
1.INTRODUCCIÓ

1.1. Mecanisme d'inflamació: paper de les cèl·lules endotelials

L'endoteli representa la superfície que els vasos sanguinis exposen al torrent circulatori i està format per una monocapa de cèl·lules endotelials unida a la membrana basal subjacent. Les cèl·lules endotelials són cèl·lules polaritzades, amb un domini apical en contacte amb la sang i un domini distal basal en contacte amb el subendoteli. Les cèl·lules endotelials formen complexes unions intercel·lulars i sintetitzen components de la matriu extracel·lular que ajuden a mantenir l'estabilitat i integritat de la paret vascular, com la fibronectina, i components de la làmina basal, com proteoglicans, heparàn sulfat, laminina, nidogen i col·lagen tipus IV i V.

L'endoteli regula nombroses funcions vasculars a través de les seves accions endocrina, paracrina i autocrina. En resposta a la seva interacció amb les cèl·lules sanguínies (plaquetes, leucòcits i monòcits), a forces físiques (pressió, fricció) i a substàncies circulants o alliberades per cèl·lules properes (angiotensina, catecolamines, quinines, prostaglandines, etc.), les cèl·lules endotelials alliberen diversos factors vasodilatadors com l'òxid nítric (NO), la prostaciclina (PGI₂), la prostaglandina E₂ (PGE₂), el factor hiperpolaritzant derivat de l'endoteli (EDHF); substàncies vasoconstrictores com les endotelines (ET-1), la prostaglandina H₂ (PGH₂), el tromboxà A₂ (TXA₂); diversos factors promotors del creixement com PDGF, bFGF, IGF-1; inhibidors del creixement com heparinoids (HPS), TGF; moduladors de la inflamació com les molècules d'adhesió ELAM, ICAM i VCAM, o vWF [1]; i factors hemostàtics i trombolítics com t-PA, u-PA, PAI-1, factor V, TF i trombomodulina (THBD) (Taula 1).

PRODUCTES EXPRESSATS EN CÈL·LULES ENDOTELIALS	
Productes de la Matriu	Fibronectina, Proteoglicans, Heparan-sulfat i dermatan sulfat Laminina, Nidogen, Col·lagen I, II, III, IV
Factors Vasomotors	Vasodilatadors: NO, PGI ₂ , PGE ₂ , EDHF Vasoconstrictors : ET-1, PGH ₂ , TXA ₂
Factors de Creixement	Promotors: PDGF, bFGF, IGF-1, ET-1 Inhibidors: HPS, TGF, NO, PGI ₂
Moduladors de la Inflamació	ELAM, ICAM, VCAM, vWF
Factors Hemostàtics i Trombolítics	t-PA/u-PA, PAI-1, Factor V (FV), TF, THBD

Taula 1. Productes expressats en cèl·lules endotelials. Modificat de [2].

Tots aquests factors modulen el to vascular i el creixement del múscul llis vascular, així com la coagulació, la fibrinòlisi i l'adhesió de cèl·lules sanguínies a la paret de l'endoteli vascular. En condicions normals existeix un equilibri entre les accions dels diferents factors endotelials [3]. En determinades situacions, aquest equilibri homeostàtic pot veure's alterat donant lloc a una disfunció endotelial.

1.1.1. Funcions de l'endoteli vascular

A més de la seva funció en el reclutament leucocitari durant el procés inflamatori, les cèl·lules endotelials activades controlen la immunitat innata, la immunitat adaptativa i els processos de coagulació i angiogènesi (Figura 1).

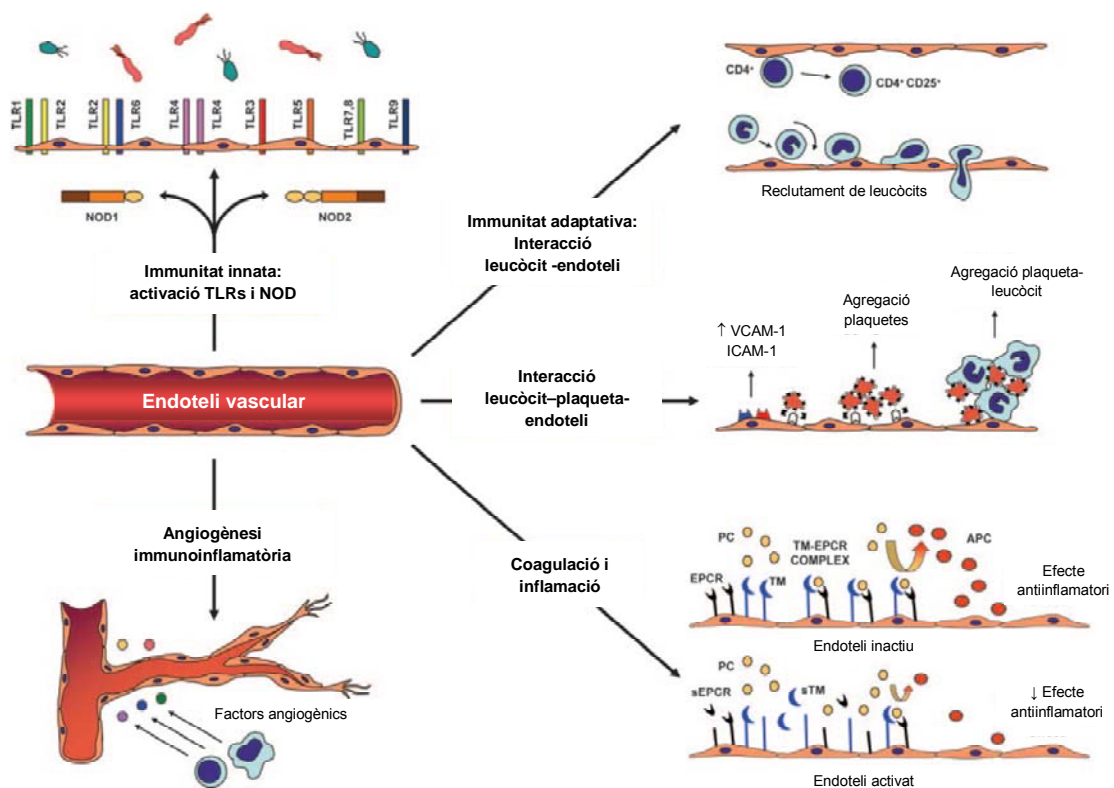


Figura 1. Funcions i interaccions cel·lulars mediades per cèl·lules endotelials en immunitat innata, immunitat adaptativa, coagulació i inflamació. Modificat de [4].

1.1.1.1. Immunitat innata

La principal funció de la immunitat innata és el reconeixement de PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*) a través de receptors de superfície, com els TLRs (*Toll like receptors*). Els TLRs desencadenen una via de transducció de senyals que dona lloc a l'expressió de gens proinflamatoris, quimiotaxi de leucòcits, fagocitosis, citotoxicitat i l'activació d'una resposta immune adaptativa [5]. Diferents estudis han demostrat l'expressió de TLRs en cèl·lules endotelials entre ells TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 i TLR8 [6].

1.1.1.2. Immunitat adaptativa

Les cèl·lules endotelials expressen les molècules MHC-I i MHC-II i poden processar l'antigen i actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen (APCs). L'endoteli expressa a més, molècules accesoris com CD80, CD86, ICOS-L, PDL-1, PDL-2 (*programmed death ligand*), LFA-3, CD134L i CD40 [7], i per tant, a través de la seva interacció amb els leucòcits i les plaquetes, les cèl·lules endotelials poden modular directament la immunitat adaptativa.

1.1.1.3. Coagulació

En condicions basals, l'endoteli confereix un estat de defensa antiinflamatori i anticoagulant, on està implicada la proteïna C (PC). En el procés d'activació de la PC intervenen la trombomodulina (THBD) i el receptor de proteïna C (EPCR). Aquestes dues proteïnes formen un complex en la superfície de la cèl·lula endotelial que captura la PC generant la forma activa de la proteïna (Figura 1). THBD i EPCR s'expressen de manera abundant a la superfície de la cèl·lula endotelial mentre que PC és sintetitzada en el fetge i circula sistèmicament [8].

1.1.1.4. Angiogènesi

Un altre nexa d'unió entre immunitat i cèl·lula endotelial és el procés d'angiogènesi, un component essencial d'inflamació aguda i crònica. L'angiogènesi és el creixement de nous vasos sanguinis a partir dels ja existents, mentre que la remodelació vascular implica modificacions estructurals sense formació de nous vasos sanguinis.

En la primera fase del procés d'inflamació tenen lloc canvis funcionals en les cèl·lules endotelials que ocasionen un increment en la permeabilitat vascular, l'activació i diapedesi de cèl·lules immunes a través de la vasculatura. Posteriorment es desencadenen canvis estructurals en l'endoteli que impliquen una remodelació de capil·lars i venes [9]. A mida que el procés inflamatori avança, els vasos sanguinis s'expandeixen per aportar suficients nutrients per sostenir l'acumulació de cèl·lules immunes activades en el teixit afectat. En la fase crònica de la inflamació, els macròfags i limfòcits infiltrats produeixen factors de creixement de les cèl·lules endotelials [10], té lloc una reparació contínua del teixit danyat i els vasos sanguinis formats de nou esdevenen permanents [11].

1.1.1.5. Reclutament leucocitari en la resposta inflamatòria

El component cel·lular essencial de la reacció inflamatòria, és el reclutament de leucòcits cap al focus inflamatori. Per a que tingui lloc l'extravasació dels leucòcits cap a

Introducció

l'àrea inflamada s'han d'establir una sèrie d'interaccions entre els leucòcits i les cèl·lules endotelials. Aquest procés consta de diverses fases que estan estretament regulades i impliquen l'expressió i activació d'una sèrie de molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials i les cèl·lules inflamatòries circulants. Aquestes molècules s'anomenen CAM (*cel·lular adhesion molecule*). En cada estadi del reclutament de leucòcits cap al lloc d'inflamació hi intervé una família diferent de molècules d'adhesió cel·lular expressades en la superfície dels leucòcits o en les cèl·lules endotelials.

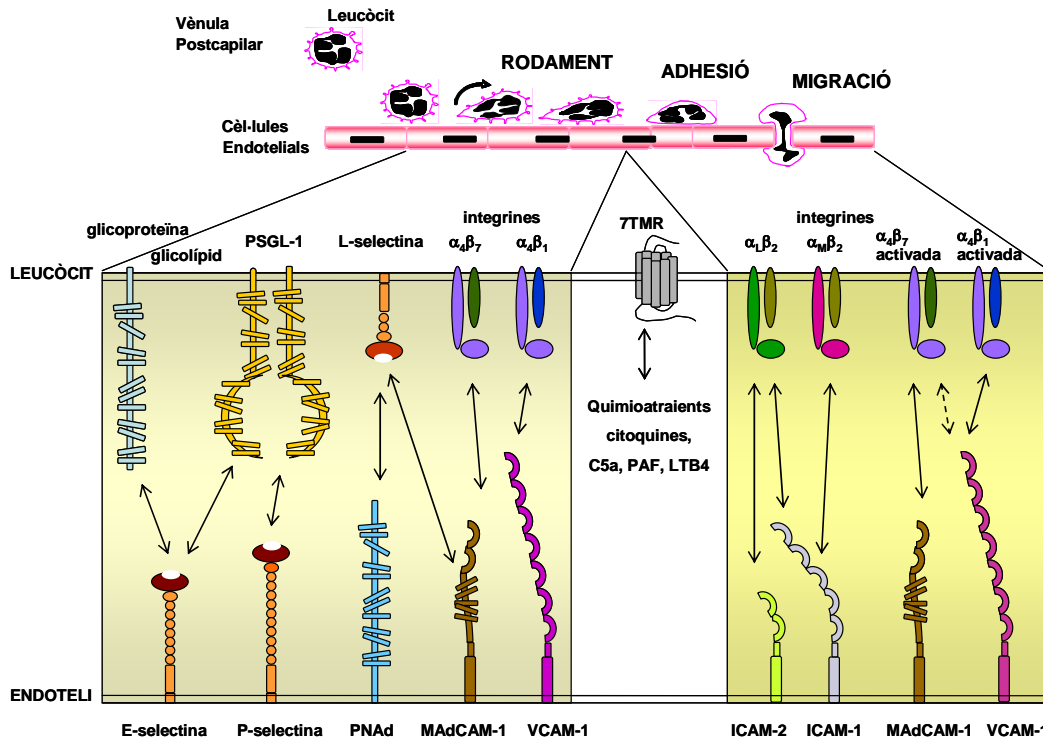


Figura 2. Procés seqüencial i molècules d'adhesió implicades en les interaccions leucòcit-endoteli. Modificat de [12].

Les interaccions leucòcit-endoteli s'inicien amb el desplaçament dels leucòcits cap a la perifèria de les vènules postcapil·lars, on interaccionen de forma dèbil amb les cèl·lules endotelials. Aquesta interacció fa que els leucòcits presentin un moviment de rotació al llarg de la paret de les vènules, que es denomina *rolling* o rodament (Figura 2). En una segona fase es pot produir l'activació dels leucòcits per l'acció de diferents mediadors proinflamatoris. Aquesta estimulació dels leucòcits fa que un tipus de molècules d'adhesió leucocitària, les integrines, que es troben habitualment inactives en la superfície del leucòcit, passin a la seva forma activa. Una vegada activats els leucòcits, tindrà lloc l'adhesió ferma d'aquests a l'endoteli. El pas final d'aquesta seqüència es produeix quan els leucòcits adherits migren cap a l'espai intersticial a través de les unions existents entre les cèl·lules endotelials.

1.1.1.5.1. Molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries

Les diferents famílies de CAM que participen en les interaccions leucòcit-endoteli són les selectines i els seus lligands, les integrines i molècules membres de la superfamília de les immunoglobulines (Taula 2).

Molècula d'adhesió	CD	Localització	Lligand	Funció
Família de les selectines				
P-selectina	CD62P	Cèl·lules endotelials Plaquetes	L-selectina PSGL-1, CD24	Rodament
E-selectina	CD62E	Cèl·lules endotelials	PSGL-1, ESL-1, L-selectina	Rodament
L-selectina	CD62L	Leucòcits	P-selectina, E-selectina, GlyCAM, CD34, MadCAM-1, PSGL-1, PCLP-1	Rodament
Família de les integrines				
LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$)	CD11a/CD18	Leucòcits	ICAM-1 ICAM-2	Adhesió Migració
Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$)	CD11b/CD18	Granulòcits Monòcits	ICAM-1	Adhesió Migració
P150/95 ($\alpha_X\beta_2$)	CD11c/CD18	Granulòcits Monòcits	Fibrinogen C3b	Activació Adhesió
VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)		Limfòcits Granulòcits, Monòcits	VCAM-1 Fibronectina	Adhesió
$\alpha_4\beta_7$		Limfòcits	MAdCAM-1 VCAM-1, Fibronectina	Rodament Adhesió
Família de les immunoglobulines				
ICAM-1	CD54	Endoteli Monòcits	CD11a/CD18 CD11b/CD18	Adhesió Migració
ICAM-2	CD102	Endoteli	CD11a/CD18	Adhesió Migració
VCAM-1	CD106	Endoteli	$\alpha_4\beta_1$ $\alpha_4\beta_7$	Adhesió Migració
PECAM-1	CD31	Endoteli Leucòcits, Plaquetes	PECAM-1	Adhesió Migració
MAdCAM-1		Endoteli intestinal	$\alpha_4\beta_7$ L-selectina	Adhesió Migració

Taula 2. Molècules d'adhesió implicades en les interaccions leucòcit-endoteli.

Selectines

Les selectines són les molècules d'adhesió cel·lular responsables dels fenòmens de rodament leucocitari. Existeixen 3 classes de selectines: la P-selectina, expressada per les plaquetes i l'endoteli; la E-selectina, present únicament a la superfície endotelial; i la L-selectina, que es troba als neutròfils, monòcits i eosinòfils circulants, i en la majoria dels

limfòcits B i T *naive* [13]. A diferència de les integrines o dels membres de la superfamília de les immunoglobulines que intervenen en les interaccions cèl·lula-cèl·lula en tot l'organisme, la funció de les selectines està restringida exclusivament al sistema vascular.

P-selectina i E-selectina no es troben de manera constitutiva en la superfície de les cèl·lules endotelials. La P-selectina s'emmagatzema en els grànuls- α de les plaquetes i en els cossos de *Weibel-Palade* de les cèl·lules endotelials i és mobilitzada cap a la membrana cel·lular en resposta a un estímul activador. La síntesi i expressió d'E-selectina, en canvi, estan regulades a nivell transcripcional. S'ha demostrat que l'expressió de E-selectina en les cèl·lules endotelials pot ser induïda per diversos estímuls, com les citoquines IL-1 i TNF- α , ROS i endotoxina bacteriana. L'expressió d'E-selectina pot ser detectada a la superfície de les cèl·lules endotelials a les 2 hores de l'estímul, disminuint a les 8 hores [14].

Superfamília de les immunoglobulines

La característica comuna d'aquest conjunt de molècules d'adhesió és l'existència de múltiples dominis tipus immunoglobulina a la seva estructura. Cinc membres d'aquesta família intervenen en les interaccions leucòcit-endoteli: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1 i MAdCAM-1.

ICAM-1 s'uneix a les integrines LFA-1 i Mac-1. S'expressa de forma basal en cèl·lules endotelials, cèl·lules epitelials, leucòcits i fibroblasts [15]. La seva expressió pot veure's incrementada per activació de l'endoteli mitjançant citoquines, lipopolisacàrid (LPS), o altres estímuls proinflamatoris.

ICAM-2 és una forma truncada de la molècula ICAM-1, el seu lligand és la integrina LFA-1. A diferència de ICAM-1, ICAM-2 està present en les cèl·lules endotelials de forma constitutiva, i la seva expressió no es veu influenciada per activació de l'endoteli [16].

VCAM-1 és un lligand de les integrines $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$, i juga un paper important com a modulador del tràfic de limfòcits i monòcits [17, 18]. S'expressa en cèl·lules endotelials de manera basal a nivell molt baix. La seva expressió en la superfície cel·lular es pot veure incrementada per mecanismes dependents de transcripció per NF- κ B en presència de citoquines proinflamatòries o LPS, amb una cinètica similar a la de ICAM-1.

PECAM-1 és un mediador de l'adhesió de leucòcits i plaquetes a les cèl·lules endotelials. A més, es creu que pot intervenir en la migració dels leucòcits, a través de l'endoteli, cap a l'espai intersticial [19]. Aquesta molècula d'adhesió s'expressa de manera constitutiva en plaquetes, leucòcits i cèl·lules endotelials, i igual com ICAM-2, la seva expressió no es veu modificada després de l'estimulació amb citoquines.

Finalment, MAdCAM-1 s'expressa majoritàriament en l'endoteli de les vènules de les plaques de Peyer, així com en altres vènules de l'intestí prim i gruixut [20] i actua com a lligand de L-selectina i de la integrina $\alpha 4\beta 7$.

1.1.1.5.2. Regulació de l'expressió de les molècules d'adhesió

De tots els factors de transcripció coneguts, NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) i AP-1 (*activator protein-1*) serien els més rellevants en la regulació dels gens implicats en la resposta inflamatòria. S'han identificat llocs d'unió per als factors de transcripció de la família NF- κ B en les regions promotores dels gens de la E-selectina, VCAM-1, MAdCAM-1 i ICAM-1 (que també té un lloc d'unió per AP-1). El factor NF- κ B juga un paper molt important en la inducció d'aquests gens en resposta a citoquines proinflamatòries [21].

1.1.1.6. Interacció plaquetes-endoteli

Les plaquetes que circulen pel torrent sanguini s'uneixen a l'endoteli activat desencadenant el procés inflamatori [22]. Un cop activades per unió a l'endoteli, les plaquetes produeixen quantitats importants de mediadors proinflamatoris com histamina, serotonina, tromboxà-A₂, PAF (*platelet activating factor*), PGE₂ i PGD₂, TGF- β , PDGF, quimioquines (RANTES, MCP-3, MIP-1 α) i IL-1 β , dirigides principalment cap a les cèl·lules immunes. Alguns d'aquests mediadors controlen el to vascular i la permeabilitat de l'endoteli. Les plaquetes també alliberen factors que promouen l'angiogènesi com el VEGF i l'heparanasa, que causa la degradació de la matriu extracel·lular facilitant l'extravasació de leucòcits cap al lloc d'inflamació [23].

1.1.2. Activació endotelial en inflamació

La inflamació crònica es considera un segell distintiu de moltes malalties, entre elles malalties que afecten la pell (psoriasis, èczema), l'intestí (malaltia de Crohn, colitis ulcerativa), el sistema nerviós central (Alzheimer, esclerosi múltiple), i patologies com l'artritis reumatoide, l'asma, l'aterosclerosi, la preclàmpsia i la diabetis juvenil.

En aquesta resposta inflamatòria hi intervenen diferents tipus cel·lulars que interaccionen entre ells de manera complexa (com cèl·lules endotelials, neutròfils i monòcits), citoquines (incloent quimioatracients i factors de creixement), molècules d'adhesió cel·lular i mediadors de baix pes molecular (p.ex. prostaglandines, leucotriens, fosfolípids).

L'endoteli juga un paper central en la reacció inflamatòria, ja que forma una barrera entre el torrent sanguini que conté les cèl·lules immunes i el teixit subjacent on té lloc el

procés inflamatori. Tot el que s'intercanvia entre aquests dos compartiments necessita passar a través de l'endoteli. En la regulació d'aquests processos, les cèl·lules endotelials hi participen de manera activa. En resposta a mediadors proinflamatoris, les cèl·lules endotelials expressen gens que codifiquen per citocines, factors de creixement i quimioquines (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF; *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, MCP-1; *monocyte chemoattractant protein-1*, RANTES; *regulated on activation, normal T expressed and secreted*) i molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) que participen en les diferents etapes de l'atracció, adhesió i transmigració de les cèl·lules immunes al lloc d'inflamació. En resposta a l'estímul proinflamatori també té lloc la regulació de l'expressió de gens associats amb supervivència/apoptosi (A20, A1, *inhibitor of apoptosis protein family members*), coagulació (TF, PAI-1; *plasminogen activator inhibitor-1*), proliferació, migració/dinàmica cel·lular i de teixit (VEGF, MMPs), canvis metabòlics i altres (iNOS, pentraxines).

A més de regular el procés inflamatori, l'endoteli vascular controla diferents funcions fisiològiques com la regulació de l'homeòstasi, la remodelació vascular, la funció de la musculatura llisa vascular i el creixement de nous vasos sanguinis. Totes aquestes funcions es veuen alterades en situació d'activació endotelial.

1.1.2.1. Efectes de l'activació endotelial en el reclutament leucocitari

L'activació endotelial juga un paper important en la transmigració dels leucòcits durant el procés inflamatori. Existeixen múltiples estímuls cel·lulars que poden desencadenar l'activació endotelial i fomentar la interacció de l'endoteli amb els leucòcits.

A la Figura 3 es mostren les diferents etapes del procés d'activació endotelial que desencadenen la transmigració de leucòcits a través de l'endoteli vascular durant el procés inflamatori.

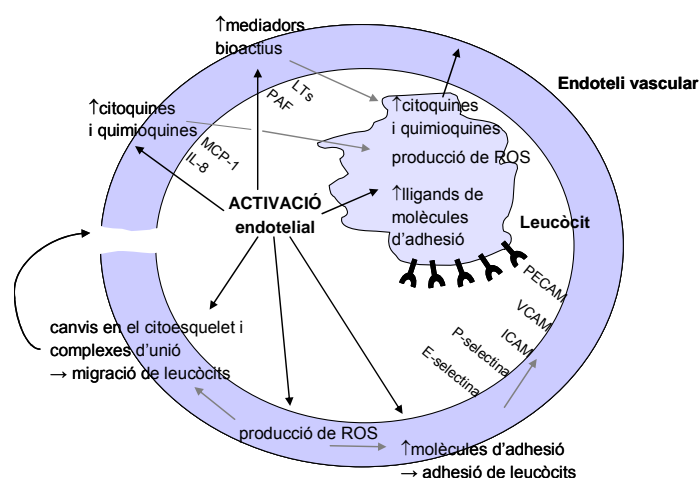


Figura 3. Mecanismes que donen lloc a l'activació endotelial i la interacció leucòcit-endoteli durant la resposta inflamatòria.

Durant el procés inflamatori, l'activació endotelial pot iniciar-se de diferents maneres.

1. Un efecte primerenc és la producció i alliberament per part de l'endoteli de mediadors bioactius, com metabòlits d'àcid araquidònic i PAF, que alteren la regulació de l'homeòstasi vascular, l'activitat de les cèl·lules sanguínies, la funció de barrera i la funció de les cèl·lules musculars llises de la vasculatura.
2. L'alteració ràpida de la senyalització endotelial dóna lloc a un increment en la síntesi i alliberament de citoquines i quimioquines per part de la cèl·lula endotelial, la qual cosa incrementa l'adhesió dels leucòcits i la seva migració a través de l'endoteli.
3. De manera similar, l'estimulació endotelial desencadena un augment en l'expressió de molècules d'adhesió a la superfície cel·lular per incrementar les interaccions endoteli-leucòcit, necessàries per a què tingui lloc la migració transendotelial.
4. L'estimulació endotelial causa una reorganització i disrupció de l'estructura normal del citoesquelet cel·lular i dels complexos d'unió entre cèl·lules, produint una disfunció de barrera que incrementa la migració dels leucòcits cap a l'espai subendotelial.
5. La producció amplificada d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i nitrogen per part de l'endoteli causa un increment en la via de senyalització que desencadena la producció de citoquines i molècules d'adhesió, el reclutament de leucòcits i el procés de diapedesi. Finalment, l'alliberament de mediadors proinflamatoris i la producció de ROS per part dels leucòcits reclutats i la seva unió a l'endoteli, manté l'estat d'activació endotelial i en darrer terme pot causar dany endotelial i/o angiogènesi, característics de l'estat d'inflamació crònica.

1.1.2.2. Estrès Oxidatiu

L'estrès oxidatiu és un tret característic de la resposta inflamatòria. Hi ha diferents enzims que poden generar ROS i causar estrès oxidatiu, incloent les oxidases mitocondrials, xantina oxidasa, NAD(P)H oxidasa, òxid nítric sintasa (NOS), citocrom P450, lipooxigenasa i ciclooxigenasa [24]. En leucòcits, l'enzim predominant que produeix ROS és la NAD(P)H oxidasa, mentre que les cèl·lules endotelials tenen la capacitat de generar ROS a partir diversos enzims. En teixits normals, les ROS són detoxificades mitjançant enzims com la superòxid dismutasa (SOD) i catalasa, i pels *free radical scavengers* normalment presents en el fluid extracel·lular (bilirrubina i àcid úric). Durant la inflamació, les ROS poden promoure l'adhesió de cèl·lules a l'endoteli vascular per diferents mecanismes.

- 1) Les ROS poden induir l'alliberament de mediadors proinflamatoris.
- 2) Les ROS poden donar lloc a l'activació de factors de transcripció que s'uneixen a la regió promotora de gens que codifiquen per CAM o citoquines. L'estrès oxidatiu ha estat

Introducció

l·ligat a l'activació dels factors de transcripció nuclears NFκB i AP-1, que són sensibles a ROS. Existeixen llocs d'unió a aquests factors de transcripció en la regió promotora de E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1.

3) Les ROS també poden mobilitzar molècules d'adhesió ja preformades a la superfície dels leucòcits (Mac-1) i en les cèl·lules endotelials (P-selectina), la qual cosa podria explicar el ràpid reclutament de leucòcits adherents cap al teixit inflamat. El peròxid d'hidrogen pot generar PAF i leucotriè B₄, els quals poden induir i/o activar les β₂-integrines de la superfície dels leucòcits (Figura 4).

Hi ha diferents estudis que demostren la importància de les ROS en l'inici de l'adhesió de leucòcits i plaquetes a l'endoteli. Ratolins deficientes en NAD(P)H oxidasa o animals transgènics que sobreexpressen SOD, mostren una resposta atenuada d'adhesió leucocitària en models d'estrès oxidatiu [25]. Animals tractats amb inhibidors de NOS [26] i ratolins *knockout* per NOS [27], en canvi, presenten un increment en l'adhesió leucocitària.

El NO és el mediador principal de tots els efectes protectors endotelials, a causa de les seves propietats antiinflamàtoies, antiproliferatives, immunomoduladores i vasodilatadores. El fet que la vasculatura assumeixi un fenotip proinflamatori o antiinflamatori (i per tant, protrombogènic o antitrombogènic) és resultat d'un balanç entre les ROS i el NO (Figura 4).

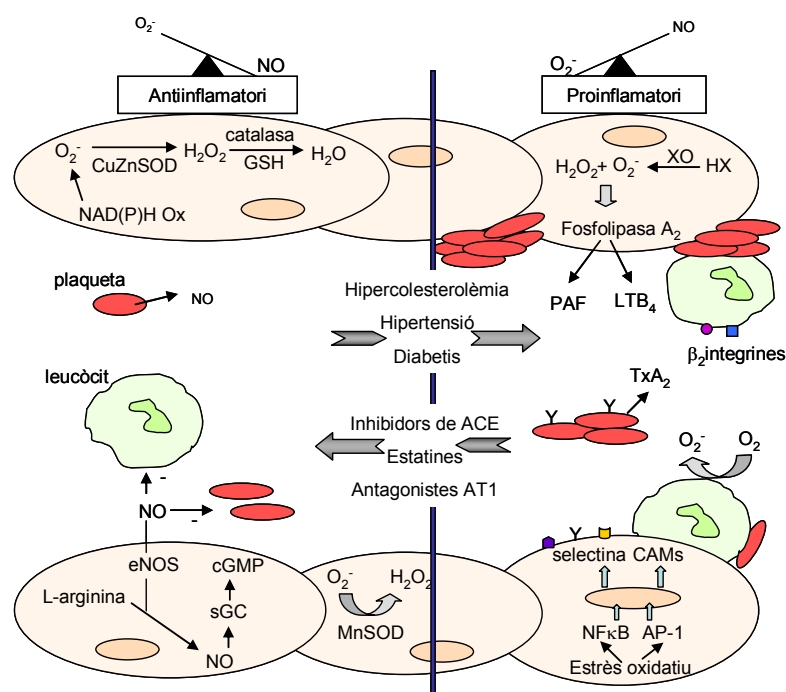


Figura 4. Paper del balanç superòxid-NO en la determinació del fenotip anti/proinflamatori per a l'endoteli vascular. Modificat de [28].

Encara que el NO i el superòxid (O_2^-) *per se* sovint es descriuen amb papers antiinflamatori i proinflamatori (i antitrombogènic i protrombogènic) respectivament, els

productes de la seva interacció química (RNOS) també poden donar lloc a ambdós fenotips i regular la resposta inflamatòria [29]. En condicions normals, el flux de NO generat per la paret vascular en gran manera excedeix la producció de O_2^- . Els enzims antioxidants (SOD, catalasa) impedeixen l'estrès oxidatiu. El NO actua mitjançant mecanismes dependents i independents de la transcripció per a impedir l'adhesió de leucòcits i plaquetes a l'endoteli. En condicions proinflamatòries, l'activació dels factors de transcripció sensibles a l'oxidació (NF κ B i AP-1) donen lloc a un increment en la síntesi i expressió de CAM a la superfície de les cèl·lules endotelials, que fomenta encara més el reclutament de leucòcits (Figura 4).

1.1.2.3. Sistema Renina-Angiotensina

En resposta a Angiotensina II (Ang II), la cèl·lula endotelial i altres cèl·lules inflamatòries donen lloc a un augment en la producció de ROS i al consegüent desequilibri entre ROS i NO [30]. Aquest efecte pro-oxidatiu d'Ang II és resultat de la seva unió al receptor AT1 (*high-affinity angiotensin II type 1 receptor*), que dona lloc a l'activació de NAD(P)H [31]. El receptor AT1 proinflamatori s'expressa en la cèl·lula endotelial i cèl·lules sanguínies circulants, incloent neutròfils, monòcits, limfòcits T i plaquetes. Els antagonistes de receptors de AT1 bloquegen l'estrès oxidatiu provocat per Ang II en aquestes cèl·lules [30].

El factor de transcripció nuclear NF κ B sembla ser un enllaç entre l'activació de receptors AT1, l'estrès oxidatiu, i el fenotip inflamatori que assumeixen les cèl·lules en resposta a Ang II [32]. L'activació de NF κ B pel receptor AT1 indueix en cèl·lules endotelials l'expressió de gens de CAMs (p. ex., VCAM-1), citoquines (p. ex., TNF- α), i quimioquines (MCP-1) [33]. L'Ang II també pot unir-se al receptor AT1 en leucòcits per promoure l'expressió de β_2 -integrines [34]. S'ha descrit que el tractament del mesenteri de rates amb Ang II indueix una adhesió ferma i una migració de leucòcits dependent de receptors de AT1, i una producció elevada de ROS en les vècules postcapil·lars [35]. Aquests efectes d'Ang II semblen ser conseqüència d'una mobilització de P-selectina ja preformada a la superfície de la cèl·lula endotelial per un mecanisme dependent de ROS [35].

1.2. CD40 I CD40L

1.2.1. CD40

CD40 és una glicoproteïna de membrana de 40-45 kDa membre de la superfamília de Receptors del Factor de Necrosi Tumoral (TNF-R), i també rep el nom de TNFR5 (*tumor necrosis factor receptor 5*). Altres membres representatius de la superfamília del TNF-R són CD30, CD27, 4-1BB, CD95 (Fas/Apo), RANK i OX40 [36].

1.2.1.1. Estructura de CD40

La proteïna CD40 humana va ser identificada en limfòcits B l'any 1984 utilitzant anticossos monoclonals, encara que el cDNA no va ser aïllat fins 5 anys després a partir d'una llibreria de cèl·lules Raji derivada d'un limfoma de Burkitt. El gen que codifica per CD40 humà es troba localitzat en el cromosoma 20 (q11-q13.2). El seu mRNA té 1.5 kb i està format per 9 exons i 8 introns (Figura 5).

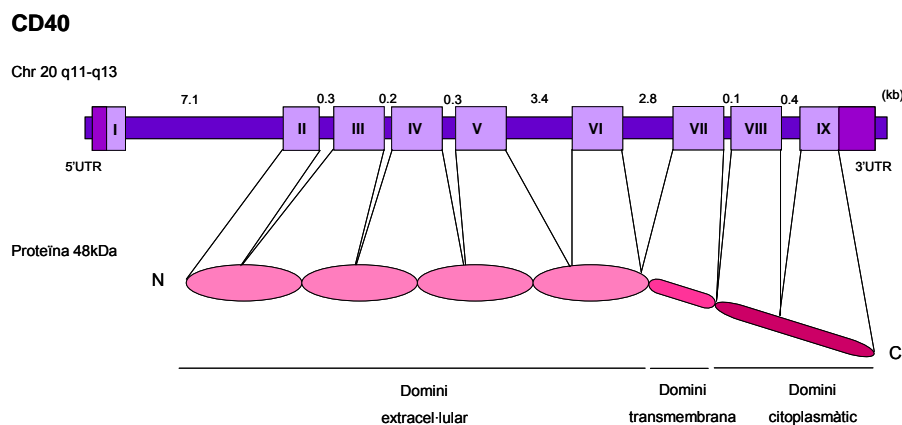


Figura 5. Estructura i organització del gen i la proteïna de CD40 en humà. Modificat de [37].

La regulació de la via de senyalització de CD40 està mediada per diferents mecanismes de control endògens i és específica de tipus cel·lular. L'expressió de CD40 està regulada posttranscripcionalment i s'han descrit múltiples isoformes del mRNA de CD40 generades per *splicing* alternatiu.

La transcripció del gen dona lloc a una proteïna de 255 aminoàcids (aa), 22 dels quals formen part d'un domini transmembrana que connecta amb un domini extracel·lular de 171 aa i un domini intracel·lular de 62 aa. Igual com altres membres de la família de TNF-R, la proteïna CD40 es caracteritza per presentar 4 dominis extracel·lulars enriquits en cisteïna, de 45 aa cadascun, amb 6 residus de cisteïna formant 3 ponts disulfur [38]. La molècula de CD40 presenta dos llocs de glicosilació altament conservats en la seva seqüència (Asn153, Asn180).

El domini intracel·lular de la proteïna CD40, que no presenta semblança amb la d'altres membres de la família, conté diferents dominis d'unió a proteïnes adaptadores que serien importants en la transducció de senyals (Thr254, Glu 253).

El gen de CD40 de ratolí es troba localitzat en la regió distal del cromosoma 2, i consta de 9 exons distribuïts al llarg de 16.3 kb de DNA genòmic. El gen presenta dos senyals de poliadenilació en el seu mRNA i codifica per dos transcrits alternatius de 1.4 i 1.7 kb. La proteïna CD40 de ratolí està formada per 305 aa (193 aa codifiquen pel domini extracel·lular, 22 aa pel domini transmembrana i 90 aa pel domini intracel·lular). A nivell de seqüència, la proteïna CD40 humana i de ratolí comparteixen un 62% d'homologia, amb una identitat del 78% i 100% en el domini intracel·lular i el C-terminal (32 aa), respectivament.

1.2.1.2. Expressió de CD40

CD40 va ser descrit per diferents grups de manera independent l'any 1984, els quals identificaven un polipèptid d'aproximadament 50 kDa en la superfície dels limfòcits B de cèl·lules de carcinoma [39]. Inicialment se l'hi va donar el nom de p50 o Bp50, més tard CDw40 i finalment l'any 1989 es va anomenar CD40. Posteriorment s'ha vist que CD40 s'expressa de forma constitutiva en una àmplia varietat de tipus cel·lulars. A més de les APCs (cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques, monòcits/macròfags), també expressen CD40 altres tipus cel·lulars com les cèl·lules T, cèl·lules epitelials, cèl·lules endotelials, queratinòcits i fibroblasts [40] (Taula 3). L'estimulació d'aquestes cèl·lules amb les citokines proinflamàtores IL-1, IL-3, TNF- α , GM-CSF i IFN- γ , incrementa l'expressió de CD40 *in vitro* [40]. Aquesta expressió induïda de CD40 s'observa 6-12 hores després de l'estimulació, assolint un màxim d'expressió a les 24 hores que persisteix fins a 24-72 hores després.

1.2.2. CD40L

El lligand de CD40, **CD40L** (CD154, gp39), és una glicoproteïna de membrana de tipus II de 32-39 kDa membre de la superfamília del Factor de Necrosi Tumoral (TNF). A aquesta superfamília també pertanyen molècules com el TNF- α , TNF- β , CD30L, CD27L, 4-1BBL, FasL, TRAIL, RANK-L i O \times 40L [36].

1.2.2.1. Estructura de CD40L

El cDNA de CD40L es va aïllar inicialment en limfòcits T de sang perifèrica. La seqüència de DNA humana de 13 kb que codifica per CD40L comparteix una homologia de seqüència del 80% amb el gen de ratolí. El gen de CD40L humà es localitza en el cromosoma

Introducció

X (q26.3-q27.1) i està format per 5 exons i 4 introns (Figura 6). Una vegada transcrit, aquest gen dóna lloc a un mRNA de 2,3 kb que codifica per a una proteïna de 261 aminoàcids (aa). El domini intracel·lular aminoterminal (22 aa), el domini transmembrana (24 aa) i una petita part del domini extracel·lular enriquit en cisteïna, estan codificats per l'exó I, mentre que els exons II-V codifiquen per la resta del domini extracel·lular de la proteïna (215 aa). De la mateixa manera que altres membres de la família de TNF, CD40L s'uneix al seu receptor com a un complex multiproteic.

A més de la forma transmembrana de 39 kDa, CD40L existeix en forma soluble (sCD40L). S'han caracteritzat tres fragments solubles biològicament actius d'aquesta proteïna, de 31, 18, i 14 kDa, obtinguts a partir de la divisió proteolítica del domini extracel·lular de la proteïna ancorada a membrana en el moment de l'activació dels limfòcits T [41]. La forma soluble majoritària de CD40L té un pes molecular de 18 kDa i es troba en forma oligomèrica i sobretot trimèrica [42].

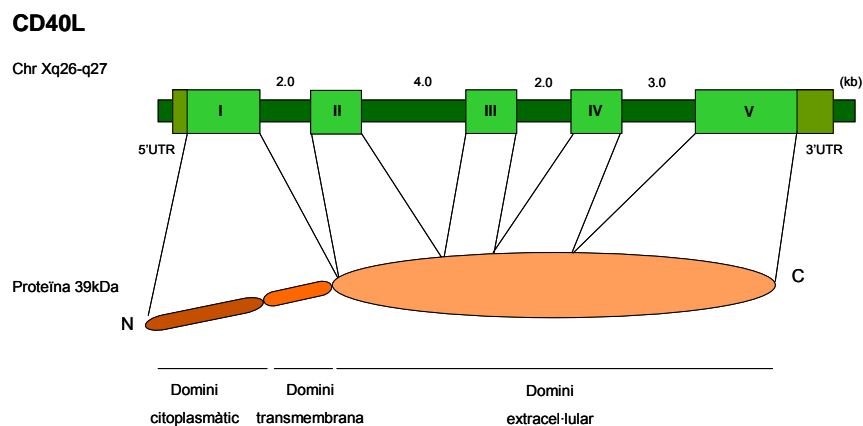


Figura 6. Estructura i organització del gen i la proteïna de CD40L en humà. Modificat de [37].

1.2.2.2. Expressió de CD40L

CD40L s'expressa predominantment en cèl·lules T CD4 activades, però també s'ha descrit en cèl·lules T CD8 i altres tipus cel·lulars com plaquetes, eosinòfils, mastòcits, basòfils, cèl·lules *natural killer*, cèl·lules endotelials, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules de la musculatura llisa i macròfags (Taula 3).

A diferència de CD40, aquestes cèl·lules no expressen el lligand de forma constitutiva, sinó que la seva expressió és induïble. En limfòcits T l'expressió de CD40L és transitòria, la proteïna s'expressa en la superfície cel·lular 5 minuts després de la seva activació, però a partir de les 6 hores té lloc una disminució de la seva expressió, que desapareix completament a les 12-24h postactivació. Aquest patró de regulació també ha estat descrit per altres tipus cel·lulars que expressen la proteïna. En limfòcits T aquesta expressió està regulada

principalment a través del TCR però també hi intervenen altres molècules coestimuladores i molècules accessòries presents en les APCs. A més de la senyalització a través del TCR, les citokines proinflamatòries IL-1, IL-12, TNF- α o IFN- γ , i glucocorticoids, indueixen l'expressió de CD40L en limfòcits T, probablement per activació dels factors de transcripció AP1 i NFAT [40]. S'ha descrit que CD40L és capaç d'induir la seva pròpia expressió després de la unió al seu receptor CD40 [43].

Tipus cel·lular	
CD40	Limfòcits B
	Cèl·lules progenitores CD34 ⁺
	Limfòcits T (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺)
	Granulòcits polimorfonuclears (basòfils, eosinòfils)
	Fagòcits mononuclears (monòcits/macròfags)
	Cèl·lules dendrítiques
	Cèl·lules epitelials
	Cèl·lules endotelials
	Cèl·lules de musculatura llisa (SMCs; vascular, bronquial)
	Queratinòcits
	Fibroblasts
CD40L	Limfòcits T (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺ , CD45RO ⁺ , CD45RA ⁺ , Th0 ⁺ , Th1 ⁺ , Th2 ⁺ , Tc1 ⁺ , Tc2 ⁺)
	Limfòcits B (no fisiològic)
	Granulòcits polimorfonuclears (basòfils, eosinòfils)
	Mastòcits
	Fagòcits mononuclears (monòcits/macròfags)
	Cèl·lules <i>Natural killer</i> (NK)
	Cèl·lules dendrítiques
	Cèl·lules epitelials
	Cèl·lules endotelials
	Cèl·lules de musculatura llisa (SMCs)
	Plaquetes

Taula 3. Expressió de CD40 i CD40L en diferents tipus cel·lulars. Modificat de [44].

1.3. Transducció de senyals de CD40

Igual com altres membres de la superfamília de TNF-R, l'activació efectiva de la via de senyalització de CD40 requereix la multimerització d'aquest receptor. Inicialment, es pensava que la trimerització del receptor depenia de la seva unió amb el lligand CD40L (*the ligand induced trimerisation model*). Estudis més recents, suggereixen que, prèviament a la unió del lligand, cada molècula de CD40 podria associar-se amb ella mateixa formant una estructura trimèrica a través d'un domini anomenat PLAD (*pre-ligand binding assembly domain*) present a l'extrem N-terminal del domini d'unió al lligand en la seva regió extracel·lular. Per tant, el receptor CD40 podria expressar-se a la superfície cel·lular com un complex preformat en comptes de com subunitats monomèriques (*the pre-ligand assembly model*) [45].

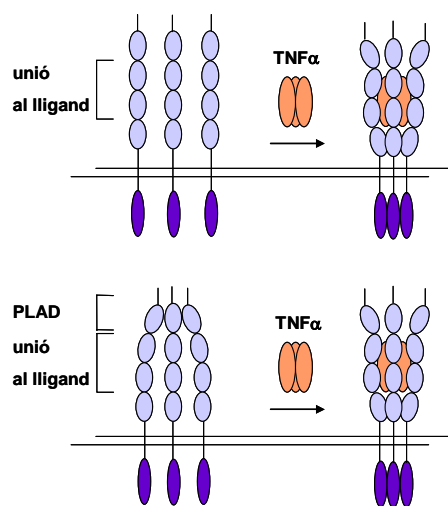


Figura 7. Models de senyalització per TNFR. A) *The ligand induced trimerisation model* i B) *The pre-ligand assembly model*. Modificat de [45].

Malgrat que la proteïna CD40 no presenta un domini intracel·lular amb activitat catalítica, la unió entre el receptor CD40 i el seu lligand activa una cascada de senyalització on hi intervenen una sèrie de segons missatgers, que donen lloc a l'activació de proteïnes de tipus fosfatasa i quinasa i al reclutament i activació d'altres proteïnes de senyalització.

1.3.1. TRAFs. Factors associats a la família de TNF-R

Les proteïnes TRAFs o factors associats a la família de receptors de TNF (TNF-R *family-associated factors*) són molècules adaptadores utilitzades per una àmplia varietat de receptors de superfície, entre ells CD40, per transduir senyals intracel·lulars. Els TRAFs, a través de la seva unió amb el domini citoplasmàtic del receptor, activen cascades de proteïnes quinasa, donant lloc a l'activació de factors de transcripció de la família NFκB, AP-1 i NFAT

(*nuclear factor of activated T cells*), que finalment regulen la transcripció de gens involucrats en proliferació, diferenciació i apoptosi.

S'han descrit 6 membres d'aquesta família. TRAF3 va ser identificat com la primera proteïna associada a la senyalització de CD40. A més de TRAF3, altres proteïnes de la família s'uneixen al domini citoplasmàtic de CD40 com TRAF1, TRAF2, o TRAF6, ja sigui directament o, en el cas de TRAF5, en forma d'heterooligòmers TRAF3/TRAF5 [46]. Totes les proteïnes d'aquesta família comparteixen homologia de seqüència d'aminoàcids en el seu domini carboxiterminal (*TRAF domain*). Aquest domini TRAF té dues subregions, una regió carboxiterminal que es requereix per a l'homodimerització o heterodimerització de TRAF amb altres membres de la família, i una regió aminoterminal que està menys conservada (Figura 8). Amb l'excepció de TRAF1, la resta de proteïnes TRAFs presenten 5-6 motius *zinc finger* en aquesta regió aminoterminal. La delecció d'aquest extrem aminoterminal genera mutants de TRAF dominants negatius, indicant que es tracta d'un domini crític per a les funcions efectores d'aquestes proteïnes. S'ha descrit que aquest domini és important per a l'activació de NFκB i JNK (*C-Jun N-terminal kinase*) [47].

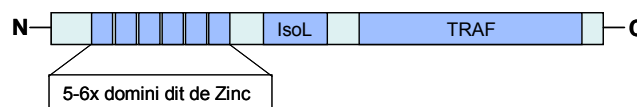


Figura 8. Estructura en dominis de les proteïnes TRAF.

L'oligodimerització del receptor CD40 induïda per la interacció amb el lligand CD40L, desencadena el reclutament de molècules TRAFs i/o altres proteïnes intracel·lulars que s'uneixen al domini citoplasmàtic del receptor. Aquestes proteïnes s'acoblen formant un complex de senyalització multiproteic que desencadena l'activació de cascades de quinases i l'estimulació de factors de transcripció que regulen l'expressió gènica. S'ha descrit l'associació de TRAFs amb una àmplia varietat de quinases i altres proteïnes adaptadores intracel·lulars que participen en la transducció de senyals de membres de la família de TNF-R (Taula 4).

Entre les molècules que interaccionen amb els TRAFs es troben les quinases RIP (*Receptor-interacting protein*) i IRAK (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*) essencials per a la senyalització de TNFR i IL-1R respectivament, i NIK (*NFκB-inducing kinase*) necessària per a l'activació de NFκB induïda per aquests receptors. Una de les MAPKs que interactuen amb TRAF és MEKK1, que s'associa a TRAF2 i TRAF6 i és important per a l'activació de JNK en resposta a les citoquines TNF i IL-1. Altres MAPKs implicades en la

via de senyalització dependent de TRAF són ASK1, implicada en l'activació de JNK induïda per TNF [48], i TAK1, que interacciona amb TRAF6 i està involucrada en l'activació de NFκB en resposta a IL-1 [49]. Per tant, les proteïnes TRAF connecten els senyals induïts per receptors amb els components de la cascada de MAPKs.

Entre les molècules que poden interferir de manera específica en aquesta via de senyalització i modificar la composició del complex multiproteic i/o bloquejar la interacció proteïna a proteïna i les posteriors funcions efectores es troben: A20 (*Inhibitor of NFκB, inhibitor of apoptosis*), c-IAPs (*cellular inhibitor of apoptosis*), TRIP (*TRAF-interacting protein*), T6BP (*TRAF6 binding protein*) i les proteïnes I-TRAF/TANK (*inhibitor of TRAF*).

Proteïna adaptadora	TRAFs
TRADD	TRAF1, TRAF2
FADD	TRAF1, TRAF2
I-TRAF/TANK	TRAF1, TRAF2, TRAF3
TRIP	TRAF1, TRAF2
cIAP1	TRAF1, TRAF2
cIAP2	TRAF1, TRAF2
A20	TRAF1, TRAF2
FLIP/Caspaer	TRAF1, TRAF2
MIP-T3	TRAF3
T6BP	TRAF6
TTRAP	TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6
Kinases	TRAFs
RIP	TRAF1, TRAF2, TRAF3
NIK	TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6
IRAK	TRAF6
ASK1	TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6
TAK1	TRAF6
MEKK1	TRAF2, TRAF6
GCK	TRAF2
PKCζ	TRAF6
c-Src	TRAF1, TRAF3, TRAF6

Taula 4. Proteïnes adaptadores i quinases que interactuen intracel·lularment amb TRAFs. Modificat de [50].

1.3.1.1. Inactivació de TRAFs

La senyalització de CD40 mediada per TRAFs probablement està regulada mitjançant la interacció de membres de la família TRAF amb I-TRAF. I-TRAF inhibeix l'activació de NFκB mediada per TRAF2, possiblement mantenint TRAFs en un estat latent [51]. S'ha descrit que I-TRAF és un substrat de IKK-I (*IκB kinase*), i probablement, l'activació de NFκB per IKK-I és resultat de la fosforilació de I-TRAF per IKK-I i posterior alliberament de TRAF2 [52] (Figura 10). Tanmateix, no està clar si I-TRAF tindria altres dianes cel·lulars.

1.3.2. Senyalització de CD40 en cèl·lules B

El domini citoplasmàtic de CD40 té un lloc d'unió per a TRAF6 i un altre per a TRAF2/3/5 (Figura 9). Aquests dos llocs d'unió per TRAFs tenen un paper diferent en la senyalització de CD40 en cèl·lules B. La via de transducció de senyals de CD40 ha estat estudiada principalment en limfòcits B, tot i així, el paper funcional d'aquestes proteïnes TRAF com a mediadores de la senyalització de CD40 encara està sent objecte d'estudi. S'ha descrit que TRAF6 és necessari per a la producció de IgM mediada per CD40, per a la secreció de IL-6, i en el canvi d'isotip d'immunoglobulina [53], mentre que TRAF2/3/5 es requereix per a la inducció de l'expressió de B7 mediada per CD40.

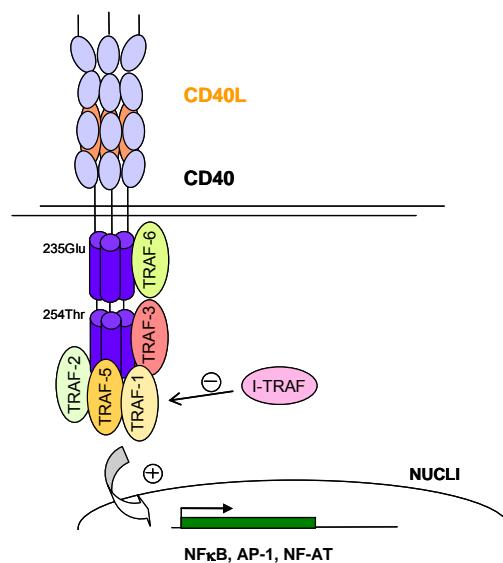


Figura 9. Senyalització de CD40 a través de la unió de proteïnes TRAF. Modificat de [40].

1.3.2.1. Paper dels STATs

A més dels TRAFs, s'han descrit altres membres de la família dels STATs (*signal transducers and activators of transcription*) que estarien implicats en la via de senyalització de CD40 en cèl·lules B [54]. Les proteïnes STAT, un cop fosforilades per JAK quinases, s'activen formant homodímers o heterodímers, i són translocades al nucli, on s'uneixen a regions específiques del DNA regulant l'expressió gènica [55].

1.3.2.2. Activació de quinases i fosfatases

La senyalització via CD40 implica l'activació de proteïnes quinasa i fosfatasa com a mediadores de la resposta intracel·lular. Inicialment es va descriure que en cèl·lules B, la interacció de CD40 amb CD40L causava la fosforilació de residus de tirosina de diferents fosfoproteïnes induint un ràpid augment de la producció de IP3 (*inositol 1,4,5-triphosphate*)

[56], estant implicada la via de senyalització de la PI-3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) [57]. Posteriorment altres proteïnes s'han associat a la senyalització de CD40, com per exemple les proteïnes SFKs (*Src family kinases*) [58].

En limfòcits B i monòcits, la via de senyalització de CD40 requereix l'activitat de proteïnes tirosina quinasa i la subsegüent activació de membres de la família de les MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) [59]. La interacció entre CD40 i TRAF6 desencadena l'activació de la proteïna p38/MAPK i d'Erk1/Erk2 (*extracellular signal-regulated kinases*), donant lloc al reclutament de NIK i a l'activació del factor de transcripció NFκB (Figura 10). A més, s'ha demostrat que les proteïnes TRAF2 i TRAF6 també poden activar la via de JNK. Recentment s'ha vist que de la mateixa manera que les vies de senyalització NFκB i p38/MAPK, l'activació de JNK per CD40 és essencial per al canvi de classe d'immunoglobulina en limfòcits B [60].

1.3.2.3. Factors de transcripció

La senyalització de CD40 a través de proteïnes de tipus tirosina quinasa i TRAFs, activa factors de transcripció de la família NFκB, incloent els membres p50, RelA i c-Rel [61]. La interacció CD40-CD40L també desencadena l'activació de NFκB a través de la via de les PI3K/Akt [62].

A més de NFκB, la senyalització via CD40 activa el factor AP-1 [61] format per homodímers de membres de la família Jun o heterodímers entre les proteïnes de la família Jun i Fos. En un estudi realitzat en limfòcits B primaris, CD40 induïa l'expressió de JunB, JunD i c-Fos [63]. En canvi, en un altre estudi es va observar que la senyalització per CD40 en limfòcits B primaris i altres línies de cèl·lules B, induïa l'expressió del mRNA de c-Jun però no la de c-Fos [64]. Aquest últim estudi demostrava que CD40 afectava l'expressió del factor de transcripció ATF-2. També s'ha descrit que la senyalització via CD40 indueix l'activació de NFAT tant en humans [61] com a ratolí [65] i modula l'activitat de E2F en limfoma de cèl·lules B [66].

1.3.2.3.1. Via NFκB

NFκB és un factor de transcripció que regula la inducció de gens implicats en la resposta immune, inflamació i resposta antiapoptòtica. NFκB està constituït per homodímers i heterodímers de membres de la família Rel. S'han identificat 5 membres: NFκB1 (p50 i el seu precursor p105), NF-κB2 (p52 i el seu precursor p100), p65 (RelA), c-Rel i Rel-B. La més comuna és la combinació de l'heterodímer de proteïnes p50 i p65. NFκB es troba en el citoplasma de la cèl·lula predominantment en forma inactiva associada a proteïnes inhibidores

I κ B (I κ B α , I κ B β o I κ B ϵ) [67]. L'activació de NF κ B requereix la seva dissociació de I κ B via fosforilació d'aquest inhibidor en dos residus de serina del seu extrem aminoterminal [68] i la subsegüent degradació d'aquest mitjançant proteòlisi per part del proteasoma 26S [69]. Un cop alliberada de la subunitat inhibidora I κ B, la forma activa de l'heterodímer NF κ B és translocada al nucli [70]. La via de transducció de senyals per la qual CD40 afecta la fosforilació de la forma I κ B en cèl·lules B implicaria la proteïna TRAF-6 que interacciona i activa la proteïna quinasa NIK [71]. Aquesta proteïna NIK pot activar les dues formes de IKK (IKK-I/IKK-II), les quals fosforilen l'inhibidor I κ B α permetent la translocació de la forma activa de NF κ B al nucli de la cèl·lula regulant la transcripció gènica (Figura 10).

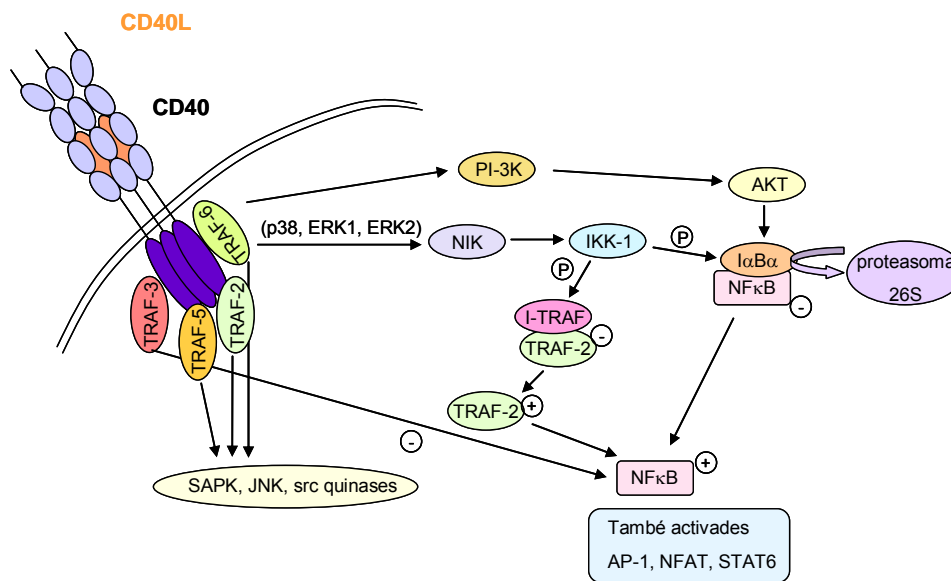


Figura 10. Rutes de transducció de senyals activades per CD40 en limfòcits B i activació de NF κ B per la via clàssica.

1.3.3. Senyalització de CD40 en altres tipus cel·lulars

La via de senyalització de CD40 difereix segons el tipus cel·lular, i en diferents estadis d'activació i diferenciació cel·lular, sobretot pel que fa a l'activació de MAPKs i a la senyalització a través de TRAFs [72].

Senyalització per TRAFs

CD40 utilitza diferencialment TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 i TRAF6 en la senyalització proinflamatòria dependent del tipus cel·lular. CD40L i altres citocines proinflamatòries modulen diferencialment l'expressió d'aquestes proteïnes TRAFs en cèl·lules endotelials, macròfags i cèl·lules de la musculatura llisa. A més, per a un mateix tipus cel·lular, la senyalització induïda per CD40L i associada a TRAF difereix de la via

d'activació utilitzada per altres citoquines proinflamatòries com IL-1 β , TNF- α , TGF- β i IFN- γ .

La senyalització per CD40 en un mateix tipus cel·lular també pot diferir entre diferents gens diana. Per exemple, en cèl·lules endotelials CD40 utilitza diferencialment TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, i TRAF6 per induir l'expressió de IL-6, IL-8 i MCP-1 [73].

Fins ara, l'estudi de la funció de les proteïnes TRAFs en la transducció de senyals per CD40 s'havia centrat principalment en cèl·lules B. A continuació es descriu la rellevància funcional de les diferents proteïnes TRAFs en la senyalització proinflamatòria de CD40 en **cèl·lules endotelials**:

TRAF1→ S'ha descrit la inducció de l'expressió de TRAF1 per CD40L, IL-1 β i TNF- α en cèl·lules endotelials [74, 75]. Alguns estudis suggereixen que TRAF1 podria promoure i al mateix temps inhibir certes funcions proinflamatòries en resposta a CD40L en aquestes cèl·lules. Un estudi recent descriu que TRAF1 juga un paper activador en la inducció de l'expressió de IL-8 i un paper regulador negatiu en la inducció de l'expressió de IL-6 i MCP-1 per CD40L [73].

TRAF2→ TRAF2 és essencial per a l'activació de factors de transcripció de la família NF κ B i l'activació de la cascada de JNK/MAPK [76]. En un estudi recent en cèl·lules endotelials, TRAF2 actua com a activador de l'expressió de IL-6 i IL-8 induïda per CD40L [73].

TRAF5→ TRAF2 i TRAF5 presenten funcions solapades en la senyalització per CD40 en cèl·lules B [77]. En cèl·lules endotelials, TRAF5 activa i inhibeix certes funcions proinflamatòries de les citoquines IL6 i IL-8. S'ha descrit que les cèl·lules endotelials deficientes en TRAF5 mostren una reducció significativa de l'expressió de IL-6 induïda per CD40L, i en canvi, alliberen al medi significativament més proteïna IL-8 [73].

TRAF3→ Estudis recents en cèl·lules endotelials suggereixen un paper inhibidor de TRAF3 en la senyalització per CD40 pel que fa a l'alliberament de IL-6, IL-8 i MCP-1 en resposta a CD40L [73].

TRAF6→ Hi ha estudis que impliquen TRAF6 com a un important mediador de la senyalització per CD40 en monòcits, macròfags [78, 79] i en cèl·lules B on és essencial per a la inducció de citoquines proinflamatòries [80]. En canvi, en cèl·lules endotelials TRAF6, igual com TRAF3, inhibeix la inducció de l'expressió de les citoquines IL-6, IL-8 i MCP-1 [73], indicant diferències específiques de tipus cel·lular en les funcions de les proteïnes TRAFs.

Senyalització per MAPKs i factors de transcripció

La majoria de vies activades en resposta a CD40 s'ha demostrat que són específiques de tipus cel·lular. Com s'ha comentat anteriorment, en **limfòcits B**, la unió de CD40 al seu lligand causa l'activació de les 3 vies de senyalització de MAPK conegudes (Erk, JNK i p38/MAPK) i finalment a l'activació dels factors de transcripció NFκB, AP-1 i NFAT. En canvi, en **monòcits**, la senyalització per la via CD40 incrementa l'expressió constitutiva de TRAF5 i desencadena l'activació de MEK1/MEK2 i els seus substrats Erk1/Erk2, i l'activació de la via de JNK [74] (Figura 11), però no incrementa els nivells de fosforilació de p38/MAPK [59].

Pel que fa a l'activació de factors de transcripció, la unió de CD40 en **macròfags** desencadena l'activació de complexos homodimèrics p50 de NFκB, mentre que en limfòcits B, el complex del factor de transcripció de NFκB induït està format per l'heterodímer p50/p65.

En **cèl·lules de la musculatura llisa vascular**, l'activació de CD40 inclou la fosforilació de proteïnes en residus de tirosina, l'activació i fosforilació de Erk1/2 i p38/MAPK i l'activació de NFκB [81] (Figura 11).

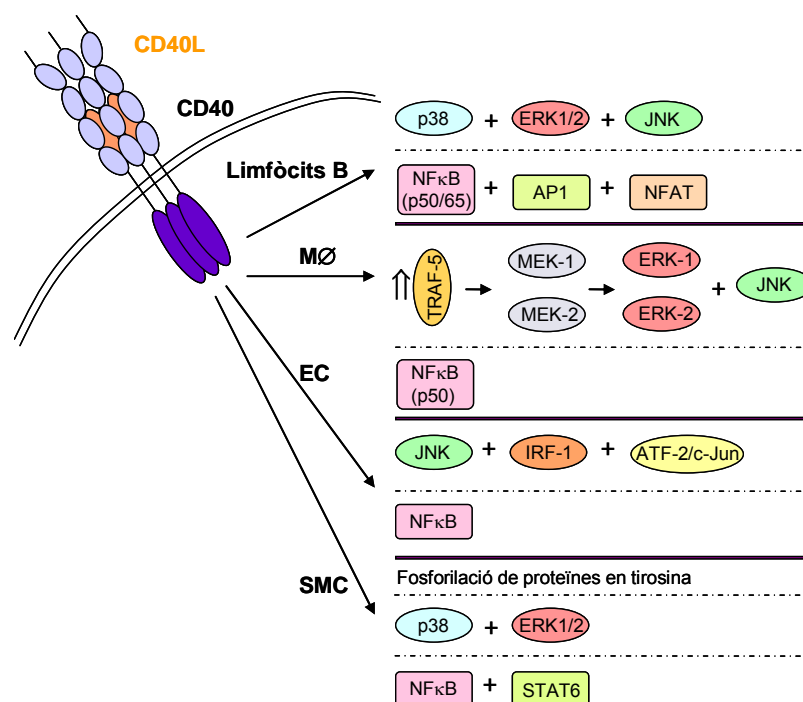


Figura 11. Vies de transducció de senyals activades per CD40 en diferents tipus cel·lulars. MØ, monòcits; EC, cèl·lula endotelial; SMC, cèl·lula de musculatura llisa. Modificat de [44].

Fins ara existeix poca informació sobre la via de senyalització de CD40 en **cèl·lules endotelials**. Pel que fa a estudis en HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), se

sap que la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina per CD40L o per TNF, està regulada transcripcionalment i depèn de l'activació de factors de transcripció de la família NFκB, ATF-2/c-Jun, IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*) i JNK/MAPK [82] (Figura 11).

Per tant, no tots els tipus cel·lulars que expressen CD40 executen totes les vies de transducció de senyals que CD40 és capaç d'activar, la qual cosa fa interessant determinar quin és el mecanisme de senyalització desencadenant de la resposta fisiològica a l'activació de CD40 en un determinat tipus cel·lular.

1.4. Funcions biològiques de CD40-CD40L

Fins fa relativament poc temps, es considerava que la funció del receptor CD40 i el seu lligand CD40L estava restringida a limfòcits B i T i involucrada en la immunitat humoral. Posteriorment s'ha descrit l'expressió tant del receptor com del lligand en altres tipus cel·lulars, d'acord amb això, la interacció CD40-CD40L regula una àmplia varietat de funcions biològiques, des d'immunitat cel·lular a processos inflamatoris (Figura 12). En conseqüència, la senyalització per CD40 ha estat associada amb processos patològics i malalties inflamatòries cròniques, com malalties autoimmunes, desordres neurodegeneratius i aterosclerosi.

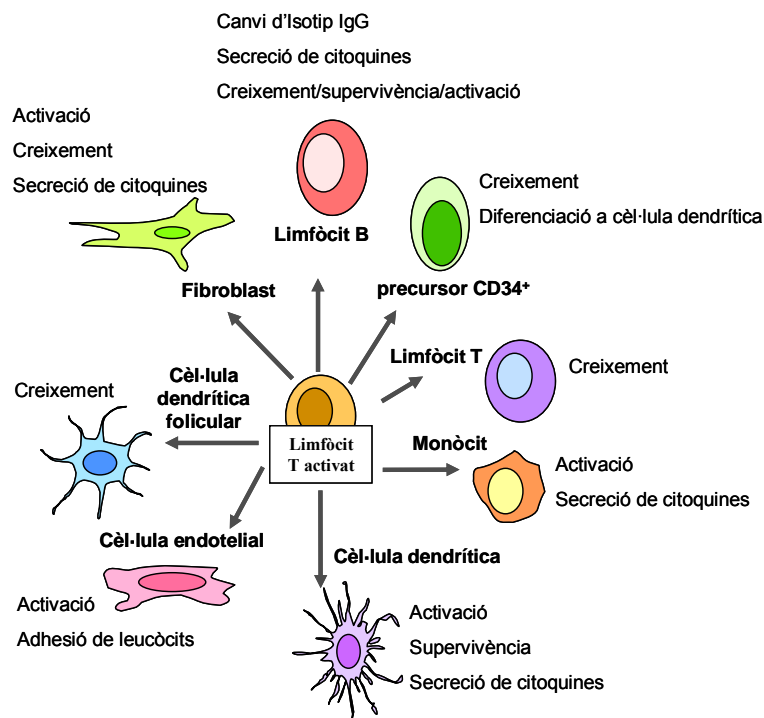


Figura 12. Funcions mediades per CD40 en la resposta immune i activació dels limfòcits T.

1.4.1. Limfòcits T i B: Immunitat humoral

La interacció CD40-CD40L juga un paper molt important en diferents processos d'activació del sistema immunitari. En la immunitat humoral, la unió del CD40 amb CD40L és important en la resposta immune primària i secundària als antígens T dependents, en la formació de cèl·lules B de memòria i en la generació i manteniment dels centres germinals [83, 84]. Hi ha nombrosos assaigs que indiquen que l'expressió de CD40L en cèl·lules T $CD4^+$ i $CD8^+$ és important per a la seva sensibilització, expansió i maduració cap a cèl·lules efectores capaces de produir citocines i de tenir activitat lítica [85]. També s'ha vist que l'estímul a través de CD40 és fonamental per a la maduració de les cèl·lules B, i podria intervenir en l'augment de la supervivència de les cèl·lules T [85].

1.4.1.1. CD40-CD40L i activació de limfòcits T

En el sistema immunitari existeixen dos tipus de resposta immune, la immunitat innata i la immunitat adaptativa o defensa antígen-específica, que es basa en l'actuació dels limfòcits T i B. L'inici de la resposta immune específica requereix el processament de l'antigen per part de les APCs, el reconeixement dels epítops pels limfòcits T i B i l'expansió clonal i diferenciació d'aquests limfòcits antígen-específics a cèl·lules efectores.

Els limfòcits són els principals agents del reconeixement immunològic específic i la seva principal funció és respondre a un estímul antigènic. Els limfòcits T presenten a la seva superfície cel·lular uns receptors de reconeixement anomenats receptors de la cèl·lula T (TCR) que reconeixen els determinants antigènics o epítops dels antígens que presenten les APCs en la seva superfície. Un cop l'antigen penetra dins l'organisme, aquest és internalitzat per les APCs (inclou macròfags, cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules endotelials, etc.) mitjançant fagocitosi i processat en fagolisosomes. Finalment, els pèptids antigènics són presentats en la superfície cel·lular de les APCs en el context del complex major d'histocompatibilitat (MHC).

El receptor TCR és un heterodímer format per cadenes transmembrana de tipus α i β (90% dels casos) o γ i δ (10% dels casos) amb una porció carboxiterminal constant i una aminoterminal variable que conté un domini altament polimòrfic que confereix al limfòcit T especificitat clonal per l'antigen. Juntament amb el receptor TCR, els limfòcits T expressen CD3 formant un complex multiproteic funcional. El receptor TCR s'uneix de forma no covalent al complex CD3 que transdueix el senyal a l'interior de la cèl·lula després de la unió del TCR a l'antigen.

A la superfície cel·lular dels limfòcits T s'expressen les molècules CD4 i CD8 que actuen com a receptors conjuntament amb el complex receptor de la cèl·lula T/CD3. Participen en el reconeixement antigènic, estabilitzant la unió entre MHC-Ag i TCR, i constitueixen elements importants en el sistema de transducció dels senyals intracel·lulars (Figura 13). El CD4 està present en els limfòcits T col·laboradors i el CD8 en els limfòcits T citotòxics, que interactuen amb determinants invariants de les molècules de classe II i de classe I del MHC presents en les APCs.

Les MHC de classe I presenten preferencialment proteïnes de tipus endogen, produïdes a l'interior de les cèl·lules. Qualsevol cèl·lula infectada per bacteris intracel·lulars, virus, o cèl·lula tumoral, pot establir contactes intercel·lulars i transmetre un senyal a les cèl·lules T CD8 citotòxiques, presentant el complex pèptid/MHC al TCR/CD3 de la cèl·lula efectora, que pot destruir la cèl·lula patològica. En canvi, les MHC de classe II, presenten proteïnes de tipus

exogen (bacteris extracel·lulars, toxines, al·lèrgens). Aquestes molècules són expressades en les APCs professionals, que capten i processen els antígens abans de presentar-los a les cèl·lules T CD4 col·laboradores que secretaran citoquines que modularan la resposta immunitària humoral o cel·lular enfront a l'antigen presentat.

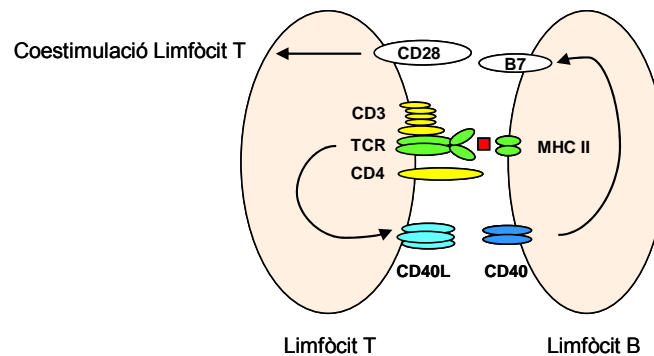


Figura 13. Presentació d'antigen i activació dels limfòcits T durant la resposta immune.

El primer senyal d'activació dels limfòcits T, corresponent a la interacció antígen-TCR, confereix especificitat antigènica al procés d'activació de la cèl·lula T, però no és suficient per a iniciar la resposta immune [86]. Per a que es produeixi l'activació de la cèl·lula T, es requereix un segon senyal que es produeix per la interacció entre receptors específics de la superfície de la cèl·lula T i els seus corresponents lligands en les APCs. Entre aquestes molècules de superfície de la cèl·lula T s'inclouen el CD28, que té com a lligand B7 (B7.1 o B7.2 també anomenats CD80 i CD86 respectivament); el CD40L, que s'uneix a CD40, i el CD2, lligand del CD58. Els dos senyals coestimuladors principals són el sistema CD28-B7 i el sistema CD40-CD40L (Figura 13). Sense aquest segon senyal d'activació es pot produir una situació de tolerància antigènica o anergia. Les cèl·lules T activades únicament per aquest primer senyal o es converteixen en anèrgiques i no responen davant la re-exposició a l'antigen, inhibint la seva proliferació i la producció de citoquines *in vivo* [87], o bé poden entrar en apoptosi [88].

Quan les molècules de CD40 expressades constitutivament en les cèl·lules B o APCs, s'uneixen al CD40L de les cèl·lules T, té lloc la inducció de l'expressió a la seva superfície cel·lular de l'altre grup de molècules accessòries B7, que posteriorment s'unirien a CD28 de la cèl·lula T [89].

Finalment, és la cèl·lula T la que modularà la resposta immune efectora humoral o cel·lular, activant més cèl·lules T, cèl·lules B i altres cèl·lules, i originant poblacions de cèl·lules T memòria. Davant d'un senyal activador, les cèl·lules T CD4⁺ poden adquirir un fenotip T_{H1} o T_{H2}, que es diferencia segons el tipus de citoquines que produeixen en resposta a l'activació, i per tant en la seva funció. Les cèl·lules Th1 segreguen IL-2, IFN- γ i TNF- α ,

mentre que les cèl·lules Th2 segreguen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13 [90]. Les característiques específiques de l'antigen i dels senyals coestimuladors determinaran si predominarà la immunitat cel·lular (T_H1) o humoral (T_H2).

La importància de la interacció entre el CD40 i el CD40L en la resposta immune es va posar de manifest per primera vegada en pacients amb Síndrome de Hiper-IgM (HIM). Els individus amb aquesta greu immunodeficiència presenten una mutació del CD40L que impedeix la seva unió a CD40. Aquests individus són incapaços de dur a terme una resposta immune humoral adequada, manifestada per una elevada susceptibilitat a patir infeccions bacterianes amb absència de IgA, IgG i IgE, absència de centres germinals als ganglis limfàtics i nivells elevats de IgM [91]. Altres evidències de que la interacció CD40-CD40L és essencial per al canvi d'isotip dependent de les cèl·lules T provenen d'estudis en ratolins deficients per CD40 [92, 93].

1.4.2. Altres tipus cel·lulars: Inducció de mediadors inflamatoris

Inicialment es pensava que el paper de la interacció CD40-CD40L estava restringit a la immunitat humoral dependent de cèl·lules T. A més d'intervenir en aspectes importants de la immunitat humoral com són l'activació de limfòcits B, el control del canvi d'immunoglobulina i la formació de centres germinals i cèl·lules B memòria, la interacció CD40-CD40L també participa en el desenvolupament de la resposta immune cel·lular. La lligació de CD40 en altres tipus cel·lulars com macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules endotelials, cèl·lules de la musculatura llisa, queratinòcits i fibroblasts, activa diferents processos inflamatoris. La interacció CD40-CD40L en aquestes cèl·lules indueix l'expressió de citoquines, quimioquines, molècules d'adhesió, metal·loproteases, molècules amb activitat procoagulant i altres mediadors proinflamatoris com prostaglandines i NO (Taula 5).

En cèl·lules dendrítiques i macròfags, la unió de CD40 intervé en el control de la fase posterior al reconeixement immune per part dels limfòcits T i en la funció efectora d'aquestes cèl·lules durant la immunitat cel·lular. Les **cèl·lules dendrítiques**, potents estimuladores de les cèl·lules T *naive*, expressen gran quantitat de les molècules coestimuladores B7 i CD40. La unió de CD40 al seu lligand en limfòcits T desencadena un increment de la capacitat de presentació d'antigen en aquestes cèl·lules induint l'expressió de nivells elevats de MHCII i altres molècules accessòries com CD58 (LFA-3). També indueix l'expressió de molècules coestimuladores CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) [37]. La interacció CD40-CD40L en cèl·lules dendrítiques indueix la secreció de citoquines i quimioquines com IL-12, TNF- α , IL-8 i MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*) [94].

Funció		Tipus cel·lular	Mediador
Immunitat humoral	Activació	Limfòcits B	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHCII; IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β
	Canvi de classe de Ig	Limfòcits B	IgA, IgE, IgG, IgM
	Formació de centres germinals i cèl·lules B memòria	Limfòcits B	IL-2, IL-10; receptors de citoquines
Immunitat cel·lular	Citoquines proinflamàtòries	Limfòcits B Monòcits Cèl·lules dendrítiques Cèl·lules epitelials Cèl·lules endotelials Fibroblasts, SMC	IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β
	Quimioquines	Monòcits Cèl·lules epitelials Cèl·lules endotelials Fibroblasts Queratinòcits	IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, ABCD-1, CCR7
	Molècules d'adhesió	Limfòcits B Cèl·lules endotelials Fibroblasts	LFA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina
	Metal·loproteases	Monòcits Cèl·lules endotelials Fibroblasts, SMC	MMP-1, MMP13, MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-11
	Activitat procoagulant	Monòcits, SMC Cèl·lules endotelials	Factor tissular
	altres	Monòcits Cèl·lules dendrítiques Cèl·lules endotelials Fibroblasts	Cox-2, NO

Taula 5. Funcions biològiques de CD40/CD40L en immunitat humoral i cel·lular. Modificat de [40].

En **macròfags**, la interacció CD40-CD40L indueix la producció de diverses citoquines i quimioquines importants en el control de la resposta inflamatòria com IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , i MIP-1 α . En macròfags i cèl·lules dendrítiques la senyalització per CD40 també indueix la producció d'altres molècules proinflamàtòries com NO i prostaglandines [95, 96].

La parella CD40-CD40L participa en la interacció funcional de cèl·lules T CD4+ amb altres cèl·lules que expressen CD40, com fibroblasts i cèl·lules endotelials. La interacció de CD40 amb el seu lligand en **fibroblasts** indueix l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1, incrementa la síntesi i alliberament de IL-6, la producció de col·lagen i

col·lagenasa i la proliferació d'aquestes cèl·lules. Totes aquestes dades concorden amb la implicació de la senyalització de CD40 en la inducció de fibrosi associada a resposta immune i autoimmunitat.

1.4.3. Funció CD40-CD40L en endoteli

1.4.3.1. Cèl·lules endotelials i expressió de CD40

L'any 1995, 3 grups independents van descriure l'expressió de CD40 en cèl·lules endotelials [97-99]. La cèl·lula endotelial és una font quantitativament important de CD40 de l'organisme. Totes les cèl·lules endotelials en cultiu i d'endoteli de teixit vascular analitzades (melsa, tiroide, pell, múscul, ronyó, pulmó, vasos sanguinis, cordó umbilical) expressen el receptor CD40 de manera constitutiva, encara que la seva expressió basal és baixa [97-99]. L'estimulació d'aquestes cèl·lules amb IL-1 i les citoquines proinflamàtores TNF- α i IFN- γ indueixen un augment de l'expressió de CD40 endotelial *in vitro*. La combinació de IFN- γ amb IL-1 o TNF- α , actua de manera sinèrgica, la qual cosa implica que la inducció de l'expressió de CD40 té lloc a través de vies de senyalització independents. Les cèl·lules endotelials de la vasculatura de teixit inflammat, tumors benignes d'origen vascular, carcinomes renals, i sarcoma de Kaposi mostren una elevada expressió de CD40 comparada amb teixit normal [97, 100, 101]. Malalties inflamàtores com l'aterosclerosi [102, 103], la glomerulonefritis [104], l'infecció per HIV [105], la malaltia d'Alzheimer [106] i el rebuig en trasplantament [107], també estan associades amb una expressió elevada de CD40 endotelial.

1.4.3.2. Interacció leucòcit-endoteli

La unió del receptor CD40 amb el lligand CD40L expressat a la superfície dels monòcits o limfòcits T activats, desencadena en les cèl·lules endotelials una resposta proinflamatòria i protrombòtica. A més de la interacció de CD40 endotelial amb el CD40L ancorat a la superfície dels leucòcits, aquest CD40L es pot alliberar en forma soluble per part d'aquestes cèl·lules després de la seva activació.

Durant el procés inflamatori, la interacció CD40-CD40L indueix en cèl·lules endotelials l'expressió a la seva superfície cel·lular de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina, desencadenant l'activació d'aquestes cèl·lules i afavorint l'adhesió i migració de leucòcits a través de la vasculatura cap al lloc d'inflamació. En cèl·lules endotelials la unió de CD40 al seu lligand indueix la producció i alliberament de diverses citoquines proinflamàtores (IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1) que promouen l'ancoratge i extravasació dels leucòcits als llocs d'inflamació. L'estimulació de les cèl·lules endotelials mediada per CD40

també indueix l'alliberament d'altres citoquines proinflamàtòries (IL1 β , IL-10, IL-12, TNF- α , IFN γ) i l'expressió, en la superfície cel·lular, de MHC-II, Fas i altres molècules coestimuladores com CD32, CD80 i CD86. Tot això, finalment causa un increment de la funció de presentació d'antigen per part d'aquestes cèl·lules.

Per altra banda, la interacció CD40-CD40L també incrementa l'expressió de metal·loproteases o proteïnes degradadores de la matriu extracel·lular (MMPs) [44], que afavoreixen aquest procés de migració cel·lular. L'activació de les cèl·lules endotelials via CD40-CD40L indueix la producció del factor estimulador de granulòcits i macròfags (GM-CSF) i ciclooxigenasa-2 (COX-2). Finalment, hi han alguns estudis que demostren que la interacció CD40-CD40L indueix en cèl·lules endotelials l'expressió de VEGF i promou l'angiogènesi. Tots aquests processos juguen un paper molt important en promoure l'extravasació i l'acumulació de limfòcits T activats als llocs de inflamació.

1.4.3.3. Interacció plaquetes-endoteli

El CD40L és present en la seva forma íntegra a la plaqueta, però una forma soluble del CD40L de 18 kDa també és alliberada per la plaqueta en el moment de la seva activació [108]. Tenint en compte el seu nombre en la circulació, la reserva de CD40L procedent de les plaquetes és superior a la dels limfòcits T. Aquest fet suggereix que les plaquetes podrien estar implicades de manera preponderant en la gènesi de la forma soluble del CD40L plasmàtic [109]. Aquest CD40L en forma soluble pot unir-se a CD40 de la superfície de la cèl·lula endotelial i desencadenar una sèrie de respostes biològiques. En les seves relacions amb l'endoteli, el CD40L plaquetari juga un paper important en la reacció inflamatòria, la coagulació i la remodelació vascular.

1.4.3.3.1. Reacció inflamatòria

La interacció CD40-CD40L indueix una sèrie de processos que desencadenen una resposta proinflamatòria. La unió del CD40L plaquetari amb el CD40 de les cèl·lules endotelials dóna lloc a la inducció de la producció de quimioquines i de citoquines proinflamàtòries i un augment de l'expressió de les molècules d'adhesió en aquestes cèl·lules [37]. Aquesta acció confereix a l'endoteli un fenotip proinflamatori, promovent l'adhesió de les cèl·lules leucocitàries a la superfície de la cèl·lula endotelial.

1.4.3.3.2. Coagulació

La interacció de CD40 endotelial amb el CD40L de les plaquetes no només promou l'activació immune i la inflamació, sinó que també desencadena el procés de coagulació

sanguínia. La interacció CD40-CD40L causa la inducció, per part de les cèl·lules endotelials, de la síntesi de factor tissular (TF) [110] i una disminució de l'expressió de trombomodulina, amb efecte anticoagulant. TF és un dels factors que posen en marxa la via extrínseca de la coagulació i la producció de trombina, encara que també està implicat en l'angiogenèsis i la reparació histològica. La inducció de l'expressió de TF per CD40-CD40L confereix a l'endoteli un fenotip procoagulant, contribuint igualment a la reacció inflamatòria.

1.4.3.3. Remodelació de la matriu extracel·lular

El procés de remodelació vascular està regulat per la interacció del CD40-CD40L sobre les cèl·lules endotelials i musculars llises. El CD40L plaquetari estimula la biosíntesi de les metal·loproteases MMP-1, MMP-2 i MMP-9, i de la MT-MMP1 (*Membrane type matrix metalloproteinase*) per les cèl·lules endotelials.

Per altra banda, la interacció CD40-CD40L augmenta l'expressió dels activadors del plasminogen u-PA i t-PA [111], induint la síntesi o producció de plasmina. La plasmina participa en l'activació proteolítica dels MMP-1 i MMP-2. Els factors uPAR (receptor de u-PA) i MT1-MMP1 fixen i activen uPA i MMP-2, respectivament.

Aquest conjunt de dades suggereixen un paper important de la interacció CD40-CD40L en el control de la producció de la matriu extracel·lular per dos mecanismes: directament mitjançant la regulació de l'expressió de les MMPs i, indirectament, per l'increment en la producció de plasmina.

1.5. CD40-CD40L i patologia humana

1.5.1. Malaltia cardiovascular: Aterosclerosi

L'aterosclerosi és un malaltia inflamatòria crònica que es combina amb un desordre en el metabolisme lipídic i la deposició de lípids a la vasculatura [112]. La hipercolesterolèmia i la diabetis, dos factors de risc de la malaltia d'artèries coronàries, causen una activació de l'endoteli induint l'expressió per part d'aquestes cèl·lules de citoquines, quimioquines i molècules d'adhesió [113]. A més, aquests i altres factors inflamatoris circulants, com les citoquines proinflamatòries i quimioatracients, donen lloc a l'activació de les cèl·lules endotelials, estimulants l'alliberament de més factors proangiogènics per part de l'endoteli com la proteïna MCP-1, IL-8 i TF. L'augment en la secreció d'aquests factors accelera el procés d'inflamació local per mitjà de l'atracció de cèl·lules immunocompetents cap a l'endoteli, com els leucòcits, limfòcits T i macròfags, la qual cosa amplifica el procés inflamatori i dona lloc a la progressió de l'aterosclerosi.

1.5.1.1. Cèl·lules endotelials i lesió ateroscleròtica

Evidències creixents suggereixen que la disfunció endotelial està associada amb esdeveniments cardiovasculars i que la síndrome coronària aguda (ACS) implica una interacció complexa entre disfunció endotelial, inflamació i trombosi. Entre els factors que poden causar disfunció endotelial es troben citoquines, proteases, agents virals, radicals lliures, lípids oxidats i homocisteïna. Aquesta situació de disfunció endotelial és conseqüència de l'acció de factors de risc cardiovascular com la dislipèmia, la diabetis, la hipertensió, la homocisteïnèmia, el fibrinogen i factors de coagulació o fibrinolítics, i participa activament en el desenvolupament de l'aterosclerosi [114].

1.5.1.2. CD40 en l'inici i progressió de l'aterosclerosi

Hi ha evidències que suggereixen que CD40 és un factor essencial que desencadena la reacció inflamatòria en la vasculatura i juga un paper important en la formació de les lesions ateroscleròtiques [103]. Tots els tipus cel·lulars que formen la placa d'ateroma expressen les molècules CD40 i CD40L. L'any 1997 es va descriure la colocalització de CD40 i CD40L en cèl·lules endotelials associades a plaques d'ateroma, SMC i macròfags [102]. Posteriorment es va veure que les plaquetes també expressaven CD40L a la seva superfície cel·lular en el moment de l'activació plaquetària *in vitro* i durant la formació del trombe *in vivo*. Tant el receptor com el lligand expressats en aquestes cèl·lules en cultiu són funcionals i estarien

Introducció

involucrats en la síntesi de mediadors implicats en diferents aspectes de la patogènesi i progressió de l'aterosclerosi [112] (Taula 6).

Molècules d'adhesió	Quimioquines	Citoquines	Factors de creixement	Metal·lo-proteases	Coagulació	Altres
↑ LFA-1	↑ IL-8	↑ IL-1	↑ VEGF	↑ MMP-1	↑ Factor tissular	↑ Cox-2
↑ ICAM-1	↑ MIP-1 α/β	↑ IL-2	↑ FGF	↑ MMP-2	↓ THBD	↑ NO
↑ VCAM-1	↑ RANTES	↓ IL-4	↑ M-CSF	↑ MMP-3		↑ Caspasa1
↑ E-selectina	↑ MCP-1	↑ IL-5	↑ GM-CSF	↑ MMP-7		↑ Bcl-XL
↑ P-selectina	↑ ABCD-1	↑ IL-6	↓ TGF- β	↑ MMP-8		↑ Bcl-2
↑ VLA-4	↑ CCR1	↑ IL-10		↑ MMP-9		↑ Fas (CD95)
	↑ CCR5	↓ IL-10R		↑ MMP-11		
	↑ CCR7	↑ IL-12		↑ MMP-12		
		↑ IL-15		↑ MMP-13		
		↑ IL-18				
		↑ TNF- α/β				
		↑ IFN- γ				

Taula 6. Funcions mediades per CD40-CD40L en cèl·lules endotelials, SMC i macròfags implicades en aterogènesi. Modificat de [44].

La patofisiologia de l'aterosclerosi culmina amb una manifestació clínica anomenada síndrome coronària aguda (ACS), causada per la ruptura de la placa d'ateroma amb la subsegüent formació del trombe. Els limfòcits T activats i les plaquetes que expressen CD40L, contribueixen significativament a la inestabilitat de la placa donant lloc a la formació del trombe [44]. Es creu que existeix una forta relació entre disfunció o lesió endotelial, inflamació, aterosclerosi i trombosi. La interacció cel·lular mediada bàsicament per les molècules d'adhesió tindria un paper molt important en tots aquests fenòmens.

La malaltia ateroscleròtica s'inicia amb una disfunció de l'endoteli que perd les seves propietats de tromboresistència i permeabilitat selectiva. Com a resultat es produeix una seqüència de fenòmens inflamatoris i proliferatius que deriven en l'aterosclerosi. La disfunció endotelial permet l'adhesió, la integració i la posterior migració de leucòcits a l'interior de la paret vascular. Simultàniament, es produeix una adhesió i estimulació de les plaquetes, que alliberen substàncies trombogèniques i inflamatòries. Gran part d'aquests factors actuen directament sobre la síntesi del col·lagen. D'una banda, la producció de IFN- γ pels limfòcits disminueix la síntesi de col·lagen per les SMCs i d'una altra, la producció de MMPs, especialment pels macròfags, contribueix a una major degradació de les fibres de col·lagen.

Ambdós processos comporten pobresa de fibres de col·lagen a la placa i per tant una inestabilitat d'aquesta que la fan procliu a la ruptura. Hi ha dos mecanismes pels quals es pot desencadenar la formació del trombe intravascular: 1) la unió del TF, expressat pels macròfags, amb el factor VIIa que forma el complex que desencadena el procés de coagulació, i 2) la ruptura de la placa pobra en fibres de col·lagen i l'exposició del material altament trombogènic al torrent circulatori. El trencament espontani de la placa causa dany endotelial i la denudació de la monocapa de cèl·lules endotelials i contribueix a fenòmens trombòtics aguts i progressió de la lesió ateroscleròtica [115].

1.5.1.2.1. CD40L i migració de les cèl·lules endotelials o reendotelització

En el mecanisme de regeneració de l'endoteli danyat, la proliferació i migració de cèl·lules endotelials té un paper fonamental i és essencial per a la reendotelització de les zones de la placa denudades per tal de prevenir la formació del trombe. L'índex de recanvi d'aquestes cèl·lules augmenta significativament en les zones més vulnerables a l'aparició de la lesió ateroscleròtica [116], i la intensitat del dany infligit al vas és un factor crític en la regeneració endotelial.

S'ha descrit que el CD40L alliberat per les plaquetes activades o els limfòcits T als llocs de l'erosió de la placa, inhibeix la migració de les cèl·lules endotelials *in vitro* donant lloc a una reducció de la reendotelització [117]. Per tant, CD40L podria dificultar el procés de reendotelització contribuint a fenòmens trombòtics. En canvi, s'ha vist que CD40L no afecta la migració de les cèl·lules endotelials estimulades per un flux laminar *in vitro* [117]. Les àrees de l'endoteli vascular exposades a un flux sanguini de tipus laminar estan protegides contra el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica. Aquest fet va quedar demostrat en veure que les lesions ateroscleròtiques es desenvolupaven preferentment en zones amb flux sanguini irregular o turbulent [118] mentre que les regions amb un flux laminar uniforme estaven protegides. En aquestes regions té lloc un bloqueig de l'activació endotelial proinflamatòria i procoagulant mediada per CD40 [119]. Per tant, CD40L afectaria específicament les cèl·lules endotelials dintre de regions propenses al trencament de la placa ateroscleròtica.

1.5.1.3. CD40 i models animals d'aterosclerosi

La rellevància del paper de CD40 *in vivo* en l'aterosclerosi s'ha demostrat en models animals d'aterosclerosi. El bloqueig de la interacció CD40-CD40L utilitzant anticossos neutralitzants contra CD40L disminueix l'aterosclerosi en ratolins deficients en el receptor de lipoproteïna de baixa densitat (LDL) sotmesos a una dieta amb elevat colesterol [103]. La inhibició de CD40L causa una reducció en el tamany de la lesió ateroscleròtica i en el seu

contingut de lípids, una disminució en el nombre de macròfags i limfòcits T infiltrats i una reducció en l'expressió de molècules d'adhesió i MMPs en comparació amb els ratolins controls no tractats. Posteriorment i de manera independent, dos grups més van demostrar que la inhibició de CD40L limitava la progressió de l'aterosclerosi induint una estabilització de la placa d'ateroma [120]. Resultats similars es van obtenir en un estudi en un model d'aterosclerosi on ratolins deficients en apolipoproteïna E (ApoE^{-/-}) eren tractats amb anticossos anti-CD40L. Aquests estudis confirmen la importància de la senyalització de CD40 en l'aterosclerosi, no només en l'inici de la lesió ateroscleròtica sinó també en l'evolució o progressió de la malaltia, canviant la composició de la placa d'ateroma i donant lloc a un fenotip més estable i ric en col·lagen.

1.5.1.4. CD40 i estrès oxidatiu en malaltia cardiovascular

Diversos factors de risc de malalties cardiovasculars poden causar l'activació d'enzims (xantina oxidasa, XO; NAD(P)H oxidasa) que produeixen grans quantitats de superòxid. El desequilibri O_2^- -NO resultant, promou la formació de mediadors (LTB_4 , PAF, IL-8) que activen i indueixen l'adhesió de leucòcits i plaquetes.

Hi ha estudis que suggereixen un efecte directe de la interacció CD40-CD40L en l'activitat funcional de les cèl·lules endotelials a través de la generació de ROS contribuint a una situació d'estrès oxidatiu. CD40L augmenta la producció de ROS no només en limfòcits B sinó també en cèl·lules endotelials, disminuint la biodisponibilitat de NO endotelial [117]. Com a conseqüència de la inactivació de NO per ROS es produeix una disfunció endotelial, que causa una vasodilatació deteriorada, promovent l'agregació de leucòcits i plaquetes a l'endoteli vascular i contribuint al procés d'inflamació. Aquest fenomen està implicat en diverses malalties cardiovasculars com hipertensió, hipercolesterolèmia, diabetis i aterosclerosi, les quals es caracteritzen per presentar nivells elevats de ROS, donant lloc a una disminució de l'activitat derivada de NO en l'endoteli [121].

1.5.1.5. Sistema Renina-Angiotensina

En l'actualitat hi ha evidències que impliquen el sistema de renina-angiotensina (RAS) en la inflamació associada amb malaltia cardiovascular. Existeixen estudis que suggereixen que l'Ang II i receptors AT1 estarien implicats en estrès oxidatiu i adhesió cel·lular leucòcit-endoteli en hipercolesterolèmia [122]. La hipercolesterolèmia està associada amb una densitat elevada de receptors AT1 en cèl·lula endotelial, leucòcits circulants i plaquetes [30]. El tractament amb estatines (inhibidors de HMG-CoA reductasa) i altres drogues dirigides contra

el sistema RAS semblen limitar la transició d'un fenotip antiinflamatori a proinflamatori [30].

A la Figura 14 es resumeixen els diferents sistemes, implicats en la reacció inflamatòria que té lloc en les cèl·lules endotelials activades durant la malaltia cardiovascular.

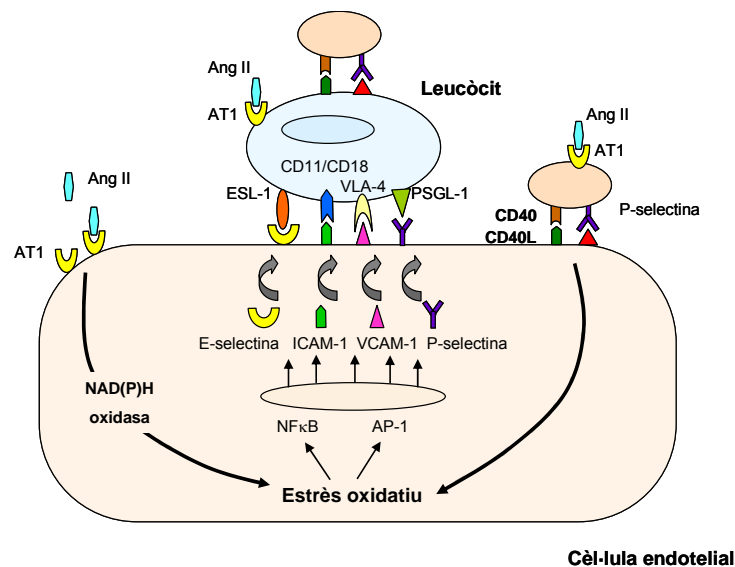


Figura 14. Interacció entre el sistema CD40-CD40L, l'estrès oxidatiu, les molècules d'adhesió, el RAS, les plaquetes i els leucòcits en les cèl·lules endotelials activades dels vasos sanguinis.

1.5.1.6. CD40L com a marcador de malaltia cardiovascular

Hi ha evidències de que la via de senyalització de CD40 està implicada en la patologia vascular associada a hipercolesterolèmia. Pacients amb hipercolesterolèmia moderada presenten nivells elevats d'expressió de CD40L i P-selectina en plaquetes i una expressió elevada de CD40 en monòcits [123].

Pacients de ACS amb angina de pit [124] i pacients amb insuficiència cardíaca [125], mostren nivells elevats en sang de CD40L soluble i CD40L unit a membrana. A més, nivells elevats de CD40L soluble estan associats amb un augment de fenòmens cardiovasculars en dones [126], la qual cosa suggereix que l'activació de CD40 podria estar involucrada en el desenvolupament de ACS. Recentment, s'ha establert el valor predictiu de CD40L soluble en síndromes coronaris aguts. Nivells elevats de CD40L soluble indiquen un elevat risc de patir fenòmens cardiovasculars en pacients amb malaltia arterial coronària inestable. A més, l'augment de la forma soluble de CD40L identifica un subgrup de pacients amb elevat risc de fenòmens trombòtics, els quals probablement es veuen beneficiats amb un tractament antiplaquetari [127]. Estudis clínics demostren que nivells elevats en sang de sCD40L estan associats amb el risc de patir un futur esdeveniment cardiovascular en dones sanes, en les quals l'erosió de la placa és una causa freqüent de mort cardíaca sobtada [126], i permet

predir un elevat risc de patir una lesió ateroscleròtica en pacients cardiovasculars. Es podria especular que la regeneració endotelial podria veure's afectada per la presència de nivells elevats de CD40L, contribuint a un elevat risc de patir fenòmens coronaris aguts [128].

1.5.1.7. Inhibició potencial de CD40-CD40L en inflamació vascular

El bloqueig de la interacció CD40-CD40L en models animals redueix la formació de la lesió ateroscleròtica i millora l'estabilitat de la placa [120]. Aquestes dades suggereixen que pacients amb aterosclerosi es poden beneficiar de la inhibició de la interacció de CD40-CD40L. Els inhibidors de HMG-CoA reductasa i els antagonistes GPIIb/IIIa interfereixen amb el sistema CD40-CD40L. L'acció dels inhibidors de HMG-CoA reductasa en el metabolisme de biosíntesi del colesterol exerceix un potent efecte antiinflamatori en la inflamació vascular. Aquest efecte podria ser, en part, degut a la inhibició d'alguns factors proinflamatoris incloent el CD40L. Hi ha estudis experimentals que demostren que les estatines causen una reducció de l'expressió de CD40 i CD40L en cèl·lules vasculars [129, 130]. De la mateixa manera, la teràpia amb estatines disminueix significativament els nivells de la forma soluble de CD40L en plasma de pacients tractats comparat amb pacients controls no tractats [129]. En pacients amb hipercolesterolèmia, el tractament amb estatines redueix significativament l'expressió de CD40 i CD40L i, en pacients amb hipercolesterolèmia familiar, s'observa una disminució dels nivells de sCD40L [131].

Una altra opció terapèutica per interferir amb la via de senyalització de CD40 en ACS, és l'ús d'antagonistes de la integrina plaquetària GPIIb/IIIa. Hi ha un estudi que demostra que els antagonistes GPIIb/IIIa causen una reducció en l'alliberament de CD40L soluble per les plaquetes activades *in vitro* [132]. A més, hi ha evidències clíniques que suggereixen que pacients amb nivells elevats de CD40L soluble associats a un elevat risc de patir fenòmens trombòtics es veuen més beneficiats per un tractament antiplaquetari que aquells pacients que presenten nivells moderats de CD40L [127].

Una altra alternativa per interferir amb la interacció CD40-CD40L, seria el bloqueig intracel·lular de la via de senyalització de CD40. Com s'ha comentat anteriorment, les àrees de l'endoteli vascular exposades a un flux sanguini de tipus laminar estan protegides contra el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica. En aquestes regions té lloc un bloqueig de l'activació endotelial proinflamatòria i procoagulant mediada per CD40. Hi ha estudis que evidencien que en cèl·lules endotelials en cultiu exposades a un flux laminar, té lloc un increment en l'expressió de TRAF-3. A més, cèl·lules endotelials de la placa d'aterosclerosi localitzades en àrees de flux laminar, presenten un augment de l'expressió de TRAF-3. La

sobreexpressió de TRAF-3 inhibeix l'expressió de citoquines proinflamàtores i TF, i bloqueja l'activitat d'unió del factor de transcripció AP-1, impedit l'activació endotelial induïda per CD40 [119].

1.5.2. Malalties autoimmunes i CD40

La importància de la interacció CD40-CD40L ha estat demostrada en diferents malalties autoimmunes com el lupus eritematós sistèmic (SLE) [133], l'artritis induïda per col·lagen [134], l'encefalomielitis al·lèrgica experimental [135, 136] i l'esclerosi múltiple [137]. L'utilització d'anticossos anti-CD40L bloqueja el desenvolupament de la major part d'aquestes malalties en el respectiu model animal [138].

1.5.2.1. Artritis reumatoide i lupus eritematós sistèmic

L'aterosclerosi presenta molts mecanismes en comú amb altres malalties inflamàtores cròniques com l'artritis reumatoide (RA) i el lupus eritematós sistèmic, sent la mort cardiovascular la major causa de mortalitat de pacients amb aquestes malalties [139].

El procés inflamatori juga un paper molt important en la patogènesi de RA i SLE de forma similar a la malaltia vascular ateroscleròtica. Tant la placa d'ateroma com el sinovium reumatoide es caracteritzen per la migració de cèl·lules inflamàtores, acompanyada d'interaccions entre l'endoteli vascular o les cèl·lules del teixit connectiu amb diferents tipus cel·lulars, que finalment dona lloc a una resposta inflamatòria crònica. Les cèl·lules proinflamàtores implicades en ambdós tipus de lesions són macròfags i limfòcits T. L'activació principalment de macròfags, que alliberen enzims degradadors de col·lagen a la placa ateroscleròtica, juga un paper important en la desestabilització de la placa d'ateroma, però la degradació de la matriu també és un pas essencial per a la destrucció del teixit en l'artritis reumatoide [140]. Altres semblances entre aquestes dues malalties inclouen la inducció de l'expressió gènica de diverses citoquines i quimioquines i l'activació endotelial. De la mateixa manera, l'angiogènesi i altres factors proangiogènics contribueixen a la patogènesi de RA [141] i al desenvolupament de l'aterosclerosi. L'expressió de TF, el principal desencadenant de la cascada de coagulació *in vivo*, el qual juga un paper important en les complicacions trombotiques cardiovasculars, també s'ha trobat incrementada en un model animal de CIA (*collagen induced arthritis*) [142].

L'adhesió dels limfòcits T a l'endoteli vascular és un fenomen que té lloc tant a l'inici de la formació de la placa d'aterosclerosi com de la malaltia de RA, donant lloc a la migració i localització subendotelial d'aquestes cèl·lules. Durant aquest procés els limfòcits T entren en

contacte amb les cèl·lules endotelials i poden activar aquestes cèl·lules així com monòcits/macròfags, cèl·lules de la musculatura llisa i fibroblasts, per produir citoquines i quimioquines, TF i MMPs promovent inflamació, angiogènesi i dany del teixit. La interacció CD40-CD40L juga un paper destacat en la regulació de tots aquests processos, on la interacció cèl·lula a cèl·lula és un mecanisme important. L'ús d'anticossos monoclonals anti-CD40L s'ha demostrat que disminueix el desenvolupament de la CIA en models animals experimentals de ratolí [143].

1.6. Trasplantament renal

El rebuig agut juntament amb els efectes secundaris produïts pels fàrmacs immunosupressors, són els principals problemes clínics en trasplantament. La immunosupressió indueix un estat de tolerància farmacològica que desapareix, generalment, un cop retirat el tractament amb la posterior pèrdua de l'empelt [144]. Tot i així, encara que es mantingui la immunosupressió, una gran quantitat d'òrgans trasplantats es perden amb el temps com a conseqüència del rebuig crònic [144]. En trasplantament, la manifestació més habitual del rebuig crònic de l'òrgan trasplantat és l'existència d'inflamació persistent i aterosclerosi. En el cas del trasplantament renal es produeix fibrosi intersticial, atrofia tubular i glomerulosclerosi, amb presència de proteinúria i un deteriorament funcional progressiu del ronyó [87]. Aquesta patologia es coneix amb el nom de nefropatia crònica de l'empelt (NCA).

1.6.1. Etapes en el rebuig mitjançat per cèl·lules T

En el rebuig agut les APCs de l'hoste i el donant migren cap als òrgans limfoides secundaris on presenten l'antigen a les cèl·lules T *naïve* i de memòria. Aquestes cèl·lules T circulen entre els teixits limfoides regulades per receptors de quimioquines i de S-1-P (*sphingosine-1-phosphate*). La presentació d'antigen per part de les cèl·lules del donant de l'empelt, entre elles les cèl·lules endotelials, desencadena l'activació de les cèl·lules T.

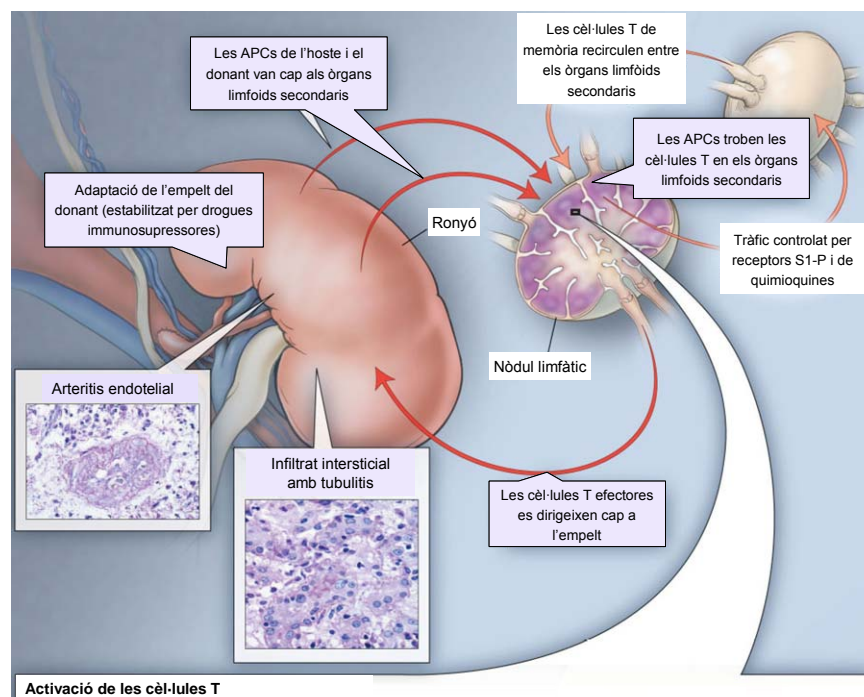


Figura 15. Activació de APCs i rebuig mitjançat per les cèl·lules T en la resposta al·loimmunitària.

Modificat de [145].

1.6.1.1. Activació de les cèl·lules T en la resposta al·loimmune

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el primer senyal d'activació de les cèl·lules T prové de la interacció entre l'antigen de la superfície de la APC i el receptor TCR. Posteriorment la unió de CD80/CD86 i CD40 de la APC amb CD28 i CD40L respectivament de la cèl·lula T, desencadena el segon senyal d'activació dins la cèl·lula. Aquests dos senyals activen les vies de calcineurina, MAPKs i PKC (Figura 16), i els factors de transcripció NFAT, AP-1 i NFκB respectivament. Aquests factors de transcripció regulen l'expressió de diverses molècules entre elles el CD40L (que al mateix temps activa APCs), la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) i la citoquina IL-2. Cert nombre de citoquines, entre elles IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, i IL-21, comparteixen la isoforma δ del seu receptor, la qual uneix JAK3 (*Janus kinase 3*) desencadenant senyals de tipus 3 i l'entrada en el cicle cel·lular a través de l'activació de la via de PI-3K i la via de mTOR (*molecular-target-of-rapamycin*). Aquesta proliferació i diferenciació de limfòcits T dona lloc a un gran nombre de cèl·lules T efectores, que un cop activades, infiltrin l'empelt i desencadenen lesions de rebuig com tubulitis i, en un estat més avançat, arteritis endotelial (Figura 15). Per altra banda, les cèl·lules B quan troben l'antigen s'activen produint anticossos contra els antigens HLA del donant. D'aquesta manera la resposta immune genera cèl·lules T efectores i al·loantígens, ambdós considerats com les molècules efectores del procés de rebuig de l'òrgan trasplantat.

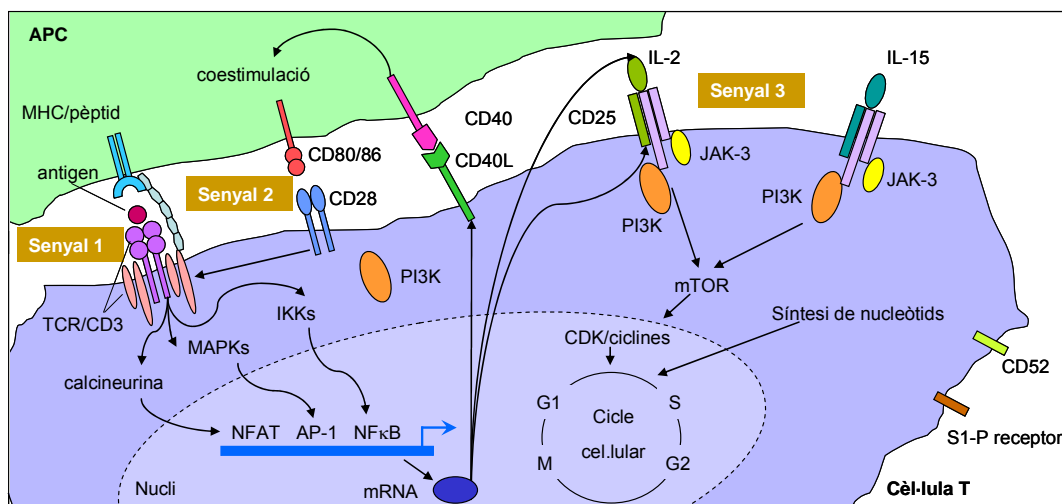


Figura 16. Model de 3 senyals en l'activació de la cèl·lula T durant la resposta al·loimmune. Modificat de [145].

1.6.2. Efectors i lesions de rebuig

Les cèl·lules T efectores que emergeixen dels òrgans limfoides infiltrin l'empelt i desencadenen la resposta inflamatòria. En el **rebuig cel·lular** desencadenat per cèl·lules T,

l'empelt és infiltrat per cèl·lules T efectores, macròfags activats, cèl·lules B, i cèl·lules plasmàtiques, donant lloc a la producció de IFN- γ , un augment en l'expressió de diverses quimioquines, una alteració en la permeabilitat capil·lar i de la matriu extracel·lular, i un deteriorament de la funció parenquimal. Les lesions diagnosticades en el rebuig desencadenat per cèl·lules T presenten cèl·lules mononuclears envaint els túbuls del ronyó (tubulitis) i la íntima d'artèries petites (arteritis). La lesió desenvolupada en el rebuig implica no només la lisi d'aquestes cèl·lules diana per part dels macròfags activats per les cèl·lules T, sinó una transdiferenciació parenquimal d'aquestes cèl·lules cap a cèl·lules mesenquimals i la senescència d'aquestes. En el **rebuig humoral**, els al·loanticossos desenvolupats contra els antígens del donant, ja siguin produïts sistèmicament o localment a l'empelt, estan dirigits majoritàriament contra l'endoteli capil·lar. Aquest rebuig humoral mitjançat per anticossos es diagnostica seguint criteris clínics, immunològics i histològics, incloent la presència en els capil·lars del factor de complement C4d.

1.6.3. Expressió de CD40-CD40L en ronyó normal i trasplantat

Donat l'important paper que ha demostrat la interacció CD40-CD40L en el desenvolupament de rebuig al trasplantament, s'ha analitzat l'expressió *in situ*, mitjançant immunohistoquímica, d'aquestes dues molècules en empelts renals humans que desenvolupen rebuig. Segons aquests estudis, el receptor CD40 i el seu lligand CD40L es troben coexpressats tant en la superfície de les cèl·lules endotelials com en altres tipus cel·lulars de l'empelt i en les cèl·lules T infiltrants. L'any 1998 es va identificar l'expressió de **CD40** en els limfòcits T i macròfags que infiltraven el ronyó trasplantat en rebuig agut humà [146]. Tanmateix, es va demostrar que tant la cèl·lula endotelial glomerular com la cèl·lula tubular epitelial renal expressaven CD40 en la seva membrana externa [104]. En el procés d'al·loreconeixement, la cèl·lula endotelial de l'empelt actua com a APC [87]. Aquesta funció de reconeixement de l'antigen per les APCs de l'òrgan ha estat ben caracteritzada dins del sistema CD40-CD40L. S'ha descrit que les cèl·lules endotelials de l'òrgan trasplantat presenten un increment en l'expressió de CD40 en situació de rebuig en comparació amb els nivells d'expressió de CD40 en teixit normal i en ronyons trasplantats que no desenvolupen rebuig.

Pel que fa a **CD40L**, s'ha descrit que en situació de rebuig renal crònic aquesta molècula incrementa la seva expressió no només en les cèl·lules endotelials glomerulars de la microvasculatura sinó també en les cèl·lules epitelials glomerulars, cèl·lules mesangials i cèl·lules epitelials tubulars. Aquesta expressió *de novo* de CD40L en estructures glomerulars i

tubulars en rebuig, contrasta amb la gairebé absència d'expressió de CD40L en l'empelt trasplantat que no desenvolupa rebuig o en teixit renal normal. Pel que fa a la seva expressió en cèl·lules mononuclears infiltrants de l'òrgan trasplantat, CD40L s'expressa en la superfície d'aquestes cèl·lules i també pot ser alliberat en forma soluble per part de les cèl·lules T circulants [147]. S'han fet estudis en models d'al·lotrasplantament renal humà on s'ha descrit un increment en l'expressió del transcrit de CD40L en situació de rebuig en comparació amb el baix nivell d'activació gènica observat en òrgans que no presenten rebuig [148].

Aquestes dades indiquen la potencial contribució de la interacció entre cèl·lules T efectores i macròfags infiltrants CD40⁺ que destrueixen l'empelt i les cèl·lules parenquimals CD40L⁺ del ronyó, en el desenvolupament de rebuig en trasplantament renal.

1.6.4. Drogues immunosupressores en trasplantament renal

Malgrat la important reducció en la incidència de rebuig agut en trasplantament renal i les millores en la supervivència de l'empelt a curt termini, l'índex de supervivència a llarg termini ha variat poc durant l'última dècada. Aquest fet posa de manifest la necessitat de desenvolupar noves estratègies immunosupressores dirigides a millorar resultats a llarg termini. Donat el paper central de les cèl·lules T en el rebuig en trasplantament, la major part de les teràpies immunosupressores tenen com a objectiu el bloqueig de l'activació de les cèl·lules T. Amb aquesta finalitat, els règims immunosupressors actuals utilitzen una combinació de teràpies que proporcionen immunosupressió més intensa durant el període immediat al posttrasplantament (fase d'inducció). Amb el temps, la majoria dels pacients són tractats amb un còctel de múltiples medicaments (fase de manteniment de la immunosupressió) per mantenir un estat de tolerància a l'al·loempelt. Desafortunadament, els immunosupressors de manteniment utilitzats actualment en trasplantament renal causen certa toxicitat que dificulta l'obtenció de resultats òptims a llarg termini. Aquest fet ha donat lloc al desenvolupament de teràpies de manteniment alternatives més selectives i amb menor toxicitat.

A la Figura 17 es mostren algunes molècules immunosupressores que s'han fet servir per bloquejar la resposta dels limfòcits T en trasplantament d'òrgans en assaigs clínics de Fase II-III. Entre les molècules utilitzades en teràpia immunosupressora en la clínica es troben els inhibidors de calcineurina (Ciclosporina, Tacrolimus), els inhibidors de mTOR (Sirolimus, Everolimus), els inhibidors de la síntesi de nucleòtids purines (MPA, micofenolat mofetil) i pirimidines (FK778), alguns anticossos monoclonals i policlonals (anti-CD3, anti-CD52, anti-CD25), i la proteïna de fusió (CTLA4-Ig).

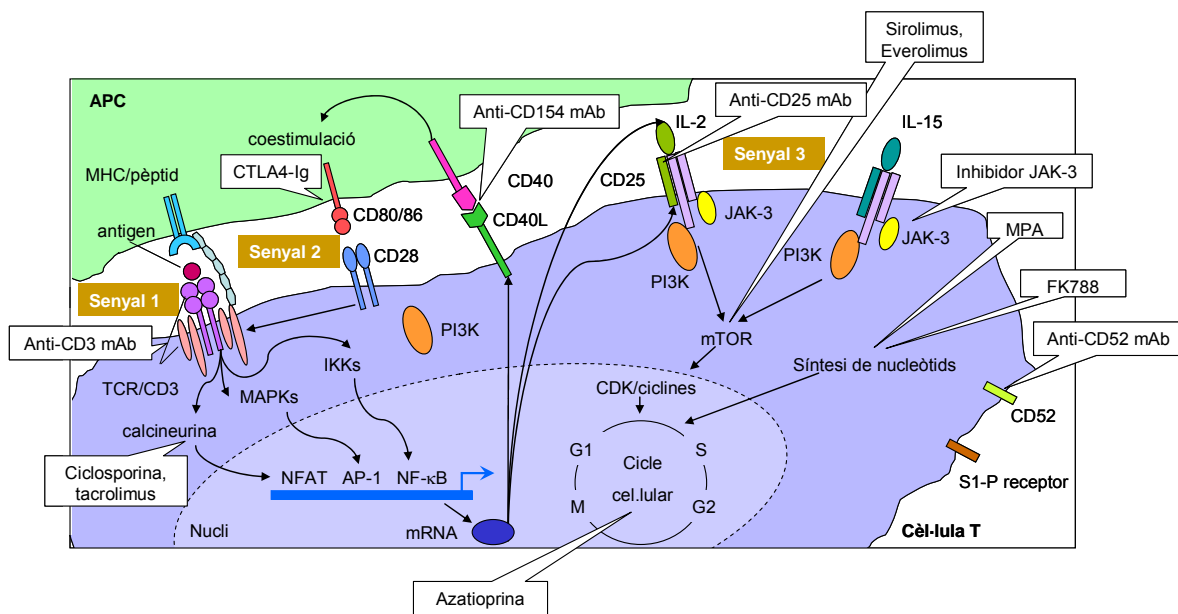


Figura 17. Drogues immunosupressores utilitzades en assaigs clínics i llocs d'acció en la cèl·lula T durant la resposta al·loimmunitària. Modificat de [145].

Durant els darrers 15 anys s'ha avançat en el coneixement del paper central que juguen les cèl·lules T en el rebuig en trasplantament. Aquest fet ha donat lloc a desenvolupar noves estratègies per induir un estat de tolerància mitjançant el bloqueig de la coestimulació de les cèl·lules T dirigits ja sigui contra el sistema CD28/CD152 (CTLA4)-B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86) o el sistema CD40-CD40L. A continuació es descriuen alguns dels estudis on el bloqueig d'aquests dos senyals coestimuladors ha mostrat cert èxit en models de trasplantament murins i en primats no humans (NHP).

1.6.5. Bloqueig del senyal coestimulador en trasplantament

1.6.5.1. Sistema CD28-B7

La via coestimuladora més estudiada és la interacció entre la molècula CD28 expressada de forma constitutiva en cèl·lules T i CD80/CD86 (B7-1/B7-2) en les APCs activades. Després de la seva unió, CD28 desencadena un senyal estimulador en els limfòcits T. Els efectes potents del bloqueig a curt termini del senyal coestimulador CD28 van ser observats inicialment en xenoempelt d'illots pancreàtics, i models d'al·loempelt cardíac de rata i ratolí. Aquests estudis en models de rosegadors de trasplantament demostraven que el bloqueig de la coestimulació de cèl·lules T mediada per CD28-B7 evitava el rebuig agut d'al·loempelts i en alguns casos induïa tolerància específica de donant [149, 150]. El bloqueig d'aquesta via amb anticossos monoclonals anti-CD28 a curt termini evita el rebuig agut i

crònic en models de trasplantament renal en rosegadors [151, 152].

Posteriorment, per bloquejar les interaccions de CD28 amb CD80 i CD86, es va desenvolupar la proteïna de fusió CTLA-4Ig, que combina el domini extracel·lular de CTLA-4 amb la porció Fc de IgG1. CTLA-4 és un homòleg de CD28 que s'expressa poc després de l'activació de les cèl·lules T i presenta major afinitat d'unió per CD80/CD86 que CD28. CTLA-4 desencadena un senyal negatiu en la cèl·lula T i una atenuació de la resposta immune, inhibint l'expressió de IL-2 i bloquejant la progressió del cicle cel·lular i la proliferació de cèl·lules T [153]. El bloqueig d'aquest senyal coestimulador utilitzant la proteïna de fusió CTLA4Ig, que competeix amb CD28 per la unió amb CD80/CD86, inhibia la resposta immune i, en alguns casos, induïa tolerància en models d'al·lotrasplantament cardíac o de pell, i de xenotrasplantament d'illots pancreàtics en rata i ratolí [150, 154]. Nombrosos estudis han mostrat que CTLA-4Ig actua inhibint les respostes immunitàries [155]. En rosegadors, CTLA-4Ig inhibeix la immunitat humoral i cel·lular, prolongant de manera significativa la supervivència de l'òrgan trasplantat, i alentint la progressió de la malaltia en alguns models animals [156, 157].

Estudis preclínics

Per inhibir la via CD28 en NHP s'han fet servir dues estratègies: (1) anticossos bloquejants dirigits contra els lligands de CD28: CD80 i CD86 (B7-1 i B7-2) [158-164] i (2) la proteïna de fusió CTLA4-Ig [165-167]. La monoteràpia utilitzant anticossos bloquejants anti-CD80 o anti-CD86, no prolongava de manera significativa la supervivència de l'al·loempelt renal en un model de macac. En canvi, el bloqueig combinat d'ambdues vies CD80 i CD86, donava lloc a un increment de la supervivència de l'empelt en aquests animals. Tot i així, no s'induïa un estat de tolerància immunològica i en retirar el tractament es produïa el rebuig de l'òrgan. Resultats similars van ser observats després del bloqueig de CD80 i CD86 amb la proteïna de fusió CTLA4-Ig. Aquesta proteïna de fusió ha estat efectiva induint tolerància immunològica en experiments en models murins, en canvi, traslladada a models de primats no humans ha mostrat una eficàcia limitada. Els resultats en aquests models de trasplantament mostraven cert increment en la supervivència dels al·loempelts, però els efectes eren menors que els observats en models de rosegador [165, 166]. Aquest efecte incomplet podria atribuir-se en part a la relativa baixa afinitat de CTLA4-Ig per CD86 [167]. Per resoldre aquest fet, es va desenvolupar una molècula de segona generació anomenada LEA29Y "belatacept", una versió mutant de CTLA4-Ig amb major afinitat *in vitro* per CD86. LEA29Y presenta dues substitucions d'aa (L104E i A29Y), que determinen una taxa de dissociació més lenta per CD80 i CD86. A diferència de CTLA4-Ig, la monoteràpia amb

belatacept prolongava la supervivència de l'òrgan en trasplantament renal i d'illots en un model de macac. En aquest últim cas, en combinar belatacept amb un tractament amb rapamicina i un anticòs dirigit contra el receptor de IL2, tenia lloc una significativa millora de l'acceptació de l'empelt [168]. L'eficàcia de belatacept en el model NHP, ha donat lloc al disseny d'un assaig clínic de fase II comparant belatacept amb ciclosporina en trasplantament renal (<http://www.immunotolerance.org>) [169] i en trasplantament d'illots (<http://www.isletstudy.org>).

1.6.5.2. Sistema CD40-CD40L

El bloqueig del senyal CD40-CD40L com a estratègia terapèutica per prevenir el rebuig en trasplantament ha estat de gran interès durant més d'una dècada. Utilitzant anticossos anti-**CD40L** s'han observat efectes notables sobre la supervivència d'al·loempelts i una inducció de tolerància en models de rosegadors. Aquests resultats confirmen la importància del sistema CD40-CD40L en el rebuig agut de l'empelt [166, 170-172] i han encoratjat la utilització en clínica humana d'eines per al bloqueig d'aquest senyal coestimulador com a una nova estratègia terapèutica immunosupressora. En primats no humans l'ús d'anticossos anti-CD40L evita el rebuig agut promovent l'acceptació de l'al·loempelt a llarg termini; tot i així, la retirada de la teràpia finalment ocasiona rebuig, demostrant que aquests anticossos no indueixen tolerància immunològica quan s'utilitzen sols [166, 170-172].

Estudis preclínics

En estudis en NHP s'han utilitzat 4 clons d'un anticòs monoclonal anti-CD40L: hu5C8, H106, IDEC-131 i ABI793 [166, 170, 171, 173-178]. Tots aquests anticossos han mostrat una eficàcia significativa prolongant la supervivència de l'al·loempelt. Tot i que la monoteràpia de cadascun dels anticossos anti-CD40L anteriors causava l'acceptació a llarg termini de l'al·loempelt renal, de cor i d'illots, el tractament no prevenia el desenvolupament d'al·loanticossos i en alguns casos s'associava amb el rebuig final de l'òrgan [166, 170, 171, 174-178]. En el cas de trasplantament renal, el rebuig es caracteritzava per un infiltrat limfocític envaint més enllà de l'àrea perivascular del teixit parenquimal circundant, causant tubulitis, endotelitis i necrosi hemorràgica. Tot i l'incomplet efecte del bloqueig de CD40L, la seva eficàcia prolongant la supervivència de l'al·loempelt va fomentar el desenvolupament d'assaigs clínics. Testat en trasplantament renal humà, l'anticòs anti-CD40L hu5C8 va ocasionar efectes trombòtics significatius. Anàlisis posteriors en NHP van mostrar que tant l'anticòs hu5C8 com ABI793 eren protrombòtics [178-181]. Posteriorment, s'han desenvolupat anticossos anti-CD40L alternatius, dirigits contra epítops diferents de la

molècula de CD40L per tal de no interferir amb la funció plaquetària. Estudis recents utilitzant l'anticòs anti-CD40L IDEC-131, juntament amb l'administració de l'immunosupressor sirolimus i una transfusió única específica de donant, han mostrat supervivència prolongada de l'empelt de pell en primats i un estat de tolerància en al·lotrasplantament renal en primats [182, 183]. Tot i que IDEC-131 no semblava ser protrombòtic en els assaigs clínics inicials, estudis posteriors van detectar cert nombre de fenòmens trombòtics que van aturar el seu desenvolupament en clínica.

Efectes tromboembòlics derivats de l'ús d'anticossos anti-CD40L en clínica

Malgrat experiències preclíniques positives, els estudis clínics amb anticossos anti-CD40L com a agents immunosupressors en malaltia autoimmune i trasplantament es van finalitzar a causa de l'elevada incidència de complicacions tromboembòliques.

Aquests efectes trombòtics són resultat de l'expressió de CD40L en les plaquetes, les quals podrien activar-se directament a través de la interacció de l'anticòs amb els receptors Fc presents a la seva superfície cel·lular [184]. Aquest fet causa un augment en la propensió a desenvolupar un trombe arterial en presència d'anticossos anti-CD40L [179, 181, 185]. Es va suggerir que tractaments que reduïssin l'agregació plaquetària podrien disminuir el risc de tromboembòlia deguda a l'ús d'aquests anticossos [179]. Posteriorment es va veure que aquests efectes trombòtics associats a la teràpia anti-CD40L podien evitar-se utilitzant tractaments anticoagulants transitoris [185].

Per altra banda, s'ha descrit que CD40L s'uneix a la glicoproteïna (GP) IIb-IIIa, de la superfície plaquetària estabilitzant el trombe [186]. En aquest context, el tractament amb anticossos anti-CD40L podria causar la inhibició de la interacció de CD40L amb aquesta integrina plaquetària i desestabilitzar el trombe, incrementant el risc de tromboembòlia en el període postquirúrgic del trasplantament.

Donades les complicacions sorgides en l'administració d'anticossos anti-CD40L, va sorgir cert interès en aconseguir el bloqueig del seu receptor **CD40**. Amb aquesta finalitat s'han utilitzat dos anticossos, ch5D12 i Chi220, i s'ha avaluat la seva eficàcia en diferents models experimentals de NHP [160, 187-191]. Ch5D12 és un anticòs monoclonal antagonista que bloqueja la unió al seu lligand. Chi220, en canvi, a més de la seva habilitat per bloquejar la unió al lligand, ha mostrat certes propietats agonistes. El grau d'implicació d'aquesta activitat agonista parcial en prolongar la supervivència de l'al·loempelt encara està per determinar, però es creu que una senyal proliferativa feble podria promoure la susceptibilitat a desenvolupar anergia, mort cel·lular o altres efectes immunes. S'ha descrit que el tractament amb l'anticòs ch5D12 o Chi220 prolonga la supervivència de al·loempelt en trasplantament

renal [160, 189] i d'illots [190] tot i que en cap cas, no s'assoleix una acceptació a llarg termini de l'òrgan ni un estat de tolerància immunològica [160, 189-191].

1.6.5.3. Combinació sistema CD28 i CD40-CD40L

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el bloqueig de la via CD40-CD40L amb anticòs anti-CD40L incrementa la supervivència a llarg termini de l'al·loempelt. Tot i així, els efectes de anti-CD40L són reversibles i, per tant, sovint es requereix una administració prolongada de l'anticòs [170]. De la mateixa manera que el bloqueig de la via CD28-B7, l'anticòs anti-CD40L quan s'utilitza sol, rarament indueix un estat de tolerància immunològica a llarg plaç [172]. Es requereix el bloqueig simultani de múltiples vies coestimuladores per tal d'assegurar l'absència del segon senyal d'activació dels limfòcits T i desencadenar una situació d'anergia i/o tolerància (Figura 18).

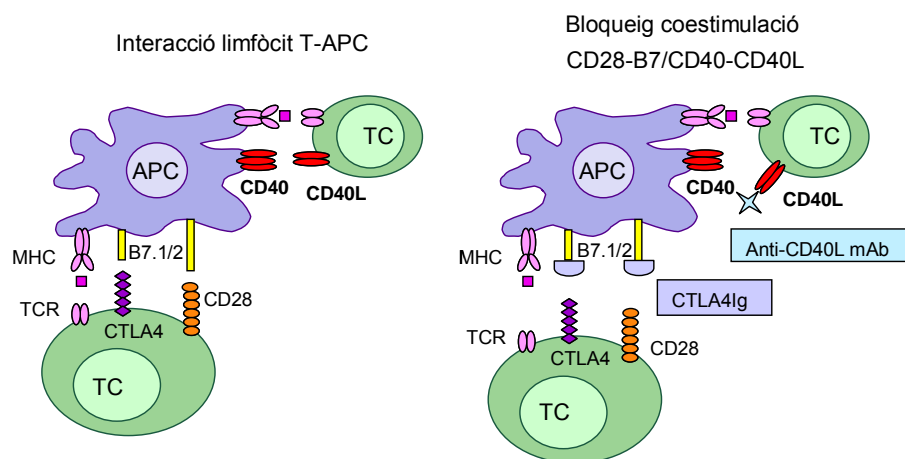


Figura 18. Combinació del bloqueig del senyal coestimulador CD28-B7 i CD40-CD40L.

S'ha observat que el bloqueig simultani de les vies CD28-B7 i CD40-CD40L té una acció sinèrgica, promovent la supervivència indefinida de l'òrgan en models murins de trasplantament de pell i xenotrasplantament [192, 193]. Altres estudis demostraven que l'associació de CTLA4Ig amb anticòs anti-CD40L prolongava la supervivència de l'insert cardíac sense necessitat d'administrar immunosupressió [192]. El bloqueig d'aquests dos sistemes coestimuladors causava una reducció del tamany del clon de cèl·lules T al·loreactives per mitjà d'un mecanisme d'apoptosi d'aquestes cèl·lules, induint una situació de tolerància perifèrica de l'òrgan trasplantat [192]. Donat l'efecte sinèrgic de la combinació del bloqueig de la via CD28 i CD40 observat en models murins, diferents grups han investigat l'eficàcia de la combinació del bloqueig dels senyals coestimuladors CD28-B7 i CD40-CD40L en models de NHP. En un model similar a l'anterior en primats, l'ús de CTLA4Ig o un anticòs monoclonal anti-CD40L perllongava la supervivència dels animals tractats en comparació

amb els animals controls [166]. Utilitzant els dos tractaments s'aconseguia una supervivència lliure de rebuig en la meitat dels animals tractats, sent l'associació dels dos fàrmacs 100 vegades més efectiva que el seu ús per separat.

Altres estudis combinant o bé anticossos anti-CD80/86 o CTLA4-Ig amb anticossos anti-CD154 en NHP, en canvi, no han mostrat efectes sinèrgics [159, 194]. En el cas de CTLA4-Ig, la falta de sinèrgisme, podria ser conseqüència del bloqueig subòptim de CD86 observat fent servir aquesta proteïna de fusió en NHP. Resultats més prometedors van ser observats en combinar belatacept o anti-CD86 amb l'anticòs anti-CD40 ch5D12 o Chi220 en trasplantament renal. Aquests estudis mostraven un increment en la supervivència de l'al·loempelt, tot i que algun dels animals tractats va desenvolupar rebuig crònic, i en retirar-se la teràpia tenia lloc la pèrdua de l'empelt [190, 191].

Aquestes dades demostren que tot i que la combinació del bloqueig de la coestimulació CD28/CD40 és capaç d'impedir el rebuig de l'al·loempelt, es requereixen estratègies addicionals per induir tolerància.

A la Taula 7 es mostren les diferents estratègies utilitzades per induir tolerància immunològica mitjançant el bloqueig de la coestimulació en NHP. Aquests estudis preclínic han donat lloc a assaigs clínics, els quals han mostrat resultats significatius però en ocasions també han revelat efectes tòxics no esperats.

Estratègia de tolerància	Referències	Resultats	Limitacions
Bloqueig CD28-B7			
anti-CD80/CD86	[158-164, 191]	-El bloqueig de CD80/86 causa un increment significatiu de la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia
CTLA4-Ig	[165, 166]	-Prolongació moderada de la supervivència de l'òrgan -Retarda la formació d'al·loanticossos	-Baixa afinitat per CD86 -Tolerància no assolida amb la monoteràpia
LEA29Y	[167, 168, 190]	-Major afinitat <i>in vitro</i> per CD86 -Utilitzat com a monoteràpia prolonga la supervivència de l'òrgan -Impedeix la formació d'al·loanticossos	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia
Bloqueig CD40-CD40L			
anti-CD154			
Hu5C8	[159, 166, 170, 171, 175, 176, 179-181, 185, 194]	-Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia -Efectes tromboembòlics en NHP i pacients
H106	[189]	-Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan -No s'han descrit fenòmens tromboembòlics	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia -No realitzats estudis de trombosis subclínica
IDEC-131	[173, 174, 182, 183]	-Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia -Efectes tromboembòlics en pacients
ABI-793	[177, 178]	-Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia -Efectes tromboembòlics en NHP
anti-CD40			
ch5D12	[160, 187, 188, 191]	-Anticòs monoclonal antagonista de CD40 -Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia
Chi-220	[189, 190]	-Anticòs amb activitat dual antagonista i parcialment agonista -Prolonga de manera significativa la supervivència de l'òrgan	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia
Combinació CD28 i CD40-CD40L	[159, 160, 166, 190, 191]	-Prolonga la supervivència de l'òrgan (excepte ref.15) -Impedeix la formació d'al·loanticossos	-Tolerància no assolida amb la monoteràpia
anti-CD154+ rapamicina+ DST	[182, 183]	-Tolerància en 3/6 receptors de trasplantament renal	-Teràpia no 100% efectiva -Incapaç de predir èxit o fracàs
anti-CD40+ anti-CD86+CSA	[191]	-Supervivència a llarg termini en 2/4 receptors de trasplantament renal	-Teràpia no 100% efectiva -Incapaç de predir èxit o fracàs

Taula 7. Estratègies d'inducció de tolerància immunològica en NHP (*non-human primates*). Modificat de [195].

1.7. Silenciament gènic posttranscripcional

Existeixen diferents molècules que poden induir una inhibició de l'expressió gènica mitjançant un mecanisme específic de seqüència. Un cop unit al seu RNA diana, aquesta molècula provoca la degradació d'aquest RNA o impossibilita la seva traducció a proteïna.

Hi ha tres categories de molècules que poden causar silenciament gènic: (1) oligonucleòtids antisentit (AS) els quals, depenent del seu tipus, recluten l'enzim RNasa H per trencar el mRNA diana o bé inhibeixen la traducció proteica per impediment estèric; (2) ribozims i desoxiribozims –es tracta d'oligonucleòtids catalíticament actius que causen el trencament del RNA; (3) i molècules *small interfering double-stranded RNA* (siRNA), que indueixen la degradació del RNA a través d'un mecanisme natural de silenciament gènic anomenat *RNA interference* (RNAi) (Figura 19).

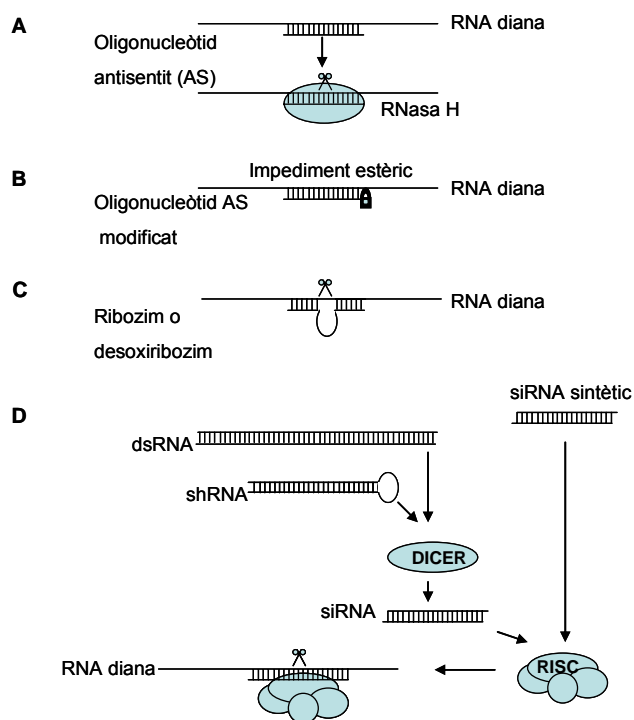


Figura 19. Mecanismes d'inhibició de l'expressió gènica o silenciament posttranscripcional. Modificat de [196].

1.7.1. Tecnologia antisentit: d'oligonucleòtids antisentit a siRNA

1.7.1.1. Oligonucleòtids antisentit

La regulació de l'expressió gènica pot aconseguir-se a nivell posttranscripcional mitjançant l'ús de tecnologies basades en el mecanisme antisentit. La tecnologia antisentit va ser desenvolupada per primera vegada al 1978 amb la utilització d'oligonucleòtids antisentit per inhibir la replicació del virus del sarcoma de Rous [197]. Aquest mecanisme implica

l'entrada dins la cèl·lula d'oligonucleòtids que són complementaris en seqüència al mRNA d'interès, el qual és capaç de buscar i unir-se al seu RNA diana (Figura 20). Aquest fet causa la supressió de l'expressió del producte gènic, que depenent del tipus d'oligonucleòtid-AS utilitzat, pot donar-se o bé a través de la degradació del seu mRNA o mitjançant el bloqueig estèric durant el procés de traducció proteica. L'especificitat d'aquest mecanisme es basa en la suposició que qualsevol seqüència de DNA amb una longitud mínima de 20nt és present dins el genoma només una vegada. A més de les possibles aplicacions terapèutiques d'aquesta tecnologia, altres aplicacions inclouen la caracterització de la funció gènica, el descobriment i validació de noves dianes terapèutiques i la generació de ratolins *knock-down*.

Des de llavors, han aparegut moltes varietats d'oligonucleòtids modificats i no modificats de DNA i de RNA amb un tamany típic de 18–25 nucleòtids que han estat utilitzats en estudis antisentit. Tots aquests oligonucleòtids tenen en comú que comparteixen el primer pas en el mecanisme de *gene knockdown*: trobar i unir-se al seu mRNA diana dins la cèl·lula. Una vegada hibridats a la molècula diana, els oligonucleòtids carregats negativament com els fosfodièsters i els fosforotioats, són reconeguts per l'enzim RNasa H, el qual de manera específica trenca la cadena del RNA del dúplex DNA/RNA degradant el mRNA diana [198] (Figura 19A). Una altra classe de molècules antisentit, a causa de la naturalesa del dúplex format amb el RNA diana, no activa la RNasa H i en el seu lloc inhibeix la traducció del producte gènic per impediment estèric [199] o interferint amb el mecanisme d'*splicing* del pre-mRNA [200] (Figura 19B). Aquesta última classe de molècules antisentit inclou els àcids nucleics derivats modificats com els morfolinos, 2'-O-methyls, 2'-O-allyls, i els àcids nucleics peptídics [201].

1.7.1.2. siRNA

En el mecanisme de RNAi, un RNA de doble cadena (dsRNA) que és homòleg en seqüència a un RNA diana causa la inhibició de l'expressió d'aquest gen per degradació específica del mRNA complementari o inhibició de la traducció proteica.

La RNAi és un fenomen natural molt potent altament conservat en eucariotes que va ser descobert originalment en plantes i invertebrats [202, 203]. Aquest procés es creu que va sorgir inicialment com a sistema de protecció de l'organisme en front de la infecció per virus i la mobilitat de transposons, per limitar l'expressió de gens exògens o aberrants.

En els últims anys, s'ha explotat el coneixement adquirit sobre RNAi per a desenvolupar la tecnologia de silenciament gènic més àmpliament utilitzada.

1.7.2. Interferència per RNA (RNAi)

1.7.2.1. Història

L'any 1990, Rich Jorgensen va provar d'exaltar el color púrpura d'unes petúnies introduint transgènicament còpies extres d'un dels gens responsables de la fabricació del pigment, i en lloc d'aconseguir el seu objectiu, les petúnies creades van resultar blanques [202]. Es va veure que les seqüències de DNA introduïdes afectaven l'expressió del locus endogen. Aquest fenomen es va anomenar cosupressió: el transgen inhibia el seu homòleg i s'inhibia a ell mateix. Al mateix temps, en un altre laboratori es va veure que les plantes eren capaces de respondre a la infecció per virus de RNA causant la degradació específica del RNA viral [204]. Aquest fenomen observat en plantes es va anomenar "*post-transcriptional gene silencing*" (PTGS) o "*viral-induced gene silencing*" (VIGS) [205, 206] respectivament.

Anys més tard, es va trobar un fenomen similar en animals. Al 1995 es va descriure que un RNA sentit introduït en *C. elegans* era més efectiu en la supressió de l'expressió gènica que el seu corresponent RNA antisentit [207]. Posteriorment l'any 1998 es va demostrar que el RNA de doble cadena era 10 vegades més potent reduint l'expressió gènica en *C. elegans* comparat amb el RNA sentit o antisentit per separat [203]. Des d'aleshores, aquest fenomen de RNAi s'ha descrit en una àmplia varietat d'organismes, incloent peix zebra [208], planària [209], hidra [210], fongs [211], *Drosophila* [212], i en mamífers en sistemes d'embrions de ratolí [213].

1.7.2.2. Funcions biològiques de RNAi

Avui en dia se sap que els intermediaris de dsRNA produïts durant la infecció vírica activen la maquinària de RNAi per silenciar l'expressió dels gens complementaris generant immunitat contra el virus. Aquest mecanisme de defensa contra material genètic exogen és un dels mecanismes fisiològics induïts per dsRNA de forma natural en una àmplia varietat d'organismes eucariotes.

A més del silenciament citoplasmàtic de l'expressió gènica activat per dsRNA viral exogen, el mecanisme de RNAi també és responsable del silenciament de mRNA cel·lulars per part dels anomenats microRNA endògens [214]. Els miRNAs són RNAs petits no codificants que presenten regions de complementaritat repetides. Aquestes regions permeten la formació d'una estructura en *hairpin* que desencadena el mecanisme de RNAi. En animals, els miRNAs regulen l'expressió gènica dirigint-se a seqüències parcialment complementàries de la regió 3'UTR (*untranslated region*), donant lloc a una repressió traduccional del gen en qüestió. S'han identificat un gran nombre de miRNAs, però els seus mRNAs diana i la seva

implicació funcional només ha estat descrita per a una petita part d'aquests miRNAs. En *Drosophila* i *C. elegans*, el paper fisiològic dels miRNAs seria regular l'expressió de gens endògens implicats en processos de desenvolupament i mort cel·lular.

Un tercer tipus de silenciament gènic en resposta a dsRNA implica la modificació del DNA cel·lular i histones i el seu empaquetament en heterocromatina condensada i silenciada transcripcionalment [215]. Els desencadenants d'aquest tipus de resposta serien siRNAs generats per hibridació de transcrits amb seqüències repetitives. Aquest tipus de RNAi existiria com a un mecanisme de defensa per protegir l'organisme en front als potencials efectes deleteris d'elements genètics com els transposons.

1.7.2.3. Mecanisme de RNAi

El mecanisme de RNAi és un procés amb múltiples etapes. El RNA de doble cadena, ja sigui introduït de manera experimental en l'organisme o bé present de forma natural com a subproducte de la replicació vírica, miRNA endogen, o en forma de transcrit transgènic aberrant, és reconegut i processat per la endonucleasa Dicer, membre de la família de la RNAsa III, donant lloc a fragments més petits de 21 a 23nt anomenats *small interfering RNAs* (siRNAs) [216]. S'han trobat homòlegs de Dicer en *S. pombe* (però no en *S. cerevisiae*), en *C. elegans*, *Drosophila*, plantes i mamífers. Les diferents espècies presenten diferent nombre d'homòlegs de Dicer i/o proteïnes associades amb dominis d'unió a dsRNA que reconeixen dsRNA de diferent origen. Aquests siRNAs generats per Dicer presenten 2 nucleòtids a l'extrem 3' cohesiu [217] i un extrem 5' fosforilat [218], ambdós necessaris per a l'activitat de la molècula de siRNA. L'homòleg humà de Dicer en *Drosophila* ha estat clonat, expressat i extensament caracteritzat i es localitza dins del reticle endoplasmàtic de la cèl·lula junt amb la calreticulina [219]. Dicer és un enzim que presenta un domini RNA helicasa/ATPasa, 2 dominis veïns RNAsa III i un domini d'unió al dsRNA (RBD). A diferència de *Drosophila*, en mamífers el tall de dsRNA per Dicer no requereix d'ATP, però sí que es requereix ATP per a l'alliberació del producte resultant [219]. En cèl·lules humanes el procés de RNAi, està restringit al citoplasma o per aquells mRNAs que són exportats des del nucli [220].

Aquests siRNAs generats per Dicer són incorporats en el complex multiproteic anomenat RISC (*RNA-induced silencing complex*). RISC presenta un domini helicasa, exonucleasa, endonucleasa i diferents dominis de cerca d'homologia. Aquest complex utilitza la cadena antisentit del RNA com a guia per trobar i degradar el mRNA que és homòleg en seqüència a aquest siRNA [221]. El mRNA diana és tallat al centre de la regió de complementaritat amb el siRNA [216], la qual cosa causa una ràpida degradació d'aquest

mRNA diana i una disminució de l'expressió proteica. Aquesta degradació té lloc a través de l'activitat endonucleasa del complex RISC actiu (Figura 20).

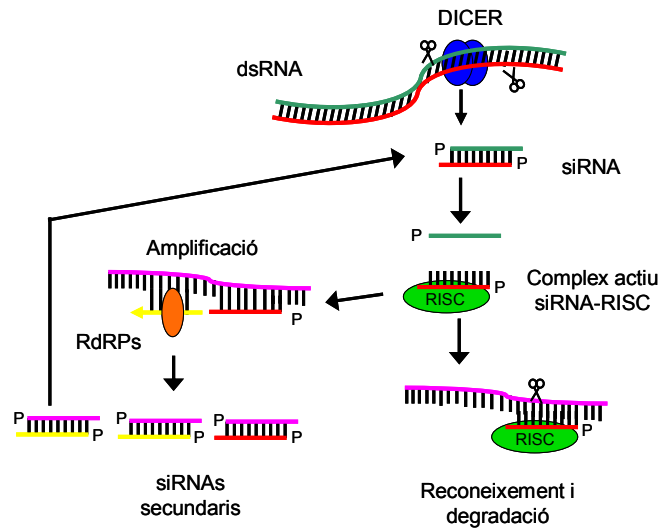


Figura 20. Mecanisme de RNAi en *C.elegans*.

Existeixen diferències importants entre el mecanisme de RNAi en diferents organismes eucariotes, com per exemple una naturalesa heretable i sistèmica de silenciament en *C. elegans* comparat amb l'aparent autonomia i falta d'heretabilitat observada en *Drosophila* i mamífers [222]. A més, en plantes i *C.elegans* s'ha observat un procés d'amplificació del senyal exercit per RNA polimerases dependents de RNA (RdRPs) que sintetitzen nous dsRNA a partir de siRNA (Figura 20). En plantes aquest fenomen s'ha anomenat “*transitive RNAi*”. Aquest mecanisme no ha estat trobat ni a *Drosophila* ni en mamífers.

1.7.2.4. RNAi en mamífers

Amb la finalitat d'estudiar la funció gènica en mamífers, la introducció de RNA de cadena doble amb una longitud de més de 30 bp, causa una resposta antiviral molt potent o resposta interferó (IFN). Aquesta resposta dona lloc a l'activació d'una proteïna quinasa-activada per dsRNA (PKR), la qual fosforila EIF-2 α induint una inhibició generalitzada no específica de la traducció [223] (Figura 21). A més, els dsRNA poden activar el sistema 2'-5'oligoadenilat polimerasa/RNasa L, i reprimir I κ B, induint la mort cel·lular per apoptosi. En canvi, l'ús de RNAs sintètics més petits (20-25 bp) evita l'activació de la resposta antiviral mediada pel sistema IFN. S'ha demostrat que aquests siRNAs més petits sintetitzats químicament introduïts per transfecció en una àmplia varietat de línies cel·lulars de mamífer, poden induir silenciament gènec específic sense causar apoptosi [224]. Aquest fet també va ser observat *in vitro* en extractes d'embrions de *Drosophila*.

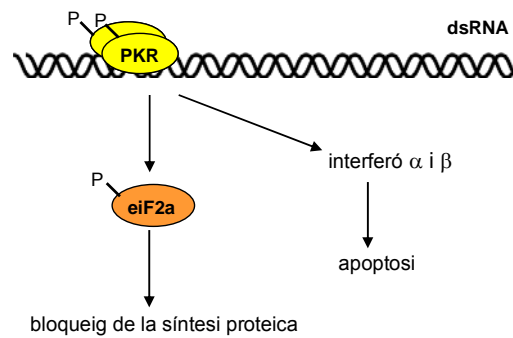


Figura 21. Mecanisme de resposta interferó induït per dsRNA.

Els siRNAs dúplex descrits més potents tenen 21 nt, 19 pb dels quals són complementaris en seqüència al mRNA i amb extrems cohesius 3'-d(TT) o (UU) [216]. Aquests siRNAs poden ser sintetitzats per transcripció *in vitro* a partir de la T7 RNA polimerasa o poden ser sintetitzats químicament. Hi ha estudis que demostren que els siRNAs sintetitzats *in vitro* i els provinents de síntesi química presenten una eficàcia comparable [225]. Aquests siRNAs també poden ser generats a partir de dsRNAs més llargs per digestió *in vitro* amb l'enzim Exonucleasa III d'*E.coli* [226]. El processament enzimàtic d'aquests dsRNAs més llargs en siRNAs permet generar una àmplia varietat de subfragments capaços d'interaccionar amb múltiples llocs dins la seqüència del mRNA diana, incrementant així la probabilitat d'èxit de la inhibició.

1.7.2.5. RNAi estable

La introducció de siRNAs de 21 pb dins la cèl·lula de forma exògena [224] ha permès l'aplicació de la tecnologia de RNAi en mamífers. Tanmateix, els assaigs utilitzant aquesta metodologia tenen un efecte transitori i el fenotip silenciats es perd durant les posteriors divisions cel·lulars, probablement a causa de la dilució del siRNA. Per a dirigir la síntesi intracel·lular del siRNA i assolir una expressió estable a llarg termini, s'ha desenvolupat un sistema mitjançant el disseny de vectors d'expressió en mamífers. Aquests siRNAs poden ser expressats de manera endògena a partir del promotor de la RNA polimerasa II o III. Per a la síntesi de siRNA amb una estructura òptima s'han utilitzat promotors de la RNA polimerasa III, que presenten un senyal d'inici de la transcripció ben definit i un senyal de terminació que consisteix en 5 residus consecutius de timidina en el qual el tall del transcrit de RNA té lloc després del segon residu d'uridina [227]. S'han fet servir principalment els promotors HI [228] i U6 [229] de la RNA polimerasa III. En casos en que l'eficiència de transfecció és baixa, en lloc de vectors plasmídics es poden utilitzar vectors vírics per expressar aquests shRNAs. L'ús d'aquests vectors vírics ha mostrat una eficient síntesi de siRNA en diferents

cèl·lules i teixits *in vivo* [230].

La transcripció *in vivo* d'aquests siRNAs dona lloc a una estructura de *hairpin* anomenada shRNA (*short hairpin* (sh)RNA), en la qual hi ha 19 nt amb aparellament de seqüència perfecte connectats per diverses regions separadores i extrems amb 2 nt 3' cohesius [228]. El mecanisme de RNAi és específic de seqüència, petites modificacions en aquesta estructura poden afectar la seva activitat en el silenciament gènic, per tant el disseny d'aquesta estructura és força crític [229]. S'ha descrit l'expressió de shRNA *in vivo* mitjançant vectors vírics retrovirals i adenovirals. Tanmateix, les limitacions d'aquests vectors són la incapacitat d'infectar cèl·lules quiescents i l'expressió gènica transitòria, respectivament. Per vèncer aquests obstacles, s'han utilitzat vectors lentivirals, els quals són capaços de transduir cèl·lules quiescents i en divisió i es poden aplicar a una àmplia varietat de dianes cel·lulars, tant *ex vivo* (ex: neurones i cèl·lules mare hematopoiètiques), com *in vivo* [231]. Aquests vectors lentivirals són capaços d'integrar el seu material genètic en el genoma de la cèl·lula hoste, causant una expressió gènica estable i heretable. Els vectors lentivirals es poden produir a títols elevats i permeten assolir un alt nivell d'expressió transgènica en les cèl·lules diana. Un cop dins la cèl·lula, els shRNAs són processats per l'enzim Dicer donant lloc a siRNAs funcionals que causen el silenciament específic de l'expressió del mRNA diana activant els elements de la maquinària de RNAi [228]. Aquests vectors de RNAi inclouen marcadors que permeten la selecció de les cèl·lules transfectades i també poden incloure elements induïbles, permetent regular l'expressió del siRNA en determinades condicions.

1.7.2.6. Aplicacions terapèutiques de siRNA

Existeix un entusiasme creixent envers al potencial desenvolupament d'un nou i potent tipus de teràpia basada en siRNA contra un ampli ventall de malalties incloent infeccions víriques, malalties neurodegeneratives, xoc sèptic, degeneració macular i càncer [232]. Resultats recents en cèl·lules en cultiu i models animals suggereixen que aquesta aplicació tindria un gran potencial en el tractament de les infeccions víriques, expressant siRNAs dirigits contra components específics del virus. La inhibició de la replicació vírica per RNAi ha estat demostrada *in vitro* per una àmplia varietat de virus de RNA com el VIH, virus d'influenza, hepatitis C, delta d'hepatitis, rotavirus, virus respiratori sincicial, poliovirus, *West Nile Virus* (WNV), *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) i virus de Dengue, així com altres virus de DNA com papilomavirus humà, l'hepatitis B i virus de l'Herpes simplex [233]. Actualment, s'estan realitzant estudis en models de ratolí que demostren el potencial de la tecnologia de RNAi per la modulació *in vivo* de diverses malalties, fent servir tant siRNAs

com shRNA codificats per vectors vírics (Taula 8).

Teixit	Malaltia	Diana	Fórmula RNAi	Ruta d'administració
Fetge	Hepatitis B	HBsAg	siRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
		Gens virals	shRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
		Gens virals	siRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
		Gens virals	siRNA-lípid	Intravenosa
	Hepatitis C	Gens virals	shRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
		Gens virals	siRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
	Hepatitis autoimmune	Fas	siRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)
Hipercolesterolèmia	apoB	siRNA-colesterol	Intravenosa	
Pulmó	Influenza	Gens virals	siRNA-PEI	Intravenosa
		Gens virals	shRNA	Intranasal+ Intravenosa
		Gens virals	siRNA+siRNA-lípid	Hidrodinàmic (intravenosa) +Intranasal
	Virus respiratori sincicial	Gens virals	siRNA+o-lípid	Intranasal
		NS1	shRNA	Intranasal
CNS	Atàxia spinocerebelar-1	Ataxin-1	shRNA adenoassociat	Intracerebral
	Dolor neuropàtic	Canal cations	siRNA	Intratecal
Ull	Neovascularització	VEGF	siRNA	Intraocular
		VEGF	siRNA	Intravitreal
Ronyó	Necrosi tubular aguda	Fas	siRNA	Vena renal o hidrodinàmic
Tumors	Tumor de cèls. germinals	FGF-4	siRNA-atelocòl·lagen	Intratumoral
	Glioblastoma	MMP9 +catepsina B	shRNA	Intratumoral
	Carcinoma de pulmó	Skp-2	shRNA	Intratumoral
	Carcinoma pàncreas	CEACAM6	siRNA	Hidrodinàmic (intravenosa)

Taula 8. Estudis de RNAi en models de ratolí. Modificat de [196].

Molts grups s'han centrat en desenvolupar una teràpia basada en oligonucleòtids antisentit per tractar desordres relacionats amb la visió. L'única droga AS aprovada fins al moment per la FDA (*Food and Drug Administration*) és el Fomiversen (Vitravene) de *ISIS Pharmaceuticals* contra la retinitis causada per citomegalovirus (CMV) (<http://www.isispharm.com>), i administrada per injecció intravitreal. També s'han fet estudis amb siRNAs dirigits contra la via de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) a l'ull. Aquests siRNAs han demostrat ser actius en models de neovascularització coroidal en ratolí i en primats no humans [234, 235]. Actualment ja hi ha candidats basats en drogues de siRNA que han entrat en estudis clínics de Fase I. *Acuity Pharmaceuticals* ha estat la primera en entrar en assaigs de Fase I amb un siRNA anti-VEGFC anomenat Cand5 per a la degeneració

macular relacionada amb l'edat. Aquests estudis han estat completats amb resultats positius (<http://www.acuitypharma.com>) i ara han començat a reclutar pacients per als estudis de Fase II. *Sirna Therapeutics* també ha començat uns estudis clínics de Fase I que actualment estan a punt de concloure amb èxit amb un siRNA químicament modificat siRNA-027 dirigit també contra VEGF (<http://www.sirna.com>).

El sistema respiratori és un altre exemple d'un context en el qual la tecnologia RNAi s'ha mostrat prometedora. Diferents grups han demostrat que l'ús de siRNA, ja sigui administrat per injecció intravenosa o intranasalment, podia tractar eficaçment el virus influença i el virus respiratori sincicial [236, 237]. Alnylam ha desenvolupat un candidat a medicament basat en siRNA contra el virus respiratori sincicial que va iniciar els assaigs clínics de Fase I a l'octubre de 2006 (<http://www.alnylam.com>).

Donat que la majoria de teixits i òrgans diana no són accessibles a l'administració local d'una potencial teràpia amb siRNA, i que sovint es requereix la inhibició de l'expressió gènica en múltiples teixits, l'objectiu principal del desenvolupament de medicaments basats en siRNA és una ruta d'administració sistèmica. Un exemple d'administració sistèmica de siRNA amb èxit és un estudi de *Alnylam Pharmaceuticals* en ratolins [238]. En aquest estudi el siRNA està dirigit contra el mRNA que codifica per l'apolipoproteïna B (apoB), una proteïna implicada en el metabolisme del colesterol. Nivells elevats d'aquesta apolipoproteïna s'associen a un major risc de patir malaltia coronària. La injecció intravenosa d'aquests siRNAs estabilitzats químicament mitjançant la seva unió a un grup colesterol, causa una reducció eficient dels nivells de mRNA de apoB i una disminució dels nivells de colesterol en sang fins a assolir nivells comparables als observats en ratolins *knockout* per apoB.

Un altre exemple d'administració sistèmica, és un estudi per *Sirna Therapeutics* [239] on es va examinar l'eficàcia de siRNAs modificats químicament dirigits contra el virus de l'hepatitis B en un model de la replicació de HBV en ratolí. Aquests siRNAs administrats per injecció intravenosa reduïen eficientment els nivells de DNA de HBV en sèrum dels animals tractats.

1.8. Microarrays

Els microarrays, també coneguts com a bioxips o xips de DNA, van ser descrits per primera vegada com a una matriu bidimensional ordenada d'elements microscòpics fixats en una superfície a la qual s'hi poden hibridar de manera específica gens o els seus productes gènics [240].

En l'actualitat existeixen diferents mètodes per a detectar i quantificar els nivells d'expressió gènica, com la tècnica de Northern Blot, *S1 protection assay*, *differential display*, seqüenciació de llibreries de cDNA, *serial analysis of gene expression* (SAGE), PCR a temps real, etc. L'avantatge dels microarrays en comparació amb aquestes altres metodologies, és que permeten analitzar l'expressió de milers de gens en paral·lel de forma relativament ràpida i econòmica.

1.8.1. Aplicacions dels microarrays en investigació bàsica i clínica

Entre les potencials aplicacions dels microarrays en investigació es troben l'estudi de l'expressió gènica, el descobriment de nous gens i la predicció de la seva funció, l'estudi de rutes metabòliques i vies de senyalització, la detecció de mutacions i polimorfismes dins la seqüència de DNA, i el descobriment de nous fàrmacs i la validació de dianes terapèutiques.

1.8.1.1. Expressió gènica i descobriment de nous gens

Els xips de DNA s'han utilitzat per estudiar l'expressió gènica en una àmplia varietat d'organismes, incloent llevat, plantes i humans [241-243]. Els experiments de microarrays generen perfils d'expressió gènica que reflecteixen l'estat transcripcional de milers de gens en resposta a un estat cel·lular o a un estímul farmacològic. El perfil d'expressió representa el subconjunt de productes transcripcionals de gens o mRNAs expressats en una determinada cèl·lula o teixit.

L'objectiu típic dels experiments de microarrays és la identificació de nous gens implicats en una determinada via, o el diagnòstic i identificació de marcadors d'expressió pronòstic que caracteritzen un estat de malaltia. La utilització dels microarrays permet el cribatge del genoma sencer en un únic assaig sense la necessitat d'identificar quins són els gens potencialment importants *a priori*. En aquest sentit es pot considerar que els experiments de microarrays són generadors d'hipòtesis més que no pas dirigits per hipòtesis (*hypothesis generating rather than hypothesis driven*).

Com a regla general, un 25-30% dels gens presents en el genoma humà s'expressen en

un determinat teixit i l'expressió d'un 10% d'aquests gens canvia en resposta a un determinat estímul. Els perfils d'expressió generats mitjançant els experiments de microarrays poden servir per identificar gens candidats per a posteriors estudis. Els experiments de microarrays poden generar dos tipus de dades: en estàtic o en dinàmic. Les dades estàtiques són dades que comparen dues mostres independents, p. ex, el teixit d'un pacient malalt contra un teixit normal. Les dades dinàmiques en canvi, s'obtenen per a una determinada mostra de manera temporal, per exemple, la progressió de la malaltia al llarg del temps. La distinció és important ja que el disseny experimental i els mètodes estadístics utilitzats posteriorment difereixen per a cada tipus d'experiment.

Pel que fa als estudis d'expressió gènica, s'ha demostrat la utilitat de portar a terme una aproximació global fent servir els microarrays i els perfils d'expressió gènica. Utilitzant microarrays s'han identificat els gens que s'expressen preferentment en certs estats de malaltia inflamatoris, com la malaltia inflamatòria d'intestí i l'artritis reumatoide [244]. A més d'identificar gens coneguts, l'ús de microarrays ha permès identificar nous gens que s'expressen en aquestes condicions inflamatòries. Sovint s'ha trobat que gens que se sabia que eren importants en un determinat context, també estaven implicats en un altre procés no relacionat que estava essent objecte d'estudi en els microarrays. Per exemple, s'han utilitzat els perfils d'expressió per identificar gens importants en tumorigènesi i identificar nous gens en l'esclerosi múltiple, la malaltia d'Alzheimer, l'hepatitis vírica [245-249], etc.

1.8.1.2. Predicció de funció gènica

Els experiments de microarrays poden descriure o revelar patrons d'expressió gènica, que poden ser utilitzats per predir la funció de gens. Això s'assoleix agrupant gens a conjunts de gens amb perfils d'expressió similars produïts sobre experiments múltiples. Aquesta agrupació es pot realitzar per inspecció visual de les dades o utilitzant mètodes estadístics. S'espera que gens que mostren patrons d'expressió similars estiguin relacionats funcionalment, per exemple, gens que intervenen en una mateixa ruta metabòlica s'haurien de coregular sota les mateixes condicions experimentals. L'expressió gènica diferencial es va utilitzar en un estudi per examinar la resposta temporal que sofria el llevat en el canvi de metabolisme anaeròbic a metabolisme aeròbic, conegut com el canvi diàuxic [241]. Amb l'ajut d'algoritmes de *clustering*, es van identificar diferents patrons temporals d'expressió gènica i els gens s'agrupaven en base a la similitud dels seus perfils d'expressió. En aquest estudi, l'anàlisi temporal mostrava patrons d'expressió en els quals es descobria que famílies de gens amb funcions similars es coregulaven. Així, els perfils d'expressió generats per

microarrays poden mostrar famílies de gens coregulats que comparteixen una mateixa funció.

L'any 2000 es va crear una base de dades de referència amb els perfils d'expressió en cèl·lules de llevat que corresponien a mutacions genètiques diverses i tractaments de drogues [250]. Aquests estudis mostraven que mutants o tractaments que afectaven processos cel·lulars similars presentaven perfils d'expressió similars. A més, es podien identificar funcions cel·lulars de gens desconeguts comparant en la base de dades el perfil d'expressió de la corresponent supressió mutant amb perfils de mutants coneguts que produïen patrons similars. La força d'aquesta aproximació en la descoberta funcional és que depèn només del reconeixement de formes dels perfils d'expressió en la base de dades i no és necessari saber en quina ruta metabòlica està implicat un gen, la presència d'elements reguladors, ni tan sols la seqüència completa del gen d'interès.

1.8.1.3. Connectant rutes metabòliques

Més enllà d'estudiar els nivells d'expressió de gens individuals sota diverses condicions, els patrons d'expressió de mRNA que es descriuen en els microarrays es poden utilitzar per estudiar enllaços entre diverses rutes o vies metabòliques, la seqüència de senyalització dins d'una via, i per trobar gens amb mecanismes reguladors comuns. En un estudi d'expressió gènica diferencial en cèl·lules de llevat, el fet que es conegués la seqüència completa del genoma de llevat, va permetre examinar la regió promotora dels gens coregulats dins un mateix *cluster* i identificar seqüències comunes reguladores de transcripció [241]. En un altre estudi utilitzant eines informàtiques més sofisticades, es van identificar diferents motius reguladors responsables d'una expressió gènica coordinada dins les regions promotores dels gens de llevat [251].

Per tant, aquests perfils d'expressió es poden utilitzar per pronosticar elements reguladors i així obviar la necessitat d'altres mètodes convencionals per a l'estudi de seqüències reguladores com la mutagènesi dirigida [252]. En una cèl·lula eucariota l'estudi d'aquest entramat de xarxes i vies de senyalització és considerablement més complex. No obstant això, l'anàlisi temporal dels perfils d'expressió gènica és una eina valuosa, que pot suggerir l'estructura de vies i rutes metabòliques en una cèl·lula. Aquests patrons temporals poden donar informació sobre la regulació coordinada de gens implicats en un mateix procés cel·lular. La regulació coordinada de gens que intervenen en diferents etapes d'un procés cel·lular comú permet esbrinar rutes o vies de senyalització cel·lulars complexes. Aquesta aproximació va ser utilitzada per estudiar la resposta temporal de fibroblasts exposats a sèrum [243]. En aquest estudi es va trobar que els gens que estaven implicats en un mateix procés ja

sigui cicle cel·lular i proliferació, inflamació, angiogènesi, remodelació de teixit, i reorganització de citoesquelet, mostraven un patró d'expressió similar entre ells i diferent del patró d'expressió dels gens implicats en un procés diferent.

1.8.2. Microarrays i cèl·lules endotelials

La tecnologia de microarrays permet analitzar a gran escala i de forma simultània patrons d'expressió de seqüències de entre 20.000-40.000 gens. Darrerament, s'ha incrementat l'ús de microarrays de DNA per entendre els patrons gènics i les vies reguladores implicades en la resposta endotelial a diferents estímuls. A continuació es resumeixen diferents estudis de microarrays que s'han realitzat per caracteritzar perfils d'expressió gènica en cèl·lules endotelials en resposta a inducció per diferents factors.

-L'anàlisi d'expressió gènica mitjançant microarrays ha permès ampliar la comprensió del paper de les cèl·lules endotelials implicades en **inflamació i respostes immunitàries**. Les cèl·lules endotelials responen a determinats estímuls inflamatoris de diferent manera mitjançant canvis o alteracions gèniques complexes que determinen el tipus de resposta immune que desencadenarà el procés inflamatori.

El TNF i el LPS bacterià són dos potents mediadors inflamatoris que indueixen l'expressió d'un gran nombre de gens en les cèl·lules endotelials. Un dels primers estudis que van utilitzar la tecnologia dels microarrays investigava els efectes del LPS en HUVECs [253]. Aquest estudi demostrava no només la viabilitat de l'anàlisi de microarrays en cèl·lules endotelials, sinó que identificava gens l'expressió dels quals era induïble per LPS. A més d'uns quants gens diana del factor de transcripció NFκB coneguts, es va trobar una sèrie de gens desconeguts l'expressió dels quals no havia estat implicada prèviament en la cèl·lula endotelial en resposta a LPS. No obstant això, s'havia despertat un enorme interès en la utilitat de la tecnologia de microarrays per l'estudi de la cèl·lula endotelial i la possibilitat d'identificar nous gens proinflamatoris. Molts investigadors han establert perfils d'expressió gènica en cèl·lules endotelials estimulades amb TNF [254-257]. Sorprenentment, tot i que en aquests estudis es van utilitzar cèl·lules i estímuls similars, els resultats eren considerablement diferents i només es solapaven parcialment. Aquesta variabilitat indica la necessitat d'una avaluació estadística i certs criteris de qualitat i estandardització en els experiments de microarrays. Són necessaris un nombre suficient d'experiments independents i rèpliques tècniques, i un anàlisi estadístic prudent. Aquests factors serien essencials per assegurar una bona qualitat de les dades de microarrays obtingudes en experiments independents.

Posteriorment, diferents grups han comparat el perfil d'expressió de cèl·lules endotelials

en resposta a TNF amb els efectes d'altres mediadors inflamatoris. Generalment, s'ha trobat una bona correlació entre els perfils d'expressió gènica induïda per LPS, i l'expressió gènica regulada en resposta a C5a [258] i IL-1 β [259].

-Una altra àrea extensament estudiada mitjançant l'anàlisi de microarrays, és la **resposta endotelial per *shear stress*** (estrès mecànic induït per deformació), que s'ha descrit que seria un dels principals desencadenants de l'aterosclerosi. Un primer estudi mostrava gens l'expressió dels quals era induïda o reprimida en resposta a *shear stress*, entre ells uns quants gens que codifiquen per a citokines proinflamatòries [260]. Molts dels gens identificats en resposta a *shear stress* s'havien implicat prèviament en la producció de NO, el qual també s'indueix en resposta a *shear stress* i està implicat en la regulació del to vascular. Un estudi posterior i estadísticament més significatiu, analitzava la cinètica de perfils d'expressió a diferents temps en HUVECs exposades a un flux laminar o turbulent [261]. Amb aquest estudi es confirmava una inducció de gens implicats en la defensa antioxidant i una repressió de gens implicats en la síntesi de DNA i control de cicle cel·lular. Es va veure que el flux turbulent afectava l'expressió de gens amb un paper en remodelació vascular, incloent gens que codificaven per activadors del plasminogen i el seu inhibidor, endotelina-1, TGF- β , col·lagen tipus IV, i efrina A1.

-Per a l'estudi de les **vies reguladores induïdes per nicotina** mitjançant microarrays, es van determinar alteracions del perfil d'expressió gènica en cèl·lules endotelials d'artèria coronària humana [262]. L'hàbit de fumar provoca una disfunció endotelial vascular i és un factor de risc essencial per a malalties cardiovasculars. La nicotina, un component essencial de fum dels cigarrets, s'ha descrit que pot canviar l'expressió gènica de les cèl·lules endotelials, però es desconeixen les vies reguladores implicades. Els autors van identificar la quinasa PI-3K i la quinasa de DAG, reguladors de la via del fosfolípid PI-3 i els factors de transcripció *cAMP response element-binding protein* (CREB) i NF κ B, com a mediadors principals de senyal induïts per nicotina. Aquestes dades podrien ser importants per entendre els mecanismes subjacents de l'efecte patofisiològic de la nicotina, especialment sobre la funció endotelial i l'aterosclerosi.

-Un altre estudi es van utilitzar microarrays de cDNA per al cribatge i identificació de nous gens induïts en **resposta a trombina** en HUVECs. La trombina desencadena gran part de les seves respostes cel·lulars a través de l'activació de receptors transmembrana associats a proteïna G, anomenats PARs (*protease-activated receptors*). La senyalització provocada per trombina en la cèl·lula endotelial ocasiona un cert nombre de canvis fenotípics, molts dels

quals són resultat de la inducció de proteïnes sintetitzades *de novo*. Entre els gens més fortament induïts en resposta a trombina, l'anàlisi de microarrays identificava CL-100, una fosfatasa d'especificitat doble, també coneguda com a quinasa de MAP phosphatase-1 (MKP-1) [263]. L'anàlisi funcional suggeria que aquesta fosfatasa i la seva subsegüent regulació d'activitat d'Erk juguen un paper clau en la regulació de via de senyalització de trombina i la regulació transcripcional de gens d'activació de cèl·lula endotelial.

-En un altre estudi utilitzant microarrays es van analitzar gens regulats en **resposta a IL-1** en HUVECs durant cinc temps d'estimulació independents, la qual cosa va permetre establir una cinètica de perfils d'expressió [264]. Entre els gens regulats es van identificar una sèrie de factors de transcripció, els quals van ser agrupats segons els seus perfils d'expressió mitjançant un anàlisi de *clustering*. Per identificar llocs d'unió a nous factors de transcripció, s'extreia de les bases de dades la regió promotora gènica corresponent i s'analitzava per determinar la presència d'elements reguladors sobrerrepresentats en *clusters* específics. Així, els autors van poder identificar nous llocs d'unió a DNA implicats en l'activació de cèl·lules endotelials induïda per IL-1. Aquesta aproximació demostrava la viabilitat d'utilitzar bases de dades públiques i eines bioinformàtiques per descobrir nous mecanismes reguladors.