



**DIANES DE LA FRUCTOSA 1,6-BISFOSFAT EN LA PREVENCIÓ DE
L'HEPATITIS INDUÏDA PER GALACTOSAMINA EN FETGE DE RATA.**

Memòria presentada per

Eduard Cuesta Matarredona

Per optar al grau de

Doctor en Biologia

Treball realitzat sota la direcció del

Dr. Jordi Bermúdez i Mas

en el Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona

Tesi inscrita en el Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de
Barcelona

JORDI BERMÚDEZ MAS,

Catedràtic del Departament de Ciències Fisiològiques II

CERTIFICA:

Que el treball que porta per títol “Dianes de la fructosa 1,6-bisfosfat en la prevenció de l’hepatitis induïda per galactosamina en fetge de rata”, realitzat per Eduard Cuesta Matarredona per optar al Grau de Doctor en Biologia, ha estat dut a terme a la Unitat de Biofísica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Jordi Bermúdez Mas, el qual n’autoritza la seva presentació i defensa davant el tribunal corresponent.

L’Hospitalet de Llobregat, 24 d’abril de 2006

Jordi Bermúdez Mas

Eduard Cuesta Matarredona

Taula de continguts

Abreviacions, acrònims i sigles.....	7
1 INTRODUCCIÓ.....	9
1.1 Presentació.....	9
1.2 Descripció de la lesió hepàtica induïda per galactosamina i dels efectes no específics.....	10
1.2.1 Efectes sobre el parènquima hepàtic.....	10
1.2.1.1 Metabolisme de la galactosamina.....	10
1.2.1.2 Homeostasi energètica.....	13
1.2.1.3 Alteracions de membrana i homeostasi iònica.....	14
1.2.1.4 Efectes sobre la viabilitat cel·lular.....	15
1.2.1.5 Altres efectes.....	17
1.2.2 Incidència de la GalN sobre els processos inflamatoris.....	17
1.2.2.1 Endotoxèmia i histaminèmia.....	18
1.2.3 Efectes de la GalN sobre altres tipus cel·lulars.....	18
1.3 La resposta immune.....	19
1.3.1 Introducció.....	19
1.3.2 Història infecció microbiana.....	19
1.3.3 Arquitectura del fetge.....	20
1.3.4 La resposta immune innata.....	21
1.3.4.1 El complex LPS-LBP-CD14.....	21
1.3.4.2 Receptors “Toll-like”.....	22
1.3.4.3 Transducció del senyal del TLR4 al nucli.....	23
1.4 Descripció dels estudis previs dels efectes de la F1,6BP exògena.....	25
1.4.1 Introducció.....	25
1.4.2 Efectes de la F1,6BP exògena.....	26
1.4.2.1 Preservació de l’homeostasi iònica.....	26
1.4.2.2 Efecte antioxidant de la F1,6BP.....	27
1.4.2.3 Modulació de la producció d’òxid nítric.....	28
1.4.2.4 Modulació de la resposta inflamatòria.....	29
1.4.2.5 Prevenició dels efectes de la isquèmia i la hipòxia.....	31
1.4.2.6 Efectes de la F1,6BP en la preservació d’òrgans.....	33
1.4.2.7 Prevenició del xoc sèptic.....	34
1.4.2.8 Protecció envers substàncies amb efectes tòxics.....	35
1.4.2.9 Efectes tòxics de la F1,6BP.....	37
1.4.3 Propostes de mecanismes d’acció de la F1,6BP exògena.....	38

1.4.3.1 Efecte directe de la F1,6BP: Incorporació com a metabòlit.....	38
1.4.3.2 Efecte de la F1,6BP sobre la membrana plasmàtica.....	40
1.5 Hipòtesi de treball.....	40
2 OBJECTIUS.....	43
3 MATERIALS I MÈTODES.....	45
3.1 Reactius.....	45
3.2 Animals.....	45
3.2.1 Material emprat.....	50
3.3 Obtenció i processament de mostres de rata.....	51
3.3.1 Obtenció de plasma de rata.....	51
3.3.2 Homogenat de fetge.....	51
3.3.3 Inclusió en parafina de fetge i obtenció de talls ultrafins.....	51
3.3.4 Marcatge dels talls ultrafins de fetge.....	53
3.3.4.1 Tinció d'Hematoxilina-eosina.....	53
3.3.4.2 Detecció histoquímica de la fragmentació del DNA.....	54
3.3.4.3 Detecció de la forma activa de la caspasa 3.....	54
3.4 Determinació de diferents activitats i substàncies.....	56
3.4.1 Determinació d'activitats transaminasa en plasma.....	56
3.4.2 Determinació d'histamina.....	56
3.4.3 Mesura d'endotoxina.....	57
3.4.4 Mesura de TNF- α	58
3.4.5 Determinació de F1,6BP.....	58
3.4.6 Determinació de fosfats a partir de la F1,6BP hidrolitzada	59
3.4.7 Contingut de proteïna.....	59
3.5 Cultius cel·lulars.....	61
3.5.1 Medis de cultiu.....	61
3.5.2 Cultius primaris de rata.....	62
3.5.2.1 Preparació material i solucions específiques dels cultius primaris..	62
3.5.2.2 Cultiu primari d'hepatòcits de rata.....	63
3.5.2.3 Cultiu primari de cèl·lules de Kupffer de rata.....	65
3.5.2.4 Cultiu primari de macròfags peritoneals de rata.....	67
3.5.3 Determinacions realitzades sobre els cultius primaris.....	67
3.5.3.1 Incorporació d'uridina tritiada en hepatòcits.....	67
3.5.3.2 Contingut de DNA en nuclis d'hepatocits per citometria de fluxe.....	68
3.5.3.3 Mesura de la fragmentació del DNA en hepatòcits.....	70
3.5.3.4 Fluxe de $^{86}\text{Rb}^+$ cap a l'exterior en cultius primaris de cèl·lules de	

Kupffer.....	71
3.5.3.5 Mesures d'unió de l'NF κ B al DNA en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer.....	73
3.5.3.6 Mesura de la despolarització de membrana plasmàtica en macròfags peritoneals per citometria de fluxe.....	74
3.6 Tècniques per mesurar la citotoxicitat comuns a tots els cultius cel·lulars.....	76
3.6.1 Mesura de l'activitat LDH.....	76
3.6.2 Assaig de viabilitat cel·lular per tinció amb cristall violeta.....	77
3.7 Anàlisi estadístic.....	77
4 RESULTATS.....	79
4.1 L'administració de F1,6BP reverteix els efectes induïts per GalN en fetge i en cultius primaris d'hepatòcits de rata.....	79
4.1.1 Efecte de la F1,6BP en la necrosi causada per GalN en rata.....	79
4.1.2 Estudi dels efectes a nivell histològic en fetges tractats amb GalN. Protecció per F1,6BP.....	80
4.1.3 Efecte de la F1,6BP en la inducció d'apoptosi en rates tractades amb GalN.....	81
4.1.4 Anàlisi de la citotoxicitat induïda per GalN en hepatòcits en cultiu primari	83
4.1.5 Anàlisi de l'apoptosi en hepatòcits en cultiu primari tractats amb GalN.....	83
4.2 L'administració de F1,6BP no reverteix la inhibició transcripcional, ni redueix la la sensibilització dels hepatòcits al TNF- α induïts per GalN.....	83
4.2.1 La F1,6BP redueix els nivells de TNF- α induïts per GalN, però no recupera els hepatòcits de l'aturada transcripcional.....	83
4.2.2 Efectes del TNF- α exogen en talls histològics i en l'apoptosi en rates tractades amb F1,6-BP més GalN.....	86
4.2.3 Efectes del TNF- α sobre hepatòcits en cultiu primari, sensibilitzats amb GalN.....	87
4.3 Prevenció per acció de la F1,6BP de l'endotoxèmia i la histaminèmia causades per GalN en rata.....	89
4.3.1 Efecte de la GalN en la generació de l'endotoxèmia. Prevenció per F1,6BP.....	89
4.3.2 Efecte de la GalN en la generació d'histaminèmia. Reversió per F1,6BP..	90
4.3.3 Paper de la secreció d'histamina en la inducció d'endotoxèmia.....	91
4.4 F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags en l'administració d'LPS en rata i inhibeix l'activació de les cèl·lules de Kupffer.....	95

4.4.1	F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags en l'administració d'LPS.....	95
4.4.2	Efecte de la F1,6BP en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer de rata incubades amb LPS.....	97
4.4.3	Efecte de la F1,6BP sobre la via de l'NFκB en cèl·lules de Kupffer.....	98
4.4.4	Efecte de la F1,6BP en la despolarització de la membrana plasmàtica induïda per LPS en cultius primaris de macròfags peritoneals de rata.....	99
4.5	La F1,6BP evita la inflamació causada per GalN i disminueix els efectes de l'endotoxèmia actuant sobre els canals de potassi.....	101
4.5.1	Paper dels canals de potassi en l'hepatitis induïda per GalN en model de rata.....	101
4.5.2	Els canals de potassi influeixen en la sensibilitat dels macròfags a l'LPS.....	101
4.5.3	Els canals de potassi estan implicats en la secreció de TNF-α en les cèl·lules de Kupffer estimulades per LPS.....	102
4.5.4	La F1,6BP inhibeix els canals de potassi i rebaixa l'activació per LPS de les cèl·lules de Kupffer.....	103
5	DISCUSSIÓ.....	107
5.1	L'administració de F1,6BP redueix l'apoptosi i la inflamació hepàtica induïda per GalN en rata i l'apoptosi i la citotoxicitat en cultius primaris d'hepatòcits.....	107
5.2	La F1,6BP no redueix la sensibilització dels hepatòcits al TNF-α induïda per GalN. Diferències entre el model in vivo i els cultius primaris d'hepatòcits.....	109
5.2.1	L'administració de F1,6BP no recupera l'activitat transcripcional dels hepatòcits inhibida pel metabolisme de la GalN.....	109
5.2.2	La F1,6BP necessàriament ha d'inhibir la secreció de TNF-α per protegir el fetge de la lesió induïda per GalN.....	109
5.2.3	La GalN, en absència del TNF-α, disminueix la viabilitat dels hepatòcits en cultiu primari.....	111
5.3	L'administració de F1,6BP redueix l'endotoxèmia i la histaminèmia causades per la GalN en rata.....	112
5.3.1	Les rates tractades amb F1,6BP i GalN tenen nivells baixos de TNF-α, degut a que presenten nivells baixos d'endotoxèmia.....	112
5.3.2	L'administració de F1,6BP redueix l'endotoxèmia causada per GalN inhibint la secreció d'histamina dels mastòcits peritoneals.....	113
5.3.3	La GalN i la histamina són necessàries però no suficients per induir translocació bacteriana i d'endotoxina.....	114
5.4	L'administració de F1,6BP rebaixa l'excessiva resposta inflamatòria dels	

macròfags activats per LPS.....	115
5.4.1 La F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags a l'LPS i la GalN la potència.....	115
5.4.2 La F1,6BP redueix l'activació dels cultius primaris de cèl·lules de Kupffer induits per LPS.....	116
5.5 L'addició de F1,6BP induïx la inactivació dels canals de potassi, com a mecanisme d'acció per evitar els efectes de la GalN i de l'endotoxèmia.....	117
5.5.1 Els canals de potassi modulen la lesió induïda per GalN i la sensibilitat dels macròfags a l'LPS en model de rata.....	117
5.5.2 La F1,6BP induïx la inactivació dels canals de potassi, que modulen l'estat d'activació dels macròfags.....	118
5.6 L'administració de F1,6BP redueix la lesió causada per GalN i per l'endotoxina degut, principalment, a la seva interacció amb les membranes biològiques.....	121
5.7 Relevància terapèutica de la F1,6BP.....	123
6 CONCLUSIONS.....	125
Referències.....	127
Apèndix.....	145
Article: <i>Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats</i>	145
Editorial: <i>Multiple beneficial actions of fructose 1,6-bisphosphate in sepsis-associated liver injury</i>	153

Abreviacions, acrònims i sigles.

4-AP; 4-Aminopiridina

ALT; Alanina aminotransferasa

AST; Aspartat aminotransferasa

C.48/80; Compost 48/80

CCl₄; Tetraclorur de carboni

CrGly; Cromoglicat

CrP; Creatina fosfat

EGTA; Àcid etilenglicol-bis(b-aminoetil èter)-N,N,N',N'-tetracètic

F1,6BP; Fructosa-1,6-bisfosfat

F2,6BP; Fructosa-2,6-bisfosfat

GalN, Galactosamina

GalN-1-P; Galactosamina-1-fosfat

GdCl; Clorur de gadolini

I/R; Isquèmia/Reperfusió

IFN- γ ; Interferó gamma

IL; Interleucina

iNOS; Òxid nítric sintasa induïble

KC; Cèl·lules de kupffer

LBP; Proteïna d'unió a l'LPS

LDH; Lactat deshidrogenasa

L-NAME; N-nitro-L-arginina metil èster

LPS; Lipopolisacàrid

NF- κ B; Factor nuclear κ B

NO; Òxid nítric

O₂⁻; Ió superòxid

PFK-1; 6-fosfofructo-1-cinasa

PMA; Èsters de forbol

MPS; Sistema fagocític mononuclear

ROS; Espècies reactives d'oxígen

SNAP; S-nitros-N-acetil-penicillamina

TEA; Tetraetilamoni

TLRs; Receptors "Toll Like"

TNF- α ; Factor de necrosi tumoral alfa

TNFR-1; Receptor de TNF-1

TUNNEL; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick
end labeling method

UDP-Glc; UDP-glucosa

UW; Universitat de Wisconsin

XDH; Xantina deshidrogenasa

XO; Xantina oxidasa

1 INTRODUCCIÓ.

1.1 Presentació.

L'objectiu d'aquest treball és el d'identificar les dianes de la fructosa 1,6-bisfosfat (F1,6BP) en el seu paper hepatoprotector. Per realitzar l'estudi vam escollir el model d'hepatitis induïda per galactosamina (GalN) en rata, que produeix una lesió histològica i un quadre inflamatori similar a l'hepatitis viral humana. També sobre els efectes derivats de l'endotoxèmia, associada al procés de xoc sèptic de rata.

Aquesta línia d'investigació ve precedida per altres treballs realitzats pel nostre grup en els que es va estudiar l'efecte protector de la F1,6BP sobre la lesió induïda per GalN en suspensions d'hepatòcits (Roig *et al.*, 1994);(Roig *et al.*, 1997);(De Oliveira *et al.*, 1992). La GalN causa una davallada de la viabilitat cel·lular, del contingut d'ATP i de fructosa-2,6-bisfosfat (F2,6BP) (Taula 1.1). També s'observa que l'addició de GalN a les suspensions d'hepatòcits produeix un efecte immediat, que és previ a la metabolització de la GalN, que dona lloc a un pic exotèrmic cel·lular, que suggereix una interacció del sucre aminat amb la membrana cel·lular. El tractament de F1,6BP més GalN reverteix tots aquests efectes inclòs el de la producció d'aquest efecte immediat que s'associa al dany cel·lular per GalN. En canvi l'addició d'uridina, substància utilitzada per prevenir la lesió causada per GalN, no evita la producció d'aquest efecte immediat. S'interpreta que, a diferència de la uridina, la F1,6BP actua primerament a nivell de membrana, evitant els primers efectes causats per la GalN. En presència de F1,6BP els hepatòcits mantenen els seus nivells d'ATP, malgrat reduir el consum d'oxigen, suggerint una disminució de les despeses del manteniment homeostàtic cel·lular.

En un posterior treball del nostre grup es va comprovar que amb l'addició de F1,6BP hi havia una disminució en els fluxes actius i passius de potassi en hepatòcits de rata aïllats (Roig *et al.*, 1997). En aquests mateixos estudis s'observa com l'addició de GalN augmentava la permeabilitat iònica de la membrana dels hepatòcits i com aquest increment s'inhibia en presència de F1,6BP. Aquestes evidències ens duen a formular la hipòtesi de que la F1,6BP estaria actuant a nivell de membrana, essent els canals de potassi una possible diana. En el mateix treball es demostra que la disminució dels fluxes de potassi no està relacionada amb el paper quelant de calci de la F1,6BP.

Taula 1.1 Efecte de diferents components en la concentració de F2,6BP i d'ATP, mesurats 30' després de l'adició de les diferents substàncies.

Substàncies afegides	F2,6BP(nmol/g pes humit)	ATP(μ mol/g pes humit)
Control	18 \pm 1.6	3.39 \pm 0.14
GalN	7.5 \pm 1.0*	2.52 \pm 0.09*
Fructosa	8.5 \pm 0.7*	1.51 \pm 0.09*
F1,6BP	20.0 \pm 1.5	3.21 \pm 0.14
GalN+Fructosa	5.3 \pm 1.7*	1.23 \pm 0.14*
GalN+F1P	7.9 \pm 0.8*	2.43 \pm 0.12*
GalN+F6P	11.1 \pm 1.5*	2.27 \pm 0.14*
GalN+Pi	6.3 \pm 0.3*	1.97 \pm 0.13*
GalN+F1,6BP	20.2 \pm 1.5†	3.35 \pm 0.07†
GalN+10mM uridina	15.2 \pm 1.2†	4.24 \pm 0.19†
GalN+0.7mM EGTA	6.9 \pm 1.5*	2.35 \pm 0.15*

(Significança: * p<0.05 vs.control; † p<0.05 vs. GalN) (Adaptat de Roig et al., 1994)

1.2 Descripció de la lesió hepàtica induïda per galactosamina i dels efectes no específics.

1.2.1 Efectes sobre el parènquima hepàtic.

1.2.1.1 Metabolisme de la galactosamina.

La GalN és un sucre aminat que es metabolitza al fetge (Figura 1.1), més en concret als hepatòcits, amb una alta especificitat, degut a que aquest tipus cel·lular posseeix elevades activitats de diferents enzims, entre d'altres la galactocinasa i la UDPG:glucosa 1-P-uridiltransferasa, que metabolitzen la galactosa i la GalN (Keppler *et al.*, 1969).

La GalN un cop entra a l'hepatòcit és metabolitza ràpidament i esdevé galactosamina-1-fosfat (GalN-1-P), reacció catalitzada per la galactocinasa (figura 1.2), amb la hidròlisi d'una molècula d'ATP. La glucosa-1-fosfat present reacciona amb l'UTP, formant-se UDP-Glucosa (UDP-Glc) i fòsfor inorgànic, reacció duta a terme per la UDPG-pirofosforilasa (Bertoli *et al.*, 1966) (Figura 1.3).

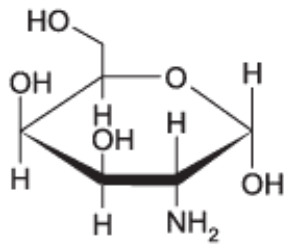


Figura 1.1 α -D-galactosamina

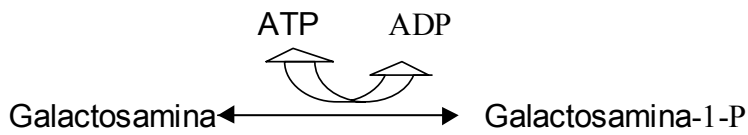


Figura 1.2

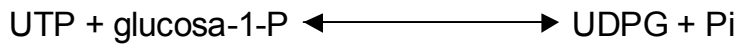


Figura 1.3

La GalN-1-P formada, conjuntament amb l'UDP-Glc dóna lloc a una lenta reacció catalitzada per l'enzim UDPG:galactosa-1-fosfat uridiltransferasa (figura 1.4), formant-se UDP-galactosamina i glucosa-1-fosfat (figura 1.5).

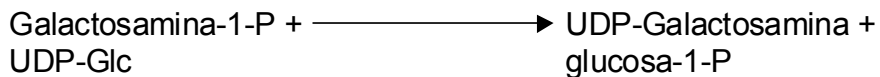


Figura 1.4

La GalN-1-P que es forma dins de l'hepatòcit té una acció inhibidora sobre l'enzim UDPG-pirofosforilasa, fet que dóna lloc a una reduïda formació d'UDP-Glc i una conseqüent acumulació de GalN-1-P (que té baixa afinitat per l'enzim galactosa-1-fosfat uridiltransferasa) (Keppler *et al.*, 1969). D'acord amb aquest model, la quantitat de GalN-1-P formada depen de la dosi administrada de GalN. Totes aquestes reaccions

donen lloc a una davallada, durant la primera mitja hora, d'UTP, UDP i UDP-Glc, acompanyada d'una acumulació d'UDP-hexosamines: UDP-galactosamina i UDP-glucosamina (que procedeix de la conversió d'UDP-galactosamina), UDP-N-acetilgalactosamina i UDP-N-acetilglucosamina. El contingut hepàtic d'UTP roman molt baix fins les 3 hores després de l'administració de GalN i no recupera els seus nivells normals fins les 20 hores (Keppler *et al.*, 1974). També la GalN disminueix molt significativament la síntesi d'RNA, determinada per la incorporació de $\{^{14}\text{C}\}$ -guanosina. L'administració d'uridina conjuntament amb la GalN, reverteix tots aquests efectes causats per la GalN (Keppler *et al.*, 1974);(Konishi *et al.*, 1974). La disminució d'UDP-Glc afecta a les vies de formació d'UDP-galactosa, la de l'àcid UDP-glucurònic, la de la biosíntesi d'heteropolisacàrids i la de la disminució de la reserva cel·lular de glicogen, ja que l'enzim glicogen sintetasa veu disminuïda la seva activitat a un 25% del normal (Mersmann *et al.*, 1967).

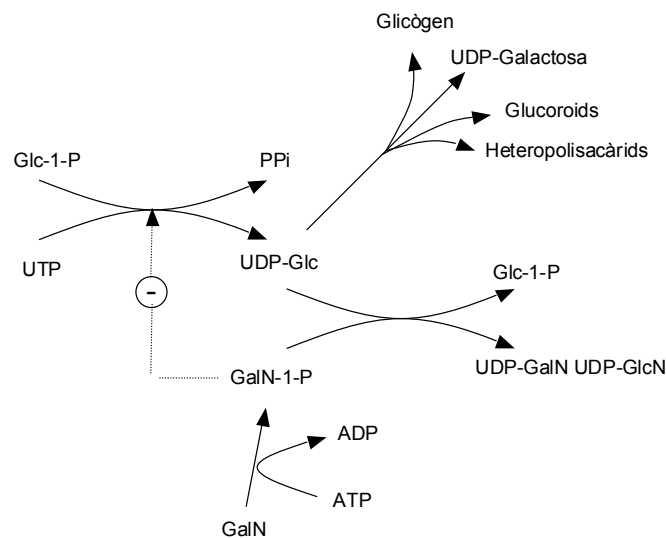


Figura 1.5. Inhibició de la UDPG-pirofosforilasa i síntesi de compostos dependents de l'UDP-Glc per la GalN. (Adaptat de Keppler i Decker, 1969)

S'ha de remarcar el paper clau que juga en aquest cicle l'UDP-Glc; així l'enzim UDPG:galactosa-1-fosfat uridiltransferasa té en condicions normals només un 5% de l'activitat que té l'altre enzim: UDPG-pirofosforilasa, per això, encara que la GalN-1-P inhibeixi l'UDPG-pirofosforilasa, hi ha una suficient formació d'UDP-Glc. S'hauria de produir una inhibició del 90% de la UDPG-pirofosforilasa perquè no es formés suficient UDP-Glc. La GalN de manera dosi dependent indueix la formació de l'UDP-GlcN i UDP-glucosamina disminuint els nivells d'uridina fosfats i segrestant l'UDP. Tot això

dóna lloc a una disminució de l'UDP-Glc (per tant també de l'UDP-galactosa), del glicogen, dels glucuroïds i dels heteropolisacàrids.

El metabolisme de la GalN als hepatòcits porta com a conseqüència una inhibició de la transcripció i posteriorment de la traducció. Aquest fet és deu directament a la davallada d'uridina fosfats, quedant-se les RNA polimerases sense substrat de transcripció.

En uns estudis anteriors de Keppler et al.(1970), es compara l'efecte que té en fetge de rata *in vivo* la GalN amb la 2-deoxi-galactosa, la galactosa i la glucosamina. En tots tres casos hi ha una davallada de les diferents formes d'uridina fosfat, encara que en el cas de la GalN aquest decrement és més acusat i té una durada major (Keppler *et al.*, 1970). Cal dir però, que l'únic sucre que dóna lloc a la formació d'UDP-galactosamina i d'UDP-Glucosamina i reproduceix en el fetge una hepatitis vírica és la GalN. En quant a la 2-deoxy-galactosa, la galactosa i la GlcN, hi ha formació d'UDP-hexoses, com la UDP-galactosa (que es troba en equilibri amb la UDP-Glc), però la recuperació de l'UDP és molt més ràpida. Així la seqüència que segueix la GalN en el fetge és primer la formació d'UDP-Glc i UDP-galactosa, que dóna lloc a UDP-galactosamina i UDP-glucosamina i finalment es formen UDP N-acetilhexosamines.

1.2.1.2 Homeostasi energètica.

La F2,6BP és un potent activador al·lostèric de l'enzim 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK-1), que dóna lloc a F1,6BP a partir de fructosa-6-fosfat més fòsfor inorgànic. La F2,6BP és sintetitzada per un enzim bifuncional, la 6-fosfofructo-2-cinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa, que catalitza la reacció de fructosa-6-fosfat a F2,6BP i viceversa. En estat basal la relació cinasa / fosfatasa d'aquest enzim és àmpliament favorable a la part cinasa, produint-se un elevat nivell de F2,6BP, i per tant estimulant-se la glicòlisi.

La F2,6BP es troba molt minvada en rates tractades amb GalN, ja que altera substrats o moduladors de la 6-fosfofructo-2-cinasa, cas de l'ATP, que indueix la inhibició del domini cinasa de l'enzim, provocant la davallada de F2,6BP, induint-se gluconeogènesi i inhibint-se la glicòlisi, amb una pronunciada davallada d'ATP. Per contra, aquest procés junt amb el de glicogenòlisi (lisi de glicogen per part de la glicogen fosforilasa), permet mantenir els nivells de glucosa en sang, evitant-se així la lesió d'altres teixits dependents de glucosa, com el cervell o el múscul. Per contra la glicogen sintasa que forma el glicogen està inhibida per una manca d'UDP-Glc (De Oliveira *et al.*, 1992).

S'ha demostrat experimentalment que la GalN afecta el metabolisme de carbohidrats dels hepatòcits (De Oliveira *et al.*, 1992). Lligat a la davallada d'uridina fosfats, a partir de les 6 hores hi ha també una davallada d'altres nucleòsids fosfat, com és el cas de l'ATP, pel reequilibri de nucleòtids que origina la depleció d'uridina fosfats i també degut a la disminució en el contingut de F2,6BP. La quantitat d'ATP arriba a uns valors que comprometen seriosament la viabilitat cel·lular i aquesta davallada en el contingut d'ATP és màxima a les 24 hores. També en un treball del nostre grup on s'incuben suspensions d'hepatòcits de rata en presència de GalN, s'observa que la GalN disminueix de manera dosi-depenent el contingut d'ATP, durant els primers 30 min. després de l'addició del sucre aminat (Roig *et al.*, 1994).

1.2.1.3 Alteracions de membrana i homeostasi iònica.

La GalN també provoca alteracions a nivell de membrana en hepatòcits i sembla ser un dels primers llocs on actua (El Mofty *et al.*, 1975). En presència de GalN la composició de lípids varia, s'incrementen els fosfolípids i disminueix la fluïdesa de membrana. També hi ha una variació de l'estat físic de la membrana i alguns enzims d'aquesta pateixen una davallada en la seva activitat. L'activitat 5' nucleotidasa en membrana aïllada és un mètode de determinació de l'estat de les membranes i és molt específic de la membrana plasmàtica. La GalN indueix una reducció del 40% de l'activitat 5' nucleotidasa a les 2 hores de l'administració. L'administració d'uridina reverteix aquest efecte sempre que aquesta s'afegeixi durant les 2 hores i mitja després de l'administració de GalN (El Mofty *et al.*, 1975). En canvi la glucosamina no produeix aquests efectes sobre les membranes.

Un efecte molt nociu de la GalN és el que dona lloc a una variació en les concentracions iòniques, derivades de les alteracions de la permeabilitat iònica de la membrana plasmàtica.

El calci es troba en una major concentració a l'exterior cel·lular respecte al citoplasma degut a dos motius: el primer és que a la membrana plasmàtica es troba l'ATPasa de calci, que expulsa el calci cap enfora; l'altre és que el calci citosòlic s'emmagatzema en el mitocondri i en el reticle endoplasmàtic. El dany a la membrana causat per la GalN pot interferir amb el funcionament de la bomba de calci i pot fer la membrana més permeable al calci; a part la lesió pot afectar mitocondris i reticle endoplasmàtic, disminuint la seva capacitat per emmagatzemar calci (El Mofty *et al.*,

1975). Aquests efectes també poden estar mediat per la davallada d'ATP causada per la GalN.

Així l'addició de GalN induïx un increment del calci intracel·lular (Taula 1.2), que activa proteïnes que depenen de calci com fosfolipases, proteases, que degraden els components intracel·lulars i també s'activen les endonucleases, relacionades amb el procés d'apoptosi, amb talls regulars i repetitius del DNA (Boobis *et al.*, 1989). L'addició d'uridina durant les 2 hores i mitja després de l'administració de la GalN reverteix l'increment de calci intracel·lular a l'hepatòcit; en canvi, a partir de les 3 hores després de l'administració de GalN, la uridina no pot revertir aquest augment (El Mofty *et al.*, 1975).

Per contra hi ha efectes de la GalN no dependents del calci, com l'alteració de la permeabilitat de la membrana cel·lular al potassi induïda per l'hepatotòxic. En el treball de Roig *et al.* (1997) es demostra que l'increment dels fluxes de potassi induït per la GalN no és conseqüència de l'increment de calci intracel·lular que produeix el sucre aminat. Els hepatòcits en suspensió tractats amb GalN més un quelant de calci, l'àcid etilenglicol-bis(b-aminoetil èter)-N,N,N',N'-tetracètic (EGTA), que evitaria l'entrada de calci dins la cèl·lula, no pateixen una disminució significativa en els fluxes de potassi respecte les cèl·lules tractades únicament amb GalN (Roig *et al.*, 1997).

Diferents treballs demostren que els nivells de potassi intracel·lular estan relacionats amb l'apoptosi i que els primers estadis de l'apoptosi poden induir-se per la pèrdua de potassi cel·lular (Bortner *et al.*, 1997);(Bortner *et al.*, 1999);(Hughes, Jr. *et al.*, 1997). S'ha demostrat en cultius de timòcits incubats amb medis rics en potassi (KCl), que hi ha una significativa correlació entre l'increment en la concentració externa de potassi i la disminució de la mort per apoptosi. En concret s'inhibeix la fragmentació del DNA i l'activació de la pro-caspasa 3, no inhibint-se, en canvi, l'activitat de la caspasa 3 madura. Es conclou que nivells fisiològics de potassi inhibeixen l'activitat nucleasa apoptòtica a nivell del trencament de les pro-caspases (Hughes, Jr. *et al.*, 1997).

1.2.1.4 Efectes sobre la viabilitat cel·lular.

A part del citat treball del nostre grup, on s'observa que la GalN causa una davallada de la viabilitat cel·lular, del contingut d'ATP i de F2,6BP en hepatòcits aïllats de rata (Roig *et al.*, 1994), altres estudis en cultius primaris d'hepatòcits de rata indiquen que la GalN disminueix la viabilitat de les cèl·lules, induint primerament

apoptosi, mesurada per l'activitat caspasa 3, la condensació del DNA o la fragmentació del DNA dels hepatòcits i secundàriament necrosi cel·lular, mesurada per l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) alliberat al medi de cultiu (Muntane *et al.*, 1998).

Taula 1.2 Prevenció amb uridina de l'increment en els nivells totals de calci induïts per GalN.

Temps (h) administració salí o uridina després de GalN.	Tractament	Ca ⁺⁺ (µg/g pes sec)
0	Galactosamina i salí	162 ± 5.3†
	Galactosamina i uridina	122 ± 3.5
2	Galactosamina i salí	165 ± 13.2
	Galactosamina i uridina	117 ± 11.6
3	Galactosamina i salí	167 ± 1.8
	Galactosamina i uridina	158 ± 7.8

Significança: † p<0.05 vs. GalN i uridina (valor control: 114±7). (Adaptat de El-Mofty et al., 1975)

En un treball del grup de Tsutsui et al.(1997) realitzat amb cultius primaris d'hepatòcits de la línia de ratolí C57BL/6N Crj, s'administren concentracions creixents de GalN per estudiar la inducció d'apoptosi. El percentatge de fragmentació del DNA mesurat pel mètode d'ELISA s'incrementa de manera depenent de dosi, manifestant-se en estadis molt primerencs, a partir dels 30 min., després de l'administració de GalN (Tsutsui *et al.*, 1997). A les 3 hores després de l'addició de GalN s'observa un patró de fragmentació de DNA en un gel d'agarosa en la dosi de 20 mM de GalN; aquest patró no apareix fins a les 6 i 12 hores en les concentracions de 10 i 5 mM de GalN, respectivament. Els estudis de citotoxicitat indiquen que la mort per necrosi, mesurada per la sortida d'LDH, pot observar-se a partir de les 24 hores després del tractament amb GalN. En quant als aspectes morfològics, apareixen els *blebs* característics de l'apoptosi a partir de les 12 hores en les dosis de GalN més altes. Totes aquestes evidències porten a la conclusió que la GalN indueix apoptosi en els cultius d'hepatòcits en aquesta línia de ratolí.

1.2.1.5 Altres efectes.

La inhibició traduccional, conseqüència de la inhibició transcripcional, causada per la GalN sobre els hepatòcits, es veu potenciada per la hipometilació de l'RNA missatger que provoca la GalN (Clawson *et al.*, 1990).

Per un altre costat, la GalN té efectes nocius per l'hepatòcit ja que disminueix la quantitat de glutatió disponible per la cèl·lula i impedeix la seva síntesi. El glutatió reduït és necessari per l'activitat de l'enzim glutatió peroxidasa que elimina el peròxid d'hidrogen. El correcte funcionament d'aquest enzim és clau per mantenir baixos els nivells de radicals lliures d'oxígen (ROS) (McMillan *et al.*, 1992).

1.2.2 Incidència de la GalN sobre els processos inflamatoris.

La GalN produeix en el fetge de rata una hepatitis similar, funcionalment i morfològicament, a l'hepatitis viral humana (Keppler *et al.*, 1968). La GalN administrada en una dosi propera als 400 mg/Kg en rata produeix una inflamació portal i parenquimal que dona lloc a apoptosi a les 6 hores i posteriorment a una necrosi dels hepatòcits, mesurada per l'activitat de les transaminases al plasma a les 24 hores del tractament (Stachlewitz *et al.*, 1999).

Bàsicament i ordenat de manera cronològica, l'efecte de la GalN té tres fases:

1^a fase.- Entre 0 i 2 hores i mitja després de l'administració de la GalN. En aquest període hi ha una lesió a nivell de membrana plasmàtica, associat a una alteració de la permeabilitat i de l'homeostasi iòniques. La cèl·lula no està lesionada de forma irreversible i si s'administra uridina, durant les 2 hores i mitja primeres, la cèl·lula es recupera.

2^a fase.- Transcorre entre les 2 hores i mitja i les quatre hores; és un període molt crític ja que la cèl·lula pot estar irreversiblement lesionada. En aquest cas l'administració d'uridina gairebé no pot prevenir la mort cel·lular.

3^a fase.- En aquesta fase la cèl·lula està irreversiblement lesionada, i ja no pot ser revertida per uridina. Hi ha un conjunt d'alteracions clares, essent la concentració de calci interna molt elevada. Es dona un deteriorament metabòlic que porta a la mort cel·lular (El Mofty *et al.*, 1975).

1.2.2.1 Endotoxèmia i histaminèmia.

Altres efectes són atribuïts a l'acció de la GalN sobre membranes de diferents tipus cel·lulars, com la desgranulació dels mastòcits del peritoneu, tant *in vivo* com *in vitro*, provocant secreció d'histamina (Liehr *et al.*, 1978). També s'observa inhibició de la capacitat fagocítica cel·lular. Basant-se en aquests resultats, Stachlewitz *et al.*(1999), hipotetitzen un efecte inespecífic de la GalN a nivell de mastòcits, cèl·lules de Kupffer (KC, *Kupffer Cells*) i hepatòcits. Com a conseqüència d'aquest efecte global, a nivell del parènquima hepàtic s'indueix mort cel·lular per apoptosi i secundàriament es desencadena una inflamació al fetge i una posterior necrosis, per l'arribada de limfòcits i altres cèl·lules pro-inflamatòries provinents del torrent sanguini (Stachlewitz *et al.*, 1999).

1.2.3 Efectes de la GalN sobre altres tipus cel·lulars.

Dels treballs descrits prèviament es pot concloure que la GalN en els hepatòcits provoca dos efectes diferenciats. El primer d'ells es deu al seu metabolisme, ja que posseeix els enzims de la via de la galactosa. L'altre efecte es deu a que la GalN actua a nivell de membrana causant alteracions, disminuint la seva fluïdesa, variant la seva composició, alterant activitats enzimàtiques, o modificant la permeabilitat iònica (El Mofty *et al.*, 1975). A més a més dels efectes sobre els hepatòcits, s'ha trobat que la GalN també actua sobre altres tipus cel·lulars, que tenen baixa activitat galactocinasa, indicant que els seus efectes són deguts a la interacció de la GalN amb la membrana cel·lular. Com es demostra en el treball de Hofmann *et al.* (1976), els efectes metabòlics de la GalN en hepatòcits són deguts a la gran activitat dels enzims de la via de la galactosa, situació que no es dona en altres tipus cel·lulars, cas de les KC (Hofmann *et al.*, 1976). En aquest treball es comprova tant en KC, com en rates pretractades amb GalN, que el sucre aminat no disminueix el contingut d'UTP, ni d'UDP-Glc (en menys d'un 10 %) i que hi ha baixa afectació en la traducció cel·lular, comparat amb els efectes que causa la GalN sobre els hepatòcits.

S'ha demostrat l'efecte de la GalN sobre membranes de diferents tipus cel·lulars. En un estudi de Houston *et al.* (1983), s'analitzen els efectes de 4 sucres amb grup amino, entre ells la GalN, sobre les plaquetes. En tots els casos s'inhibeix l'agregació plaquetària en resposta a l'àcid araquidònic, degut a la interacció del grup amino a

nivell de membrana i no pas al seu metabolisme. La GalN també evita la unió del fibrinogen al seu receptor, la glicoproteïna del complex Iib-III (Houston *et al.*, 1983).

1.3 La resposta immune.

1.3.1 Introducció.

La resposta immune contra els patògens microbians està formada per components innats (resposta immune innata) i per components adaptatius (resposta immune adaptativa) (Hoffmann *et al.*, 1999). La resposta immune innata està mediada per les cèl·lules sanguínies blanques, com són els neutròfils i els macròfags. Cèl·lules fagocítiques que eliminen els patògens alhora que sintetitzen un ampli ventall de mediadors i citocines pro-inflamatòries (Aderem *et al.*, 1999). Els patògens fagocitats són degradats al fagosoma madur, on components del patogen són presentats als limfòcits T, activant-se així la resposta immune adaptativa, modulada a partir dels patògens que han infectat a cada individu.

1.3.2 Història infecció microbiana.

Louis Pasteur va ser el primer científic que al segle XIX va determinar que els gèrmens eren els responsables de la putrefacció i descomposició de la matèria orgànica i que els microbis són necessaris i suficients per produir una malaltia infecciosa. A ell se li atribueix el terme microbiologia (Beutler *et al.*, 2003). Posteriorment, Richard Pfeiffer (1858-1954) descobrí en porcs de guinea inoculats amb el bacteri del còlera, *Vibrio cholerae*, que encara que els bacteris estiguessin morts produïen la infecció. A part, descobrí una part tòxica de la membrana de la cèl·lula bacteriana estable a canvis de temperatura, que era l'endotoxina. Anys més tard Eugenio Centanni (1863-1948) indicà que totes les famílies de bacteris tenien aquesta endotoxina, amb petites variacions, i que la febre era beneficiosa per l'organisme ja que ajudava a disminuir certs tumors malignes. Aquesta és la primera evidència de l'existència del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α , *Tumor Necrotic Factor- α*), (Beutler *et al.*, 2003).

Posteriors estudis indicaren que l'endotoxina era un important component estructural de la membrana externa de les bacteris gram negatives (Figura 1.6). Conté tres parts; la cadena O-específica (polisacàrid amb l'O-antigen), la regió central i el lípid A, un glicofosfolípid (Raetz, 1990). Diferents estudis demostren que el lípid A és el portador de les propietats tòxiques i pirogèniques de l'endotoxina (Darveau, 1998). La

seva toxicitat depèn de la forma que adopti, essent la cúbica la més activa (Blunck *et al.*, 2001);(Schromm *et al.*, 1998). La primera evidència de l'existència d'un receptor del lipopolisacàrid (LPS) va ser l'any 1965, degut a una mutació espontània a un ratolí que va quedar fixada al sublinatge C3H/Hej del ratolí C3H, que va esdevenir insensible a l'LPS (Watson *et al.*, 1974);(Watson *et al.*, 1975) . La mutació afectava a un sol locus, que posteriorment va anomenar-se *Lps*.

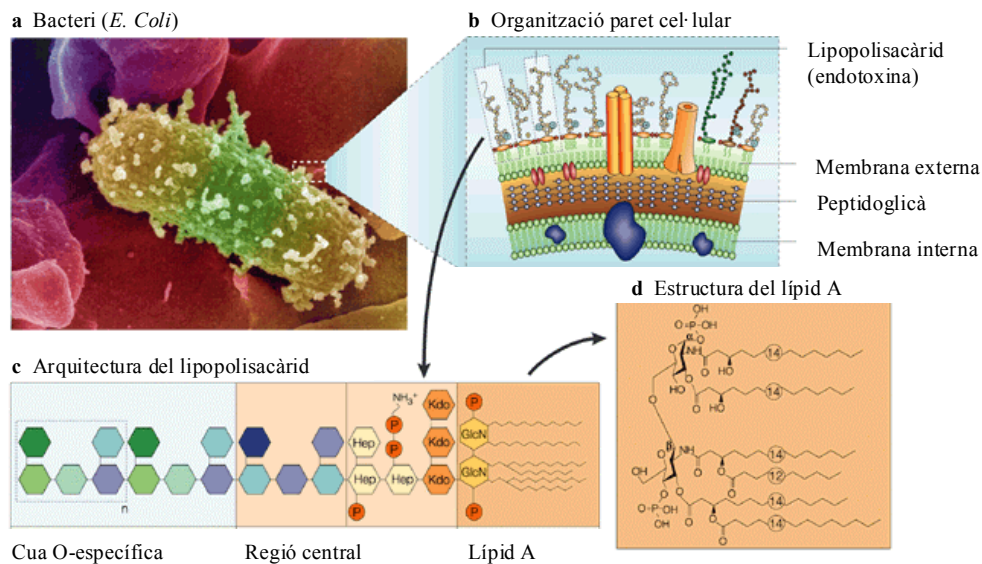


Figura 1.6. Lipopolisacàrid d'un bacteri Gram-negatiu. (Adaptat de Beutler *et al.*, 2003)

1.3.3 Arquitectura del fetge.

Per la seva ubicació a dins de l'organisme i pels diferents tipus cel·lulars que conté, el fetge és un òrgan que esdevé clau en la detecció i eliminació de patògens a través de la immunitat innata i en cas de produir-se una infecció, promovent processos inflamatoris, amb l'arribada de cèl·lules pro-inflamatòries al través del torrent sanguini (Stachlewitz *et al.*, 1999);(Su, 2002).

L'arquitectura hepatocel·lular del fetge és molt complexa perquè: *i*) el fetge està format per diferents tipus de cèl·lules; *ii*) la proporció de cadascuna d'aquestes cèl·lules pot variar arran de lesions hepàtiques, i *iii*) hi ha una doble vasculatura aferent, l'artèria hepàtica i la vena portal (Alexander, 1998). El fetge es pot considerar com un conjunt de nombroses unitats estructurals i funcionals de mida microscòpica, els acins. Cadascuna d'aquestes unitats funcionals comprèn una agrupació de cèl·lules que es disposen anatòmicament al voltant de la vasculatura hepàtica (Rappaport, 1973). Els acins estan formats per les cèl·lules parenquimals, o hepatòcits, i per diversos tipus de

cèl·lules no parenquimals. Els hepatòcits ocupen gairebé el 80 % del volum del fetge i duen a terme la major part de les funcions hepàtiques, mentre que les cèl·lules no parenquimals, situades al compartiment sinusoïdal, ocupen poc més del 6 % del volum del fetge, malgrat que constitueixen el 40% del nombre total de cèl·lules del fetge (Harbrecht *et al.*, 1995). Les parets del sinusoides hepàtic estan flanquejades per tres tipus diferents de cèl·lules: cèl·lules endotelials, KC i cèl·lules estrellades hepàtiques o lipòcits. Addicionalment, sovint també es troben a la llum dels sinusoides els limfòcits intrahepàtics i les cèl·lules assassines, específiques del fetge.

Tant en condicions normals com patològiques, moltes de les funcions dels hepatòcits estan regulades per substàncies alliberades per les cèl·lules no parenquimals veïnes. Les KC són els macròfags residents que es localitzen als sinusoides, caracteritzats per tenir una pronunciada capacitat endocítica i fagocítica. Atès que aquestes cèl·lules estan constantment en contacte amb productes bacterians solubles i altres partícules provinents de l'intestí, en condicions normals sempre hi ha un cert nivell d'activació dels macròfags hepàtics. Els potents mitjancers de la resposta inflamatòria que secreten les KC, com ROS, l'òxid nítric (NO, *Nitric oxide*), CO, eicosanoides, el TNF- α i altres citocines, controlen la fase inicial de la inflamació hepàtica, una part important de la resposta immune innata (Su, 2002);(Werling *et al.*, 2004). L'exposició intensa de les KC a productes bacterians, especialment endotoxines o LPS provoca l'alliberament dels mediadors inflamatoris esmentats anteriorment, afectant, entre altres tipus cel·lulars, els hepatòcits.

1.3.4 La resposta immune innata.

1.3.4.1 El complex LPS-LBP-CD14.

La resposta immune innata és la primera línia de defensa contra les malalties infeccioses. Té com a funció detectar i eliminar els patògens. Aquest paper el duen a terme un grup de receptors de la família "Toll-like" (TLRs, *Toll Like Receptors*), que es troben tant en vertebrats com en invertebrats i estan molt conservades en l'evolució (Aderem *et al.*, 2000). El sistema immune innat ha de ser capaç de distingir entre tot un ventall de patògens, realitzant aquestes funcions amb un nombre reduït de receptors (Janeway, Jr. *et al.*, 1998).

Un dels primers passos per entendre com actua l'LPS va ser descobrir i caracteritzar la proteïna d'unió a l'LPS (LBP, *LPS binding protein*) (Ulevitch *et al.*,

1999) i la identificació del receptor CD14 (Schumann *et al.*, 1990);(Wright *et al.*, 1990). L'LPS és opsonitzat per l'opsonina LBP i el complex és reconegut pel receptor opsònic CD14 a la superfície del macròfag, o al plasma en la forma soluble de CD14. El CD14, que no té unitats transmembrana, presenta l'LPS al TLR-4, que sí que en té i activa la cadena de senyals (Figura 1.7) (Ulevitch *et al.*, 1995).

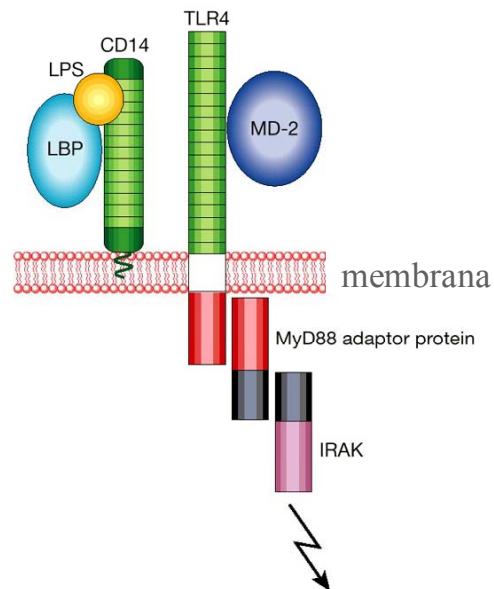


Figura 1.7. Reconeixement de l'LPS a la superfície del fagòcits. (Adaptat de Aderem *et al.* 2000).

1.3.4.2 Receptors "Toll-like".

Va ser al model de *Drosophila* on es va descobrir primerament la funció dels TLRs (Lemaitre *et al.*, 1996);(Williams *et al.*, 1997). Posteriorment es va trobar el TLR homòleg en vertebrats, en concret en el ratolí (Hoshino *et al.*, 1999);(Poltorak *et al.*, 1998);(Qureshi *et al.*, 1999). Actualment la família TLR està composta per 11 membres (TLR-1 a TLR-11), a l'espècie humana (Takeda, 2005), mentre que son 13 els identificats en el ratolí. Els TLRs de l'1 al 9 són comuns a les dues espècies (Dunne *et al.*, 2005). Janeway *et al.* (1997) van identificar el primer TLR humà homòleg a *Drosophila* que participava en el sistema de la immunitat innata, anomenat TLR-4, que és present a tots els vertebrats (Medzhitov *et al.*, 1997). Es va demostrar que els defectes genètics que presentaven dues línies de ratolins que no eren sensibles a l'LPS, o molt poc, estaven lligats al TLR-4, en una mutació al tercer exò (Poltorak *et al.*, 1998);(Qureshi *et al.*, 1999). Quan aquesta mutació era introduïda en un TLR-4 salvatge, el receptor es transformava en un mutant dominant negatiu, amb la resposta inhibida a l'LPS (Underhill *et al.*, 1999). Els TLRs són capaços de distingir entre fongs, bacteris i llevats i poden donar lloc a una resposta adequada en cada cas (Figura 1.8)

(Williams *et al.*, 1997). Així per un costat el TLR-4 reconeix l'LPS dels bacteris Gram negatius, en canvi no reconeix bacteris Gram positius, ni micobacteris, ni llevats (Takeuchi *et al.*, 1999). Per un altre costat el TLR-2, que no reconeix l'LPS de Gram negatius, sí que respon a peptidoglicans de la paret de Gram positius, a micobacteris i a llevats (Hirschfeld *et al.*, 1999);(Lien *et al.*, 1999);(Underhill *et al.*, 1999). Així s'explica l'especificitat dels TLRs, que és similar a la trobada en *Drosophila* (Lemaitre *et al.*, 1996);(Williams *et al.*, 1997). A part del complex CD14-TLR4 també es va descobrir la participació de la proteïna MD-2, que funciona unint-se a la part extracel·lular del TLR-4 i que està implicada en la transducció del senyal cap al nucli (Shimazu *et al.*, 1999).

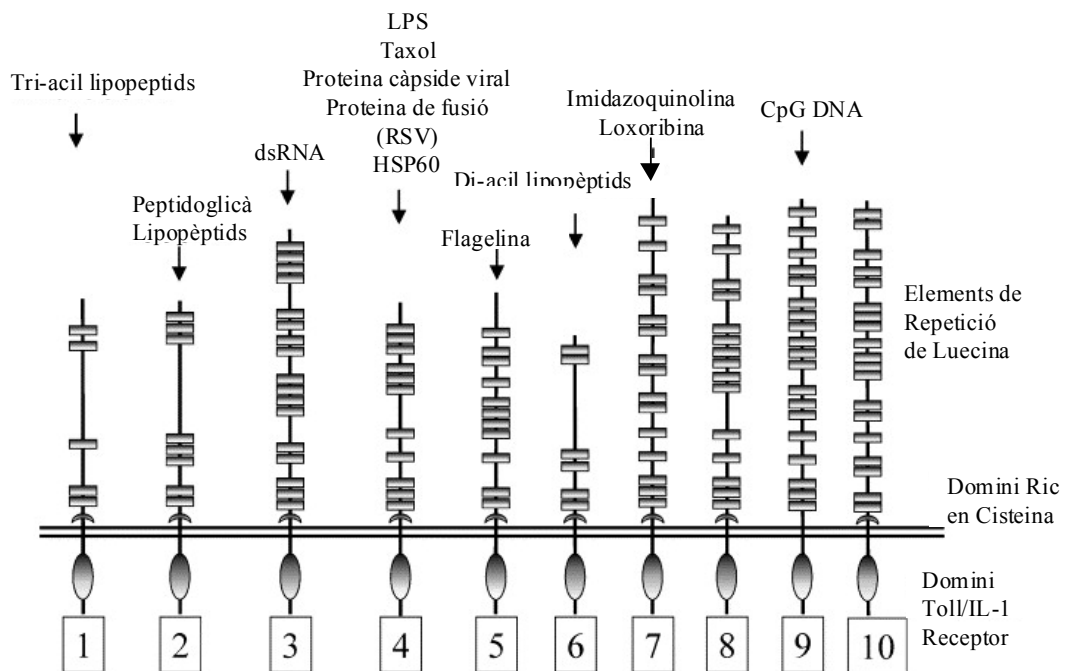


Figura 1.8 Esquema dels TLRs 1 a 10. (Adaptat de Ulevitch *et al.*, 2004)

1.3.4.3 Transducció del senyal del TLR4 al nucli.

La unió del CD14-TLR4-MD2 promou el reclutament de la proteïna adaptadora MyD88 (*MyD88*, *MyD88 adaptor protein*) que conté dos dominis, el d'homologia toll C-terminal que s'uneix a la part homòloga toll del receptor i el domini N-terminal o de mort, que continua el senyal. El domini de mort a la vegada interactua amb el domini de mort serina/treonina protein kinase (Figura 1.7) (Medzhitov *et al.*, 1997);(Muzio *et al.*, 1998). El domini de mort serina/treonina protein kinase s'autofosforila i s'acomplexa

amb TRAF6 que oligomeritza i activa TAK-1, un membre de la família MAP-kinasa (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999), que alhora activa altres I κ B kinases. Al seu torn aquestes cinases fosforilen l'I κ B, que es degrada i permet la translocació cap al nucli del factor nuclear κ B (NF- κ B, *Nuclear factor kappa B*) (Medzhitov *et al.*, 1998);(Muzio *et al.*, 1998);(Yang *et al.*, 1999). A la vegada membres de la família de la proteïna activadora-1 (AP-1, *Activator protein-1*), Jun i Fos són activats (Irie *et al.*, 2000);(Kopp *et al.*, 1999);(Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999). Tots ells juntament amb l'NF κ B són necessaris per activar la producció de mediadors inflamatoris i de citocines com el TNF- α i la interleucina 12 (IL-12) (Figura 1.9) (Anderson, 2000). L'activació del TLR-4 també indueix membres de la família B7, molècules requerides per l'activació de cèl·lules T natives, que actuen per presentació d'antigen, connectant amb el sistema immune adquirit. És l'enllaç entre la detecció del patogen i l'adaptació de la resposta immune adquirida (Medzhitov *et al.*, 1997).

L'estimulació dels macròfags amb LPS dóna lloc a alteracions de diferents paràmetres a nivell cel·lular i a l'activació de gens que propicien la resposta inflamatòria. La interacció de l'LPS amb el macròfag indueix un increment en el calci intracel·lular procedent del reticle endoplasmàtic, a través dels canals dependents d'inositol trifosfat. A més a més hi ha una entrada de calci de l'exterior a través dels canals de calci dependents de voltatge, estimulats per la despolarització de la membrana induïda per l'LPS. Aquest increment en els nivells de calci intracel·lular als pocs segons de l'estimulació, activa proteïnes dependents de calci-calmodulina i és necessari per la producció de TNF- α , O $_2^-$ i la inducció de diferents respostes inflamatòries (Wheeler *et al.*, 1999).

Diferents autors relacionen l'estimulació dels macròfags amb LPS amb l'activació de canals de potassi sensibles al calci (Blunck *et al.*, 2001);(Maruyama *et al.*, 1994);(Seydel *et al.*, 2001) En un treball realitzat amb macròfags humans derivats de monòcits madurats observen, mitjançant la tècnica de "patch-clamp", que quan les cèl·lules són estimulades amb LPS es produeix l'activació d'uns canals de potassi dependents de voltatge i d'alta conductància al calci (canals MaxiK). Aquests canals poden respondre a increments citosòlics de calci, generats entre altres per les endotoxines.

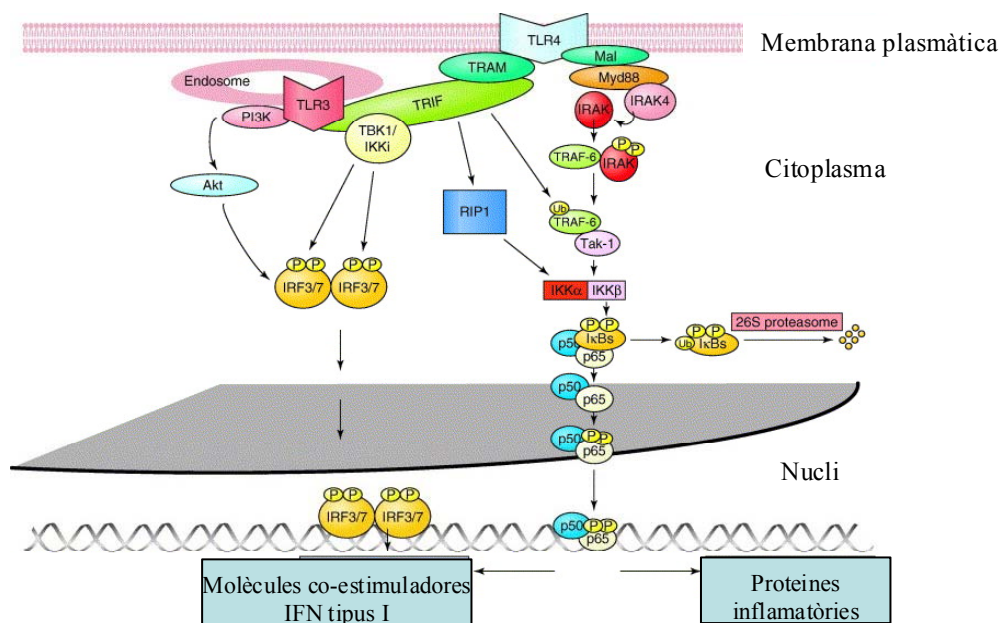


Figura 1.9. Regulació d'IRFs i NF-κB per TLR-3 i TLR-4. (Adaptat de Moynagh 2005)

En administrar LPS més tancadors inespecífics de canals de potassi, o específics al MaxiK, com la paxillina, s'inhibeix l'activació dels macròfags, mesurat pels nivells de TNF- α , que disminueixen a valors propers al control. Això indica que bloquejant específicament els canals de potassi pot inhibir-se l'activació dels macròfags induïda per LPS (Blunck *et al.*, 2001). Com a conseqüència de l'acció de les endotoxines, els macròfags alliberen un seguit de molècules pro-inflamatòries com el TNF- α , IL-1 α , IL-1 β (Netea *et al.*, 1998), IL-10, l'NO i O $_2^-$ (Werling *et al.*, 2004).

1.4 Descripció dels estudis previs dels efectes de la F1,6BP exògena.

1.4.1 Introducció.

A principis del segle XX Buchner va observar fermentacions alcohòliques per part de sals d'àcid ortofosfòric en sistemes lliures de cèl·lules. Harden i Young, basant-se en aquestes observacions, van descobrir un sucre difosforilat en aquest sistema (Korman, 1974). Aquest component, que primer va ser anomenat l'èster de Harden-Young i després fructosa-1,6-difosfat, fou el primer intermediari bioquímic descobert en el procés de la fermentació.

La F1,6BP és un metabòlit cel·lular de sis carbonis i dos grups fosfats (Figura 1.10), que té un paper directe en la regulació de moltes rutes metabòliques. Així, el seu increment afavoreix la glicòlisi i per contra inhibeix la gluconeogènesi, ja que hi ha estimulació de la PFK-1 (Markov *et al.*, 1980a). També se sap que en incrementar-se la concentració de F1,6BP s'estimula la síntesi de glicògen, ja que s'activa l'UDP-glucosa pirofosforilasa (Kaufmann *et al.*, 1973) i a la vegada s'evita la seva degradació, ja que s'inhibeix l'enzim glucògen fosforilasa en fetge i múscul (Kirtley *et al.*, 1977). També s'estimula la síntesi de lípids en fetge, ja que s'activa l'àcid gras sintetasa i es promou la lipòlisi en el teixit adipós (Chlouverakis, 1968);(Kirtley *et al.*, 1977).

Tot i ser un metabòlit cel·lular, la F1,6BP s'ha utilitzat com a principi actiu en diferents models de lesió i per reduir els efectes tòxics de l'addició de diferents substàncies.

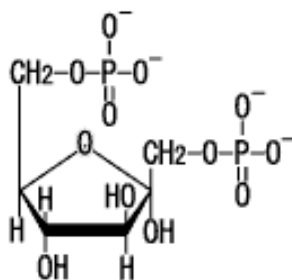


Figura 1.10 α -D-Fructosa 1,6-bisfosfat

1.4.2 Efectes de la F1,6BP exògena.

1.4.2.1 Preservació de l'homeostasi iònica.

La F1,6BP exògena altera la permeabilitat iònica i la regulació de protons de les membranes biològiques. Es va observar que la interacció de la F1,6BP amb la membrana d'eritròcits induïa canvis en la permeabilitat a diferents ions (Rigobello *et al.*, 1982a); (Rigobello *et al.*, 1982b), disminuïa la sortida de potassi i induïa un increment en l'eliminació dels protons. L'administració de valinomicina als eritròcits provocava un augment en la sortida de potassi i un increment de protons al citosol (Galzigna *et al.*, 1986). En presència de F1,6BP s'augmentava el pH intracel·lular i s'activava la PFK-1, amb el conseqüent increment en el funcionament de la via glicolítica, obtenint-se més ATP disponible per les bombes protòniques.

Es va comprovar que l'etanol incrementa l'entrada de calci en cèl·lules renals de rata (Rizzoli *et al.*, 1990). Aquest efecte és dependent de la concentració d'etanol i de la de calci i també del temps d'incubació. La F1,6BP addicionada a diferents concentracions evita aquest fenomen, possiblement, estabilitzant la membrana plasmàtica. En un altre treball es descriu que en plaquetes la trombina promou la sortida d'ATP i l'increment citosòlic de calci. Tots aquests efectes són revertits amb l'administració de F1,6BP (Cavallini *et al.*, 1992).

1.4.2.2 Efecte antioxidant de la F1,6BP.

En el treball de Rao *et al.* (1997) es demostra que amb l'addició de F1,6BP s'evita la lipoperoxidació que indueix l'amfotericina B en multitud d'òrgans en rata (Rao *et al.*, 1997). En estudis del sistema cardiovascular, diferents ratolins són estimulats amb doxorubicina (Lazzarino *et al.*, 1987), que causa estrès oxidatiu al cor. Entre els efectes descrits destaquen la presència en plasma de l'isoenzim LDH propi de cor, la peroxidació lipídica, mesurada amb els nivells de malondialdehid i l'augment de l'activitat catalasa. Tots aquests paràmetres s'associen amb estrès oxidatiu, paràmetres que amb l'administració de F1,6BP van retornar als nivells control. En la lesió de cor de rata per perfusió anòxica hi ha una disminució d'ATP, que estimula la transformació de xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO), la qual cosa provoca dany oxidatiu, mesurat per exemple en la formació de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS) al teixit. L'administració de F1,6BP propicia el manteniment dels nivells d'ATP, inhibint-se la transformació de XDH a XO (Tavazzi *et al.*, 1990).

La protecció que la F1,6BP confereix a cors de rata perfundits amb agents oxidants com el peròxid d'hidrògen i la diamida, està associada a la producció d'energia al mitocondri (Rigobello *et al.*, 1994). En concret es manté la capacitat contràctil del cor i es preserven els nivells de glutatió mitocondrial. En un altre treball es determina que amb l'administració de F1,6BP es mantenen els nivells de glutatió reduït, en aquest cas en cultius purs de neurones corticals, les quals són sotmeses a hipòxia-reoxigenació i a estrès oxidatiu (Vexler *et al.*, 2003). Els autors indiquen que, almenys en part, l'acció de la F1,6BP es deu a que s'incrementa l'activitat glutatió reductasa.

En quant a la regulació per part de la F1,6BP de la producció de ROS, Schinetti *et al.* (1986) treballen amb neutròfils humans estimulats amb èsters de forbol (PMA). La producció de radicals està destinada a la defensa de l'organisme degut a les propietats antimicrobianes de ROS. Una desregulació, o un excés de ROS, pot desencadenar en

una resposta inflamatòria amb la consegüent destrucció del propi teixit. El PMA a través del sistema enzimàtic xantina-XO genera O_2^- , a través de l'enzim superòxid dismutasa. La F1,6BP no elimina l' O_2^- , però mitjançant la regulació del metabolisme del neutròfil, disminueix la seva producció, analitzat amb la resposta quimioluminiscent a l'estímul del PMA (Schinetti *et al.*, 1986).

1.4.2.3 Modulació de la producció d'òxid nítric.

L'administració de F1,6BP modula la producció d'òxid nítric, molècula que regula la funció hepatocel·lular, actuant directament sobre hepatòcits i KC i de manera indirecta, com a resultat de les seves propietats com a vasodilatador (Alexander, 1998).

El preconditionament, 10 min d'isquèmia seguits de 10 min. de reperfusió, protegeix els òrgans d'un posterior dany d'isquèmia/reperfusió (I/R) associat a un trasplantament (Hotter *et al.*, 1996);(Murry *et al.*, 1986). El preconditionament intestinal de rata produeix un increment en la producció d'NO que propicia la inhibició de l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, que té com a conseqüència una acumulació endògena de F1,6BP. Aquest fet propicia un augment de l'ATP cel·lular, minvat en els processos d'I/R, conferint així protecció als òrgans davant aquests processos (Sola *et al.*, 2001). Els autors demostren que afegint NONOs, donador d'NO, o F1,6BP, es redueix significativament la lesió induïda per I/R a l'intestí de rata. La lesió intestinal es mesurada pel contingut proteic trobat al perfusat intestinal, conseqüència de la secreció de proteïna, associada al dany al teixit. Per un altre costat, al afegir-se N-nitro-L-arginina metil èster (L-NAME), inhibidor de l'NO sintasa, es perd la protecció obtinguda en el preconditionament contra l'I/R, arribant-se a nivells significativament superiors als causats només per l'efecte de la I/R. A l'afegir-se F1,6BP en aquest grup, es redueix parcialment la lesió, encara que, en aquest cas, els nivells de contingut proteic al perfusat intestinal son similars als detectats al tractament d'I/R intestinal.

En presència de F1,6BP s'impedeix la inactivació de l'òxid nítric sintasa, en la seva forma constitutiva (cNOS), en l'administració de ciclosporina A en miocardi de rata (Hutcheson *et al.*, 1995), o bé el tetraclorur de carboni (CCl_4) en homogenats de fetge de rata *in vitro* (Mihás *et al.*, 1997). Aquests treballs estan en la línia dels resultats trobats en un treball on s'indica que la F1,6BP incrementa la producció d'NO en el sistema cardiovascular de rates (Rao *et al.*, 1998).

En diferents treballs s'ha comprovat que l'NO modula, segons la concentració, la lesió induïda per la GalN en cultius primaris d'hepatòcits (Muntane *et al.*, 2000);(Siendones *et al.*, 2003). La GalN, com a part del seu efecte citotòxic, dona lloc a un increment en l'NO, mesurat pels nivells de nitrats més nitrits. En administrar-se baixes dosis del donador d'NO, S-nitros-N-acetil-penicillamina (SNAP), o pretractant el cultiu amb prostaglandina E1 (PGE1), que estimula una baixa producció d'NO, 2-3 hores abans d'afegir l'hepatotòxic, s'anula l'apoptosi induïda per GalN en cultius primaris d'hepatòcits; mesurada per fragmentació de DNA, activació de caspasa 3 (Quintero *et al.*, 2002) i per condensació del DNA. En canvi l'addició de PGE1 no evita la citotoxicitat causada per GalN, mesurada per l'activitat LDH al cultiu (Siendones *et al.*, 2003). En aquest últim treball es comprova que la GalN incrementa l'activitat NF- κ B, entre les 3 h. i les 24 h., augmentant-se l'expressió de l'iNOS en hepatòcits. La pre-administració de PGE1 en hepatòcits tractats amb GalN indueix un ràpid increment en l'activitat de l' NF- κ B i de l'expressió d'iNOS, 1 h. després de l'addició de GalN, fet que dona lloc a una *down regulation* de l'activació de l'NF κ B, de l'expressió d'iNOS i de la producció d'NO causada per GalN.

1.4.2.4 Modulació de la resposta inflamatòria.

En l'evolució del coneixement de l'acció de la F1,6BP s'han anat descobrint nous efectes, que han modificat les hipòtesis inicials sobre els mecanismes d'acció. Les KC juguen un paper clau en els processos inflamatoris i en concret en el dany hepàtic. Quan les KC són activades aquestes presenten una gran capacitat fagocítica i una baixa capacitat secretora de ROS i citocines, fet que és força positiu pel correcte funcionament de l'organisme (Tamaki *et al.*, 2002). Quan l'estimulació és excessiva, baixa la capacitat fagocítica de les cèl·lules i per contra s'incrementa la secreció de tot un seguit de molècules pro-inflamatòries, fet molt nociu per l'organisme. A part de la secreció de ROS i d'NO, hi ha una gran producció de citocines pro-inflamatòries com el TNF- α i l'IL-1 β , que actuen en cèl·lules que tenen els receptors d'aquestes molècules, cas dels hepatòcits.

La secreció d'histamina per part dels mastòcits del peritoneu és crítica en els processos inflamatoris, les reaccions d'hipersensibilitat, el colapse circulatori, i en casos extrems pot produir la mort per xoc. Està demostrat que en administrar-se F1,6BP s'evita l'excessiva sortida d'histamina en mastòcits de rata, causada per l'administració

del compost 48/80 (C.48/80) (Schinetti *et al.*, 1983a), substància que augmenta el calci intracel·lular, disminueix el contingut d'ATP i la pressió sanguínia i contreu les arterioles, o també per doxorubicina (Schinetti *et al.*, 1983b). Amb l'administració de F1,6BP s'observa un increment de l'ATP, davallat pel C.48/80 i aquest plus energètic permet l'expulsió de l'excés de calci intracel·lular, que és el desencadenant de la desgranulació de la histamina. En altres treballs s'indica que el C.48/80 a part de propiciar la secreció d'histamina, augmenta la sortida cel·lular de potassi, detectat pels nivells de potassi en plasma. En presència de F1,6BP més C.48/80 no es produeixen aquests efectes (Figuerola *et al.*, 2001).

A diferència del que hem indicat en altres sistemes, on l'administració de F1,6BP incrementa la producció d'NO, ja que s'activen les NOS, en altres treballs, com el d'Edde *et al.* (1998), treballant amb la línia de macròfags alveolars de rata NR8383, es demostra que la F1,6BP disminueix la producció d'NO. L'LPS és l'estímul principal dels macròfags i aquests responen produint, entre d'altres molècules, NO que en aquest cas té un paper pro-inflamatori. En estudis en la línia pulmonar de macròfags estimulats amb LPS, l'addició de F1,6BP inhibeix la producció d'NO. Els autors apunten que el mecanisme d'acció de la F1,6BP es deu a la degradació dosi-depenent que pateix l'mRNA de la iNOS, sense que quedi afectat la unió de l'NFκB al nucli, via que estimula l'LPS (Edde *et al.*, 1998).

S'han fet estudis amb cultius primaris de KC a 4°C incubats en solució de manteniment de la Universidad de Wisconsin (UW), en els quals s'ha investigat l'efecte d'afegir F1,6BP (Hirokawa *et al.*, 2002). Així la F1,6BP, afegida a la solució UW, indueix la reducció de l'excés d'activació dels macròfags i la davallada en la producció de ROS i de molècules pro-inflamatòries: TNF-α i IL-1β, respecte la solució UW sense F1,6BP. A part es manté la capacitat fagocítica dels macròfags, fet aquest últim, ja demostrat prèviament en l'eliminació de carboni col·loidal pel sistema reticuloendotelial (MPS, *Mononuclear Phagocytic System*) en diferents models (Markov AK *et al.*, 1985);(Tarsi *et al.*, 1985).

També s'ha demostrat que amb l'addició de F1,6BP s'inhibeix l'agregació plaquetària induïda per trombina, vasopresina o pel factor d'activació plaquetària; en canvi no s'evita l'activació plaquetària induïda per activadors de la proteïna cinasa C, cosa que indicaria que amb l'addició de F1,6BP s'inhibeix l'agregació plaquetària per sobre de l'activació de la proteïna cinasa C (Cavallini *et al.*, 1992).

1.4.2.5 Prevenió dels efectes de la isquèmia i la hipòxia.

Una de les primeres aplicacions en que es va utilitzar la F1,6BP com a fàrmac va ser l'any 1980 en un model d'isquèmia en una perfusió cardíaca en gossos (Markov *et al.*, 1980b). En el cas d'una obstrucció arterial comença un període d'isquèmia i hipòxia, que si es perllonga en el temps pot causar lesions irreversibles, fins i tot la mort. Una de les etapes crítiques durant la isquèmia és la que dóna lloc a la inactivació de l'enzim glucolític PFK-1, inhibida per l'increment d'acidesa cel·lular, fet que provoca una disminució del sucre F1,6BP. Aquest sucre esdevé fonamental per l'obtenció d'energia en forma d'ATP en la via de la glicòlisi, font principal d'obtenció d'energia, ja que en situació d'hipòxia està aturat el cicle de Krebs. Aquesta situació, si es perllonga, dóna lloc a una necrosi generalitzada de la zona que ha patit la isquèmia (Farias *et al.*, 1986);(Mansour, 1963);(Williamson, 1966).

Dels treballs que demostren que amb l'addició de F1,6BP s'anul·la la lesió induïda per isquèmia/hipòxia cardíaca (Lazzarino *et al.*, 1991);(Nuutinen EM *et al.*, 1991), destaca una revisió del tema, on s'indiquen els efectes que pateixen els miòcits sotmesos a I/R (Lazzarino *et al.*, 1992). Primerament hi ha una davallada d'ATP i creatina fosfat (CrP). A la vegada s'acumulen productes de la seva degradació, com l'ADP, AMP i creatina (Taula 1.3). Un excés de lactat i protons dona lloc a la inhibició de la PFK-1 i de la gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenasa, fet que compromet la viabilitat cel·lular per falta d'energia. Un dels efectes de la davallada d'ATP és la de l'increment intracel·lular de calci, que dóna lloc a la irreversible transformació de l'enzim XDH en XO (Taula 1.4). En la posterior reperfusió del teixit, l'entrada d'oxigen dóna lloc a una elevada producció de ROS a partir de l'enzim XO, anomenada "explosió oxidativa", fet que compromet la viabilitat de l'organ. L'administració de F1,6BP prèvia a la I/R dona lloc a una significativa reducció en la quantitat de ROS, fet que correlaciona amb un increment en l'ATP cel·lular. Els efectes de la F1,6BP exògena s'associen, en aquest treball, a la seva incorporació com a metabòlit de la glicòlisi.

L'efecte protector de la F1,6BP es demostra en els processos d'isquèmia i infart cerebral, ja sigui produïda com a conseqüència d'una oclusió mecànica de l'artèria cerebral, o bé per una isquèmia provocada per la injecció de microesferes a rates (Kuluz *et al.*, 1993);(Trimarchi *et al.*, 1997). Resultats similars s'han trobat en conills sotmesos a isquèmia cerebral parcial o total. Quan s'afegeix F1,6BP disminueix la mortalitat i

s'atenuen les alteracions provocades pel dany isquèmic (Cannella *et al.*, 1989);(Farias *et al.*, 1990).

La F1,6BP confereix protecció a rates sotmeses a isquèmia intestinal per oclusió de l'artèria mesentèrica superior, o per altres mètodes (Manani *et al.*, 1977);(Sun *et al.*, 1990). En presència de F1,6BP s'incrementa el metabolisme anaeròbic dels carbohidrats, s'inhibeix l'acció dels neutròfils, que produeixen ROS i s'evita la necrosi de l'òrgan, preservant la supervivència de l'animal.

Taula 1.3 Efecte de la F1,6BP en la concentració de components fosforilats (en µg/g pes sec) a cors de rata aïllats sotmesos a perfusió anòxica i reperfusió normòxica.

	Pas	ATP	ADP	AMP	CrP	Cr	Glic
Cors control	1	24.8±2.1	7.5±0.8	2.3±0.4	32.7±1.5	21.3±2.0	112.4±6
	2	6.0±1.7	8.1±1.7	8.0±1.5	5.0±1.9	38.1±3.6	4.1±1.4
	3	8.3±1.3	7.7±1.1	4.1±0.6	13.6±3.9	32.4±4.1	54.3±5.0
5mM Fructosa	1	22.1±1.8	7.9±1.2	2.2±0.4	32.7±2.2	20.4±2.3	107.2±5
	2	5.1±1.0	7.8±1.9	7.6±0.9	5.4±1.9	38.0±2.2	6.0±1.3
	3	8.2±1.9	8.2±1.0	4.1±0.6	12.7±4.4	36.4±2.8	48.1±4.4
5mM F1,6BP	1	24.8±2.0	7.9±1.5	2.1±0.2	33.4±2.7	22.1±2.5	109.7±4
	2	11.8±2.3 ^b	7.6±1.7 ^c	3.9±0.8	12.0±3.0 ^c	29.1±2.5 ^a	33.7±2.0 ^c
	3	21.0±3.6 ^c	7.1±1.9 ^b	2.4±0.8	29.2±4.1 ^c	21.9±2.5 ^a	82.1±5.3 ^c

Pas 1: 10' preperfusió; pas 2: 20' perfusió anòxica lliure de glucosa; pas 3: 20' reperfusió normòxica. (Significança: ^a, ^b i ^c és p<0.05, 0.01 i 0.001, respectiv., respecte el mateix pas dels altres dos grups. (Adaptat de Lazzarino *et al.*, 1992).

Amb l'administració de F1,6BP s'observa una disminució en el dany produït per I/R de pulmó i es veuen minvats els efectes que aquesta provoca, que són: increment en la permeabilitat vascular, en el pes del pulmó i increment de l'acumulació de proteïna al fluid broncoalveolar (Chu *et al.*, 2002). En definitiva la F1,6BP millora l'estat general de l'òrgan.

En estudis d'I/R renal la F1,6BP també millora l'estat general de l'òrgan. Es va sotmetre a un grup de rates a una oclusió de 30 min. de l'artèria renal bilateral (Didlake *et al.*, 1985);(Didlake *et al.*, 1989). Els animals tractats amb F1,6BP presentaven velocitats d'aclariment renal i d'excreció de soluts més altes. A part d'aquestes millores

funcionals presentaven una millor histologia renal. També s'ha emprat la F1,6BP en casos d'isquèmia en fetge de rates (Nakai *et al.*, 1991), amb resultats similars als descrits prèviament.

Taula 1.4 Efecte de la F1,6BP en diferents paràmetres en cor de rata anòxic i reperfundit.

	Pas	ATP μmol/g p.h	CrP μmol/g p.h	Potencial fosforilant (10 ³ x M ⁻¹)	TBARS μmolMDA/ g p.h	XDH/XO	LDH U/min
Cors	1	23.2±2.0	32.1±1.5	72.6±10.3	97.2±3.9	2.4±0.8	0.05±0.01
Control	2	4.8±1.5	6.3±2.0	5.1±0.7	120.4±12.8	0.5±0.2	0.10±0.02
	3	9.0±1.0	12.8±2.3	23.1±3.4	152.6±6.8	0.25±0.1	0.27±0.06
5mM	1	23.6±2.0	32.8±3.0	69.9±9.3	100.3±12.9	2.3±0.9	0.06±0.01
F1,6BP	2	11.5±1.8	12.1±2.4	18.4±2.0	112.6±10.1	2.2±1.1	0.08±0.01
	3	20.3±2.3	28.8±5.1	57.1±11.9	101.7±8.9	2.3±1.2	0.11±0.03

(Adaptat de Lazzarino *et al.*, 1992)

1.4.2.6 Efectes de la F1,6BP en la preservació d'òrgans.

Donat que la F1,6BP millorava l'estat funcional dels òrgans sotmesos a I/R, es va fer la hipòtesi de que també podia millorar l'estat de cors exposats a condicions d'hipotèrmia si era afegida a solucions de preservació, com la solució Euro-Collins (Figura 1.11) (Niu *et al.*, 1999), la de St. Thomas (Chien *et al.*, 2000), o la de UW (Moresco *et al.*, 2004a). D'acord amb aquesta hipòtesi, Niu *et al.* (1999) demostren que a l'afegir-se F1,6BP a aquestes solucions s'incrementa el consum miocàrdic d'oxigen, la capacitat cardíaca, el flux arterial i la força del ventricle esquerre.

S'han fet diferents estudis utilitzant la F1,6BP en les solucions de preservació de fetge en fred. En estudis realitzats l'any 2004, es comparen els efectes de la solució UW sola o combinada amb F1,6BP i amb el sucre sol sobre la preservació de fetge en fred (Moresco *et al.*, 2004a);(Moresco *et al.*, 2004b). No s'aprecien diferències entre la protecció que confereix la F1,6BP respecte la solució UW en mesures d'activitat transaminasa fins a 24 hores, en canvi sí que hi ha diferències en quan al dany per ROS,

mesurat amb els nivells de TBARS en fetge, quan s'addiciona F1,6BP respecte de solució UW.

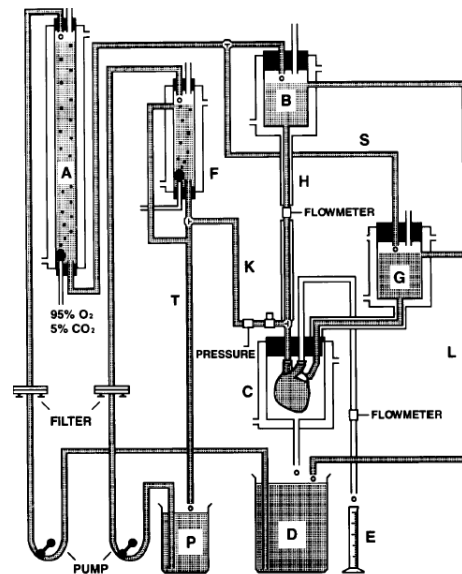


Figura 1.11 Setup per l'estudi del cor aïllat. (Adaptat de Niu et al., 1999)

Diferents estudis certifiquen que al afegir-se F1,6BP a la solució UW en fred s'augmenta la protecció durant el trasplantament d'intestí en rata (Genesca *et al.*, 2005);(Sola *et al.*, 2004). Entre els paràmetres que es milloren destaquen el manteniment d'alts nivells d'adenosina i la clara disminució dels d'hipoxantina i xantina, substrat de la XO, causant del dany per ROS en el trasplantament en el moment de la reperfusió. També hi ha una disminució en la lesió histològica i en la sortida d'LDH, paràmetre de necrosis. A part també es constata una clara davallada de l'apoptosi mesurada per activat caspasa 3. La F1,6BP també disminueix significativament la translocació bacteriana que té lloc en la reperfusió després del trasplantament de l'intestí.

1.4.2.7 Prevenció del xoc sèptic.

Els mecanismes de lesió tissular provocats per la sepsi inclouen processos infecciosos, inflamació i dèficit en l'energia cel·lular. En model de rata la sepsi provoca un increment en l'hematòcrit, en el número de leucòcits, monòcits i cèl·lules immadures circulants, que exacerben el procés inflamatori induint lesions tissulars a nivell multiorgànic, a cor, pulmó, fetge i ronyó. Com a conseqüència d'aquests efectes hi ha un col·lapse general i una taxa de mortalitat elevada (Nunes *et al.*, 2002);(Nunes *et al.*,

2003a). Amb l'administració de F1,6BP es reverteixen tant les alteracions hematològiques com les tissulars, a part de disminuir-se la taxa de mortalitat en un 50%. Els mecanismes d'acció de la F1,6BP apunten a la reducció de l'augment de calci intracel·lular, el manteniment de l'homeòstasi energètica i la reducció de l'activació dels macròfags per part de les endotoxines associades a la sepsi. Els mateixos estudis descarten que la F1,6BP actuï d'una manera similar a un antibiòtic, ja que no impedeix el creixement d'*Escherichia coli* en plaques de petri.

1.4.2.8 Protecció envers substàncies amb efectes tòxics.

Diferents estudis determinen per un costat, l'efecte protector de l'addició de F1,6BP en rates tractades amb ciclosporina (Cardoso *et al.*, 1996), fàrmac nefrotòxic i per altre la inhibició de l'activació dels neutròfils pulmonars, causants d'edema pulmonar, en gossos tractats amb α -naftiltiourea (Markov *et al.*, 2002). Indicar també l'efecte multiorgànic que confereix la F1,6BP en el tractament de rates amb amfotericina B (Rao *et al.*, 1997); en concret amb l'addició de la F1,6BP s'evita la peroxidació lipídica, mesurada pels nivells de malondialdehid, causada per l'amfotericina B en els següents òrgans: ronyó, cervell, fetge, pulmó i cor.

Amb l'administració de F1,6BP disminueix l'edema plantar causat pel mucopolisacàrid carragenina, que dona lloc a artritis experimental; en canvi no és antigènic, ni produeix efectes sistèmics. L'acció antiinflamatòria de la F1,6BP té lloc quan aquesta és administrada oralment, intraperitonealment o de manera sistèmica (Planas *et al.*, 1993).

Markov *et al.* (1999) van realitzar experiments amb gossos als quals se'ls va administrar extractes de la planta baladre. Els principis actius d'aquesta planta mediterrània, oleandrina, digitoxigenina i nerium, produeixen la inhibició de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de membranes del sarcolema miocàrdic, ja que és el receptor farmacològic d'aquestes substàncies. També disminueix el contingut d'ATP, indueix irritació gastrointestinal, hiperkalèmia, arrítmia ventricular, inestabilitat hemodinàmica i en molts casos la mort (Markov *et al.*, 1999). Amb l'administració de F1,6BP no es produeix la inhibició de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, però no se sap si evita la unió dels principis actius de la planta a la bomba o reactiva la seva activitat. També s'observa que no decau l'ATP, que no es produeixen les arritmies, la inestabilitat hemodinàmica i la mort de

l'animal. El mecanisme proposat és el de la incorporació de la F1,6BP a la glicòlisi, mantenint-se la concentració cel·lular d'ATP.

S'ha estudiat l'efecte de la F1,6BP contra diferents drogues que afecten el fetge, cas del CCl₄ (Rao *et al.*, 1989). L'efecte beneficiós de la F1,6BP s'associa al seu metabolisme. El paracetamol és un fàrmac que dona lloc a un increment del nivell d'activitats transaminasa i de malondialdehid en plasma de rates i que disminueix els nivells d'iNOS del fetge (Mihas *et al.*, 2003). Els autors postulen que la protecció de la F1,6BP, en aquest cas, es degut a que es mantenen els nivells control d'iNOS del fetge. Ho comproven administrant F1,6BP, a més de paracetamol, als animals pretractats amb L-NAME, inhibidor de l'NO sintasa. Aquests animals presenten un grau de lesió hepàtica del mateix rang que els solament tractats amb paracetamol.

La injecció de F1,6BP redueix significativament els nivells de les transaminases aspartat aminotransferasa (AST) i alanina aminotransferasa (ALT) i de la γ -glutamiltanspeptidasa i de la bilirrubina, augmentats tots ells en sèrum per la lesió induïda per la GalN en rates; a part s'evita la necrosi hepàtica (Markov *et al.*, 1991). Les causes que apunten els autors de l'efecte de la F1,6BP fan referència al fet que incrementa l'activitat fagocítica de l'MPS i la capacitat de suprimir la secreció de ROS per part dels leucòcits en el procés inflamatori. En un altre treball s'indica que la GalN incrementa els nivells totals de calci hepàtic i disminueix els nivells cel·lulars d'ATP i F2,6BP, a part de provocar una necrosi generalitzada del teixit, mesurat amb l'activitat de les transaminases AST i ALT. Tots aquests efectes s'eviten quan s'administra F1,6BP. En canvi no s'obtenen similars nivells en quan a la protecció envers la GalN, quan s'administra fructosa, fructosa-1-fosfat o fructosa-6-fosfat (De Oliveira *et al.*, 1992).

En un treball amb rates Wistar tractades amb GalN i amb F1,6BP, els autors constaten diferències tant quantitatives com qualitatives en la mort cel·lular, respecte les tractades només amb GalN (Fortes Aiub *et al.*, 2003). Així, determinen que les rates injectades amb GalN presenten uns nivells de necrosi hepàtica (i de mortalitat en general) superiors en tots els temps estudiats, fins 48 h, respecte les rates tractades amb F1,6BP més GalN. També s'indica que els animals tractats amb GalN i F1,6BP presenten uns nivells d'apoptosi superiors als tractats només amb GalN. Cal indicar però, que els esmentats estudis d'apoptosi els determinen amb l'assaig de TUNEL, essent aquest un mètode no totalment específic d'apoptosi, que té un cert solapament

amb la mort cel·lular per necrosi. Aquest fets podrien alterar els índex necrosi-apoptosi trobats. Per avaluar de manera correcta els índexos d'apoptosi-necrosi caldria una mesura complementaria d'activitat caspasa 3 o determinar la presència de la forma truncada de la caspasa 3, l'activa, detectable per *western blotting*.

1.4.2.9 Efectes tòxics de la F1,6BP.

L'administració de F1,6BP exògena presenta un baix nivell, quasi nul, d'efectes adversos, derivats principalment de la depleció de calci i de l'excés de fosfats per la hidròlisi de la F1,6BP. Cal tenir en compte però, una sèrie de consideracions de cara al potencial ús terapèutic. Existeixen dos vies d'administració de F1,6BP en animals; en un bolus intraperitoneal o bé intravenós ja sigui en bolus o amb administració lenta.

En canvi sí es va detectar un cert grau de toxicitat en l'administració intraperitoneal de F1,6BP en rates neonates; encara que aquestes rates, a diferència de les adultes, tenen menys desenvolupats els sistemes excretors (Vexler *et al.*, 1999). En aquests animals s'observa hemorràgia pulmonar, baixos nivells sanguinis de calci i molt elevats de fosfats i en les dosis més altes causa la mort.

En quant a la toxicitat de la F1,6BP en administració intravenosa, s'estudien els efectes de l'administració de F1,6BP en una única dosi per la vena caudal en rates (Nunes *et al.*, 2003b). Es determina que la DL50 es al voltant d'1 g per quilo de pes corporal a les 24 h (Figura 1.12). Hi ha una baixada en el calci iònic al plasma i un augment en la quantitat de fosfats derivats de la hidròlisi parcial de les molècules bifosforilades. Hi ha baixa correlació entre els nivells iònics de calci i la mort dels animals; en canvi sí que hi ha alta correlació entre els nivells de fosfats i la mort dels animals, indicant que aquesta pot ser la causa de mort per aturada cardíaca, per la interacció dels fosfats amb les cèl·lules del miocardi.

No obstant, Markov *et al.* (2000) realitzen estudis amb pacients sans als quals se'ls administren 5 g de F1,6BP per la vena braquial, en una infusió ràpida, no observant-se efectes adversos (Markov *et al.*, 2000). Sí que es detecta un descens de la taxa respiratòria i cardíaca i un increment en la concentració plasmàtica de fòsfor inorgànic

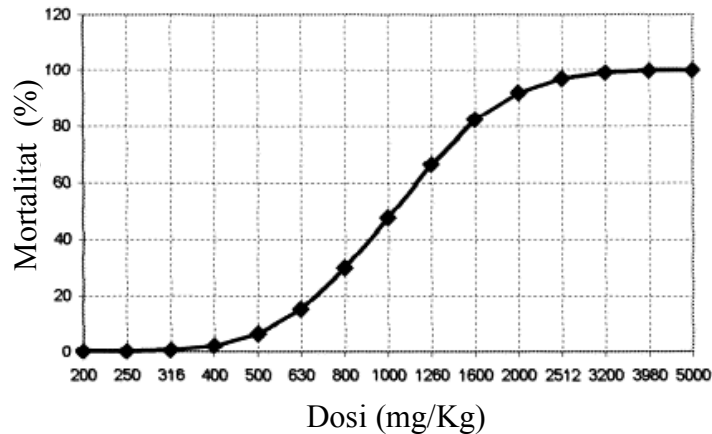


Figura 1.12 Corba de mortalitat de rates sotmeses a dosis creixents de F1,6BP, administrada per via intravenosa. (Adaptat de Nunes et al., 2003)

1.4.3 Propostes de mecanismes d'acció de la F1,6BP exògena.

1.4.3.1 Efecte directe de la F1,6BP: Incorporació com a metabòlit.

En el treball de Markov et al. (1980) amb gossos sotmesos a isquèmia cardíaca, s'observa que amb l'administració prèvia de F1,6BP es veu incrementat significativament el contingut cel·lular d'ATP, de CrP i d'àcid làctic a les cèl·lules del miocardi (Markov *et al.*, 1980a). A la publicació es proposa com a possible mecanisme d'acció l'entrada del sucre bifosforilat al través de la membrana plasmàtica i un cop a dins la cèl·lula reactivaria la glicòlisi anaeròbia saltant-se el pas de la PFK-1, inhibint durant la isquèmia (Figura 1.13). A més a més, això suposaria un estalvi energètic considerable ja que la molècula estaria bifosforilada estalviant-se l'ATP que requereix aquest procés.

El grup de Tavazzi et al. (1992) realitzen uns experiments en cors aïllats de rates perfosos amb F1,6BP marcada, $\{U-^{14}C\}$ -F1,6BP, on demostren que les cèl·lules capten el sucre bifosforilat al mesurar l'abundant producció de ^{14}C -lactat entre d'altres productes, prescindint d'altres fonts d'energia com la fructosa no fosforilada (Tavazzi *et al.*, 1992). No s'indica però, el mecanisme de transport del sucre bifosforilat al través de la membrana plasmàtica i la prevenció de la seva degradació a formes no fosforilades.

Un estudi realitzat amb vesícules de fosfatidilcolina d'ou demostra que la F1,6BP pot travessar, depenent de la concentració, aquestes vesícules. Hi ha múltiples causes que influeixen en la permeabilitat de les membranes, com la composició de la cadena d'àcids grassos, la temperatura, la presència de detergents o la força iònica. Els autors hipotetitzen que una concentració elevada d'una molècula carregada (de 5 a 50 mM), com és la F1,6BP, pot desestabilitzar la membrana i permetre el pas del sucre

bifosforilat intacte (Wang *et al.*, 1998). La F1,6BP és una molècula altament carregada a pH fisiològic que difícilment pot traspasar la membrana per difusió. En canvi, concentracions similars de fructosa, F6P o F1P no tenen el mateix patró de difusió.

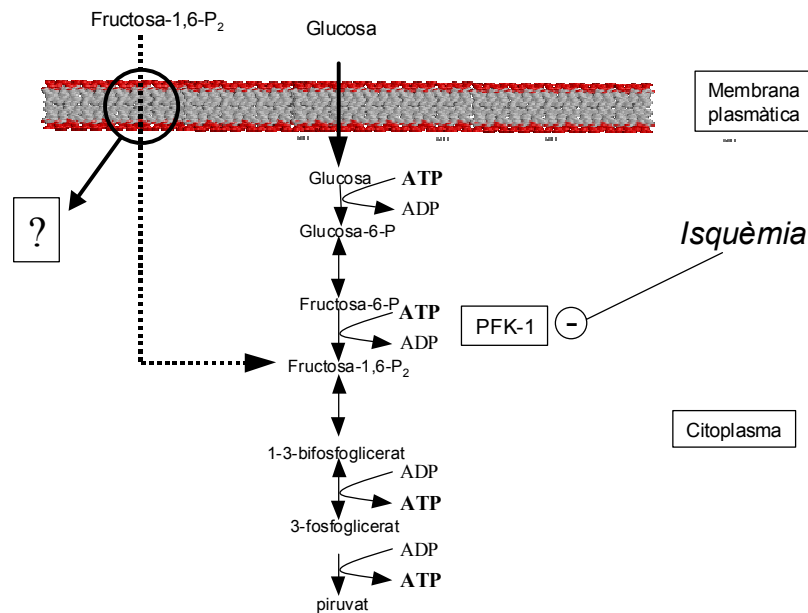


Figura 1.13 Esquema del possible punt d'incorporació de la F1,6BP a la glicòlisi cel·lular en la hipòtesi d'entrada com a metabòlit.

Per un altre costat, Hardin *et al.* (2001) hipotetitzen que la F1,6BP utilitza el transportador de dicarboxilats, o un d'anàleg, per entrar dins de cèl·lules de miocardi de rata. Realitzen els estudis amb F1,6BP amb ¹⁴C o ¹³C i també amb una molècula dicarboxilada, el fumarat, també marcat. Mitjançant un espectroscopi de ressonància magnètica nuclear analitzen l'entrada i metabolització dels productes. Conclouen que la F1,6BP entra a dins de la cèl·lula, que no es degrada a formes monofosforilades o a fructosa, i que dona lloc a lactat marcat (Hardin *et al.*, 2001). Si hi és present el fumarat, la F1,6BP entra en un percentatge inferior al 30%, segons les dosis de fumarat usades, degut a la competència pel transportador. Finalment descarten que el possible transportador de la F1,6BP sigui l'intercanviador d'anions de banda 3. Per comprovar-ho utilitzen un inhibidor d'aquest transportador, el 4,4'-dinitroestilben-2,2'-disulfonat (DNDS), sense que l'entrada de F1,6BP es vegi afectada, demostrant-se que per aquest transportador en concret no entra la F1,6BP.

1.4.3.2 Efecte de la F1,6BP sobre la membrana plasmàtica.

Hi ha controvèrsia alhora d'explicar el mecanisme d'acció pel qual actua la F1,6BP per produir els seus efectes. Sense descartar la seva incorporació com a metabòlit cel·lular, s'han observat diferents efectes de la F1,6BP que podrien explicar-se sota la base de la seva interacció amb la membrana plasmàtica.

Entre els autors que recolzen que la F1,6BP interacciona amb les membranes alhora de produir els seus efectes, destaquen els estudis de Rigobello i Galzigna (1982) on s'indica que la F1,6BP interactua amb les membranes d'eritròcits, induint canvis en la permeabilitat dels ions, incloent la captació de potassi i l'eliminació de protons (Rigobello *et al.*, 1982a). Altres estudis posteriors del mateix grup indiquen que l'efecte de la F1,6BP com a antihemolític i el fet que impedeixi l'entrada de calci al teixit miocàrdic de rata, és degut al seu efecte com a estabilitzador de membrana (Galzigna *et al.*, 1989). Aquest efecte produiria un senyal transmembrana que donaria lloc a un increment de la F1,6BP intracel·lular.

Altres autors també hipotetitzen que l'acció de la F1,6BP es deu a la seva interacció amb la membrana; proposen que la causa d'aquesta interacció podria donar-se pel fet que la F1,6BP pot competir amb els fosfolípids pels llocs d'interacció amb les proteïnes d'unió de les membranes i crear discontinuïtats polars, afectant-se la composició i permeabilitat de la membrana (Ehringer *et al.*, 2000), o bé inhibint alguns efectes de les catecolamines (Eddy *et al.*, 1981). En altres treballs s'associa l'efecte de la F1,6BP amb el fet que estabilitza la membrana, disminueix els nivells de calci hepàtic incrementats per l'acció de la GalN en rates (De Oliveira *et al.*, 1992) i evita l'entrada de calci al citosol en cèl·lules renals de hàmmster (Rizzoli *et al.*, 1990).

L'acció de la F1,6BP en els treballs del nostre grup s'associa principalment a l'efecte de membrana, en aquest cas en hepatòcits aïllats de rata. En presència de F1,6BP no s'observen els efectes que la GalN causa sobre la membrana plasmàtica, com és el pic exotèrmic cel·lular (Roig *et al.*, 1994), o les alteracions en la permeabilitat de la membrana al potassi (Roig *et al.*, 1997).

1.5 Hipòtesi de treball.

Per poder respondre la pregunta de com actua la F1,6BP alhora de prevenir els efectes de la GalN en el desenvolupament de l'hepatitis en model de rata i en el dany en els cultius d'hepatòcits, s'ha de tenir en compte tant l'efecte de la GalN com a

conseqüència del seu metabolisme específic a l'hepatòcit, com els efectes inespecífics de la GalN derivats de la seva interacció amb les membranes biològiques.

Existeixen importants diferències en el mecanisme d'acció de la F1,6BP, respecte el de la uridina, alhora de prevenir els efectes de la GalN. L'acció principal de la uridina sobre els hepatòcits tractats amb GalN, es deu a que evita els efectes derivats del metabolisme de la GalN, com la reducció en el contingut d'uridina cel·lular i la inhibició de la transcripció i la traducció (Keppler *et al.*, 1974);(Konishi *et al.*, 1974); la conseqüència és que els hepatòcits no estan sensibilitzats al TNF- α , fet que explica, en bona part, l'efecte protector de la uridina en l'hepatitis induïda per GalN. En canvi, en presència de F1,6BP no es redueixen els nivells de GalN-1-P, ni de les UDP-hexoses, augmentats pel metabolisme de la GalN, ni tampoc es recupera el contingut d'uridina (De Oliveira *et al.*, 1992). Aquests resultats posen en dubte que la F1,6BP pugui evitar la inhibició transcripcional i la sensibilització dels hepatòcits al TNF- α induïts per GalN. En canvi, com s'ha indicat anteriorment, diferents autors associen efectes observats en l'addició de F1,6BP, a la seva interacció amb la membrana plasmàtica. Així, amb l'addició de F1,6BP a suspensions d'hepatòcits incubades amb GalN, s'eviten els efectes immediats del sucre aminat, previs al seu metabolisme, que estan associats amb la seva interacció amb la membrana plasmàtica. En canvi, els efectes immediats causats per GalN no s'eviten en presència d'uridina (Roig *et al.*, 1994).

Els resultats dels estudis de l'efecte protector de la F1,6BP contra el dany produït per GalN sobre els hepatòcits, suggereixen una acció de la F1,6BP a nivell de la membrana cel·lular; efecte inespecífic, i per tant, independent del tipus cel·lular i de la seva capacitat d'internalitzar F1,6BP.

A partir d'aquestes consideracions fem la hipòtesi de treball de que l'efecte de la F1,6BP sobre les membranes modifica la resposta de les cèl·lules a diferents condicions d'estrés i constitueix un dels mecanismes de l'acció de la F1,6BP contra les lesions descrites.

2 OBJECTIUS.

Per validar la hipòtesi formulada en el model d'hepatitis experimental induïda per GalN en fetge de rata, ens proposem els següents objectius:

Generals

1-Determinar les dianes cel·lulars de la F1,6BP en la prevenció de l'hepatitis induïda per GalN en fetge de rata.

2- Estudiar els efectes de la F1,6BP sobre les membranes biològiques de les cèl·lules diana en la prevenció de la lesió induïda per GalN.

Específics

1- Aprofundir en el coneixement de l'efecte protector de la F1,6BP en la lesió induïda per GalN en model de rata, realitzant estudis de citotoxicitat i apoptosi en cultius primaris d'hepatòcits.

2- Determinar l'efecte de la F1,6BP sobre la sensibilització del fetge al TNF- α induïda per GalN.

3- Determinar l'efecte de la F1,6BP sobre la histaminèmia i l'endotoxèmia causades per GalN.

4- Determinar els mecanismes d'inhibició de la F1,6BP sobre macròfags activats per lipopolisacàrids.

3 MATERIALS I MÈTODES.

3.1 Reactius.

Els reactius i dissolvents emprats en la realització del present treball i que no apareixen a la Taula 3.1 s'han adquirit a empreses locals distribuïdores de productes químics. En tots els casos, el grau de qualitat dels esmentats productes és, com a mínim, analític. Tots els reactius s'han emprat sense cap tractament posterior. Per preparar totes les solucions aquoses s'ha emprat aigua bidestil·lada obtinguda amb un sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA).

3.2 Animals.

Per la realització dels experiments que apareixen en el present treball s'han emprat rates (*Rattus norvegicus*) mascle adultes de la soca Sprague-Dawley de pes comprès entre 200 i 350 g (en funció de l'experiment), comprades a Harlam i criades en gàbies de polipropilè, a l'estabulari del Campus de Ciències de la Salut de Bellvitge de la Universitat de Barcelona. Els animals han estat sotmesos a cicles de llum/foscors amb un període de 12 h, s'han alimentat amb pinso estàndard (A04, Panlab, Espanya) ad libitum i han tingut lliure accés a aigua potable de la xarxa pública. Els animals s'han manipulat d'acord amb les recomanacions del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona i la legislació establerta pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

L'administració de substàncies a les rates s'ha dut a terme en estat de consciència mitjançant xeringues estèrils d'un sol ús d'1 ml de capacitat equipades amb agulles hipodèrmiques de 25 G de diàmetre. Els volums totals administrats no han estat en cap cas superiors a 2 ml (Taula 3.2). Després de l'administració de les substàncies, els animals han estat sotmesos a dejú, però han tingut lliure accés a l'aigua, fins el seu posterior sacrifici, màxim 24 h més tard.

Taula 3.1. Reactius específics emprats en la realització del present treball.

Reactiu	Casa comercial
$^{86}\text{RbCl}$, solució a $1 \text{ mCi} \times \text{ml}^{-1}$ inicialment	Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, GB)
^3H -Uridina	Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, GB)
4-aminopiridina	Sigma (St. Louis, EUA)
ADP, sòdic	Sigma (St. Louis, EUA)
Albúmina sèrica bovina (BSA, <i>Bovine Serum Albumin</i>), fracció V	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Aldolasa	Roche (Indianapolis, EUA)
Amfotericina B (fungizona), solució a $250 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$, estèril	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
ATP, disòdic	Sigma (St. Louis, EUA)
Blau de tripà (0,4%)	Sigma (St. Louis, EUA)
Bradford, reactiu de	Bio-Rad (Munich, Alemanya)
Cànula de tipus Londwel de tefló (T-16G x 51 mm)	Selles (Barcelona, Espanya)
Caspasa-3 truncada (17 kDa), anticòs policlonal de conill.	Cell Signaling (Danvers, EUA)
Ciclosporina A	Calbiochem (La Jolla, EUA)
Clorhídric, àcid (HCl)	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Cloroform	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Col·lagen, tipus I, de cua de rata, solució concentrada, estèril	Upstate (Lake Placid, EUA)
Col·lagenasa	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
Component 48/80	Sigma (St. Louis, EUA)
Cristall violeta	Sigma (St. Louis, EUA)
Cromolin, sal sòdica	Sigma (St. Louis, EUA)
Crysolit A	Crison (Alella, Espanya)
<i>Cytotoxicity detection kit</i> , Kit detecció de citotoxicitat	Roche (Indianapolis, EUA)
Dexametasona, acetat	Sigma (St. Louis, EUA)

DIBAC ₄ (3) (<i>bis</i> -(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol)	Molecular probes (Oregon, EUA)
Digitonina	Sigma (St. Louis, EUA)
Ditiotreitol (DTT)	Sigma (St. Louis, EUA)
DMEM (<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i> , medi mínim essencial de Dulbecco), sense L-Glu, pólvores	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
DMSO (<i>Dimethyl Sulfoxide</i> , sulfòxid de dimetil), estèril	Sigma (St. Louis, EUA)
DTPA (<i>Diethylenetriaminepentaacetic Acid</i> , dietilentriaminopentaacètic, àcid)	Sigma (St. Louis, EUA)
E de Williams, medi	Bio science (Verviers, Bèlgica)
EDTA (etilendiaminotetraacètic, àcid), disòdic	Sigma (St. Louis, EUA)
EGTA (etilenglicol-bis(β-aminoetil èter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacètic, àcid)	Sigma (St. Louis, EUA)
Endotoxin standard	Sigma (St. Louis, EUA)
F12K, medi, pólvores	Sigma (St. Louis, EUA)
FBS (<i>Foetal Bovine Serum</i> , sèrum fetal boví), estèril	Gibco (Eggenstein, Alemanya)
Fosfoenolpiruvat de mono(ciclohexilamoni)	Sigma (St. Louis, EUA)
Fosfoenolpiruvat potàssic	Sigma (St. Louis, EUA)
Fosfotúngstic, àcid	Sigma (St. Louis, EUA)
Fructosa, D	Sigma (St. Louis, EUA)
Fructosa-1,6-bisfosfat (FBP), trisòdica	Serva (Heidelberg, Alemanya)
Fructosa-6-fosfat (F6P)	Roche (Indianapolis, EUA)
Gadulini, clorat, hexahidratat	Sigma (St. Louis, EUA)
Galactosamina, clorhidrat	Sigma (St. Louis, EUA)
GDH/Triosa fosfat isomerasa	Roche (Indianapolis, EUA)
Gentamicina	Sigma (St. Louis, EUA)
Glibenclamida	Sigma (St. Louis, EUA)
Glucosa	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Glucosa-6-fosfat (G6P)	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)

Glutamina, L (200mM)	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
H ₂ O lliure d'endotoxina	Sigma (St. Louis, EUA)
<i>Hank's balanced salt solution</i> , solució salina equilibrada de HanK	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Heparina (5%)	Laboratoris farmaceutics Rovi (Madrid, Espanya)
Hepes [<i>Àcid N-(2-hidroxiètil)-piperazina-N'-(2-etanosulfònic)</i>]	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
Hepes [<i>Àcid N-(2-hidroxiètil)-piperazina-N'-(2-etanosulfònic)</i>], solució 1 M, estèril	Sigma (St. Louis, EUA)
Hidròxid sòdic (NaOH)	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Histamina	Sigma (St. Louis, EUA)
Ketolar (1 ml × Kg-1 pes animal)	Merial
Lactat deshidrogenasa (LDH), de múscul de conill	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
Liberasa blendzyme 3	Roche (Indianapolis, EUA)
Lipopolisacàrid (LPS)	Sigma (St. Louis, EUA)
MEM (<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> , medi mínim essencial d'Eagle), amb sals d'Early, sense L-Glu, pòlvores	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Metanol, per HPLC	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Minoxidil	Sigma (St. Louis, EUA)
Minoxidil, sulfat	Sigma (St. Louis, EUA)
Molsidomina	Sigma (St. Louis, EUA)
NADH	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
NADP+	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
NADPH	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
<i>NF-κB p65 transcription factor detection kit</i> , kit de detecció del factor de transcripció de p65 de l'NFκB	Pierce (Rockford, EUA)
<i>o</i> -ftalaldehid (OPA, <i>o-phthalaldehyde</i>)	Sigma (St. Louis, EUA)
PDB (<i>Phorbol Dibutyrate</i> , dibutirat de forbol)	Sigma (St. Louis, EUA)

Penicil·lina (G) i estreptomicina (sulfat), solució 100 × en PBS, estèril	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Pepstatina A	Sigma (St. Louis, EUA)
Percoll	Sigma (St. Louis, EUA)
Peròxid d'hidrogen, solució al 35 % (vol/vol)	Merck (Darmstadt, Alemanya)
PicoGreen	Molecular Probes (EUA)
Pirofosfat sòdic (PPi)	Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya)
Piruvat cinasa (PK, <i>Pyruvate Kinase</i>), de múscul de conill	Sigma (St. Louis, EUA)
Piruvat sòdic (Pyr), solució a 100 mM, estèril	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Pirúvic (Pyr), àcid	Sigma (St. Louis, EUA)
PMSF (<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> , fluorur de fenilmetilsulfonil)	Sigma (St. Louis, EUA)
Quantikine rat TNF- α , kit	R&D Systems (Mineapolis, EUA)
Quinina, hidroclorete	Sigma (St. Louis, EUA)
Reactiu de fosfor	Sigma (St. Louis, EUA)
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Sacarosa	Merck (Darmstadt, Alemanya)
SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , dodecilsulfat sòdic)	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Sèrum de rata, lliure d'acida	Serotec (Oxford, GB)
Tetraetilamoni, clorhidrat	Sigma (St. Louis, EUA)
Tiobarbitúric (TBA), àcid	Sigma (St. Louis, EUA)
TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i> , factor de necrosi tumoral α), murí, recombinant	Sigma (St. Louis, EUA)
TPP (<i>Thiamine Pyrophosphate</i> , pirofosfat de tiamina)	Sigma (St. Louis, EUA)
Tricloroacètic (TCA), àcid	Sigma (St. Louis, EUA)
Tripsina (0,25 %) i EDTA (1 M), solució estèril	Biological Industries (Beth Haemek, Israel)
Tris [Tris(hidroximetil)aminometà], clorhidrat	Sigma (St. Louis, EUA)
Triton® X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol)	Sigma (St. Louis, EUA)

Tween® 20 (monolaurat de polioxietilensorbità)	Sigma (St. Louis, EUA)
Uridina	Sigma (St. Louis, EUA)
Xilagèsic (2%)	Laboratoris Calier (Barcelona, Espanya)

3.2.1 Material emprat.

- Ketamina (1 g × ml⁻¹).
- Material quirúrgic: pinces dentades, pinces planes, tisores mitjanes amb punta arrodonida i tisores petites.
- Cànula de tipus Londwel de tefló.
- Solució salina fisiològica (SF): NaCl al 0,9 % (p/vol). Esterilitzeu a l'autoclau i conserveu a temperatura ambient.
- Esparadrap.
- Xeringues d'insulina amb 50 µl d'heparina-liti al seu interior.
- Gases estèrils.

Taula 3.2 Substàncies administrades a les rates.

Substància	Concentració (mg × ml ⁻¹)	Dosi (mg × Kg pes animal ⁻¹)
Clorur de gadulini	50	20
Compost 48/80	0.5	1
Cromoglicat	25	50
Fructosa-1,6-bisfosfat	500	2000
D-galactosamina	200	400
Lipopolisacàrid	5	2-10
Minoxidil	0.5	1
Quinina	6.25	25
Silica	125	500
rm TNF-α	5×10 ⁻⁴	2×10 ⁻⁴

En tots els casos els compostos s'han dissolt en SF estèril a les concentracions indicades i s'han administrat per via intraperitoneal, a excepció del clorur de gadulini que

s'ha administrat per via intravenosa, en un volum de 100 µl (24 hores abans que els altres tractaments).

La quinina i el minoxidil s'han solubilitzat amb H₂SO₄ 0.1M, formant-se sulfat de quinina i de minoxidil (pH superior a 5.5).

3.3 Obtenció i processament de mostres de rata.

3.3.1 Obtenció de plasma de rata.

- Al final de cada tractament anestesieu les rates amb ketamina-xilacina.
- Mitjançant una laparotomia accediu a la cavitat peritoneal, on s'extrau sang de les venes cava inferior i porta-hepàtica i es recull en un vial de tipus *Eppendorf* estèril.
- Centrifugueu la sang a 800 x g durant 10 min.
- Reculliu el plasma, líquid transparent que es troba al sobrenedant, i es guarda a – 20°C.

3.3.2 Homogenat de fetge.

***Solucions.**

–Fosfat buffer.

2.98mM de K₂HPO₄.

47.02 mM de KH₂PO₄.

- Ajusteu el pH a 6.

***Protocol.**

- Talleu trossos de fetge (d'aproximadament 0.1 g), peseu-los i dipositeu-los en tubs.
- Afegiu 10 volums de fosfat buffer fred (50mM) i poseu els tubs en gel.
- Homogenitzeu el teixit mitjançant un Polytron PT 3000 homogeniser.
- Centrifugueu a 4000 x g a 4°C durant 15 min.
- Agafeu una alíquota per mesurar el contingut de proteïna.
- Recolliu els sobrenedants en vials de tipus *Eppendorf* estèrils i congeleu a –20°C.

3.3.3 Inclusió en parafina de fetge i obtenció de talls ultrafins.

***Solucions.**

–Tampó fosfat 0.1M (pH7.4).

–Solució A:

225mM de NaH₂PO₄.2 × H₂O.

–Solució B:

200mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \times \text{H}_2\text{O}$

200mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \times \text{H}_2\text{O}$.

- Per treballar amb un pH de 7.4 barregeu 19 ml de solució A + 81 ml de solució B.

- Diluiu la barreja 1:2 amb H_2O destil·lada.

–Paraformaldehid.

El Paraformaldehid es dissol a dins una campana, a una temperatura de entre 60 i 70°C, tapat amb paper d'alumini. Un cop dissolt (la solució és transparent), es filtra i es refreda amb gel. Finalment es guarda a la nevera.

*Protocol

–Perfusió de l'animal.

- Mitjançant una laparotomia accediu a la cavitat peritoneal.

- Clampeu la vena cava inferior i la superior.

- Canuleu la vena porta-hepàtica.

- Talleu l'arteria i la vena pulmonar (es troben després del cor).

- Perfundi el fetge amb 500 ml de SF amb 0.05% d'heparina.

- Perfundi amb 400 ml de tampó fosfat 0.1M (pH 7.4) amb un 4% de paraformaldehid, per fixar el teixit. (Cal ús de mascareta i campana).

- Extraieu el fetge i guardeu-lo en líquid fixador a la nevera (temps màxim 24 h.)

–Deshidratació.

- Esbandiu el teixit 3 vegades amb H_2O destil·lada.

- Poseu trossos de fetge dins d'uns cassets de plàstic.

- Submergiu-lo en alcohol de 70°C un mínim de 2 hores i un màxim de 3 dies.

- Submergiu-lo en els següents alcohols:

Alcohol 96° I durant 1 hora.

Alcohol 96° II durant 1 hora.

Alcohol 100° I durant 45 min.

Alcohol 100° II durant 45 min.

Alcohol 100° III durant 45 min.

Xilol I durant 30 min.

Xilol II durant 30 min.

Xilol III durant 30 min.

- Finalment deixeu-lo tota la nit en parafina I a 58°C.

- Inclusió en parafina.
- Submergiu en parafina II durant 2 hores 30 min.
- Submergiu en parafina III durant 2 hores 30 min.
- Poseu parafina líquida amb un dispensador en uns motllos metàl·lics a sobre d'una placa calenta.
- Col·loqueu la mostra i la base del cassete i torneu a afegir parafina.
- Deixeu refredar a temperatura ambient i acabeu d'omplir amb parafina abans que solidifiqui.
- Un cop sòlida es guarda a la nevera (es pot treure el motllo metàl·lic).
- Muntatge dels talls en portaobjectes.
- Poseu els blocs en una placa freda.
- Feu talls de 3 μM de gruix amb un micròtom.
- Poseu els talls en H_2O calenta amb gelatina, vigilant que quedin ben extesos.
- Col·loqueu els talls sobre portaobjectes amb polyilisina al 50%.
- Els talls poden guardar-se en caixes a temperatura ambient.

3.3.4 Marcatge dels talls ultrafins de fetge.

3.3.4.1 Tinció d'Hematoxilina-eosina.

- Desparafinar.
- Feu tots els passos següents (5 min. a cada pas).
 - Xilol I,II,III i IV.
 - Alcohol 100% I, II i III.
 - Alcohol 96% I, II i III.
 - Alcohol 70% I.
 - H_2O destil·lada.
- Tinció.
 - 5 min. en hematoxilina.
 - Renteu amb H_2O de l'aixeta.
 - Feu dos immersions en alcohol clorhídric (1% d'àcid clorhídric en alcohol absolut).
 - Renteu amb H_2O de l'aixeta.
 - Feu dos immersions en H_2O amoniacal (H_2O de l'aixeta amb unes gotes d' NH_3).
 - Feu dos immersions en H_2O de l'aixeta.
 - Feu nou immersions en eosina.

- Feu nou immersions en alcohol 96% (3 cops).
- Feu nou immersions en alcohol 100% (3 cops).
- Feu nou immersions en xilol (3 cops).
- Feu el muntatge amb una gota de DPX i col·loqueu el cubreobjectes vigilant de que no es formin bombolles.

3.3.4.2 Detecció histoquímica de la fragmentació del DNA.

La fragmentació del DNA s'estudia utilitzant el mètode de TUNNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling method*), amb el TdT-FragEL DNA Fragmentation Kit (Oncogene Research Products, Cambridge, MA). (Fawthrop *et al.*, 1991);(Wyllie, 1980)

***Protocol**

- Desparafineu els talls de fetge .
- Rehidrateu els talls amb una gradació d'alcohol fins a rentar amb H₂O desionitzada.
- Afegiu proteasa K (20 µl/ml en PBS) per disminuir la contaminació del fons.
- Incubeu els talls amb l'enzim terminal deoxiribonucleotidil transferasa (TdT) a 37°C durant 2 hores.
- L'enzim TdT s'uneix a extrems 3'-OH lliures de fragments de DNA generats en resposta a la mort cel·lular i a més catalitza l'addició de deoxinucleotids marcats i no marcats amb biotina.
- Els nucleotids biotinilats són detectats amb un conjugat de peroxidasa d'streptovidina de rave.
- La diaminobenzidina reacciona amb les mostres unides generant un substrat colorejat insoluble al lloc de la fragmentació del DNA.
- La coloració verda indica fragmentació del DNA cel·lular.

3.3.4.3 Detecció de la forma activa de la caspasa 3.

- Desparafinar.
- Desparafineu els talls de fetge .
- Rehidrateu els talls amb una gradació d'alcohol fins a rentar amb H₂O destil·lada.
- Renteu amb PBS durant 5 min.
- Bloquejeu les peroxidases del teixit:
Cubeta amb: 140 ml PBS + 60 ml metanol + 2 ml H₂O₂ al 30 % 15 min. a les fosques.

- Renteu amb PBS durant 5 minuts.
- Desemascarar l'antigen.
- Submergiu les mostres amb tampó citrat (diluït 1/10 amb H₂O destil·lada).
- Bulliu les mostres 1 min. amb el microones.
- Deixeu les mostres 2 min. atemperant-se.
- Repetiu els dos passos anteriors dos cops.
- Deixeu les mostres 25 min. a temperatura ambient.
- Monteu els portaobjectes en càmares.
- Renteu 2 cops amb PBS durant 5 min.
- Renteu 2 cops amb PBS-tritó 0.2% durant 5 min. (eviteu de fer bombolles).
- Afegiu 30 µl per tall d'una solució de PBS-tritó 0.2 %-gelatina 0.2 % més sèrum de cavall normal (NHS, *Normal horse serum*) 0.2 %.
- Deixeu els talls 2 hores a la càmera humida i a temperatura ambient.
- Afegiu 30 µl per tall de la mateixa sol·lució més 1% de sèrum fetal de cavall (FHS, *Foetal horse serum*), més l'anticòs policlonal de conill de la caspasa-3 truncada. (17KDa) en una dilució 1:100 (Ferrer *et al.*, 2001).
- Incubeu 30 min. a temperatura ambient.
- Renteu 2 cops amb PBS-tritó 0.2 % durant 5 min.
- Renteu 2 cops amb PBS durant 5 min.
- Afegiu l'anticòs secundari (*Biotinylated link universal*) (2 gotes per tall).
- Incubeu durant 15 min. a temperatura ambient.
- Renteu amb PBS durant 5 min. (3 cops).
- Afegiu streptavidin-HRP. (2 gotes per tall).
- Incubeu 15 min. a temperatura ambient.
- Renteu amb PBS durant 5 min. (3 cops).
- Poseu els portaobjectes amb els talls en una cubeta amb PBS.
- Revelat.
- Prepareu 200 µl de PBS més una punta de pipeta de vidre amb diaminobencidina en pols.
- El diaminobencidina és molt tòxic per inhalació i en contacte amb la pell, per tant s'ha de treballar amb guants i a la cabina.
- Filtreu la solució amb paper de filtre i afegiu peròxid d'hidrògen al 30 %.
- Incubeu els portaobjectes amb la solució fins que els teixits es vegin marrons.

- Renteu els teixits amb H₂O de l'aixeta dins la cubeta durant 5 min.
- Deshidrateu els teixits amb:
 - H₂O destil·lada.
 - Alcohol 95%.
 - Alcohol 100%.
- 3 immersions (de 30 segons) H₂O destil·lada.
- 3 immersions alcohol 95%.
- 3 immersions alcohol 100%.
- 3 immersions en xilol.
- Monteu amb DPX i al damunt poseu un cubreobjectes.

Les cèl·lules caspasa-3 truncada positives, indicatives de mort per apoptosi, es veuen de color marró, destacant del fons blanc.

3.4 Determinació de diferents activitats i substàncies.

3.4.1 Determinació d'activitats transaminasa en plasma.

Els nivells plasmàtics d'activitats ALT i AST han estat assajats espectrofotomètricament (a 340 nm) amb un kit comercial (Roche, Basel, Switzerland)

3.4.2 Determinació d'histamina.

***Referència.**

Mètode descrit en el Laboratory Fluorometer I.N.E.P.A.C.A. Recommended method for histamine (Yusem *et al.*, 1969).

***Reactius.**

1.0 N d'NaOH.

Histamina dihidroclorada.

0.1 N d'HCl

Metanol per anàlisi.

0.1% o-Phtalaldehyde (10 mg en 10 ml de Metanol, refrigerat i protegit de la llum. Es prepara setmanalment).

3.57 N d'àcid fosfòric.

***Standard d'histamina (Taula 3.3)**

-10 mg d'histamina en 50 ml d'HCl. 200 µg / mL (solució mare)

-75 µL solució mare + 15 ml d'HCl. 1 µg / mL. (solució treball)

Taula 3.3 Standard d'histamina.

Concentració (ng / ml)	Solució treball (μ l)	HCl 0.1 N (μ l)
300	300	700
200	200	800
100	100	900
75	75	925
50	50	950
25	25	975
12.5	12.5	987.5
0	0	1000

-Blanc: 250 μ l de plasmes i no afegiu o-Phtalaldehyde sinó 50 μ l de metanol (es restarà a tots els valors).

***Protocol.**

- Pipetegeu en cubetes de fluorímetre 250 μ l de cada punt de la patró o mostra.
- Afegiu 500 μ L de 0.1N HCl.
- Afegiu 150 μ L d'1N NaOH. Barregeu donant ditades.
- Afegiu 50 μ L d'OPT, dintre dels 5 min. següents, i torneu a barrejar.
- Incubeu durant 4 min.
- Afegiu 150 μ l de 3.57 N H₃PO₄
- Incubeu entre 15 i 20 min.
- Llegiu al fluorímetre. Excitació:360 Emissió: 445. (Programa Labquant).

3.4.3 Mesura d'endotoxina.

L'endotoxina es mesura a partir del plasma sanguini amb el kit cromogènic d'endotoxines de punt final de diozo-acoblament (Pyrochrome; Cape Cod, Falmouth, MA, USA).(Bates *et al.*, 1998);(Novitsky *et al.*, 1985).

Tot el material ha de ser apirògen.

- Escalfeu els plasmes als *ependorfs* a 80 °C durant 30 min. per eliminar proteïnes que poden interferir (inhibir) el resultat del test.

3.4.4 Mesura de TNF- α .

El TNF- α es mesura a partir de plasma, homogenat de fetge i sobrenedant cel·lular amb l'ELISA kit Quantikine rat TNF- α . (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA).

3.4.5 Determinació de F1,6BP.

La F1,6BP és una substància relativament làbil que pot hidratar-se, donant lloc a la hidrolització dels seus grups fosfats; per això s'ha de conservar a 4°C i en dessecació. Per aquest motiu hem utilitzat diferents sistemes per poder testar periòdicament la puresa de la F1,6BP. Per comprovar la puresa de la F1,6BP, comparem la concentració teòrica que indica el pot original amb la calculada amb l'espectrofotòmetre.

*Substàncies emprades per la reacció:

50 mM de tris/acetat.

2 mM d'acetat magnèsic.

0.15 mM d'EDTA (pH 7.8).

0.2 mM de NADH (el NADH s'ha d'afegir el mateix dia de l'assaig).

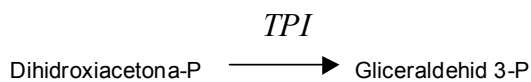
- El volum final del tampó és de 75 ml.

*Fonament del sistema:

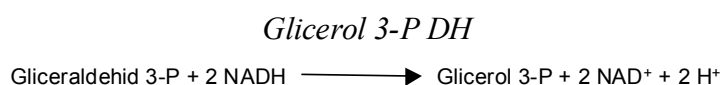
A)



B)



C)



***Enzims auxiliars:**

1.7 U × ml⁻¹ de glicerol 3P deshidrogenasa.

5 U × ml⁻¹ de trioses fosfat isomerasa.

1U × ml⁻¹ Aldolasa.

***Standard:**

0.2 mM de solució de F1,6BP.

- Adicioneu 0/10/20/30/40/50/60 µl en un total de 1000 µl.

***Protocol:**

- Addicioneu tots els reactius, inclosos els enzims, a excepció de la mostra o l'standard.

- Mesureu l'absorvència del NADH, a 340 nm, mitjançant l'espectrofotòmetre. (el resultat ha de donar aproximadament 1).

- Addicioneu la mostra o l'standard i feu la mesura a 340 nm, a temps final.

***Càlculs:**

$$\Delta A = a \times b \times \Delta[\text{NADH}]$$

a (coeficient d'extinció NADH=6290 M⁻¹)

b (pas òptic=1)

La desaparició del NADH ens indicarà la concentració de F1,6BP de la mostra.

$$[\text{F1,6BP}] = \Delta[\text{NADH}] / 2$$

3.4.6 Determinació de fosfats a partir de la F1,6BP hidrolitzada.

- Standard de fosfats a partir d'NaH₂PO₄ × 2H₂O.

- Feu la mesura de fosfats a partir d'aliquotes de FBP de concentració coneguda amb el test de fosfor inorgànic (Sigma (St. Louis, EUA)).

- Per cada mol de FBP podem trobar 2 mols de fosfat producte de la hidròlisi.

3.4.7 Contingut de proteïna.

El contingut de proteïna dels extractes cel·lulars i dels homogenats de fetge s'ha determinat en tots els casos mitjançant l'assaig Bio-Rad. La proteïna total de les cèl·lules cultivades en plaques s'extrau amb una solució de NaOH 0,1 M. La proteïna que s'ha emprat per preparar els estàndards ha estat en tots els casos l'albumina sèrica bovina.

*Protocol:

–Patrò:

A partir d'una solució de 0.1 mg/ml de BSA adicioneu els següents volums, segons la taula 3.4.

Taula 3.4 Standard de BSA.

Concentració ($\mu\text{g/ml}$)	μl BSA 0.1 mg/ml	μl H ₂ O	μl reactiu BIO RAD
0	0	800	200
1	10	790	200
2.5	25	775	200
5	50	750	200
10	100	700	200
15	150	650	200
20	200	600	200

–Mostres i blanc:

- Transferiu 800- x μl d'aigua bidestil·lada a les cubetes, essent x el volum de la mostra (generalment entre 2 i 20 μl).
- Addicioneu x μl d'extracte cel·lular de la mostra i pel blanc x μl del dissolvent que s'ha emprat per a l'obtenció de l'extracte.
- Addicioneu 200 μl de reactiu de Bradford.

–Mesura:

- Tapeu les cubetes amb *parafilm*, invertiu-les suaument tres vegades i col·loqueu-les a la cel·la de mesura de l'espectrofotòmetre.
- Mesureu l'absorbància del blanc, els patrons i la mostra a una longitud d'ona de 595 nm.

3.5 Cultius cel·lulars.

En aquest treball s'han cultius primaris d'hepatòcits, de cèl·lules de kupffer i de macròfags peritoneals de fetge de rata.

3.5.1 Medis de cultiu.

Les cèl·lules que s'han emprat per la realització del present treball s'han cultivat en els medis que se citen a continuació, convenientment suplementats amb sèrum, antifúngic i antibiòtics antimicrobians.

–MEM: el medi d'Eagle essencial mínim (MEM, *Minimum Essential Medium Eagle*), creat per Harry Eagle, és una modificació del medi basal d'Eagle (BME, *Basal Medium Eagle*) que inclou elevades concentracions d'aminoàcids, essent un medi més semblant a la composició proteica dels cultius de cèl·lules de mamífer i està suplementat amb sals d'Early (*Earle's salts*). La concentració de glucosa que hem utilitzat als experiments és d' $1 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ (Eagle, 1955);(Eagle *et al.*, 1956).

–DMEM: el medi d'Eagle modificat per Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) és una modificació del BME que conté una concentració d'aminoàcids i vitamines quatre vegades superior, que es va emprar per primer cop per cultivar cèl·lules embrionàries de ratolí. La concentració de glucosa a la formulació original és $1 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$, però al llarg del temps s'ha anat modificant per suportar cultius primaris de cèl·lules de ratolí i pollastre i una gran varietat de línies cel·lulars normals i transformades. En aquest treball s'ha emprat DMEM alt en glucosa ($4,5 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$). (Dulbecco *et al.*, 1959);(Eagle, 1959).

–Medi E de Williams: Williams i Gunn van desenvolupar aquest medi ric en nutrients a principis de la dècada de 1970 per suportar el creixement de cèl·lules epitelials de fetge de rata adulta a llarg terme. (Williams *et al.*, 1974).

–Medi RPMI 1640: Moore et al. (1967) van desenvolupar aquest medi a l'Institut Memorial Parc Roswell (RPMI, Roswell Park Memorial Institute), d'on surt l'acrònim RPMI. La formulació està basada en el RPMI-1630, utilitzant un sistema tamponador amb bicarbonat i amb alteracions en la composició d'aminoàcids i vitamines. El medi RPMI-1640 s'ha demostrat que pot utilitzar-se pel creixement de molts tipus de cultius cel·lulars, incloent limfòcits humans. La concentració de glucosa que hem utilitzat als experiments és de $2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ (Moore *et al.*, 1967);(Moore *et al.*, 1968).

3.5.2 Cultius primaris de rata.

3.5.2.1 Preparació material i solucions específiques dels cultius primaris.

- Preparació de plaques de cultiu cobertes amb gel de col·lagen.

*Material.

Plaques de cultiu de tipus convencional.

Solució d'àcid acètic 0,1 N, estèril.

Solució concentrada comercial de col·lagen de cua de rata.

*Protocol (procediment estèril, en cabina de flux laminar).

- Prepareu una solució de col·lagen a $50 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ en solució d'àcid acètic. Aquesta solució no es conserva.
- Addicioneu 100 μl de la solució anterior per cada cm^2 de superfície de la placa de cultiu. La concentració superficial de col·lagen és de $5 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$.
- Deixeu les plaques obertes dins la cabina de flux laminar fins que s'evapori l'àcid acètic. El més aconsellable és realitzar el procediment a última hora de la tarda i deixar les plaques tota la nit a la cabina, però sense llum UV, perquè degrada el col·lagen.
- Un cop seques, emboliqueu les plaques revestides amb col·lagen amb paper d'alumini i conserveu-les a temperatura ambient. S'utilitzen sense cap tractament posterior.

- Solucions emprades pels aïllaments.

*Solució de pre-perfusió (per 0.5 l).

4.75 g Hank's BSS.

0.175 g NaHCO_3 .

1.19 g Hepes.

0.095 g EGTA.

- Ajusteu el pH amb NaOH fins a 7 i filtreu la solució (al filtrar el pH puja 0.2, arribant-se a un pH 7.2).

*Solució de perfusió (per 0.5 l).

4.75 g Hank's BSS.

0.175 g NaHCO_3 .

1.19 g Hepes.

0.27 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

- Ajusteu el pH amb NaOH fins a 7.3 i filtreu la solució (al filtrar el pH puja 0.2, arribant-se a un pH 7.5).

*MEM (per 0.5 l).

1 paquet de MEM.

2.2 g NaHCO_3 .

- Ajusteu el pH amb NaOH fins a 7 i filtreu la solució (al filtrar el pH puja 0.2, arribant-se a un pH 7.2).

*Trypan blue

0.015g/ml en PBS.

• Obtenció de gradients de percoll (del 25 i 60%).

*Preparació gradients de percoll.

SIP: 18ml percoll + 2ml solució 1.5 M NaCl.

Percoll 60%: 6 mL SIP + 4 mL solució 0.15 M NaCl.

Percoll 25%: 2.5 mL SIP + 7.5 mL solució 0.15 M NaCl.

- El SIP pot preparar-se uns dies abans.

- Prepareu els percolls el mateix dia que es aneu a utilitzar.

3.5.2.2 Cultiu primari d'hepatòcits de rata.

*Referència.

Els hepatòcits es varen aïllar seguint el mètode inicialment descrit per Berry i Friend (1969) (Berry *et al.*, 1969), posteriorment per Seglen (1973) (Seglen, 1973) i per Bartrons *et al.* (1983) (Bartrons *et al.*, 1983).

*Fonament.

El mètode consisteix bàsicament en la perfusió recirculant d'una solució de liberassa pel fetge.

*Aparells de perfusió.

Els líquids de perfusió es mantenen a l'interior d'un *erlenmeyer* o reservori, el qual es troba submergit a l'interior d'un bany calefactor. La temperatura del bany ha de ser tal que el medi de perfusió a l'entrada del fetge tingui una temperatura d'entre 36-37 °C. En el nostre sistema experimental això s'assoleix amb 41-42 °C. El medi de

perfusió es bombeja mitjançant una bomba peristàltica a una velocitat de 40-45 ml/min cap a un serpentí termostatitzador situat a l'interior del bany. A continuació el medi es fa circular cap a l'interior del fetge pel través de la cànula d'entrada que es situarà a la vena porta-hepàtica. La cànula de sortida del fetge recircula el medi de perfusió desde la vena cava superior cap al reservori. D'aquesta forma s'estableix un circuit tancat.

***Protocol.**

- Recirculeu el medi de preperfusió al través del circuit (uns 200 ml).
- Comproveu que el medi que surt per la cànula que entrarà al fetge estigui a 36-37 °C i que el fluxe sigui el correcte.
- Descongeleu la liberassa i manteniu en fred el MEM i el DMEM suplementat amb un 20 % de FCS.
- Anestesieu la rata mitjançant injecció intraperitoneal de ketolar a dosi de 60 mg/kg de pes corporal.
- Poseu l'animal sobre un suport metal·lic i lligueu-lo de les potes amb esparadrap.
- Un cop anestesiada, heparinitzen-la amb 0.2 ml de solució d'heparina al 5% per via intravenosa a través de la vena del penis.
- Practiqueu una laparotomia, desinfectant la zona afegint solució iodada.
- Passeu un fil de seda per sota de la vena porta-hepàtica i deixeu-lo preparat per fer un nus.
- Passeu un segon fil per la vena cava inferior (per sota dels ronyons) i deixeu-lo preparat per fer un nus.
- Canuleu la vena porta-hepàtica amb una cànula de tipus Londwel de tefló i tanqueu el nus amb força, fent-lo doble.
- Comenceu la circulació del medi de preperfusió.
- Tanqueu el segon fil i talleu la vena cava inferior per sota del nus; així s'evita que el líquid de preperfusió es barregi amb la sang sistèmica i es dirigeix cap al cor a través de la vena cava superior.
- Obriu la caixa toràctica i canuleu la vena cava superior a través d'una incisió feta a l'aurícula dreta. Fixeu la cànula fent un nus amb fil de seda.
- Llenceu el líquid que surt per la cànula de sortida, sense recircular-ho, fins que aparegui clar i canvieu el medi de preperfusió per un flascò amb el medi de perfusió (150 ml amb liberassa, estem addicionant 1 ml d'una solució 3.5 mg/ml).
- Recirculeu el líquid sortint, tancant el circuit en el reservori de líquid de perfusió, que tenim a dins del bany, Així fem recircular el medi de perfusió.

- Manteniu hidratat el fetge afegint líquid de perfusió amb una xeringa.
- El temps de perfusió està en funció de l'activitat de l'enzim i de l'aspecte del fetge. En general podem dir que aturem la perfusió aproximadament als 12 minuts, quan el fetge té un aspecte distès i grogenc, i quan les puntes dels lòbuls agafen una forma arrodonida. És també un bon indicador el fet que una petita pressió esquinci la superfície del fetge.
- Acabada la perfusió, extraieu el fetge curosament i col·loqueu-lo sobre un troç de parafilm; separeu la càpsula de Bouman.
- Prepareu una doble gassa, poseu-la a sobre d'un embut i aquest a dins d'un falcon estèril de 50 ml.
- Dipositeu a la gassa el fetge i pipetegeu MEM fred a sobre, repartint-lo en quatre falcons fins que es disgregui totalment.
- Centrifugueu la suspensió resultant a 50 g/4°C durant 2 minuts.
- Descarteu el sobrenadant (altres cèl·lules del fetge que no són els hepatòcits) i resuspeneu el pellet amb MEM i torneu a centrifugar. (Aquest darrer pas el repetiu dos cops més).
- Resuspeneu el pellet amb DMEM suplementat amb un 20% de FCS (aproximadament 30 ml), d'aquesta forma obteniu una concentració final de cèl·lules d'entre 2 i 4 10^6 cèl·lules/ml.
- Estimeu la viabilitat de les suspensions amb la tècnica d'exclusió del blau de tripanà.
- Desprecieu suspensions cel·lulars amb una viabilitat inferior al 85-90%.
- Planteu les cèl·lules en plats col·lagenats amb medi William's E suplementat i amb un 5% FCS.
- A les 3 hores aspireu el medi i afegiu medi William's E suplementat sense serum (es fa per evitar la diferenciació dels hepatòcits).

3.5.2.3 Cultius primaris de cèl·lules de Kupffer de rata.

***Referència.**

El protocol de disgregació del fetge és el mateix que en el cas del cultiu d'hepatòcits; a partir d'aquí s'obtenen les KC mitjançant centrifugació amb gradients de percoll (Hoebe *et al.*, 2001);(Smedsrod *et al.*, 1985b);(Smedsrod *et al.*, 1985a).

***Protocol.**

- Repartiu en sis falcons de 50 ml el resultat de la disgregació i diluiu amb medi MEM (20 ml/falcon).

- Centrifugueu durant 5 min. a 50 x g (totes les centrifugades a 4°C). Baixen els hepatòcits.
- Per decantació recupereu els sobrenedants; agrupeu-los en 4 falcons.
- Centrifugueu 5 min. a 50 x g.
- Recupereu els sobrenedants i centrifugueu-los durant 10 min. a 200 x g.
- Elimineu els sobrenedants i resuspeneu el pellet amb 20 ml/falcon de PBS.
- Torneu a centrifugar 10 min. a 200 x g.
- Elimineu els sobrenedants i resuspeneu de nou el pellet amb 20 ml/falcon de PBS i concentreu-lo tot en dos falcons.
- Centrifugueu 10 min. a 200 x g.
- Elimineu els sobrenedants i resuspeneu els pellets amb 6 ml de PBS en 1 sol falcon de 50 ml.
- Afegiu les següents solucions, a dos falcons de 15 ml, a poc a poc i lliscant per la paret:
 - 4 ml de la solució 60% de percoll.
 - 4 ml de la solució 25% de percoll.
 - 3 ml de suspensió cel.lular.
- Centrifugueu durant 15 min. a 400 x g amb la centrífuga sense fre:
 - Al nivell de 8 ml trobeu cèl.lules no determinades.
 - Al nivell dels 4 ml trobeu KC i endotelials en proporció del 50%. (en un anell)
 - Al pellet trobeu eritròcits.
- Retireu les cèl.lules del nivell de 4 ml amb una pipeta pasteur de vidre.
- Posseu les cèl.lules en un falcon de 15 ml i resuspeneu-les amb 12 ml de PBS.
- Centrifugueu 10 min. a 200 x g.
- Torneu a resuspendre el pellet amb 12 ml de PBS.
- Centrifugueu 10 min. a 200 x g.
- Planteu les cèl.lules durant 1 hora en pous de 24 (6 a 12 pous segons la concentració cel.lular) amb medi RPMI 1640 suplementat sense sèrum.
- Retireu el medi; s'eliminem les cèl.lules endotelials, ja que no s'adhereixen a la placa.
- Feu 3 rentats forts amb PBS.
- Afegiu medi RPMI 1640 suplementat i amb 10% FCS.
- En els experiments s'ha utilitzat medi RPMI 1640 suplementat i amb 10% de serum de rata.

3.5.2.4 Cultiu primari de macròfags peritoneals de rata.

***Referència.**

Els macròfags s'han aïllat seguint el mètode descrit per Kasravi et al. (1996), (Kasravi *et al.*, 1996a).

***Protocol.**

- Anestesieu l'animal amb injecció de ketamina-xilacina intramuscular.
- Injecteu intraperitonealment 15 ml d'RPMI 1640 suplementat amb una xeringa de 20 ml.
- Sense extreure l'agulla feu un massatge abdominal de 3 min. per desenganxar els macròfags del peritoneu.
- Canvieu la xeringa (sense treure l'agulla), per una d'1 ml i extragueu l'exudat peritoneal.
- Distribuiu l'exudat en falcons de 15 ml (1ml per falcon).
- Afegiu 5 ml de PBS (estèril i filtrat), a cada falcon.
- Centrifugueu 15 min. a 500 x g.
- Elimineu els sobrenedants.
- Resuspeneu amb 6 ml de PBS/falcon.
- Torneu a centrifugar 15 min. a 500 x g.
- Resuspeneu el pellet amb 1 ml d'RPMI 1640 suplementat i amb 10% FCS per cada falcon.
- En els experiments que necessiteu els macròfags en suspensió, per evitar que s'adhereixin al substrat, incubeu-los en falcons de 15 ml, mig oberts per assegurar l'intercanvi gasos, en un bany a 37 °C.

3.5.3 Determinacions realitzades sobre els cultius primaris.

3.5.3.1 Incorporació d'uridina tritiada en hepatòcits.

- A partir d'un aïllament d'hepatòcits planteu les cèl·lules en plaques de 6 cm sense col·lagenar (amb 4 ml de medi William's amb FCS).
- A les 3 hores canvieu-lis el medi (amb retirada de FCS).
- Incubeu els hepatòcits (entre 2 i 4×10^6 cèl·lules/placa) 24 hores a 37 i el 5% de CO₂.
- Retireu el medi i afegiu 2 ml de medi nou amb els diferents tractaments i la 5,6-³H uridina (Stock Uridina tritiada: 1mCi/ml; dosi: 5μCi/ml).

- Incubeu durant 30 min.
- A partir d'aquest punt utilitzeu safates amb gel per col·locar les plaques.
- Afegiu per cada placa de 6 cm, 0.5 ml de solució d'UltraspecTM RNA (Chomczynski *et al.*, 1987).
- Utilitzeu un *scraper* per lisar les cèl·lules.
- Introduïu el contingut en un *eppendorf*.
- Poseu les mostres 5 minuts en gel.
- Afegiu 200 µl de cloroform per *eppendorf* i feu *vortex*.
- 5 minuts més en gel.
- Centrifugeu 15 minuts a 15700 x g a 4°C.
- Podeu observar:
 - a la part superior una fase aquosa on es troba l'RNA total.
 - a la part intermitja una fase on es troba la proteïna.
 - a la part inferior una fase on es troba el DNA.
- Recupereu tot el contingut d'RNA amb una pipeta *Pasteur*.
- Introduïu en un *eppendorf* el mateix volum d'RNA que d'isopropanol.
- Feu una inversió.
- Introduïu els *eppendorfs* en el congelador, a -20°C, durant 30 minuts.
- Centrifugeu 10 min. a 15700 x g a 4°C..
- L'RNA es troba al pellet.
- Feu 2 rentats amb alcohol 70 % (500 µl/rentat, amb centrifugades de 5 min. a 5400 x g a 4°C).
- Ressuspeneu amb 500 µl de PBS.
- Fiqueu el contingut en un vial de centelleig (amb 10 ml líquid de centelleig) i conteu els comptes per minut (c.p.m.) amb el comptador B.

3.5.3.2 Contingut de DNA en nuclis hepatòcits per citometria de fluxe.

*Citometria de fluxe.

Totes les mesures de citometria de flux destinades a la realització del present treball s'han dut a terme en un citòmetre FACSCalibur[®] controlat pel programari CellQuest[®] equipat amb un làser d'argó amb una longitud d'ona de 488 nm (Becton Dickinson, EUA) i s'han analitzat amb els programaris MODFIT[®] o Paint-a-gate[®] (Becton Dickinson, EUA). En tots els casos s'han analitzat almenys 10.000 cèl·lules.

El grau d'inducció d'apoptosi es relaciona amb el contingut de DNA de cada nucli, de manera que els nuclis amb un contingut de DNA menor al control es consideren apoptòtics (Cain *et al.*, 1996). El contingut de DNA es mesura mitjançant la tinció amb iodur de propidi, un fluoròfor que s'uneix al DNA bicatenari intercalant-se entre les bases. L'anàlisi citomètrica de nuclis cel·lulars requereix una concentració bastant elevada, la qual cosa exigeix un cultiu cel·lular a densitat alta o inclús molt alta (entre 10^5 i 2×10^5 cèl·lules \times cm⁻²). Cal tenir en compte, però, que a aquestes densitats cel·lulars la possible apoptosi espontània, o, en general, la mort cel·lular espontània no són menyspreables. Per altra banda, la major part dels hepatòcits tenen un o dos nuclis, els quals poden ser diploides o tetraploides, la qual cosa origina dues poblacions a l'anàlisi citomètrica.

***Material.**

PBS estèril fred.

Solució d'àcid cítric a l'1 % (p/vol). Conserveu-la a 4 °C.

Solució d'àcid cítric a l'1 % (p/vol) i Tween[®] 20 al 0,5 % (vol/vol). Conserveu-la a 4 °C.

Solució de iodur de propidi a 0,5 mg \times ml⁻¹. Conserveu-la a 4 °C.

Solució de iodur de propidi a 20 μ g \times ml⁻¹ en PBS. Aquesta solució no es conserva.

***Protocol (tot el procediment es realitza sobre gel).**

- Disposeu les plaques amb els cultius cel·lulars sobre gel, aspireu el medi de cultiu i renteu-les dues vegades amb 5 ml de PBS estèril fred. Si voleu mesurar la citotoxicitat, reserveu els sobrenedants.
- Addicioneu 5 ml de solució d'àcid cítric freda.
- Incubeu durant 10-15 min. a 4 °C.
- Aspireu i descarteu el sobrenedant.
- Addicioneu 5 ml de solució d'àcid cítric i Tween[®] 20 freda.
- Incubeu durant 20-25 min. a 4 °C, o bé fins que amb el microscopi de contrast de fases s'observi que la major part de les cèl·lules estiguin enucleades.
- Transferiu el contingut dels plats de cultiu a tubs *falcon* de 15 ml i centrifugueu a 200 \times g durant 5 min a 4 °C.
- Aspireu i descarteu el sobrenedant.
- Suspeneu el sediment amb 1 ml de PBS.

- Repetiu les etapes 7 i 8.
 - Suspeneu el sediment amb 250 µl de PBS i transferiu-lo a tubs per a citometria.
 - Addicioneu 250 µl de solució de iodur de propidi a $20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.
 - Incubeu durant 30 min. a 4 °C en la foscor.
 - Analitzeu la suspensió de nuclis amb el citòmetre de flux.
- ATENCIÓ: llenceu tot el material que hagi pogut estar en contacte amb iodur de propidi als contenidors especials per a residus citostàtics, de color blau.

3.5.3.3 Mesura de la fragmentació del DNA en hepatòcits.

Aquesta tècnica permet determinar el percentatge de fragmentació del DNA d'un cultiu primari d'hepatòcits de rata mitjançant mesures de fluorescència. El DNA fragmentat se separa del DNA no fragmentat per centrifugació i posteriorment es quantifica amb PicoGreen, un fluorofor que s'uneix de forma específica al dsDNA. El cultiu primari d'hepatòcits es realitza en plaques de 24 pous tractades amb col·lagen, a densitat alta de cèl·lules (aproximadament 5×10^5 cèl·lules/pou).

*Solucions emprades.

- Tampó de lisi:
 - 20 mM Tris.
 - 5 mM EDTA.
 - 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 8.
- Tampó TE (pH 7.5).
 - 10 mM Tris-HCl
 - 1 mM EDTA.
- Solució de PicoGreen®
 - 10 µl de solució *stock* de PicoGreen®
 - 1590 µl de tampó TE.

*Protocol .

- Aspireu els sobrenedants de les plaques amb els hepatòcits.
- Renteu dos cops amb PBS.
- Addicioneu als pous 1 ml de tampó de lisi fred.
- Deixeu a la nevera les plaques durant 20 min.
- Liseu les cèl·lules amb un *scraper*.

- Recupereu el lisat i dipositeu-lo en vials *eppendorf* petits i reserveu la condició control “DNA total”.
 - Centrifugueu a 13.000 g durant 20 min. en fred.
 - Barregeu 400 µl del sobrenedant (DNA fragmentat) i 1600 µl de solució de PicoGreen[®].
 - Barregeu 400µl de solució de lisi (DNA total) i 1600 µl de solució de PicoGreen[®].
 - Mesureu la intensitat de la fluorescència de les mostres a 490/515 nm en cubetes *macro*.
- % DNA fragmentat = (Intensitat fluorescència sobrenedant / Intensitat fluorescència DNA total) x 100.

3.5.3.4 Fluxe de ⁸⁶Rb⁺ cap a l'exterior en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer.

*Estimació de fluxos de potassi.

Tots els mètodes que mesuren la conducció iònica a través d'una membrana biològica requereixen dos compartiments iònics separats per una bicapa lipídica on resideixin els canals iònics o les bombes iòniques. Tant un cultiu cel·lular, una cèl·lula intacta, com un fragment de membrana plasmàtica escindit satisfan els esmentats requeriments. L'assaig de flux constitueix el format preferit pels laboratoris de recerca i desenvolupament a l'hora d'efectuar cribatges perquè mesura directament el flux iònic. Els isòtops radioactius, també anomenats traçadors, s'han emprat àmpliament per determinar els fluxos d'entrada o sortida d'ions intracel·lulars específics de cèl·lules intactes (Gonzalez *et al.*, 1999). L'eficiència de l'assaig de flux és molt superior al *patch clamp* (centenars de dades per hora), amb una sensibilitat comparable, i és força resistent als artefactes propis dels assaigs basats en tècniques de fluorescència. No obstant, la resolució temporal és baixa (típicament, segons o minuts), proporciona menys informació que el *patch clamp* de voltatge i és menys eficient que els assaigs fluorimètrics. Addicionalment, els assaigs de flux amb traçadors presenten els inconvenients associats a la manipulació de material radioactiu i el requeriment de diferents radioisòtops per l'estudi de canals selectius per diferents ions.

Els fluxos de K⁺ cap a l'exterior de les cèl·lules s'han calculat a partir de la pèrdua de ⁸⁶Rb⁺, assumint que ambdós ions es comporten de forma anàloga en els processos de transport iònic cel·lular (Krumshnabel *et al.*, 1996). El ⁸⁶Rb⁺ s'ha emprat

en forma de $^{86}\text{RbCl}$ en solució aquosa a $0,22 \text{ mg Rb}^+ \times \text{ml}^{-1}$, amb una activitat inicial d' $1 \text{ mCi} \times \text{ml}^{-1}$.

El flux unidireccional de sortida de K^+ s'ha determinat mitjançant l'ús del traçador radioactiu $^{86}\text{Rb}^+$ (Bourne *et al.*, 1984). Per calcular l'electrodifusió passiva del $^{86}\text{Rb}^+$ s'ha emprat el pendent del tram lineal del procés de pèrdua de radioisòtop de les cèl·lules.

*Material.

PBS estèril.

Solució d'estoc de $^{86}\text{RbCl}$ a $1 \text{ mCi} \times \text{ml}^{-1}$ inicialment.

Medi de cultiu convencional.

Medi mínim per a estudis de metabolisme cel·lular.

Microcentrifugadora.

Vials d'escintil·lació de plàstic.

Líquid d'escintil·lació.

*Protocol.

- Féu créixer un cultiu cel·lular en una placa de 6 pous fins assolir una confluència del 70-80 %.
- Aspireu el medi de cultiu i renteu la placa dues vegades amb PBS estèril.
- Addicioneu 1 ml de medi de cultiu amb $^{86}\text{Rb}^+$ a $10 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$ als pous de la placa.
- Incubeu durant 12 h a 37°C .
- Aspireu i descarteu el medi de cultiu, i renteu tres vegades amb PBS estèril.
- Addicioneu 1 ml de medi mínim a cada pou amb les substàncies l'efecte de les quals es vol estudiar, per duplicat.
- Incubeu a 37°C .
- A intervals de 10 min, fins a 50 min, transferiu $75 \mu\text{l}$ del medi dels pous a vials de tipus *Eppendorf*, centrifugueu-los a $12.000 \times g$ durant 5 min a temperatura ambient, transferiu $50 \mu\text{l}$ de sobrenedant a un vial amb 5 ml de líquid d'escintil·lació i mesureu la radioactivitat (β).
- Prepareu solucions patró a partir del medi de cultiu amb $^{86}\text{Rb}^+$ a $10 \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$, transferiu-ne $50 \mu\text{l}$ a un vial amb 5 ml de líquid d'escintil·lació i mesureu la

radioactivitat (β).

3.5.3.5 Mesures d'unió de l'NF κ B al DNA en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer.

Els factors de transcripció de la família NF- κ B estan implicats en la regulació de gens involucrats en la resposta immunitària, inflamació i malalties com el càncer (Baldwin, Jr., 1996);(Karin *et al.*, 2002b);(Karin *et al.*, 2002a). La subunitat p65 d'NF- κ B es troba al citoplasma en una forma inactiva unida a I κ B a les KC. L'activació pot succeir per diferents estímuls com citocines pro-inflamatòries, productes bacterials o virals, o agents que causin dany cel·lular. Al produir-se l'estimulació, l'I κ B és fosforilat, ubiquitinat i degradat, fent possible la ràpida translocació de l'NF- κ B al nucli on regula la expressió de gens específics (Thanos *et al.*, 1995).

*Solucions emprades.

–*Buffer A* *.

10 mM Hepes KOH a pH 7.9

10 mM KCl.

1.5 mM MgCl₂.

–*Buffer B* *.

20 mM Hepes KOH a pH 7.9

25% glicerol.

420 mM NaCl.

1.5 mM MgCl₂.

0.2 mM EDTA.

*Suplementeu els buffers al moment de ser utilitzats amb inhibidors de fosfatases i de proteases:

Pepstatina: *stock* 5 mg/ml en etanol. Afegiu 1 μ l/ml *buffer*.

Leupeptina: *stock* 5 mg/ml en etanol. Afegiu 1 μ l/ml *buffer*.

Ditiotreitol: 0.5 mM [] final.

Fenilmetilsulfonilfluoridat: *stock* 100 mM en isopropanol. Afegiu 10 μ l/ml *buffer*.

β -glicerol-fosfat: *stock* 1 M en H₂O. Afegiu 10 μ l/ml *buffer*.

NaF: *stock* 1 M en H₂O. Afegiu 10 μ l/ml *buffer*.

***Protocol.**

- Incubeu les KC en plaques de 6 cm.
- Un cop fets els tractaments, elimineu els sobrenedants.
- Col·loqueu les plaques sobre gel.
- Feu 2 rentats amb PBS fred.
- Afegiu 1 ml de PBS.
- Liseu les cèl·lules amb un *scraper*.
- Recupereu els lisats i fiquen-los en *eppendorfs*.
- Centrifugueu 5 min. a 180 x g a 4°C.
- Desprecieu sobrenedant.
- Resuspeneu les cèl·lules amb 400 µl de *buffer A* suplementat.
- Deixeu els *eppendorfs* 10 min.sobre gel.
- Resuspeneu les mostres amb vortex 10 segons.
- Centrifugueu 10 segons a 13.000 x g a 4°C.
- Desprecieu els sobrenedants.
- Resuspeneu els pellets (on es troben els nuclis) amb 50 µl de *buffer C* suplementat.
- Deixeu els *eppendorfs* 20 min.sobre gel.
- Centrifugueu 2 min. a 13.000 x g a 4°C.
- Recupereu els sobrenedants i guardeu-los a -80°C.
- La translocació al nucli de la subunitat p65 de l'NFκB es va determinar mitjançant l'EZ-Detect™ Transcription Factor Kit for NF-κB p65 (Pierce Biotechnology, USA).

3.5.3.6 Mesura de la despolarització de membrana plasmàtica en macròfags peritoneals per citometria de fluxe.

Amb el citòmetre de fluxe i utilitzant la sonda fluorescent DIBAC4(3) (Kitagawa *et al.*, 1985), excitada amb el laser FL1-H, observem que el màxim de senyal (màxima despolarització) el produeix la incubació de les cèl·lules amb digitonina (Fig.3.1).

***Protocol.**

- Incubeu els macròfags peritoneals amb els diferents tractaments en falcons de 15 ml en un bany a 37 °C.
- Afegiu 5 ml de PBS a cada falcon que conté 1 ml d'exudat peritoneal.

- Centrifugueu 15 min. a 500 x g.
- Elimineu els sobrenedant.
- Resuspeneu amb 300 µl de PBS cada falcon.
- Afegiu el contingut a tubs de citòmetre.
- Incubeu el DIBAC4(3), 1.5 µM, durant 30 min. a 37 °C, en obscuritat.
- Passeu les mostres per citòmetre.
- Adquiriu 10.000 cèl·lules per cada experiment amb el software CellQuest.

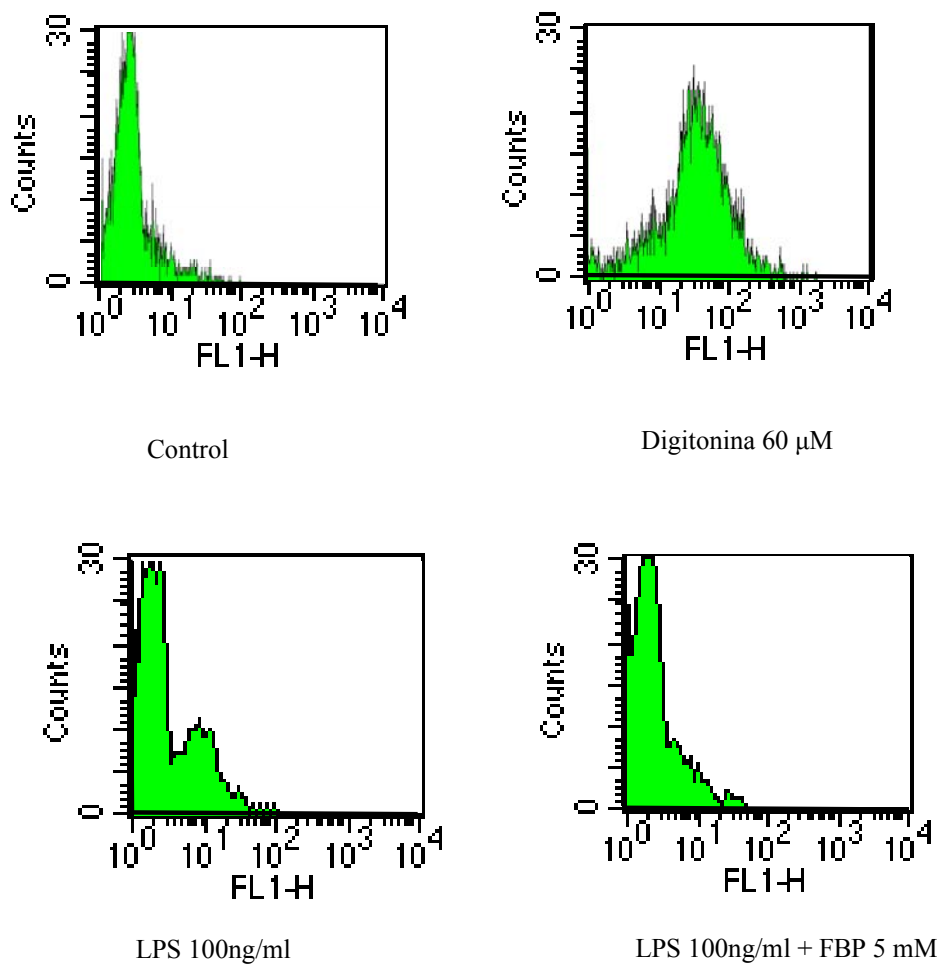


Fig.3.1 Registre de despolarització de membrana amb citometria de fluxe.

3.6 Tècniques per mesurar la citotoxicitat comuns a tots els cultius cel·lulars.

3.6.1 Mesura de l'activitat LDH.

La mesura de lactat DH alliberada als sobrenadants és una mesura de citotoxicitat. Per mesurar % de toxicitat les mesures faran referència al 100% de toxicitat, que s'obté trencant les cèl.lules amb tritó X-100 a l'1%.

*Reactius.

Per fer la mesura de citotoxicitat es va emprar el Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Molecular Biochemicals, Germany)

- Reconstituïu l'ampolla petita del kit amb 1 mL d'H₂O miliQ.
- Barregeu: 45:1 (ampolla gran:ampolla petita).

*Protocol.

- Cultiveu els hepatòcits en plats de 24 pous.
- LDH sobrenedant:
 - Agafeu una aliquota del sobrenedant, sense tocar el fons.
 - Centrifugueu 5 min. a 200 x g.
 - Recupereu el sobrenadant i porteu-lo a congelar.
 - Per llegir la mostra afegiu 100 µl de mostra + 100 µl de barreja de reactiu.
- LDH cèl.lules:
 - Afegiu a la placa de Petri tritó X-100 a l'1%.
 - Liseu les cèl.lules amb un *scraper*. Porteu a congelar.
 - Per llegir la mostra diluïu 1/4 en Trito x-100 (25 µl. mostra + 75 µl Trito x-100).
 - Agafeu 100 µl de mostra diluïda + 100 µl de barreja de reactius.
- Blancs:
 - Feu un blanc només amb medi (100 µl de mostra + 100 µl de barreja de reactiu); i un altre amb trito x-100 (100 µl de mostra + 100 µl de barreja de reactiu).
- LDH Total:
$$= ((\text{LDH sobren.} / (\text{LDH sobren.} + \text{LDH cel.})) \times 100$$
 - Feu la incubació en una placa d'ELISA de 96 pous, en l'obscuritat durant 30 min.
 - Llegiu la placa a 492 nm.

* Si el resultat de la lectura és superior a 1.5, estem fora de la linealitat, repetiu la lectura diluint la mostra.

3.6.2 Assaig de viabilitat cel·lular per tinció amb cristall violeta.

Les cèl·lules que es troben adherides a la placa són fixades i alhora tenyides pel cristall violeta (Drysdale *et al.*, 1983). La intensitat del color és proporcional al número de cèl·lules de la placa. El resultat s'expressa en percentatge respecte la condició control.

***Reactius.**

Solució al 0.2 % de cristall violeta en etanol al 2 %.

SDS a l'1 %.

***Protocol.**

- Cultiveu les cèl·lules en plaques de 96 pous.
- Aspireu el medi de cultiu i feu dos rentats amb PBS.
- Incubeu el cultiu durant 20 min. amb cristall violeta (500 ml x pou).
- Feu rentats amb H₂O destil·lada, fins que aquesta surti neta.
- Deixeu assecar els plats a temperatura ambient.
- Afegir SDS a l'1 %. (150 µl x pou).
- Llegiu la placa a 570 nm.

3.7 Anàlisi estadístic.

Els resultats obtinguts representen la mitja \pm l'error estàndard dels valors obtinguts en el nombre d'experiments indicats. Les diferències entre els grups s'han testat mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA) i l'apropiat *a priori* mètode de contrast. Els resultats s'han considerat significatius quan $p < 0.05$.

4 RESULTATS.

4.1 L'administració de F1,6BP reverteix els efectes induïts per GalN en fetge i en cultius primaris d'hepatòcits de rata.

4.1.1 Efecte de la F1,6BP en la necrosi causada per GalN en rata.

La lesió en fetge de rata provocada per l'administració de 400 mg/Kg de GalN queda reflectida pels nivells d'activitats transaminases AST i ALT al plasma, 24 h. després dels diferents tractaments. L'administració conjunta de F1,6BP (2g/Kg) i de GalN disminueix significativament el dany necròtic causat per GalN (Fig.4.1).

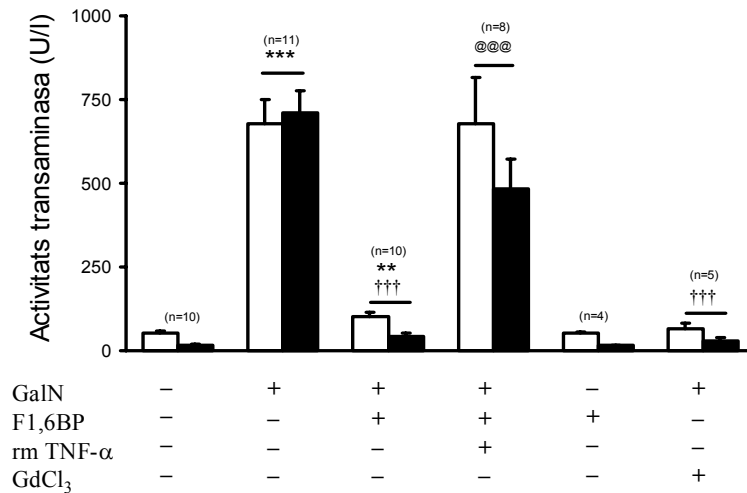


Fig.4.1 Activitats AST (□) i ALT (■) a plasma de rates 24 hores després dels diferents tractaments. Els resultats indiquen la mitja ± l'error estàndard d'n animals. ** i *** indiquen (P<0.01) i (P<0.001) respecte control. ††† i @@@ indiquen (P<0.001) respecte els tractaments GalN i F1,6BP+GalN, respectivament.

Per completar la percepció de l'evolució del dany hepàtic causat per la GalN i veure la protecció de la F1,6BP en el temps, vam analitzar el nivell d'activitats transaminasa en plasma 3, 6, 12 i 24 hores després dels tractaments (Fig.4.2).

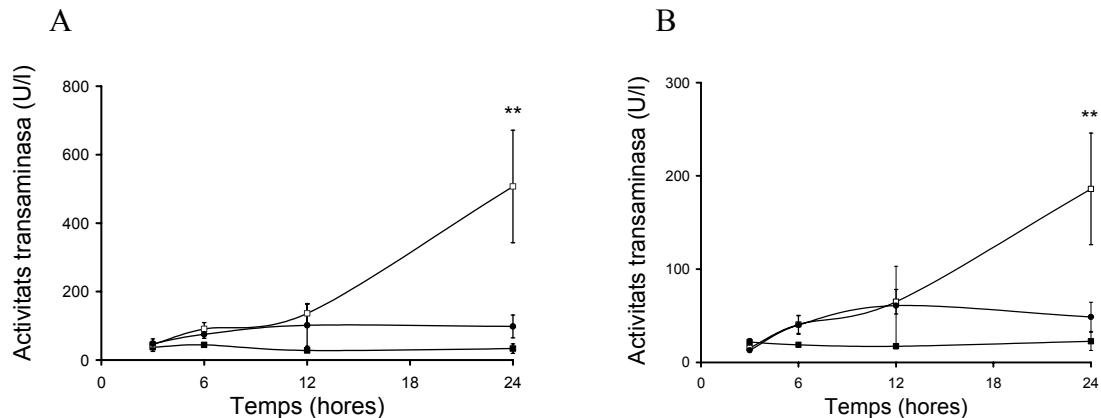


Fig.4.2 Resposta temporal de l'activitat AST (A) i ALT (B) en plasma de rata. Control (■), GalN(□) i F1,6BP + GalN (●). ** indiquen (P<0.01) respecte el tractament amb salí.

4.1.2 Estudi dels efectes a nivell histològic en fetges tractats amb GalN. Protecció per F1,6BP.

A l'analitzar els talls de fetge tenyits amb hematoxilina-eosina observem que en presència de F1,6BP es redueixen les lesions tissulars generades per l'administració de GalN (Fig.4.3). Entre els efectes que poden observar-se veiem que en els fetges tractats amb GalN (indicat com G) hi ha hagut infiltració de limfòcits i d'altres cèl·lules pro-inflamatòries. S'aprecien cèl·lules de color rosat danyades en el procés inflamatori (fletxa vermella central). A dins dels vasos sanguinis trobem hematies i al voltant d'aquests poden observar-se infiltracions limfocitàries, cèl·lules negres de tamany inferior a la resta, que pràcticament no tenen citoplasma (fletxa vermella dreta), que han estat reclutades del torrent sanguini com a conseqüència del procés inflamatori desencadenat per l'acció de la GalN. En alguns dels hepatòcits, que són binuclears, és veuen els nuclis fragmentats en diverses parts i la cromatina condensada (fletxa vermella esquerra), característics de la mort cel·lular per apoptosi.

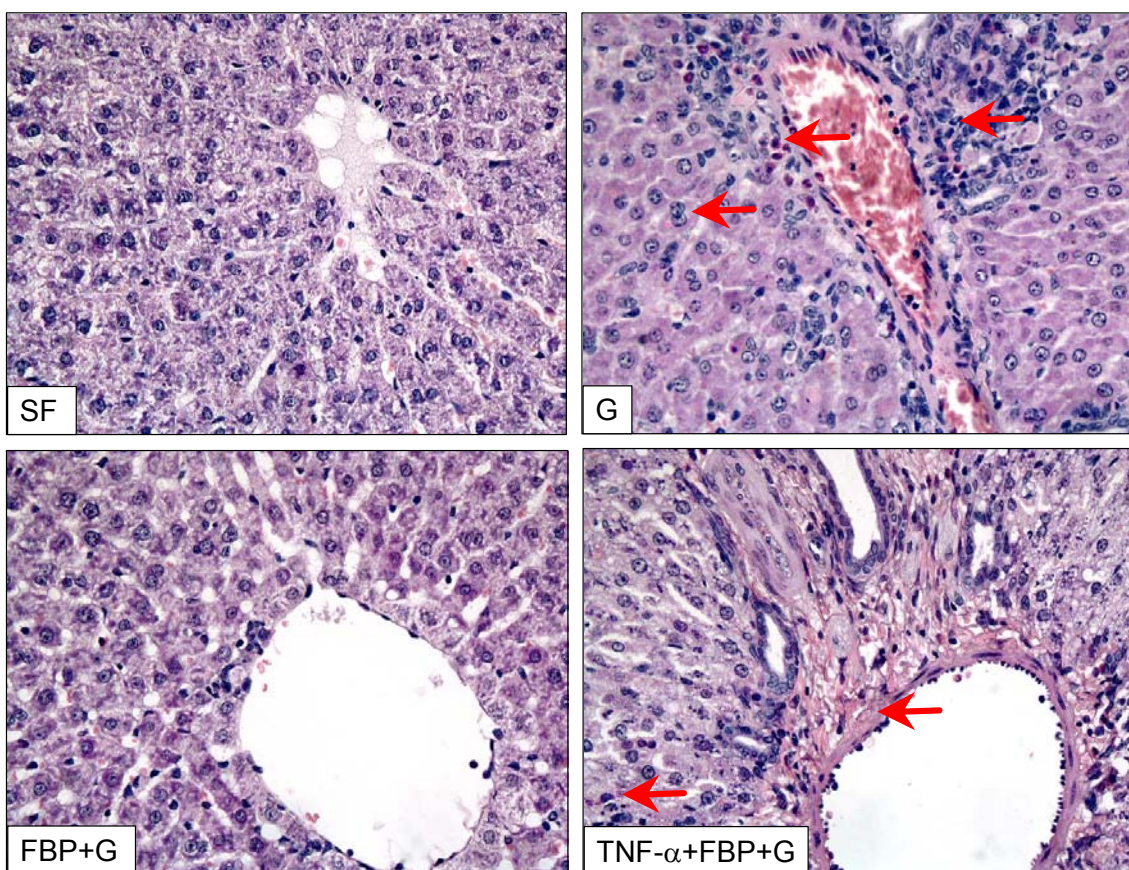


Fig.4.3 Talls de fetge tenyits amb hematoxilina-eosina 18 hores després dels tractaments amb GalN i TNF- α més GalN i reversió per F1,6BP. (FBP indica F1,6BP i G indica GalN).

Els talls corresponents a les rates tractades amb F1,6BP més GalN (indicat com FBP+G), presenten un aspecte molt més semblant a les rates tractades amb salí fisiològic (indicat com SF). Pot apreciar-se una clara reversió dels efectes causats per la GalN, però encara trobem una petita porció de limfòcits infiltrats i de nuclis d'hepatòcits apoptòtics, confirmant que la reversió de la lesió no és total (Fig.4.3).

4.1.3 Efecte de la F1,6BP en la inducció d'apoptosi en rates tractades amb GalN.

En diferents treballs s'indica que, prèvia a la necrosi, la GalN indueix apoptosi del parènquima hepàtic (Muntane *et al.*, 1998);(Stachlewitz *et al.*, 1999). Així, per comprovar aquests supòsits, vam analitzar els extrems 3'OH lliures del DNA detectats per la tècnica de TUNEL (Fig.4.4), en altres talls dels mateixos fetges tractats. Com pot observar-se en l'anàlisi de cèl·lules positives per TUNEL en diferents camps al microscopi (Taula 4.1), la F1,6BP redueix significativament el nombre de cèl·lules positives respecte fetges tractats amb GalN.

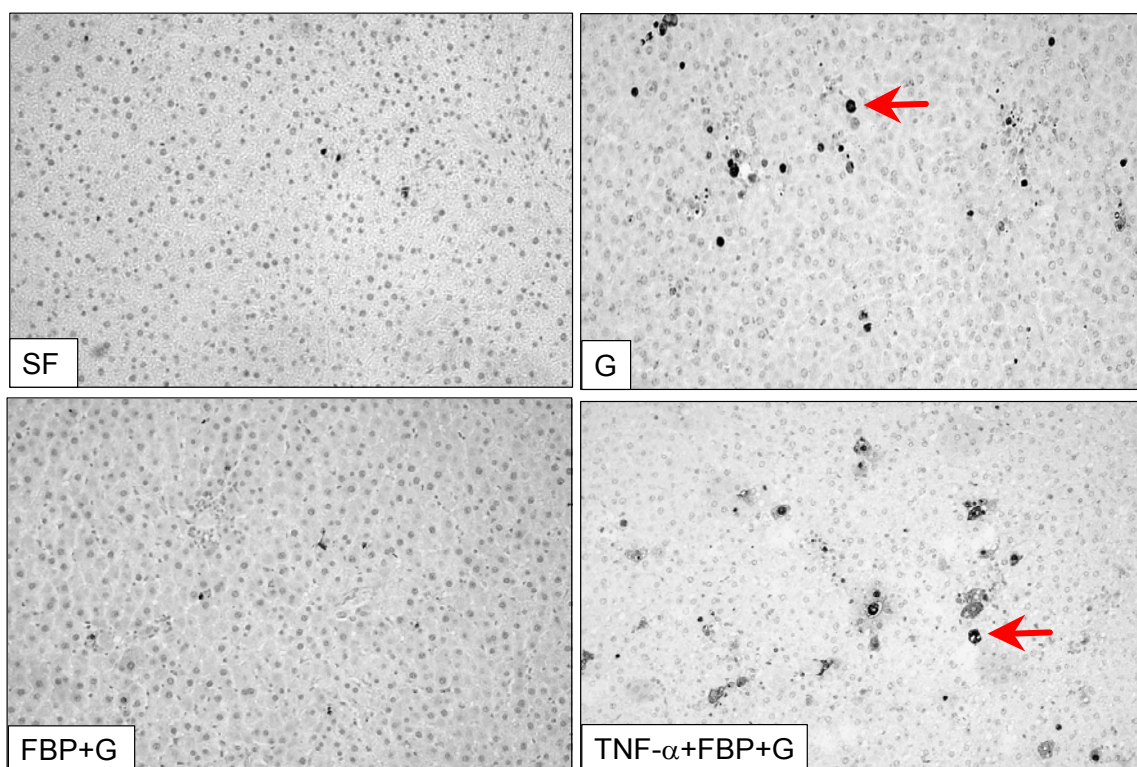


Fig.4.4 Talls de fetge de rata evaluats amb l'assaig de TUNEL 18 hores després dels tractaments amb GalN i TNF- α més GalN i reversió per F1,6BP. (FBP indica F1,6BP i G indica GalN).

Taula.4.1 Nuclis positius per la tècnica de TUNEL en talls de fetge de rata.

SF	7.1±0.6
GalN	41.5±4.6(**)
F1,6BP+GalN	16.9±0.9(††)
TNF-α + F1,6BP+GalN	64.4±3.1(@@@)

Els resultats indiquen la mitja ± l'error estàndard del comptatge de diferents camps (400x), de cèl·lules positives per TUNEL (punts negres), d'una mitjana de 5 experiments. ** i †† indiquen (P<0.01) respecte el tractament amb salí i GalN, respectivament. @@@ indica (P<0.001) respecte F1,6BP+GalN.

La tècnica de TUNEL és una prova indicativa de mort cel·lular, on existeix cert grau de solapament entre la mort apoptòtica i la necròtica, ja que detecta extrems 3'OH lliures, no exclusius de l'apoptosi. Per estar segurs del grau d'apoptosi en aquests fetges vam determinar, mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica, la presència de la forma truncada, activa, de la caspasa 3 (Fig.4.5), prova que detecta exclusivament mort per apoptosi. Es pot observar als talls corresponents al tractament amb GalN que hi ha una gran presència de la forma activa de la caspasa 3 (punts vermells) Com es determina en el posterior anàlisi, la F1,6BP retorna el grau d'apoptosi a nivells pràcticament control en el tractament conjunt amb GalN (Taula 4.2).

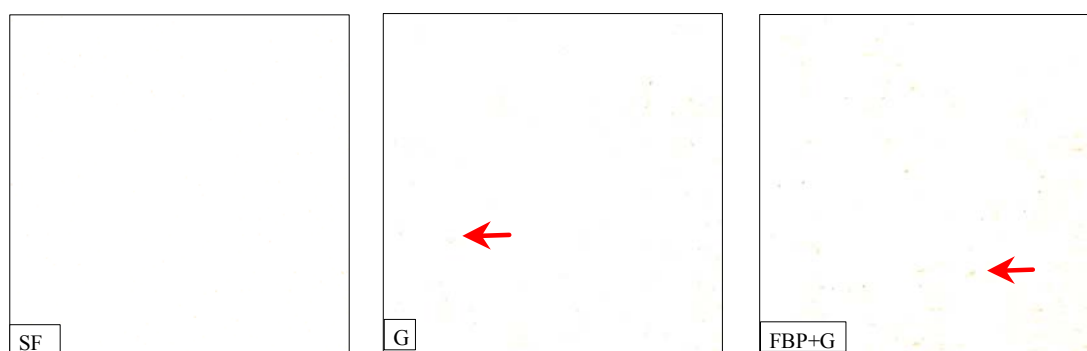


Fig.4.5 Anàlisi immunohistoquímica de la caspasa 3 activa en talls de fetges 18 després del tractament amb GalN i reversió per F1,6BP. (FBP indica F1,6BP i G indica GalN).

Taula.4.2 Cèl·lules positives per la caspasa 3 activa en talls de fetge de rata.

SF	1.2±0.3
GalN	442.8±50.5(***)
F1,6BP+GalN	17.6±3.6(†††)

Els resultats indiquen la mitja ± l'error estàndard del comptatge de diferents camps (400x), de cèl·lules positives per caspasa 3 activa (punts vermells), d'una mitjana de 5 experiments. *** i ††† indiquen (P<0.001) respecte el tractament amb salí i GalN, respectivament.

4.1.4 Anàlisi de la citotoxicitat en hepatòcits en cultiu primari tractats amb GalN.

Per aprofundir en l'estudi dels efectes de la GalN i de la F1,6BP sobre els hepatòcits, vam analitzar si es reproduïen els efectes observats *in vivo*, en cultius primaris d'hepatòcits de rata. Vam comprovar que la F1,6BP disminuïa la mort per necrosi en cultius primaris d'hepatòcits tractats amb GalN a les dosis utilitzades, en mesures d'LDH (Fig.4.6).

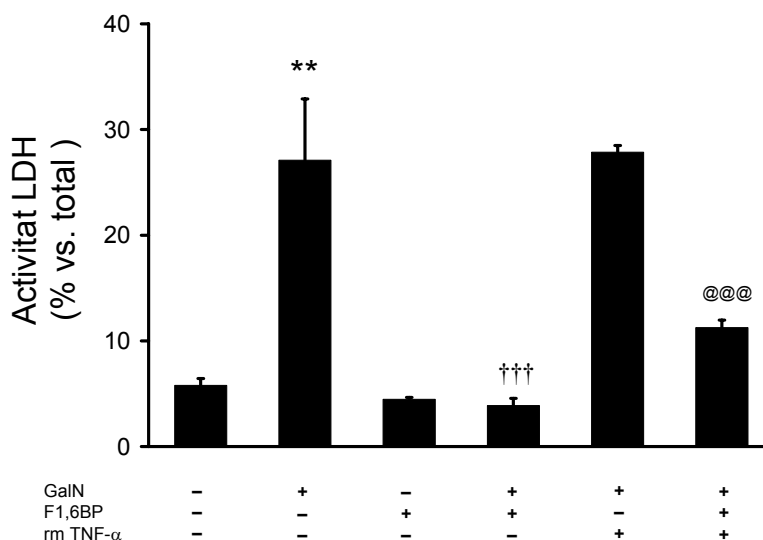


Fig.4.6 Efecte citotòxic de la GalN (5mM) i la GalN més TNF- α (20ng/ml) i reversió per F1,6BP (5mM). Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard del percentatge de l'activitat LDH present al medi de cultiu respecte LDH total, després d'una incubació de 15 h. ** indica ($P < 0.01$) respecte control. ††† i @@@ indiquen ($P < 0.001$) respecte els tractaments GalN i GalN més TNF- α , respectivament.

4.1.5 Anàlisi de l'apoptosi en hepatòcits en cultiu primari tractats amb GalN.

Vam avaluar l'apoptosi en els mateixos tractaments, a les 15 hores després d'administrar els diferents compostos, mitjançant l'anàlisi de nuclis per citometria (Fig.4.7). La F1,6BP rebaixa significativament l'apoptosi induïda per GalN. Com a control positiu d'apoptosi s'utilitza el TGF- β .

4.2 L'administració de F1,6BP no reverteix la inhibició transcripcional, ni redueix la sensibilització dels hepatòcits al TNF- α induïts per GalN.

4.2.1 La F1,6BP redueix els nivells de TNF- α induïts per GalN, però no recupera els hepatòcits de l'aturada transcripcional.

El TNF- α és una de les principals citocines que afecten el parènquima en l'hepatitis induïda per GalN (Josephs *et al.*, 2000);(Lozano *et al.*, 2003). En condicions

fisiològiques, els hepatòcits són resistents al TNF- α , ja que la unió al seu receptor activa dues vies simultàneament, que es contrarresten i no es produeixen efectes nocius per a la cèl·lula. El TNF- α activa la transcripció de gens antiapoptòtics, com la SOD de magnesi, proteïnes HSP i altres que inhibeixen les vies d'apoptosi; per un altre costat el TNF- α propicia la traducció de proteïnes inductores de la mort cel·lular, a partir d'RNAs transcrits prèviament, activant-se la via mitocondrial de mort per apoptosi (Leist *et al.*, 1994). Per tant, quan els hepatòcits es troben en estat d'arrest transcripcional, només es troba activa la segona via, la via mitocondrial de mort per apoptosi i l'arribada del TNF- α dona lloc a una mort apoptòtica, que finalitza amb la necrosi del fetge.

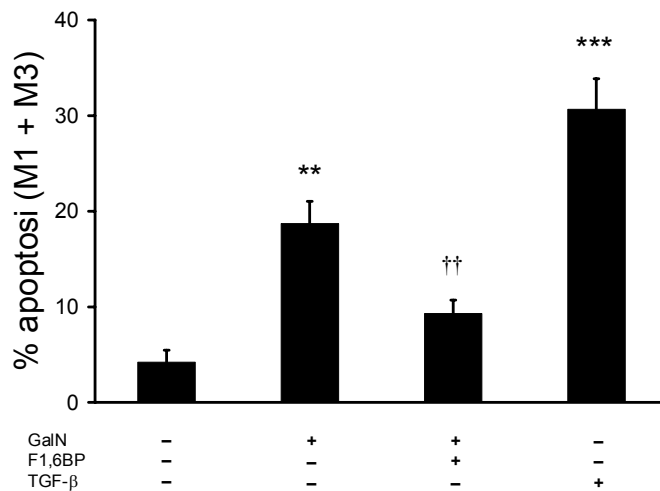


Fig.4.7 Efecte apoptòtic de la GalN i la seva reversió per F1,6BP sobre cultius primaris d'hepatòcits de rata. Els resultats representen la mitja \pm l'error estàndard del grau d'apòptosi, expressada com a percentatge de nuclis hipodiploides, després d'una incubació de 15 h en presència de GalN (5 mM) i F1,6BP (5 mM), de 5 experiments independents. ** i *** indiquen ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control. †† indica ($P < 0.01$) respecte GalN.

Es coneix que en presència de GalN els hepatòcits es troben en aturada transcripcional degut a la davallada en el contingut d'uridina que causa aquest sucre aminat (Keppler *et al.*, 1974). Així, pensem que la F1,6BP, alhora de reduir els efectes causats per la GalN en fetge de rata, ha de produir, almenys, un dels dos efectes següents. O bé la F1,6BP recupera els hepatòcits de l'arrest transcripcional induït per GalN, fent-los de nou refractaris al TNF- α , o bé redueix els nivells de TNF- α , augmentats en presència de GalN, explicant-se així que no es produeixi la necrosi hepàtica causada per GalN.

Per comprovar el primer dels supòsits, vam analitzar, en cultius primaris d'hepatòcits, la quantitat d'uridina tritiada incorporada pels hepatòcits a l'RNA respecte les cèl·lules control (Fig.4.8). En aquesta mesura, indicativa de l'activitat transcripcional de les cèl·lules, s'observa que en presència de F1,6BP més GalN els hepatòcits continuen en aturada transcripcional. Com a control positiu d'aturada transcripcional utilitzem actinomicina D (ActD).

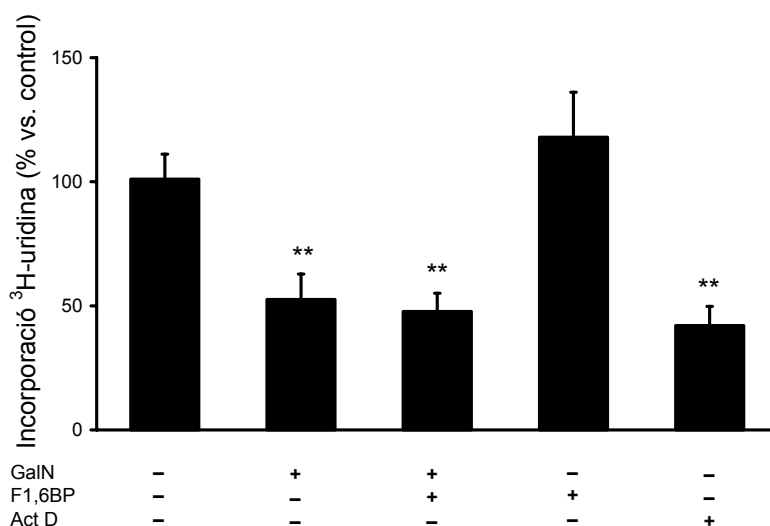


Fig.4.8 Efectes de la GalN i la F1,6BP sobre l'activitat transcripcional de cultius primaris d'hepatòcits avaluat per la incorporació d'³H-uridina a l'mRNA. Cada barra correspon a la mitja \pm ES de 5 experiments independents. ** indica ($P < 0.01$) respecte cèl·lules control.

Així, degut a que la F1,6BP no recupera de l'arrest transcripcional induït per la GalN sobre els hepatòcits, els nivells de TNF- α , doncs, haurien de ser baixos en les rates tractades amb F1,6BP més GalN. En cas contrari no s'explicarien els baixos nivells de transaminases detectats en aquest tractament (Fig.4.1).

Vam analitzar, doncs, l'efecte de la F1,6BP en l'increment dels nivells de TNF- α induïts per GalN en rata. Observem que els nivells de TNF- α disminueixen significativament respecte les tractades solament amb GalN, tant en nivells en plasma (Fig.4.9), com en nivells en homogenat de fetge total (Fig.4.10).

Aquests resultats (Figs.4.8, 4.9 i 4.10) suggereixen que la F1,6BP té altres dianes implicades en la resposta inflamatòria i la producció de citocines, a més dels hepatòcits, ja que els principals productors de TNF- α són els macròfags. Per corroborar aquesta hipòtesi vàrem administrar TNF- α conjuntament amb F1,6BP i GalN. Pot observar-se com desapareix la protecció que conferia la F1,6BP (Fig.4.1), augmentant considerablement el nivell d'activitat de les transaminases AST i ALT.

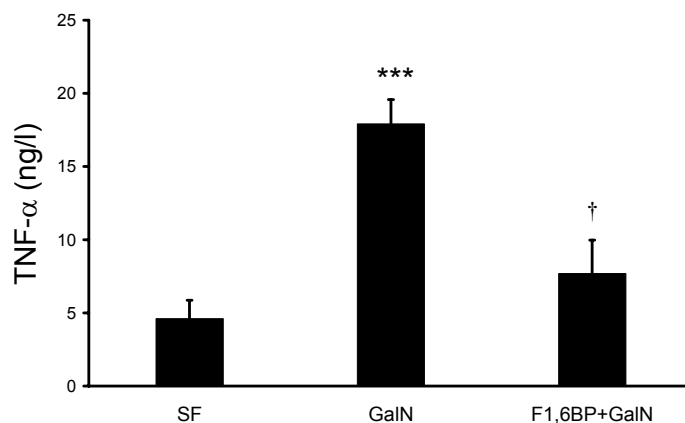


Fig.4.9 Concentració de TNF- α en plasma de rates 24 hores després dels tractaments indicats. Cada barra correspon a la mitja \pm l'error estàndard de 5 a 8 rates. *** indica ($P < 0.001$) respecte control. † indica ($P < 0.05$) respecte el tractament amb GalN.

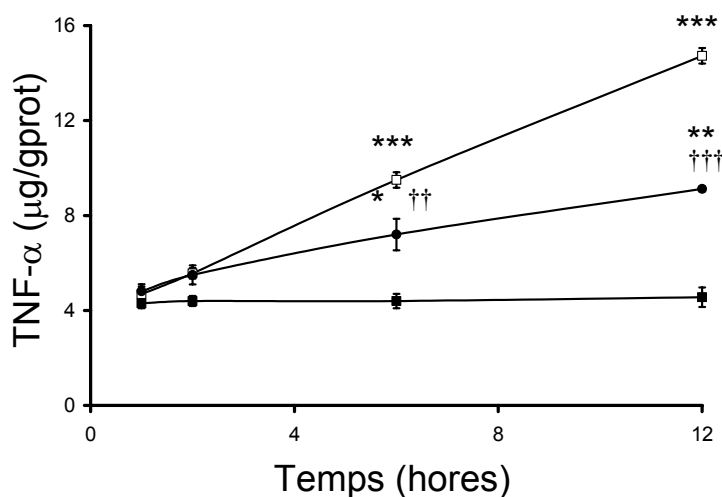


Fig.4.10 Resposta temporal de producció de TNF- α mesurats en homogenat de fetge de les rates tractades. Control (■), GalN(□) i F1,6BP + GalN (●). Cada punt del gràfic correspon a la mitja \pm l'error estàndard de 4 a 7 animals. *, ** i *** indiquen ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control. †† i ††† indiquen ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte F1,6BP+GalN.

A més pre-tractant les rates amb clorur de gadolini (GdCl), substància que col·lapsa i inhibeix els macròfags (Brown *et al.*, 1997), aquestes esdevenen resistents a la GalN (Fig.4.1); és a dir, que l'activació dels macròfags i la producció de citocines (TNF- α) és necessària per la gènesi de la lesió de la GalN en model de rata.

4.2.2 Efectes del TNF- α exogen en talls histològics i en l'apoptosi en rates tractades amb F1,6BP més GalN.

A l'administrar-se TNF- α a les rates tractades amb F1,6BP i GalN, de nou observem un increment del nombre de limfòcits infiltrats al teixit, a més d'altres

cèl·lules pro-inflamatòries, així com d'hepatòcits amb la cromatina condensada (Fig.4.3). A part es pot veure que el teixit perd la seva estructura funcional i es perden els límits cel·lulars.

A l'administrar-se TNF- α a les rates tractades amb F1,6BP i GalN s'observa un increment de cèl·lules positives per TUNEL (Fig.4.4), significativament superior a tots els altres tractaments (Taula1).

4.2.3 Efectes del TNF- α sobre hepatòcits en cultiu primari, sensibilitzats amb GalN.

Els efectes citotòxics de la GalN es veuen agreujats per l'addició de TNF- α als cultius primaris d'hepatòcits i augmenten en incrementar-se la concentració de TNF- α administrada (Fig.4.11). La F1,6BP administrada juntament a aquest doble tractament, redueix parcialment els seus efectes.

El TNF- α de manera depenent de dosi incrementa l'apoptosi induïda per GalN en cultius primaris d'hepatòcits, mesurada per citometria de nuclis en una corba dosis-resposta de TNF- α (Fig.4.12), o per la mesura de mono i oligonucleosomes al citoplasma (Fig.4.13). La F1,6BP afegida al TNF- α més GalN redueix de manera significativa l'apoptosi en les diferents concentracions de TNF- α .

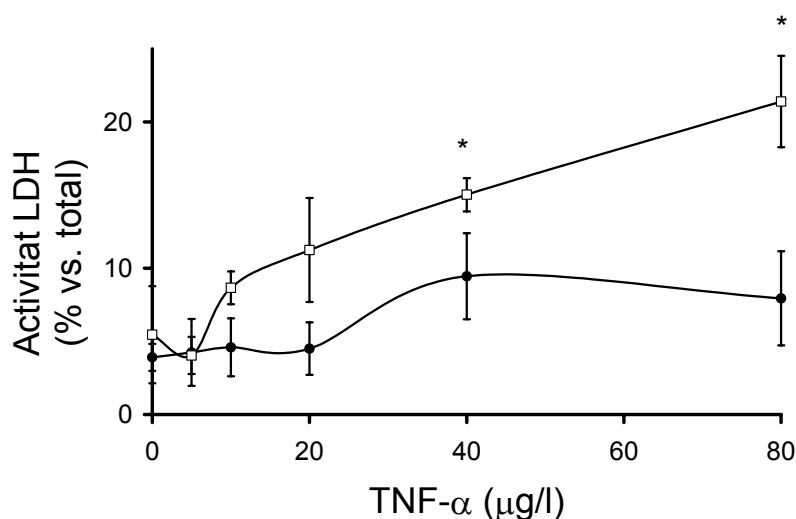


Fig.4.11 Efecte citotòxic del TNF- α en cultius primaris d'hepatòcits sensibilitzats amb GalN (5mM) i la seva reversió per F1,6BP (5mM). Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard del percentatge de l'activitat LDH present al medi de cultiu respecte LDH total, després d'una incubació de 15 h. GalN, (□) i F1,6BP + GalN, (●). * indica ($P < 0.05$) respecte F1,6BP+GalN, a la mateixa concentració de TNF- α .

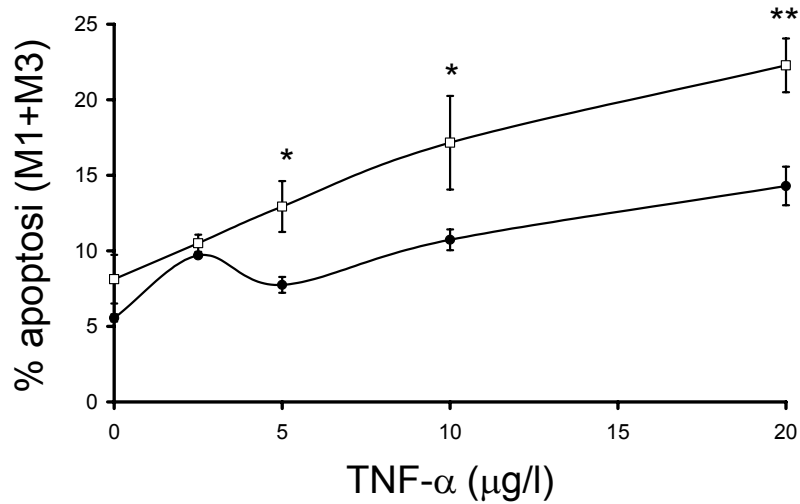


Fig.4.12 Corba dosi-resposta corresponent a l'efecte apoptòtic del TNF- α i la seva reversió per F1,6BP sobre hepatòcits de rata sensibilitzats amb GalN. Cada cercle representa la mitja \pm l'error estàndard del grau d'apòptosi, expressada com a percentatge de nuclis hipodiploides, després d'una incubació de 15 h en presència de GalN (2 mM) i de les concentracions indicades de TNF- α , amb F1,6BP (5mM) (●) i sense (□), de 3 experiments independents. * i ** indiquen ($P<0.05$) i ($P<0.01$) respecte F1,6BP+GalN, a la mateixa concentració de TNF- α .

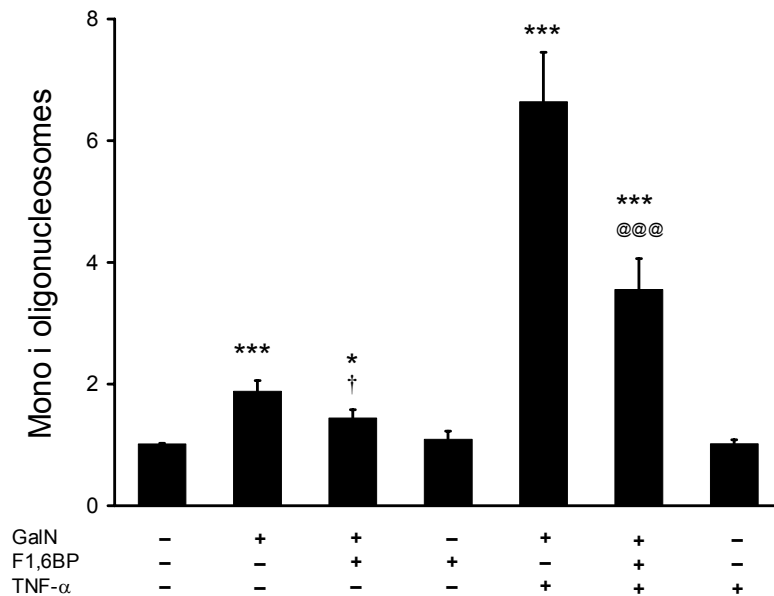


Fig.4.13 Efecte del TNF- α en la inducció d'apoptosi mesurada per formació de mono i oligonucleosomes al citoplasma de cultius primaris d'hepatòcits tractats amb GalN. Reversió per F1,6BP. † i *** indiquen ($P<0.05$) i ($P<0.001$) respecte control. † indica ($P<0.05$) respecte F1,6BP+GalN. @@@ indica ($P<0.001$) respecte GalN+TNF- α .

4.3 Prevenció per acció de la F1,6BP de l'endotoxèmia i la histaminèmia causades per GalN en rata.

4.3.1 Efecte de la GalN en la generació de l'endotoxèmia. Prevenció per F1,6BP.

Els resultats obtinguts anteriorment suggereixen que la F1,6BP redueix l'activació dels macròfags (Figs. 4.1 i 4.9). Aquesta inhibició podria produir-se per dos motius no excloents: una reducció de l'endotoxèmia causada per la GalN (Liehr *et al.*, 1978), o bé de la sensibilitat dels macròfags a l'endotoxina. Vam mesurar els nivells d'endotoxina sistèmics, en vena cava (Fig.4.14); com pot observar-se, la GalN provoca una endotoxèmia, amb el pic màxim a una hora. En les rates tractades amb F1,6BP més GalN s'aprecia una disminució d'aproximadament un 30% en l'endotoxèmia respecte les tractades només amb GalN, mesurada 1 hora després dels diferents tractaments.

També vam mesurar els nivell d'endotoxèmia a la vena porta-hepàtica (Fig.4.15), vena que connecta els vasos sanguinis de l'intestí, d'on prové l'endotoxina, amb el fetge. Aquests valors son indicatius dels nivells d'endotoxèmia de les rates tractades amb GalN abans del primer pas de la sang pel fetge, òrgan encarregat d'eliminar l'endotoxina (Fox *et al.*, 1989);(Treon *et al.*, 1993). L'eliminació de l'endotoxina es produeix quasi totalment a partir de les tres hores després del tractament amb GalN (Fig.4.15).

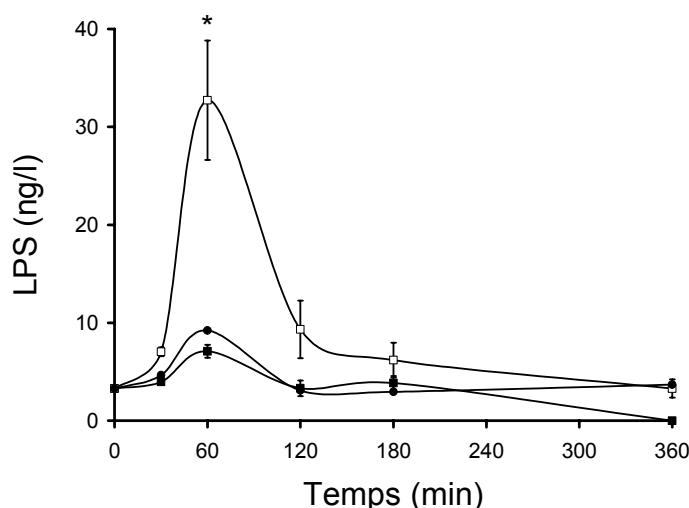


Fig.4.14 Resposta temporal de la concentració d'LPS a la vena cava de les rates tractades. Control (■), GalN(□) i F1,6BP + GalN (●). Cada punt del gràfic correspon a la mitja \pm l'error estandard de 4 a 10 animals. * indica ($P < 0.05$) respecte control.

El perfil d'endotoxèmia a la vena porta-hepàtica de les rates tractades amb GalN és similar a l'observat a cava, però amb nivells més elevats; la F1,6BP administrada

conjuntament amb la GalN redueix significativament els nivells d'endotoxèmia. A diferència del que succeeix en els nivells d'endotoxèmia en cava, en la vena porta-hepàtica, les rates tractades amb F1,6BP més GalN, presenten uns nivells significativament superiors a les rates tractades amb salí fisiològic, mesurats 1 hora després d'iniciats els tractaments (Figs.4.14 i 4.15).

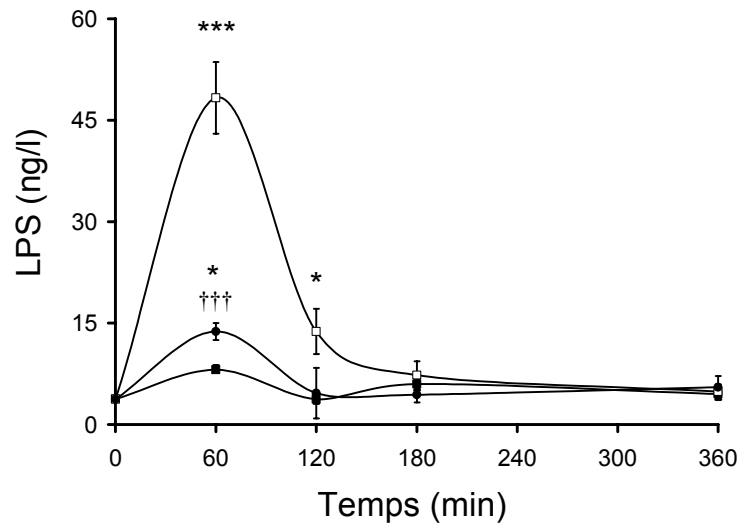


Fig.4.15 Resposta temporal de la concentració d'LPS a la vena porta-hepàtica de les rates tractades. Control (■), GalN(□) i F1,6BP + GalN (●). Cada punt del gràfic correspon a la mitja \pm l'error estàndard de 4 a 10 animals. * i *** indiquen ($P < 0.05$) i ($P < 0.001$) respecte control. ††† indica ($P < 0.001$) respecte F1,6BP+GalN.

4.3.2 Efecte de la GalN en la generació d'histaminèmia. Reversió per F1,6BP.

L'endotoxèmia induïda per GalN en rates pot estar associada a una histaminèmia prèvia, produïda per la desgranulació dels mastocits peritoneals. L'augment dels nivells d'histamina al plasma afavoriria la permeabilització de la paret del budell permetent la translocació d'endotoxines a la sang a través de la vena porta-hepàtica (Stachlewitz *et al.*, 1999). Per tant la prevenció per F1,6BP de l'endotoxèmia induïda per GalN podria ser deguda a una inhibició de la histaminèmia prèvia.

Les rates tractades amb GalN presenten uns elevats nivells d'histamina plasmàtica a partir de la primera hora després del tractament (Fig.4.16), retornant als valors control a partir de les 3 h. Amb l'administració de F1,6BP més GalN s'observen nivells d'histamina plasmàtics similars als trobats a les rates control.

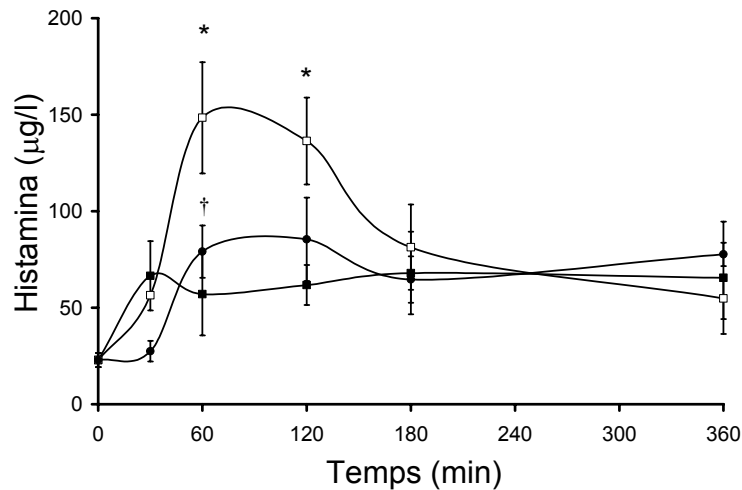


Fig.4.16 Resposta temporal de la concentració d'histamina a la vena cava de les rates tractades. Control (■), GalN(□) i F1,6BP + GalN (●). Cada punt del gràfic correspon a la mitja \pm l'error estàndard de 4 a 10 animals. * indica ($P < 0.05$) respecte control. † indica ($P < 0.05$) respecte F1,6BP+GalN.

4.3.3 Paper de la secreció d'histamina en la inducció d'endotoxèmia.

Per determinar el paper de la secreció d'histamina en la inducció d'endotoxèmia, vam combinar els tractaments de GalN i F1,6BP amb C.48/80 i cromoglicat (CrGly), activador i inhibidor, respectivament, de la desgranulació dels mastòcits. Les rates injectades amb C.48/80 donen lloc als nivells més alts d'histamina en plasma, superiors als assolits en les rates tractades amb GalN, mesurats a l'hora del tractament (Fig.4.17). Les rates tractades amb F1,6BP, ja sigui combinat amb GalN o amb C.48/80 presenten uns nivells d'histamina en plasma iguals a les tractades amb salí fisiològic. Per últim observem que les rates a les quals s'injecta CrGly i GalN presenten uns nivells d'histamina significativament inferiors al tractament amb GalN únicament (Fig.4.17).

Per determinar la relació existent entre els nivells d'histamina i els d'endotoxina en plasma, vam mesurar els nivells d'endotoxina, tant en porta com en cava, utilitzant els inhibidors i activadors de la desgranulació dels mastòcits. Les rates tractades amb C.48/80, que presenten nivells elevats d'histamina en plasma, manifesten uns nivells d'endotoxina similars a les rates control, tant en l'endotoxina en porta, com en l'endotoxina en cava (Taula 4.3). En el cas de les rates tractades amb CrGly i GalN s'observen nivells baixos en plasma, tant d'histamina, iguals als control, com d'endotoxina mesurats a porta i cava.

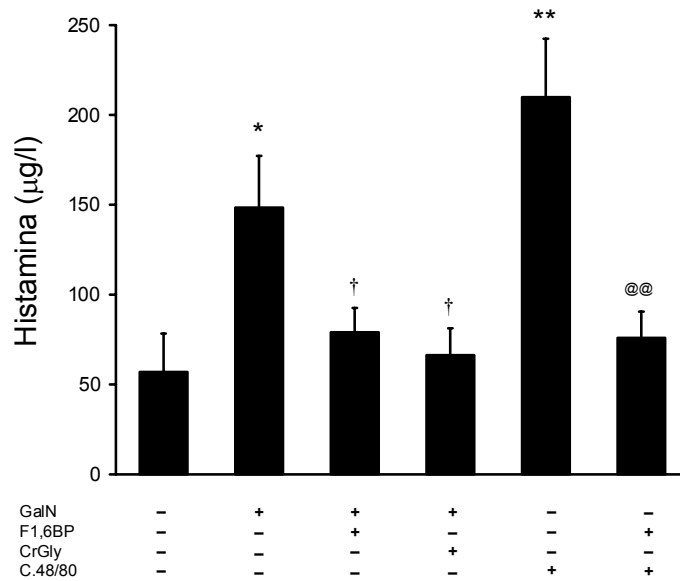


Fig.4.17 Nivells d'histamina en plasma de rata 1h després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 4 a 10 animals. * i ** indiquen ($P < 0.05$) i ($P < 0.01$) respecte control. † indica ($P < 0.05$) respecte F1,6BP+GalN. @@ indica ($P < 0.01$) respecte C.48/80.

També vam mesurar l'efecte dels moduladors de la secreció d'histamina sobre els nivells de TNF- α tant en plasma (Fig.4.18 A), com en fetge total (Fig.4.18 B). Les rates tractades amb C.48/80 presenten uns nivells de TNF- α en plasma significativament superiors als control. Per altra banda els animals tractats amb CrGly i GalN presenten nivells de TNF- α , tant en plasma com en fetge total, significativament inferiors als tractats només amb GalN i superiors als tractats amb F1,6BP més GalN ($p < 0.1$).

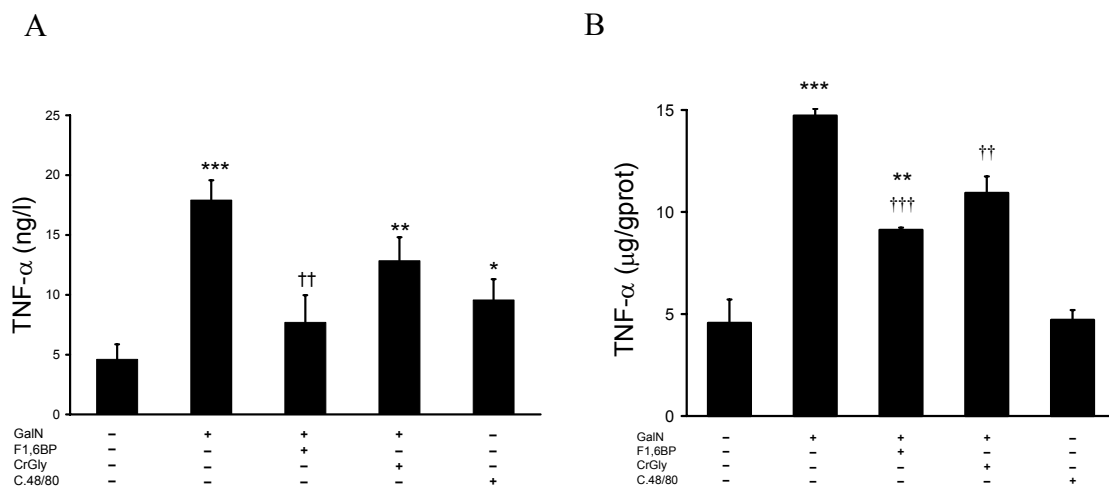


Fig.4.18 Concentració de TNF- α en plasma (A) i en homogenat de fetge (B), mesurats 24 i 12 hores després dels tractaments indicats, respectivament. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 4 a 8 rates. *, ** i *** indiquen ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control. †† i ††† indiquen ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte el tractament amb GalN.

Taula 4.3 Nivells plasmàtics d'histamina, LPS, TNF- α i activitats transaminasa. Histamina i LPS van ser determinades 1 hora després dels tractaments. TNF- α i activitats transaminasa van ser determinades 24 hores després dels tractaments.

	Histamina ($\mu\text{g/l}$)	LPS (EU/l)		TNF- α (ng/l)	Activitats transaminasa (U/l)	
		Portal	Cava		AST	ALT
Control	57.04 \pm 21.37 (n=5)	80.9 \pm 6.6 (n=5)	70.8 \pm 7.5 (n=4)	4.6 \pm 1.3 (n=8)	52.9 \pm 5.0 (n=10)	16.9 \pm 1.2 (n=10)
GalN	148.42 \pm 28.77(*) (n=6)	483.3 \pm 9.1(***) (n=10)	327.2 \pm 61.0(*) (n=8)	17.9 \pm 1.6(***) (n=10)	678.0 \pm 71.0(***) (n=11)	711.0 \pm 66.1(***) (n=11)
F1,6BP + GalN	79.06 \pm 13.60(†) (n=9)	137.5 \pm 12.6(*)(^{†††}) (n=7)	92.1 \pm 14.5(^{††}) (n=9)	7.7 \pm 2.3(^{††}) (n=8)	101.0 \pm 13.6(**)(^{†††}) (n=10)	42.0 \pm 9.8(**)(^{†††}) (n=10)
CrGly + GalN	66.32 \pm 17.22(†) (n=5)	119.8 \pm 5.1(**)(^{†††}) (n=5)	85.9 \pm 11.5(†) (n=4)	12.8 \pm 2.0(**) (n=10)	240.5 \pm 52.7(**)(^{†††})([@]) (n=9)	114.1 \pm 56.7(^{†††}) (n=9)
Comp. 48/80	209.91 \pm 32.52(**) (n=5)	106.6 \pm 11.7 (n=6)	87.4 \pm 12.5 (n=4)	9.5 \pm 1.7(*) (n=6)	68.6 \pm 28.4 (n=5)	12.0 \pm 3.4 (n=5)

Els resultats indiquen la mitja \pm l'error estàndard d'n animals. *, ** i *** indiquen ($p < 0.05$), ($p < 0.01$) i ($p < 0.001$) respecte control. †, †† i ††† indiquen ($p < 0.05$), ($p < 0.01$) i ($p < 0.001$) respecte GalN. @ indica ($p < 0.05$) respecte F1,6BP més GalN.

Les rates tractades amb C.48/80 no presenten lesió a nivell hepàtic, mesurades pels nivells d'activitat transaminasa, AST i ALT, a les 24 hores d'iniciat el tractament (Fig.4.19). En canvi les rates tractades amb CrGly i GalN mostren nivells de transaminases significativament inferiors a les tractades només amb GalN i significativament superiors a les tractades amb F1,6BP més GalN.

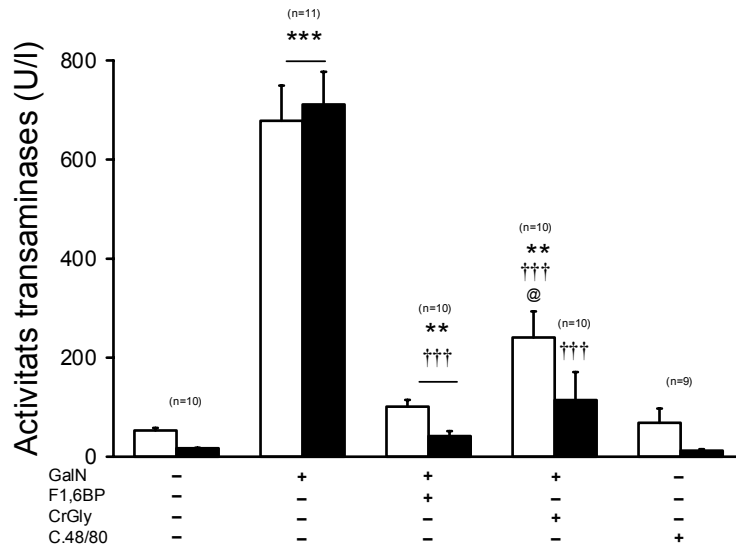


Fig.4.19 Activitats AST (□) i ALT (■) a plasma de rates 24 hores després dels diferents tractaments. Els resultats indiquen la mitja ± l'error estàndard d'n animals. * i ** indiquen (P<0.01) i (P<0.001) respecte control. ††† indica (P<0.001) respecte GalN. @ indica (p< 0.05) respecte F1,6BP més GalN.

Existeix correlació entre els nivells d'histamina, endotoxina, TNF- α i activitats transaminasa detectats en plasma de rata en els diferents tractaments. Així observem que les rates tractades amb GalN presenten nivells elevats d'histaminèmia, que correlacionen amb alts nivells d'endotoxèmia, tant a porta com a cava. L'endotoxèmia generada per GalN dona lloc a una elevada producció de TNF- α sistèmica, que desencadena en la lesió hepàtica, mesurada pels nivells plasmàtics de transaminases AST i ALT (Taula 4.3), quan el TNF- α entra en contacte amb els hepatòcits que es troben en estat d'arrest transcripcional. Quan les rates es tracten amb F1,6BP, a més de GalN, observem que es produeix una reducció significativa en tots els paràmetres abans esmentats respecte les rates tractades amb GalN sola. Només en els nivells d'endotoxèmia, mesurats a la vena porta-hepàtica i en els nivells d'activitats transaminases AST i ALT en plasma, observem nivells significativament superiors en les rates tractades amb F1,6BP i GalN respecte les tractades amb salí fisiològic.

En quant a les rates tractades amb C.48/80 observem que els elevats nivells d'histamina assolits no correlacionen amb nivells d'endotoxèmia significativament superiors als trobats en les rates control; encara que, en el cas d'endotoxèmia a porta els valors assolits són superiors als control ($p < 0.1$). Això podria explicar els nivells de TNF- α detectats en les rates injectades amb C.48/80, significativament superiors als control (Taula 4.3). No s'observa però lesió hepàtica, mesurada en l'activitat AST i ALT a plasma a les 24 hores, en aquest tractament, ja que els hepatòcits no es troben en estat d'aturada transcripcional.

En últim terme, a l'analitzar l'evolució del procés en les rates tractades amb CrGly i GalN observem similars nivells d'histamina i endotoxina en porta i en cava als de les rates tractades amb F1,6BP i GalN (Taula 4.3). En canvi, trobem valors de TNF- α plasmàtic superiors en el tractament CrGly i GalN respecte el tractament F1,6BP i GalN ($p < 0.1$). Aquest fet podria explicar el major grau de lesió hepàtica observat en el tractament CrGly més GalN, respecte el de F1,6BP més GalN, ja que en les dues situacions els hepatòcits són sensibles al TNF- α , fet que correlaciona amb que els hepatòcits es trobin en aturada transcripcional.

4.4 F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags en l'administració d'LPS en rata i inhibeix l'activació de les cèl·lules de Kupffer.

4.4.1 F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags en l'administració d'LPS.

A part de l'efecte que la F1,6BP produeix sobre els mastòcits peritoneals, de l'apartat anterior es dedueix que la F1,6BP fa un altre efecte sobre els macròfags, ja que amb els mateixos nivells d'endotoxina generats per GalN, les rates tractades amb F1,6BP presenten nivells inferiors de TNF- α , respecte les tractades amb CrGly ($p < 0.1$), (Taula 4.3).

Durant el desenvolupament del nostre treball es van publicar resultats que suggerien una inhibició, per part de la F1,6BP, de l'activació en de KC en cultiu primari, als quals s'administrava LPS (Hirokawa *et al.*, 2002);(Tamaki *et al.*, 2002). Entre els diferents paràmetres que s'estudien destaca la reducció, de fins a un 30%, en la secreció de TNF- α que la F1,6BP provoca en cultius incubats amb LPS.

Així, per corroborar aquestes evidències, vam injectar intraperitonealment diferents dosis d'LPS (0.625, 1.25, 2.5 i 5 mg/Kg de pes corporal), per estimular els macròfags de rata. Alguns dels grups de rates van ser tractades també amb F1,6BP, a

part de l'LPS, en aquest cas amb una dosi fixa de 2 g/Kg de pes corporal; vam analitzar els nivells de TNF- α en plasma obtinguts 1 hora després dels tractaments (Fig.4.20). En tots els casos les rates tractades amb F1,6BP més LPS presenten nivells inferiors de TNF- α respecte de les rates tractades només amb LPS.

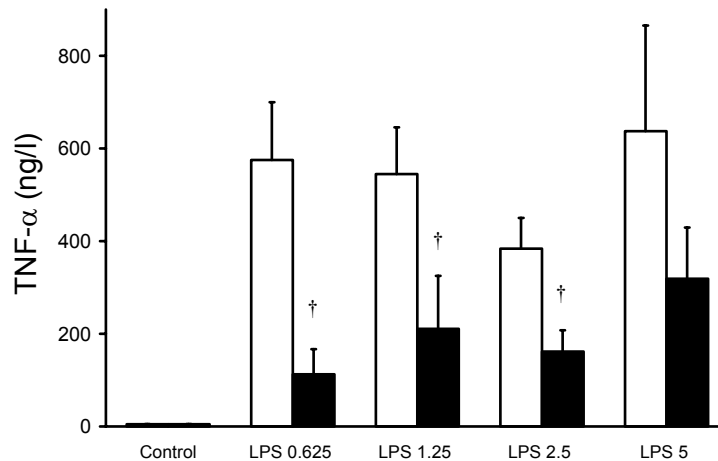


Fig.4.20 Nivells de TNF- α a plasma, mesurats 1 hora després dels tractament dels animals amb les dosis d'LPS indicades (en mg/Kg de pes corporal); no tractats (\square), o tractats (\blacksquare) amb F1,6BP. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard d'entre 4 i 6 animals. [†] indica ($P < 0.05$) respecte el tractament amb la mateixa dosi d'LPS, sense F1,6BP.

Per determinar si la quantitat d'endotoxina en sang era la mateixa en tots els casos, o si d'alguna manera la F1,6BP estava interferint en l'absorció de l'LPS cap al torrent sanguini, vam analitzar, en les mateixes mostres on havíem analitzat el TNF- α , els nivells d'endotoxina al plasma (Fig.4.21). Pot observar-se com en les dosis més altes d'LPS injectades (2.5 i 5 mg/Kg de pes corporal), l'endotoxina que arriba al torrent sanguini és inferior en els casos en que s'ha administrat també F1,6BP; en canvi en les dosis més baixes d'LPS injectades (0.625 i 1.25 mg/Kg de pes corporal), no s'observen diferències en la quantitat d'endotoxina en sang entre els dos tractaments. Per això i per efectuar futurs estudis vam decidir treballar amb les dosis baixes d'LPS.

Per determinar si la F1,6BP afectava la sensibilitat dels macròfags, mesurem el quocient entre el TNF- α i l'LPS mesurat en plasma de cada mostra, obtenint la quantitat de TNF- α secretat pels macròfags per unitat d'LPS present en plasma (Fig.4.22 A). Els resultats mostren que l'administració de F1,6BP i LPS dona lloc a produccions significativament inferiors de TNF- α per unitat d'endotoxina, respecte a les rates injectades només amb LPS. Aquesta evidència es confirma en el gràfic XY de dispersió (Fig.4.22 B), on la majoria de punts corresponents al tractament F1,6BP més LPS

(blancs), presenten nivells superiors de TNF- α (eix Y), per qualsevol concentració d'LPS mesurada (eix X), respecte dels punts corresponents al tractament amb només LPS (negres).

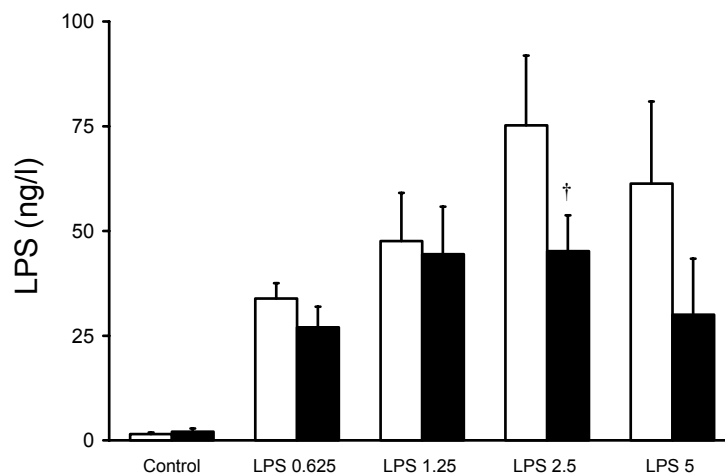
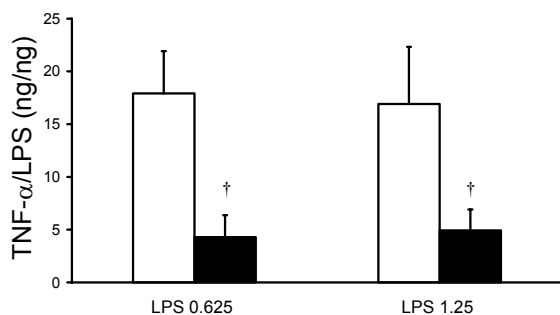


Fig.4.21 Nivells d'endotoxina a plasma, mesurats 1 hora després dels tractament dels animals amb les dosis d'LPS indicades (en mg/Kg de pes corporal); no tractats (□), o tractats (■) amb F1,6BP. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard d'entre 4 i 6 animals. † indica ($P < 0.05$) respecte el tractament amb la mateixa dosis d'LPS, sense F1,6BP.

A



B

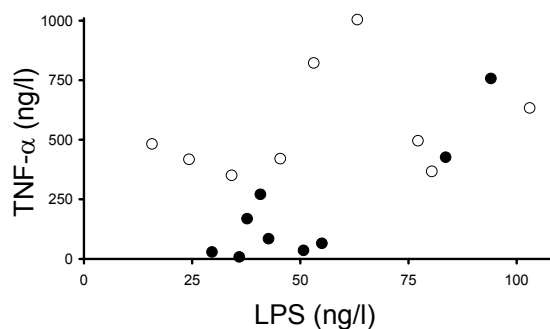


Fig.4.22 (A) Mesura del ratio de TNF- α per unitat d'endotoxina mesurada en plasma de rata 1 hora després dels tractaments amb les dosis indicades d'LPS (en mg/Kg de pes corporal); no tractats (□), o tractats (■) amb F1,6BP. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard d'entre 4 i 5 animals. † indica ($P < 0.05$) respecte el tractament amb la mateixa dosis d'LPS, sense F1,6BP. (B) Representació dels valors de tots els animals de la figura (A), tractats amb LPS, no tractats (□), o tractats (■) amb F1,6BP.

4.4.2 Efecte de la F1,6BP en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer de rata incubades amb LPS.

Un cop obtinguts aquests resultats a nivell fisiològic, vam centrar els estudis a nivell cel·lular per determinar els mecanismes, treballant amb aïllaments primaris de KC, principals productors de TNF- α en el fetge. En primer terme vam analitzar la

resposta de les KC a diferents dosis d'LPS en quant a la secreció de TNF- α (Fig.4.23). Un cop observats els resultats vam decidir utilitzar la dosi d'LPS de 100 ng/ml, ja que produïa la màxima resposta en els macròfags.

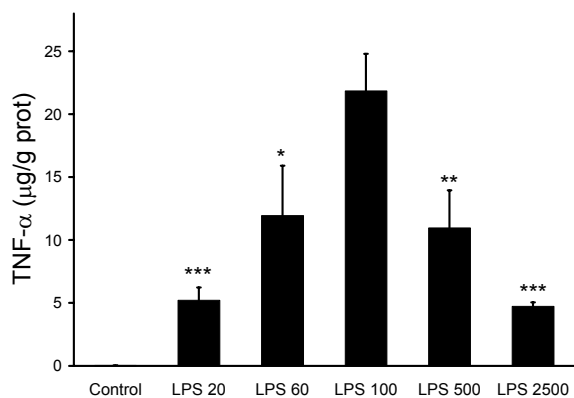


Fig.4.23 Nivells de TNF- α mesurats en el sobrenedant de KC en cultiu primari 5 hores després de l'addició de dosis creixents d'LPS (en ng/ml). Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 7 aïllaments independents. *, ** i *** indiquen ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control.

Vam observar que la F1,6BP reduïa en un 50% la secreció de TNF- α induïda per LPS en les KC (Fig.4.24).

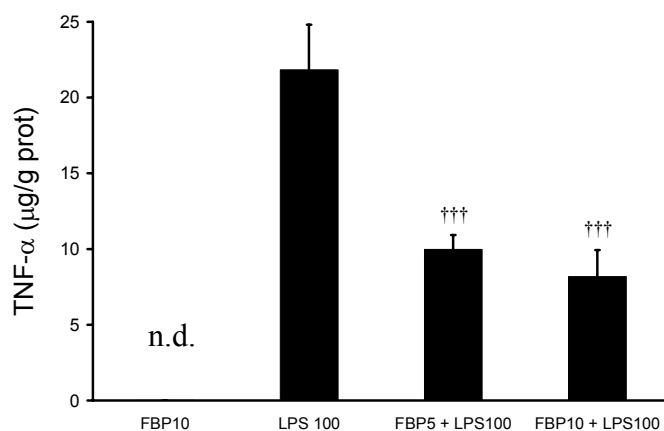


Fig.4.24 Nivells de TNF- α mesurats en el sobrenedant de KC en cultiu primari 5 hores després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 8 aïllaments independents. ††† indica ($P < 0.001$) respecte tractament amb LPS (en ng/ml).

4.4.3 Efecte de la F1,6BP sobre la via de l'NF κ B en cèl·lules de Kupffer.

Un cop observat que la F1,6BP disminuïa la secreció de TNF- α de les KC estimulades per LPS, vam analitzar si la via de l'NF κ B estava inhibida. L'LPS unit a l'LBP i al CD14, un cop interactua amb el TLR-4, envia una senyal intracel·lular que dona lloc a l'activació de la via de l'NF- κ B. En concret vam investigar si en presència de F1,6BP es reduïa la unió de la subunitat p65 del factor de transcripció NF- κ B al

DNA de KC en cultiu primari (Fig.4.25). Observem que aquestes cèl·lules tenen un nivell basal d'activació de la via de l'NFκB i que, en administrar LPS, aquest augmenta significativament. Quan s'administra F1,6BP (5mM), conjuntament amb l'LPS, els nivells d'unió al DNA retornen pràcticament als nivells control.

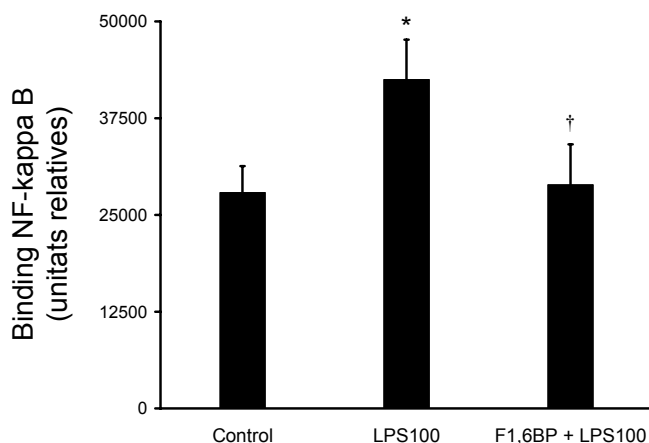


Fig.4.25 Nivells d'unió d'NFκB al DNA de nuclis aïllats de KC en cultiu primaris 90 min. després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja ± l'error estàndard de 6 aïllaments independents. * indica ($p < 0.05$) respecte control. † indica ($P < 0.05$) respecte tractament amb LPS (ng/ml).

4.4.4 Efecte de la F1,6BP en la despolarització de la membrana plasmàtica induïda per LPS en cultius primaris de macròfags peritoneals de rata.

En el procés d'activació dels macròfags l'LPS indueix la despolarització de la membrana plasmàtica, ja que propicia el moviment d'ions (Ikejima *et al.*, 1997);(Kitagawa *et al.*, 1985). Degut a la correlació existent entre la despolarització de la membrana plasmàtica dels macròfags i la seva activació, induïts per LPS, ens vam plantejar que la F1,6BP, com a possible mecanisme d'acció alhora de reduir l'activació dels macròfags, podia modular la despolarització de membrana causada per LPS en aquest tipus cel·lular.

Mitjançant la citometria de fluxe i utilitzant una sonda fluorescent sensible als canvis de potencial de membrana plasmàtica vam estudiar l'efecte de l'LPS sobre els cultius primaris de macròfags peritoneals de rata. Observem que l'LPS causa despolarització de la membrana plasmàtica dels macròfags peritoneals, mesurada 5 hores després de la seva administració. La sonda utilitzada en aquests estudis, DIBAC4(3), incrementa la seva emissió fluorescent de manera proporcional i específica a l'increment en la despolarització de la membrana plasmàtica cel·lular (Bortner *et al.*,

2001). Com a control positiu s'utilitza la digitonina que permeabilitza la membrana plasmàtica i provoca la despolarització de la cèl·lula (Fig.4.26).

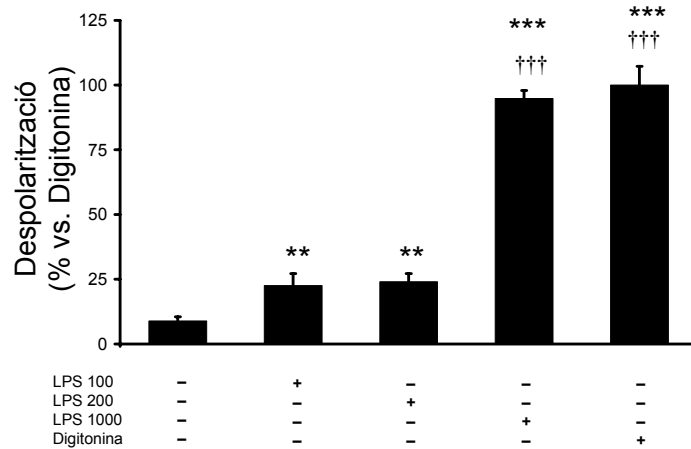


Fig.4.26 Despolarització de la membrana plasmàtica en cultius primaris de macròfags peritoneals 5h. després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 6 aïllaments independents. ** indica ($p < 0.01$) i *** indica ($p < 0.001$) respecte cèl·lules control. ††† indica ($P < 0.001$) respecte tractament amb LPS 100 ng/ml.

La F1,6BP administrada als macròfags inhibeix la despolarització causada per l'LPS; fins i tot evoca a la cèl·lula a uns nivells de polaritat superior a l'estat control, és a dir que hiperpolaritza la membrana plasmàtica (Fig.4.27). Per un altre costat pot observar-se com la GalN també despolaritza la membrana plasmàtica dels macròfags, reforçant la hipòtesi d'una acció inespecífica de la GalN a nivell de la membrana plasmàtica.

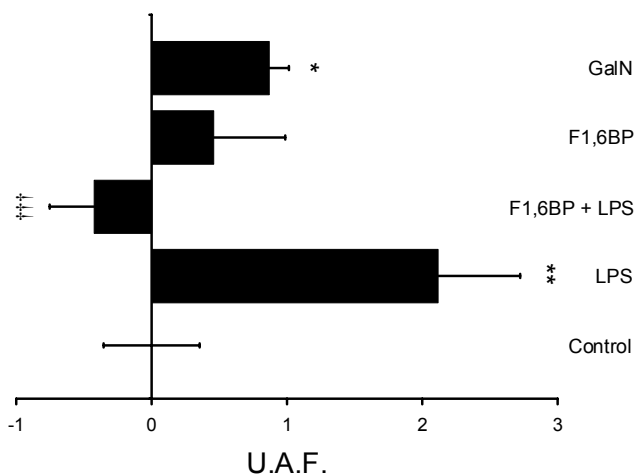


Fig.4.27 Despolarització de la membrana plasmàtica en cultius primaris de macròfags peritoneals 5h. després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 7 aïllaments independents. * indica ($p < 0.05$) i ** indica ($p < 0.01$) respecte cèl·lules control. ††† indica ($P < 0.001$) respecte tractament amb LPS 100 ng/ml.

4.5 La F1,6BP evita la inflamació causada per GalN i disminueix els efectes de l'endotoxèmia actuant sobre els canals de potassi.

4.5.1 Paper dels canals de potassi en l'hepatitis induïda per GalN en model de rata.

Després d'haver caracteritzat els efectes de la F1,6BP en la lesió originada per la GalN i en l'endotoxèmia, tant a nivell *in vivo* com en cultius primaris, vam centrar els estudis en els mecanismes d'acció de la F1,6BP que expliquessin els seus efectes pleiotròpics.

En un treball previ del nostre grup s'observa que la F1,6BP disminueix els fluxos actius i passius de potassi en hepatòcits de rata aïllats (Roig *et al.*, 1997). En els mateixos estudis es demostra que l'administració de GalN en aquests cultius dona lloc a un flux de sortida de potassi i que aquest era revertit per l'addició de F1,6BP. En altres treballs es demostra que l'obertura dels canals de potassi és un pas essencial en la resposta inflamatòria dels macròfags (Blunck *et al.*, 2001) i dels mastòcits (Duffy *et al.*, 2001), a l'estimulació amb endotoxines. Amb aquestes evidències vam hipotetitzar que la F1,6BP podria estar actuant com a inhibidor dels canals de potassi en els diferents sistemes.

La quinina, un tancador inespecífic dels canals de potassi, administrada conjuntament amb la GalN evita totalment la lesió induïda pel sucre aminat en model de rata (Fig.4.28). Com a obridor de canals de potassi hem utilitzat el minoxidil, que és més específic dels canals de potassi ATP-dependents, però que fa efecte en tots els tipus de canals de potassi. L'administració conjunta de GalN i minoxidil dona lloc a una lesió molt superior a la produïda per la sola administració de GalN, mesurada pels nivells d'activitats transaminasa en plasma. La F1,6BP, encara que rebaixa en part la lesió, esdevé ineficaç en la protecció de la lesió produïda per GalN quan també s'administra l'obridor de canals de potassi. L'administració de minoxidil sol, o combinat amb TNF- α , no produeix cap lesió hepàtica (Fig.4.28), la qual cosa indica que perquè això succeeixi és necessària l'acció de la GalN.

4.5.2 Els canals de potassi influeixen en la sensibilitat dels macròfags a l'LPS.

La quinina administrada conjuntament amb l'LPS (1.25mg/Kg de rata) redueix significativament la resposta dels macròfags a l'LPS en rata, determinada per

l'alliberament de TNF- α (Taula 4.4). Altrament, quan s'injecta el triple tractament minoxidil, F1,6BP i LPS, els macròfags recuperen la sensibilitat normal a l'LPS.

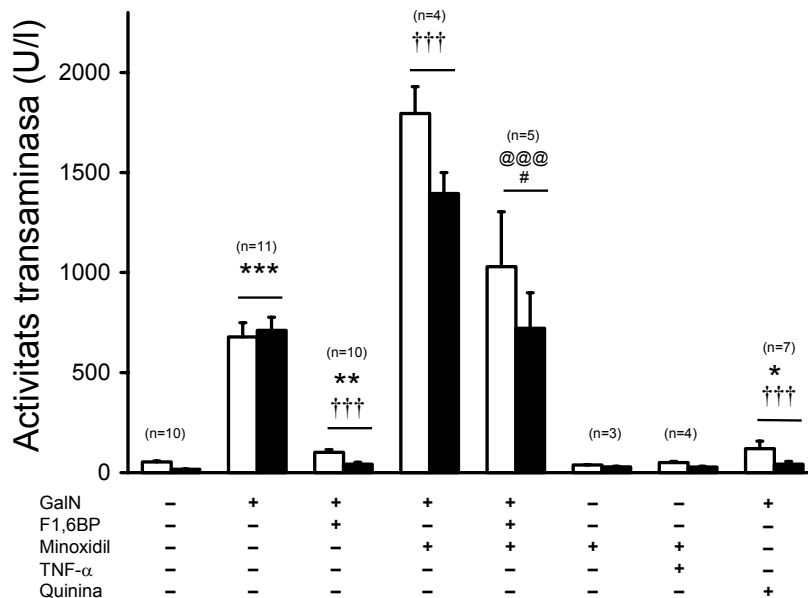


Fig.4.28 Activitats AST (\square) i ALT (\blacksquare) a plasma de rates 24 hores després dels diferents tractaments. Els resultats indiquen la mitja \pm l'error estàndard d'n animals. *, ** i *** indiquen ($p < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control. ††† i @@@ indiquen ($P < 0.001$) respecte els tractaments GalN i F1,6BP+GalN, respectivament. # indica ($p < 0.05$) respecte minoxidil més GalN.

4.5.3 Els canals de potassi estan implicats en la secreció de TNF- α en les cèl·lules de Kupffer estimulades per LPS.

Després de comprovar a nivell fisiològic el possible paper dels canals de potassi com a diana d'acció de la F1,6BP, vam dirigir l'experimentació al nivell de cultius primaris de KC, per determinar el mecanisme. En els cultius de KC, com a tancadors de canals de potassi vam utilitzar la combinació de tetraetilamoni (TEA) i 4-aminopiridina (4-AP). Quan administrem als cultius els tancadors de canals de potassi TEA i 4-AP de manera conjunta a l'LPS, observem una reducció del 50% en la secreció de TNF- α per part de les KC (Fig.4.29). Per contra, com a obridors de canals de potassi usem el minoxidil sulfat i l'àcid pimàric, a diferents dosis. Observem que en tots dos casos quan afegim l'obridor de canals de potassi a la F1,6BP més LPS, es recupera la secreció de TNF- α que produïa per si sol l'LPS. Per tant, els activadors de canals de potassi reverteixen l'efecte inhibitor de la F1,6BP.

Taula 4.4 Nivells plasmàtics d'LPS, TNF- α i ratio TNF- α /LPS, determinats 1 hora després dels diferents tractaments.

	LPS (ng/l)	TNF- α (ng/l)	Ratio TNF- α /LPS
Control	3.0 \pm 0.3 (n=4)	12.5 \pm 6.9 (n=4)	3.6 \pm 1.7 (n=4)
LPS	55.2 \pm 9.5 (**) (n=9)	554.9 \pm 74.7 (***) (n=9)	12.9 \pm 2.7 (*) (n=9)
F1,6BP + LPS	52.2 \pm 7.4 (n=9)	205.3 \pm 82.6 (††) (n=9)	3.3 \pm 1.0 (††) (n=9)
Min + F1,6BP + LPS	29.1 \pm 4.9 (†) (@) (n=6)	266.8 \pm 71.6 (†) (n=6)	10.1 \pm 3.5 (@) (n=6)
Quinina + LPS	23.7 \pm 4.4 (†) (n=4)	44.4 \pm 28.7 (††) (n=4)	1.5 \pm 0.8 (††) (n=4)

(Els resultats indiquen la mitja \pm l'error estàndard d'n animals. *, ** i *** indiquen (p<0.05), (P<0.01) i (P<0.001) respecte control. †, †† i ††† indiquen (p<0.05), (P<0.01) i (P<0.001) respecte LPS. @ indica (p< 0.05) respecte F1,6BP més LPS.)

4.5.4 La F1,6BP inhibeix els canals de potassi i rebaixa l'activació per LPS de les cèl·lules de Kupffer.

L'obertura dels canals de potassi és un event necessari en l'activació dels macròfags per part de l'LPS (Blunck *et al.*, 2001).

Vam estimar el fluxe de potassi a partir del fluxe de $^{86}\text{Rb}^+$ a KC en cultiu primari (Cossins *et al.*, 1994). Dels nivells de radioactivitat mesurats en els medis de cultiu cel·lulars pot deduir-se que les cèl·lules estimulades amb LPS presenten un flux de $^{86}\text{Rb}^+$ al través dels canals de potassi significativament superior als fluxes control, que representen el flux basal d'aquests canals en els macròfags (Fig.4.30). S'obtenen fluxes

de $^{86}\text{Rb}^+$ superiors quan s'administra sulfat de minoxidil. La combinació de tancadors de canals de potassi TEA i 4-AP sols, o afegits a l'LPS disminueixen els fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$, fins i tot per sota dels nivells basals. Per altra banda, la F1,6BP en ser administrada sola o conjuntament amb l'LPS, té un efecte similar al produït pels tancadors de canals de potassi, ja que disminueix significativament el flux de $^{86}\text{Rb}^+$ de les KC. Finalment, s'observa que quan s'administra la triple combinació sulfat de minoxidil, F1,6BP i LPS, s'obtenen fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$ similars als obtinguts quan s'afegeix minoxidil sulfat, o LPS als cultius (Fig.4.30).

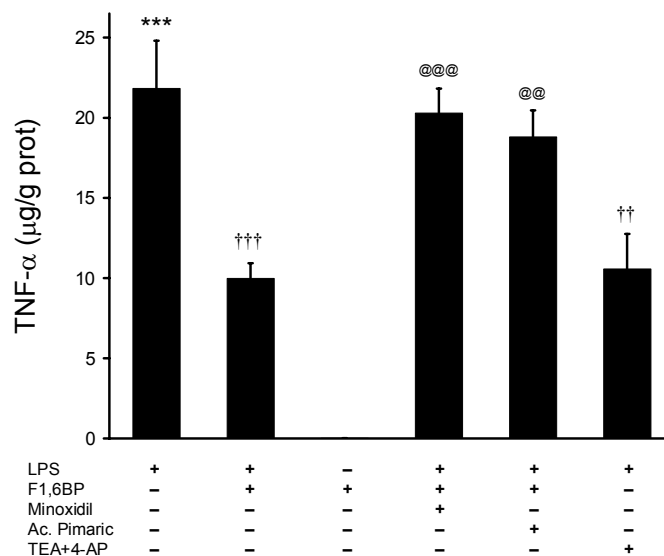


Fig.4.29 Nivells de TNF- α mesurats en el sobrenedant de KC en cultiu primari 5 hores després dels tractaments indicats. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 8 aïllaments independents. *** indica ($p < 0.05$) respecte F1,6BP. †† i ††† indiquen ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte LPS. @@ i @@@ indica ($p < 0.01$) i ($p < 0.001$) respecte F1,6BP més LPS

Existeix una correlació entre els fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$ i els nivells de TNF- α detectats en els cultius primaris de KC. Quan s'incuben les cèl·lules amb LPS hi ha un increment en els fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$ que correlaciona amb una elevada secreció de TNF- α (Fig.4.30). Per un altre costat quan s'afegeix, conjuntament a l'LPS, F1,6BP, o bé la combinació de tancadors de canals de potassi TEA i 4-AP s'observa una significativa disminució en els fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$ que correlaciona amb una davallada, també significativa, en la secreció de TNF- α . Finalment es constata que les cèl·lules a les quals s'afegeix minoxidil sulfat, F1,6BP i LPS, presenten uns elevats fluxes de $^{86}\text{Rb}^+$ que correlacionen amb nivells elevats de secreció de TNF- α , demostrant-se així que es perd l'efecte que produïa la F1,6BP afegida als cultius incubats amb LPS.

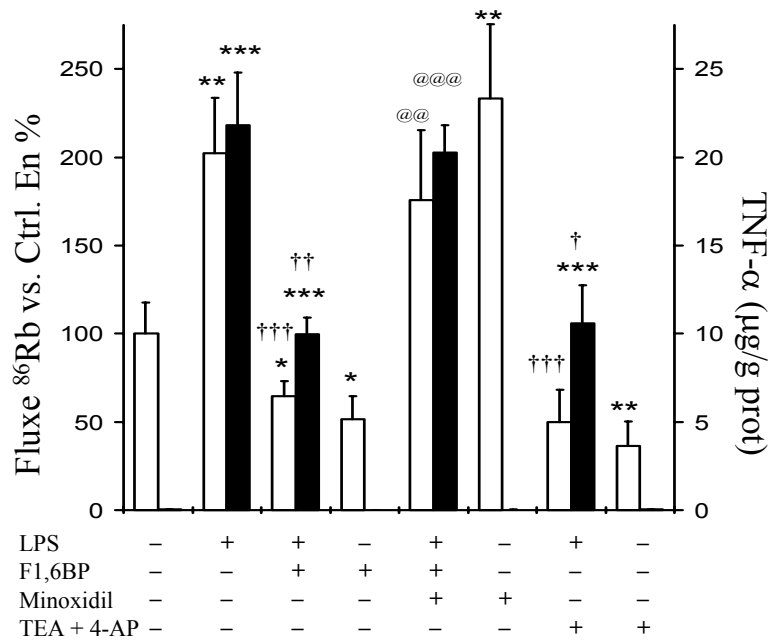


Fig.4.30 Mesura de la permeabilitat de membrana al K^+ , usant el traçador $^{86}Rb^+$, (\square) i nivells de TNF- α , (\blacksquare), mesurats en el sobredant de KC en cultiu primari en intervals de 10 min. i 5h. després dels tractaments indicats, respectivament. Cada barra representa la mitja \pm l'error estàndard de 6 a 10 aïllaments independents. *, ** i *** indiquen ($p < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte control. †, †† i ††† indiquen ($p < 0.05$), ($P < 0.01$) i ($P < 0.001$) respecte LPS. @@ i @@@ indiquen ($p < 0.01$) i ($p < 0.001$) respecte F1,6BP més LPS.

5 DISCUSSIÓ.

5.1 L'administració de F1,6BP redueix l'apoptosi i la inflamació hepàtica induïda per GalN en rata i l'apoptosi i citotoxicitat en cultius primaris d'hepatòcits.

La GalN és un compost hepatotòxic que administrat per via intraperitoneal en dosis subletals, causa una inflamació portal i parenquimal que desencadena en una mort per necrosi dels hepatòcits (Stachlewitz *et al.*, 1999).

La F1,6BP és un intermediari glicolític que s'ha utilitzat com a hepatoprotector en model de rata en la lesió induïda per CCl₄ (Rao *et al.*, 1989) i per paracetamol (Mihas *et al.*, 2003). Diferents grups van observar que la F1,6BP evitava el dany hepàtic causat per la GalN en rata (Markov *et al.*, 1991);(De Oliveira *et al.*, 1992). En els nostres experiments comprovem que a l'administrar conjuntament F1,6BP a les rates tractades amb GalN s'evita la lesió induïda per GalN, mitjançant l'anàlisi del nivell d'activitats transaminasa a les 24 hores després del tractament (Fig.4.1). S'ha de constatar però, que la protecció que confereix la F1,6BP no reverteix totalment la lesió induïda per GalN, quan es compara amb el grup de rates control, tractades amb salí fisiològic. Aquest resultat evidenciava que la F1,6BP no estava evitant tots els efectes causats per l'administració de GalN en rata.

Vam comprovar que el dany necròtic és manifestava més enllà de les 12 hores després del tractament amb GalN en model de rata (Fig.4.2 A i B), observant-se lesions tissulars derivades del procés inflamatori i apreciant-se cèl·lules parenquimals amb un alt grau de condensació de la cromatina del DNA, característica de l'apoptosi. (Fig.4.3). Tots aquests efectes es reduïen amb l'administració conjunta de F1,6BP més GalN. Aquestes evidències indicarien que la mort inflamatòria estaria precedida per una mort per apoptosi en les rates tractades amb GalN, fet que està d'acord amb els resultats observats per altres grups (Muntane *et al.*, 1998);(Stachlewitz *et al.*, 1999).

Observem gran nombre de cèl·lules TUNEL positives en el tractament de GalN (Taula 4.1); nombre que es veu reduït de manera significativa amb l'administració conjunta de F1,6BP i GalN. Aquests resultats, però, no concorden amb un treball (Fortes Aiub *et al.*, 2003), on els autors afirmen que la F1,6BP manté els nivells cel·lulars d'ATP, fet que protegeix la cèl·lula de l'acció tòxica de la GalN, reduint el percentatge de cèl·lules mortes i causant una alteració al patró de mort cel·lular. Les rates tractades amb F1,6BP més GalN presenten uns valors de necrosi inferiors a les tractades amb GalN; en canvi presenten valors de cèl·lules positives per TUNEL

superiors. Els autors fan l'equivalència de cèl·lules positives per TUNEL amb cèl·lules mortes per apoptosi, encara que existeix un solapament amb la necrosi. Per establir la mort per apoptosi caldria realitzar una prova específica d'apoptosi, com és la de la caspasa 3, fet que permetria validar les conclusions que apareixen al treball.

Ens va semblar interessant intentar resoldre la incògnita que es generava en aquest treball; volíem saber si la F1,6BP augmentava la relació apoptosi/necrosi en la protecció del dany hepàtic generat per la GalN. Vam constatar que l'administració de GalN en rata induïa apoptosi, mesurada per detecció immunohistoquímica de la forma activa de la caspasa 3 (Fig.4.5), a les 18 hores del tractament, i que l'administració conjunta de GalN i F1,6BP reduïa la mort apoptòtica en un 95%, respecte el tractament de GalN. Aquests resultats estan d'acord amb altres treballs on es descriu, en model de rata, que la GalN indueix l'activació de la caspasa 3, tant hepàtica com plasmàtica, a partir de les 6 hores i en majors nivells a les 24 hores després del tractament (Gujral *et al.*, 2003);(Siendones *et al.*, 2003).

Un cop establert el model de lesió de la GalN *in vivo* i la reversió per part de la F1,6BP, vam utilitzar cultius primaris d'hepatòcits de rata, fet que ens permetria estudiar, d'una manera més directa i precisa, els mecanismes d'acció de la GalN i de la F1,6BP sobre els hepatòcits.

En un treball precedent del nostre grup es va analitzar l'efecte de la GalN i de la F1,6BP en hepatòcits de rata en suspensió (Roig *et al.*, 1994). En el treball es demostra que la GalN causa una davallada en la viabilitat cel·lular, en el contingut d'ATP i de F2,6BP (Taula 1.1). Tots aquests efectes són revertits per l'acció de la F1,6BP, quan aquesta és administrada als cultius a la vegada que la GalN. En els presents resultats, en aquest cas en cultius primaris d'hepatòcits de rata, observem que la GalN causa una forta davallada en la viabilitat cel·lular, fet confirmat per altres estudis (Siendones *et al.*, 2003) i que aquesta es reverteix amb la prèvia administració de F1,6BP, mesurada pels nivells d'activitat LDH al sobrenedant, mesura de mort per necrosi (Fig.4.6).

Diferents resultats demostren que la GalN indueix apoptosi en cultius primaris d'hepatòcits, mesurada mitjançant l'activitat caspasa 3, la condensació del DNA o la fragmentació del DNA en hepatòcits (Muntane *et al.*, 1998);(Siendones *et al.*, 2003). Volíem comprovar si l'addició de F1,6BP als cultius podia evitar l'apoptosi induïda per GalN. Observem, amb la mesura de l'aparició de nuclis hipodiploids amb el citòmetre de fluxe, que la F1,6BP reverteix l'apoptosi generada per l'administració de GalN als cultius primaris d'hepatòcits (Fig.4.7).

Podem concloure que l'administració en rates i cultius primaris d'hepatòcits de F1,6BP, conjuntament amb GalN, redueix significativament el dany induït per GalN. Disminueix els índexos d'apoptosi, l'efecte citotòxic i, en el cas del teixit, tot el procés inflamatori causat per l'hepatotòxic.

5.2 La F1,6BP no redueix la sensibilització dels hepatòcits al TNF- α induïda per GalN. Diferències entre el model in vivo i els cultius primaris d'hepatòcits.

5.2.1 L'administració de F1,6BP no recupera l'activitat transcripcional dels hepatòcits inhibits pel metabolisme de la GalN.

Un cop comprovat que l'administració de F1,6BP redueix l'apoptosi i necrosi induïda per GalN sobre els hepatòcits en fetge de rata, en cultius primaris i en línies d'hepatòcits, vam centrar la investigació en els mecanismes d'acció de la F1,6BP.

Un dels efectes característics de l'acció de la GalN sobre els hepatòcits i que es relaciona amb els seus efectes lesius, deriva de l'específica metabolització que pateix el sucre aminat per aquest tipus cel·lular (Bertoli *et al.*, 1966);(Dunn *et al.*, 1980). Aquest procés dona lloc a una davallada en el contingut cel·lular d'uridina i a l'aturada de la maquinaria transcripcional per falta de substrat i conseqüentment a la inhibició traduccional (Keppler *et al.*, 1974);(Konishi *et al.*, 1974). L'administració exògena d'uridina restableix l'activitat transcripcional i traduccional cel·lular degut a que recupera els nivells d'uridina (Konishi *et al.*, 1974), inclús quan s'injecta als animals 6 hores després de la GalN (El Mofty *et al.*, 1975). Per contra, existien evidències que apuntaven en la direcció de que la F1,6BP no restabliria l'activitat transcripcional; així el grup de De Oliveira *et al.* (1992), havien comprovat, en model de rata, que amb l'administració de F1,6BP, juntament a la GalN, no disminuïen els nivells de GalN-1-P i de UDP-hexoses, augmentats pel sucre aminat, ni es recuperava el contingut d'uridina (De Oliveira *et al.*, 1992). Els nostres resultats sobre la incorporació d'³H-uridina a l'mRNA en cultius primaris d'hepatòcits confirmen que la F1,6BP no recupera els hepatòcits de l'aturada transcripcional induïda per GalN (Fig.4.8).

5.2.2 La F1,6BP necessàriament ha d'inhibir la secreció de TNF- α per protegir el fetge de la lesió induïda per GalN.

A part dels efectes de la GalN sobre els hepatòcits derivats de la seva metabolització i interacció amb la seva membrana plasmàtica, es clau el paper d'una

citcuina pro-inflamatòria, el TNF- α , en la lesió que indueix la GalN en fetge de rata (Josephs *et al.*, 2000). Aquest és, doncs, un altre punt susceptible de ser estudiat en la recerca del mecanisme d'acció de la F1,6BP envers els efectes de la GalN.

El TNF- α és una molècula endògena que és sintetitzada pels macròfags en resposta a diferents estímuls, entre ells l'LPS, l'interferó- γ (IFN- γ), PMA i zimosan (Werling *et al.*, 2004). Quan el TNF- α interacciona amb la membrana de l'hepatòcit ho fa a través del receptor de TNF-1 (TNFR-1) i no pas a partir del TNFR-2, ni del receptor de FAS (Leist *et al.*, 1995);(Shimizu *et al.*, 2005). El TNF- α únicament indueix apoptosi i posterior necrosi hepàtica en model de rata en el cas que els hepatòcits es trobin en situació d'aturada transcripcional, ja sigui per l'addició de GalN o ActD (Leist *et al.*, 1994).

Ens vam plantejar si la GalN, en model de rata, podia lesionar el fetge en absència de TNF- α . El pretractament dels animals amb GdCl inhiuix l'acció dels macròfags (Brown *et al.*, 1997), ja que aquestes cèl·lules queden col·lapsades en fagocitar aquesta substància. Els macròfags esdevenen insensibles als estímuls i no secreten les molècules pro-inflamatòries habituals, cas del TNF- α (Louis *et al.*, 1997). En els nostres resultats observem que les rates pretractades amb GdCl, 24h abans d'afegir GalN, presenten nivells basals d'activitats transaminases plasmàtiques (Fig.4.1); és a dir que la GalN no causa lesió hepàtica en absència de la resposta dels macròfags.

Per relacionar de manera inequívoca la lesió hepàtica induïda per GalN amb la necessària participació del TNF- α , diferents grups van utilitzar anticossos anti-TNF- α en la lesió originada per GalN, observant-se una disminució en la mort per apoptosi dels hepatòcits (Stachlewitz *et al.*, 1999) i la posterior mort inflamatòria (Lozano *et al.*, 2003). Aquestes evidències indicaven que, en aquest model de lesió hepàtica, tant la GalN com el TNF- α són necessaris però no suficients per produir la lesió.

Així, degut al paper clau del TNF- α en la lesió induïda per GalN, vam questionar-nos si la F1,6BP disminuïa els nivells de TNF- α induïts per GalN (Lozano *et al.*, 2003), com a possible mecanisme d'acció alhora de protegir el fetge de la lesió hepàtica. Observem que la F1,6BP disminueix significativament els nivells de TNF- α , tant en plasma (Fig.4.9), com en fetge total (Fig.4.10), augmentats tots ells en presència de GalN i també s'observa que aquest fet implica protecció a nivell hepàtic (Fig.4.1).

Finalment i per acabar d'entendre la importància del TNF- α en la lesió induïda per GalN, vam analitzar quins efectes produiria l'addició de TNF- α exògen sobre rates tractades amb F1,6BP més GalN. Vam observar que amb aquest triple tractament, les rates presentaven uns nivells d'activitat transaminasa AST i ALT similars a les obtingudes amb la única addició de GalN (Fig.4.1). L'anàlisi histopatològica dels talls de fetge corresponents al triple tractament mostren un aspecte semblant als talls corresponents al tractament amb GalN (Fig.4.3). Per últim podem constatar que les rates tractades amb TNF- α , més F1,6BP i GalN presenten un nombre de cèl·lules positives per TUNEL significativament superior a les rates tractades només amb F1,6BP i GalN (Taula 4.1). Aquests resultats indiquen que a l'administrar TNF- α als animals tractats amb F1,6BP i GalN es perd la protecció conferida per la F1,6BP en la lesió induïda per GalN en fetge de rata. Això també implica que la F1,6BP ha d'estar actuant, necessàriament, en un punt anterior al de la secreció de TNF- α per part dels macròfags, ja que en cas contrari no pot prevenir la inflamació i hepatitis que origina l'administració de GalN.

5.2.3 La GalN, en absència del TNF- α , disminueix la viabilitat dels hepatòcits en cultiu primari.

L'administració de GalN en rata dóna lloc a la inducció d'endotoxèmia (Figs.4.14 i 4.15), que provoca la secreció, entre d'altres citocines, de TNF- α pels macròfags (Fig.4.9), produint-se la lesió hepàtica (Fig.4.1). En canvi quan s'administra GalN més GdCl no es produeix aquesta lesió (Fig.4.1); és a dir que en el model in vivo, la GalN, en absència de TNF- α , no lesiona el fetge. Per un altre costat, la GalN afegida als cultius primaris d'hepatòcits sí que indueix mort per apoptosi (Fig.4.7) i citotoxicitat (Fig.4.6), en absència de TNF- α . Aquests resultats s'explicarien sota la base de que els organismes disposen de sistemes excretors, no presents en els cultius cel·lulars. La GalN injectada a l'animal és parcialment metabolitzada pels hepatòcits i la resta és eliminada pels sistemes excretors de l'organisme. En canvi la GalN que no és metabolitzada pels hepatòcits en el cultiu primari roman totes les hores del tractament en contacte amb les cèl·lules. Així pensem que el punt clau podria radicar en el fet que la GalN en els cultius està molt més temps en contacte amb la membrana dels hepatòcits i que aquesta major interacció de la GalN amb la membrana podria explicar els diferents efectes sobre la viabilitat dels hepatòcits en els dos sistemes.

En els cultius primaris d'hepatòcits, el TNF- α potencia, de manera dependent de dosi, la mort per apoptosi (Fig.4.12 i Fig.4.13) i la citotoxicitat cel·lular (Fig.4.11). En tots els casos l'addició de F1,6BP als cultius tractats amb TNF- α i GalN millora els nivells d'apoptosi i de citotoxicitat dels hepatòcits.

5.3 L'administració de F1,6BP redueix l'endotoxèmia i la histaminèmia causades per la GalN en rata.

5.3.1 Les rates tractades amb F1,6BP i GalN tenen nivells baixos de TNF- α , degut a que presenten nivells baixos d'endotoxèmia.

La conclusió principal de l'apartat anterior va ser constatar que la F1,6BP estava produïnt algun efecte que disminuïa la secreció de TNF- α . Per tant l'estava produint fora dels hepatòcits, lloc principal on es focalitza la lesió induïda per GalN. Aquest raonament ens dirigia a abordar dos línies d'investigació diferents. Per un costat hi ha la possibilitat de que la F1,6BP inhibeixi per algun mecanisme la generació de l'endotoxèmia causada per l'administració de GalN (Liehr *et al.*, 1978) i que aquesta fos la causa per la qual aquestes rates presentessin nivells més baixos de TNF- α . D'altra banda, la F1,6BP podria estar afectant els macròfags, alterant la seva capacitat de resposta a l'endotoxina i així inhibint la producció de citocines pro-inflamatòries.

Per abordar el primer dels supòsits vam mesurar l'endotoxèmia a la vena cava, com un indicatiu de la quantitat d'endotoxina sistèmica. Vam comprovar que les rates tractades amb GalN presentaven elevats nivells d'endotoxèmia, amb un pic màxim a l'hora del tractament i que aquests nivells minvaven amb la coadministració de F1,6BP i GalN (Fig.4.14).

L'eliminació de l'endotoxina de la sang és un procés que el duu a terme l'MPS al fetge (Agarwal *et al.*, 1977). L'endotoxina procedent del tracte gastrointestinal arriba al fetge a través de la vena porta-hepàtica, a on és fagocitada per les KC, que el modifiquen i es secretat al sinusoid (Fox *et al.*, 1989); (Treon *et al.*, 1993). Aquest LPS modificat té molta menys capacitat d'estimular la producció de TNF- α que l'LPS nadiu; per contra té molta més afinitat d'unió als hepatòcits, que el capten i així es completa el procés de detoxificació de l'LPS del plasma sanguini. La GalN disminueix l'activitat fagocítica de l'MPS, mesurada mitjançant l'eliminació de partícules de carbó col·loidal (Liehr *et al.*, 1978). També s'ha demostrat que l'administració de F1,6BP afecta l'activitat fagocítica de l'MPS dels animals, en aquest cas augmentant-la (Markov AK

et al., 1985);(Tarsi *et al.*, 1985) i que aquesta pot ser una de les causes per les quals la F1,6BP pot evitar la lesió induïda per GalN (Markov *et al.*, 1991). Vam pensar que el fet que la F1,6BP incrementés la capacitat fagocítica de l'MPS, per tant d'eliminació de l'LPS, podia explicar els baixos nivells sistèmics d'endotoxina i per tant de TNF- α . Per tot això ens semblava interessant mesurar els nivells d'endotoxèmia directament de la vena porta-hepàtica, procedents del tracte gastrointestinal, abans del pas pel fetge i comparar-los amb els obtinguts a la mesura sistèmica a través de la vena cava. Observem un perfil similar en l'endotoxèmia generada per GalN en vena porta-hepàtica respecte de la vena cava (Fig.4.15). En el pic màxim a 1 hora detectem nivells d'endotoxina significativament superiors en vena porta, respecte de la vena cava, en el tractament de GalN i en el tractament F1,6BP més GalN (Taula 4.3). Com ja succeïa a la vena cava, els nivells d'endotoxèmia a la vena porta-hepàtica a les rates tractades amb F1,6BP i GalN són significativament inferiors als trobats a les tractades només amb GalN. Per contra, a diferència del que passava a la vena cava, els nivells d'endotoxèmia en el tractament F1,6BP més GalN a la vena porta-hepàtica, són significativament superiors als nivells mesurats a les rates control.

De tots aquests resultats podem concloure que la F1,6BP, a part dels efectes que pugui realitzar sobre els macròfags, està actuant en un punt anterior al de la translocació de l'endotoxina del tracte gastrointestinal, del budell prim a la vena porta-hepàtica.

5.3.2 L'administració de F1,6BP redueix l'endotoxèmia causada per GalN inhibint la secreció d'histamina dels mastòcits peritoneals.

S'ha comprovat que la GalN, juntament amb altres molècules aminades, indueix efectes sobre les membranes de diferents tipus cel·lulars, a part dels hepatòcits. Entre d'altres efectes la GalN indueix la inhibició de l'agregació plaquetària (Houston *et al.*, 1983) i provoca que els mastòcits peritoneals secretin histamina (Liehr *et al.*, 1978). Basant-se en aquests resultats Stachlewitz *et al.* (1999) van teoritzar que l'endotoxèmia generada per l'administració de GalN en model de rata podia estar causada pel fet que la GalN provoca la secreció d'histamina pels mastòcits i que aquest fet propiciaria la translocació bacteriana i d'endotoxina dels budells a la vena porta-hepàtica (Stachlewitz *et al.*, 1999).

L'addició de F1,6BP minva la secreció d'histamina induïda per C.48/80 (Schinetti *et al.*, 1983a) i doxorubicina en cultius de mastòcits de rata (Schinetti *et al.*,

1983b). Aquests resultats ens van suggerir que els mastòcits del peritoneu podien esdevenir una nova diana de la F1,6BP, relacionada amb el mecanisme pel qual evita la lesió causada per GalN. Vam observar que la GalN provocava una histaminèmia que es feia màxima entre la primera i la segona hora i que més enllà de les tres hores després del tractament retornava als nivells control (Fig.4.16). Amb l'addició conjunta de F1,6BP i GalN es disminueixen significativament els valors d'histamina plasmàtica. Aquests resultats poden tenir interès terapèutic sota la base de que una excessiva secreció d'histamina media en processos inflamatoris, reaccions d'hipersensibilitat i col·lapse circulatori (Figuroa *et al.*, 2001);(Schinetti *et al.*, 1983a). Podria utilitzar-se la F1,6BP per paliar o minimitzar l'efecte lesiu d'aquests processos.

5.3.3 La GalN i la histamina són necessàries però no suficients per induir translocació bacteriana i d'endotoxina.

Es considera que la GalN indueix translocació bacteriana (Dijkstra *et al.*, 1996);(Kasravi *et al.*, 1996b) i d'endotoxina al fetge (Figs.4.14 i 4.15), per la suma de dos motius. El primer d'ells és que la GalN desencadena la secreció d'histamina pels mastòcits i que la histaminèmia indueix un edema a la paret del colon, incrementant-se l'absorció de les endotoxines per la sang (Cuevas *et al.*, 1973). El segon motiu és que la GalN inhibeix l'MPS al fetge i es perd part de la capacitat d'eliminació d'endotoxines i és per això que aquestes romanen més temps al plasma, arribant-se a acumular en gran proporció (Kasravi *et al.*, 1996b);(Liehr *et al.*, 1978). Vam voler estudiar sota quines condicions es produïa la translocació i per tant l'endotoxèmia en la lesió per GalN. La injecció de C.48/80 a les rates dóna lloc a una elevada producció d'histamina (Fig.4.17), però no indueix nivells elevats d'endotoxèmia, no iniciant-se la resposta inflamatòria (Taula 4.3). Això ens indica que la histamina per si sola no permet la translocació bacteriana i d'endotoxina dels budells. Aquests resultats estan d'acord amb un treball on s'indica que la letalitat associada al xoc causat pel C.48/80 és deguda a la secreció d'histamina i que és independent de la ruta del TNF- α (Figuroa *et al.*, 2001).

Un cop vist que la histamina no era suficient per estimular la translocació bacteriana i d'endotoxina, volíem constatar si era almenys necessària. Amb l'administració conjunta de CrGly i GalN a les rates observàvem uns nivells d'histamina plasmàtica del mateix ordre que els produïts per la injecció de salí fisiològic als animals (Fig.4.17). Vam observar que a nivell de la vena porta-hepàtica les rates

tractades amb CrGly més GalN presentaven nivells d'endotoxèmia superiors a les rates control, però quatre vegades inferiors a les tractades amb GalN (Taula 4.3). Així podem concloure que la histamina potencia els efectes de la GalN.

Amb l'addició de F1,6BP, a les rates tractades amb GalN, s'observen baixos nivells d'histamina al plasma (Fig.4.16), confirmant que actua emulant l'efecte dels inhibidors de l'activació dels mastòcits; en aquest cas, els nivells d'endotoxina a porta són més de tres cops inferiors als tractats amb GalN i significativament superiors a les rates control (Taula 4.3). En canvi a nivell de la vena cava no hi ha diferència en l'endotoxèmia en les rates tractades amb F1,6BP i GalN, respecte de les rates control, fet que podria explicar-se per un increment en la capacitat fagocítica de l'MPS hepàtic propiciat per la F1,6BP (Markov AK *et al.*, 1985);(Tarsi *et al.*, 1985). El fet que l'administració de F1,6BP redueixi els nivells d'histamina incrementats per GalN i incrementi la capacitat fagocítica de l'MPS, podria explicar els baixos nivells d'endotoxina trobats a les venes porta i cava, derivats de la translocació d'endotoxina dels budells a la sang, quan son comparats amb el tractament amb GalN. En altres estudis s'ha observat que la F1,6BP redueix l'apoptosi i la translocació bacteriana quan és afegida juntament amb la solució de preservació UW, a les rates sotmeses a un transplantament d'intestí (Genesca *et al.*, 2005).

5.4 L'administració de F1,6BP rebaixa l'excessiva resposta inflamatòria dels macròfags activats per LPS.

5.4.1 La F1,6BP redueix la sensibilitat dels macròfags a l'LPS i la GalN la potencia.

De l'apartat anterior es conclou que la F1,6BP evita l'increment de TNF- α induït per GalN tallant el senyal a nivell de la secreció d'histamina. De manera independent a aquest efecte, diferents evidències apuntaven al fet que els macròfags podien esdevenir diana de l'acció de la F1,6BP. En primer lloc s'havia demostrat que la F1,6BP incrementava l'activitat fagocítica de l'MPS al fetge (Markov AK *et al.*, 1985);(Tarsi *et al.*, 1985). Per un altre costat vam comprovar que partint de similars nivells d'endotoxina a la vena porta-hepàtica, les rates tractades amb GalN i F1,6BP presentaven uns nivells de TNF- α significativament inferiors als de les rates tractades amb GalN i CrGly (Taula 4.3). Per últim, uns resultats publicats durant el

desenvolupament de la present Tesi indicaven que la F1,6BP alterava la resposta de les KC a l'LPS (Hirokawa *et al.*, 2002);(Tamaki *et al.*, 2002).

Per comprovar si la F1,6BP alterava la resposta inflamatòria dels macròfags en model de rata, vam utilitzar la injecció d'LPS com a model d'endotoxèmia. L'LPS s'utilitza habitualment ja que produeix un efecte mimètic al xoc sèptic (Wolff, 1973), causant de complicacions a diferents sistemes orgànics i desencadenant d'uns elevats nivells de mortalitat en l'home (Bautista *et al.*, 1990). La sensibilitat a l'LPS varia dins de les diferents espècies animals. Alguns animals són sensibles a baixes dosis d'LPS (μ grams/Kg de pes corporal), cas dels humans, els conills i els porcs (LPS-sensibles) (Ben Shaul *et al.*, 1999). Per un altre costat hi ha d'altres espècies, com ara la rata, el ratolí i el mandril, que presenten una baixa sensibilitat, inclús a dosis d'LPS de miligrams per Kg de pes corporal (LPS-resistents).

És per això que vam utilitzar elevades dosis d'LPS (miligrams/Kg de pes corporal) en els nostres experiments en rata. Vam observar que les rates tractades amb F1,6BP més LPS donaven lloc a una reducció significativa en la secreció de TNF- α , respecte de les tractades amb LPS, per unitat d'LPS mesurat a plasma (Fig.4.22 A i B). És a dir que la F1,6BP estava alterant l'efecte que l'LPS induïa sobre els macròfags, reduint la resposta inflamatòria.

L'administració de GalN incrementa la sensibilitat dels animals, tant els LPS-resistents, com els LPS-sensibles, als efectes letals de l'LPS (Galanos *et al.*, 1979). En el cas de les rates, la GalN altera dràsticament la resposta dels macròfags a l'LPS. S'observen els mateixos nivells plasmàtics de TNF- α i la mateixa taxa de mortalitat en les rates tractades amb dosis d'LPS de mg/Kg de pes corporal, que en les tractades amb GalN i dosis d'LPS de μ grams/Kg de pes corporal (Bahrami *et al.*, 1994). Això es deu a que els hepatòcits es troben en aturada transcripcional i són molt més sensibles al TNF- α ; a part d'altres efectes sistèmics que provoca l'endotoxèmia.

5.4.2 La F1,6BP redueix l'activació dels cultius primaris de cèl·lules de Kupffer induïts per LPS.

La F1,6BP incrementa l'activitat fagocítica de l'MPS en el fetge (Markov AK *et al.*, 1985);(Tarsi *et al.*, 1985), augmentant-se la velocitat d'eliminació de les endotoxines. Aquest fet podria explicar, almenys en part, que els macròfags secretessin menys quantitat de TNF- α en resposta a les mateixes quantitats d'LPS plasmàtic en

model de rata. En el cas dels cultius primaris de KC, no disposem del sistema MPS d'eliminació de l'LPS, ja que no són presents els hepatòcits. Vam observar, en el cas dels cultius de KC, que l'administració de F1,6BP redueix la secreció de TNF- α induïda per LPS (Fig.4.24) i es veu alterada la via de l'NF κ B, activada per l'LPS. En concret, s'observa que amb l'administració de F1,6BP es redueix la unió de la subunitat p65 del factor de transcripció NF- κ B al DNA, quedant inhibida la via (Fig.4.25).

Aquests resultats es contraposen als obtinguts pel grup de l'Edde et al. (1998), on s'indica que la F1,6BP no disminueix l'activació de l'NF κ B induïda per LPS en macròfags alveolars i que en canvi, sí que actua degradant l'mRNA de l'iNOS, com a conseqüència de la capacitat quelant de calci de la F1,6BP (Edde *et al.*, 1998); segons l'autor, això explicaria la baixa concentració d'NO trobada al sobrenedant. Moltes són les causes que poden explicar aquesta contradicció. El fet d'utilitzar una línia de macròfags alveolars de rata, immortalitzada, pot donar lloc a variacions substancials en les vies de senyalització, com el cas de la via de l'NF κ B. En aquests experiments la F1,6BP s'afegeix al cultiu 4 hores abans que l'LPS, amb la possible degradació de la F1,6BP a formes mono i no fosforilades, donant lloc a possibles alteracions en l'efecte de la F1,6BP.

5.5 L'addició de F1,6BP indueix la inactivació dels canals de potassi, com a mecanisme d'acció per evitar els efectes de la GalN i de l'endotoxèmia.

5.5.1 Els canals de potassi modulen la lesió induïda per GalN i la sensibilitat dels macròfags a l'LPS en model de rata.

En diferents treballs s'associa l'activació dels canals de potassi amb la citotoxicitat induïda per GalN als hepatòcits (Roig *et al.*, 1997) i amb l'activació de macròfags (Blunck *et al.*, 2001);(Czaika *et al.*, 2000);(Qiu *et al.*, 2002) i mastòcits (Duffy *et al.*, 2001), estimulats per endotoxines. També s'ha observat que en alguns dels efectes de la F1,6BP hi ha associada una disminució en la sortida de potassi dels hepatòcits en suspensió quan disminueix la citotoxicitat causada per GalN (Roig *et al.*, 1997), com a conseqüència de la interacció de la F1,6BP amb la membrana dels eritròcits (Galzigna *et al.*, 1986);(Rigobello *et al.*, 1982b), o bé al plasma de rates tractades amb C.48/80 (Figueroa *et al.*, 2001) , o amb extractes de la planta de baladre (Markov *et al.*, 1999).

Tot això suggereix que la F1,6BP, com a part del seu mecanisme d'acció, podia estar induint una disminució en els fluxes de sortida de potassi, evitant així la lesió induïda per GalN i els efectes derivats de l'endotoxèmia. Podria estar fent aquests efectes degut a una interacció i bloqueig directe del canal de potassi, o bé degut a la interacció amb la membrana plasmàtica, induint un senyal que propiciés la inactivació dels canals de potassi.

Observem que amb l'administració d'un inhibidor dels canals de potassi inespecífic, la quinina, es protegeix el fetge de la lesió originada per GalN (Fig.4.28) i es rebaixa significativament la sensibilitat dels macròfags per l'LPS, deduit del quocient TNF- α /LPS (Taula 4.4). Aquests dos efectes són mimètics als que es produeixen amb l'addició de F1,6BP. Contràriament, a l'administrar un activador dels canals de potassi, el minoxidil, a les rates tractades amb F1,6BP més GalN, observem uns nivells de lesió del mateix ordre als trobats a les rates tractades només amb GalN (Fig.4.28). També a l'administrar minoxidil a les rates tractades amb F1,6BP més LPS, observem uns nivells de sensibilitat dels macròfags a l'LPS similars als trobats amb l'administració d'LPS (Taula 4.4). És a dir, que l'addició de l'activador dels canals de potassi reverteix els efectes antiinflamatoris induïts per la F1,6BP contra l'administració de GalN i LPS en rata.

5.5.2 La F1,6BP induïx la inactivació dels canals de potassi, que modulen l'estat d'activació dels macròfags.

Per poder confirmar els resultats trobats *in vivo*, on es mostra que els tancadors de canals de potassi fan un efecte mimètic al de la F1,6BP, vam passar a analitzar la resposta al nivell de cultius primaris de macròfags.

Un dels principals índexos d'activació dels macròfags és el que fa referència a la seva capacitat secretora de citocines pro-inflamatòries, en concret el TNF- α , en resposta a l'LPS (Su, 2002);(Werling *et al.*, 2004). Vam estudiar la relació existent entre la capacitat secretora de TNF- α i el grau d'activació dels canals de potassi. Tal com succeïa en el model *in vivo*, a l'afegir una combinació de tancadors de canals de potassi a les cèl·lules tractades amb LPS, observem una significativa reducció en els nivells de TNF- α secretats (Fig.4.29); nivells similars als detectats en la combinació F1,6BP més LPS, reforçant la hipòtesi de que la F1,6BP, en part almenys, actua promovent la inactivació dels canals de potassi. En el cas dels cultius, també observem que a l'afegir

minoxidil sulfat, juntament amb F1,6BP i LPS, retornem als nivells de secreció de TNF- α obtingut en els cultius tractats només amb LPS.

Un altre dels efectes associats a l'activació dels macròfags per part de l'LPS és el de la despolarització de la membrana plasmàtica, per causa del moviment d'ions que propicia la interacció de les endotoxines amb els macròfags (Ikejima *et al.*, 1997);(Kitagawa *et al.*, 1985). L'addició d'LPS als macròfags dóna lloc a la despolarització de la seva membrana plasmàtica (Figs.4.26 i 4.27), que es relaciona amb el fet que l'LPS propicia l'activació dels canals de potassi. L'activació dels canals de potassi cel·lular, conjuntament amb el moviment d'altres ions, fa disminuir el potencial de membrana de la cèl·lula, causa última d'aquesta despolarització de la membrana plasmàtica. A l'afegir-se F1,6BP als cultius tractats amb LPS, els canals de potassi no s'activen i es manté el potencial de membrana i es preserva l'homeostasi iònica (Fig.4.27).

També l'addició als cultius de GalN provoca la despolarització de la membrana plasmàtica dels macròfags peritoneals (Fig.4.27), presumiblement per la seva interacció amb la membrana, alterant la permeabilitat iònica, entre elles la del potassi, fet observat en hepatòcits en suspensió (Roig *et al.*, 1997).

Per establir la relació entre l'estat d'activació dels macròfags i la permeabilitat de la cèl·lula al potassi, vam mesurar directament el fluxe de sortida del traçador radioactiu $^{86}\text{Rb}^+$ (Cossins *et al.*, 1994). Estimulant la cèl·lula amb LPS o minoxidil sulfat s'observen fluxes de sortida de potassi significativament superiors als control (Fig.4.30). A diferència del minoxidil sulfat, en el cas de l'LPS, l'increment en el fluxe de potassi coincideix amb l'activació de les KC, mesurat amb els nivells de TNF- α al medi cel·lular. Això implica que la sola activació dels canals de potassi no és suficient per provocar l'activació dels macròfags. Per contra, quan afegim una combinació de tancadors de canals de potassi, o bé F1,6BP, als macròfags tractats amb LPS, s'observa tant una reducció significativa en els fluxes de sortida de potassi, com en la quantitat de TNF- α secretat. Això implica que l'activació dels canals de potassi sí que és necessària per l'activació dels macròfags (Fig.4.30).

Per un altre costat veiem que la F1,6BP té un efecte mimètic al dels tancadors de canals de potassi. Aquesta evidència s'observa amb més claredat quan es comparen els efectes d'afegir únicament els tancadors de canals de potassi o bé únicament la F1,6BP; en ambdós casos s'observa una disminució significativa dels fluxes de sortida de potassi

dels cultius respecte les cèl·lules no tractades (Fig.4.30). És a dir que la F1,6BP redueix l'activació dels canals de potassi; caldria investigar, però, si ho fa de manera directa sobre el canal, o bé de menera mediada a través de la seva interacció amb la membrana, induïnt un senyal de tancament dels canals.

A la vegada que es produeix una sortida de potassi cel·lular, un ràpid increment en la concentració de calci intracel·lular, procedent del reticle endoplasmàtic i de l'exterior cel·lular, està associat a l'acció de l'LPS sobre els macròfags (Blunck *et al.*, 2001);(Wheeler *et al.*, 1999) i de la GalN sobre els hepatòcits (El Mofty *et al.*, 1975). En els resultats del nostre grup s'observa que l'addició de F1,6BP redueix el fluxe de sortida de potassi en hepatòcits en suspensió generat per GalN; en canvi amb l'addició d'EGTA, quelant de calci, no es disminueix aquest fluxe (Roig *et al.*, 1997). També hem vist que a l'afegir minoxidil sulfat als cultius de macròfags tractats amb F1,6BP i LPS es restableix el senyal, cosa que indica que l'administració de F1,6BP redueix l'activació dels canals de potassi i aquest efecte és suficient per inhibir l'activació dels macròfags, de manera independent a l'increment de calci induït per LPS.

Són molts els processos en els quals estan implicats de manera directa l'activació dels canals de potassi. Així estímuls com l'LPS (Qiu *et al.*, 2002), l'ActD (Bock *et al.*, 2002), el TNF- α (Nietsch *et al.*, 2000) o l'estaurosporina (Yu *et al.*, 1997), indueixen apoptosi mitjançant l'activació de canals de potassi. L'activació dels canals de potassi també media en els processos proliferatius dels hepatòcits (Malhi *et al.*, 2000) i en la inducció d'NO i de la resposta de l'explosió respiratòria en macròfags (Stafford *et al.*, 2002). Altres processos, com la reducció en la secreció de citocines, o la inhibició de l'apoptosi i necrosi cel·lular, estan mediat per la inhibició del fluxe de sortida de potassi, ja sigui per l'addició de tancadors de canals de potassi (Gantner *et al.*, 1995);(Qiu *et al.*, 2002), per l'addició de KCl, o el manteniment del potassi intracel·lular als cultius de limfòcits (Hughes, Jr. *et al.*, 1997).

La inducció del tancament dels canals de potassi per la F1,6BP, com un dels seus mecanismes d'acció, obre expectatives en quan a la seva aplicació en els processos en els quals estan implicats de manera directa els canals de potassi, amb especial relevància als que fan referència als processos inflamatoris.

5.6 L'administració de F1,6BP redueix la lesió causada per GalN i per l'endotoxina degut, principalment, a la seva interacció amb les membranes biològiques.

Dels estudis precedents i dels resultats aportats en aquesta Tesi, es despren que l'administració de la GalN produeix dos efectes ben diferenciats sobre les cèl·lules. Un d'ells deriva del seu metabolisme específic als hepatòcits, ja que utilitza el mateix sistema enzimàtic que metabolitza la galactosa (Bertoli *et al.*, 1966);(Dunn *et al.*, 1980). La conseqüència és una devallada en el contingut d'uridina cel·lular i una conseqüent aturada transcripcional i traduccional (Keppler *et al.*, 1974);(Konishi *et al.*, 1974). Aquests mateixos efectes no s'observen en altres tipus cel·lulars, cas de les KC, ja que presenten baixa activitat en els enzims de la via de la galactosa (Hofmann *et al.*, 1976).

El segon efecte és conseqüència de la interacció de la GalN amb les membranes cel·lulars; la més estudiada ha estat la dels hepatòcits, ja que clàssicament s'ha assignat la lesió causada per GalN als seus efectes sobre aquest tipus cel·lular. Com a conseqüència d'aquesta interacció s'han descrit alteracions en la composició de la membrana, increments en el calci citosòlic i davallada en la viabilitat cel·lular (El Mofty *et al.*, 1975); també s'ha observat que es produeix un efecte immediat sobre la membrana, previ al metabolisme de la GalN (Roig *et al.*, 1994) i que s'indueix un increment en la permeabilitat iònica pel potassi (Roig *et al.*, 1997). També s'han descrit efectes de la GalN, associats al seu grup amino, sobre les membranes d'altres tipus cel·lulars, cas de les plaquetes (Houston *et al.*, 1983) i sobre els macròfags, disminuint-se l'activitat fagocítica de l'MPS del fetge (Liehr *et al.*, 1978), o bé induint-se la despolarització de la membrana plasmàtica (Fig.4.27).

Hem comprovat que la lesió hepàtica induïda per GalN en model de rata no es deu a un efecte específic del sucre aminat sobre els hepatòcits, sinó a la seva interacció sobre altres tipus cel·lulars, inclús de teixits extrahepàtics. L'acció de la GalN sobre els mastòcits induïx histaminèmia, (Fig.4.16 i 4.17), permeabilització del budell i causa translocació bacteriana procedent de l'intestí (Dijkstra *et al.*, 1996);(Kasravi *et al.*, 1996b), provocant endotoxèmia (Figs.4.14 i 4.15). Degut a la interacció de la GalN sobre els macròfags, disminueix l'activitat fagocítica de l'MPS (Liehr *et al.*, 1978) i incrementa la sensibilitat dels macròfags a les endotoxines (Bahrami *et al.*, 1994). En definitiva, propicia l'augment dels nivells de TNF- α (Figs.4.9 i 4.10), que donen lloc a l'apoptosi (Fig.4.5) i inflamació del fetge (Fig.4.1).

La uridina i la F1,6BP s'han utilitzat tant en rates com en cultius d'hepatòcits per revertir la lesió induïda per la GalN. La uridina administrada conjuntament amb la GalN recupera el contingut d'uridina cel·lular dels hepatòcits, reactiva la transcripció de l'mRNA i la traducció proteica (Keppler *et al.*, 1974);(Konishi *et al.*, 1974). També inhibeix les alteracions de membrana, mesurades per l'activitat 5' nucleotídica, i l'increment de calci intracel·lular induït per GalN (El Mofty *et al.*, 1975); en canvi la uridina no impedeix que es produeixi l'efecte immediat generat per la GalN, previ al seu metabolisme, associat al seu efecte sobre la membrana dels hepatòcits (Roig *et al.*, 1994). En quant a l'efecte de la F1,6BP, als anteriors treballs publicats pel nostre grup es demostra que la F1,6BP té un efecte a nivell de membrana que redueix la lesió causada per la GalN; així, inhibeix l'efecte immediat generat per la GalN als hepatòcits (Roig *et al.*, 1994), també en resposta a l'acció de la GalN, impedeix l'increment del calci hepàtic (De Oliveira *et al.*, 1992), disminueix els fluxes passius de potassi i redueix el consum d'oxigen (Roig *et al.*, 1997). Paral·lelament a aquests efectes manté els nivells cel·lulars d'ATP i de F2,6BP, incrementant l'eficàcia metabòlica cel·lular (De Oliveira *et al.*, 1992).

Altres evidències recolcen la nostra hipòtesi, en el sentit de que la F1,6BP interacciona amb la membrana plasmàtica prevenint la lesió induïda per la GalN en el parènquima hepàtic. A diferència de la uridina, la F1,6BP no és capaç de reduir els nivells de GalN-1-P, ni de les UDP-hexoses quan s'administra conjuntament amb la GalN, ni tampoc recupera el contingut d'uridina (De Oliveira *et al.*, 1992) i com a conseqüència els hepatòcits no recuperen l'activitat transcripcional basal (Fig.4.8).

La gènesi de la inflamació i l'hepatitis causada per GalN en rata es deu en part a l'efecte del sucre aminat sobre les membranes d'altres tipus cel·lulars, a part dels hepatòcits. Així, la interacció de la F1,6BP amb les membranes cel·lulars redueix els efectes causats per la GalN, com la desgranulació dels mastòcits (Fig.4.16 i 4.17), inhibint-se la conseqüent endotoxèmia (Figs.4.14 i 4.15); En algun cas també s'ha vist que la F1,6BP també redueix la translocació bacteriana (Genesca *et al.*, 2005). A l'actuar sobre la membrana dels macròfags, augmenta la capacitat fagocítica de l'MPS (Markov AK *et al.*, 1985);(Tarsi *et al.*, 1985) i disminueix la seva sensibilitat a les endotoxines (Fig.4.22 A); minimitzant-se l'apoptosi (Fig.4.5) i necrosi (Fig.4.1) causada per GalN.

En l'estudi a nivell cel·lular observem que la F1,6BP inhibeix la despolarització de la membrana dels macròfags peritoneals causada pels efectes de l'LPS sobre la

membrana (Fig.4.27), redueix la sensibilitat de les KC a l'efecte de les endotoxines (Fig.4.24) i disminueix el seu nivell d'activació, mesurat per la unió de la subunitat p65 de l'NF κ B al DNA (Fig.4.25). També hem observat la correlació existent entre la inhibició dels canals de potassi induïda per F1,6BP i la reducció que produeix de la lesió causada per GalN (Fig.4.28) i de la sensibilitat dels macròfags a les endotoxines en fetge de rata (Taula 4.4).

Hem demostrat que l'efecte de la F1,6BP derivat, almenys en part, de la seva interacció sobre les membranes, és el de reduir el grau d'activació dels canals de potassi estimulats per LPS en cultius primaris de KC (Fig.4.30).

La reducció de l'activitat dels canals de potassi podria ser la causa d'altres efectes produïts per la F1,6BP, com és la inhibició de la desgranulació dels mastòcits, ja que l'activació d'aquest tipus cel·lular per les endotoxines està mediat per l'activació dels canals de potassi (Duffy *et al.*, 2001).

5.7 Relevància terapèutica de la F1,6BP.

Tots aquest resultats obren expectatives sobre l'ús terapèutic de la F1,6BP en processos inflamatoris a nivell hepàtic i degut al seu efecte pleiotròpic, potencialment en altres tipus de processos inflamatoris. També pot tenir especial interès el fet que la F1,6BP redueixi l'activació dels macròfags, activats durant l'endotoxèmia associada als processos de xoc sèptic, causant d'una elevada mortalitat (Bautista *et al.*, 1990);(Wolff, 1973); o ser utilitzat com a antihistamínic, per evitar processos inflamatoris, o reaccions d'hipersensibilitat i col·lapse circulatori (Figueroa *et al.*, 2001);(Schinetti *et al.*, 1983a). També pot ser utilitzada per aturar les reaccions al·lèrgiques, donada la seva eficàcia davant diferents activadors de la desgranulació dels mastòcits, com la GalN (Fig.4.20), el C.48/80 (Schinetti *et al.*, 1983a), o la doxorubicina (Schinetti *et al.*, 1983b). Per últim, la F1,6BP podria ser utilitzada per reduir l'apoptosi cel·lular (Bock *et al.*, 2002);(Nietsch *et al.*, 2000);(Qiu *et al.*, 2002);(Yu *et al.*, 1997) o bé per regular la proliferació cel·lular (Malhi *et al.*, 2000), en els casos en els que l'activació dels canals de potassi estigui implicada.

6 CONCLUSIONS.

- 1) La F1,6BP redueix l'apoptosi i la inflamació hepàtica en la lesió generada per GalN en model de rata. L'efecte protector de la F1,6BP contra l'apoptòsi i citotoxicitat induïda per GalN es confirma en cultiu primari d'hepatòcits.
- 2) La F1,6BP no reverteix la inhibició transcripcional induïda pel metabolisme de la GalN en els hepatòcits i aquests romanen sensibilitzats al TNF- α . Aquests resultats indiquen que *in vivo* la F1,6BP inhibeix l'activació per GalN dels mecanismes implicats en la inflamació i la producció de TNF- α .
- 3) L'efecte hepatotòxic de la GalN en rata està potenciat per la histaminèmia que genera, que s'associa a l'endotoxèmia i inflamació subsequents. L'administració de F1,6BP prevé la lesió induïda per GalN inhibint la desgranulació dels mastòcits.
- 4) L'administració de F1,6BP inhibeix la resposta inflamatòria induïda per LPS en rata. Els nostres resultats *in vivo* mostren la implicació de mecanismes associats a l'homeostasi iònica en la regulació de la sensibilitat dels macròfags a les endotoxines.
- 5) La F1,6BP redueix l'activació dels canals de potassi i la producció de TNF- α induïdes per LPS en cultius primaris de cèl·lules de Kupffer. Aquest resultat correlaciona amb una menor unió de la subunitat p65 del factor de transcripció NF- κ B al DNA, quedant inhibida la via de l'NF κ B inductora de la secreció de citocines pro-inflamatòries.

Referències.

1. Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
2. Aderem, A., and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17, 593-350.
3. Agarwal, M. K., and Lazar, G. (1977). Metabolic basis of endotoxiosis. *Microbios* 20, 183-214.
4. Alexander, B. (1998). The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 14, 376-390.
5. Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 12, 13-19.
6. Bahrami, S., Redl, H., Leichtfried, G., Yu, Y., and Schlag, G. (1994). Similar cytokine but different coagulation responses to lipopolysaccharide injection in D-galactosamine-sensitized versus nonsensitized rats. *Infect.Immun.* 62, 99-105.
7. Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 14, 649-683.
8. Bartrons, R., Hue, L., Van Schaftingen, E., and Hers, H. G. (1983). Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem.J.* 214, 829-837.
9. Bates, D. W., Parsonnet, J., Ketchum, P. A., Miller, E. B., Novitsky, T. J., Sands, K., Hibberd, P. L., Graman, P. S., Lanke, P. N., Schwartz, J. S., Kahn, K., Snyderman, D. R., Moore, R., Black, E., and Platt, R. (1998). Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group. *Clin.Infect.Dis.* 27, 582-591.
10. Bautista, A. P., and Spitzer, J. J. (1990). Superoxide anion generation by in situ perfused rat liver: effect of in vivo endotoxin. *Am.J.Physiol* 259, G907-G912.
11. Ben Shaul, V., Sofer, Y., Bergman, M., Zurovsky, Y., and Grossman, S. (1999). Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock* 12, 288-293.
12. Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J.Cell Biol.* 43, 506-520.
13. Bertoli, D., and Segal, S. (1966). Developmental aspects and some characteristics of mammalian galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 241, 4023-4029.
14. Beutler, B., and Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.* 3, 169-176.

15. Blunck, R., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., Seitzer, U., and Seydel, U. (2001). New Insights Into Endotoxin-Induced Activation of Macrophages: Involvement of a K⁺ Channel in Transmembrane Signaling. *J.Immunol.* 166, 1009-1015.
16. Bock, J., Szabo, I., Jekle, A., and Gulbins, E. (2002). Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 295, 526-531.
17. Boobis, A. R., Fawthrop, D. J., and Davies, D. S. (1989). Mechanisms of cell death. *Trends Pharmacol.Sci.* 10, 275-280.
18. Bortner, C. D., and Cidlowski, J. A. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21953-21962.
19. Bortner, C. D., Gomez-Angelats, M., and Cidlowski, J. A. (2001). Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4304-4314.
20. Bortner, C. D., Hughes, F. M., Jr., and Cidlowski, J. A. (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32436-32442.
21. Bourne, P. K., and Cossins, A. R. (1984). Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. *J.Physiol (Lond)* 347, 361-375.
22. Brown, A. P., Harkema, J. R., Schultze, A. E., Roth, R. A., and Ganey, P. E. (1997). Gadolinium chloride pretreatment protects against hepatic injury but predisposes the lungs to alveolitis after lipopolysaccharide administration. *Shock* 7, 186-192.
23. Cain, K., Inayat-Hussain, S. H., Couet, C., Qin, H. M., and Oberhammer, F. A. (1996). A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time dependent increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF-beta 1 treatment. *Cytometry* 23, 312-321.
24. Cannella, D. M., Kapp, J. P., Munschauer, F. E., Markov, A. K., and Shucard, D. W. (1989). Cerebral resuscitation with succinate and fructose-1, 6-diphosphate. *Surg.Neurol.* 31, 177-182.
25. Cardoso, L. R., Santos, O. F., Boim, M. A., Barros, E. G., Ajzen, H., and Schor, N. (1996). Fructose-1,6-diphosphate: potential protection in cyclosporine-induced renal impairment. *Nephron* 72, 67-71.
26. Cavallini, L., Deana, R., Francesconi, M. A., and Alexandre, A. (1992). Fructose-1,6-diphosphate inhibits platelet activation. *Biochem.Pharmacol.* 43, 1539-1544.
27. Chien, S., Zhang, F., Niu, W., Ehringer, W., Chiang, B., Shi, X., and Gray, L. A., Jr. (2000). Fructose-1,6-diphosphate and a glucose-free solution enhances functional recovery in hypothermic heart preservation. *J.Heart Lung Transplant.* 19, 277-285.

28. Chlouverakis, C. (1968). The lipolytic action of fructose-1-6-diphosphate. *Metabolism* 17, 708-716.
29. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162, 156-159.
30. Chu, S. J., Chang, D. M., Wang, D., Chen, Y. H., Hsu, C. W., and Hsu, K. (2002). Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med.* 30, 1605-1609.
31. Clawson, G. A., Sesno, J., Milam, K., Wang, Y. F., and Gabriel, C. (1990). The hepatocyte protein synthesis defect induced by galactosamine involves hypomethylation of ribosomal RNA. *Hepatology* 11, 428-434.
32. Coon, H. G., and Weiss, M. C. (1969). Sendai produced somatic cell hybrids between L cell strains and between liver and L cells. *Wistar.Inst.Symp.Monogr* 9, 83-96.
33. Cossins, A. R., Weaver, Y. R., Lykkeboe, G., and Nielsen, O. B. (1994). Role of protein phosphorylation in control of K flux pathways of trout red blood cells. *Am.J.Physiol* 267, C1641-C1650.
34. Cuevas, P., and Fine, J. (1973). Production of fatal endotoxic shock by vasoactive substances. *Gastroenterology* 64, 285-291.
35. Czaika, G., Gingras, Y., Zhu, E., and Comtois, A. S. (2000). Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia. *Muscle Nerve* 23, 967-969.
36. Darveau, R. P. (1998). Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr.Opin.Microbiol.* 1, 36-42.
37. De Oliveira, J. R., Rosa, J. L., Ambrosio, S., and Bartrons, R. (1992). Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology* 15, 1147-1153.
38. Didlake, R., Kirchner, K. A., Lewin, J., Bower, J. D., and Markov, A. (1985). Protection from ischemic renal injury by fructose-1,6-diphosphate infusion in the rat. *Circ.Shock* 16, 205-212.
39. Didlake, R., Kirchner, K. A., Lewin, J., Bower, J. D., and Markov, A. K. (1989). Attenuation of ischemic renal injury with fructose 1,6-diphosphate. *J.Surg.Res.* 47, 220-226.
40. Dijkstra, H. M., Manson, W. L., Blaauw, B., Klasen, H. J., and de Smet, B. (1996). Bacterial translocation in D-galactosamine-treated rats in a burn model. *Burns* 22, 15-21.
41. Drysdale, B. E., Zacharchuk, C. M., and Shin, H. S. (1983). Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J.Immunol.* 131, 2362-2367.

42. Duffy, S. M., Lawley, W. J., Conley, E. C., and Bradding, P. (2001). Resting and activation-dependent ion channels in human mast cells. *J.Immunol.* 167, 4261-4270.
43. Dulbecco, R., And Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-397.
44. Dunn, W. A., Hubbard, A. L., and Aronson, N. N., Jr. (1980). Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 255, 5971-5978.
45. Dunne, A., and O'Neill, L. A. (2005). Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett.* 579, 3330-3335.
46. Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-514.
47. Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
48. Eagle, h., oyama, v. I., levy, m., and freeman, a. (1956). Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *Science* 123, 845-847.
49. Edde, L., Zhou, X., Eaton, J. W., and Sherman, M. P. (1998). Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by fructose-1,6-diphosphate 4. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 243 , 683-687.
50. Eddy, L. J., Chambers, D., Honig, S., and Downey, J. M. (1981). Lack of a direct metabolic effect of fructose, 1,6-diphosphate in ischemic myocardium. *Am.J.Physiol* 241, H576-H582.
51. Ehringer, W. D., Niu, W., Chiang, B., Wang, O. L., Gordon, L., and Chien, S. (2000). Membrane permeability of fructose-1,6-diphosphate in lipid vesicles and endothelial cells. *Mol.Cell Biochem.* 210, 35-45.
52. El Mofty, S. K., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C., and Farber, J. L. (1975). Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am.J.Pathol.* 79, 579-595.
53. Farias, L. A., Smith, E. E., and Markov, A. K. (1990). Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke* 21, 606-613.
54. Farias, L. A., Willis, M., and Gregory, G. A. (1986). Effects of fructose-1,6-diphosphate, glucose, and saline on cardiac resuscitation. *Anesthesiology* 65, 595-601.
55. Fawthrop, D. J., Boobis, A. R., and Davies, D. S. (1991). Mechanisms of cell death. *Arch.Toxicol.* 65, 437-444.

56. Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Barrachina, M., Gomez, C., and Ambrosio, S. (2001). Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J.Neural Transm.* 108, 1383-1396.
57. Figueroa, A. H., Stone, R. H., Cohly, H. H. P., Lehan, P. H., and Markov, A. K. (2001). Effect of fructose-1, 6-diphosphate versus diphenhydramine on mortality in compound 48/80-induced shock. *Toxicology Letters* 122, 141-148.
58. Fortes Aiub, C. A., Bortolini, R., Arrieira, A. A., Alves Filho, J. C., Bordignon, N. F., and Rodrigues, D. O. (2003). Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol.Res.* 25, 83-91.
59. Fox, E. S., Thomas, P., and Broitman, S. A. (1989). Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of ³H, ¹⁴C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 96, 456-461.
60. Galanos, C., Freudenberg, M. A., and Reutter, W. (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76, 5939-5943.
61. Galzigna, L., and Rigobello, M. P. (1986). Proton and potassium fluxes in rat red blood cells incubated with sugar phosphates. *Experientia* 42, 138-139.
62. Galzigna, L., Rizzoli, V., Bianchi, M., Rigobello, M. P., and Scuri, R. (1989). Some effects of fructose-1,6-diphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action. *Cell Biochem.Funct.* 7, 91-96.
63. Gantner, F., Uhlig, S., and Wendel, A. (1995). Quinine inhibits release of tumor necrosis factor, apoptosis, necrosis and mortality in a murine model of septic liver failure. *Eur.J.Pharmacol.* 294, 353-355.
64. Genesca, M., Sola, A., Azuara, D., De Oca, J., and Hotter, G. (2005). Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1,6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation. *Crit Care Med.* 33, 827-834.
65. Gonzalez, J. E., Oades, K., Leychkis, Y., Harootunian, A., and Negulescu, P. A. (1999). Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. *Drug Discov.Today* 4, 431-439.
66. Gujral, J. S., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2003). Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 190, 37-46.
67. Harbrecht, B. G., and Billiar, T. R. (1995). The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions. *Shock* 3, 79-87.
68. Hardin, C. D., Lazzarino, G., Tavazzi, B., Di Pierro, D., Roberts, T. M., Giardina, B., and Rovetto, M. J. (2001). Myocardial metabolism of exogenous FDP is

consistent with transport by a dicarboxylate transporter. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281, H2654-H2660.

69. Hirokawa, F., Nakai, T., and Yamaue, H. (2002). Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 74, 779-783.
70. Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M., and Weis, J. J. (1999). Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 163, 2382-2386.
71. Hoebe, K. H., Witkamp, R. F., Fink-Gremmels, J., Van Miert, A. S., and Monshouwer, M. (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280, G720-G728.
72. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
73. Hofmann, F., Wagle, S. R., and Decker, K. (1976). Effect of d-galactosamine administration on nucleotide and protein metabolism in isolated rat Kupffer cells. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 357, 1395-1400.
74. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 162, 3749-3752.
75. Hotter, G., Closa, D., Prados, M., Fernandez-Cruz, L., Prats, N., Gelpi, E., and Rosello-Catafau, J. (1996). Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 222, 27-32.
76. Houston, D. S., Gerrard, J. M., McCrea, J., Glover, S., and Butler, A. M. (1983). The influence of amines on various platelet responses. *Biochim.Biophys.Acta* 734, 267-273.
77. Hughes, F. M., Jr., Bortner, C. D., Purdy, G. D., and Cidlowski, J. A. (1997). Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30567-30576.
78. Hutcheson, A. E., Rao, M. R., Olinde, K. D., and Markov, A. K. (1995). Myocardial toxicity of cyclosporin A: inhibition of calcium ATPase and nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose-1,6-diphosphate in vitro. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 89, 17-26.
79. Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R. F., and Thurman, R. G. (1997). Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am.J.Physiol* 272, G1581-G1586.
80. Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* 467, 160-164.

81. Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin.Immunol.* 10, 349-350.
82. Josephs, M. D., Bahjat, F. R., Fukuzuka, K., Ksontini, R., Solorzano, C. C., Edwards, C. K., III, Tannahill, C. L., MacKay, S. L., Copeland, E. M., III, and Moldawer, L. L. (2000). Lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF-alpha and not by Fas ligand. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278, R1196-R1201.
83. Kaighn, M. E. (1974). Choice, treatment, and storage of sera for the growth of specialized cells. *In Vitro Monogr* 21.
84. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002b). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev.Cancer* 2, 301-310.
85. Karin, M., and Lin, A. (2002a). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* 3, 221-227.
86. Kasravi, F. B., Gebreselassie, D., Adawi, D., Wang, L., Molin, G., Bengmark, S., and Jeppsson, B. (1996a). The effect of endotoxin and Lactobacillus pretreatment on peritoneal macrophage behavior in acute liver injury in rat. *J.Surg.Res.* 62, 63-68.
87. Kasravi, F. B., Wang, L., Wang, X. D., Molin, G., Bengmark, S., and Jeppsson, B. (1996b). Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* 23, 97-103.
88. Kaufmann, U., and Froesch, E. R. (1973). Inhibition of phosphorylase-a by fructose-1-phosphate, alpha-glycerophosphate and fructose-1,6-diphosphate: explanation for fructose-induced hypoglycaemia in hereditary fructose intolerance and fructose-1,6-diphosphatase deficiency. *Eur.J.Clin.Invest* 3, 407-413.
89. Keppler, D., and Decker, K. (1969). Studies on the mechanism of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur.J.Biochem.* 10, 219-225.
90. Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W., and Decker, K. (1968). Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp.Mol.Pathol.* 9, 279-290.
91. Keppler, D. O., Pausch, J., and Decker, K. (1974). Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors. Effect on ribonucleic acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 249, 211-216.
92. Keppler, D. O., Rudigier, J. F., Bischoff, E., and Decker, K. F. (1970). The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur.J.Biochem.* 17, 246-253.
93. Kirtley, M. E., and McKay, M. (1977). Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol.Cell Biochem.* 18, 141-149.

94. Kitagawa, S., and Johnston, R. B., Jr. (1985). Relationship between membrane potential changes and superoxide-releasing capacity in resident and activated mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 135, 3417-3423.
95. Konishi, Y., Shinozuka, H., and Farber, J. L. (1974). The inhibition of rat liver nuclear ribonucleic acid synthesis by galactosamine and its reversal by uridine. *Lab Invest* 30, 751-756.
96. Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C. A., and Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* 13, 2059-2071.
97. Korman, E. F. (1974). The discovery of fructose-1,6-diphosphate (the Harden-Young ester) in the molecularization of fermentation and of bioenergetics. *Mol.Cell Biochem.* 5, 65-68.
98. Krumschnabel, G., Biasi, C., Schwarzbaum, P. J., and Wieser, W. (1996). Membrane-metabolic coupling and ion homeostasis in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant hepatocytes. *Am.J.Physiol* 270 , R614-R620.
99. Kuluz, J. W., Gregory, G. A., Han, Y., Dietrich, W. D., and Schleien, C. L. (1993). Fructose-1,6-bisphosphate reduces infarct volume after reversible middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 24, 1576-1583.
100. Lazzarino, G., Nuutinen, M. E., Tavazzi, B., Cerroni, L., Di Pierro, D., and Giardina, B. (1991). Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated langendorff-perfused rat hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* 23, 13-23.
101. Lazzarino, G., Tavazzi, B., Di Pierro, D., and Giardina, B. (1992). Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Radic.Res.Comm.* 16, 325-339.
102. Lazzarino, G., Viola, A. R., Mulieri, L., Rotilio, G., and Mavelli, I. (1987). Prevention by fructose-1,6-bisphosphate of cardiac oxidative damage induced in mice by subchronic doxorubicin treatment. *Cancer Res.* 47, 6511-6516.
103. Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Germann, P. G., Tiegs, G., and Wendel, A. (1994). Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J.Immunol.* 153, 1778-1788.
104. Leist, M., Gantner, F., Jilg, S., and Wendel, A. (1995). Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J.Immunol.* 154, 1307-1316.
105. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
106. Liehr, H., Grun, M., Seelig, H. P., Seelig, R., Reutter, W., and Heine, W. D. (1978). On the pathogenesis of galactosamine hepatitis. Indications of

extrahepatocellular mechanisms responsible for liver cell death. *Virchows Arch.B Cell Pathol.* 26, 331-344.

107. Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D., and Golenbock, D. T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33419-33425.
108. Louis, H., Le Moine, O., Peny, M. O., Gulbis, B., Nisol, F., Goldman, M., and Deviere, J. (1997). Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 112, 935-942.
109. Lozano, J. M., Padillo, J., Montero, J. L., Pena, J., de La, M. M., and Muntane, J. (2003). Immunomodulatory activity of TNF-alpha during acute liver injury induced by D-galactosamine and its protection by PGE1 in rats. *Int.Immunopharmacol.* 3, 197-207.
110. Malhi, H., Irani, A. N., Rajvanshi, P., Suadricani, S. O., Spray, D. C., McDonald, T. V., and Gupta, S. (2000). KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *Journal of Biological Chemistry* 275, 26050-26057.
111. Manani, G., Galzigna, L., Costa, G., Tambuscio, B., Alati, G. L., Suma, V., Giovannonni, G., Volpe, A., and Giron, G. P. (1977). Experimental effects on rabbit ileum and biochemical action of fructose-1,6-diphosphate. *Agressologie* 18, 189, 202-189, 206.
112. Mansour, k. (1963). Acute cholecystitis associated with echinococcal cyst obstruction of the common bile duct. *Postgrad.Med.J.* 39, 542-544.
113. Markov AK, Oglethorpe N, Grogan JB, and Hellems HK (1985). Stimulating effect of fructose 1-6 diphosphate on the phagocytic function of rat RES and on human leukocyte carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci* 290, 3-10.
114. Markov, A. K. Hemodynamics and metabolic effects of fructose 1-6 diphosphate in ischemia and shock--experimental and clinical observations.
115. Markov, A. K., Causey, A. L., Didlake, R. H., and Lemos, L. B. (2002). Prevention of alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary edema with fructose-1,6-diphosphate. *Exp.Lung Res.* 28, 285-299.
116. Markov, A. K., Farias, L. A., Bennett, W. S., Subramony, C., and Mihas, A. A. (1991). Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology* 43, 310-317.
117. Markov, A. K., Neely, W. A., Didlake, R. H., Terry, J., III, Causey, A., and Lehan, P. H. (2000). Metabolic responses to fructose-1,6-diphosphate in healthy subjects. *Metabolism* 49, 698-703.

118. Markov, A. K., Oglethorpe, N. C., Blake, T. M., Lehan, P. H., and Hellems, H. K. (1980a). Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am.Heart J.* 100, 639-646.
119. Markov, A. K., Oglethorpe, N. C., Blake, T. M., Lehan, P. H., and Hellems, H. K. (1980b). Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am.Heart J.* 100, 639-646.
120. Markov, A. K., Payment, M. F., Hume, A. S., Rao, M. R., Markov, M. A., Skelton, T. N., and Lehan, P. H. (1999). Fructose-1,6-diphosphate in the treatment of oleander toxicity in dogs. *Vet.Hum.Toxicol.* 41, 9-15.
121. Maruyama, N., Kakuta, Y., Yamauchi, K., Ohkawara, Y., Aizawa, T., Ohru, T., Nara, M., Oshiro, T., Ohno, I., and Tamura, G. (1994). Quinine inhibits production of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10, 514-520.
122. McMillan, J. M., and Jollow, D. J. (1992). Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 115, 234-240.
123. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
124. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol.Cell* 2, 253-258.
125. Mersmann, H. J., and Segal, H. L. (1967). An on-off mechanism for liver glycogen synthetase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 58, 1688-1695.
126. Mihas, A. A., Kanji, V. K., Mihas, T. A., Joseph, R. M., Markov, A. K., and Heuman, D. M. (2003). Fructose diphosphate attenuates the acetaminophen-induced liver injury in the rat evidence for involvement of nitric oxide. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 113-114, 253-266.
127. Mihas, A. A., Maliakkal, R. J., Mihas, T. A., Kanji, V. K., and Markov, A. K. (1997). Effects of fructose-1,6-diphosphate on the activity of rat liver nitric oxide synthase in vitro
5. Pharmacology 54, 43-48.
128. Moore, G. E., Gerner, R. E., and Franklin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 199, 519-524.
129. Moore, G. E., and Kitamura, H. (1968). Cell line derived from patient with myeloma. *N.Y.State J.Med.* 68, 2054-2060.
130. Moresco, R. N., Santos, R. C., Alves Filho, J. C., Cunha, A. A., Dos, R. C., Reichel, C. L., and De Oliveira, J. R. (2004a). Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant.Proc.* 36, 1261-1264.

131. Moresco, R. N., Santos, R. C., Alves Filho, J. C., and De Oliveira, J. R. (2004b). Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant.Proc.* 36, 2593-2595.
132. Muntane, J., Montero, J. L., Marchal, T., Perez-Seoane, C., Lozano, J. M., Fraga, E., Pintado, C. O., de la, M., and Mino, G. (1998). Effect of PGE1 on TNF-alpha status and hepatic D-galactosamine-induced apoptosis in rats. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 13, 197-207.
133. Muntane, J., Rodriguez, F. J., Segado, O., Quintero, A., Lozano, J. M., Siendones, E., Pedraza, C. A., Delgado, M., O'Valle, F., Garcia, R., Montero, J. L., de La, M. M., and Mino, G. (2000). TNF-alpha dependent production of inducible nitric oxide is involved in PGE(1) protection against acute liver injury. *Gut* 47, 553-562.
134. Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
135. Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., and Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J.Exp.Med.* 187, 2097-2101.
136. Nakai, T., Tanimura, H., Tabuse, K., Nagai, Y., Mori, K., and Yamoto, H. (1991). Beneficial effects of fructose-1,6-diphosphate infusion on liver regeneration after ischemic liver injury. *Gastroenterol.Jpn.* 26, 611-618.
137. Netea, M. G., Kullberg, B. J., and van der Meer, J. W. (1998). Lipopolysaccharide-induced production of tumour necrosis factor and interleukin-1 is differentially regulated at the receptor level: the role of CD14-dependent and CD14-independent pathways. *Immunology* 94, 340-344.
138. Nietsch, H. H., Roe, M. W., Fiekers, J. F., Moore, A. L., and Lidofsky, S. D. (2000). Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20556-20561.
139. Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
140. Niu, W., Zhang, F., Ehringer, W., Tseng, M., Gray, L., and Chien, S. (1999). Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose 1, 6-diphosphate. *J.Surg.Res.* 85, 120-129.
141. Novitsky, T. J., Roslansky, P. F., Siber, G. R., and Warren, H. S. (1985). Turbidimetric method for quantifying serum inhibition of Limulus amoebocyte lysate. *J.Clin.Microbiol.* 21, 211-216.
142. Nunes, F. B., Gaspareto, P. B., Santos, R. C., de Assis, M., Graziottin, C. M., Biolchi, V., Alves Filho, J. C., Lunardelli, A., Avila, L. D., Pires, M. G., Wachter,

- P. H., and De Oliveira, J. R. (2003b). Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. *Toxicol.Lett.* 143, 73-81.
143. Nunes, F. B., Graziottin, C. M., Alves Filho, J. C., Lunardelli, A., Pires, M. G., Wachter, P. H., and De Oliveira, J. R. (2003a). An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol.Res.* 47, 35-41.
144. Nunes, F. B., Simoes Pires, M. G., Farias Alves Filho, J. C., Wachter, P. H., and Rodrigues, D. O. (2002). Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med.* 30, 2069-2074.
145. Nuutinen EM, Lazzarino G, Giardina B, and Hassinen IE (1991). Effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on glycolysis in the isolated perfused rat heart. *Am Heart J* 122, 523-527.
146. Planas, M. E., Sanchez, S., Gonzalez, P., Rodrigues, D. O., and Bartrons, R. (1993). Protective effect of fructose 1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. *Eur.J.Pharmacol.* 237, 251-255.
147. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
148. Qiu, M. R., Campbell, T. J., and Breit, S. N. (2002). A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 130, 67-74.
149. Quintero, A., Pedraza, C. A., Siendones, E., Kamal ElSaid, A. M., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Montero, J. L., de La, M. M., Fernandez-Checa, J. C., Mino, G., and Muntane, J. (2002). PGE1 protection against apoptosis induced by D-galactosamine is not related to the modulation of intracellular free radical production in primary culture of rat hepatocytes. *Free Radic.Res.* 36, 345-355.
150. Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J.Exp.Med.* 189, 615-625.
151. Raetz, C. R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu.Rev.Biochem.* 59, 129-170.
152. Rao, M. R., Olinde, K. D., and Markov, A. K. (1997). Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 95, 217-220.
153. Rao, M. R., Olinde, K. D., and Markov, A. K. (1998). In vitro induction of nitric oxide by fructose-1,6-diphosphate in the cardiovascular system of rats. *Mol.Cell Biochem.* 185, 171-175.
154. Rao, S. B., and Mehendale, H. M. (1989). Protective role of fructose 1,6-bisphosphate during CCl4 hepatotoxicity in rats. *Biochem.J.* 262, 721-725.

155. Rappaport, A. M. (1973). The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc.Res.* 6, 212-228.
156. Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267.
157. Rigobello, M. P., Bianchi, M., Deana, R., and Galzigna, L. (1982b). Interaction of fructose-1,6-diphosphate with some cell membranes. *Agressologie* 23, 63-66.
158. Rigobello, M. P., and Galzigna, L. (1982a). Enzymatic events following the interaction of fructose-1,6-diphosphate with red cell membranes. *Farmaco [Sci.]* 37, 459-462.
159. Rigobello, M. P., Galzigna, L., and Bindoli, A. (1994). Fructose 1,6-bisphosphate prevents oxidative stress in the isolated and perfused rat heart. *Cell Biochem.Funct.* 12, 69-75.
160. Rizzoli, V., Battilana, G., and Galzigna, L. (1990). Fructose-1,6-diphosphate counteracts ethanol-stimulated calcium uptake in isolated BHK cells. *Mol.Cell Biochem.* 95, 89-93.
161. Roig, T., Bartrons, R., and Bermudez, J. (1997). Exogenous fructose 1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am.J.Physiol* 273, C473-C478.
162. Roig, T., De Oliveira, J. R., Bartrons, R., and Bermudez, J. (1994). Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am.J.Physiol* 266, C1722-C1728.
163. Schinetti, M. L., Greco, R., Lazzarino, G., and Bertelli, A. (1983a). Inhibiting effect of fructose 1,6 diphosphate on rat mast cell histamine release. *Int.J.Tissue React.* 5, 55-59.
164. Schinetti, M. L., Greco, R., Lazzarino, G., Soldani, G., and Bertelli, A. (1983b). Mast cell histamine release induced by doxorubicin and the inhibitory effect of fructose 1,6-diphosphate. *Arzneimittelforschung.* 33, 834-836.
165. Schinetti, M. L., and Lazzarino, G. (1986). Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6-diphosphate. *Biochem.Pharmacol.* 35, 1762-1764.
166. Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Zahringer, U., Rietschel, E. T., Carroll, S. F., Koch, M. H., Kusumoto, S., and Seydel, U. (1998). The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J.Immunol.* 161, 5464-5471.
167. Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429-1431.
168. Seglen, P. O. (1973). Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp.Cell Res.* 82, 391-398.

169. Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
170. Seydel, U., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., and Blunck, R. (2001). A K⁺ channel is involved in LPS signaling. *J.Endotoxin.Res.* 7, 243-247.
171. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 189, 1777-1782.
172. Shimizu, S., Yamada, Y., Okuno, M., Ohnishi, H., Osawa, Y., Seishima, M., and Moriwaki, H. (2005). Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice. *HepatoL.Res.* 31, 136-142.
173. Siendones, E., Fouad, D., Abou-Elella, A. M., Quintero, A., Barrera, P., and Muntane, J. (2003). Role of nitric oxide in D-galactosamine-induced cell death and its protection by PGE1 in cultured hepatocytes. *Nitric.Oxide.* 8, 133-143.
174. Smedsrod, B., and Pertoft, H. (1985a). Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J.Leukoc.Biol.* 38, 213-230.
175. Smedsrod, B., Pertoft, H., Eggertsen, G., and Sundstrom, C. (1985b). Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll, and selective substrate adherence. *Cell Tissue Res.* 241, 639-649.
176. Sola, A., De Oca, J., Alfaro, V., Xaus, C., Jaurrieta, E., and Hotter, G. (2004). Protective effects of exogenous fructose-1,6-biphosphate during small bowel transplantation in rats. *Surgery* 135, 518-526.
177. Sola, A., Rosello-Catafau, J., Gelpi, E., and Hotter, G. (2001). Fructose-1,6-biphosphate in rat intestinal preconditioning: involvement of nitric oxide. *Gut* 48, 168-175.
178. Stachlewitz, R. F., Seabra, V., Bradford, B., Bradham, C. A., Rusyn, I., Germolec, D., and Thurman, R. G. (1999). Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* 29, 737-745.
179. Stafford, J. L., Galvez, F., Goss, G. G., and Belosevic, M. (2002). Induction of nitric oxide and respiratory burst response in activated goldfish macrophages requires potassium channel activity. *Dev.Comp Immunol.* 26, 445-459.
180. Su, G. L. (2002). Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 283, G256-G265.
181. Sun, J. X., Farias, L. A., and Markov, A. K. (1990). Fructose 1-6 diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 98, 117-126.
182. Takeda, K. (2005). Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J.Endotoxin.Res.* 11, 51-55.

183. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11, 443-451.
184. Tamaki, T., Nakai, T., and Yamaue, H. (2002). Fructose-1,6-Bisphosphate inhibits excess activation of Kupffer cell function induced by endotoxin. *Dig.Dis.Sci.* 47, 2179-2185.
185. Tarsi, R., Mulieri, L., Venturi, F., and Simonetti, N. (1985). Reticuloendothelial system activated by fructose-1,6-diphosphate in mice. *J.Leukoc.Biol.* 37, 45-50.
186. Tavazzi, B., Cerroni, L., Di Pierro, D., Lazzarino, G., Nuutinen, M., Starnes, J. W., and Giardina, B. (1990). Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-bisphosphate. *Free Radic.Res.Commun.* 10, 167-176.
187. Tavazzi, B., Starnes, J. W., Lazzarino, G., Di Pierro, D., Nuutinen, E. M., and Giardina, B. (1992). Exogenous fructose-1,6-bisphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart. *Basic Res.Cardiol.* 87, 280-289.
188. Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80, 529-532.
189. Treon, S. P., Thomas, P., and Broitman, S. A. (1993). Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells releases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor-alpha stimulatory capacity. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 202, 153-158.
190. Trimarchi, G. R., Arcadi, F. A., Imperatore, C., Ruggeri, P., and Costa, G. (1997). Effects of fructose-1,6-biphosphate on microsphere-induced cerebral ischemia in the rat. *Life Sci.* 61, 611-622.
191. Tsutsui, S., Hirasawa, K., Takeda, M., Itagaki, S., Kawamura, S., Maeda, K., Mikami, T., and Doi, K. (1997). Galactosamine-induced apoptosis in the primary mouse hepatocyte cultures. *Exp.Toxicol.Pathol.* 49, 301-306.
192. Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu.Rev.Immunol.* 13, 437-457.
193. Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr.Opin.Immunol.* 11, 19-22.
194. Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811-815.
195. Vexler, Z., Berrios, M., Ursell, P. C., Sola, A., Ferriero, D. M., and Gregory, G. A. (1999). Toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in developing normoxic rats. *Pharmacol.Toxicol.* 84, 115-121.

196. Vexler, Z. S., Wong, A., Francisco, C., Manabat, C., Christen, S., Tauber, M., Ferriero, D. M., and Gregory, G. (2003). Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. *Brain Res.* 960, 90-98.
197. Wang, J. H., Redmond, H. P., Wu, Q. D., and Bouchier-Hayes, D. (1998). Nitric oxide mediates hepatocyte injury. *Am.J.Physiol* 275, G1117-G1126.
198. Watson, J., and Riblet, R. (1974). Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. *J.Exp.Med.* 140, 1147-1161.
199. Watson, J., and Riblet, R. (1975). Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow-derived lymphocytes by lipopolysaccharides. *J.Immunol.* 114, 1462-1468.
200. Weinstein, I. B., Orenstein, J. M., Gebert, R., Kaighn, M. E., and Stadler, U. C. (1975). Growth and structural properties of epithelial cell cultures established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. *Cancer Res.* 35, 253-263.
201. Werling, D., Hope, J. C., Howard, C. J., and Jungi, T. W. (2004). Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 111, 41-52.
202. Wheeler, M. D., and Thurman, R. G. (1999). Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am.J.Physiol* 277, L952-L959.
203. Williams, G. M., and Gunn, J. M. (1974). Long-term cell culture of adult rat liver epithelial cells. *Exp.Cell Res.* 89, 139-142.
204. Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A., and Eldon, E. D. (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* 16, 6120-6130.
205. Williamson, J. R. (1966). Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *Journal of Biological Chemistry* 241, 5026-5036.
206. Wolff, S. M. (1973). Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J.Infect.Dis.* 128, Suppl-64.
207. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
208. Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

209. Yang, R. B., Mark, M. R., Gurney, A. L., and Godowski, P. J. (1999). Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 163, 639-643.
210. Yu, S. P., Yeh, C. H., Sensi, S. L., Gwag, B. J., Canzoniero, L. M., Farhangrazi, Z. S., Ying, H. S., Tian, M., Dugan, L. L., and Choi, D. W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278, 114-117.
211. Yusem, M., Delaney, W. E., Lindberg, M. A., and Fashing, E. M. (1969). An improved fluorimetric determination of histamine by stabilizing the o-phthalaldehyde reagent. *Anal.Chim.Acta* 44, 403-409.

Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats*

Eduardo Cuesta, BSc; Jordi Boada, PhD; Roser Calafell, BSc; Jose C. Perales, PhD; Teresa Roig, PhD; Jordi Bermudez, PhD

Objective: Fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) protects organs against a wide range of challenges involving inflammation. We hypothesized that the primary action of F1,6BP is to prevent macrophage activation and cytokine release. Our aim was to determine the tissue and cellular targets for this bisphosphorylated sugar and to provide new insights into its mechanisms of action.

Design: Prospective, controlled laboratory study.

Setting: Animal resource facilities and research laboratory.

Subjects: Male Sprague-Dawley rats (200–250 g body weight).

Interventions: The protective action of F1,6BP was analyzed in galactosamine (GalN)-induced hepatitis in rats. The *in vivo* effects of F1,6BP were evaluated by changes in transaminase activities, blood endotoxins, and tumor necrosis factor (TNF)- α production in GalN-challenged rats. The targets of F1,6BP to reduce macrophage response to lipopolysaccharide (LPS) were determined by correlation between changes in TNF- α production and K⁺ fluxes through cell membrane in primary cultures of Kupffer cells.

Measurements and Main Results: The *in vivo* results indi-

cate that F1,6BP treatment prevented GalN-induced injury in liver parenchymal cells. This protection was mainly associated with a reduction of the inflammatory response. F1,6BP prevention of GalN-induced endotoxemia correlated with preclusion of mast cell degranulation and histamine release that preceded the increased plasma endotoxins and liver production of TNF- α . In addition, F1,6BP treatment decreased sensitivity to LPS, which reduced the GalN-induced increase in TNF- α . The *in vitro* results show that F1,6BP inhibited Kupffer cell response and reduced TNF- α production by preventing LPS-induced K⁺ channel activation.

Conclusions: The role of exogenous F1,6BP as a K⁺ channel modulator underlies its antihistaminic and anti-inflammatory action and increases its interest as a protective compound. (Crit Care Med 2006; 34:807–814)

KEY WORDS: histamine; inflammation; tumor necrosis factor- α ; K⁺ channel; Kupffer cells

Fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) protects organs and tissues against injuries induced by hypoxia, ischemia, and toxic agents (1–4) and increases the viability of grafts when present in perfusion and preservation media (5). Experimental evidence indicates that the protective action of F1,6BP in stress situations is mediated by its incorporation as an energy substrate and by prevention of critical alterations in cell membrane function. The relative importance of each contribution is controver-

sial and appears to depend on the cell type and challenge. Results obtained with vascular smooth muscle (6) and myocardial cells (7) suggest that F1,6BP may be taken up and incorporated as a glycolytic substrate. However, F1,6BP does not contribute to glycolytic metabolism in brain cells, and its protective action is thus associated with its effect on the cell membrane (3, 8). Moreover, studies of the protective action of F1,6BP against hepatic injuries have suggested effects on both the energy metabolism and the cell membrane function of hepatocytes (9, 10), as well as on the response of other cells involved in liver inflammation (5, 11).

To provide new insights into the protective mechanisms of F1,6BP, we studied the effect of this bisphosphorylated sugar in the prevention of galactosamine (GalN)-induced hepatitis in rats. Experimental hepatitis was induced *in vivo* by administering sublethal doses of GalN (400 mg/kg body weight) to rats (9). The liver specificity of GalN is due to the high levels of galactokinase and UDP-glucose: galactose-1-P-uridyltransferase in hepa-

tocytes (12). The trapping of UDP associated with GalN metabolism depletes the uridine-phosphate pools and inhibits transcriptional activity and protein synthesis, rendering hepatocytes highly sensitive to TNF- α (13). Previous studies have described the protective effect of F1,6BP against GalN-induced injury in hepatocytes (9), but there is no information on whether F1,6BP affected the GalN-induced transcriptional arrest in hepatocytes (10).

In addition to the injury produced by GalN in liver parenchymal cells, this aminated sugar requires endotoxemia and inflammation to induce liver failure *in vivo* (14). This finding leads us to hypothesize that the *in vivo* protective effect of F1,6BP against GalN involves attenuation of endotoxemia and inflammation. Production and release of cytokines and cytotoxic molecules constitute the main defense of the host against pathogens. However, under insult conditions, such as those produced during sepsis, an exaggerated response to endotoxins may result in multiorgan failure and shock (15).

*See also p. 927.

From the Unitat de Biofísica, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Supported in part by the Ministerio de Educación y Ciencia (HU02–22, BF12003–02539) and the Fundació Marató TV3 (031633–2003). E. Cuesta is the recipient of a research fellowship from the University of Barcelona.

The authors have no financial interests to disclose.

Copyright © 2006 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000202016.60856.03

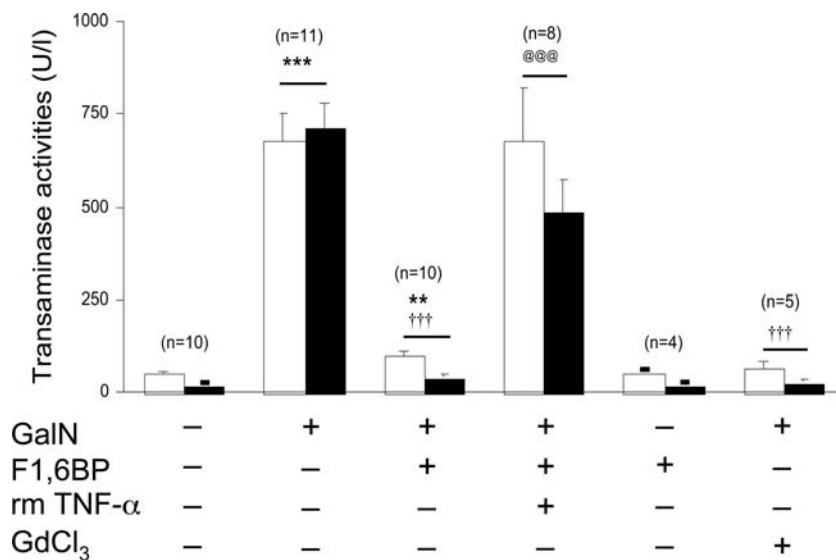


Figure 1. Aspartate (unfilled bars) and alanine aminotransferase (filled bars) activities in plasma of rats 24 hrs after the indicated treatment. Fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) avoids galactosamine (GalN)-induced injury. Kupffer cell inactivation by gadolinium chloride (GdCl₃) mimicked the effect of F1,6BP. Conversely, administration of murine recombinant of tumor necrosis factor-α (rmTNF-α) removed the protective effect of F1,6BP. Results are mean ± SE of n animals (*, **, ***, †, ††, †††, and @, @@, @@@ indicate $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$ vs. saline, GalN, and F1,6BP + GalN treatments, respectively).

Consequently, nontoxic compounds that mitigate inflammatory response under critical situations, such as F1,6BP, may be of therapeutic use as protective agents (5, 16). To assess the anti-inflammatory role of F1,6BP, we studied its effect on the various steps of the GalN-induced inflammatory response.

Our results show that F1,6BP treatment did not affect GalN-induced transcriptional arrest in hepatocytes but inhibited histamine release and endotoxemia, in addition to reducing macrophage response to lipopolysaccharide (LPS). These results point to the cell membrane K⁺ channels as targets of F1,6BP in the inhibition of Kupffer cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Treatment Protocols. Male Sprague-Dawley rats, weighing 200–250 g, were maintained under standard conditions and received water and standard diet *ad libitum*. All animals were given humane care in compliance with the guidelines of the Experimental Animal Ethics Committee of the University of Barcelona. All tested compounds (Sigma, St. Louis, MO) were dissolved in sterile saline and administered intraperitoneally except for gadolinium chloride, which was delivered intravenously.

Collection of Blood and Liver Sections. At the end of each treatment, rats were anesthetized with ketamine-xylazine. After laparotomy, blood was taken from the cava and portal veins, allowed to clot, and centrifuged at 800g for 10 mins. Serum was collected and stored at -20°C. For these manipulations, pyrogen-free material was used. Livers were perfused with saline solution to remove red cells and non-fixed white cells. They were then excised, washed in phosphate-buffered saline, fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin, cut into 3-μm sections, and stored at -80°C until analysis.

Histochemical Detection of DNA Fragmentation and Caspase 3 Activity. For immunohistochemical staining, liver sections were deparaffined in xylene and hydrated through a graded series of ethanol. *In situ* cell injury was evaluated by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method with the TdT-FragEL DNA Fragmentation Kit (Oncogene Research Products, Cambridge, MA) (17). Counterstaining with methyl green aided the morphologic evaluation and characterization of normal and injured cells. Active caspase-3 immunohistochemistry was carried out with use of a cleaved caspase-3 (17 kD) rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling). The antibody, used at a dilution of 1:100 with the ABC method, detects only the large fragment of activated caspase-3 (18).

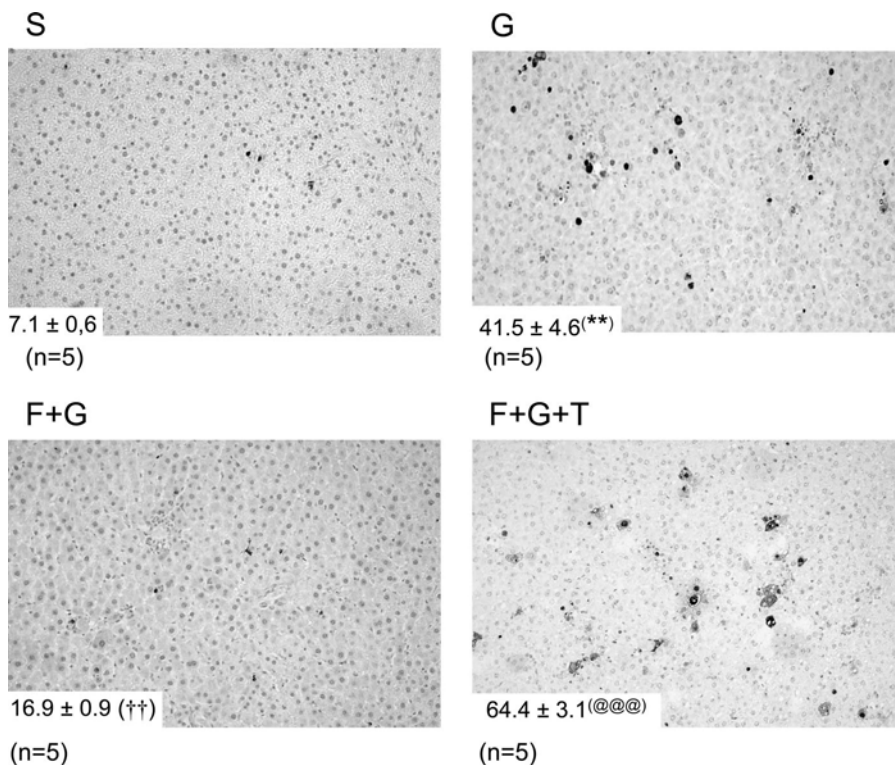


Figure 2. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay evaluation of induced injury in rat livers 18 hrs after challenge. S, G, F + G, and F + G + T indicate saline, galactosamine, fructose 1,6-bisphosphate + galactosamine, and fructose 1,6-bisphosphate + galactosamine + recombinant of tumor necrosis factor-α treatment, respectively. Inserted figures indicate mean ± SE of TUNEL-positive cells counted per field (400×) of five independent experiments (** and †† indicate $p < .001$ vs. S and G, respectively; @@@ $p < .001$ vs. F + G).

Table 1. Apoptosis induced by recombinant murine tumor necrosis factor-alpha (rmTNF- α) in the liver of fructose 1,6-bisphosphate plus galactosamine (F1,6BP + GalN)—treated rats

Treatment	Caspase 3—Positive cells
Saline	1.2 \pm 0.3
F1,6BP + GalN	17.6 \pm 3.6
F1,6BP + GalN + TNF- α	50.6 \pm 4.4 ^a

^a*p* < .001 and *p* < .01 vs. saline and F1,6BP + GalN, respectively.

Caspase 3-positive cells were determined 18 hrs after the indicated challenge. Figures represent mean \pm SE of positive cells counted per field (400 \times) of five independent experiments.

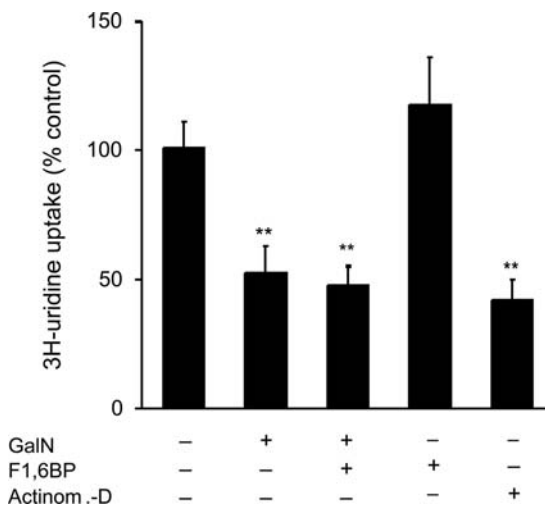


Figure 3. Effects of fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) on galactosamine (GalN)-induced inhibition of transcriptional activity, as assessed by ³H-uridine incorporation into mRNA of primary cultures of hepatocytes. Actinom.-D indicates actinomycin-D, a transcriptional inhibitor. Results are mean \pm SE of five independent experiments (***p* < .01 vs. control).

Determination of Blood Transaminase Activities. Serum levels of alanine and aspartate aminotransferase activities were assessed spectrophotometrically with a commercially available kit (Roche, Basel, Switzerland).

Determination of Blood Endotoxin and Histamine Content. Plasma endotoxin was measured with a Limulus Amebocyte Lysate test kit (Pyrochrome, Cape Cod, Falmouth, MA) (19). Histamine concentration was determined fluorometrically with the fluorescent probe O-phthalaldehyde (OPT, Sigma, St. Louis, MO), as reported elsewhere (20).

Determination of TNF- α Content in Blood, Cell Culture Supernatants, and Liver Tissue. TNF- α was quantified in plasma and cell culture supernatants with a commercial ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Frozen livers were homogenized with a Polytron homogenizer in cold 50-mM phosphate buffer (pH, 6) and centrifuged at 4,000*g* for 15 mins. TNF- α and protein content in the supernatants was determined (21). Total protein concentration in homogenates was determined with a commercial kit (BioRad, Munich, Germany).

Primary Cell Cultures. Hepatocytes were obtained from male Sprague-Dawley rats (200–250 g) by means of the collagenase per-

fusion method (22). Cell viability, assessed by the trypan blue exclusion criterion, was always higher than 90%. The isolated cells were placed in William's E medium supplemented with 1 nM dexamethasone, 1 nM insulin, 50 mg/L gentamicin, and 5% fetal calf serum, plated in collagen-precoated plastic culture dishes and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. After 2 to 3 hrs, the medium was aspirated to remove serum and unattached cells, and fresh medium was added.

Primary cultures of rat Kupffer cells were obtained from male Sprague-Dawley rats (200–250 g), as described previously (23). Cells were placed in RPMI 1640 medium supplemented with 50 mg/L gentamicin, 10 mM hepes, and 10% fetal calf serum. Cells were cultured in 24-well plates for 1 hr, and the medium was changed to remove nonadherent cells. Twenty-four hours later, the medium was aspirated and the experiments were initiated with RPMI 1640 medium containing 10% rat serum. To determine the purity of Kupffer cells, we evaluated the capacity of the cells to ingest fluorescent latex beads.

Determination of Transcriptional Activity in Hepatocytes. Primary cultures of rat hepatocytes were incubated in 60-mm cell culture

dishes for 24 hrs. The medium was aspirated and 5 μ Ci of 5,6-³H-uridine (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) was added before the treatments. Afterward, total RNA was obtained from cells with the Ultraspec RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Houston, TX) (24). RNA extracts were placed in scintillation vials, and the action of 5,6-³H-uridine was measured in a liquid scintillation counter.

K⁺ Efflux Estimated from ⁸⁶Rb⁺ Release. The unidirectional leakage of K⁺ was determined by using ⁸⁶Rb⁺ as a tracer (25). Kupffer cells were cultured in 24-well plates for 24 hrs, and the medium was then aspirated before adding 20 μ Ci of ⁸⁶Rb⁺ (Amersham Biosciences). After overnight incubation, medium with ⁸⁶Rb⁺ was replaced with fresh medium. After 10 mins, aliquots of medium were obtained at 10-min intervals before and after the addition of tested compounds. Activity was measured in a liquid scintillation counter.

Data Analysis. Results are shown as mean \pm SE of the values obtained from the indicated number of experiments. The differences between groups were tested by analysis of variance (ANOVA) and the appropriate *a priori* contrast methods. For the analysis of longitudinal data, repeated-measures ANOVA was used. Results were considered significant at *p* < .05.

RESULTS

F1,6BP Did Not Prevent the GalN-Induced Sensitization of Hepatocytes to TNF- α . F1,6BP (2 g/kg body weight) prevented the transaminase increase produced by administration of GalN (400 mg/kg body weight) to rats (Fig. 1). GalN-induced liver injury to rats involves endotoxemia and TNF- α production in the liver. Under physiologic conditions, hepatocytes are almost insensitive to TNF- α because transcription of antiapoptotic genes *via* the NF- κ B pathway activation counteracts proapoptotic effectors (13). However, GalN metabolism inhibits transcription activity in hepatocytes *via* depletion of the uridine triphosphate (UTP) pool and increased sensitivity of these cells to TNF- α (12). Thus, inflammatory response induces parenchymal cell apoptosis and liver failure (14). Accordingly, pretreatment with GdCl₃ (20 mg/kg body weight) to inhibit Kupffer cells (the major TNF- α -producer cells in the liver) rendered rats resistant to GalN (Fig. 1). Thus, two targets may be considered for the protective action of F1,6BP against GalN injury: F1,6BP prevents GalN-induced hepatocyte sensitization to TNF- α , and F1,6BP inhibits cytokine release and inflammation.

To test whether F1,6BP treatment prevented the GalN-induced sensitiza-

tion of liver parenchyma to TNF- α , we evaluated the liver injury following administration of recombinant murine TNF- α (rmTNF- α ; 0.2 μ g/kg body weight) to F1,6BP+GalN-treated rats. Addition of rmTNF- α increased

transaminase activities in plasma (Fig. 1) and TUNEL- and caspase 3-positive cells in the livers of F1,6BP + GalN-treated rats (Fig. 2 and Table 1), indicating that F1,6BP was not effective in protecting GalN-sensitized rats against

TNF- α . This inefficiency may be explained by the inability of F1,6BP to prevent GalN-induced transcriptional arrest in hepatocytes (Fig. 3) (13), among other cytokine-mediated effects. Taken together, these results suggest inhibition of macrophage activation and cytokine release as the primary effects of F1,6BP in preventing GalN-induced liver failure.

F1,6BP Prevented GalN-Induced Endotoxemia and Inflammation in Rat Livers. To evaluate the effects of F1,6BP on GalN-induced endotoxemia, we monitored the levels of LPS in the portal vein of challenged rats. Time courses of plasma LPS concentration indicate that F1,6BP treatment prevented endotoxin increase in GalN-treated rats (Fig. 4A). Comparison of time courses in Figure 4 reveals correlation between endotoxemia and histamine increases in plasma of GalN-treated rats (Fig. 4B), with a common maximum close to 1 hr after challenge. The administration of F1,6BP alone produced similar results in saline controls (data not shown).

To determine the role of histamine release in the induction of endotoxemia, we combined GalN and F1,6BP treatments with compound 48/80 and cromoglycate (CrGly), activator and inhibitor, respectively, of mast cell degranulation. Prevention of mast cell degranulation by CrGly (50 mg/kg body weight) strongly reduced GalN-induced endotoxemia (Table 2). In the absence of GalN, a four-fold increase in the control levels of histamine by compound 48/80 administration (1 mg/kg body weight) produced no significant increase in LPS (Table 2). These

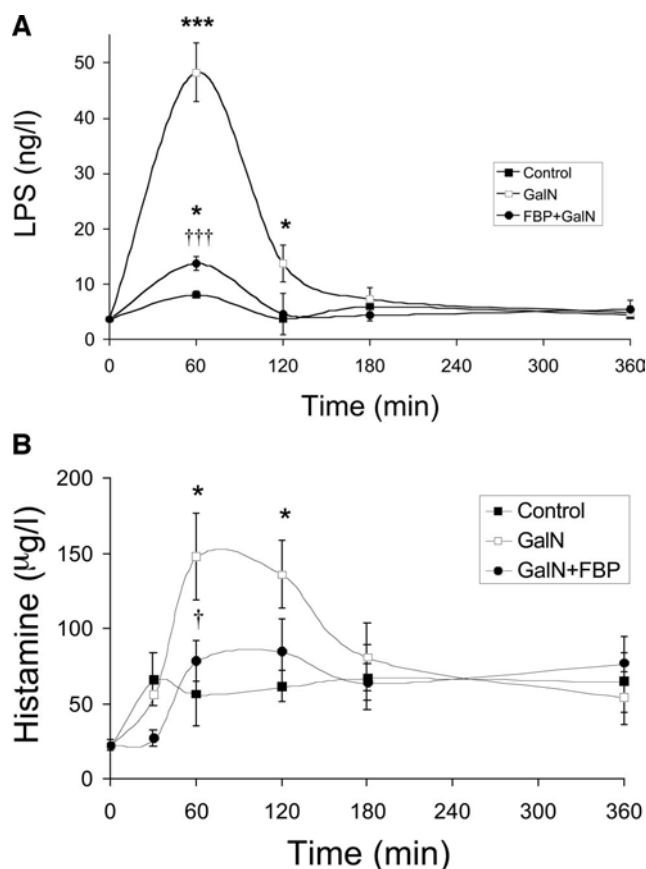


Figure 4. Time courses of lipopolysaccharide (LPS) concentration (A) and histamine level (B) in portal vein of treated rats. Fructose 1,6-bisphosphate (FBP) alone (data not shown) produced similar results to saline. Results are mean \pm SE of four to ten animals (*, **, *** indicate $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$ vs. control; GalN, galactosamine).

Table 2. Effect of fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) on the galactosamine (GalN)-induced increases of histamine, lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and transaminase activities in plasma of challenged rats

	Histamine (μ g/L)	LPS (EU/L)		TNF- α (η g/L)	Transaminase activity (U/L)	
		Portal	Cava		Aspartate	Alanine
Control	57.0 \pm 21.4 <i>n</i> = 5	80.9 \pm 6.6 <i>n</i> = 5	70.8 \pm 7.5 <i>n</i> = 4	4.6 \pm 1.3 <i>n</i> = 8	52.9 \pm 5.0 <i>n</i> = 10	16.9 \pm 1.2 <i>n</i> = 10
GalN	148.4 \pm 28.8 ^a <i>n</i> = 6	483.3 \pm 9.1 ^c <i>n</i> = 10	327.2 \pm 61.0 ^a <i>n</i> = 8	17.9 \pm 1.6 ^c <i>n</i> = 10	678.0 \pm 71.0 ^c <i>n</i> = 11	711.0 \pm 66.1 ^c <i>n</i> = 11
F1,6BP + GalN	79.1 \pm 13.6 ^d <i>n</i> = 9	137.5 \pm 12.6 ^{a,f} <i>n</i> = 7	92.1 \pm 14.5 ^e <i>n</i> = 9	7.7 \pm 2.3 ^e <i>n</i> = 8	101.0 \pm 13.6 ^{b,f} <i>n</i> = 10	66.3 \pm 14.3 ^{b,f} <i>n</i> = 10
CrGly + GalN	66.3 \pm 17.2 ^d <i>n</i> = 5	119.8 \pm 5.1 ^{b,f} <i>n</i> = 5	85.9 \pm 11.5 ^d <i>n</i> = 5	12.8 \pm 2.0 ^b <i>n</i> = 10	240.5 \pm 52.7 ^{b,f,g} <i>n</i> = 9	114.1 \pm 59.7 ^f <i>n</i> = 9
Comp. 48/80	209.9 \pm 32.5 ^b <i>n</i> = 5	106.6 \pm 11.7 <i>n</i> = 6	87.4 \pm 12.5 <i>n</i> = 4	9.5 \pm 1.7 ^a <i>n</i> = 6	68.6 \pm 28.4 <i>n</i> = 5	12.0 \pm 3.4 <i>n</i> = 5

p values: footnotes ^{a,b,c} indicate $< .05$, $< .01$, and $< .001$ vs. control, and footnotes ^{d,e,f} indicate $< .05$, $< .01$, and $< .001$ vs. GalN; ^g $p < .05$ vs. F1,6BP + GalN. Histamine and LPS were determined 1 hr after treatment. TNF- α and transaminase activities were determined 24 hrs after challenge. CrGly and Comp. 48/80 indicate cromoglycate and compound 48/80, inhibitor and activator of mast cell degranulation, respectively. Results are mean \pm SE of *n* animals.

results indicate that mast cell degranulation *per se* did not induce endotoxemia in rats but contributed to GalN-induced endotoxemia. Considered together, the results shown in Figure 4 and Table 2 indicate that F1,6BP reduced endotoxemia in GalN-challenged rats by preventing mast cell degranulation and the increase

of plasma histamine, in agreement with previous *in vitro* findings (26, 27).

Following GalN challenge, endotoxins in portal and cava veins quickly increased to up to six and five times the control value, respectively (Table 2). The increased values of plasma LPS correlated with the enhancement of TNF- α production in the liver (Fig. 5) and of plasma TNF- α levels and transaminase activities measured 24 hrs after challenge (Table 2). F1,6BP treatment significantly reduced LPS enhancement and the subsequent increase in cytokine production and liver injury (Table 2, Fig. 5).

F1,6BP Reduced LPS-Induced Macrophage Activation. The results in Table 2 show that higher LPS levels in F1,6BP + GalN-treated rats corresponded to lower TNF- α than in CrGly + GalN-treated rats. This suggests an inhibitory effect of exogenous F1,6BP on the inflammatory response. Moreover, previous findings suggest that F1,6BP modulates the activation of cell membrane K⁺ channels (10, 27), which plays a primary role in LPS-induced monocyte/macrophage cytokine production and release (28).

To test whether potassium channels were involved in the *in vivo* protective effect of F1,6BP, we studied the effects of a potassium channel activator (minoxidil) and inhibitor (quinine) on transaminase activities of GalN-challenged rats. Minoxidil (1 mg/kg body weight) blunted,

whereas quinine (25 mg/kg body weight) mimicked, the protective effect of F1,6BP against GalN (Fig. 6).

To assess the *in vivo* effect of F1,6BP and the role of K⁺ channel modulation on the response to endotoxemia, we administered LPS (1.25 mg/kg) to rats treated with F1,6BP plus K⁺ channel activator and inhibitor. Although the administered dose of LPS was the same, the levels of LPS in plasma varied, depending on the pretreatment (Table 3). We took the ratio TNF- α /LPS, both measured in the same blood sample 1 hr after LPS administration, as an index of the sensitivity to endotoxemia: the higher the TNF- α /LPS ratio, the higher the response. Our results indicate that F1,6BP treatment reduced by half the TNF- α produced per unit of LPS in plasma (Table 3). According to the results shown in Figure 6, the inhibitory effect of F1,6BP on the inflammatory response to LPS was removed by minoxidil (Table 3), whereas quinine reduced LPS-induced TNF- α production, in agreement with findings reported elsewhere (29).

These results suggest that changes in K⁺ channel activity mediated the F1,6BP-induced inhibition of inflammatory response to endotoxemia. To confirm this hypothesis, we analyzed the effect of F1,6BP on both LPS-induced K⁺ channel activation and macrophage activation in primary cultures of Kupffer cells. F1,6BP (5 mM) abolished the LPS (100 ng/L)-induced increase of K⁺ cell membrane permeability and reduced TNF- α production (Fig. 7). Confirming the *in vivo* results shown in Figure 6 and Table 3, minoxidil sulfate (100 μ M) blocked the inhibitory effects of F1,6BP on both K⁺ channels and TNF- α production, whereas the blockade of K⁺ channels by tetraethylammonium (20 mM) + 4-aminopyridine (5 mM) (TEA + 4-AP) mimicked the effects of F1,6BP.

DISCUSSION

GalN is a highly specific hepatotoxic drug that induces a liver injury closely resembling viral hepatitis when given to rats (30). GalN-induced hepatitis in rats is caused by two overlapping effects: the increase of endotoxins in the blood (31), which in turn activates Kupffer cells and enhances cytokine production (14), and the sensitization of parenchymal cells to TNF- α (32, 33), as a consequence of GalN metabolism in hepatocytes. The injury induced by the excess of inflammatory

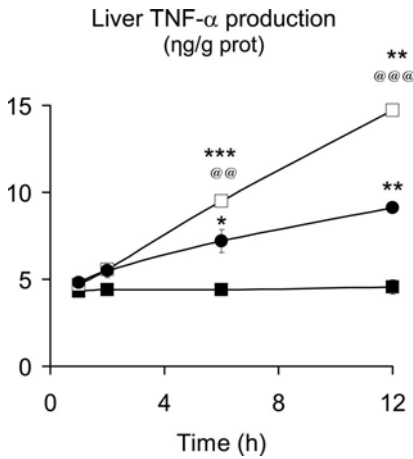


Figure 5. Time courses of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production measured in liver homogenates of control (■), galactosamine-treated (□), and fructose 1,6-bisphosphate + galactosamine-treated (●) rats. Each data point corresponds to mean \pm SE of four to seven animals (*, **, *** indicate $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$ vs. control; @, @@@ indicate $p < .01$ and $p < .001$ vs. fructose 1,6-bisphosphate + galactosamine).

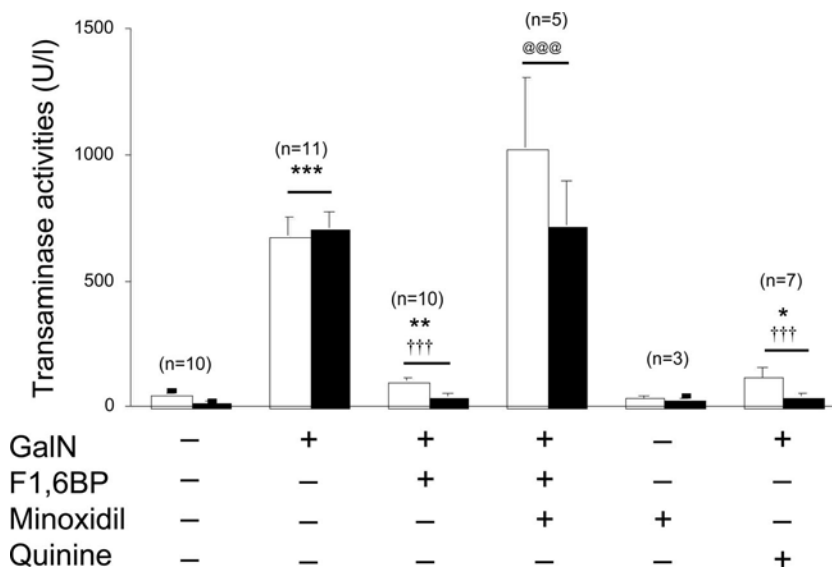


Figure 6. Effect of K⁺ channel activator (minoxidil) and inhibitor (quinine) on the protective effect of fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) against galactosamine (GalN)-induced hepatic injury. Aspartate (empty bars) and alanine aminotransferase (solid bars) activities were measured in plasma of rats 24 hrs after the indicated treatment. Results are mean \pm SE of n animals (*, **, *** indicate $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$ vs. saline; ††† and @@@ indicate $p < .001$ vs. GalN and F1,6BP + GalN, respectively).

Table 3. *In vivo* effect of fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) and K⁺ channel modulators on the inflammatory response to endotoxemia, as assessed by the ratio tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide (TNF-α/LPS)

	LPS (EU/L)	TNF-α (ng/L)	TNF-α/LPS (ng/EU)
Variable Control	3.0 ± 0.3 n = 4	12.5 ± 6.9 n = 4	3.6 ± 1.7 n = 4
Control + LPS	55.2 ± 9.5 ^b n = 9	554.9 ± 74.7 ^c n = 9	12.9 ± 2.7 ^a n = 9
F1,6BP + LPS	52.2 ± 7.4 n = 9	205.3 ± 82.6 ^{††} n = 9	3.3 ± 1.0 ^{††} n = 9
Min + F1,6BP + LPS	29.1 ± 4.9 ^{d,g} n = 6	266.8 ± 71.6 ^d n = 6	10.1 ± 3.5 ^g n = 6
Quinine + LPS	23.7 ± 4.4 ^d n = 4	44.4 ± 28.7 ^e n = 4	1.5 ± 0.8 ^f n = 4

Min, minoxidil, activator of K⁺ channels.

p values: footnotes ^{a,b,c} indicate <.05, <.01, and <.001 vs. control, and footnotes ^{d,e,f} indicate <.05, <.01, and <.001 vs. LPS; ^gp <.05 vs. F1,6BP + LPS. TNF-α and LPS concentrations were both measured in the same sample of blood taken from the cava vein 1 hr after intraperitoneal LPS administration 1.25 mg/kg to control and pretreated rats. Results are mean ± SE of n animals.

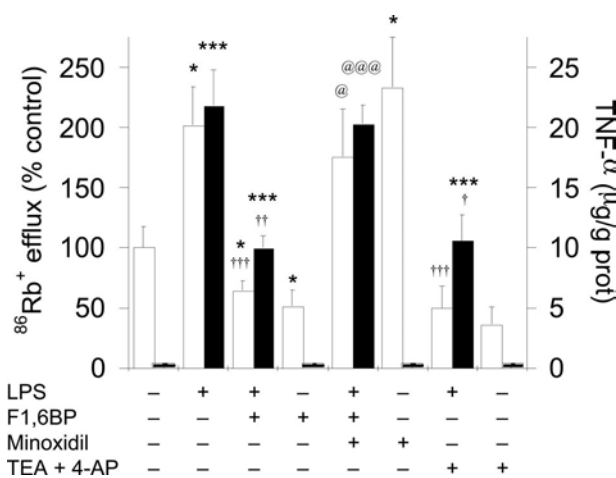


Figure 7. Fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) inhibited the lipopolysaccharide (LPS)-induced increase of cell membrane K⁺ permeability, as assessed by ⁸⁶rubidium (⁸⁶Rb)⁺ tracer (empty bars), and reduced the tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) production (solid bars) of primary cultures of Kupffer cells. The inhibitory effects of F1,6BP were removed by minoxidil (nonspecific K⁺ channel activator). Inhibition of K⁺ channels by tetraethylammonium + 4-aminopyridine (TEA+4-AP) blunted the LPS-induced cytokine production. Results are mean ± SE of six to ten isolations (*, ***, and @, @@@ indicate p <.05 and p <.001 vs. saline and F1,6BP+LPS, respectively; †, ††, ††† indicate p <.05, p <.01, and p <.001 vs. LPS).

response in the GalN-sensitized hepatocytes initiated the cascade of processes leading to liver failure (32, 34, 35).

Most previous studies on the protective action of F1,6BP have focused on the effects on metabolism of parenchymal cells. Indeed, improved mitochondrial function (2), cell membrane stabilization (10), and reduced free radical production have been associated with the improvement of metabolic efficiency in the presence of F1,6BP (1). However, these actions cannot explain the prevention of the GalN-induced hepatitis in rats. Unlike other liver-protective metabolites such as uridine, F1,6BP did not prevent the GalN-induced transcriptional arrest (Fig. 3)

and the subsequent increase in sensitivity to TNF-α in hepatocytes of challenged rats. Indeed, comparisons of liver injury between GalN- and F1,6BP + GalN-treated rats (Fig. 1 and Fig. 2) confirm that F1,6BP prevents liver injury in GalN-challenged rats. Moreover, the increase of liver injury following the administration of TNF-α to F1,6BP + GalN-treated rats (Fig. 1, Fig. 2 and Table 1) indicates that hepatocytes remain sensitive to this cytokine. All these results suggest a reduction of the GalN-induced inflammatory response as the main action for the protective effect of F1,6BP. We considered two targets for F1,6BP in its prevention of excess inflammatory response: the inhi-

bition of mechanisms that lead to endotoxemia, and the reduction of macrophage activation.

Antihistaminic and Anti-Inflammatory Effects of F1,6BP. The GalN promotion of endotoxemia and inflammation suggests a nonspecific interaction with the membrane components of cells, probably related to the aminated group (36). Indeed, GalN modulated macrophage phagocytic function, despite the low capacity of these cells to metabolize galactose (14, 37, 38). GalN and other amino compounds, such as mannosamine, histamine, and arginine, inhibited platelet aggregation, whether induced by thrombin (36), arachidonic acid, or the Ca²⁺ ionophore A23187 (39), through reduction of plasma membrane lectin activity. Unlike other amino compounds, GalN inhibition did not affect the internal reactions stimulated by the agonists (39). Moreover, GalN-induced endotoxemia is associated with the ability of this aminated sugar to produce mast cell degranulation (14). The subsequent histamine release contributes to increasing gut permeability and bacterial transfer to the blood (31, 40). The activation of cytokine production amplified the metabolic effect of GalN on liver parenchymal cells (32). Thus, the antihistaminic effect of F1,6BP is a primary contribution to the prevention of endotoxemia upstream of the inflammatory response.

The F1,6BP Anti-Inflammatory Effect is Mediated by Cell Membrane K⁺ Channel Activity Inhibition. These findings strongly suggest a nonspecific mechanism for F1,6BP in impeding the GalN-induced membrane alterations of cells involved in endotoxemia and inflammation. Previous results related the effects of ex-

The evidence reported here that F1,6BP modulated K⁺ channel activation increases the potential therapeutic value of this bisphosphorylated sugar in those pathologic situations involving histaminemia and inflammation and opens up new perspectives on its role as a modulator of cell proliferation.

ogenous F1,6BP to reduction of potassium cell membrane permeability in both hepatocytes (10) and mast cells (27). Indeed, we reported that F1,6BP blunted the GalN-induced increase of hepatocyte cell membrane permeability to K⁺ (10), whereas Figueroa et al. observed that F1,6BP prevented the increase of plasma K⁺ concentration following the intraperitoneal injection of compound 48/80 in rats (27). The *in vivo* results reported here suggest a link between K⁺ channel inactivation and the anti-inflammatory action of F1,6BP (Fig. 6 and Table 3).

Endotoxin stimulation of macrophages is a complex process initiated by cell membrane receptors and involves at least four proteins: LPS-binding protein (LBP), soluble and membrane-bound receptor CD14, MD-2 protein, and the transmembrane protein Toll-like receptor-4 (TLR-4) (41, 42). The intracellular signal evoked by the transmembrane unit of TLR-4 and the internalization of the LPS + LBP + CD14 complex (43) lead to the transcriptional and posttranscriptional regulation of cytokine production. The early LPS-induced activation of K⁺ channels is critical for the progress of macrophage activation (28, 44). Indeed, prevention of LPS-induced activation by glycine blunted macrophage activation (45), whereas activation of high-conductance Ca²⁺- and voltage-sensitive K⁺-channels (K_{Ca}) stimulated LPS-induced cytokine production (44). These effects

are consistent with the concomitant inhibition of the LPS-induced K⁺ channel activation and cytokine production in the presence of F1,6BP shown in Figure 7.

In conclusion, the capacity of F1,6BP to modulate K⁺ channel activation provides new insights into the mechanisms underlying the protective action of this bisphosphorylated sugar. K⁺ channel activation plays a primary role in triggering and promoting many relevant events in pathology, such as activation of mast cells (46) and macrophages (44) and control of apoptosis and proliferation (47). Consequently, the evidence reported here that F1,6BP modulated K⁺ channel activation increases the potential therapeutic value of this bisphosphorylated sugar in those pathologic situations involving histaminemia and inflammation and opens up new perspectives on its role as a modulator of cell proliferation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Esther Castaño (SCT, Unitat de Bellvitge, UB) and Robin Rycroft (SAL, UB) for their assistance and Victor Moreno for his statistical revision.

REFERENCES

- Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D, et al: Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Radic Res Commun* 1992; 16:325-339
- Sano W, Watanabe F, Tamai H, et al: Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995; 108:1785-1792
- Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, et al: Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during *in vitro* hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res* 2001; 917:158-166
- Chu SJ, Chang DM, Wang D, et al: Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 2002; 30:1605-1609
- Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H: Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74:779-783
- Hardin CD, Roberts TM: Metabolism of exogenously applied fructose 1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 267: H2325-H2332
- Hardin CD, Lazzarino G, Tavazzi B, et al: Myocardial metabolism of exogenous FDP is consistent with transport by a dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H2654-H2660
- Fahlman CS, Bickler PE, Sullivan B, et al: Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca²⁺ and phospholipase C. *Brain Res* 2002; 958: 43-51
- De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, et al: Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992; 15: 1147-1153
- Roig T, Bartrons R, Bermudez J: Exogenous fructose 1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997; 273:C473-C478
- Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, et al: An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; 47:35-41
- Keppler DO, Pausch J, Decker K: Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors: Effect on ribonucleic acid synthesis. *J Biol Chem* 1974; 249:211-216
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al: Murine hepatocyte apoptosis induced *in vitro* and *in vivo* by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994; 153:1778-1788
- Liehr H, Grun M, Seelig HP, et al: On the pathogenesis of galactosamine hepatitis: Indications of extrahepato cellular mechanisms responsible for liver cell death. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1978; 26:331-344
- Karima R, Matsumoto S, Higashi H, et al: The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999; 5:123-132
- Nunes FB, Simoes Pires MG, Farias Alves Filho JC, et al: Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30:2069-2074
- Fawthrop DJ, Boobis AR, Davies DS: Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991; 65: 437-444
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, et al: Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J Neural Transm* 2001; 108: 1383-1396
- Novitsky TJ, Roslansky PF, Siber GR, et al: Turbidimetric method for quantifying serum inhibition of *Limulus* amoebocyte lysate. *J Clin Microbiol* 1985; 21:211-216
- Yusem M, Delaney WE, Lindberg MA, et al: An improved fluorimetric determination of histamine by stabilizing the o-phthalaldehyde reagent. *Anal Chim Acta* 1969; 44: 403-409
- Muntane J, Rodriguez FJ, Segado O, et al: TNF-alpha dependent production of induc-

- ible nitric oxide is involved in PGE(1) protection against acute liver injury. *Gut* 2000; 47:553–562
22. Bartrons R, Hue L, Van Schaftingen E, et al: Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1983; 214:829–837
 23. Smedsrod B, Pertoft H, Eggertsen G, et al: Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll, and selective substrate adherence. *Cell Tissue Res* 1985; 241: 639–649
 24. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156–159
 25. Bourne PK, Cossins AR: Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. *J Physiol* 1984; 347:361–375
 26. Schinetti ML, Greco R, Lazzarino G, et al: Inhibiting effect of fructose 1,6 diphosphate on rat mast cell histamine release. *Int J Tissue React* 1983; 5:55–59
 27. Figueroa AH, Stone RH, Cohly HHP, et al: Effect of fructose-1, 6-diphosphate versus diphenhydramine on mortality in compound 48/80-induced shock. *Toxicology Letters* 2001; 122:141–148
 28. Seydel U, Scheel O, Muller M, et al: A K⁺ channel is involved in LPS signaling. *J Endotoxin Res* 2001; 7:243–247
 29. Gantner F, Uhlig S, Wendel A: Quinine inhibits release of tumor necrosis factor, apoptosis, necrosis and mortality in a murine model of septic liver failure. *Eur J Pharmacol* 1995; 294:353–355
 30. Decker K, Keppler D: Galactosamine hepatitis: Key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1974; 71:77–106
 31. Kasravi FB, Wang L, Wang XD, et al: Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* 1996; 23:97–103
 32. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al: Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995; 146: 1220–1234
 33. Nagaki M, Sugiyama A, Osawa Y, et al: Lethal hepatic apoptosis mediated by tumor necrosis factor receptor, unlike Fas-mediated apoptosis, requires hepatocyte sensitization in mice. *J Hepatol* 1999; 31:997–1005
 34. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, et al: Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: A critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184:1397–1411
 35. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, et al: TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000; 103:1071–1083
 36. Gartner TK, Williams DC, Minion FC, et al: Thrombin-induced platelet aggregation is mediated by a platelet plasma membrane-bound lectin. *Science* 1978; 200:1281–1283
 37. Hofmann F, Wagle SR, Decker K: Effect of D-galactosamine administration on nucleotide and protein metabolism in isolated rat Kupffer cells. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1976; 357:1395–1400
 38. Lozano JM, Padillo J, Montero JL, et al: Immunomodulatory activity of TNF-alpha during acute liver injury induced by D-galactosamine and its protection by PGE1 in rats. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:197–207
 39. Houston DS, Gerrard JM, McCrea J, et al: The influence of amines on various platelet responses. *Biochim Biophys Acta* 1983; 734: 267–273
 40. Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, et al: Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: Role of Kupffer cells. *Hepatology* 1999; 29:737–745
 41. Lichtman SN, Wang J, Lemasters JJ: Lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha release from cultured rat Kupffer cells: Sequence of intracellular signaling pathways. *J Leukoc Biol* 1998; 64:368–372
 42. Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169–176
 43. Vasselon T, Hailman E, Thieringer R, et al: Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14. *J Exp Med* 1999; 190:509–521
 44. Blunck R, Scheel O, Muller M, et al: New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: Involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J Immunol* 2001; 166:1009–1015
 45. Wheeler MD, Rose ML, Yamashima S, et al: Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L390–L398
 46. Duffy SM, Lawley WJ, Conley EC, et al: Resting and activation-dependent ion channels in human mast cells. *J Immunol* 2001; 167: 4261–4270
 47. Wang Z: Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* 2004; 448:274–286

osis. Tsuchida and colleagues have already reported that Lixelle adsorbent could remove inflammatory cytokines and endotoxin (13). Moreover, they showed that direct hemoperfusion treatment with the Lixelle column in patients exhibiting the clinical features of SIRS could remove inflammatory cytokines and aid recovery from clinical shock (14). Although the Lixelle column was designed to effectively adsorb molecules whose molecular weights are approximately 10kD to 20kD, CTR is designed to adsorb middle- to high-molecular-weight molecules (20–50 kD), with inflammatory cytokines falling into this category.

It is also noteworthy that a recent case report demonstrated that cytokine apheresis with the CTR-001 column was safe and effective in reducing levels of proinflammatory cytokines during acute pancreatitis (15). Therefore, the CTR column may also be available for use in patients with sepsis and/or endotoxemia, in addition to the Lixelle column. Circulating cytokines are elevated subsequent to various stressful conditions such as hemorrhagic shock, trauma, acute pancreatitis, burn injury, abdominal peritonitis, and acute pneumonia. Because the excess production of cytokines is a critically important factor in the progression of these diseases, the CTR column may have therapeutic potential for these diseases.

We believe that the work of Dr. Taniguchi and colleagues will promote further studies and reveal additional aspects

of the CTR column in the treatment of SIRS, severe sepsis, or septic shock.

Tomoharu Shimizu, MD, PhD

Yoshihiro Endo, MD, PhD

Tohru Tani, MD, PhD

Department of Surgery

Shiga University of Medical

Science

Shiga, Japan

REFERENCES

1. Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996; 24:163–172
2. Wang JE, Dahle MK, McDonald M, et al: Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: Receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 2003; 20:402–414
3. Deans KJ, Haley M, Natanson C, et al: Novel therapies for sepsis: A review. *J Trauma* 2005; 58:867–874
4. Dunn DL: Prevention and treatment of multiple organ dysfunction syndrome: Lessons learned and future prospects. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1:227–236
5. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J et al: A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock* 2005; 23: 400–405
6. Bengsch S, Boos KS, Nagel D, et al: Extracorporeal plasma treatment for the removal of endotoxin in patients with sepsis: Clinical results of a pilot study. *Shock* 2005; 23: 494–500
7. Ronco C, Bellomo R, Homel P, et al: Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: A prospective randomised trial. *Lancet* 2000; 356:26–30
8. Ronco C, Tetta C, Mariano F, et al: Interpreting the mechanisms of continuous renal replacement therapy in sepsis: The peak concentration hypothesis. *Artif Organs* 2003; 27:792–801
9. Menegatti E, Ronco C, Winchester JF, et al: Absence of NF-kappaB activation by a new polystyrene-type adsorbent designed for hemoperfusion. *Blood Purif* 2005; 23:91–98
10. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al: A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002; 30:1250–1255
11. Taniguchi T, Hirai F, Takemoto Y, et al: A novel adsorbent of circulating bacterial toxins and cytokines: The effect of direct hemoperfusion with CTR column for the treatment of experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 2006; 34:800–806
12. Esmon CT: Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32:S219–S222
13. Tsuchida K, Takemoto Y, Sugimura K, et al: Adsorption of endotoxin by beta2-microglobulin adsorbent column (Lixelle): The new approach for endotoxemia. *Ther Apher* 2002; 6:116–118
14. Tsuchida K, Takemoto Y, Sugimura K, et al: Direct hemoperfusion by using Lixelle column for the treatment of systemic inflammatory response syndrome. *Int J Mol Med* 2002; 10:485–488
15. Saotome T, Endo Y, Sasaki T, et al: A case of severe acute pancreatitis treated with CTR-001 direct hemoperfusion for cytokine apheresis. *Ther Apher Dial* 2005; 9:367–371

Multiple beneficial actions of fructose 1,6-biphosphate in sepsis-associated liver injury*

Acute liver injury and hepatic failure are serious clinical conditions sometimes encountered both in extensive hepatic surgery and in patients with multiple organ failure (1). Bacterial infection and sepsis, which are danger-

ous complications stemming from liver injury, can enhance its morbidity and mortality (2). The pathogenesis of acute liver injury generally involves the activation of an immune response, cardiovascular disorders, and intracellular oxidative stress (3). In addition, profound metabolic changes occur in hepatocytes to maintain glucose homeostasis during those phases of partial liver necrosis and ulterior regeneration (4). Such changes are particularly relevant in clinical conditions associated with endotoxemia, in which the inflammatory response not only induces vascu-

lar hypotension but also results in insufficient oxygen supply to tissues.

In the present issue of *Critical Care Medicine*, Cuesta et al. (5) administered D-galactosamine (D-GalN) to induce liver injury. D-GalN is a useful experimental model that illustrates several features of drug-induced hepatitis in humans (6). D-GalN induces hepatotoxicity by the depletion of uridin phosphates via the formation of UDP-sugar derivatives, thereby inhibiting RNA synthesis and generating disturbances in the biosynthesis of glycoproteins. This leads to the deterioration

*See also p. 814.

Key Words: cell death; hepatocytes; glycolysis; Kupffer cells; mast cells

This author has nothing to disclose.

Copyright © 2006 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000202436.45295.6E

of the cell membranes, as well as increased cell death (6).

Although D-GalN exhibits marked hepatocyte specificity, due to the high levels of galactokinase and UDP-glucose:galactose-1-*P*-uridylyltransferase in hepatocytes, different extrahepatic factors are particularly relevant to D-GalN hepatotoxicity, including increased mast cell-associated gut permeability, bacterial translocation, and endotoxemia (7). Furthermore, tumor necrosis factor (TNF)- α released from activated Kupffer cells exacerbated cell death in hepatocytes subjected to transcriptional arrest by D-GalN. The overall picture of D-GalN hepatotoxicity is one of diffuse liver cell injury, with spotty hepatocyte necrosis and prominent portal and parenchymal inflammation.

In this experimental model of liver injury, hepatic glycogen content is reduced, either as a consequence of intracellular UDP-glucose depletion or because of its need to maintain cellular energy status. In this sense, maintaining plasmatic concentrations of glucose during D-GalN-induced liver injury was associated with a depletion of glycogen and fructose 2,6 biphosphate content in liver (8). Fructose 2,6-biphosphate (Fru-2,6-P₂), the most potent allosteric activator of 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) and an inhibitor of fructose 1,6-biphosphatase (FBPase-1), promotes the accumulation of high-energy glycolysis intermediates such as fructose 1,6-biphosphate (Fru-1,6-P₂). The administration of Fru-1,6-P₂ reportedly exerts protective effects in toxic liver damage, septic shock, and tissue ischemia (9–11).

The beneficial effects of Fru-1,6-P₂ have been documented in different tissues, including the heart, liver, kidney, brain, and small intestine (9, 11, 12). The cytoprotective mechanisms underlying Fru-1,6-P₂ are believed to be involved in its intervention in the glycolytic pathway, as a metabolic regulator or substrate, as well as an agent modifying the ion permeability of cell membrane transporters. In a prior study, Roig et al. (13) successfully interrelated the two mechanisms during Fru-1,6-P₂ cytoprotection in cultured rat hepatocytes. In this way, the beneficial effects of Fru-1,6-P₂ against D-GalN-induced cell death were linked to the reduction of passive or active K⁺ effluxes and metabolic downregulation in hepatocytes (13). The reduction of cellular adenosine triphosphate consumption

upon Fru-1,6-P₂ administration may have a beneficial impact on both mitochondrial function and free radical generation. The addition of Fru-1,6-P₂ as a sole carbon source instead of glucose has been shown to reduce adenosine triphosphate generation, intracellular oxidative stress, and apoptosis during the reoxygenation of hypoxic cultured rat hepatocytes (14).

Furthermore, in this issue of *Critical Care Medicine*, Cuesta et al. (5) elucidated the beneficial effects of Fru-1,6-P₂ on the critical features of the extrahepatic D-GalN-related reperfusion, such as bacterial gut translocation and Kupffer-related TNF- α production during liver injury. This study clearly outlines the sequential events that occur during D-GalN-induced endotoxemia and cell damage. The prevention of mast cell degranulation by Fru-1,6-P₂ drastically reduced endotoxemia and D-GalN-induced liver injury (5).

The most interesting observation put forward by the authors regarding the beneficial effects of Fru-1,6-P₂ on TNF- α hepatic expression (vs. that induced by an inhibitor of mast cell degranulation) was the additional anti-inflammatory effects of carbohydrate in D-GalN-treated animals. Reduced TNF- α production by Fru-1,6-P₂ was linked to its capacity to prevent K⁺ efflux in lipopolysaccharide-stimulated Kupffer cells (5). The early lipopolysaccharide-induced activation of K⁺ channels has been shown to be critical for macrophage activation (15).

Other molecules, such as glycine and uridine, also prevent experimental liver damage, but only through the activation of the membrane-gated chloride channel in Kupffer cells (16). This effect induces cellular membrane hyperpolarization and prevents the opening of a voltage-dependent calcium channel, thereby blunting any increases in intracellular calcium concentration, as well as blocking Kupffer cell activation (16). Nevertheless, glycine or uridine in unrelated D-GalN damage is unable to prevent hepatocyte cell death (16).

The findings presented herein by Cuesta et al. (5) are particularly relevant as they demonstrate that the beneficial effects of Fru-1,6-P₂ extend to all critical steps related to sepsis-associated liver injury. In addition, Fru-1,6-P₂ can be regarded as a molecule of potentially therapeutic importance in those pathologic conditions involving histaminemia, in-

flammation, and/or cell injury.

Jordi Muntané, MD, PhD

Hospital Universitario Reina
Sofía

Unidad de Investigación

Liver Research Unit

Cordoba, Spain

REFERENCES

1. Williams R, Gimson AES: Intensive liver care and management of acute hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36:820–826
2. Rolando N, Harvey F, Brahm J, et al: Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: An analysis of fifty patients. *Hepatology* 1990; 11:49–53
3. Kaplowitz N: Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 2002; 22:137–144
4. Isselbacher KJ, Jones WA: Alterations of glucose metabolism in viral and toxic liver injury. *Gastroenterology* 1964; 46:424–433
5. Cuesta E, Boada J, Calafell R, et al: Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Crit Care Med* 2006; 34:807–814
6. Decker K, Keppler K: Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis: Accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur J Biochem* 1969; 10:219–225
7. Liehr H, Grun M, Seeling H: On the pathogenesis of galactosamine hepatitis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1978; 26:331–335
8. De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, et al: Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: Protective role of fructose 1,6 bisphosphate. *Hepatology* 1992; 15: 1147–1153
9. Rao SB, Mehendale HA: Protective role of fructose 1,6 bisphosphate during CCl₄ hepatotoxicity in rats. *Biochem J* 1989; 262: 721–725
10. Bordignon Nunes F, Guerra Simoes Pires M, Farias Alves JC, et al: Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30:2069–2074
11. Markov AK, Oglethorpe N, Blade TM, et al: Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 1980; 100:639–646
12. Markov AK, Turner MD, Oglethorpe NC, et al: Fructose-1,6 diphosphate: An agent for treatment of experimental endotoxin shock. *Surgery* 1981; 90:482–488
13. Roig T, Bartrons R, Bermudez J: Exogenous fructose 1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 273:C473–C478
14. Frenzel J, Richter J, Eschrich K: Fructose inhibits apoptosis induced by reoxygenation in rat hepatocytes by decreasing reactive oxygen species via stabilization of the glutathi-

How cytomegalovirus reactivation could cause pulmonary pathology in septic hosts*

Human cytomegalovirus (HCMV) antibodies can be detected in 40–100% of adult humans. Primary HCMV infection frequently occurs in infancy, and the virus persists lifelong in the host, generally in a latent state. Reactivation of HCMV infection from latency is well known in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection and in recipients of stem cell or organ transplants. These immunocompromised patients are at high risk of developing HCMV disease with significant morbidity and mortality rates. In contrast, HIV-negative persons not receiving immunosuppressive drugs have usually been considered not particularly susceptible for HCMV reactivation (1).

Meanwhile, however, an HCMV reactivation rate of >95% has been reported in healthy HCMV seropositive breastfeeding mothers (2). More recent clinical investigations suggest that HCMV infection might have been underestimated also in surgical intensive care medicine (3–5); HCMV cultures became positive in respiratory samples of 21% of HCMV immunoglobulin G-positive surgical patients with moderate severity of illness (mean admission Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score 13.1 ± 0.5) staying in the intensive care unit for ≥ 5 days (4). In the most severely ill patients (Simplified Acute Physiology Score II >40) of another surgical intensive care unit, the detection rate of HCMV DNA was 35%, even reaching 62% in the subgroup with underlying bacterial or fungal sepsis (5). Some earlier publications provided strong evidence that sepsis might

promote HCMV reactivation by causing an imbalance in immunomodulatory mediators, leading to immunodysfunction in the critically ill (6, 7). Tumor necrosis factor- α has been shown to play a key role in this context by stimulating the activity of the HCMV immediate early (IE) 1/2 enhancer/promoter, which controls IE1 and IE2 gene expression via activation of the transcription factor nuclear factor- κ B and its binding to putative binding sites in the IE1/2 enhancer (8).

However, the clinical significance of HCMV DNA detection or HCMV isolation from blood or respiratory secretions in so-called immunocompetent intensive care patients is not yet clearly understood. Full-blown HCMV disease in this patient population has been described in several case reports, and histologic evidence for HCMV pneumonia was shown in 18 of 36 patients who underwent open lung biopsy because of otherwise unexplained acute respiratory distress syndrome (9). But in cohorts of immunocompetent critically ill patients, typical HCMV disease seems to be very rare (3–5). In 139 mechanically ventilated patients, a high incidence of active infection with herpes viruses was detected but no virus-induced nosocomial pneumonia (10). Longitudinal monitoring of a severely burned patient with recurrent episodes of bacterial sepsis suggested that the course of productive HCMV replication in blood and lung might be self-limiting (11). Nevertheless, two study groups observed that immunocompetent patients with HCMV reactivation had an increased length of intensive care unit stay and tended to have higher mortality rate than those in whom the virus remained undetectable (4, 5).

How can these seemingly contradictory findings be reconciled? In this issue of *Critical Care Medicine*, Dr. Cook and colleagues (12) present an intriguing animal study that might contribute to a better understanding. They demonstrate

that reactivation of murine cytomegalovirus (MCMV) from latency was associated with prolonged gene expression of inflammatory mediators in the lung tissue of nonimmunocompromised septic mice. Abnormal pulmonary fibrosis appeared 3 wks after induction of sepsis by cecal ligation and puncture, which served as trigger for MCMV reactivation. Such effects did not occur if MCMV reactivation was blocked by ganciclovir (12). These novel findings could explain how cytomegalovirus reactivation might cause increased morbidity in septic hosts even when full-blown cytomegalovirus disease is prevented by immune defense. There are several reasons why the experimental concept presented by Dr. Cook and colleagues might be applicable to immunocompetent critically ill patients. First, the mechanism inducing MCMV reactivation in their animal model was sepsis with proven increase of tumor necrosis factor- α messenger RNA. Sepsis is one of the most common and most serious complications in intensive care treatment; within the last decade *in vitro* and *in vivo* investigations have provided substantial evidence that inflammation can promote cytomegalovirus reactivation (6–8). Second, it is plausible that pathogenicity of cytomegalovirus reactivation would affect the lungs, because they are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence (13). Clinical studies have confirmed that HCMV reactivation can occur in the lung of nonimmunocompromised intensive care patients (3, 4), and an association with acute respiratory distress syndrome was suspected in two investigations (4, 9). Finally, intensivists are familiar with the ganciclovir prophylaxis suggested by Dr. Cook and colleagues, because it is frequently applied in solid organ recipients. Thus, this concept could easily be adopted to preserve septic immunocompetent patients from HCMV-induced morbidity.

*See also p. 842.

Key Words: cytomegalovirus; reactivation; pulmonary fibrosis; sepsis; immunocompetent mice; critical illness

Copyright © 2006 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000202442.33792.04