
6.CONCLUSIONS

1. L'optimització de la metodologia de RNAi contra el CD40 humà ens ha permès obtenir un siRNA capaç de silenciar l'expressió d'aquest receptor fins a un 85% tant a nivell de mRNA com a nivell de proteïna.
2. El bloqueig del senyal coestimulador CD40-CD40L mitjançant RNAi contra CD40 en cèl·lules endotelials impedeix la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, i causa una reducció de l'adhesió leucocitària del 87% en aquestes cèl·lules.
3. Aquest siRNA anti-CD40 no afecta l'adhesió leucocitària induïda en cèl·lules endotelials activades via TNF- α , la qual cosa confirma la seva especificitat.
4. La generació d'un vector lentiviral que expressa el siRNA anti-CD40 en forma de shRNA ha permès assolir un silenciament gènic eficient (60%) i estable de CD40 en les cèl·lules endotelials transduïdes.
5. La determinació dels perfils d'expressió gènica mitjançant microarrays juntament amb la tecnologia de RNAi, ha permès verificar que la interacció CD40-CD40L desencadena un patró d'expressió gènica específic en les cèl·lules endotelials.
6. Aproximadament tres quartes parts dels gens regulats segons l'assaig de microarrays estarien induïts i una quarta part veurien disminuïda la seva expressió en resposta a l'activació per CD40L, la qual cosa confirma el paper de CD40 com a "activador" cel·lular.
7. La validació per RT-PCR de la inhibició de l'expressió d'alguns d'aquests gens, mediada per RNAi contra CD40, confirma que la regulació és dependent d'aquest receptor i que gens involucrats en resposta inflamatòria es troben induïts després del tractament amb CD40L ancorat a la membrana de limfòcits T.
8. L'anàlisi d'ontologia gènica de les dades ha confirmat la inducció de l'expressió de gens involucrats en resposta immune i processos inflamatoris, com molècules d'adhesió cel·lular, citoquines i quimioquines proinflamàtores, factors de creixement, factors de transcripció i gens implicats en la presentació d'antígens. Aquest patró d'expressió gènica confirma el paper de la senyalització via CD40 i de les cèl·lules endotelials en l'inici i el desenvolupament dels processos immunoinflamatoris.
9. Gran part d'aquests gens involucrats en l'activació de diferents processos implicats en

Conclusions

la resposta immunoinflamatòria havien estat descrits prèviament com a dianes de CD40, tot i així, aquest estudi d'expressió gènica ha permès identificar nous gens i noves vies de senyalització implicades en la inducció de la resposta inflamatòria desencadenada per activació de CD40 en cèl·lules endotelials com MMP10, NLF2, TLR-3 i Apelin.

10. L'anàlisi comparativa del patró d'expressió gènica en resposta a l'activació de la via CD40-CD40L, a diferents temps, ha permès constatar la complexitat i cooperació de múltiples rutes de transducció de senyals en el patró d'expressió gènica de cèl·lules endotelials activades via CD40.

11. CD40 regula un nombre significatiu de gens de resposta primerenca donat que gran part de l'activació de l'expressió gènica es va observar a les 4 hores d'estimulació, on hi ha una major regulació de factors de transcripció i altres gens implicats en el control de l'expressió gènica.

12. Entre els factors de transcripció que controlen l'expressió de gens implicats en processos inflamatoris i es troben activats de manera primerenca en resposta a CD40L en cèl·lules endotelials es troben membres de la família NFκB (NFκB p50 i p65), membres de la família AP-1 (FosB, c-Fos, JunB, JunD, ATF2) i STAT-1, un factor de transcripció regulat per JNK/MAPK.

13. En cèl·lules endotelials, la unió de CD40 al seu lligand desencadena l'activació de la via de transducció de senyals de MAPKs Erk1/2 i JNK, la qual cosa es tradueix en un increment de la forma fosforilada de la proteïna. En quant a Erk, en resposta a CD40 a més, tindria lloc una estabilització de la forma total de la proteïna.

14. L'activitat cel·lular de p38/MAPK no es veu alterada en resposta a l'estimulació per CD40 en aquestes cèl·lules.

15. El siRNA anti-CD40 causa una menor resposta cel·lular a la infecció viral induïda per dsRNA i dependent de la via de senyalització de *Toll like receptor-3*. CD40 regula els nivells de receptor TLR-3, resultant en l'activació de l'expressió de la quimioquina IL-8 i la síntesi de IFN-β.

16. El gen d'Apelin és un dels gens més significativament regulats per la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials. La inhibició de l'expressió de l'Apelin per CD40 en cèl·lules endotelials en condicions proinflamatòries, tant a nivell de mRNA com a

nivell de proteïna, confirma la importància del sistema Apelin-APJ en els processos inflamatoris d'origen vascular.

17. L'electroporació representa un mètode alternatiu a la perfusió *in situ* de ronyó i permet assolir una elevada eficiència de transferència gènica causant la mínima toxicitat.

18. L'ús d'un siRNA optimitzat anti-CD40 en un model experimental d'al·lotrasplantament renal en rates mostra una disminució significativa de l'expressió del mRNA de CD40 en les cèl·lules tubulars, paret dels vasos i glomèruls del grup d'animals tractats en comparació amb els animals control que desenvolupaven rebuig agut. Dades experimentals preliminars semblen indicar que el siRNA anti-CD40 disminueix l'aparició de rebuig agut, allargant el temps de supervivència dels animals tractats en comparació amb els animals control.