

Tesi Doctoral

Effects of mechanical stimuli of vibration and stretch on airway epithelial cells

Memòria presentada per

Ferranda Puig i Cotado

per optar al grau de Doctor

Treball dirigit pel Dr. Ramon Farré i Ventura
a la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria
del departament de Ciències Fisiològiques I,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Efectes dels estímuls mecànics de vibració i deformació en cèl·lules epitelials pulmonars

M.Ferranda Puig i Cotado, Unitat de Biofísica i Bioenginyeria.

I.1 Introducció de la tesi

Les cèl·lules estan exposades a diferents estímuls mecànics al llarg de la seva vida. Actualment s'accepta que les forces mecàniques juguen un paper important en funcions crítiques cel·lulars com ara la proliferació, diferenciació, mobilitat cel·lular, apoptosi, síntesi de proteïnes i DNA i expressió gènica, entre d'altres. Les cèl·lules pulmonars estan exposades a forces mecàniques derivades de la respiració, flux sanguini i tensió superficial. En concret, les cèl·lules epitelials que envolten les vies aèries estan exposades a forces de tensió i compressió durant el cicle respiratori (16). Per altra banda, forces anormals exercides sobre teixits pulmonars contribueixen a moltes situacions patològiques (8). Així, per exemple, la deformació mecànica induïx la proliferació de cèl·lules epitelials alveolars (3), jugant un paper important en el manteniment de la integritat de l'epiteli especialment durant processos de reparació després de dany pulmonar. Durant l'aplicació de diferents estratègies de ventilació mecànica, tractament bàsic en els pacients amb dany pulmonar agut (ALI) i la seva forma més severa, el síndrome d'afecció respiratòria aguda (ARDS), s'ha observat un augment en la producció de mediadors inflamatoris com la trombina (14) i el trencament de la barrera alveolocapil·lar (15) que contribueix en el dany pulmonar induït pel ventilador i en la formació d'edema pulmonar. Un altre exemple de forces mecàniques exercides sobre el teixit respiratori, i en concret en la via aèria superior, és l'induït pel ronc, el qual té lloc quan el teixit de la via aèria superior es relaxa i comença a vibrar (1). Aquesta

situació és experimentada típicament per pacients que pateixen apnea/hipoapnea o el síndrome de resistència en la via aèria superior (6). Actualment hi ha evidències fisiològiques i histològiques, i estudis moleculars que exhibeixen inflamació en pacients amb trastorns respiratoris de la son (2).

En aquesta tesi s'ha estudiat el paper de diferents estímuls mecànics en dues condicions patològiques. En un cas s'ha estudiat com la vibració pot induir una resposta inflamatòria en cèl·lules epitelials bronquials a través de la sobreexpressió de la citoquina IL-8. Més concretament, s'ha dissenyat un novedós model experimental que ens permet tastar si l'aplicació d'un estímulo mecànic vibratori amb una freqüència i amplitud similars a les sofertes pels teixits de la via aèria superior quan es ronca és capaç d'induir una resposta inflamatòria a nivell cel·lular. L'estudi s'ha focalitzat en avaluar si la vibració dispara una resposta inflamatòria caracteritzada per la sobreexpressió d'interleucina 8 (IL-8) a través de les vies de senyalització de la proteïna kinasa activada per mitògen (MAPK), tal com suggereix quan les cèl·lules estan subjectes a una deformació del substrat (9). L'altre estudi s'ha centrat en estudiar com un estímulo mecànic de deformació o estirament juntament amb un mediador inflamatori, en aquest cas la trombina, poden alterar les propietats mecàniques de les cèl·lules epitelials i contribuir al trencament de la barrera alveolocapil·lar agreujant la formació d'edema pulmonar.

I.2 Objectiu general de la tesi

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat estudiar el paper de diferents estímuls mecànics per diferents condicions patològiques. En concret;

- Estudiar com un estímulo vibratori pot induir una resposta inflamatòria en cèl·lules epitelials bronquials a través de la sobreexpressió de la citoquina IL-8.
- Estudiar com un estímulo mecànic de deformació o estirament juntament amb un mediador inflamatori, en aquest cas la trombina, poden alterar les propietats mecàniques de les cèl·lules i contribuir en el trencament de la barrera alveolocapil·lar agreujant la formació d'edema pulmonar.

I.3 L'estímul vibratori augmenta l'alliberament d'interleuquina-8 en un model cel·lular del ronc

I.3.1 Introducció

El ronc és una vibració de la via aèria superior associada a la son que pot aparèixer tant en adults com en nens. Té lloc quan el teixit tou de la via aèria superior es relaxa i vibra (1) i és símptoma característic en pacients amb apnea/hipoapnea o el síndrome de resistència en la via aèria superior (6). S'ha vist que el ronc també pot estar associat amb la inflamació bronquial (11). De fet ja hi ha dades que relacionen el ronc amb l'asma (5). Dades recents indiquen que mesures directes de marcadors inflamatoris suggereixen que en pacients amb apnea de la son, la inflamació també està present en els bronquis. Tot i que els mecanismes que determinen el dany en els trastorns respiratoris de la son no han estat aclarits, s'ha suggerit que l'estímul mecànic de vibració podria jugar un paper important en el dany del teixit aeri (6,10) i en la progressió de l'apnea de la son severa. Aquesta falta d'informació podria ser deguda en part al fet que els sistemes experimentals que apliquen estímuls mecànics a cèl·lules estan dissenyats per simular l'estirament, la compressió o les forces de tall, però no la vibració.

I.3.2 Objectiu

Implementar un sistema experimental que permeti aplicar a un cultiu de cèl·lules epitelials bronquials humanes un estímul vibratori controlat i estudiar si la vibració és capaç d'induir un una resposta inflamatòria a través de la sobreexpressió d'IL-8.

I.3.3 Mètodes

Cultiu cel·lular: Es van cultivar cèl·lules epitelials bronquials humanes de la línia cel·lular BEAS-2B (CRL-9609, ATCC, Manassas, Virg, US) en medi RPMI 1640 suplementat.

El dia abans de l'experiment, es van plantar les cèl·lules en plaques de Petri (diàmetre de 35 mm) prèviament col·lagenades amb col·lagen tipus-I de cua de rata (10 µg/ml). A l'inici de l'experiment, la tapa de cada placa de Petri va ser embolcallada fortament amb Parafilm M.

Es van fer dos petits forats d'1 mm de diàmetre cada un en la tapa de la placa permetent l'intercanvi de gasos entre el medi de cultiu i l'atmosfera.

Sistema experimental: Per poder aplicar l'estímul vibratori a les cèl·lules es va utilitzar un altaveu excitat per un senyal sinusoidal i un amplificador de força. Es va encolar al con de l'altaveu una superfície de Plexiglas rígida (24 cm de diàmetre) per poder adherir fortament 15 plaques de cultiu cel·lular.

L'amplitud de l'amplificador de potència de l'altaveu es va deixar per tal d'obtenir una amplitud de vibració de ± 0.3 mm a 60 Hz. (7).

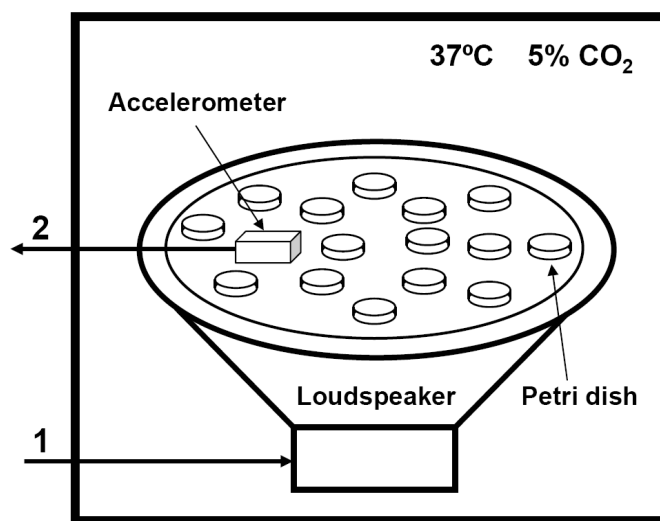


Diagrama del sistema utilitzat per aplicar un estímul oscil·latori vertical a cèl·lules en cultiu. Les plaques de Petri amb les cèl·lules plantades van estar subjectades a la plataforma, la qual estava enganxada al con de l'altaveu. Un acceleròmetre va permetre mesurar l'amplitud de vibració en tot moment. Els cables flexibles van connectar l'altaveu amb l'amplificador (1) i l'acceleròmetre al seu circuit (2). Aquest sistema va ser col·locat dins d'una cambra convencional de cultius.

El sistema experimental va ser col·locat en un incubador a 37°C i 5% CO₂. Altres plaques de Petri van ser utilitzades com a control, o sigui, no subjectes a cap estímul vibratori van ser col·locades en un incubador similar.

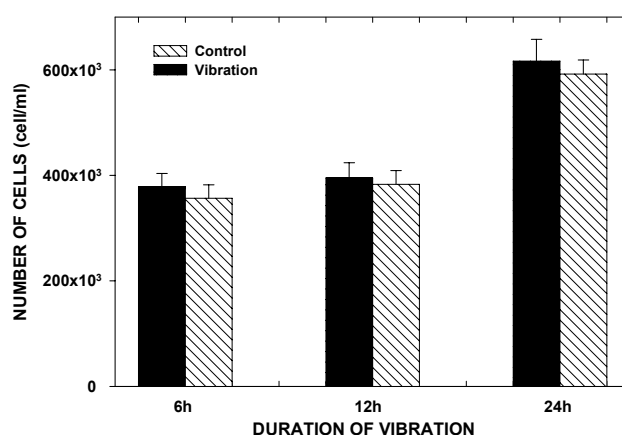
Estudis experimentals: Amb aquest sistema experimental i aquest cultiu cel·lular es va estudiar els efectes de la vibració en la proliferació cel·lular i l'alliberament de la citoquina proinflamatòria IL-8 a 60 Hz i a ± 0.3 mm en cèl·lules que van estar vibrant durant 6, 12 i 24 hores.

També es va estudiar quin era el paper de les MAP kinases en l'alliberament de l'IL-8

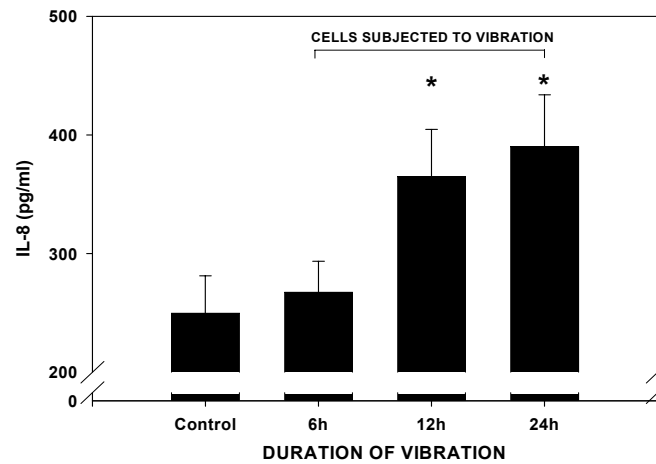
induïda per la vibració. En aquest cas les cèl·lules van estar vibrant durant 12 hores a 60 Hz, ± 0.3 mm i es van tractar amb diferents inhibidors. Un grup no va ser tractat i es va utilitzar com a control. Un altre grup es va tractar amb un inhibidor no específic de la tirosina quinasa, la genisteïna. Els altres tres inhibidors utilitzats van ser específics per cascades principals de les MAPK, un específic per la p38 MAPK, l'altre per la MEK1/2 i l'altre per JNK MAPK.

I.3.4 Resultats

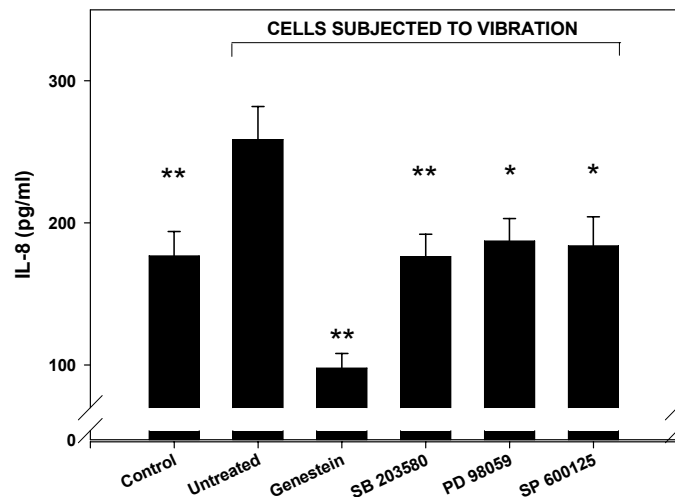
S'ha observat que l'estímul vibratori aplicat a les cèl·lules no va afectar a la proliferació cel·lular. No s'han trobat diferències significatives ($P=0.42$) entre les cèl·lules que no han estat vibrant i les que han vibrat durant 6, 12 i 24 hores, tal i com es mostra en la figura següent. Les dades estan representades amb la mitja \pm SEM.



La concentració de IL-8 en el sobrenedant recollit 40 hores després d'haver començat la vibració s'ha vist incrementat amb la duració de l'estímul oscil·latori. Després de 12h i 24h de vibració, la concentració d'IL-8 ha estat significativament superior que la del control (46% ($P=0.029$) i 56% ($P=0.013$), respectivament). Les dades estan representades amb la mitja \pm SEM. El símbol * indica diferències significatives amb el control ($P<0.05$). Les dades estan representades en la següent figura:



Les vies de senyalització MAP kinases han jugat un paper important en l'increment d'IL-8 alliberada resultant. S'ha vist que a les cèl·lules tractades amb l'inhibidor no específic de la tirosina quinasa, la genisteïna, ha reduït considerablement la concentració d'IL-8 quan es compara amb la concentració de les cèl·lules no tractades i subjectes a vibració ($P < .001$). A més a més, s'ha observat una disminució d'IL-8 en les cèl·lules tractades amb els inhibidors específics de la p38 MAPK (SB 203580) ($P = 0.008$), de la MEK1/2 (PD 98059) ($P = 0.016$), i de la JNK MAPK (SP 600125) ($P = 0.022$). Les dades estan representades a continuació i mostren la mitja \pm SEM. Els símbols * i ** indiquen diferències significatives amb les cèl·lules no tractades subjectes a l'estímul vibratori ($P < 0.05$ i $P < 0.01$, respectivament). Totes les cèl·lules van estar subjectes a la mateixa concentració final de DMSO (0.1%)



I.3.5 Discussió

S'ha desenvolupat un novedós sistema experimental que ens permet aplicar fàcilment estímuls vibratoris al cultiu cel·lular amb una freqüència, amplitud i duració ben controlada. L'aplicació de la vibració simulant el ronc en cèl·lules epitelials bronquials humanes (BEAS-2B) ha incrementat l'expressió de la citoquina proinflamatòria IL-8 alliberada en el sobrenedant, la qual es veu reduïda quan s'inhibeixen les cascades de senyalització de les MAP kinases.

Aquests resultats indiquen que la vibració en la paret cel·lular epitelial de la via aèria respiratòria podria provocar un senyal inflamatori.

Per investigar els efectes potencials en les cèl·lules epitelials de la via aèria, s'ha utilitzat una oscil·lació simple de freqüència 60 Hz. Tot i que el ronc produeix un so complex estès a les altes freqüències, l'anàlisi espectral ha mostrat que la vibració és d'amplitud alta i de baixa freqüència (50-100 Hz). Donat que les freqüències de les vibracions típiques són de l'ordre de 30 Hz i 80 Hz pel ronc bucal i nasal, respectivament, hem seleccionat una freqüència de 60 Hz per estudiar la resposta de les cèl·lules epitelials bronquials a la vibració. L'amplitud de vibració utilitzada en aquest treball (± 0.3 mm) és de l'ordre de les oscil·lacions de ronc de la via aèria superior derivades de les imatges cineradiogràfiques. Per últim, la duració de la vibració aplicada en l'estudi ha estat de diverses hores, període de temps de l'ordre d'una nit.

Encara que l'oscil·lació sinusoidal aplicada a les cèl·lules en cultiu no ha reproduït exactament el patró vibratori en pacients roncadors, aquests paràmetres principals (freqüència, amplitud i temps) imiten raonablement els trets bàsics del ronc.

Entre els diferents marcadors inflamatoris, ens hem centrat en l'IL-8 per avaluar els efectes danyins de la vibració en un cultiu cel·lular. IL-8 és una citoquina proinflamatòria que juga un paper important en la resposta patogènica degut a que és un quemoatracent i activador de neutròfils, promovent la infiltració d'aquests des dels capil·lars al teixit sotmès a una inflamació.

Per altra banda l'expressió d'IL-8 està regulada per ambdós nivells transcripcional i posttranscripcional i les principals cascades de les MAP kinases (p38, MEK1/2 and JNK) juguen un paper en l'alliberament d'IL-8 durant el procés inflamatori.

En aquest treball ens hem centrat en l'IL-8 com a biomarcador de inflamació en resposta a la vibració, donat que l'expressió d'aquesta citoquina augmenta quan les cèl·lules epitelials de la via aèria es troben sotmeses a un estímul mecànic.

I.3.6 Conclusió

S'ha mostrat que l'aplicació d'un estímul vibratori ben definit simulant el ronc en cèl·lules epitelials bronquials en cultiu, inicia una resposta proinflamatòria. Aquests resultats confirmen la hipòtesi que el ronc podria ser un factor important que contribueix a la inflamació observada en pacients amb trastorns respiratoris obstructius durant la son.

I.4 Efecte de l'estirament en la integritat estructural i la micromecànica de monocapes de cèl·lules epitelials alveolars humanes exposades a trombina

I.4.1 Introducció

El Dany pulmonar agut (ALI) i la seva forma més severa, el síndrome d'afecció respiratòria aguda (ARDS) estan caracteritzats per un procés sever inflamatori i pel trencament de la barrera epitelial alveolar. La integritat física d'aquesta monocapa cel·lular està regulada pel balanç entre les forces centrípetes tensionals i les forces centrífugues adhesives que uneixen les cèl·lules entre elles i a la matriu extracel·lular. En els pulmons, les forces de recuperació elàstica causades per l'estirament cel·lular durant una ventilació espontània o artificial contribueixen a les forces centrípetes de la cel·lula: quan més rígida és la cel·lula, més gran és la tensió que les adhesions cel·lula – cel·lula i cel·lula – matriu han de suportar durant un estirament(13). Per altra banda, en un estudi previ (14), es va mostrar que la trombina, una serina proteasa, induïa un increment dràstic en la rigidesa de les cèl·lules epitelials alveolars. Però fins ara ningú no ha mostrat quin són els efectes combinats dels dos estímuls, estirament i un mediador inflamatori, sobre un cultiu cel·lular d'epiteli alveolar.

I.4.2 Objectiu

Estudiar l'efecte combinat de l'estímul mecànic de l'estirament i de la trombina en la mecànica cel·lular i l'adhesió de les cèl·lules epitelials alveolars humanes.

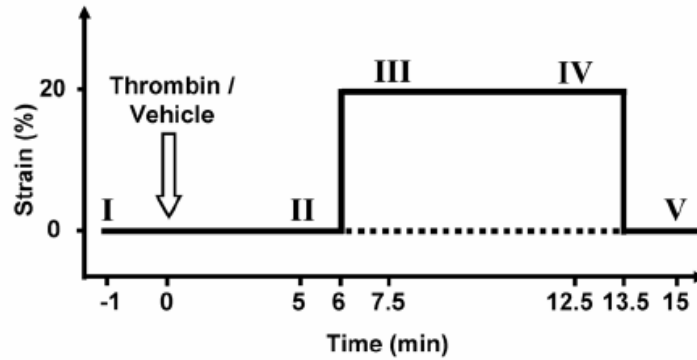
I.4.3 Mètodes

Cultiu cel·lular: Es van cultivar cèl·lules epitelials alveolars humanes de la línia cel·lular A549 (CCL-185, ATCC, Manassas, Virg, US) en medi RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví inactivat. Es van plantar les cèl·lules sobre membranes flexibles col·lagenades fins arribar a la confluència (7-14 dies després de plantar-les) i en subconfluència (2-4 dies després de plantar-les). El dia de l'experiment, 400 µg de microesferes ferromagnètiques de 4.5µm de diàmetre recobertes amb RGD sintètic es van afegir a cada membrana. Després de 20 min d'incubació, es van muntar en el sistema experimental.

Sistema experimental d'estirament: Els experiments es van realitzar amb un dispositiu d'estirament descrit anteriorment (13)

Citometria de torsió magnètica amb detecció òptica (OMTC): Les propietats mecàniques de les cèl·lules van ser mesurades amb un sistema integrat descrit anteriorment (4,12). Aquestes microesferes són magnetitzades permanentment amb un breu (20 ms) però intens (120 mT) pols magnètic en la direcció horitzontal de la monocapa cel·lular. A continuació, les microesferes van ser rotades amb un camp magnètic sinusoidal dèbil aplicat en la direcció vertical.

Estudi experimental: Els experiments es van realitzar amb monocapes de cèl·lules confluents i sub-confluents i es va seguir el protocol que es mostra en la següent figura. Les mesures de citometria es van realitzar en els punts marcats amb nombres romans, rotant les microesferes durant 15 segons amb un camp magnètic oscil·latori de 5 mT d'amplitud i 1 Hz de freqüència. Les microesferes van ser magnetitzades abans de cada mesura de citometria. L'estirament del 20% en el substrat es va realitzar als 6 minuts d'haver començat l'experiment.



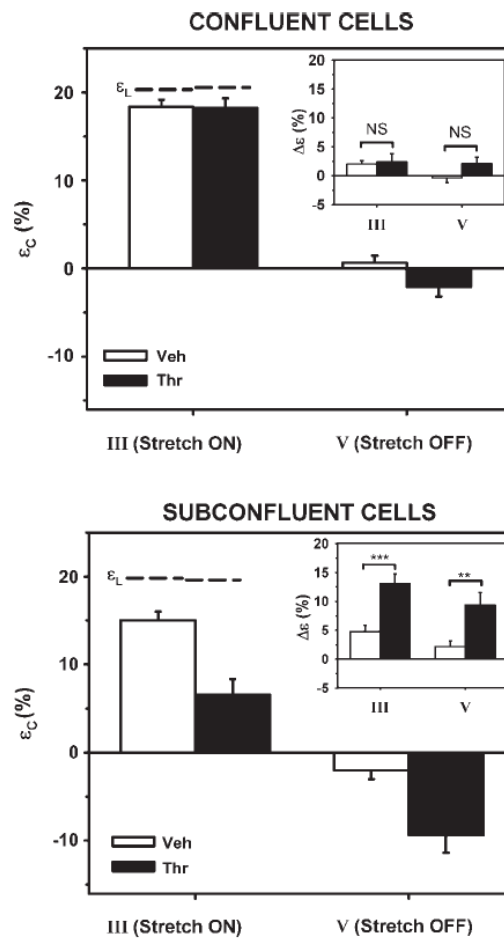
Processat de dades: La G' , G'' i la histeresivitat $\eta = G''/G'$ cel·lular van ser calculades a partir del desplaçament i de la rotació aplicada. ϵ_c , la deformació intracel·lular o deformació cel·lular, s'ha calculat a partir de les posicions de les microesferes situades en una mateixa cèl·lula. ϵ_L , la deformació intercel·lular o deformació del substrat, s'ha mesurat a partir de les posicions de les microesferes situades en cèl·lules diferents. La pèrdua de transmissió d'estirament s'ha mesurat com: $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_c$.

I.4.4 Resultats

Mesures de deformació cel·lular

En la figura, es mostra la deformació intracel·lular (ϵ_c), la deformació intercel·lular (ϵ_L), i la pèrdua de transmissió d'estirament $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_c$ en resposta a un estirament del 20% en el substrat (I) i la subseqüent relaxació (V) del mateix. $n=7$ membranes/grup. Els símbols ** i *** indiquen diferències significatives $P<0.01$, i $P<0.001$, respectivament. Quan les cèl·lules confluents són estirades (figura de dalt) ϵ_c va ser lleugerament més petita que ϵ_L , (ϵ_c (III) \leq ϵ_L (III)), trobant un petit però significatiu $\Delta\epsilon$. No es van trobar diferències significatives entre les cèl·lules tractades amb trombina o amb vehicle. Quan el substrat va ser retornat a la seva configuració inicial, els valors de ϵ_c de les cèl·lules vehicle van retornar als valors inicials (ϵ_c (V) Vehicle = ϵ_c (I) > 0), mentre que les cèl·lules tractades amb trombina van exhibir una tendència a mantenir un valor positiu de $\Delta\epsilon$. (ϵ_c (V) Thr < 0 , ϵ_c (V) Thr \neq ϵ_c (I)). Per altra banda, quan es va aplicar un estirament del 20% a monocapes de cèl·lules no confluents (figura de baix) es va trobar que ϵ_c va ser considerablement més petita que ϵ_L en ambdós casos (ϵ_c (III) $<$ ϵ_L (III)), les cèl·lules tractades amb trombina o amb vehicle, resultant un elevat $\Delta\epsilon$, el qual va ser significativament més gran en cèl·lules tractades amb trombina que en cèl·lules tractades amb vehicle. Quan el substrat va ser retornat a la seva

configuració inicial, tant les cèl·lules tractades amb trombina com les cèl·lules tractades amb vehicles van exhibir una ε_c negativa, resultant en $\Delta\varepsilon > 0$.

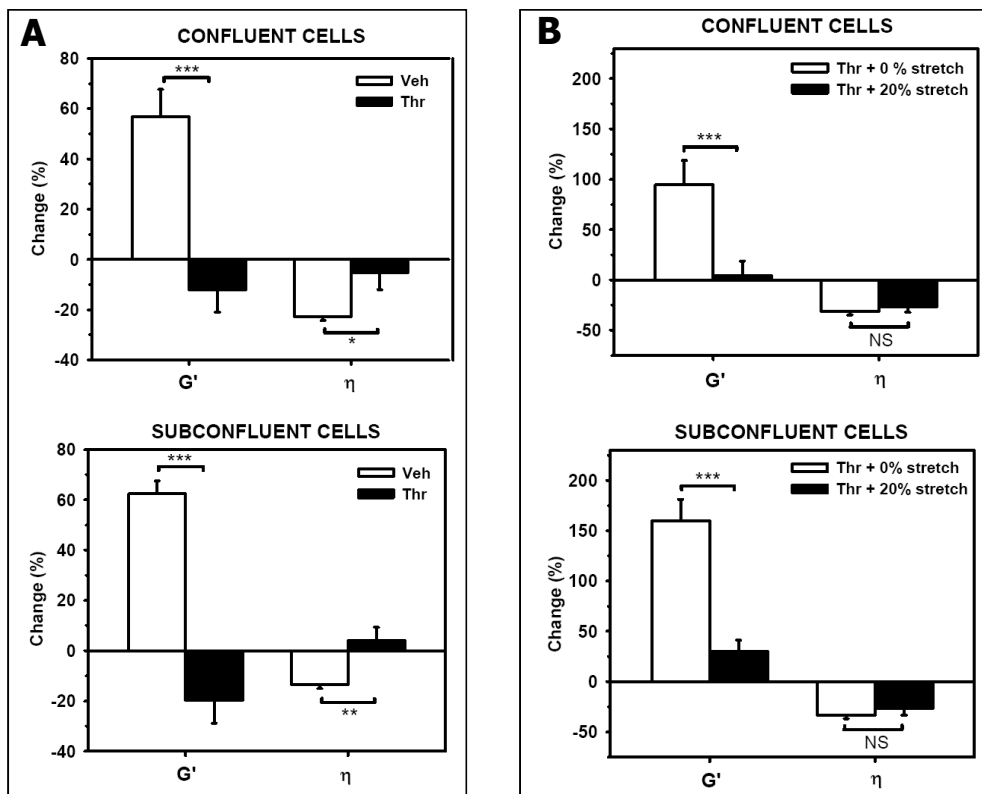


Mesures de la rigidesa i histeresivitat cel·lular

En la següent figura, les dades representen canvis relatius en G' i en η induïts per un estirament del 20%. **A:** les dades representen canvis relatius entre els punts temporals III i II de $n=7$ membranes/grup. El símbols *, ** i *** indiquen diferències significatives $P < 0.05$, $P < 0.01$, i $P < 0.001$, respectivament. **B:** les dades mostren canvis relatius entre els punts temporals V i I de $n=7$ membranes/grup, o sigui entre les dades inicials, sense estirament, (I), i després d'haver estirat el substrat i haver retornat a la seva conformació inicial (V). El símbol *** indica diferències significatives $P < 0.001$.

Els valors basals obtinguts per la rigidesa i la histeresivitat cel·lular van ser $G' = 1.20 \pm 0.06$ Pa/nm and $\eta = 0.344 \pm 0.007$ per cèl·lules confluents i $G' = 1.03 \pm 0.06$ Pa/nm and $\eta = 0.336 \pm 0.006$ per cèl·lules no confluents. La trombina va incrementar marcadament la rigidesa, G' ($192\% \pm 25\%$ en cèl·lules confluents i $263\% \pm 22\%$ en cèl·lules subconfluents) i una caiguda en la histeresivitat cel·lular η ($33\% \pm 3\%$ en cèl·lules confluents i $36\% \pm 2\%$

en cèl·lules no confluents) (Figura A). Quan el substrat va ser relaxat a la seva conformació inicial, els valors de la G' de cèl·lules tractades amb trombina va caure a valors similars als basals (Figura B), mentre que els valors de G' de les cèl·lules tractades amb trombina però que no van ser estirades van continuar elevats. Tot i així el valor de η , tant en cèl·lules estirades com no estirades tractades amb trombina, va romandre >25% més baix que el valor basal.



I.4.5 Discussió

Hem mesurat els efectes de l'estirament en la micromecànica i la deformació de cèl·lules epitelials alveolars humanes confluents i subconfluents exposades a la trombina. Tot i que aquest model té limitacions, presenta un dels trets centrals de l'epiteli danyat severament, la funció mecànica de les unions cèl·lula - cèl·lula. Hem utilitzat una tècnica desenvolupada

recentment que ens permet mantenir cèl·lules adherents mentre estirem biaxialment el seu substrat i mesurar simultàniament la seva viscoelasticitat i la seva deformació.

La deformació cel·lular va ser calculada a partir dels canvis entre la distància entre les microesferes. Si la cèl·lula fos un cos mecànicament homogeni firmament unit al seu substrat, la deformació del substrat imposada seria transmesa totalment a la superfície apical de la cèl·lula. En aquest cas, la deformació de la monocapa cel·lular ϵ_L i la deformació d'una cèl·lula individual ϵ_c seria la mateixa i $\Delta\epsilon = 0$.

No obstant hem trobat diferències significatives entre ϵ_L i ϵ_c . Hem raonat que aquesta pèrdua de transmissió de deformació és deguda al trencament de les adhesions cèl·lula – cèl·lula i cèl·lula – substrat durant la distensió cel·lular. Com a resultat d'aquesta pèrdua d'adhesió, les cèl·lules es desenganxen del seu substrat i es formen forats paracel·lulars, avaluat amb l'índex $\Delta\epsilon$.

Les cèl·lules subconfluents, contràriament a les confluents, exhibeixen una retracció substancial respecte del substrat com mostra haver trobat un valor elevat de $\Delta\epsilon$. Aquest valor incrementa molt més en les cèl·lules tractades amb trombina. Aquesta troballa revela un paper mecànic important de les unions cèl·lula – cèl·lula com a contrapès quan les forces centrípètes augmenten durant l'estirament.

Simultàniament amb la deformació global, també s'han obtingut mesures de G' i η . S'ha observat que la G' i la η en cèl·lules confluents i subconfluents exhibeixen el mateix comportament en resposta a un estirament. Per altra banda, s'ha observat que les cèl·lules tractades amb trombina recuperen els nivells basals després de relaxar l'estirament previ induït a les cèl·lules, suggerint que l'estirament trenca les estructures del citoesquelet que determinen la rigidesa induïda per la trombina. Tot i així, el valor de la histeresivitat η va romandre 20-25% més baix que el valor basal. La histeresivitat reflecteix el grau de quan de sòlida o líquida és la cèl·lula.

I.4.6 Conclusions

En aquest context, els nostres resultats suggereixen que quan les unions cèl·lula – cèl·lula són dèbils o nul·les, l'estirament pot provocar la formació de forats en l'epiteli i un increment en la permeabilitat. Aquest efecte pot ser augmentat perillosament per la presència de trombina.

I.5 Conclusions de la tesi

Efecte d'un estímul vibratori en cèl·lules epitelials de la via aèria superior

1. S'ha implementat un sistema experimental que permet aplicar perturbacions oscil·latòries d'alta freqüència a un cultiu cel·lular amb l'avantatge de que es pot ajustar fàcilment l'amplitud i la freqüència de vibració en oscil·lacions sinusoidals. Aquest sistema és potencialment aplicable a l'estudi dels efectes de la vibració en diferents tipus cel·lulars (epitelials, endotelials, neuromuscular, neuronal, macròfags, etc...) involucrats en patofisiologies respiratòries durant el son.
2. Un estímul vibratori de 60 Hz i ± 0.3 mm d'amplitud, aplicat sobre cèl·lules epitelials bronquials humanes en cultiu, no va afectar la proliferació cel·lular a les 24h, indicant que aquest estímul vibratori no va afectar a què les cèl·lules es desenganxessin del seu substrat.
3. Una vibració mecànica amb amplitud i freqüència que simulen les del ronc va ser capaç d'induir una resposta inflamatòria, com és reflexa amb l'increment en la sobreexpressió de la citoquina inflamatòria IL-8 al llarg del temps (46% at 12h (P= 0.029) and 56% at 24h (P= 0.013)).
4. La inhibició de les cascades principals de les MAPK: p38, ERK, and JNK MAPKs van reduir significativament l'increment en la sobreexpressió d'IL-8 induït per la vibració, indicant que la regulació de la citoquina IL-8 està mediada per les cascades de senyalització MAPK.
5. Aquests resultats en un model in vitro donen suport a la hipòtesi de que la vibració deguda al ronc podria ser una font important de dany cel·lular en les vies aèries de pacients amb diferents malalties respiratòries associades a la som com ara, l'apna/hipoapnea obstructiva de la son o el síndrome de resistència en la via aèria superior.

Efecte de l'estirament en la integritat estructural i la micromecànica de monocapes de cèl·lules epitelials alveolars humanes exposades a trombina

6. Es va definir un índex per avaluar la pèrdua de transmissió d'estirament entre la cèl·lula i el substrat. Aquest índex, el qual va ser calculat a partir dels canvis en la distància entre microesferes unides fortament a la superfície cel·lular via adhesions focals, determina la formació o canvis en la mida de forats paracel·lulars.
7. La trombina no va comprometre la integritat física de la barrera epitelial alveolar de cèl·lules confluents. En cèl·lules confluents, la deformació cel·lular o intracel·lular i la deformació del substrat o intercel·lular va ser molt semblant. Aquest resultat va ser independent del tractament, indicant que la trombina no contribueix a la formació de forats paracel·lulars en cèl·lules confluents.
8. La deformació cel·lular experimentada per cèl·lules subconfluents va ser marcadament més petita que la deformació patida pel substrat. Aquesta reducció va ser molt pronunciada amb la presència de trombina, indicant un augment substancial en la formació de forats paracel·lulars.
9. En cèl·lules subconfluents, degut a que la presència d'adhesions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu són limitades, les forces centrífugues adhesives no poden aguantar les forces centrípètes tensionals degudes a l'estirament, compromentent d'aquesta manera la integritat física de la barrera alveolocapil·lar.
10. L'estirament incrementa la rigidesa i redueix la histeresivitat cel·lular de les cèl·lules tractades amb vehicle. Per contra, l'estirament no va incrementar la rigidesa de les cèl·lules tractades amb trombina. Aquest comportament diferent entre les cèl·lules tractades amb trombina o amb vehicle no pot ser atribuït al desenganxament cel·lular degut a que aquest comportament es troba tant en cèl·lules confluents com en cèl·lules subconfluents. Aquests resultats suggereixen trencament i reorganització de les estructures del citosquelet.
11. Aquests resultats suggereixen que la trombina podria empitjorar la integritat de la barrera epitelial en pulmons danyats subjectes a ventilació mecànica. .

I.6 Referències

1. Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. *Am J Respir Crit Care Med*;170:541-6. (2004).
2. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O et al. *Chest*;124:1386-92. (2003).
3. Chess PR, Toia L and Finkelstein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L43-51. (2000).
4. Fabry B, Maksym GN, Shore SA, Moore PE, Panettieri RA Jr, Butler JP, and Fredberg JJ. *J Appl Physiol* 91: 986–994. (2001).
5. Fitzpatrick MF, Martin K, Fossey E, Shapiro CM, Elton RA, Douglas NJ. *Eur Respir J*;6:531-5. (1993).
6. Kimoff RJ, Sforza E, Champagne V, Ofiara L, Gendron D. *Am J Respir Crit Care Med*;164:250-5. (2001).
7. Liistro G, Stanescu D, Veriter C. *J Appl Physiol*;70:2736-41. (1991).
8. Liu M, Tanswell AK and Post M. *Am J Physiol* 277: L667-L683. (1999).
9. Oudin S, Pugin J. *Am J Respir Cell Mol Biol*;27:107-14. (2002).
10. Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, et al. *Am J Respir Crit Care Med*;166:501-9. (2002).
11. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, et al. *Respir Med*;98:25-8. (2004).
12. Trepast X, Grabulosa M, Buscemi L, Rico F, Fabry B, Fredberg JJ, and Farre R. *Rev Sci Instrum* 74: 4012–4020. (2003).
13. Trepast X, Grabulosa M, Puig F, Maksym GN, Navajas D, and Farre R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1025–L1034. (2004).
14. Trepast X, Grabulosa M, Buscemi L, Rico F, Farre R, and Navajas D. *J Appl Physiol* 98: 1567–1574. (2005).
15. Vlahakis NE and Hubmayer RD. Invited Review. *J Appl Physiol* 89: 2490-2496. (2000).
16. Waters CM, Sporn PH, Liu M and Fredberg JJ. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L503-L509. (2002).