
**EFFECTES DELS INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA EN
CÈL·LULES HEPÀTIQUES I EL SEU PAPER EN LA
INFLAMACIÓ I FIBROSI HEPÀTICA EXPERIMENTAL**

Anna Planagumà Ferrer



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

**EFFECTES DELS INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA EN
CÈL·LULES HEPÀTIQUES I EL SEU PAPER EN LA INFLAMACIÓ I
FIBROSI HEPÀTICA EXPERIMENTAL**

Memòria presentada per

ANNA PLANAGUMÀ FERRER

per optar al títol de doctora en Bioquímica

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Joan Clària Enrich**, a la Unitat de DNA de
l'Hospital Clínic de Barcelona

Anna Planagumà Ferrer

Dr. Joan Clària Enrich
Director

Prof. Joan Rodés Teixidor
Tutor

Tesi inscrita en el programa de doctorat de *Biopatologia en Medicina*, del departament
de Medicina, bienni 1999-2001

Als meus pares

“Res és tan fàcil com sembla”
Albert Einstein

AGRAÏMENTS

Gairebé sis anys de tesi donen molt de si, i no només pel que fa al tema dels coneixements adquirits i resultats obtinguts sinó que també durant aquest temps he conegut a moltes persones que sense elles no m'hagués estat possible arribar fins aquí. A tots vosaltres agrair-vos la vostra ajuda.

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a tots aquells que han col·laborat en el present projecte sense l'ajut dels quals no s'hagués pogut dur a terme.

Especialment vull agrair al meu director de tesi, el Dr. Joan Clària, la possibilitat que em va oferir de realitzar la tesi doctoral en el seu grup i l'esforç il·limitat que ha dipositat en ella. Gràcies per confiar en mi i sobretot per donar-me un cop de mà sempre que ha estat necessari. Agrair al Professor Joan Rodés, catedràtic de Medicina de la Universitat de Barcelona i Director General de l'Hospital Clínic, el seu recolzament a la investigació.

Moltes gràcies al Dr. Vicente Arroyo, catedràtic de Medicina de la Universitat de Barcelona i Director de l'Institut de Malalties Digestives i Metabòliques de l'Hospital Clínic, per la seva ajuda i suport constants.

Destacar a la Dra. Francisca Rivera, que essent directora del Servei d' hormonal de l'Hospital Clínic, va acceptar que iniciés la tesi doctoral en aquest Departament.

Gràcies també al Dr. Wladimiro Jiménez, Cap Operatiu del Laboratori Clínic d'Especialitats del Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB) de l'Hospital Clínic, pel seu encoratjament i bons consells. Agrair també a la Dra. Rosa Miquel del laboratori de Patologia de l'Hospital Clínic la seva col·laboració en l'anàlisi histològic de les mostres de teixit hepàtic.

Aquest agraïment el vull estendre a les companyes de grup, a les "noies de DNA", per la seva gran col·laboració i ajuda al laboratori: l'Esther (que em va ajudar a donar els primers passos a dins d'un laboratori, gràcies per fer-me de "profe"), la Marta (juntament des de l'inici d'aquest llarg camí, ànims que ja arribem al final!), la Montse (pels teus ànims constants), l'Anita (per la teva companyia durant la última etapa a l'Idibaps), la Natàlia (gràcies per ser com ets), la Carmen Escofet i la recent incorporada Raquel (molta sort i molts èxits).

Moltes gràcies també a tots els companys del lab 502 de l'Idibaps: en especial merci a la Sònia, veïna de poiata, que a més de companya ha estat una amiga durant tots aquests anys i m'ha sabut escoltar i donar consell en tot moment, sempre amb el seu característic bon humor,

Agraïments

gràcies Immunda! Gràcies a en Pedro i en Javi per les seves constants visites a Idibaps i per fer-me riure moltes vegades sense tenir-ne ganes. Recordar també a la Laia que espero que tot li vagi molt bé per Edinburgh. Agrair també al "Juan" les seves visites a l'Idibaps i les llargues converses.

Moltes gràcies a les veïnes del lab 501 de malalties respiratòries d'Idibaps: la Marta i l'Elisabet, i les ex-veïnes Ana i Blanca, amb les quals he compartit grans moments tant a les hores dels àpats com a fora del laboratori fent "activitats extraescolars". En aquest *pack* també englobo a en Marc i l'Isa "d'Hormonal", gràcies per la vostra companyia durant les llargues cues al menjador de l'Hospital i les interessants xerrades entre mossec i mossec.

Agrair també a l'Anna Beato, lab manager de l'Idibaps, la seva dedicació perquè tot rutllés als nous laboratoris.

Igualment m'agradaria destacar a tota la gent que m'ha donat suport durant la meua primera etapa a l'Hospital i ha continuat fent-ho a l'Idibaps (espero no deixar-me a ningú):

A l'antic laboratori d'Hepato (que em va albergar durant uns anys) i actual lab 503 de Fibrosi Hepàtica d'Idibaps. En especial gràcies al Dr. Ramón Bataller per haver-me animat en tot moment i transmetre'm el seu bon humor. A la Loreto (merci per ser tan espontània), la Càrol (trionfant enmig dels francesos), la Maria José (forces que això ja s'acaba!), en Pau (ànims que ja gairebé ho tenim!), la Raquel, en Jordi, la Montse, l'Elena i a les companyes que ja no estan en el laboratori l'Eva, la Neus i la Valeria.

Al laboratori de Cardiologia experimental: a l'Ester (gràcies per la teva simpatia i per les grans converses que hem tingut els "dies" que em portava carmanyola), a la Montserrat (companya gironina amb qui sempre acabem parlant de la nostra terra) i la Leire (gràcies per cuidar tant bé els ratolinetes).

A la Unitat de Nefrologia: a en Sergio (en terres Nova Yorquines), la Cristina Mur (sempre preocupant-se pels altres), en Dani (gràcies per ser tan simpàtic, espero que tot et vagi sobre rodes per París), la Blanca (ànims que ja queda poc!) i la Mònica (et trobem a faltar!).

Al servei d'Endocrinologia: a la Marce (una *megacrack* de la ciència), la Melina (gràcies pel teu bon humor), la Sylvia, i la Reini.

A l'antic Servei d'Hormonal i actual laboratori Clínic d'Especialitats del CDB, tant els que hi van passar com els que encara hi són: la Pepa (gràcies pels teus consells), en Manuel (gràcies pels bons suggeriments i per transmetre'm la teva harmonia), la Pili (la nostra postdoc a San Diego, CA), en Guillermo (gràcies per la teva serenitat), l'Alberto (el nº 1 dels comercials), la Cristina

Avia, en Josep Oriola i la Dra. Roser Casamitjana. Igualment agrair a totes les tècnics del Servei d'Hormonal la seva col·laboració: el duo Lluïsa-Marga (gràcies per transmetre'm la vostra alegria sempre que entrava al laboratori de "post"), l'Eulàlia, la Nuri, la Pili Pérez, la Carmen Cano, la Cristina Ferran i la Marina.

Thank you Rosalind per les classes d'anglès i per explicar-me les teves aventures diàries.

Sortint de l'àmbit de l'Hospital també m'agradaria donar les gràcies a les meves amigues d'Olot: l'Elisa, l'Eva, l'Herminia, les Susannes i l'Isa, gràcies per les bones estones que hem passat plegades i per ajudar-me a relativitzar les coses.

També agrair a la gent que he anat coneixent al llarg d'aquests anys a Barcelona. Per començar destacaré als meus companys de pis per la convivència del dia a dia, que no és gens fàcil, i per aguantar-me en aquells moments en què regnava una atmosfera de mal humor; gràcies Albert per fer-me canviar els meus "hàbits" alimentaris. També moltes gràcies a la gent del gimnàs: Mireia (gràcies pels teus ànims), Sònia (no te rindas!), Sandra (gràcies pel cop de mà amb la portada), Mònica (ai aquests homes...) i Marc (molts d'èxits teatrals!), agrair-vos les bones estones que hem passat junts, suant una miqueta, i que m'han ajudat a desconnectar moltíssim. Gràcies també a la Quelis que ja és més de Gràcia que d'Olot, pels cafès i pels bons consells. I molta sort a la Jordina en la seva nova etapa a la Garrotxa, gràcies per encomanar-me la teva alegria. També agrair a les germanes Anna i Maria els bons moments que hem passat juntes tant en terres barcelonines com garrotxines.

Thanks Chris for your help during my stay in Chicago, without you it wouldn't have been the same.

I com no, gràcies Jordi pels teus ànims i per transmetre'm la teva energia positiva perquè em decidís a realitzar el postdoc a Boston. Espero que allí m'esperis quan arribi!

També moltes mercès a tota la meva família, tiets i cosins (en especial a la petita Clàudia), que sense acabar d'entendre ben bé el què feia sempre us heu interessat i constantment m'heu animat.

Però sobretot a qui vull agrair el seu esforç incondicional és als meus pares, Lluís i Anita, a vosaltres us dedico plenament aquesta tesi. Gràcies per animar-me quan ho veia tot fosc, recolzar-me en tot moment i estar sempre al meu costat. Omple moltíssim saber que puc confiar sempre amb vosaltres i que mai em fallareu. A la vostra comprensió i al vostre temps dedico el treball que ara comença.

ABREVIATURES

α-SMA	Actina- α de múscul llis
aa	Aminoàcids
AA	Àcid araquidònic
AINEs	Antiinflamatoris no esteroïdals
AMPc	Adenosina 3,5 monofosfat cíclica
Arg	Arginina
ASA	Aspirina
ATP	Adenosina trifosfat
C3a	Complement C3a
C5a	Complement C5a
Ca²⁺	Calci
CCl₄	Tetraclorur de carboni
CINC-1	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>
COX	Ciclooxygenasa
CSF	Factor estimador de colònia
Cys	Cisteïna
Cys-LTs	Cisteïnil leucotriens
DAG	Diacilglicerol
DHA	Àcid omega-3 docosahexanoic
DNA	Àcid desoxoribonucleic
bFGF	Factor bàsic de creixement de fibroblasts
FLAP	Proteïna activadora de la 5-LO
Glut	Glutamina
GMPc	Guanosina 3,5 monofosfat cíclica
GROα	Producte gènic de regulació del creixement α
HCV	Virus de l'hepatitis C
HETE	Àcid hidroxieicosatetranoic
HGF	Factor de creixement d'hepatòcits
HPETE	Àcid hidroperoxieicotetranoic
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HSC	Cèl·lula hepàtica estrellada
IgGs	Immunoglobulines

Abreviatures

IL	Interleuquina
Ile	Isoleucina
INF	Interferó
KC	Cèl·lula de Kupffer
LX	Lipoxina
LO	Lipooxigenasa
LT	Leucotriè
MAC	Complex d'atac a membrana
MEC	Matriu extracel·lular
MMP	Metaloproteasa
MCP1	Proteïna quimiotàctica de monòcits 1
Mg²⁺	Magnesi
MIP1	Proteïna inflamatòria de macròfags 1
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
NASH	Esteatosi hepàtica no alcohòlica
NO	Òxid nítric
NPCs	Cèl·lules no parenquimals
PAF	Factor d'activació de plaquetes
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PG	Prostaglandina
PL	Fosfolipasa
PMNs	Polimorfonuclears
PP	Polienilfosfatidilcolina
PPAR	Receptor activat per proliferadors peroxisomals
PPRE	Element de resposta de proliferadors peroxisomals
PPs	Proliferadors peroxisomals
PS	Fosfatidilserina
RNA	Àcid ribonucleic
RXR	Receptor de l'àcid retinoic
SAM	S-adenosilmetionina
SEC	Cèl·lula endotelial sinusoidal
Ser	Serina
TGF-β	Factor de transformació del creixement-β
Th1	Cèl·lules <i>T helper</i> tipus I

Th2	Cèl·lules <i>T helper</i> tipus II
TIMP	Inhibidor de metaloproteasa
TNF	Factor de necrosi tumoral
TSP	Trombospondina
TX	Tromboxà
Tyr	Tirosina
TZDs	Tiazolidinediones
Val	Valina
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular

ÍNDEX

1 INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 INFLAMACIÓ.....	3
1.2 MEDIADORS D'INFLAMACIÓ.....	5
1.2.1 MEDIADORS SOLUBLES D'INFLAMACIÓ.....	7
1.2.1.1 Immunoglobulines.....	7
1.2.1.2 Sistema del complement.....	8
1.2.1.3 Eicosanoids.....	9
1.2.1.4 Factor d'activació de plaquetes.....	9
1.2.1.5 Histamina.....	10
1.2.1.6 Citoquines.....	10
1.2.2 MEDIADORS CEL·LULARS D'INFLAMACIÓ.....	12
1.3 SÍNTESI D'EICOSANIDS.....	13
1.3.1 VIA DE LA CICLOOXIGENASA.....	20
1.3.1.1 Expressió gènica.....	20
1.3.1.2 Estructura proteica.....	20
1.3.1.3 Activitat catalítica.....	22
1.3.1.3.1 Prostaglandines de la sèrie D, E i F.....	24
1.3.1.3.2 Prostaciclina.....	25
1.3.1.3.3 Tromboxà.....	25
1.3.1.4 Receptors de prostanoids.....	26
1.3.1.5 Inhibidors de la ciclooxigenasa.....	26
1.3.1.5.1 L'aspirina.....	28
1.3.1.5.1.1 Mecanisme d'acció.....	30
1.3.1.5.1.2 Formació de lipoxines i 15-epi-lipoxines.....	32
1.3.1.5.2 Altres Antiinflamatoris no esteroïdals no selectius.....	36
1.3.1.5.3 Inhibidors selectius de COX-2.....	37
1.3.1.5.3.1 COX-2 i inflamació.....	37
1.3.1.5.3.2 Coxibs.....	38
1.4 EICOSANIDS I INFLAMACIÓ HEPÀTICA.....	41
1.4.1 ESTRUCTURA DEL SINUSOIDE HEPÀTIC.....	41
1.4.1.1 Les cèl·lules de Kupffer.....	43
1.4.2 BIOSÍNTESI D'EICOSANIDS EN EL FETGE.....	44
1.4.2.1 Eicosanoids derivats de la COX.....	44
1.4.2.2 Eicosanoids derivats de la 5-LO.....	45

1.4.3 PAPER DELS EICOSANOIDS DURANT LA INFLAMACIÓ I FIBROSI HEPÀTICA.....	45
1.4.3.1 Fibrosi hepàtica.....	46
1.4.3.2 Cirrosi hepàtica	49
1.4.4 TERÀPIES ANTIFIBROGÈNIQUES.....	49
1.4.4.1 Citoquines profibrogèniques i antifibrogèniques.....	51
1.4.4.2 Pèptids biològicament actius: bloqueig dels receptors d'endotelina-1, inhibició del sistema renina-angiotensina i bloqueig del sistema adrenèrgic.....	52
1.4.4.3 Antiinflamatoris.....	53
1.4.4.4 Inhibició de la proliferació cel·lular i estimulació d'apoptosi en KCs i HSCs.....	54
1.4.4.5 Agonistes del PPAR α i γ	54
1.4.4.6 Inhibició de les MMPs.....	56
1.4.4.7 Colxicina.....	58
1.4.4.8 Antioxidants.....	58
1.4.4.9 Polienilfosfatidilcolina	59
1.4.4.10 Silimarina.....	60
1.4.4.11 Compostos derivats de plantes	60
1.4.4.12 Substàncies que inhibeixen les vies de transducció de senyal.....	60
1.4.4.13 Disminució del col·lagen.....	61
1.4.4.14 Inhibició de la contractilitat.....	61
1.4.4.15 Tractament amb cèl·lules mare mesenquimals.....	61
2 OBJECTIUS.....	63
3 MATERIAL I MÈTODES.....	67
3.1 AÏLLAMENT DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES.....	69
3.1.1 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ D'HEPATÒCITS.....	72
3.1.2 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES DE KUPFFER.....	72
3.1.3 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES ESTRELLADES.....	73
3.2 CULTIUS CEL·LULARS.....	74
i Normes generals.....	74
ii Comptatge de cèl·lules.....	75
3.2.1 MEDIS DE CULTIU.....	75
3.2.2 INCUBACIONS CEL·LULARS.....	76
3.2.2.1 CRL-2192.....	76
3.2.2.2 Cèl·lules de Kupffer.....	77
3.2.2.3 Hepatòcits.....	77
3.2.2.4 THP-1.....	78
3.2.2.5 Cèl·lules hepàtiques estrellades.....	78

3.3 RNA.....	78
3.3.1 EXTRACCIÓ DE RNA PER TRIZOL.....	79
3.3.2 VALORACIÓ DE RNA.....	79
3.3.3 REACCIÓ DE RETROTRANSCRIPCIÓ.....	80
3.3.4 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	81
3.3.4.1 PCR convencional.....	81
3.3.4.1.1 Electroforesi en gel d'agarosa.....	82
3.3.4.2 PCR a temps real.....	83
3.4 PROTEÏNA.....	83
3.4.1 EXPRESSIÓ PROTEICA.....	83
3.4.1.1 Extracció de proteïna total.....	83
3.4.1.2 Extracció de proteïna nuclear.....	84
3.4.1.3 Valoració de proteïna.....	85
3.4.1.3.1 Bradford.....	85
3.4.1.3.2 MicroBCA.....	86
3.4.1.4 Western blott.....	86
3.4.1.4.1 PPAR α	86
3.4.1.4.2 α -SMA.....	88
3.4.2 ACTIVITAT PROTEICA: ZIMOGRAFIA.....	89
3.5 DETERMINACIÓ D'EICOSANOIDS.....	90
3.5.1 HPLC.....	90
3.5.1.1 Sep-Pak d'extractes cel·lulars.....	90
3.5.1.2 Determinació de derivats de la 5-LO per HPLC.....	91
3.5.2 EIAs.....	91
3.6 ESTUDIS <i>IN VITRO</i>	92
3.6.1 ASSAIG DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.....	92
3.6.2 ASSAIGS D'APOPTOSI.....	92
3.6.2.1 Tinció amb iodur de propidi.....	92
3.6.2.2 Tinció amb Diff-Quik.....	92
3.6.3 ASSAIG DE TRANSACTIVACIÓ.....	93
3.6.3.1 Extracció lipídica: mètode de Bligh and Dyer.....	93
3.7 ESTUDIS <i>IN VIVO</i>	94
3.7.1 ANIMALS I DISSENY EXPERIMENTAL.....	94
3.7.2 HISTOLOGIA.....	94
4 RESULTATS.....	95
ARTICLE 1.....	97
ARTICLE 2.....	123
5 DISCUSSIÓ.....	159

6 CONCLUSIONS.....	167
7 ANNEX.....	171
7.1 ALTRES ARTICLES DERIVATS DE LA PRESENT TESI.....	173
8 BIBLIOGRAFIA.....	179