tissular considerable però no irreversible. En canvi les altres isquèmies més intenses patien molta pèrdua de teixit i un augment considerable de necrosi, descartant aquests insults isquèmics per l'estudi.

D'altra banda la soca BN mostrava en el temps escolit (I45/R180) uns valors similars al sham, confirmant la resistència d'aquesta soca en front el dany isquèmic. Els altres insults isquèmics en aquesta soca mai arribaren al nivell de dany obtinguts amb SD.

Recolzant la nostra hipòtesi, la determinació de l'apoptosi dels neutròfils circulants mesurant l'activitat de caspasa 3 va mostrar una disminució d'aquest enzim en tots els grups isquèmics respecte als grups control en ambdues soques de rata, independentment de la seva resistència o sensibilitat a la IR. El grup sotmès a una isquèmia de 45 minuts seguits de 180 minuts de reperfusió (I45/R180) en la soca SD és el que mostrà la major disminució en el paràmetre

apoptòtic mesurat. De totes maneres, és interessant destacar que els valors d'apoptosi de la soca BN eren remarcablement inferiors que els de la soca SD, no només en els grups isquèmics sinó també en el grup control. Aquesta dada suggeriria que una menor apoptosi constitutiva dels neutròfils podria ser una dels factors implicats en el mecanisme de resistència de la soca BN en front un procés isquèmic.

En aquest estudi vam determinar també que el procés d'IR intestinal no produïa retard en l'apoptosi d'altres cèl·lules sanguínies, com són les cèl·lules mononuclears circulants. Cap dels quatre grups estudiats presentava diferències entre ells, suggerint que, al contrari del que succeeix amb els neutròfils, la IR intestinal no provoca cap efecte sobre l'apoptosi d'aquestes cèl·lules.

Amb totes les dades obtingudes fins aquest punt es va concloure que la soca Sprague Dawley era la idònia per a la realització dels estudis, ja que presentava un major dany en front de la IR intestinal, a la vegada que presentava també un major retard en l'apoptosi dels seus neutròfils circulants. Dins d'aquesta soca, es va escollir el grup I45/R180 (IR) com el més adient per a l'experimentació, doncs presentava un dany intestinal important però reversible i un significatiu retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants.

Una vegada confirmat el retard apoptòtic en el grup IR, en una segona etapa de l'estudi vam modular l'apoptosi dels neutròfils circulants després de la IR intestinal i es van determinar les conseqüències d'aquesta modulació en el teixit de l'intestí.

Per modular l'apoptosi constitutiva es va administrar sistèmicament *Escherichia coli* morta i opsonitzada, que ha estat descrita com un activador de la mort programada dels neutròfils de manera específica, sense una activació inflamatòria o immunològica per part de les cèl·lules sanguínees. L'administració en forma d'aerosol d'*E.coli* morta i opsonitzada s'ha demostrat que re-indueix l'apoptosi dels neutròfils després d'un dany pulmonar per IR,<sup>100,101</sup> conduint a una millora del dany d'aquest òrgan i a una major taxa de supervivència, essent un nou mecanisme de modulació de l'apoptosi dels neutròfils i de la millora del dany produït per una IR.

Les conseqüències en el teixit intestinal de la reversió del retard de l'apoptosi dels neutròfils era clara, mostrant una significativa disminució dels paràmetres de dany tissular, tal i com es mostra en les figures 36, 37 i 39; això és, els nivells de mieloperoxidasa i de lipoperoxidació similars als presentats per les rates control. Per altra banda, el major augment de IL-10 durant l'administració d'*E.coli* suggereix que el teixit genera un ambient anti-inflamatori ajudant a la resolució del dany.

El número de neutròfils aïllats de la sang perifèrica es va comptabilitzar, mostrant un augment significatiu després d'una IR intestinal, indicant que molts més neutròfils es trobaven en circulació cap a les zones inflamades i que, probablement la seva apoptosi es trobava retardada. Una vegada s'havia administrat l'inductor apoptòtic *E.coli*, el nombre de neutròfils aïllats decreixia considerablement, confirmant l'eficiència de la tècnica i el seu poder pro-apoptòtic.

---

Així doncs, aquest estudi confirma que el retard en l'apoptosi dels neutròfils participa en el dany produït per una IR intestinal, en concret que l'apoptosi dels neutròfils es troba retardada després d'una IR intestinal. La re-inducció d'aquest retard mitjançant l'administració d'*E.coli* és capaç de millorar el dany de l'intestí.

La resistència genètica al dany isquèmic ve acompanyada d'un menor retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants, és a dir, d'un manteniment de l'apoptosi constitutiva després d'un insult per IR intestinal.

## **Estudi 2. La proteïna secretable dels neutròfils *24p3* és determinant en la re-inducció de la seva apoptosi**

Els neutròfils presenten la proteïna secretable *24p3* en els seus grànuls. *24p3* ha estat descrita d'ésser capaç d'induir l'apoptosi de manera específica depenent del tipus cel·lular, essent els neutròfils un dels tipus susceptibles.<sup>102,103</sup> Aquesta proteïna secretable es troba involucrada en diversos mecanismes en aquestes cèl·lules, entre ells, l'apoptosi en condicions de deprivació de factors de creixement.<sup>122</sup> De totes maneres, el paper que juga en l'apoptosi constitutiva dels neutròfils, així com en malalties inflamatòries on l'apoptosi dels neutròfils es troba retardada no ha estat encara definida.

Els neutròfils presenten mort cel·lular espontània en absència de citocines o d'altres agents pro-inflamatoris, però en condicions d'anòxia/hipòxia, al contrari que molts d'altres tipus cel·lulars, presenten un retard en la seva apoptosi.<sup>69</sup> La línia cel·lular promielocítica MPRO clon 2.1 es pot diferenciar a neutròfils adults en presència de factor de creixement GM-CSF i d'àcid all-trans

retinoic (ATRA). D'aquesta manera aquestes cèl·lules demostren una activació completa i funcional cap a neutròfils, essent un model d'estudi que reflecteix de manera acurada la capacitat funcional dels neutròfils murins adults.<sup>176</sup> Aquesta línia cel·lular va ser la utilitzada en la primera part d'aquest estudi, que tenia com a finalitat establir un cultiu de línia cel·lular de neutròfils per aprofundir en el rol de *24p3* en l'apoptosi del neutròfil durant l'anòxia. Així doncs, després de cultivar les cèl·lules durant 96 hores en presència de 10 µM d'ATRA i obtenir neutròfils madurs (Figura 40), vam comprovar que en absència de la citocina GM-CSF, els neutròfils entraven en apoptosi de forma progressiva (figures 41, 42), la qual podia ésser retardada quan les cèl·lules eren cultivades en condicions d'anòxia/reoxigenació (AR, 0.6% O<sub>2</sub>). Tots els paràmetres apoptòtics mesurats (entre ells, activitat de caspasa 3, cèl·lules positives per Annexina/PI i immunofluorescències) recolzaren aquest comportament cel·lular (Figura 44). Aquesta observació confirmava també la correcta diferenciació del cultiu cel·lular MPRO cap a neutròfils madurs completament funcionals.

Una vegada establert el model *in vitro* vam voler estudiar la implicació de la proteïna *24p3* en l'apoptosi dels neutròfils. Per aquest propòsit, i reproduïnt les condicions en que es va treballar *in vivo*, es va utilitzar *E.coli* morta i opsonitzada com a re-activador del retard de la mort cel·lular programada.

Tal i com succeí *in vivo*, l'administració d'*E.coli* va revertir l'efecte anti-apoptòtic de l'anòxia/reoxigenació. L'administració d'un anticòs específic bloquejant l'acció de *24p3* en aquest grup tornava a inhibir l'apoptosi, suggerint de manera directa un paper per a la lipocalina *24p3* en la re-inducció de la mort cel·lular programada.

A més, en condicions d'AR, *24p3* es trobava disminuït, tant a nivell d'expressió gènica com a nivell proteic. La re-inducció de l'apoptosi per mitjà d'*E.coli* comportava la reversió d'aquest fet, augmentant ambdós paràmetres. És destacable que quan s'administrà l'anticòs anti-*24p3*, l'expressió gènica de *24p3* disminuï, el que podria suggerir algun tipus de resposta *feed-back* negativa. La quantificació de la proteïna pel mètode d'ELISA en aquest grup no va poder ésser quantificada per possibles interferències en la tècnica entre els diferents anticòssos.

Així doncs, després d'una anòxia/reoxigenació, tant l'expressió com la síntesi de *24p3* es troben disminuïts en els neutròfils, coincidint amb el retard apoptòtic. La re-inducció de l'apoptosi a través d'*E.coli* provoca una augment en els dos paràmetres de *24p3*. El bloqueig d'aquesta proteïna mitjançant l'aplicació d'un anticòs durant la re-inducció inhibeix l'apoptosi obtinguda, suggerint que el mecanisme pro-apoptòtic succeeix a través de *24p3*.

El fet que l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars succeeixi a través de *24p3* mentre que d'altres tipus cel·lulars no semblen afectats per aquesta proteïna ha suggerit que podria haver un receptor cel·lular per a *24p3* molt selectiu.<sup>122</sup> Per a comprovar si en les diferents condicions de cultiu els neutròfils podien expressar diferencialment el receptor per a *24p3*, es va mesurar la seva expressió gènica. El resultat mostrà que no solament es trobava implicada l'expressió de *24p3* sinó que el propi receptor cel·lular presentava la mateixa tendència, el que faria augmentar

els efectes dins la cèl·lula. Així doncs, en una situació d'AR on els neutròfils presenten una apoptosi disminuïda, les expressions tant de *24p3* com del seu receptor es troben també decrescudes, mentre que quan es reverteix aquesta situació mitjançant l'administració d'*E.coli* les expressions dels dos gens augmenten significativament. Per altra banda, un neutròfil control amb una apoptosi programada i ràpida presenta nivells alts tant de *24p3* com del seu receptor.

L'administració de l'anticòs bloquejant l'acció de *24p3* no comportava cap canvi en l'expressió del seu receptor.

L'expressió de la megalina, l'altre receptor descrit per a *24p3* no va mostrar diferències significatives entre cap dels grups d'estudi.

S'ha descrit que la lipocalina *24p3* s'indueix en condicions d'estrés oxidatiu, essent la seva expressió induïda pels ROS, actuant, a més, com un mecanisme protector de la toxicitat produïda per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>112,187</sup> El següent pas en l'estudi va ésser comprovar si la modulació de l'apoptosi dels neutròfils a través de *24p3* implicava la participació de radicals lliures d'oxigen. Així, en cèl·lules administrades amb la proteïna *24p3* es va afegir al medi sulfat de difenileniòde (DPI), un inhibidor de la NADPH oxidasa (enzim principal en la formació de ROS en neutròfils)<sup>188</sup>, i es va mesurar l'apoptosi (Figura 49). El resultat va mostrar com l'apoptosi re-induïda mitjançant l'administració de *24p3* era bloquejada quan s'inhibia la NADPH oxidasa, suggerint que els efectes de *24p3* involucraven els ROS. A més, la quantitat de ROS disminuïa en els neutròfils en condicions d'AR o quan s'administrava DPI, com era esperable, tal i com es va poder observar mitjançant la fluorescència alliberada per la calceïna. L'administració de *24p3* al grup AR comportà la formació de ROS en els neutròfils, confirmant la implicació d'aquestes molècules en el procés.

Una vegada confirmat que *24p3* participava en el mecanisme apoptòtic dels neutròfils *in vitro*, vam voler comprovar si aquesta proteïna es trobava també involucrada en el nostre model d'IR intestinal. Per a tal finalitat es van tractar animals isquèemics amb la proteïna recombinant *24p3* i també amb l'anticòs anti-*24p3*.

L'administració intravenosa d'un anticòs anti-*24p3* bloquejava l'efecte de la proteïna, provocant una disminució tant de l'apoptosi constitutiva dels neutròfils circulants com de l'apoptosi re-induïda per *E.coli*. A més, en aquestes cèl·lules es mostrava un augment en l'expressió del gen *24p3* quan les rates eren administrades amb *E.coli*, confirmant que aquesta lipocalina jugava un paper important en la re-inducció de l'apoptosi. L'administració intravenosa de la pròpia proteïna *24p3* després d'una IR intestinal provocà un augment significatiu de l'apoptosi dels neutròfils circulants, demostrant el paper d'aquesta lipocalina en la inducció de l'apoptosi dels granulòcits *in vivo*.

Tal i com s'havia observat quan es modulava l'apoptosi dels neutròfils mitjançant *E.coli*, la modulació d'aquesta apoptosi a través de l'administració de la proteïna *24p3* o de l'anticòs anti-*24p3*, tenia conseqüències en els paràmetres de dany intestinal. El bloqueig de la re-inducció de l'apoptosi en els neutròfils provocat per l'administració de l'anticòs anti-*24p3* en una rata IR

tractada amb *E.coli* provocà un augment del dany intestinal, mentre que la inducció de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant l'administració de la proteïna *24p3* en una rata subjecte a una IR intestinal provocà una disminució del dany en aquest teixit.

Així doncs, es pot concloure que la proteïna secretada dels neutròfils *24p3* es troba directament implicada en l'apoptosi dels neutròfils, actuant com a factor pro-apoptòtic en aquestes cèl·lules. El retard apoptòtic durant l'AR/IR és degut a una disminució de *24p3*. El bloqueig de la proteïna mitjançant l'aplicació d'un anticòs inhibeix tant l'apoptosi constitutiva com la re-induïda a través d'*E.coli*, comportant un augment en el dany.

### **Estudi 3. La via WNT i el seu gen diana *24p3* es troben disminuïts en els neutròfils anòxics**

Tot i que diferents models experimentals han demostrat que l'expressió de *24p3* és regulada per la cascada de senyalització de NFκB,<sup>133,134,189</sup> també s'ha demostrat que la seva expressió depèn de la via de senyalització Wnt.<sup>129,135</sup> Els components de la via Wnt són responsables d'importants processos en el desenvolupament i l'homeòstasi, incloent-hi la regulació de la proliferació i la diferenciació, l'organogènesi i l'oncogènesi, i l'apoptosi.<sup>147,190,191</sup>

La inhibició de la via Wnt per la hipòxia ha estat força debatuda i s'han proposat diversos mecanismes, centrats sobretot en models tumorigènics.<sup>192,193</sup> La intenció d'aquest estudi fou comprovar si l'anòxia/reoxigenació inhibia la via WNT disminuïnt l'apoptosi dels neutròfils i aprofundir en el paper modulador de l'expressió de *24p3* durant l'anòxia.

En el model cel·lular *in vitro* vàrem estudiar l'expressió de tres gens relacionats amb la via Wnt. Wnt1 i Wnt3A formen part de la via canònica; es poden unir a *frizzled* permetent, la translocació de la β-catenina al nucli. Per la seva banda Wnt5A actua independentment de la β-catenina, a través de l'anomenada via no canònica. Els resultats van mostrar com l'AR afectava a tots tres gens de la via Wnt en els neutròfils, disminuïnt la seva expressió; a més, l'administració d'*E.coli* durant l'anòxia revertia la situació augmentant significativament els valors de l'expressió de tots tres gens.

Així doncs, els neutròfils *in vitro* presenten apoptosi espontània que pot ésser retardada mitjançant una anòxia/reoxigenació. El mecanisme apoptòtic d'aquestes cèl·lules ocorre a través de *24p3* i de l'activació o inhibició de la via de senyalització Wnt.

Una vegada confirmat que la via Wnt es trobava disminuïda en el nostre model d'anòxia/reoxigenació cel·lular vàrem implicar directament *24p3* i l'apoptosi mitjançant la utilització del fàrmac activador de la via Wnt canònica, el 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO). BIO és un inhibidor específic de la GSK3β, de manera que la seva actuació permet l'estabilització i posterior translocació de la β-catenina al nucli i la transcripció de gens, essent, en definitiva, un activador de la via Wnt canònica.<sup>194</sup>

Els resultats confirmaren l'habilitat de l'activació de la via Wnt en promoure l'expressió del seu gen diana *24p3* i, al mateix temps, la capacitat de reactivar l'apoptosi que s'havia retardat amb



l'anòxia, demostrant d'una manera directa que la via Wnt exerceix una funció pro-apoptòtica en aquest model.

Les dades obtingudes van demostrar a més que l'anòxia disminuïa de manera important la via Wnt, presentant la mateixa tendència que *24p3*. Una vegada induïda la via mitjançant l'addició de BIO, la proteïna *24p3* augmentava, dada que es correlacionava també amb la re-inducció de l'apoptosi. La silenciació del gen *24p3* comportava una disminució de l'apoptosi dels neutròfils, independentment de l'addició de BIO, el que suggeria que l'activació de la via Wnt participava en el control de l'apoptosi dels neutròfils mitjançant la producció de *24p3* (Figura 60).

Seguidament es va voler determinar la relació directa de l'anòxia, mitjançant el factor induïble per la hipòxia HIF-1 $\alpha$ , factor descrit com a mediador de l'apoptosi dels neutròfils en anòxia. És ampliament reconegut que HIF-1 $\alpha$  és un regulador de la supervivència dels neutròfils en condicions de falta d'oxigen.<sup>79</sup> Quan la concentració d'oxigen disminueix, les prolil-hidroxilases es tornen inactives de manera que l'HIF s'estabilitza i es pot unir ràpidament a proteïnes dels porus nuclears i translocar-se dins el nucli, permetent la seva activitat transcripcional.<sup>195</sup> Addicionalment, està descrit que en hipòxia, el complex TCF/ $\beta$ -catenina pot ésser dissociat mitjançant l'actuació d'HIF-1 $\alpha$ , el qual s'uniria a la  $\beta$ -catenina, suprimint la seva activitat i reprimint la via de senyalització Wnt.<sup>193,196</sup> Al trobar-se la via Wnt disminuïda en les condicions de privació d'oxigen, es volia determinar si és HIF-1 $\alpha$  qui regula la via Wnt.

Per a induïr farmacològicament HIF-1 $\alpha$  i estabilitzant-lo en el citoplasma evitant la seva degradació proteosòmica, es va administrar a les cèl·lules Clorur de Cobalt (CoCl<sub>2</sub>), mimetitzant l'efecte de l'anòxia sobre aquest factor.<sup>197,198</sup> L'administració de CoCl<sub>2</sub> en cèl·lules control, al igual que l'anòxia, va induïr la formació i estabilització d'HIF-1 $\alpha$  (Figura 61A), així com la seva translocació al nucli cel·lular permetent l'activació dels seus gens diana, entre ells VEGF i Glut-1 (Figura 61B).

Els resultats van confirmar que HIF-1 $\alpha$  inhibia Wnt, tant a nivell d'expressió gènica dels components mesurats com a nivell d'expressió de  $\beta$ -catenina. Com era d'esperar, el grup anòxia presentà el mateix resultat.

Seguint amb el clorur de cobalt com a estabilitzador d'HIF-1 $\alpha$  vam relacionar la capacitat inhibidora d'HIF-1 $\alpha$  sobre la via Wnt amb el retard de l'apoptosi en els neutròfils. La reactivació de la via Wnt mitjançant l'administració de BIO en aquest grup va comportar un increment en l'apoptosi dels neutròfils, reforçant que HIF-1 $\alpha$  retarda l'apoptosi dels neutròfils inhibint Wnt i, per tant, confirmant la hipòtesi inicial.

Seguidament, vam mesurar si l'expressió i formació de *24p3* es trobaven modulades per HIF-1 $\alpha$  a través de la via Wnt. Els nivells d'aquesta proteïna es trobaven en poca quantitat en les cèl·lules amb HIF-1 $\alpha$  estabilitzat en el citoplasma, com es el cas del clorur de cobalt i de l'anòxia (Figura 67). En canvi, l'addició de BIO en el grup de clorur de cobalt anulava els efectes inhibitoris d'HIF-1 $\alpha$ , mostrant un augment significatiu en la quantitat de proteïna *24p3* i de l'apoptosi de les cèl·lules. Aquests resultats confirmaven que en condicions de falta d'oxigen, quan HIF-1 $\alpha$  es

---

troba estabilitzat en el citoplasma cel·lular, aquest modula la via Wnt i, consegüentment el seu gen diana *24p3*, el qual inhibeix l'apoptosi dels neutròfils.

Una vegada confirmat *in vitro* que la inhibició de l'apoptosi dels neutròfils succeeix a través de la via Wnt i del seu gen diana *24p3*, es va dirigir l'estudi en modular el retard de l'apoptosi dels neutròfils circulants després d'una IR intestinal mitjançant l'activació de la seva via Wnt per tal de reduir el dany tissular.

La re-inducció de l'apoptosi dels neutròfils circulants mitjançant l'activador de la via Wnt BIO succeí, com s'esperava, a través del gen diana *24p3*, comportant una disminució del dany que presentava el teixit intestinal després de patir una IR.

El procés d'IR intestinal comportà una disminució en la  $\beta$ -catenina dels neutròfils circulants, la qual augmentava la seva concentració quan s'administrava intravenosament BIO així com l'apoptosi dels neutròfils, comportant una disminució dels paràmetres de dany (MPO i MDA) i una preservació de la integritat intestinal. Per contra, l'administració d'un anticòs anti-*24p3* en els animals amb BIO bloquejà els efectes, confirmant que Wnt exerceix un control sobre l'apoptosi del neutròfils circulants a través d'aquesta proteïna. Paral·lelament, es confirma *in vivo* que *24p3* s'activa mitjançant aquesta via de senyalització.

#### Estudi 4. La esfingosina-1-fosfat en l'apoptosi del neutròfil anòxic.

Darrerament s'han descrit els esfingolípidis com a molècules implicades en diversos processos metabòlics, entre ells la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi.<sup>154,155</sup> Tot i això, la implicació d'aquests metabòlits en el metabolisme dels neutròfils i la seva apoptosi ha estat, fins ara, poc discutit.

Previs estudis *in vitro* realitzats en el nostre grup han demostrat que la producció de l'esfingosina-1-fosfat (S1P) es troba íntimament lligat a la producció i modulació de *24p3*. A més a més, recentment s'ha descrit que l'activitat de l'esfingosina quinasa 2, enzim encarregat de la formació d'S1P a partir de la esfingosina, es troba activat per la hipòxia.<sup>199</sup> Amb aquestes premisses, l'estudi plantejava si l'S1P pot estar implicat en l'apoptosi dels neutròfils en anòxia a través d'una acció directa sobre *24p3*.

Adicionalment, s'ha descrit que *24p3* és regulat transcripcionalment a través de la via de senyalització NFκB, tenint un paper determinant el factor induïble IκB-ζ, el qual seria indispensable per a la formació d'aquesta lipocalina.<sup>189,199</sup>

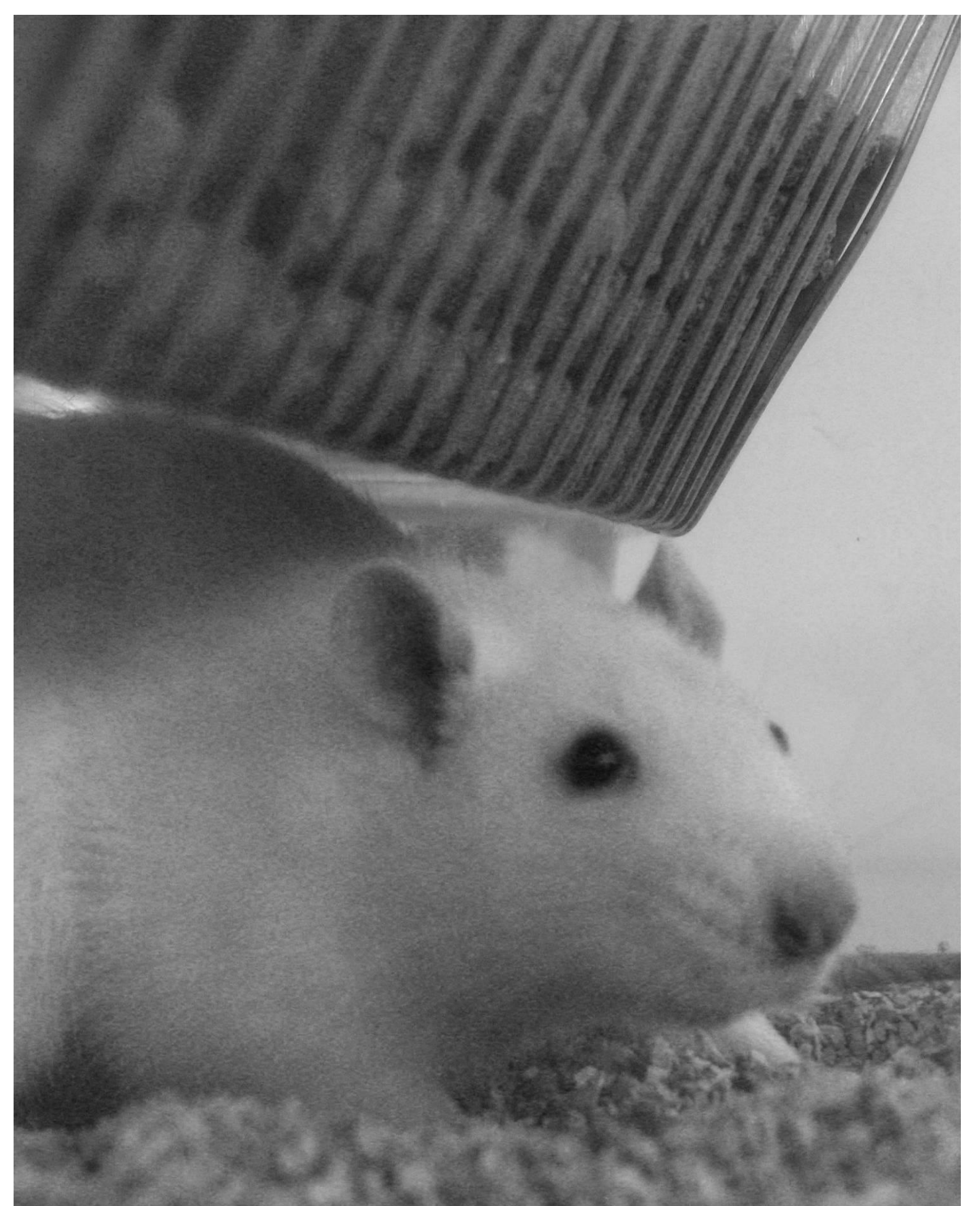
La nostra hipòtesi es basava doncs en que durant l'anòxia, una major acumulació d'S1P actuaria inhibint el factor de transcripció NFκB, disminuint la transcripció de *24p3*.

En aquest sentit els primers resultats de l'estudi apunten a que una modulació de S1P en els neutròfils és capaç de modular la seva apoptosi. Així, agonistes de receptors d'S1P retarden l'apoptosi en neutròfils control a nivells similars als neutròfils anòxics, implicant S1P en el procés. Paral·lelament, els valors de *24p3*, tant a nivell proteic com d'expressió gènica segueixen la situació apoptòtica de les cèl·lules; de manera que la silenciació de l'enzim productor d'S1P (esfingosina quinasa 2) fa que augmentin els nivells de *24p3* i, conseqüentment, l'apoptosi de les cèl·lules. Sorprenentment però, els nivells d'S1P mesurats intracel·lular i extracel·lularment suggerien que la implicació d'S1P en l'apoptosi del neutròfil anava en un altre sentit. Mentre que l'efecte dels fàrmacs agonistes mostraven el resultat esperat, els nivells d'S1P en condicions anòxiques tendien al contrari.

Aquests resultats, juntament amb les dades de l'activitat de l'esfingosina quinasa 2 en aquests grups, indiquen que l'actuació dels fàrmacs i l'actuació de l'anòxia es comportarien de manera diferent.

Aquest fet ens fa reconduïr l'estudi en una altra direcció.





## **6. CONCLUSIONS**



## 6. CONCLUSIONS

1. El retard en l'apoptosi dels neutròfils participa en el dany produït per una IR intestinal.

L'apoptosi dels neutròfils es troba retardada després d'una IR intestinal. La re-inducció d'aquest retard mitjançant l'administració d'*E.coli* és capaç de millorar el dany de l'intestí.

La resistència genètica al dany isquèmic ve acompanyada d'un menor retard en l'apoptosi dels neutròfils circulants, és a dir, d'un manteniment de l'apoptosi constitutiva després d'un insult per IR intestinal.

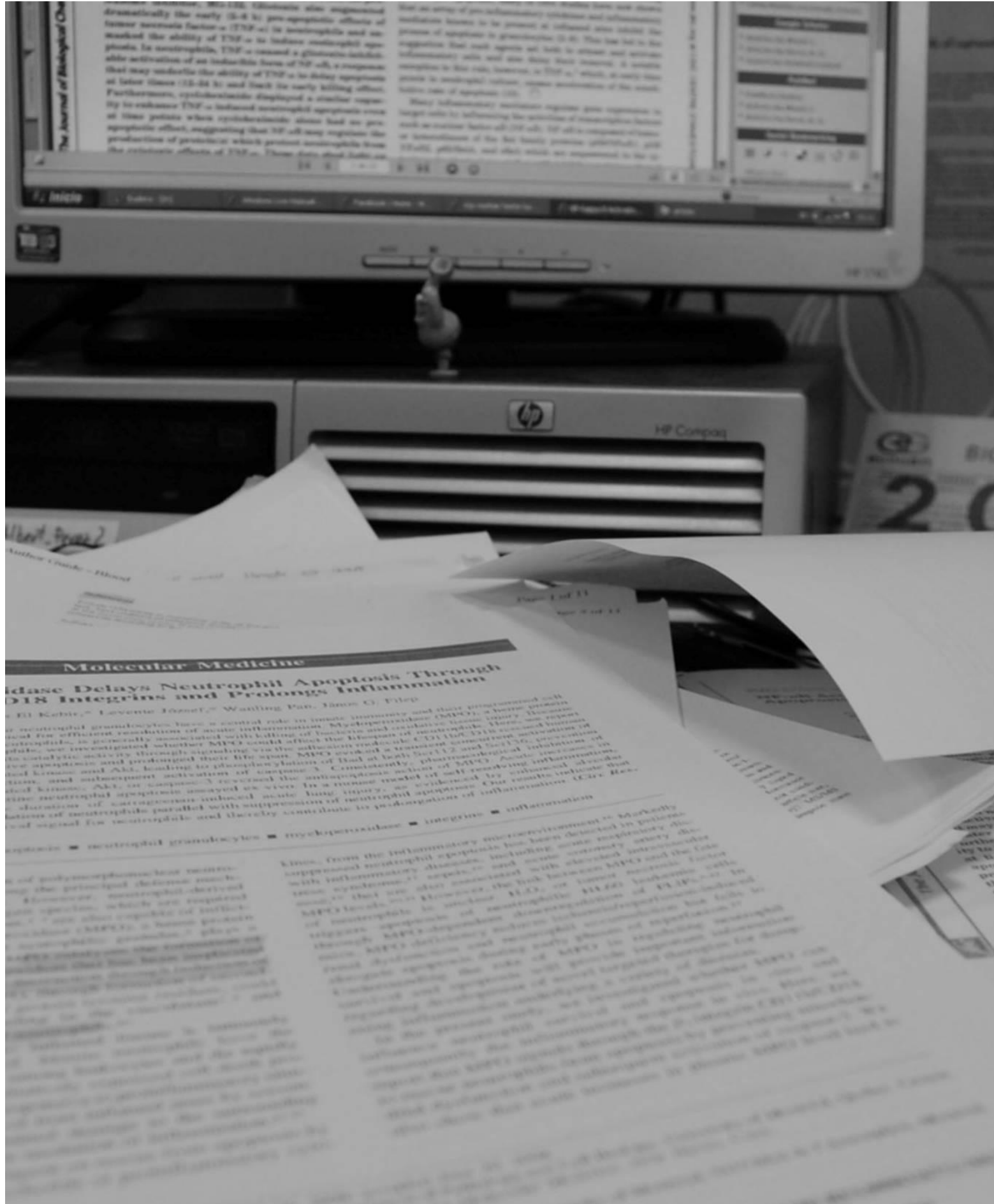
2. La proteïna secretable *24p3* es troba directament implicada en l'apoptosi dels neutròfils, actuant com a factor pro-apoptòtic. En condicions anòxiques/isquèmiques *24p3* es troba disminuït, conduïnt al retard en l'apoptosi d'aquestes cèl·lules.

3. La via de senyalització Wnt indueix l'apoptosi dels neutròfils a través de l'activació del seu gen diana *24p3*. Durant l'anòxia, la manca d'oxigen provoca una estabilització d'HIF-1 $\alpha$  el qual inhibeix la via Wnt, i per tant, impossibilita la formació de *24p3*, retardant conseqüentment l'apoptosi del neutròfil anòxic.

4. L'esfingosina-1-fosfat actúa com un factor inhibidor de l'apoptosi dels neutròfils quan s'administra exògenament. En condicions anòxiques S1P no sembla participar directament en el retard apoptòtic d'aquestes cèl·lules. No descartem la modulació de *24p3* per S1P en aquestes condicions.







## Molecular Medicine

### Apoptosis Delays Neutrophil Apoptosis Through CD18 Integrins and Prolongs Inflammation

Ed Kabir,<sup>1</sup> Levenia Jorret,<sup>2</sup> Wanding Pan,<sup>1</sup> James G. Filep<sup>1</sup>

Neutrophil granulocytes have a central role in innate immunity and their programmed cell death for efficient resolution of acute inflammation. Myeloperoxidase (MPO), a major protein of neutrophils, is generally associated with killing of bacteria and cellular injury. However, recent reports indicate that MPO could affect the lifespan of neutrophils. Here, we report that MPO, via its catalytic activity through signaling via the adhesion molecules CD11b/CD18 and LFA-1, promotes cell apoptosis and prolongs their life span. MPO worked a transient, nonreversible inhibition of the catalytic activity of caspase-3, leading to phosphorylation of Bad at both Ser132 and Ser136, activation of Akt, and subsequent inhibition of caspase-3. Consistently, pharmacological inhibition of Akt kinase and subsequent activation of caspase-3 reversed the antiapoptotic action of MPO. Acute inflammation, and subsequent activation of caspase-3, in a murine model of self-resolving inflammation, *Chlamydia pneumoniae* induced acute lung injury, as evidenced by enhanced apoptosis of neutrophils parallel with suppression of neutrophil apoptosis. Our results indicate that local signal for neutrophils and thereby contribute to prolongation of inflammation.

Neutrophils are the principal defense mechanism against bacterial and fungal pathogens, which are responsible for a wide array of infectious diseases. Myeloperoxidase (MPO) is a major protein of neutrophils, and its catalytic activity is thought to be involved in killing of bacteria and cellular injury. However, recent reports indicate that MPO could affect the lifespan of neutrophils. Here, we report that MPO, via its catalytic activity through signaling via the adhesion molecules CD11b/CD18 and LFA-1, promotes cell apoptosis and prolongs their life span. MPO worked a transient, nonreversible inhibition of the catalytic activity of caspase-3, leading to phosphorylation of Bad at both Ser132 and Ser136, activation of Akt, and subsequent inhibition of caspase-3. Consistently, pharmacological inhibition of Akt kinase and subsequent activation of caspase-3 reversed the antiapoptotic action of MPO. Acute inflammation, and subsequent activation of caspase-3, in a murine model of self-resolving inflammation, *Chlamydia pneumoniae* induced acute lung injury, as evidenced by enhanced apoptosis of neutrophils parallel with suppression of neutrophil apoptosis. Our results indicate that local signal for neutrophils and thereby contribute to prolongation of inflammation.

# 7. BIBLIOGRAFIA



---

**7. BIBLIOGRAFIA**

- (1) Grant DR, Wood RFM. Small bowel transplantation. 1994.
- (2) Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2005;9:11-24.
- (3) Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat.* 1974;141:537-561.
- (4) Barker N, van Es JH, Kuipers J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449:1003-1007.
- (5) Freeman HJ. Crypt region localization of intestinal stem cells in adults. *World J Gastroenterol.* 2008;14:7160-7162.
- (6) Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 2006;7:349-359.
- (7) Parks DA, Jacobson ED. Physiology of the splanchnic circulation. *Arch Intern Med.* 1985;145:1278-1281.
- (8) Torras J, Cruzado JM, Grinyo JM. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31:2217-2218.
- (9) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993;21:1376-1386.
- (10) Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med.* 2004;164:1054-1062.

- 
- (11) Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*. 2005;35:185-195.
  - (12) Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery*. 1990;107:574-580.
  - (13) Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970;101:478-483.
  - (14) Brandt LJ, Boley SJ. AGA technical review on intestinal ischemia. American Gastrointestinal Association. *Gastroenterology*. 2000;118:954-968.
  - (15) Schneider TA, Longo WE, Ure T, Vernava AM, III. Mesenteric ischemia. Acute arterial syndromes. *Dis Colon Rectum*. 1994;37:1163-1174.
  - (16) Berland T, Oldenburg WA. Acute mesenteric ischemia. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008;10:341-346.
  - (17) Boley SJ, Sprayregen S, Veith FJ, Siegelman SS. An aggressive roentgenologic and surgical approach to acute mesenteric ischemia. *Surg Annu*. 1973;5:355-378.
  - (18) Vicente DC, Kazmers A. Acute mesenteric ischemia. *Curr Opin Cardiol*. 1999;14:453-458.
  - (19) Dunn MM, McFall TA, Rigano WD, Peoples JB. Adjunctive vasodilator therapy in the treatment of murine ischemia. *Am J Surg*. 1993;165:697-699.

- 
- (20) Kougias P, Lau D, El Sayed HF et al. Determinants of mortality and treatment outcome following surgical interventions for acute mesenteric ischemia. *J Vasc Surg.* 2007;46:467-474.
- (21) Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225-246.
- (22) Fox IH. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism.* 1981;30:616-634.
- (23) Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact.* 1990;76:141-161.
- (24) Leaf A. Regulation of intracellular fluid volume and disease. *Am J Med.* 1970;49:291-295.
- (25) Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53:957-978.
- (26) De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M et al. Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol.* 1998;11:110-122.
- (27) Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol.* 1999;12 Suppl 2:S142-S151.
- (28) Farber JL, Chien KR, Mittnacht S Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol.* 1981;102:271-281.

- 
- (29) Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:1421-1441.
- (30) Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255-266.
- (31) Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T et al. Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci.* 2001;46:545-549.
- (32) Genesca M, Sola A, Miquel R et al. Role of changes in tissular nucleotides on the development of apoptosis during ischemia/reperfusion in rat small bowel. *Am J Pathol.* 2002;161:1839-1847.
- (33) Simpson R, Alon R, Kobzik L et al. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 1993;218:444-453.
- (34) Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2006;6:652-658.
- (35) Schoenberg MH, Poch B, Younes M et al. Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut.* 1991;32:905-912.
- (36) Sola A, Panes J, Xaus C, Hotter G. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J Leukoc Biol.* 2003;73:74-81.
- (37) McCullough KC, Summerfield A. Basic concepts of immune response and defense development. *ILAR J.* 2005;46:230-240.

- 
- (38) David Male, Jonathan Brostoff, David Roth, Ivan Roitt. Immunology. 7th ed. Mosby; 2006.
- (39) Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994;56:672-686.
- (40) Antonio Celada. *Inmunología básica.* 1994.
- (41) Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5:1317-1327.
- (42) Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89:3503-3521.
- (43) Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol.* 1995;101 Suppl 1:6-9.
- (44) Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:500-510.
- (45) Cassatella MA, Gasperini S, Russo MP. Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;832:233-242.
- (46) Kasama T, Miwa Y, Isozaki T et al. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4:273-279.
- (47) Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;487:318-322.

- 
- (48) Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:965-975.
- (49) Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect*. 2003;5:1337-1344.
- (50) Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991;67:1033-1036.
- (51) Zarbock A, Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*. 2009;16:31-42.
- (52) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678-689.
- (53) Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996;88:3259-3287.
- (54) Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol*. 1996;134:255-266.
- (55) Marmon S, Cammer M, Raine CS, Lisanti MP. Transcellular migration of neutrophils is a quantitatively significant pathway across dermal microvascular endothelial cells. *Exp Dermatol*. 2009;18:88-90.



- 
- (56) Yang L, Froio RM, Sciuto TE et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106:584-592.
- (57) Hart SP, Dransfield I, Rossi AG. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*. 2008;44:280-285.
- (58) Metchnikoff E. Lecture XII. In: F.A.Starling, E.H.Starling, eds. Lectures on the comparative pathology of inflammation. Delivered at the Pasteur Institute in 1891. 1968.
- (59) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989;83:865-875.
- (60) Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol*. 2008;83:288-295.
- (61) Hart SP, Smith JR, Dransfield I. Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:181-185.
- (62) Ward C, Dransfield I, Chilvers ER, Haslett C, Rossi AG. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20:503-509.
- (63) Ina K, Kusugami K, Hosokawa T et al. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil

- 
- apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14:46-53.
- (64) Garlich CD, Eskafi S, Cicha I et al. Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes. *J Leukoc Biol.* 2004;75:828-835.
- (65) Chen JC, Ng CJ, Chiu TF, Chen HM. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. *J Pineal Res.* 2003;34:260-264.
- (66) Jimenez MF, Watson RW, Parodo J et al. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg.* 1997;132:1263-1269.
- (67) Peyssonnaud C, Johnson RS. An unexpected role for hypoxic response. *Cell Cycle.* 2004;3:168-171.
- (68) Nathan C. Immunology: Oxygen and the inflammatory cell. *Nature.* 2003;422:675-676.
- (69) Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett.* 1995;372:233-237.
- (70) Mecklenburgh KI, Walmsley SR, Cowburn AS et al. Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood.* 2002;100:3008-3016.
- (71) O'Neill A, Greenan MC, Doyle B, Fitzpatrick JM, Watson RW. Gene profiling of in vitro and in vivo models of delayed neutrophil apoptosis: a common pathway? *Biochem Soc Trans.* 2004;32:470-473.

- 
- (72) Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30:393-402.
- (73) Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res*. 2009;315:1791-1797.
- (74) Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc Res*. 2007;75:275-282.
- (75) Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med*. 2007;85:1339-1346.
- (76) Walmsley SR, McGovern NN, Whyte MK, Chilvers ER. The HIF/VHL pathway: from oxygen sensing to innate immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:251-255.
- (77) Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10440-10445.
- (78) Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol*. 2005;26:434-439.
- (79) Walmsley SR, Print C, Farahi N et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med*. 2005;201:105-115.
- (80) Ward C, Chilvers ER, Lawson MF et al. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem*. 1999;274:4309-4318.

- 
- (81) Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25:6758-6780.
- (82) Miskolci V, Rollins J, Vu HY et al. NFkappaB is persistently activated in continuously stimulated human neutrophils. *Mol Med*. 2007;13:134-142.
- (83) renzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1995;15:2689-2696.
- (84) Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol*. 2002;169:3947-3953.
- (85) Ward C, Walker A, Dransfield I, Haslett C, Rossi AG. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:465-467.
- (86) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
- (87) Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2239-2244.
- (88) Elkon KB. IL-1alpha responds to necrotic cell death. *Nat Med*. 2007;13:778-780.
- (89) Chen CJ, Kono H, Golenbock D et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 2007;13:851-856.

- 
- (90) Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev.* 2003;193:5-9.
- (91) Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull.* 1997;53:451-465.
- (92) Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:897-907.
- (93) Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev.* 2003;193:10-21.
- (94) Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR et al. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:461-464.
- (95) Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR, Edwards SW. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2001;70:783-792.
- (96) Simon HU. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev.* 2003;193:101-110.
- (97) Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS et al. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol.* 1999;178:311-319.
- (98) Stanford L.Peng. Neutrophil apoptosis in autoimmunity. *Journal of molecular medicine.* 2006.
- (99) Rossi AG, Hallett JM, Sawatzky DA, Teixeira MM, Haslett C. Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:288-291.

- 
- (100) Sookhai S, Wang JJ, McCourt M et al. A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo. *Ann Surg.* 2002;235:285-291.
- (101) Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol.* 1996;156:3986-3992.
- (102) Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993;268:10425-10432.
- (103) Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482:272-283.
- (104) Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996;318 ( Pt 1):1-14.
- (105) Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell.* 2002;10:1033-1043.
- (106) Huang HL, Chu ST, Chen YH. Ovarian steroids regulate 24p3 expression in mouse uterus during the natural estrous cycle and the preimplantation period. *J Endocrinol.* 1999;162:11-19.
- (107) Yan QW, Yang Q, Mody N et al. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:2533-2540.

- 
- (108) Lee YK, Kim HL, Kim YL, Im DS. Multiple actions of dimethylsphingosine in 1321N1 astrocytes. *Mol Cells*. 2007;23:11-16.
- (109) Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR et al. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1996;38:414-420.
- (110) Meheus LA, Fransen LM, Raymackers JG et al. Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J Immunol*. 1993;151:1535-1547.
- (111) Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J*. 1999;31:433-441.
- (112) Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T et al. Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2007;48:39-44.
- (113) Mishra J, Ma Q, Prada A et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2534-2543.
- (114) Seo SJ, Ahn JY, Hong CK et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in skin epidermis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:510-512.
- (115) Tong Z, Wu X, Ovcharenko D et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J*. 2005;391:441-448.

- 
- (116) Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:407-413.
- (117) Flo TH, Smith KD, Sato S et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004;432:917-921.
- (118) Sorensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Monch K et al. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol.* 2003;170:5583-5589.
- (119) Lee JH, Kye KC, Seo EY et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in calcium-induced keratinocyte differentiation. *J Korean Med Sci.* 2008;23:302-306.
- (120) Gwira JA, Wei F, Ishibe S et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem.* 2005;280:7875-7882.
- (121) Mishra J, Mori K, Ma Q et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:3073-3082.
- (122) Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, Green MR. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science.* 2001;293:829-834.
- (123) Ryon J, Bendickson L, Nilsen-Hamilton M. High expression in involuting reproductive tissues of uterocalin/24p3, a lipocalin and acute phase protein. *Biochem J.* 2002;367:271-277.



- 
- (124) Liu Q, Ryon J, Nilsen-Hamilton M. Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol Reprod Dev.* 1997;46:507-514.
- (125) Nilsen-Hamilton M, Liu Q, Ryon J et al. Tissue involution and the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;995:94-108.
- (126) Yousefi S, Simon HU. Granulocyte apoptosis: death by a secreted lipocalin? *Cell Death Differ.* 2002;9:595-597.
- (127) Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell.* 2005;123:1293-1305.
- (128) Richardson DR. 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell.* 2005;123:1175-1177.
- (129) Ziegler S, Rohrs S, Tickenbrock L et al. Lipocalin 24p3 is regulated by the Wnt pathway independent of regulation by iron. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;174:16-23.
- (130) Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK et al. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett.* 2005;579:773-777.
- (131) Hjalm G, Murray E, Crumley G et al. Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem.* 1996;239:132-137.
- (132) Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol.* 2003;171:6630-6639.

- 
- (133) Cowland JB, Muta T, Borregaard N. IL-1beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol.* 2006;176:5559-5566.
- (134) Fujino RS, Tanaka K, Morimatsu M et al. Spermatogonial cell-mediated activation of an IkappaBzeta-independent nuclear factor-kappaB pathway in Sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene. *Mol Endocrinol.* 2006;20:904-915.
- (135) Ziegler S, Rohrs S, Tickenbrock L et al. Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation. *FEBS J.* 2005;272:1600-1615.
- (136) Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281:22429-22433.
- (137) Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol.* 2006;21:103-124.
- (138) Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:581-593.
- (139) van NM, Meeldijk J, van der ZR, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem.* 2002;277:17901-17905.
- (140) Mao J, Wang J, Liu B et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell.* 2001;7:801-809.

- 
- (141) Katoh M, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:1059-1064.
- (142) Zeng X, Tamai K, Doble B et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature.* 2005;438:873-877.
- (143) Roberts DM, Slep KC, Peifer M. It takes more than two to tango: Dishevelled polymerization and Wnt signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:463-465.
- (144) Endo Y, Wolf V, Muraiso K et al. Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2. *J Biol Chem.* 2005;280:777-786.
- (145) Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell.* 2000;11:3509-3523.
- (146) Pon YL, Wong AS. Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the beta-catenin/T-cell factor signaling pathway. *Mol Endocrinol.* 2006;20:3336-3350.
- (147) Zhang Z, Deb A, Zhang Z et al. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:370-377.
- (148) Jia L, Miao C, Cao Y, Duan EK. Effects of Wnt proteins on cell proliferation and apoptosis in HEK293 cells. *Cell Biol Int.* 2008;32:807-813.

- 
- (149) Chen S, Guttridge DC, You Z et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol.* 2001;152:87-96.
- (150) He TC, Sparks AB, Rago C et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281:1509-1512.
- (151) Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. *Exp Cell Res.* 2007;313:1652-1666.
- (152) Liang H, Coles AH, Zhu Z et al. Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med.* 2007;204:3077-3084.
- (153) Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006;4:e115.
- (154) Kee TH, Vit P, Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:153-161.
- (155) Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784:66-75.
- (156) Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem.* 2002;277:25851-25854.
- (157) Baumruker T, Prieschl EE. Sphingolipids and the regulation of the immune response. *Semin Immunol.* 2002;14:57-63.

- 
- (158) Snider AJ, Orr GK, Obeid LM. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie*. 2010.
- (159) Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:397-407.
- (160) Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2027-2036.
- (161) Lee WJ, Yoo HS, Suh PG et al. Sphingosine mediates FTY720-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *Exp Mol Med*. 2004;36:420-427.
- (162) Ohta H, Yatomi Y, Sweeney EA, Hakomori S, Igarashi Y. A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett*. 1994;355:267-270.
- (163) Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 1993;365:557-560.
- (164) Olivera A, Kohama T, Edsall L et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*. 1999;147:545-558.
- (165) Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:34499-34505.

- 
- (166) Ader I, Malavaud B, Cuvillier O. When the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2009;69:3723-3726.
- (167) Yang L, Yatomi Y, Miura Y, Satoh K, Ozaki Y. Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. *Br J Haematol.* 1999;107:282-293.
- (168) Chihab R, Porn-Ares MI, varado-Kristensson M, Andersson T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes human neutrophil apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:776-785.
- (169) Siehler S, Wang Y, Fan X, Windh RT, Manning DR. Sphingosine 1-phosphate activates nuclear factor-kappa B through Edg receptors. Activation through Edg-3 and Edg-5, but not Edg-1, in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 2001;276:48733-48739.
- (170) Xia P, Gamble JR, Rye KA et al. Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14196-14201.
- (171) Bu DX, Hemdahl AL, Gabrielsen A et al. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB. *Am J Pathol.* 2006;169:2245-2253.
- (172) Cowland JB, Muta T, Borregaard N. IL-1beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol.* 2006;176:5559-5566.

- 
- (173) Totzke G, Essmann F, Pohlmann S et al. A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem.* 2006;281:12645-12654.
- (174) Motoyama M, Yamazaki S, Eto-Kimura A, Takeshige K, Muta T. Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem.* 2005;280:7444-7451.
- (175) Matsuo S, Yamazaki S, Takeshige K, Muta T. Crucial roles of binding sites for NF-kappaB and C/EBPs in IkappaB-zeta-mediated transcriptional activation. *Biochem J.* 2007;405:605-615.
- (176) Gaines P, Chi J, Berliner N. Heterogeneity of functional responses in differentiated myeloid cell lines reveals EPRO cells as a valid model of murine neutrophil functional activation. *J Leukoc Biol.* 2005;77:669-679.
- (177) Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood.* 1992;80:2920-2924.
- (178) Trush MA, Egner PA, Kensler TW. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food Chem Toxicol.* 1994;32:143-147.
- (179) Hotter G, Closa D, Prats N et al. Free radical enhancement promotes leucocyte recruitment through a PAF and LTB4 dependent mechanism. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:947-954.

- 
- (180) Jha HC, von RG, Zilliken F. Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1985;34:1367-1369.
- (181) Sola A, Alfaro V, Hotter G. Intestinal ischemic preconditioning: less xanthine accumulation relates with less apoptosis. *Apoptosis.* 2004;9:353-361.
- (182) Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391:806-811.
- (183) Billich A, Ettmayer P. Fluorescence-based assay of sphingosine kinases. *Anal Biochem.* 2004;326:114-119.
- (184) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med.* 1996;125:680-687.
- (185) Ertel W, Keel M, Infanger M et al. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J Trauma.* 1998;44:767-775.
- (186) Basile DP, Donohoe D, Cao X, Van Why SK. Resistance to ischemic acute renal failure in the Brown Norway rat: a new model to study cytoprotection. *Kidney Int.* 2004;65:2201-2211.
- (187) Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. *Arch Med Res.* 2008;39:560-566.



- 
- (188) O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* 1993;290 ( Pt 1):41-49.
- (189) Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:14058-14063.
- (190) Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* 2000;406:86-90.
- (191) Moon RT, Brown JD, Yang-Snyder JA, Miller JR. Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell.* 1997;88:725-728.
- (192) Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA et al. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 2004;23:1949-1956.
- (193) Lim JH, Chun YS, Park JW. Hypoxia-inducible factor-1alpha obstructs a Wnt signaling pathway by inhibiting the hARD1-mediated activation of beta-catenin. *Cancer Res.* 2008;68:5177-5184.
- (194) Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL et al. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F703-F713.
- (195) Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122:1055-1057.

- 
- (196) Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol.* 2007;9:210-217.
- (197) Ji Z, Yang G, Shahzidi S et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 2006;244:182-189.
- (198) Piret JP, Lecocq C, Toffoli S et al. Hypoxia and CoCl<sub>2</sub> protect HepG2 cells against serum deprivation- and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1. *Exp Cell Res.* 2004;295:340-349.
- (199) Schnitzer SE, Weigert A, Zhou J, Brune B. Hypoxia enhances sphingosine kinase 2 activity and provokes sphingosine-1-phosphate-mediated chemoresistance in A549 lung cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2009;7:393-401.

