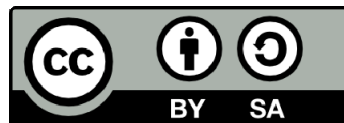




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**El metabolisme del ferro en la inflamació.  
Modulació pels nivells de ferro en l'organisme  
i per una dieta deficient en àcids grassos poliinsaturats**

Teresa Carbonell i Camós



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

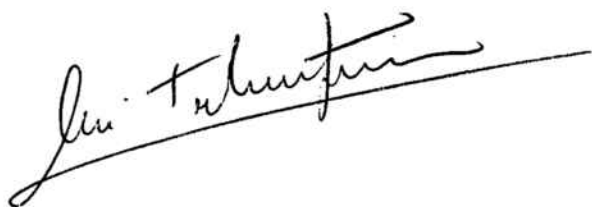
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA

EL METABOLISME DEL FERRO EN LA INFLAMACIÓ. MODULACIÓ  
PELS NIVELLS DE FERRO EN L'ORGANISME I PER UNA DIETA  
DEFICIENT EN ÀCIDS GRASSOS POLIINSATURATS.

Memòria presentada per a optar al grau de  
Doctor en Biologia per la Universitat de  
Barcelona per Teresa Carbonell i Camós.

Vist i plau del Director de la Tesi



Dra. M<sup>a</sup> Teresa Mitjavila i Cors  
Professora titular d'Universitat  
Departament de Bioquímica i Fisiologia  
Universitat de Barcelona.

Barcelona, Febrer del 1992



*Usually new approaches not only help to clarify  
persisting problems, but also create new ones of equal magnitude*

Bonta, 1978.

Per en Ferran

Durant la realització d'aquesta tesi he comptat amb el suport de dos equips, un a la Universitat de Barcelona i l'altre a la Universitat Paul Sabatier de Tolosa (França). A tots els qui m'han ajudat els voldria expressar el meu agraïment.

- A la Dra. Maria Teresa Mitjavila, per la seva direcció i assessorament, així com per haver-me introduït en el món de la investigació.

- Al Dr. Josep Planas, iniciador de la línia de recerca sobre el metabolisme del ferro, per haver posat a la meva disposició els seus amplis coneixements sobre aquest metall.

- A la Dra. M. Puy Sáiz, al Dr. Pierre Fritsch, a Joana Valentín i a Jordi Muntané, per la seva col.laboració en diferents fases d'aquest projecte.

- Al Dr. Pere Puig-Parellada, de la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina, pels seus valuosos comentaris, i a Juan Sánchez, pel seu suport tècnic.

- Al Dr. Salvador Mitjavila, del CNRS, Institut de Physiologie de la Universitat Paul Sabatier, pel seu acolliment i per haver-me facilitat l'ús de les seves instal.lacions. Així com la col.laboració i l'amistat del seu equip, de la Dra. Yvette Fernandez i de la Dra. Claudie Cambon-Gros.

- Voldria agrair l'haver disposat dels Serveis d'Espectroscopia i Microscopia electrònica de la Universitat de Barcelona, del servei de l'estabulari de la Facultat de Biologia, i dels consells del Dr. Martín Rios, del Departament de Bioestadística.

- Als companys de la Unitat de Fisiologia Animal pel seu suport prestat en tot moment i als senyors Jesús Ródenas, M. Carme Rodríguez, Ferran Roca i Eliseu Carbonell pel seu ajut en la confecció i correcció del mecanoscrit.

- Molt especialment voldria esmentar els companys del The London Hospital Medical College de la Universitat de Londres que van ajudar-me a comprendre les complexes interrelacions dels radicals lliures.

- Aquest treball ha estat finançat per la CAICYT PB 85-0234, per la CICYT PM 89-0054 i per l'acció integrada Hispano-Francesa n16-130.

<b>Introducció</b>	1
<b>1.- La biologia del ferro.</b>	1
1.1.- Propietats químiques del ferro.	1
1.2.- Proteïnes que intervenen al metabolisme del ferro.	2
1.2.1.- Proteïnes hemíniques.	4
1.2.1.1.- Hemoglobina.	4
1.2.1.2.- Mioglobina.	5
1.2.1.3.- Enzims hemínics.	5
1.2.2.- Proteïnes no hemíniques.	6
1.2.2.1.- Proteïnes de transport del ferro.	6
1.2.2.2.- Proteïnes de reserva del ferro.	10
1.2.2.3.- Altres proteïnes que contenen ferro.	13
1.3.- Reciclatge, absorció i excreció del ferro.	14
<b>2.- La inflamació i els seus mediadors.</b>	17
2.1.- Característiques de la inflamació.	17
2.1.1.- Vasodilatació.	18
2.1.2.- Augment de la permeabilitat capilar.	18
2.1.3.- Migració leucocítica.	18
2.1.4.- Restauració de l'àrea afectada.	19
2.2.- Cèl.lules implicades en el procés inflamatori.	21
2.2.1.- Mastòcits.	21
2.2.2.- Cèl.lules fagocítiques.	21
2.3.- Els mediadors de la inflamació.	25
2.3.1.- Histamina.	25
2.3.2.- Serotonina.	25
2.3.3.- Bradicinina.	26
2.3.4.- El sistema del complement.	26
2.3.5.- Enzims lisosomals.	27
2.3.6.- Eicosanoides.	27
2.3.7.- Factor de necrosi tumoral (TNF).	30
2.3.8.- Interleucina 1 (IL-1).	31
2.3.9.- Factor activador de les plaquetes (PAF).	31
2.3.10.- Espècies reactives d'oxigen (ROS).	32
<b>3.- Alteracions en el metabolisme dels metalls en la inflamació.</b>	37
3.1.- Mobilització del ferro.	37

3.2.- Mobilització del coure.	39
4.- El paper del ferro en la formació dels radicals lliures oxigenats.	41
4.1.- El ferro i la formació del radical hidroxil.	41
4.1.1.- Reaccions del radical superòxid amb el ferro.	41
4.1.2.- Reaccions del peròxid d'hidrogen amb el ferro.	42
4.2.- Agressió dels radicals lliures a les biomolècules.	44
4.2.1.- Lipoperoxidació.	44
4.2.2.- Proteïnes i DNA.	48
4.3.- Naturalesa del ferro promotor de la lipoperoxidació <i>in vivo</i> .	48
4.4.- Mecanismes de protecció contra l'agressió produïda pels radicals lliures.	49
5.- Objectiu del treball.	52
<b>PRIMERA PART:</b>	
<b>Metabolisme del ferro en la inflamació. Modulació pels nivells de ferro en l'organisme.</b>	<b>54</b>
<b>Material i mètodes.</b>	
1.- Animals i dietes.	54
2.- Mètode experimental.	54
2.1.- Inducció del granuloma per carragenina.	54
2.1.1.- Administració de ferro-dextrà.	55
2.1.2.- Administració de desferrioxamina.	56
3.- Obtenció de mostres.	56
3.1.- Obtenció de plasma.	56
3.2.- Extracció dels òrgans.	57
3.3.- Extracció del granuloma, exsudat i cèl.lules.	57
4.- Anàlisi hemàtiques relacionades amb el metabolisme del ferro.	58
4.1.- Hematòcrit.	58
4.2.- Hemoglobina.	58
4.3.- Ferro en plasma.	59
4.4.- Capacitat total de fixació del ferro (TIBC).	59
4.5.- Ceruloplasmina en plasma.	60
5.- Determinació de ferro als òrgans de reserva.	60
5.1.- Ferro ferrític.	61
5.2.- Ferro no hemínic.	62
6.- Anàlisi dels paràmetres inflamatoris.	62
6.1.- Comptatge, viabilitat i distribució cel.lular.	62

6.2.- Observació de les cèl·lules amb microscopia electrònica.	63
6.3.- Quimioluminiscència.	64
6.4.- Determinació de ferro en l'exsudat.	66
6.4.1.- Ferro dèbilment lligat.	66
6.4.2.- Ferro ferrític.	68
6.5.- Ceruloplasmina en exsudat.	68
6.6.- PGE <sub>2</sub> en exsudat.	68
7.- Disseny experimental.	70
7.1.- Experiment 1.	70
7.2.- Experiment 2.	71
7.3.- Criteris estadístics aplicats.	73
8.1.- Experiment 1.	73
8.2.- Experiment 2.	74

## **Resultats**

### Experiment 1:

1.1 - Pes corporal.	76
1.2.- Valors hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.	76
1.2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.	76
1.2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.	76
1.2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.	78
1.3.- Pes dels òrgans i contingut en ferro.	78
1.3.1.- Pes i reserves de ferro al fetge.	78
1.3.2.- Pes i reserves de ferro a la melsa.	78
1.4.- Paràmetres inflamatoris.	86

### Experiment 2:

2.1.- Pes corporal.	89
2.2.- Valors hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.	89
2.2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.	89
2.2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.	89
2.2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.	91
2.3.- Pes del fetge i la melsa i contingut en ferro.	93
2.3.1.- Pes i reserves de ferro al fetge.	93
2.3.2.- Pes i reserves de ferro a la melsa.	94
2.4.- Paràmetres inflamatoris.	98
2.4.1.- Pes del granuloma.	98

2.4.2.- Volum d'exasdat.	102
2.4.3.- Nombre de leucòcits.	102
2.4.4.- Viabilitat cel.lular.	102
2.4.5.- Distribució dels leucòcits.	104
2.4.6.- Observació de les cèl.lules amb microscopia electrònica.	105
2.4.7.- Activitat fagocítica.	105
2.4.8.- Nivells de ferro a l'exasdat.	113
2.4.9.- pH de l'exasdat.	114
2.4.10.- Ceruloplasmina a l'exasdat.	114
2.4.11.- Nivells de PGE <sub>2</sub> a l'exasdat.	118
 <b>SEGONA PART:</b>	
<b>Modulació de la inflamació per una dieta deficient en AGPI.</b>	<b>120</b>
 <b>Material i mètodes.</b>	
1.- Animals i dietes.	120
2.- Mètode experimental.	120
2.1.- Inducció del granuloma per carragenina.	121
2.1.1.- Administració de Fe-dextrà.	121
2.1.2.- Administració de Dfo.	121
3.- Obtenció de mostres.	122
3.1.- Gasos espirats.	122
3.2.- Obtenció de plasma.	124
3.3.- Extracció del fetge.	124
3.4.- Extracció del granuloma.	125
4.- Anàlisi hemàtiques relacionades amb el metabolisme del ferro.	125
5.- Determinació de ferro en fetge.	125
6.- Estudi de la lipoperoxidació.	126
6.1.- Età expirat.	126
6.2.- PGE <sub>2</sub> en plasma.	126
6.3.- Malondialdehid en plasma.	126
7.- Disseny experimental.	127
8.- Mètodes estadístics.	128



<b>Resultats</b>	
1.- Pes corporal.	130
2.- Valors hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.	130
2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.	130
2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.	132
2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.	132
3.- Pes del fetge i contingut en ferro.	134
4.- Paràmetres inflamatoris.	135
4.1.- Pes del granuloma.	135
5.- Paràmetres de lipoperoxidació.	135
5.1.- Età expirat.	135
5.2.- Nivells plasmàtics de PGE <sub>2</sub> .	140
5.3.- Nivells plasmàtics de MDA.	140
<b>Discussió</b>	144
1.- Alteracions en els paràmetres relacionats amb el metabolisme del ferro.	144
1.1.- Repercussions de l'administració de Fe-dextrà i de Dfo.	150
2.- Modulació de la resposta inflamatòria pels nivells de ferro en l'organisme.	153
3.- Efectes d'una dieta deficient en AGPI sobre la lipoperoxidació.	161
4.- Efectes d'una dieta deficient en AGPI sobre els nivells de ferro en l'organisme.	165.
<b>Conclusions</b>	169
<b>Bibliografia</b>	173

## **INTRODUCCIÓ**

## 1.- La biologia del ferro.

Els metalls de transició representen el 0,1% dels organismes vius. D'aquests elements el ferro és el més abundant. Degut a les seves propietats químiques i, potser, per la seva quantitat en l'escorça terrestre, el ferro va ser seleccionat durant l'evolució molecular per a portar a terme moltes funcions biològiques. Així el ferro és responsable del transport d'oxigen (hemoglobina, mioglobina), de l'activació del nitrogen i oxigen molecular (nitrogenases, oxigenases i oxidases) i del transport d'electrons (citocroms). Tanmateix aquestes propietats poden arribar a ser perjudicials, donant lloc a oxidacions nocives o a reaccions amb radicals lliures, de manera que l'evolució ha fixat que el ferro romangui als éssers vius lligat a proteïnes (transferrina, ferritina, hemosiderina ...).

La importància de les funcions que realitzen les ferroproteïnes és tal que només es coneixen els bacteris anaerobis del gènere *Lactobacillus*, que utilitzen manganès i cobalt enlloc de ferro (Planas, 1983; Weinberg, 1990).

### 1.1- Propietats químiques del ferro.

El ferro és un metall de transició amb 8 valències, que pot trobar-se en estats oxidats entre -2 i +6. Les dues valències principals són la forma ferrosa, divalent ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i la forma fèrrica, trivalent ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ambdues formes són estables en estat sòlid. Les sals ferroses són oxidades a l'estat fèrric en solució en presència d'oxigen; les sals fèrriques són estables en solucions àcides però s'hidrolitzen a pH neutre a través de ponts d'oxigen formant hidròxids polimèrics molt insolubles (Spiro, 1977). Per aquest motiu, en condicions fisiològiques, no existeixen ions de  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  en quantitats significatives i els organismes vius han desenvolupat molècules que segresten el ferro per tal de mantenir-lo en solució durant el seu transport i inserció als *loci* biològics (Aisen i Litowsky, 1980).

La capacitat del ferro de formar compostos coordinats fa possible que s'uneixi a moltes molècules orgàniques formant, majoritàriament, complexos

octaèdrics.

Intermediats metabòlics comuns, com sucres, aminoàcids, àcids orgànics i nucleòtids poden, en major o menor grau, combinar-se amb el  $\text{Fe}^{3+}$ . Estructures més complexs, com el grup pirròlic (compostos hemo) poden unir tant el  $\text{Fe}^{2+}$  com el  $\text{Fe}^{3+}$ . En aquest cas un o més dels llocs coordinats pot unir-se a l'oxigen molecular, essent això de crítica importància en les propietats transportadores d'oxigen de l'hemoglobina.

Les propietats d'oxido-reducció del ferro en els seus dos estats més importants són significatives, tant des del punt de vista de la mobilització i transport del ferro, com de les seves funcions biològiques. Cal, però, tenir en compte que els mecanismes redox per a solubilitzar i mobilitzar el ferro en els sistemes biològics dependran de la presència d'agents reductors per a compensar la seva tendència a l'oxidació (Spiro i Saltman 1974).

### **1.2.- Proteïnes que intervenen al metabolisme del ferro.**

Un adult humà normal contè de 3 a 4 g de ferro (Heberg i Rouaud, 1981; Planas, 1983; Pollycove, 1978). A la taula I s'observa la distribució en percentatges del ferro en l'organisme. Les dades corresponen a un home adult de 70 kg de pes que contingui uns 4 g de ferro. En dones la fracció de ferro emmagatzemat és variable i menor, depenent aquesta dada fisiològica de les pèrdues addicionals de ferro durant la menstruació, que representa una pèrdua mitjana mensual de 0,6 mg de ferro, la gestació, amb una pèrdua total de 20 mg Fe/kg de p.c. i l'alletament, amb menys de 0,3 mg de pèrdua diària de ferro (Bothwell i col., 1989).

Taula I: Percentatge de distribució del ferro en l'organisme. Modificada de Pollycove (1978).

<b>%</b>	<b>COMPOST</b>	<b>TIPUS</b>	<b>FUNCIO</b>
65	Hemoglobina	Hemínic	Transport O <sub>2</sub>
25 - 30	Ferritina	No hemínic	Reserva Fe
	Hemosiderina	No hemínic	Reserva Fe
3 - 5	Mioglobina	Hemínic	Reserva O <sub>2</sub>
0,3	Citocroms	Enzim hemínic	Oxidació
	Peroxidases	Enzim hemínic	Oxidació
	Catalases	Enzim hemínic	Descomposició H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0,1	Transferrina	No hemínic	Transport Fe
	Lactoferrina	No hemínic	Transport Fe
-	Ferro-sulfur	Enzim no hem.	Variable

## 1.2.1.- Proteïnes hemíniques.

### 1.2.1.1.- Hemoglobina.

L'hemoglobina està composta per una part proteica i una part prostètica, el grup hemo. Aquest conté un nucli tetrapirròlic, la protoporfirina, amb un àtom de ferro ferrós.

L'hemoglobina humana té un pes molecular de 66.700 i conté 3,4 mg de ferro per gram de proteïna (Hecberg i Rouaud, 1981; Williams, 1974). En l'hemoglobina A (la més abundant en els humans adults) la part proteica és un tetràmer amb dues subunitats  $\alpha$  i dues  $\beta$ .

El ferro, en estat ferrós, es troba lligat a l'anell porfirínic del grup hemo, formant enllaços coordinats amb els 4 àtoms pirròlics del nitrogen. El cinquè enllaç s'utilitza per a connectar el grup hemo a un reste d'histidina de la cadena de la globina, i el sisè enllaç queda disponible per a la seva coordinació amb una molècula d'oxigen (Williams, 1974). Si hi ha oxigen unit la molècula s'anomena oxihemoglobina, si hi manca, s'utilitza el terme desoxihemoglobina. La desoxihemoglobina varia respecte a l'oxihemoglobina en la seva estructura quaternària. La fixació de l'oxigen a l'hemoglobina per a formar oxihemoglobina no causa l'oxidació del ferro ferrós a fèrric. En el cas que això succeís s'obtidria metahemoglobina, que no es combina amb l'oxigen i, per tant, no és funcional. La formació de metahemoglobina es pot donar normalment, però els eritròcits tenen un enzim, la metahemoglobina reductasa, que catalitza la reducció de la metahemoglobina a la forma ferrosa funcional.

Degut a la capacitat de l'hemoglobina d'unir l'oxigen, la sang pot transportar 21 ml d'oxigen gasós per 100 ml, mentre que el plasma sanguini només pot transportar-ne al voltant de 0,3 ml per dissolució física (Hecberg i Rouaud, 1981).

L'hemoglobina és una proteïna alostèrica, de manera que la corba d'unió de l'oxigen a l'hemoglobina té caràcter sigmoidal i la posició d'equilibri hemoglobina-oxigen també es veu afectada per la pressió parcial d'oxigen i el pH

(Williams, 1974). Als pulmons, on la pressió parcial d'oxigen i el pH són relativament alts, l'hemoglobina tendeix a estar saturada al 96%. En canvi, a l'interior dels teixits perifèrics on la tensió d'oxigen és baixa i el pH àcid (per l'alta concentració de CO<sub>2</sub>) l'hemoglobina s'uneix menys fort a l'oxigen i així en descarrega part que cedeix a les cèl·lules en respiració fins a una saturació del 65% (Williams, 1974).

L'hemoglobina constitueix un 90% de la proteïna global dels eritròcits i es troba concentrada en llur citoplasma, ja que durant la maduració a la medulla òssia es van carregant d'hemoglobina. La vida mitja dels hematies humans és de 120 dies i la seva destrucció porta al catabolisme de l'hemoglobina en bilirrubina, un pigment biliar. El ferro és recuperat i reutilitzat per a una nova síntesi d'hemoglobina als eritròcits medulars (veure apartat 1.3). La quantitat de ferro recuperada d'aquesta manera és de 20 a 25 mg diaris.

#### **1.2.1.2.- Mioglobina.**

La mioglobina és una heteroproteïna constituïda per una única cadena proteica de tipus  $\alpha$  amb un pes molecular aproximat de 17.000. Està composta per un grup hemo unit a ferro ferrós. El grup hemo està envoltat d'una zona hidrofòbica i unit a un grup histidil (Williams, 1974).

Fixa l'oxigen de manera ràpida i reversible. La corba de dissociació de l'oxigen de la mioglobina és hiperbòlica. La mioglobina proveeix les cèl·lules musculars d'una reserva làbil d'oxigen durant una activitat muscular intermitent o bé durant una activitat intensiva però de curta durada (Pollycove, 1978).

#### **1.2.1.3.- Enzims hemínics.**

Els enzims hemínics contenen aproximadament el 0,3% del ferro total de l'organisme i la seva funció és essencial per a la vida.

Al mitocodri, el complex citocrom b i c<sub>1</sub>, el citocrom c, el complex citocrom a i a<sub>3</sub>, accepten i alliberen succesivament electrons a la cadena

respiratòria. Aquest procés es coneix com a fosforilació oxidativa i dona com a resultat la formació d'ATP a partir d'ADP i fosfat a expenses de l'energia produïda pel transport electrònic fins a l'oxigen (Nicholls i Elliot, 1974).

Els citocroms extramitocondrials, com el P-450 i el b<sub>5</sub>, s'impliquen en reaccions d'hidroxilació de substrats endògens i en la detoxificació oxidativa de certes drogues. El complex citocrom b-245 a les membranes dels fagòcits intervé en la generació de radicals superòxid, mecanisme implicat en la mort dels bacteris (Rossi, 1986).

El grup hemo intervé també en la constitució de les peroxidases i de les catalases, enzims que utilitzen peròxid d'hidrogen endogen com a substrat en reaccions oxidatives. Els enzims catalasa, contingut en els peroxisomes, i glutatió peroxidasa, present en el citosòl, són coneguts com a defensa antioxidant a l'interior de les cèl·lules (Halliwell i Gutteridge, 1986a).

## **1.2.2.- Proteïnes no hemíniques.**

### **1.2.2.1.- Proteïnes de transport del ferro.**

Amb el nom de transferrines es coneixen un grup de proteïnes transportadores de ferro que es troben a tots els vertebrats (Aisen, 1981). La transferrina, propiament dita, coneguda també com siderofilina, és una proteïna del sèrum. Es coneix una variant, que només difereix en la composició de la cadena de glicans, en el rovell de l'ou (ovotransferrina o conalbúmina) i a la llet d'alguns mamífers. Tanmateix molts mamífers no contenen transferrina a la llet, sino una proteïna molt relacionada, la lactoferrina.

Més recentment s'han descobert altres membres d'aquest grup de proteïnes, la melanotransferrina (Brown i col., 1982), les proteïnes Blym-1 (Goubin i col., 1983) i l'uteroferrina (Buhi i col., 1982).

#### **- Transferrina.**

L'existència d'una proteïna no hemínica fixadora de ferro en plasma, va



ser descrita per Häuserman el 1899, i aïllada i caracteritzada per Laurell i Ingleman el 1947.

El lloc principal de síntesi d'apotransferrina plasmàtica és el fetge. Morton i Tavill (1977) van observar com la síntesi de transferrina estava augmentada en resposta a un dèficit de ferro, i inhibida quan n'hi havia en excés. Això s'ajusta a l'observació clínica que indica que la concentració de transferrina plasmàtica augmenta i la seva concentració en ferro disminueix en l'anèmia per deficiència en ferro (Aisen, 1984).

Aisen i Litowsky (1980) van definir les seves característiques: La transferrina és una glucoproteïna. La part proteica està constituïda per una única cadena polipeptídica de pes molecular d'aproximadament 80.000, que té dos llocs de fixació del ferro. Els dos llocs de fixació difereixen pel que fa a la fermesa amb que lliguen el metall, en llur accessibilitat al ferro presentat en diverses formes químiques i també pel que fa a llurs propietats espectroscòpiques. Aquestes diferències no es refereixen necessàriament al camp de la funció fisiològica. La majoria dels estudis portats a terme indiquen que els dos llocs de fixació funcionen de manera equivalent com a donants de ferro *in vivo* (Hahn i Ganzoni, 1975; Huebers i col., 1981).

Les anàlisi de la seqüència d'aminoàcids indiquen que la transferrina recent, amb dos llocs de fixació, sorgí, durant l'evolució bioquímica, mitjançant la duplicació i fusió d'un gen que era específic d'una altra proteïna més simple amb un altre lloc de fixació (McGillivray i Brew, 1977). Als procordats s'ha trobat una proteïna fixadora de ferro de pes molecular de 40.000, que sembla ser un precursor de la transferrina dels vertebrats (Martin i col., 1984).

La fixació del ferro a la transferrina depèn de la unió concomitant d'un anió adequat (Aisen, 1981). En un medi biològic la necessitat de fixació aniònica queda coberta pel carbonat o bicarbonat que bloqueja el ferro en el seu lloc de fixació, coordinant així el metall i la proteïna (Harris i col., 1974).

La naturalesa dels residus implicats en el lloc d'unió amb el ferro ha estat molt estudiada (Chasteen, 1983). Hom pensa que l'àtom de ferro està coordinat amb dues histidines, dues tirosines, una molècula d'aigua i l'anió (bi)carbonat,

que ahora està unit a un residu d'arginina o tirosina a la cadena polipeptídica.

La funció principal de la transferrina és el transport de ferro des dels llocs d'absorció, catabolisme eritrocitari i emmagatzematge, fins a les cèl·lules i teixits que en requereixen, principalment els precursors eritroides a la medulla òssia.

Una part del ferro de la transferrina pot ser alliberat als hepatòcits, que l'incorporaran com a ferritina (Young i Aisen, 1981). L'alliberament del ferro de la transferrina i la seva subseqüent incorporació a la ferritina hepàtica depenen del metabolisme oxidatiu de la cèl·lula hepàtica, car necessita ATP i àcid ascòrbic (Mazur i col., 1960). Aquest ferro serà alliberat després per a les activitats metabòliques, encara que no són coneguts els mecanismes que controlen aquest pas.

Un tercer tipus de cèl·lules que adquireixen ferro de la transferrina consisteix en cèl·lules que proliferen activament, com els fibroblasts, cèl·lules endotelials i limfòcits activats. El ferro és essencial per a llur proliferació, probablement perquè l'enzim ribonucleòtid reductasa, que conté ferro, està implicat en la síntesi de DNA.

Mentre es dona la seva interacció amb les cèl·lules que requereixen ferro, la transferrina és conservada, experimentant molts cicles de transport durant el seu temps de vida (8 dies) (Aisen i Litowsky, 1980). Octave i col. (1983) proposen un model general segons el qual l'obtenció del ferro lligat a la transferrina per les cèl·lules implica una endocitosis mediada per un receptor. El ferro és alliberat a una vesícula intracel·lular àcida (que podria ser la mateixa vesícula endocítica o un lisosoma). Es transfereix el ferro a la ferritina citosòlica mentre que l'apotransferrina, sense ferro, és retornada a la membrana cel·lular i alliberada intacte al medi extracel·lular.

La transferrina manté unit el ferro en condicions fisiològiques molt més fortament que la majoria de les molècules fixadores de ferro, però aquesta afinitat decreix en baixar el pH, de manera que a pH 5 el ferro pot ser extret per agents quelants de baixa afinitat, com el citrat.

El lliurament de ferro a la transferrina ha estat molt menys estudiat. Hom pensa que la transferrina actua com un recipient passiu de l'alliberament de ferro

per les cèl·lules i teixits, el control del qual és regulat intracel·lularment (Brock, 1989).

Normalment, la proteïna circulant està saturada al 30% per ferro. La distribució del ferro entre els dos llocs de fixació no està determinada per atzar o per motius termodinàmics, sino que s'ocupa preferentment el lloc de fixació més dèbil, a l'extrem N-terminal (Frieden i Aisen, 1980). Quan la capacitat de fixació de la transferrina per al ferro es veu excedida apareixen siderocomplexos inespecífics formats amb altres proteïnes del sèrum (Graham i col., 1979).

### **- Lactoferrina.**

La lactoferrina és una proteïna semblant a la transferrina pel que fa al seu pes molecular, el fet de tenir dos llocs de fixació per al ferro i perquè necessita l'anió carbonat per a la unió del ferro (Anderson i col., 1987). A més, la seqüència d'aminoàcids de la lactoferrina presenta fragments idèntics a la transferrina. Així, la lactoferrina humana presenta un 59% d'homologia amb la seqüència de la transferrina (Metz-Boutigue i col., 1984).

Tanmateix, la lactoferrina difereix de la transferrina en la distribució i composició de la cadena de glicans (Spik i col., 1982), en el seu alt punt isoelèctric (Brock, 1985) i en que té més afinitat per a fixar el  $\text{Fe}^{3+}$  que la transferrina, de manera que pot retenir el ferro a pH de 4 o menor (Masson i Heremans, 1968).

Respecte a la seva distribució, la lactoferrina es troba a alguns fluids corporals, com la llet, el suc pancreàtic o les secrecions salivars. La seva funció principal és la defensa contra les infeccions bacterianes (Sawatzaki i col., 1983).

Al ser produïda per les cèl·lules fagocítiques, s'ha proposat que podria actuar com un mecanisme protector prenent el ferro alliberat de la transferrina en condicions de baix pH (Charlton i Bothwell, 1983). També s'han proposat altres funcions per a la lactoferrina: podria tenir un paper en la transferència de ferro a les cèl·lules de la mucosa (Lönnerdal, 1985) i en la proliferació cel·lular (Amouric i col., 1984).

### 1.2.2.2.- Proteïnes de reserva del ferro.

La necessitat de tenir formes d'emmagatzematge del ferro als animals superiors depèn de molts factors fisiològics. Pel paper important de l'hemoglobina cal desenvolupar un mecanisme que protegeixi l'organisme de pèrdues sobtades i que proveeixi el fetus durant la gestació.

El ferro s'emmagatzema principalment a fetge, però també a melsa, medul·la òssia, ronyó i múscul (Harrison i col., 1974) en la molècula de ferritina i hemosiderina. Aquestes s'han identificat a espècies molt diverses de bacteris, plantes i animals (Harrison i col., 1980).

El ferro de la ferritina és soluble i es presenta en forma de molècules constituïdes per una escorça proteica que tanca un nucli amb el metall. L'hemosiderina sembla ser la forma degradada de la ferritina, en la que les molècules han perdut part de la seva escorça proteica i s'han agregat de manera que els nuclis de ferro no s'associen amb molècules íntegres (Trump i col., 1973).

#### - Ferritina.

L'estructura de la ferritina comprèn una escorça proteica que envolta un nucli que pot contenir 4.500 àtoms de ferro, encara que normalment en conté la meitat, en forma de petites partícules de ferrihidrita ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), de manera que aproximadament el 20% del seu pes és ferro (Harrison i col., 1974).

El pes molecular de l'apoferritina de cavall és de 450.000. La molècula es troba formada per 24 subunitats, d'un pes molecular aproximat de 18.500 (Harrison i col., 1980). En estudis de difracció de ratjos X sobre cristalls d'apoferritina de melsa de cavall, Harrison i col. (1974) han aportat molta informació sobre l'estructura de la proteïna. Les 24 subunitats estructuralment equivalents formen una escorça còncava, gairebé esfèrica, amb un diàmetre extern de 13 nm i intern de 8 nm.

L'espai intern pot comunicar-se amb l'espai extern, com s'ha observat en anàlisi d'intercanvis a través de diversos canals de 3-4 Å de mida (Collawn i Fish,

1985). En presència de ferro ferrós i d'un agent antioxidant, l'apoferritina captarà ferro i l'incorporarà al nucli (Harrison i col., 1980) a través d'aquests canals ajudats per la cadena d'amino àcids de la superfície. A l'interior del nucli el ferro serà oxidat a la forma fèrrica per acció catalítica d'aquests amino àcids i polimeritzarà. Un cop s'ha format el nucli de ferro, aquest mateix té un paper predominant en l'oxidació dels ions de ferro que entren al nucli.

L'alliberament de ferro *in vitro* requereix la presència d'agents reductors o quelants, i és augmentada a baix pH. Els darrers àtoms de ferro en entrar a la molècula són els primers en ser alliberats, suggerint que els àtoms a la superfície del nucli polimèric són els més làbils (Treffry i Harrison, 1984).

S'ha aïllat ferritina de molts òrgans de mamífers: fetge, melsa, ronyó, cor, placenta, múscul, medulla òssia, mucosa intestinal i sèrum. La ferritina procedent de qualsevol teixit mostra heterogeneïtat isoelèctrica, degut a que la ferritina està composta per proporcions variables de dos tipus de subunitats de diferent mida i càrrega, que s'han anomenat H (pesada, inicialment fou descrita al cor, però es troba a tots els teixits) i L (lleugera, predominant en teixits rics en ferro i ferritina, com el fetge) (Drysdale, 1971). Una tercera subunitat, la G (subunitat glicosilada) ha estat descrita en sèrum (Arosio i col., 1978).

Diversos estudis sobre la biosíntesi de la ferritina en cèl·lules hepàtiques de rata han demostrat que la major part de l'apoferritina es sintetitza als polirribosomes lliures (Bomford i Munro, 1980). Existeixen evidències que són aquests els que responen a un augment de ferro incrementant la síntesi d'apoferritina, així, Drysdale i Munro (1966) van observar que entre les 5 i 12 hores de l'administració de ferro, l'activitat específica de la ferritina augmentava.

Es considera que la ferritina porta a terme dues funcions principals en el metabolisme del ferro: evitar l'acumulació de concentracions elevades de ferro lliure a l'interior de les cèl·lules, segregant-lo en una escorça proteica, i constituir una reserva de ferro per a la síntesi del grup hemo. En aquest sentit, els malats afectats per una sobrecàrrega de ferro posseeixen teixits que contenen concentracions altes de ferritina molt carregades de ferro (Harrison i col., 1974).

### - Hemosiderina.

L'hemosiderina fou aïllada per Cook (1929) que la definí com a grànuls orgànics impregnats amb alguna forma d'òxid fèrric.

El contingut en ferro de l'hemosiderina és variable, però superior al de la ferritina i sol ser del 41% del seu pes (Sturgeon i Shoden, 1964). Al microscopi electrònic es veuen partícules denses similars als nuclis de ferritina (Ritcher, 1958; Fischbach i col., 1971). Tractant la ferritina amb tripsina i agents oxidants s'obté un producte que s'assembla a l'hemosiderina quant a propietats físico-químiques, immunològiques i ultraestructurals (Matioli i Baker, 1963). Tots aquests estudis donen suport a la teoria que l'hemosiderina es forma a partir de la ferritina. La conversió de ferritina en hemosiderina té lloc als lisosomes (Trump i col., 1973). No es coneixen els factors que influencien aquest procés, però s'ha suggerit que els radicals lliures, juntament amb els enzims proteolítics, podrien intervenir en la degradació de ferritina per a donar lloc a l'hemosiderina (O'Connell i col., 1988).

S'ha descrit que la proporció d'hemosiderina respecte a ferritina augmenta quan més alt és el contingut en ferro del teixit (Shoden i col., 1953). El motiu d'aquest augment seria que en l'hemosiderina els nuclis de ferro estan més propers, degut a la pèrdua de proteïna, la qual cosa permet l'emmagatzematge de més ferro per unitat de volum. Estudis recents amb anàlisi de difracció d'electrons sobre el nucli de ferro de l'hemosiderina (Dickson i col., 1988) han permès observar que, en condicions normals, tant l'hemosiderina humana com la d'animals, conté un nucli de ferro ben estructurat en forma de ferrihidrita, similar a l'observat en la ferritina, mentre que en l'hemocromatosi s'observa un nucli de ferro semblant a la goetita ( $\alpha$ -FeOOH) amb alguns defectes de cristallització.

L'hemosiderina no consisteix únicament en ferritina degradada, la seva composició varia considerablement pel que fa al contingut en fòsfor, nitrogen, ferro i proteïnes. Algunes preparacions d'hemosiderina contenen porfirines i altres pigments (McKay i Fineberg, 1964), sucres (Ludewig, 1957), lípids

(Ludewig i Franz, 1970) i proteïnes diferents de l'apoferritina (McKay i Fineberg, 1964). L'hemosiderina no és, per tant, homogènia.

### 1.2.2.3.- Altres proteïnes que contenen ferro.

Entre les proteïnes que contenen ferro hi ha els enzims redox coneguts com a proteïnes ferro-sulfur (Thomson, 1985). Aquestes proteïnes estan generalment actuant en reaccions de transport d'un electró. Contenen 2 o 4 àtoms de ferro units a un nombre similar d'ions sulfidat o als grups sulfhidril dels residus de cisteïna.

Les proteïnes ferro-sulfur més caracteritzades són les ferredoxines. En mamífers es troben ferredoxines a l'escorça adrenal i altres teixits estereidogènics, en el ronyó i al fetge i estan implicades en la conversió de colesterol en hormones esteroidals.

També són proteïnes ferro-sulfur:

- Els enzims mitocondrials NADH deshidrogenasa i la succinat deshidrogenasa, ambdues implicades, juntament amb una ferredoxina, en la fosforilació oxidativa al cor.

- La xantina oxidasa, que es troba al fetge i a la llet, i l'aldehid oxigenasa, del fetge, implicades en el transport d'electrons.

- L'aconitasa, un enzim del cicle de Krebs, i l'amidofosforibosil transferasa, enzim implicat en la biosíntesi de les purines.

Finalment, entre altres proteïnes que contenen ferro, cal destacar l'enzim ribonucleòtid reductasa, que redueix els ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids, un pas essencial en la síntesi del DNA. Aquest enzim conté dues subunitats que es mantenen juntes mitjançant un ió fèrric dèbilment lligat (Atkin i col., 1973) i sembla ser ràpidament exhaurit, raó per la qual necessita un aport constant de ferro a fi de mantenir la seva activitat. El paper del ferro en la proliferació cel.lular sembla, per aquest motiu, lligat a aquest enzim.

### 1.3.- Reciclatge, absorció i excreció del ferro.

La síntesi de molècules que contenen ferro requereix el subministrament d'aquest metall per la dieta. Quan s'estudia el metabolisme del ferro en els mamífers s'ha de tenir en compte el balanç entre els ingressos per l'alimentació front a les pèrdues experimentades per l'excreció i la descamació cel·lulars, així com l'estudi dels mecanismes de transport, utilització i reciclatge (figura 1).

L'organisme adult és molt eficient pel que fa a la reutilització del ferro (Aisen, 1984). Diàriament es destrueixen els eritròcits senescents. Això representa el catabolisme de 6 a 7 g d'hemoglobina i l'alliberament de 20 a 25 mg de ferro. Els òrgans hematopoiètics han de formar un volum igual d'eritròcits per tal de mantenir les constants fisiològiques. Per aquest motiu és important el reciclatge del ferro, a partir dels llocs de destrucció dels eritròcits (macròfags del fetge i de la melsa) el qual passa al plasma i és unit a la transferrina. El plasma és el dipòsit d'aquest metall des d'on és enviat als teixits hematopoiètics per a la síntesi de nova hemoglobina, i als restants teixits per a la formació de les metaloproteïnes o per al seu emmagatzematge, en funció de les necessitats de l'organisme (Planas, 1983).

Degut a aquest eficaç *turnover* del ferro, els mamífers mantenen una concentració corporal de ferro relativament constant, establint un equilibri entre l'absorció i l'excreció durant la vida adulta (Conrad i Barton, 1981). McCance i Widdowson (1937) varen demostrar que el balanç de ferro era regulat a nivell de l'absorció. Només 0,6 - 1,5 mg de ferro són absorbits diàriament i passen al plasma en condicions normals. Aquesta dada dependrà dels requeriments de ferro de l'organisme, però també de la naturalesa del ferro absorbit (el ferro en forma hemínica és absorbit més fàcilment) i de la presència d'altres substàncies en la dieta que puguin afavorir (citrats, ascorbat) o inhibir (fosfats, fitats) la seva absorció (Turnbull, 1974).

L'absorció *in vivo* del ferro pot produir-se al llarg de tot el tracte gastrointestinal, però principalment a nivell del duodè i jejú (Aisen, 1984).



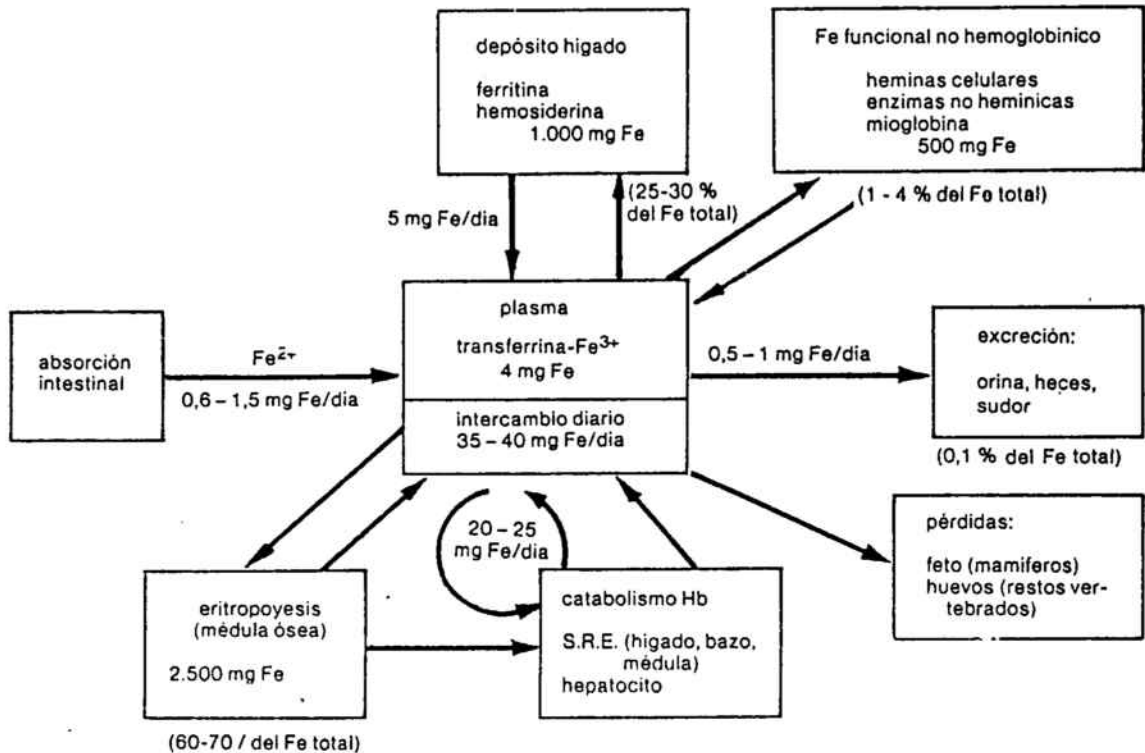


Figura 1: Metabolisme del ferro als vertebrats (Planas, 1983).

S'ha suggerit que l'entrada de ferro a les cèl·lules de la mucosa és mediada per la lactoferrina (Lönnerdal, 1985), per la transferrina (Huebers i Finch, 1985) o que no hi intervé cap proteïna (Charlton i Bothwell, 1983). A l'interior dels enteròcits el ferro pot ser emmagatzemat en forma de ferritina o bé ser transportat per una proteïna semblant a la transferrina (Pollack i Lasky, 1976) i alliberat al plasma on circularà unit a la transferrina. Refsum i Schreiner (1984) proposen que els macròfags de la làmina pròpia intestinal poden controlar la quantitat de ferro que passarà al plasma o serà excretat amb la descamació de les cèl·lules de l'epiteli intestinal.

Malgrat que els mecanismes que controlen l'absorció intestinal de ferro

han estat molt estudiats, encara no es coneixen amb claredat. Sembla ser que l'absorció incrementa durant la deficiència en ferro i disminueix en casos de sobrecàrrega en les reserves. La relació entre les reserves de ferro i l'absorció d'aquest metall és objecte de controvèrsia: mentre que alguns autors impliquen els nivells de ferritina a la mucosa (Huebers i Finch, 1985), d'altres creuen que el grau de saturació de la transferrina plasmàtica pot actuar de senyal (Refsum i Schreiner, 1984). En un treball recent en humans, Taylor i col. (1988) troben que l'absorció de ferro depèn més de la concentració de ferritina sèrica que del percentatge de saturació de la transferrina. Això seria degut a que la ferritina sèrica reflexa la quantitat de ferro de reserva de l'organisme (Jacobs i col., 1972).

El ferro absorbit que ha passat al plasma s'uneix a un *pool* més gran de ferro en trànsit des dels llocs d'emmagatzematge i catabolisme eritrocitari cap a la medulla òssia. D'aquesta manera, la quantitat de ferro que diàriament passa pel plasma és de 35 a 40 mg. Aquest valor quantifica la intensitat del metabolisme en una espècie (Planas, 1983).

Sembla ser que l'organisme no posseeix mecanismes que controlin l'excreció de ferro, de manera que les pèrdues són el resultat de la descamació cel·lular, principalment de la mucosa intestinal i de la suor. Per aquest motiu un augment del contingut de ferro, ja sigui degut a transfusions sanguínies repetides o a una manca en el control de l'absorció, dona lloc a una sobrecàrrega en ferro amb conseqüències greus (Jacobs, 1980).

## 2.- La inflamació i els seus mediadors.

### 2.1.- Característiques de la inflamació

La inflamació és la resposta dels teixits front a determinades agressions. Aquesta resposta inclou una sèrie de reaccions i canvis en la circulació local que tendeixen a neutralitzar i eliminar l'agent nociu i a reparar el mal tissular. Les causes de la inflamació són els agents infecciosos (bacteris, virus, paràsits, que actuen generalment per les seves toxines) i els agents irritants (sobretot substàncies químiques). Les reaccions inflamatòries no depenen massa de la naturalesa de l'agent agressiu, sino principalment de la manera com l'organisme pot organitzar les seves defenses (Rocha e Silva, 1978).

Les característiques anatomoclíniques que acompanyen a la inflamació (figura 2) ja foren descrites per Celsus, fisiòleg romà del segle I d. C. *Notae vero inflammationes sunt quattuor: rubor et tumor cum calore et dolore* (De Medicina, liber 3, Cap. 10). Galè va afegir-ne una cinquena, la pèrdua de funcionalitat, conseqüència directa de les anteriors (Rocha e Silva, 1978).

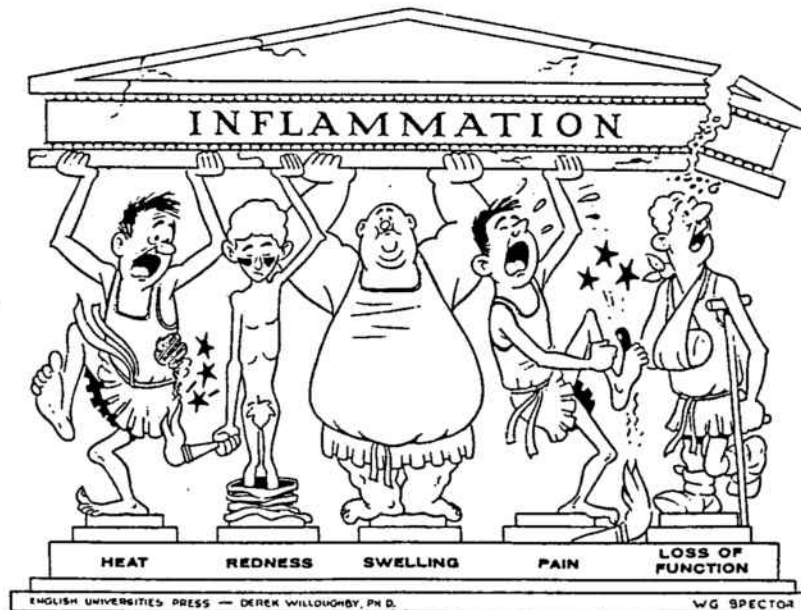


Figura 2 : *Ex-Libris* del *International Inflammation Club*. Dissenyat per Willoughby i Spector.

En el procés inflamatori, com a resultat d'una lesió cel.lular, s'activa tot un intrincat sistema, causant l'alliberament de nombrossos mediadors inflamatoris. Aquests inicien un procés en tres fases que poden donar-se simultàniament: vasodilatació, augment de la permeabilitat capil.lar i migració leucocítica.

### **2.1.1.- Vasodilatació.**

La primera fase de la inflamació és una vasodilatació localitzada, fet que té per objecte l'augment de fluxe de sang a la zona afectada i que assegura l'aport suficient de cèl.lules amb capacitat defensiva, així com dels elements sèrics col.laboradors en la defensa local.

### **2.1.2.- Augment de la permeabilitat capil.lar.**

Com a conseqüència de l'alliberament d'histamina i de prostaglandines dels teixits lesionats es produeix un augment de la permeabilitat capil.lar que permetrà la sortida de proteïnes, líquid i cèl.lules del torrent circulatori. Tot això comportarà la formació d'un edema.

### **2.1.3.- Migració leucocítica**

Els leucòcits s'adhereixen als vasos de la zona inflamada. Aquesta adherència depèn d'alteracions a la paret vascular, i no d'alteracions en els leucòcits. No es coneix la naturalesa d'aquest canvi vascular, però sembla ser altament específica.

S'ha observat que les cèl.lules que s'adhereixen a les vènules amb inflamació aguda són predominantment leucòcits polimorfonuclears (PMN) (neutròfils amb alguns eosinòfils) i monòcits (Hurley, 1978). Les cèl.lules emigren de vènules i venes, i només ocasionalment ho fan de capil.lars. Observacions a teixits transparents vius mostren que els leucòcits migren per un moviment

ameboide. Els PMN tarden de 2 a 9 minuts en passar a través de la paret venular. Després es mouen als teixits al voltant de 20 micres per minut (Clark i col., 1936). Els eritròcits poden acompanyar l'emigració dels leucòcits. En inflamacions lleus només pocs hematies escapen, però després d'estímuls més severos pot haver una gran hemorràgia als teixits inflamats. El pas dels eritròcits és totalment passiu, car són empessos per pressió intravascular a través d'obertures transitòries a la paret del vas.

Els estímuls quimiotàctics alliberats pels mastòcits o que provenen de l'activació del complement, contribueixen a la concentració de cèl.lules fagocítiques al lloc de la lesió.

#### **2.1.4.- Restauració de l'àrea afectada.**

Després que els estadis inicials de la inflamació s'han desenvolupat, els canvis en l'àrea afectada poden seguir dos camins: aquesta és restaurada o la inflamació esdevé crònica. El procés de restauració completa de l'àrea afectada cap a un estadi normal només pot donar-se si l'agent no ha causat àrees exteses de teixit necrosat. La restauració no només implica la reparació dels canvis vasculars, com vasodilatació i augment de la permeabilitat, sino també l'eliminació del material estrany dels espais extravasculars de l'àrea afectada: exsudat inflamatori, leucòcits PMN, fibrina, cèl.lules del teixit necrosat i els seus productes de desfet, majoritàriament perquè es produeix una acceleració de la funció limfàtica normal (Hurley, 1978).

Des del punt de vista fisiològic la inflamació seria el resultat de l'acció d'unes substàncies que actuen com a mediadors i de la participació d'unes cèl.lules que han estat atretes i activades per un estímul determinat. Existeixen moltes interrelacions entre els diferents mediadors inflamatoris i entre aquests i les cèl.lules (figura 3).

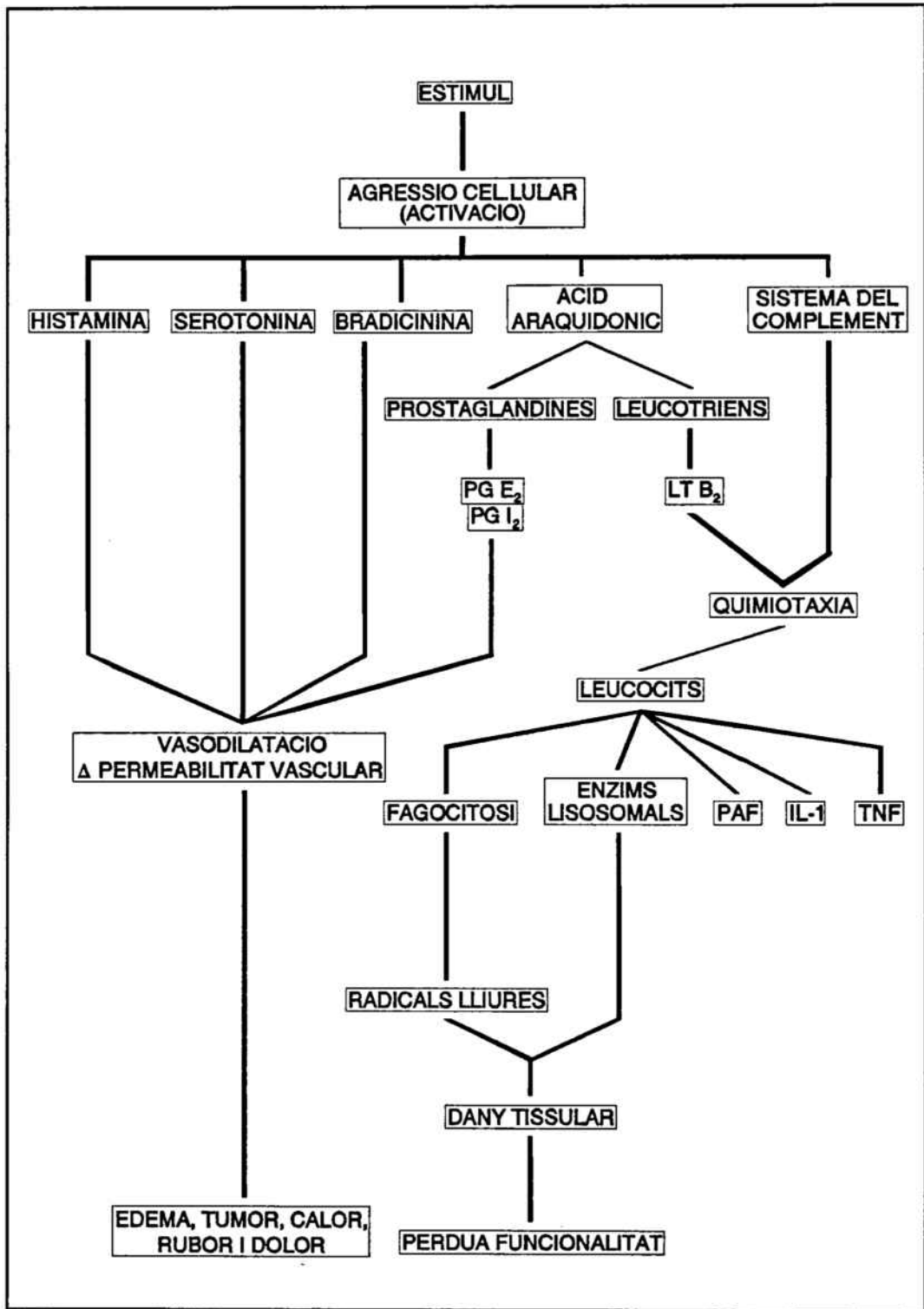


Figura 3: Mediadors implicats en la resposta inflamatòria.

## **2.2.- Cèl.lules implicades en el procés inflamatori.**

A nivell microscòpic, l'acumulació de leucòcits és l'indicador de l'existència de la inflamació. Les cèl.lules implicades en aquest procés són mastòcits, neutròfils, basòfils, eosinòfils, monòcits, macròfags i limfòcits (Bonta, 1983).

### **2.2.1.- Mastòcits.**

Els mastòcits són cèl.lules altament diferenciades, probablement d'origen medullar (Clark, 1983) i que es troben en els llocs d'entrada potencial d'agents nocius, com el teixit perivascular i les superfícies seroses i cutànies. La característica principal és la presència dels grànuls densos que ocupen el citoplasma de manera que enmascaren el nucli i es coloren intensament amb colorants metacromàtics (Metcalf i Kaliner, 1981a). Probablement els mastòcits indueixen la primera resposta inflamatòria en una lesió, i la seva degranulació provoca l'alliberament de mediadors que poden estimular la migració secundària d'altres cèl.lules efectores a l'àrea inflamada.

Entre els mediadors alliberats per la degranulació dels mastòcits s'ha descrit: histamina, serotonina, factors quimiotàctics per a eosinòfils i per a neutròfils, enzims lisosomals, factor activador de plaquetes (PAF), quimiòtripsina i tripsina, prostaglandines i leucotriens.

### **2.2.2.- Cèl.lules fagocítiques.**

La fagocitosi va ser estudiada per Metchnikoff al 1893 en una àmplia varietat d'espècies animals, des de protozous fins als mamífers. Per Metchnikoff l'essència del procés inflamatori és, precisament, la digestió del material agressor que segueix a la fagocitosi.

Les cèl.lules fagocítiques comprenen dos grups especialitzats: les cèl.lules mieloides que poden ésser mobilitzades ràpidament, però que han perdut la capacitat de diferenciació i tenen una vida curta al lloc inflamatori, i el sistema

fagocític mononuclear, que comprèn cel.lules mòbils que responen més lentament que les cel.lules mieloides però que poden diferenciar-se als llocs d'inflamació donant lloc a cel.lules més eficients que les originals.

#### - Cèl.lules mieloides.

Es coneixen amb el nom de granulòcits o leucòcits PMN. Segons l'afinitat dels seus grànuls citoplasmàtics es classifiquen en neutròfils, eosinòfils o basòfils. Els neutròfils són els més abundants i estudiats.

Els granulòcits es formen a la medul.la òssia, a partir d'una cel.lula pluripotent que és antecessora també d'eritròcits i plaquetes. A partir d'aquesta cel.lula s'origina el mieloblast que va madurant fins a granulòcit madur. En condicions normals el teixit hematopoietic conté una reserva de granulòcits madurs que poden ser mobilitzats en cas necessari (Wilkinson, 1983), i que en l'home poden representar el 92,6 % dels neutròfils totals (Boggs, 1975), un 3,2 % dels neutròfils totals es troba en sang circulant, mentre que el 4,2 % restant el constitueixen els anomenats neutròfils marginals, que s'adhereixen i es marginen als llits capil.lars, especialment dels pulmons (Dancey i col., 1976).

Els neutròfils circulen per la sang durant un breu període, de 6 hores aproximadament, després del qual poden migrar als teixits, particularment als llocs inflamatoris. Altres poden entrar al tracte gastrointestinal i són eliminats de l'organisme.

Són cel.lules finals, que tenen un nucli format per una massa informe de cromatina capaç només d'una síntesi limitada de proteïnes. El neutròfil madur està envoltat d'una membrana plasmàtica trilaminar que és capaç d'extendre pseudòpodes dirigits cap a un gradient quimiotàctic (Berlin i col., 1975). Per sota d'aquesta membrana hi ha microfilaments d'actina i miosina que generen les forces contràctils necessàries per a moure's (Stossel, 1974).

A la membrana dels neutròfils s'han trobat receptors per a la porció Fc de la IgG i per al component C3b del complement (Lay i Nussenzweig, 1968) així com receptors específics pel factor quimiotàctic C5a (Chenoweth i Tugli 1978).



Els factors quimiotàctics tenen múltiples efectes en la funció dels neutròfils. A part d'estimular la locomoció dirigida, indueixen la secreció del contingut dels grànuls, canvis en l'adhesivitat i un fort augment en l'activitat metabòlica, generant productes microbicides. Aquests efectes poden ser dosi-dependents: a baixes concentracions, el principal efecte del C5a és estimular la locomoció, mentre que a concentracions elevades immobilitza les cèl.lules, afavoreix la degranulació i activa els processos necessaris per a la mort del bacteri ingerit (Wilkinson, 1983).

Els neutròfils presenten dos tipus principals de grànuls citoplasmàtics: primaris o atzuròfils i secundaris o específics que contenen enzims necessaris per a la fagocitosi. El citoplasma també conté diferents grànuls de glicogen, que constitueixen una font d'energia per a la cèl.lula.

La degranulació del neutròfil té un important paper en la modulació de la inflamació (Weissman, 1982). Els grànuls específics dels neutròfils contenen materials que activen la via alterna del complement generant C5a. Això pot representar un important sistema d'amplificació de la resposta inflamatòria. D'altra banda, productes procedents dels grànuls atzuròfils, que són alliberats més tard en el procés fagocític, poden inactivar el C5a i altres factors quimiotàctics, limitant, per tant, l'extensió de la inflamació (Wright i Gallin, 1977).

#### **- Sistema fagocític mononuclear.**

Aquest sistema comprèn totes les cèl.lules que provenen de la sèrie monocítica de la medul.la òssia, tenen una capacitat fagocítica i pinocítica molt elevada i tenen receptors immunològics a través dels quals realitzen un reconeixement específic (Adams i Marino, 1983).

Els monòcits s'originen a la medul.la òssia des d'on passen a la circulació. Després de 24 hores entren als teixits per a esdevenir macròfags tissulars residents.

Els macròfags tissulars constitueixen l'anomenat sistema retículo-endotelial

(RE). La proporció més gran de macròfags residents es troba al fetge, la melsa i els nòduls limfàtics, on els macròfags estan estretament relacionats amb els limfòcits. Altres llocs són el teixit connectiu (histiòcits) i llocs especialitzats com l'os (osteoclast) i el sistema nerviós central (microglia) (Wilkinson, 1983).

La membrana plasmàtica del macròfag conté un gran nombre de proteïnes, glicoproteïnes i glicolípidis diferents que determinen les seves funcions reguladores i efectores. S'han descrit més de 30 receptors específics: receptors implicats a la fagocitosi (per a la porció Fc de la IgG, pel complement, per a glicoproteïnes); receptors o proteïnes que mediatitzen funcions no fagocítiques (receptor per a la transferrina, llocs d'unió per a cel·lules tumorals) i receptors implicats en la regulació (receptors per a proteïnes acetilades i lipoproteïnes, receptors d' $\alpha_2$ -macroglobulina, de factor de creixement dels macròfags, per a limfocines, per a la lactoferrina) (Adams i Marino, 1983).

En el citoplasma del macròfag hi ha tres estructures importants per a desenvolupar la seva funció:

- El sistema vacuolar, que comprèn fagosomes, pinosomes, endosomes, lisosomes primaris i secundaris i fagolisosomes. Els lisosomes primaris i secundaris contenen més de 40 enzims hidrolítics, essent la seva funció la digestió de partícules i molècules fagocitades.

- L'aparell citoesquelètic dels macròfags o sistema de filaments i tubuls que participa en les funcions fagocítiques i secretores.

- El sistema mitocondrial. En els llocs inflamats els macròfags contenen un nombre més gran de mitocondris (Steinman i Cohn, 1974) degut a que la fagocitosi produeix un fort augment en la respiració cel·lular i activa una oxidasa associada a la membrana que comporta la generació de radicals oxigenats.

Els monòcits circulants i els macròfags residents sintetitzen i secreten diversos productes. En condicions normals els nivells d'aquests productes secretats són baixos, però a causa dels estímuls inflamatoris els nivells poden augmentar i fer-se persistents. Els fagòcits mononuclears secreten enzims, metabòlits de l'àcid araquidònic (principalment prostaglandines de la sèrie E), productes oxigenats i altres substàncies (factors del complement, factors de

coagulació, interleucina 1 o interferó  $\beta$ ).

### **2.3. - Els mediadors de la inflamació.**

Els primers mediadors inflamatoris descrits varen ser la histamina i la bradicinina (Rocha e Silva, 1978). El camp dels mediadors inflamatoris va esdevenint cada cop més complex, essent ampliat amb noves substàncies (serotonina, factors del complement, prostaglandines...) i l'estudi de les interaccions entre ells. Actualment s'accepta que en la modulació de la resposta a la inflamació hi tindrien un paper principal les substàncies alliberades per les cèl·lules fagocítiques (Clark i Chaudhuri, 1989). Aquestes substàncies inclouen: enzims lisosomals, derivats de l'àcid araquidònic (prostaglandines i leucotriens), factors de necrosi tumoral (TNF), interleucina 1 (IL - 1), factor activador de les plaquetes (PAF) i espècies reactives d'oxigen (ROS).

#### **2.3.1. - Histamina.**

La histamina fou el primer mediador inflamatori conegut (Dale i Laidlaw, 1919) i és secretada pels mastòcits i basòfils. Es sintetitza mitjançant la descarboxilació de la L-histidina, en un pas regulat per la histamina descarboxilasa (Beaven, 1976). És un potent vasodilatador, capaç d'augmentar la permeabilitat i de produir dolor (Rocha i Silva, 1978). Està present en molts teixits i és alliberada en la majoria de respostes inflamatòries, però els clàssics antihistamínics no tenen efecte sobre la inflamació (Youlten, 1978). De manera que avui dia s'accepta que aquesta substància només intervindria en la fase vascular de la inflamació (Peña, 1982).

#### **2.3.2. - Serotonina.**

La 5-hidroxitriptamina o serotonina prové de la descarboxilació i hidroxilació del triptòfan. El paper fisiològic de la serotonina s'exerceix a nivell

del sistema nerviós, actuant com a neurotransmissor, i del tracte gastrointestinal, on intervé en la contracció del múscul llis. També es troba als grànuls de les plaquetes i, en rossegadors, als mastòcits. És alliberada en els primers moments de la reacció inflamatòria. El paper específic d'aquest mediador encara no està clar, però s'ha descrit que la seva activitat estaria dirigida cap a l'augment de la permeabilitat vascular i la separació de les cèl.lules endotelials venulars, comportant edema tissular (Holgate, 1983).

### **2.3.3. - Bradicinina.**

La bradicinina és un polipèptid capaç de causar vasodilatació, increment de la permeabilitat vascular i dolor (Kaplan, 1981). Es genera a partir de les proteïnes plasmàtiques conegudes com a cininògens.

La vasodilatació i l'increment de la permeabilitat vascular induïts per aquesta cinina facilitaran el dipòsit local d'immunocomplexos i l'afluència de cèl.lules. S'ha vist també que la bradicinina és capaç d'estimular l'alliberament de prostaglandines (Nasjletti i Malik, 1979).

### **2.3.4. - El sistema del complement.**

El sistema del complement està constituït per enzims plasmàtics que s'identifiquem com a C1 fins a C9, la funció dels quals és actuar com a mediadors de la resposta immune. Existeixen com a precursors inactius en el plasma i s'activen d'una manera successiva (Thomson, 1983).

Les funcions biològiques del sistema del complement són diverses. El complex C5b-9 és el responsable de la lisi cel.lular. Aquest complex s'inserta a la membrana formant un canal hidrofílic que permet el pas d'aigua i electrolits i això comporta l'eventual lisi osmòtica (Mayer, 1972). C3a i C5a (formats a partir de C3 i C5 respectivament) alliberen histamina dels granulòcits, mastòcits i plaquetes. C5a i el complex format per C5a, C6 i C7 són quimiotàctics i atrauen els leucòcits al lloc de la reacció antigen-anticòs. C3b és el complement

corresponent a l'opsonització dels bacteris (Lay i Nussenzweig, 1968).

### 2.3.5.- Enzims lisosomals.

Els enzims lisosomals alliberats pels fagòcits poden ser lisozim, hidrolases àcides i proteases neutres.

El lisozim és una proteïna catiònica capaç d'atacar els mucopèptids de la paret cel.lular d'algunes espècies bacterianes.

Les hidrolases àcides són vessades ràpidament i en abundància després de l'estimulació de macròfags i de neutròfils. Dins d'aquests enzims hi ha la catepsina B, capaç de degradar la molècula de col.làgen.

Les proteases neutres inclouen la col.lagenasa, l'elastasa i la catepsina G, capaç aquesta darrera d'hidrolitzar els proteoglicans dels cartílags i atacar el col.làgen insoluble (Barrett, 1975).

La interacció dels enzims lisosomals amb altres mediadors ha estat molt estudiada: els radicals lliures d'oxigen poden inactivar l'enzim inhibidor de la proteasa  $\alpha_1$ , de manera que es crea un sinergisme entre aquests dos mediadors. D'altra banda els enzims lisosomals estimulen la síntesi de prostaglandines durant la inflamació.

### 2.3.6.- Eicosanoides.

El terme eicosanoides descriu les prostaglandines, tromboxans i leucotriens produïts quan l'àcid araquidònic, alliberat dels fosfolípids per la fosfolipasa  $A_2$ , és metabolitzat per dues vies enzimàtiques diferents: via de la ciclooxigenasa o via de la lipoxigenasa (figura 4).

Els eicosanoides són produïts i alliberats per diversos tipus cel.lulars, incloent leucòcits i cèl.lules parenquimals i endotelials.

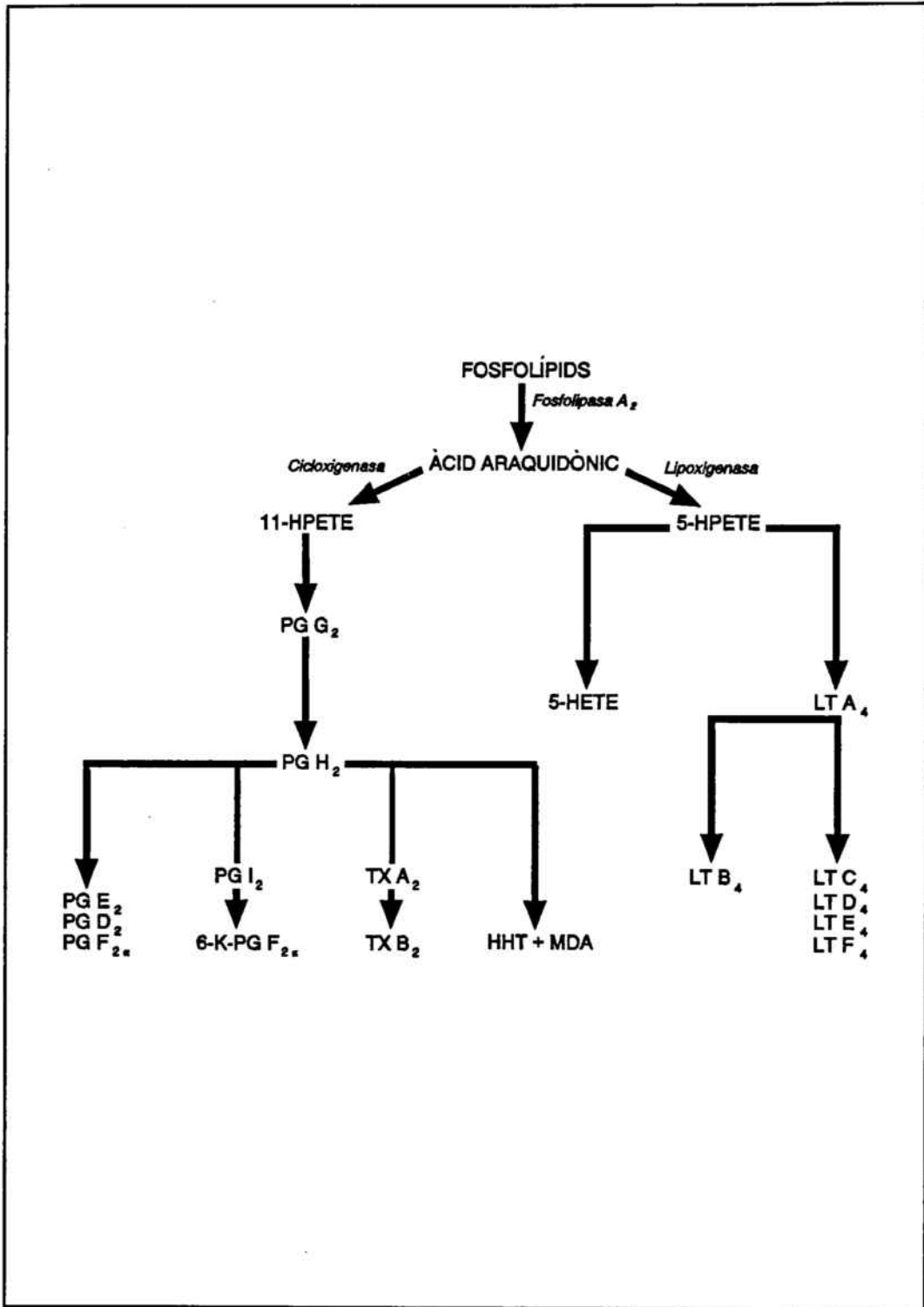


Figura 4: Metabolisme de l'àcid araquidònic.

### - Via de la cicloxigenasa.

El metabolisme de l'àcid araquidònic per aquesta via comporta la formació de prostaglandines i tromboxans.

L'estructura de les prostaglandines fou establerta per Bergström i col. (1968). Són un grup d'àcids grassos insaturats, de vint àtoms de carboni. Cinc dels àtoms de carboni (del 8 al 12) es tanquen per a constituir un anell de 5 membres. Les prostaglandines es designen segons els substituents i el nombre d'enllaços addicionals de la cadena lateral. Les prostaglandines amb dues insaturacions (de la sèrie 2) provenen de l'àcid araquidònic, però també es poden formar prostaglandines a partir de l'àcid dihomogamma-linolènic (prostaglandines de la sèrie 1) i de l'àcid 5,8,11,14,17-eicosapentanoic (prostaglandines de la sèrie 3) (Metcalf i Kaliner, 1981b).

L'estudi de les prostaglandines és difícil, perquè es produeixen localment, es troben en quantitats petites i són metabolitzades ràpidament.

La prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) i el tromboxà  $\text{A}_2$  són productes intermedis inestables, amb activitats biològiques importants. La  $\text{PGI}_2$  té una estructura de doble anell que conté oxigen (Hamor, 1981). Els tromboxans tenen una estructura amb un anell oxà (Moncada i col., 1980).

Les prostaglandines i els tromboxans varen ser considerats com a mediadors de la inflamació per Willis (1970) però el seu paper encara no està gens clar. L'alliberament de  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGD}_2$  pot provocar vasodilatació i vermellor. Sembla ser que la  $\text{PGI}_2$  i la  $\text{PGE}_2$  són les principals responsables d'aquesta vasodilatació (Moncada i col., 1980). En l'efecte contrari, s'ha descrit una potent acció vasoconstrictora per al tromboxà  $\text{A}_2$  (Hamberg i col., 1975). D'altra banda el tromboxà  $\text{B}_2$  (derivat del  $\text{A}_2$ ) ha estat detectat a nivell del fluid sinovial de pacients artrítics, on sembla que tindria un efecte quimiotàctic pels leucòcits (Hornstra, 1982). També tindria un paper quimiotàctic la  $\text{PGE}_2$  (Till i col., 1979). Aquestes dades contrasten amb altres treballs on es descriu un paper antiinflamatori per a les prostaglandines de la sèrie E (Fantone i col., 1980).

S'ha postulat també la relació de les prostaglandines amb la síntesi de proteïnes de fase aguda que es produeix durant la inflamació, ja que la  $PGE_1$  actua sobre el fetge augmentant la síntesi de  $\alpha_2$ -macroglobulina i la seva secreció al medi (Anbalagan i Sadique, 1984).

#### **-Via lipoxigenasa.**

Per la via de la lipoxigenasa, l'àcid araquidònic és metabolitzat a HPETE (àcid hidroperoxi-eicosatetraenoic). Aquest compost pot ser metabolitzat pel sistema glutatió peroxidasa als HETE (àcids mono-hidroxi-eicosatetraenoics). Els productes resultants d'aquesta via són els leucotriens, substàncies biològicament molt actives. Sembla que el leucotriè amb més activitat seria el  $LTB_4$ , el qual és un potent agent quimiotàctic i quimiocinètic pels leucòcits (Ford-Hutchison i col., 1980).

Els productes de l'àcid araquidònic contribueixen també a la inflamació mitjançant la producció de radicals d'oxigen en els processos catalitzats per les peroxidases, tant de la via de la cicloxigenasa com de la lipoxigenasa (Metz, 1981).

Actualment es considera que el paper dels eicosanoides no és tant mediar la inflamació sino estimular o regular l'efecte d'altres mediadors (Clark i Chaudhuri, 1989).

#### **2.3.7.- Factor de necrosi tumoral (TNF).**

El TNF és un polipèptid descrit el 1975 per Carswell i col., amb activitat antitumoral. És secretat per fagòcits mononuclears, mastòcits, limfòcits T i algunes cèl.lules tumorals.

En estudis recents se l'ha associat com a mediador de les malalties agudes, i concretament en la malària (Clark i col., 1981). Les seves funcions biològiques, a part de causar la mort de les cèl.lules tumorals, inclouen la



regulació dels receptors EGF dels fibroblasts, la inducció de la síntesi de PAF pels fagòcits i, en les cèl.lules endotelials, l'expressió d'activitat procoagulant i facilitar l'adherència dels leucòcits. Hi ha també evidències que el TNF incrementa la capacitat dels leucòcits d'alliberar superòxid (Klebanoff i col., 1986).

### **2.3.8.- Interleucina 1 (IL-1).**

La IL-1 és una monocina descrita per la seva capacitat per estimular la proliferació mitogènica dels limfòcits. És produïda, principalment, per fagòcits mononuclears.

Des del punt de vista de la inflamació, la IL-1 és interessant perquè causa l'agregació i adherència dels neutròfils i mononuclears a l'endoteli (Bevilacqua i col.,1985) i la seva degranulació. A més, incrementa la secreció de radicals d'oxigen, PGE<sub>2</sub> i tromboxà A per diversos tipus cel.lulars i indueix les cel.lules endotelials a expressar activitat procoagulant i sintetitzar PAF.

Probablement la IL-1 contribueixi a l'anèmia de les malalties inflamatòries a l'actuar sobre el metabolisme del ferro en diferents teixits diana (Konijn i Hershko, 1989).

### **2.3.9. Factor activador de les plaquetes (PAF).**

El PAF és un fosfolípid de baix PM generat per leucòcits, plaquetes i cèl.lules de l'endoteli vascular (Braquet i col.,1987). Bessin i col. (1983) van observar similituds entre l'efecte del PAF i l'endotoxicitat experimental, per això se'l considera un dels principals mediadors de la inflamació.

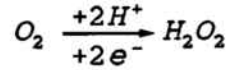
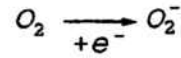
Entre les seves funcions es coneix: agregació de les plaquetes, hipotensió i increment dels nivells de tromboxans en plasma (Lefer i col., 1984), activació dels neutròfils i increment de la permeabilitat vascular (Braquet i col., 1987).

### 2.3.10. Espècies reactives d'oxigen (ROS).

Els radicals lliures d'oxigen han estat implicats recentment en la propagació de la inflamació. Les molècules aconsegueixen llur estabilitat a l'aparellar els seus electrons en la formació d'enllaços covalents. Un radical lliure es defineix com un àtom o molècula amb un o més electrons desaparellats (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Els electrons desaparellats que caracteritzen un radical lliure d'oxigen els confereixen un alt nivell d'instabilitat i per tant una alta reactivitat química de la molècula. Per aquest motiu els radicals lliures d'oxigen només existeixen a baixes concentracions *in vivo* ( $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  mol/l) (Merry i col., 1989).

En els organismes aeròbics, l'oxigen molecular ( $O_2$ ) té un paper important com a acceptor d'electrons i s'ha demostrat que actua de mediador en moltes reaccions de radicals lliures a les cèl·lules. En el seu estat fonamental l' $O_2$  presenta dos electrons desaparellats, cada un d'ells localitzat a un orbital  $\pi$  antienllaçant diferent i amb spin paral·lel ( $\uparrow$ )( $\uparrow$ ). Si l' $O_2$  pretén oxidar un altre àtom o una altra molècula acceptant un parell d'electrons per ocupar les places lliures dels orbitals antienllaçants  $\pi$  de l' $O_2$ , cal que tinguin spins paral·lels entre ells i oposats amb els de l'oxigen per tal que a cada orbital hi hagi els dos electrons amb spin oposat. Això imposa una restricció que fa que l'oxigen accepti els electrons un per un. Per excitació, l'oxigen molecular dona lloc al radical oxigen singlet ( $^1O_2$ ) mentre que per reducció s'obté el radical superòxid  $O_2^-$ , ( $\uparrow\downarrow$ )( $\uparrow$ ). L'addició d'un altre electró al radical superòxid donarà lloc a l'ió peròxid  $O_2^{2-}$ , que ja no és un radical i que a pH fisiològic es protona ràpidament a peròxid d'hidrògen (Halliwell i Gutteridge, 1985; Torreilles i Guérin, 1989).



El  $H_2O_2$  no és un radical lliure, ja que no conté electrons desaparellats. Tanmateix és un oxidant amb alta capacitat de difusió, per la qual cosa es classifica com a *espècie reactiva d'oxigen (ROS)* un terme que engloba també els radicals lliures d'oxigen (Merry i col., 1989).

El peròxid d'hidrogen pot donar lloc, per fissió homolítica, al radical hidroxil ( $OH\cdot$ ).



El radical hidroxil és altament reactiu, capaç d'oxidar a la major part de molècules biològiques.

La formació del radical hidroxil és catalitzada pels ions dels metalls de transició, i en particular, pel ferro i pel coure, motiu pel qual s'implica el ferro en la propagació de la inflamació (veure apartat 4).

Els radicals lliures d'oxigen s'han relacionat amb la patogènesi de gairebé totes les malalties conegudes (Merry i col., 1989). El 1954 Gershman i Gilbert van proposar que les lesions provocades als organismes vius per concentracions excessives d'oxigen devien ser atribuïdes a la formació de radicals lliures. Però llur importància va ser demostrada quan McCord i Fridovich (1969) van descobrir la presència de l'enzim superòxid dismutasa (SOD) als organismes vius.

En condicions *in vivo*, els radicals lliures d'oxigen poden ser produïts a la cadena respiratòria, durant la fagocitosi, en la biosíntesi dels eicosanoides i en les reaccions oxidatives de detoxificació.

Durant la fagocitosi, el consum d'oxigen s'incrementa considerablement,

en el procés anomenat explosió respiratòria, amb l'objectiu de produir ROS, responsables de la mort dels patògens. En resposta als factors quimiotàctics, les cèl·lules fagocítiques (neutròfils i monòcits circulants) es dirigeixen al lloc de l'agressió. Els agents quimiotàctics inclouen un component del sistema del complement (C5a), leucotriens i polipèptids secretats pels mastòcits i basòfils.

Uns factors del plasma actuen en la partícula agressora per tal que pugui ser reconeguda pels fagòcits, aquest procés s'anomena *opsonització*. Les principals opsonines són immunoglobulines de la classe g (IgG) i proteïnes del complement.

Els principals estadis involucrats en la fagocitosi serien:

- Unió del complex antígen-anticòs als receptors de la membrana de les cèl·lules fagocítiques.

- Hiperpolarització de la membrana cel·lular, seguida per la despolarització i repolarització lenta (en 5-10 segons). Incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  lliure en el citoplasma.

- Les vesícules formades per endocitosi que contenen el complex antígen-anticòs es fusionen amb els lisosomes, donant lloc a un fagolisosoma.

- Es produeix la degranulació dels neutròfils, amb un alt increment en l'absorció d' $\text{O}_2$  i la taxa metabòlica.

Aquest procés constitueix l'explosió respiratòria amb una activitat incrementada de la derivació de les hexoses monofosfat i la producció de peròxid d'hidrògen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i anió superòxid ( $\text{O}_2^-$ ) (figura 5).

Hi ha dos sistemes enzimàtics implicats en la generació de ROS: el sistema NADPH oxidasa, lligat a la membrana plasmàtica que incorpora el citocrom b-245, responsable de la producció dels radicals superòxid, el qual per dismutació donarà lloc a peròxid d'hidrògen (Rossi, 1986) i el sistema mieloperoxidasa (MPO), una hemoproteïna localitzada als grànuls atzuròfils dels neutròfils. Aquest enzim és responsable de la producció d'hipoclorit ( $\text{HOCl}$ ) i altres cloramines, a partir del peròxid d'hidrogen (Torreilles i Guérin, 1989).

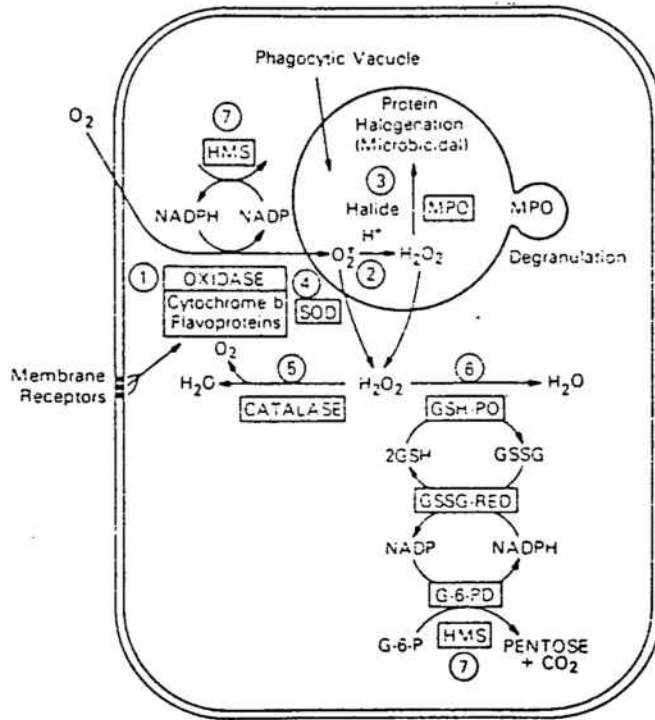


Figura 5: Producció de ROS durant la fagocitosis en els neutròfils. Vies metabòliques implicades (Root i Chen, 1981).

- 1.- Prèvia estimulació a la membrana del neutròfil, l'O<sub>2</sub> sofreix una reducció a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en una reacció catalitzada per una oxidasa que utilitza NADPH com a substrate.
- 2.- l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> és reduït per dismutació espontània a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 3.- La MPO és incorporada a la vacuola fagocítica on catalitza reaccions microbicides a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i d'halògens.
- 4.- L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que surt de la vacuola fagocítica és reduït a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per acció de la SOD.
- 5.- Per acció de la catalasa una part del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pot donar lloc a H<sub>2</sub>O i O<sub>2</sub>.
- 6.- La glutatió peroxidasa (GSH-PO) catalitza l'oxidació de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O.
- 7.- S'activa la via de les hexoses monofosfat (HMS) oxidant glucosa per a produir NADPH.

Després de la fagocitosi té lloc l'exocitosi, mecanisme pel qual els grànuls són buidats fora de la cèl.lula. Els neutròfils poden alliberar així una sèrie de factors que actuen sobre els teixits, lesionant-los i amplificant els processos inflamatori. En alguns casos, particularment si hi ha molts antígens al voltant del fagòcit, el lisosoma pot fusionar-se amb la vesícula endocítica abans que aquesta estigui totalment tancada, de manera que els enzims lisosomals s'alliberen al fluid extra-cel.lular.

La importància de la producció de ROS en els PMN s'ha posat de manifest al demostrar-se que les cèlules privades d'oxigen engloben, però no maten eficientment certs microbis (Mandell, 1974) i a l'estudiar-se el síndrome de la malaltia granulomatosa crònica. En aquesta malaltia l'explosió respiratòria no funciona, degut a una absència hereditària del citocrom b-245. Això dona lloc a infeccions bacterianes persistents malgrat que l'opsonització i la fagocitosi son normals (Segal, 1985).

### 3. Alteracions en el metabolisme dels metalls en la inflamació

Els processos inflamatoris, independentment de la seva etiologia, són capaços d'induïr canvis en la distribució i metabolisme de molts elements traça, tals com el coure, el zinc (Feldman i col., 1981d; Oliva i col., 1987) i el ferro (Carbonell i col., 1989; Hershko i col., 1974; Hershko i Konijn, 1977).

Les alteracions dels metalls apareixen lligades a una fase aguda de resposta de proteïnes plasmàtiques (Powanda i col., 1973; 1975) i podrien formar part d'un sistema de defensa que actuaria contra els agents inductors de la inflamació, essent aquest sistema activat pels factors dels fagòcits (Powanda, 1981).

#### 3.1. Mobilització del ferro

S'han observat canvis profunds en el metabolisme del ferro en malalties tan diverses com infecció, necrosi tissular, processos quirúrgics i carcinomes, suggerint una patogènesi comuna que depèn del grau de cronicitat de la malaltia.

En general, s'ha observat com les inflamacions agudes poden causar canvis transitoris en els nivells plasmàtics del ferro, transferrina i ferritina, mentre que el dany tissular continu associat a l'artritis reumatoide o a un tumor maligne produeix alteracions complexs en el *turnover* del ferro, les quals resulten en una redistribució del contingut de ferro en diversos teixits, eritropoiesi anormal i anèmia (Roeser, 1980).

L'anèmia de la inflamació i de les malalties cròniques (AICD) ha estat molt estudiada, tant en pacients crònics (Haurani i col., 1965) com en models experimentals (Feldman i col., 1981a; 1981b; Hershko i col., 1974; Hershko i Konijn, 1977; Mikolajew i col., 1969b). L'AICD va ser definida per Cartwright i Lee (1971) com una anèmia de grau mig i de gravetat no progressiva. Normalment l'AICD es manifesta com a normocítica i normocròmica, però ocasionalment pot esdevenir microcítica i hipocròmica (Birgegard, 1989) particularment als pacients de més cronicitat.

Molts dels símptomes clínics de l'AICD són similars a l'anèmia provocada per deficiència en ferro (Haurani i col., 1965): s'observa com els nivells de ferro plasmàtic són inferiors als normals mentre que la porfirina eritrocitària està elevada. Tanmateix l'AICD no respon a una teràpia amb ferro, manté valors baixos de la capacitat total de fixació del ferro per la transferina (TIBC) i no s'observa depleció de ferro als òrgans de reserva (Carbonell i col., 1989; Feldman i col., 1981d)

S'han suggerit diversos mecanismes per a explicar l'aparició de l'AICD. Un d'aquests mecanismes implicats podria ser la disminució de la vida mitja dels eritròcits, que ha estat descrita en pacients amb artritis reumatoide (Cavill i Bentley, 1982) així com en rates amb inflamació crònica induïda per adjuvant de Freund (Mikolajew i col., 1969b).

Cartwright i Lee (1971) varen atribuir la disminució de la vida mitja dels eritròcits a l'existència d'un factor extracorpúscular hemolític. Aquest factor hemolític explicaria perquè la vida mitja dels eritròcits procedents de donants sans disminueix quan són transferits a pacients artrítics, mentre que els eritròcits de pacients tenen una vida mitja normal quan són transferits a individus sans.

Una altra possible causa de la reducció de la vida mitja dels eritròcits seria la seva extracció de la circulació per un sistema RE hiperactiu, segons suggereix Lee (1983).

Aquestes dues observacions podrien explicar, en part, l'aparició de l'AICD. Però d'una manera més general, actualment s'accepta que l'AICD seria el resultat d'un balanç negatiu entre la destrucció i la producció d'eritròcits, de manera que l'eritropoiesi no seria suficient per a compensar la reducció de la vida mitja dels eritròcits. Segons aquesta hipòtesi durant la inflamació es produiria una reducció en la producció i síntesi d'eritropoietina o bé una disminució en la resposta de la medulla òssia a l'eritropoietina (Zarrabi i col., 1977). En aquest sentit els treballs de Schooley i col. (1987) mostren que la IL-1 inhibeix l'acció de l'eritropoietina en cultius cel·lulars.

D'altra banda Marchal i Milon (1986) proposen que els limfòcits T tindrien un paper en la regulació de l'eritropoiesi al secretar factors que la



inhibeixen.

La majoria dels autors, però, argumenten que la limitació de la proliferació eritrocitària durant la inflamació seria deguda a la disminució de la disponibilitat de ferro per a l'eritropoesi. Donat a que s'han observat reserves normals o altes de ferro a les cèl.lules del sistema RE i parenquimal, hom parla d'un *secrest* de ferro (Hershko i col., 1974; Lee, 1983; Mikolajew i col., 1969; Roeser, 1980).

A la figura 6 s'observa el *turnover* de ferro a les cèl.lules RE en condicions normals i durant la inflamació. Segons Roeser (1980) el *secrest* intracel.lular de ferro a les cel.lules RE seria degut a una combinació dels següents factors:

- Entrada accelerada de ferro a les cèl.lules RE, en forma d'hemoglobina (degut a la reducció de la vida mitja dels eritròcits), en forma de lactoferrina (resultat de l'increment de turnover i quelació del ferro en el fluid extracel.lular), i de transferrina (per l'increment de la capacitat de les cèl.lules RE d'extreure ferro de les proteïnes).

- Desviació del ferro RE incrementat a la fase ferritínica i hemosiderínica. L'increment en la taxa de síntesi de ferritina i la seva desviació a hemosiderina fa que aquest ferro sigui menys disponible per al *pool* de ferro plasmàtic.

Probablement la retenció de ferro en el sistema RE dels teixits quantitativament més importants i la reducció en l'absorció intestinal de ferro (Hershko i col., 1974) serien els responsables de la hipoferrèmia i, en darrer terme, de l'anèmia.

### 3.2.- Mobilització del coure.

El coure es troba en el plasma lligat principalment a la ceruloplasmina, però també pot acomplexar-se amb l'albumina i alguns aminoàcids. S'associa també a l'enzim superòxid dismutasa (SOD) tant en eritròcits com en leucòcits circulants.

El fetge és el principal òrgan de reserva de coure, on es troba lligat a la metalotioneïna i s'incorpora a la ceruloplasmina abans de circular per la sang

(Meacock i col., 1981).

Oliva i col. (1987) descriuen hipercuprèmia i increment en la concentració hepàtica de coure en rates artrítiques. Mentre que a gossos artrítics s'observa un augment de coure en sèrum acompanyat d'una disminució en la concentració hepàtica de ceruloplasmina i de coure (Feldman i col., 1981d).

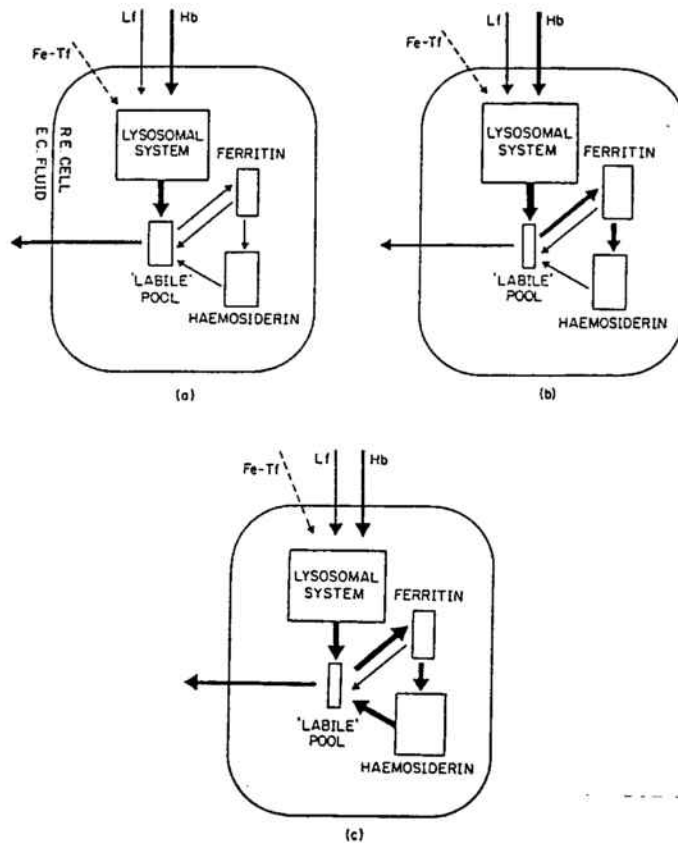


Figura 6: Esquema del turnover del ferro a les cèl·lules RE.

- En condicions normals.
- Durant la inflamació aguda.
- Durant la inflamació crònica.

Hb, hemoglobina; Lf, lactoferrina; Fe-Tf, ferro lligat a la transferrina; RE, cèl·lula del sistema retículo-endotelial; EC, fluid extracel·lular (Roeser, 1980).

#### 4.- El paper del ferro en la formació dels radicals lliures oxigenats.

Les ROS (veure apartat 2.3.10) formades a partir del dioxigen per reducció (superòxid, peròxid d'hidrogen i radical hidroxil) s'han implicat en un gran nombre d'estats fisiològics, toxicològics i patològics.

El paper catalitzador dels metalls de transició, principalment coure i ferro, ha estat reconegut com una part integral en la generació i en les reaccions d'aquestes espècies reactives d'oxigen. No obstant, en els sistemes biològics la concentració dels metalls de transició redox-actius sembla ser relativament baixa. Tanmateix, sota certes condicions, les proteïnes d'emmagatzematge i transport (ferritina, transferrina i ceruloplasmina) poden proveïr de metalls redox actius (Aust i col., 1985).

Factors com el pH i la capacitat dels quelants semblen governar la reactivitat dels metalls de transició amb el dioxigen i els radicals d'oxigen i, per conseqüència, influencien els mecanismes pels quals el dany oxidatiu als fosfolípids, DNA, proteïnes i altres biomolècules és iniciat.

##### 4.1.- El ferro i la formació del radical hidroxil.

El radical superòxid ( $O_2^-$ ) i el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) es formen en tots els organismes aeròbics, i, com hem vist (apartat 2.3.10) tenen un paper cabdal durant la fagocitosi.

Tant el  $O_2^-$  com el  $H_2O_2$  poden danyar directament les cèl·lules diana, però la seva reactivitat és limitada. Tanmateix, en presència d'un complex de ferro adequat, el  $O_2^-$  i el  $H_2O_2$  poden interactuar donant lloc a una espècie altament reactiva, el radical OH.

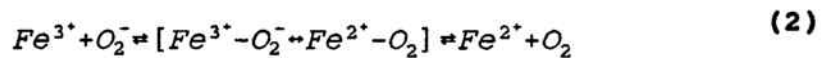
##### 4.1.1.- Reaccions del radical superòxid amb el ferro.

En un medi aquós el radical superòxid tendeix a dismutar-se en una reacció no enzimàtica per a donar  $H_2O_2$  i  $O_2$ .



A pH fisiològic la constant per a la dismutació no enzimàtica és de  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , i per a la dismutació enzimàtica  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  de manera que la família d'enzims de la superòxid dismutasa sembla protegir contra els efectes deleteris del  $O_2^-$ , reaccionant de manera ràpida i sense necessitat de cofactor.

Malgrat l'existència de la SOD, en solució aquosa, el  $O_2^-$  pot reduir el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Aquesta reacció es dona amb la formació d'una espècie (espècie perferril) que té una estructura intermèdia entre el  $Fe^{3+}$ -superòxid i el  $Fe^{2+}$ -oxigen:

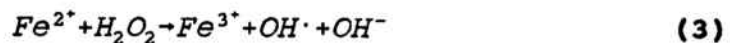


Aust i col., (1985) han suggerit que aquests complexos podrien actuar com a medi de transport dels radicals lliures d'oxigen des del lloc on es generen fins el lloc d'eventual reacció amb les molècules diana.

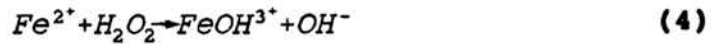
#### 4.1.2.- Reaccions del peròxid d'hidrogen amb el ferro.

##### - Reacció de Fenton

Malgrat que el  $H_2O_2$  és un potent agent oxidant, les seves reaccions amb compostos orgànics només es donen lentament, però pot actuar amb els metalls de transició per a formar un oxidant capaç de reaccionar amb les molècules orgàniques, en la reacció coneguda com a reacció de Fenton:



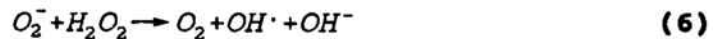
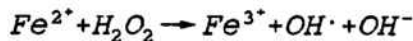
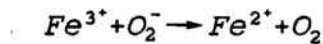
L'oxidant format en la reacció de Fenton és el radical hidroxil (OH·) i seria el responsable de les oxidacions a molècules orgàniques. Alguns autors, però, han postulat que en aquesta reacció es formaria un complex de ferro i oxigen, l'ió ferril ( $\text{FeO}^{2+}$  o bé  $\text{FeOH}^{3+}$ ), que seria, en darrer terme, l'espècie oxidant (Rush i Koppenol, 1986):



En revisions sobre el tema (Aust i col., 1985; Halliwell i Gutteridge, 1988) s'admet que tant l'ió ferril com l'hidroxil poden formar-se en la reacció de Fenton però donat que ambdós tindrien els mateixos efectes es tendeix a referir-se com al radical hidroxil a l'espècie reactiva formada.

#### - Reacció d'Haber-Weiss

La reacció d'Haber-Weiss (1934) va ser proposada com la reacció de formació de radicals lliures catalitzada pel ferro. De fet és la suma de dues reaccions anteriors, la reducció del metalls quelats pel superòxid (2) i la reacció de Fenton (3):



Atès que el radical superòxid proveeix el  $\text{Fe}^{2+}$  necessari per a reaccionar amb el  $\text{H}_2\text{O}_2$  i formar el OH·, aquesta reacció també rep el nom de *reacció de Fenton conduïda pel superòxid*.

## 4.2.- Agressió dels radicals lliures a les biomolècules.

El radical hidroxil, format a les reaccions de Fenton i d'Haber-Weiss pot oxidar els lípids, proteïnes, carbohidrats i DNA.

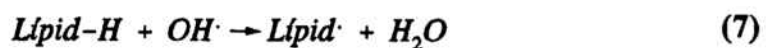
### 4.2.1.- Lipoperoxidació.

Un lloc potencial per a l'oxidació per part dels radicals és la membrana cel·lular. El procés resultant és la lipoperoxidació coneguda com a *rancidificació* que causa disminució en la fluïdesa de la membrana i impedeix les seves funcions normals (Sevanian i Hochstein, 1985).

La majoria de les membranes contenen al voltant d'un 40% de lípid i un 60% de proteïna. Els lípids de les membranes són en gran part polars. Hi predominen els fosfoglicèrids, amb quantitats menors d'esfingolípid. La relació de les diferents classes de lípids polars és característica del tipus de membrana, de l'òrgan i de l'espècie. Els lípids estan compostos per àcids grassos (AG), l'estructura dels quals està formada per una cadena hidrocarbonada, no ramificada en els animals, amb un grup polar carboxilat en un extrem i un grup no polar en l'altre. La cadena hidrocarbonada pot ser saturada o tenir un o més d'un dobles enllaços, essent llur longitud, juntament amb la posició i el nombre de dobles enllaços, el que els confereix llur especificitat.

La taxa de reaccions dels radicals amb els lípids de les membranes està influenciada per la quantitat d'àcids grassos poliinsaturats (AGPI) que contingui i el grau de llur insaturació (Fehér, 1987).

El radical  $\text{OH}\cdot$  pot iniciar el procés de lipoperoxidació a les membranes a l'extreure un àtom d'hidrogen d'una cadena senzilla d'AGPI:

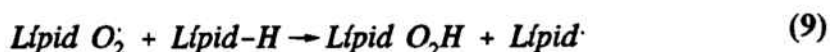


D'aquesta manera es forma el radical alcoxil (lípid)

La reacció següent més probable, en condicions aeròbiques, serà la formació de radical peroxil (lípid  $\text{O}_2\cdot$ ).



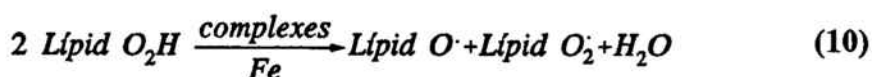
El radical peroxil pot extreure més àtoms d'hidrogen i propagar la cadena de reacció de la lipoperoxidació



donant lloc a la formació del lipoperòxid (lípid O<sub>2</sub>H) i del radical alcoxil.

El ferro pot contribuir a iniciar la lipoperoxidació a l'afavorir la generació del OH·, però, a més, s'ha descrit que els complexs del ferro i oxigen poden també ser capaços d'extreure àtoms d'hidrogen (Halliwell i Gutteridge, 1988). Així entre els possibles iniciadors del procés de lipoperoxidació de les membranes s'han descrit els compostos ferril (FeOH<sup>3+</sup> o FeO<sup>2+</sup>), perferril (Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub>· o Fe<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub>) i el complex Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>/oxigen (Minotti i Aust, 1987). Per altres autors (Aruoma i col., 1989), el mecanisme d'iniciació de la lipoperoxidació no és tan específic, ja que s'ha observat com el Al<sup>3+</sup> i el Pb<sup>2+</sup> podrien substituir el ferro en la iniciació de la lipoperoxidació.

Hi ha una altra manera addicional per la qual el ferro pot estimular la lipoperoxidació. Els lipoperòxids són, en condicions fisiològiques, fàcilment descomposables pels complexs del ferro, donant lloc a la formació de radicals peroxil i aldehids citotòxics:



Els radicals peroxil són, a la vegada, iniciadors i productes de la lipoperoxidació de manera que el procés s'autoperpetua. D'aquesta manera la descomposició depenent de ferro pot accelerar les taxes observades de peroxidació.

Molts AGPI de la membrana tenen enllaços dobles no conjugats i separats pel grup metilè. La presència d'un doble enllaç adjacent a un grup metilè fa que l'enllaç C-H sigui més dèbil i per tant més susceptible a que un hidrogen sigui extret (figura 7). Quan aquest s'ha extret, el radical produït s'estabilitza per

reordenament dels lligams dobles, per tal de formar un radical amb diene-conjugats, que pot, aleshores, ser peroxidat. Això significa que els lípids amb diversos grups metilats intercalats són particularment susceptibles a la peroxidació (Yagi, 1982).

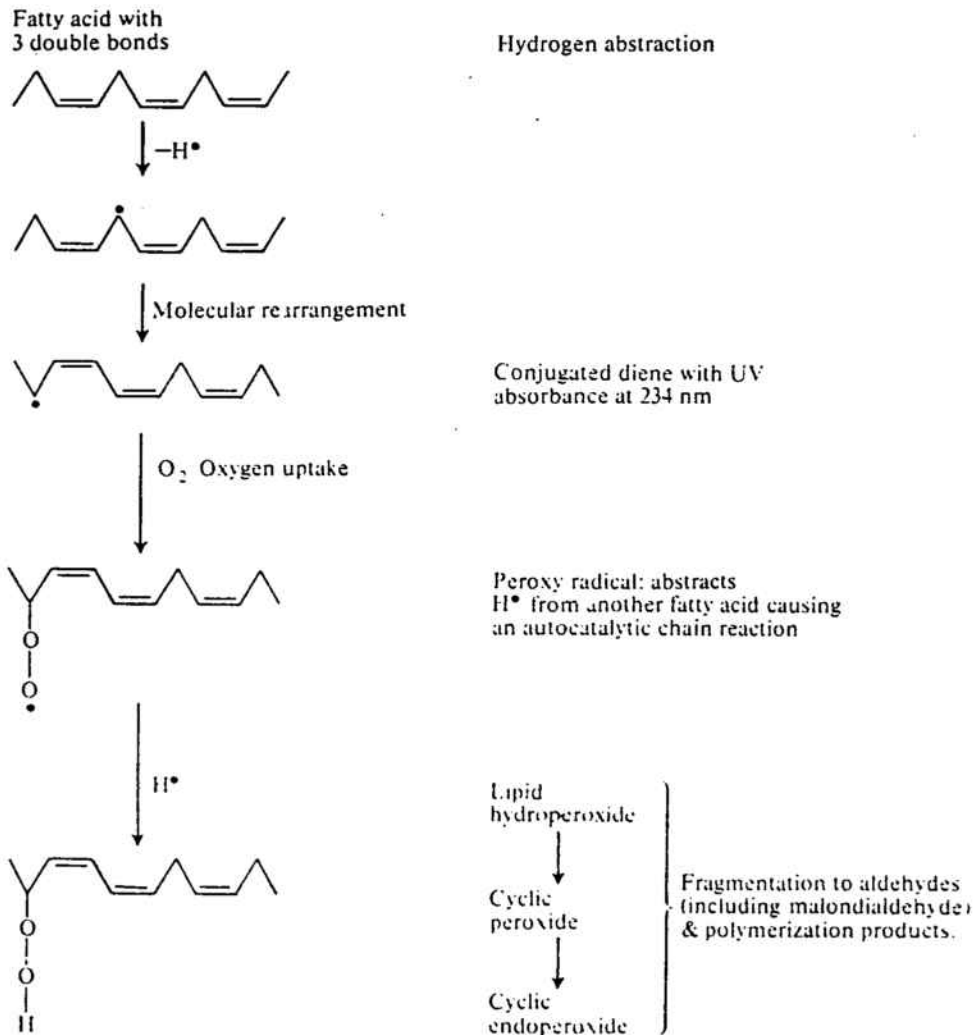


Figura 7: Peroxidació d'un lípid poliinsaturat (Halliwell i Gutteridge, 1989).



*In vivo* els lipoperòxids poden ser produïts de manera enzimàtica, en la cascada de l'àcid araquidònic, o no enzimàtica (lipoperoxidació). Aquests dos sistemes poden interactuar, ja que la producció de peroxids donarà lloc a l'activació de la cicloxigenasa (Merry i col., 1989).

Els productes de la lipoperoxidació poden inhibir la síntesi de proteïnes, bloquejar l'acció dels macròfags i alterar les funcions quimiotàctiques i enzimàtiques (Yagi, 1982). Un dels aldehyds citotòxics produïts és el malondialdèhid (MDA). El MDA pot atacar els grups amino de les proteïnes per a formar entrecreuaments intramoleculars i intermoleculars (figura 8).

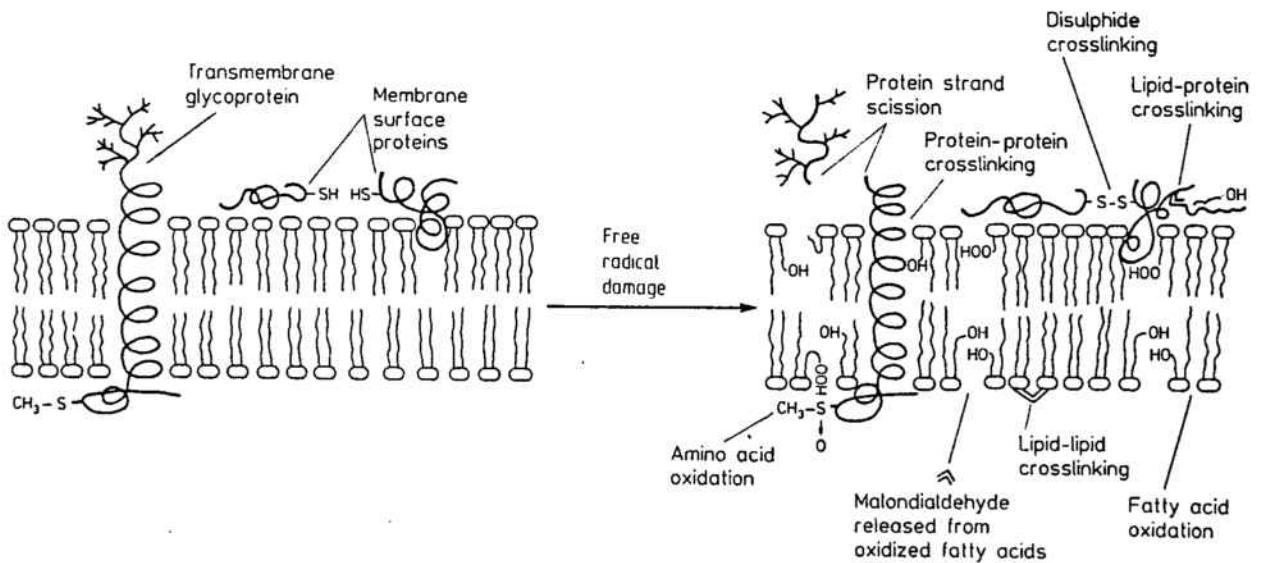


Figura 8: Dany oxidatiu induït pels radicals lliures a les membranes cel·lulars. (Fehér, 1987).

#### 4.2.2.- Proteïnes i DNA.

Les proteïnes exposades a ROS sofreixen desnaturalització, pèrdua de funció, entrecreuament, agregació i fragmentació (Merry i col., 1989). La generació de radicals hidroxil als llocs de fixació dels metalls de transició produeix un dany localitzat (Winyard i col., 1984).

Els radicals d'oxigen indueixen la hidroxilació de les bases del DNA i poden causar escissions en les cadenes sencilles i dobles. Com a les proteïnes, la generació del radical hidroxil en un lloc específic del DNA, catalitzada pel ferro lligat al DNA és altament perjudicial perquè aquests canvis podrien ser causa de la incorporació errònia de bases, originant mutacions somàtiques. Aquest fet suggereixen que els radicals hidroxil poden intervenir en la inducció de l'autoimmunitat i possiblement també en la carcinogènesi (Loels i col., 1988; Merry i col., 1989).

#### 4.3.- Naturalesa del ferro promotor de la lipoperoxidació *in vivo*.

Diversos autors (Jacobs, 1977; Halliwell i Gutteridge, 1985) han descrit la presència de *pools* de ferro lligat a compostos de baix pes molecular a les cèl.lules. Aquests *pools* consistirien en ions de ferro lligat a ADP, ATP i citrat. Els complexos de  $Fe^{3+}$  amb aquestes molècules poden reaccionar amb el radical superòxid (reacció 2) però en canvi la seva reactivitat amb el peròxid d'hidrogen sembla ser poc efectiva (Halliwell i Gutteridge, 1988). Degut a que la naturalesa química del *pool* intracel.lular de ferro és poc coneguda, és difícil determinar si aquest ferro pot promoure la formació del radical ( $OH\cdot$ ) *in vivo*. No obstant, si aquest ferro és un potencial catalitzador de la formació de radical hidroxil en el medi intracel.lular, aleshores els enzims intracel.lulars antioxidants esdevenen un mecanisme protector molt important (Fridovich, 1986b).

Respecte al ferro lligat a proteïnes, diversos estudis han suggerit que els ions de ferro lligats a transferrina, lactoferrina, hemoglobina, mioglobina, ferredoxina, ferritina o hemosiderina, no són capaços de reaccionar amb el

peròxid d'hidrògen per a formar radicals  $\text{OH}\cdot$  detectables fora de la proteïna (Aruoma i Halliwell, 1987; Gutteridge, 1986). Aquests estudis, però, no permeten confirmar si la formació de  $\text{OH}\cdot$  es pot produir a dins de la proteïna en el lloc d'unió amb el ferro. En aquest cas, la mateixa proteïna seria atacada degut a l'alta reactivitat del  $\text{OH}\cdot$ .

Malgrat que el ferro lligat a proteïnes sembla ser un ferro segur i no implicat en els processos oxidatius, s'ha observat que la peroxidació pot causar l'alliberament del ferro d'algunes d'aquestes proteïnes (Gutteridge, 1986).

La transferrina i la lactoferrina semblen ser resistents al stress oxidant. En canvi, l'hemoglobina és ràpidament degradada per excés de peròxid d'hidrògen, i pot alliberar ions de ferro. La mioglobina és també degradada per excés de peròxid d'hidrògen. La ferritina ha estat descrita com a estimuladora de la lipoperoxidació, probablement perquè l'escorça proteica seria atacada pels lipoperòxids, causant l'alliberament del ferro (Gutteridge i col., 1983). D'altra banda, s'ha implicat el radical superòxid en l'alliberament de ferro de la ferritina (Biemond i col., 1984), i, en un procés més lent, de l'hemosiderina (O'Connell i col., 1986).

#### **4.4.- Mecanismes de protecció contra l'agresió produïda pels radicals lliures.**

Els organismes vius estan protegits contra els efectes potencialment perjudicials de les reaccions amb radicals lliures per mecanismes estrictes de control.

Certes característiques de les membranes són responsables de llur protecció parcial en les reaccions de radicals lliures. Així els AGPI de les membranes, susceptibles de ser lipoperoxidats, estan localitzats a la regió hidrofòbica, lluny del lloc de transport d'electrons, ja que aquest es dona a la regió hidrofílica. Tanmateix, alguns agents químics com el  $\text{CCl}_4$  (Cambon-Gros i col., 1990), el DDT i substàncies carcinògenes poden penetrar a la regió hidrofòbica i iniciar reaccions de lipoperoxidació (Fehér i col., 1987).

Al medi intracel·lular, el principal mecanisme per a una defensa *in vivo* contra la toxicitat de l'oxigen és mantenir una baixa tensió d'oxigen als teixits (aprox. 26 mm Hg). Així la formació del radical superòxid es manté sota control. D'altra banda les cèl·lules contenen diversos enzims per a l'extracció de les espècies reactives d'oxigen.

El radical superòxid és captat per l'enzim superòxid dismutasa (SOD). S'han aïllat tres tipus de SOD, cadascuna amb un metall redox actiu diferent (manganés, ferro o coure). El metall que conté la SOD és reduït, en primer lloc, pel  $O_2^-$ , donant lloc a oxigen i seguidament és oxidat, per un segon  $O_2^-$ , donant lloc a  $H_2O_2$  (Fridovich, 1986a). El peròxid d'hidrògen, al seu torn, és extret per la catalasa i la glutatió peroxidasa.

Els antioxidants contitueixen un altre mecanisme de protecció intracel·lular contra la lipoperoxidació. Els antioxidants són definits per Halliwell i Gutteridge (1989) com a tota substància que, quan està present en baixa concentració comparat amb la concentració del substrat oxidable, retarda o inhibeix l'oxidació d'aquest substrat.

Com a antioxidants naturals, que es donen en sistemes biològics en condicions fisiològiques, es coneixen les vitamines E, C, A, i K; el seleni i compostos que contenen el grup tiol (cisteïna, cisteamina, glutatió) (Halliwell, 1990).

Els antioxidants poden actuar a diferents fases del procés de lipoperoxidació, i alguns actuen com a *scavengers*. La funció dels *scavengers* és reaccionar amb un radical per a produir un altre radical. El radical resultant ha de ser menys reactiu i, per tant, menys tòxic que l'inicial.

La vitamina E, principalment el  $\alpha$ -tocoferol, és un antioxidant liposoluble que pot reaccionar amb  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$  i amb lipoperòxids. En aquestes reaccions es produeix el radical tocoferil, el qual pot ser reduït a tocoferol per agents reductors com l'àcid ascorbic. La importància del tocoferol resideix en la seva solubilitat a la membrana (Burton i Ingold, 1986).

La vitamina C pot actuar com a antioxidant i com a prooxidant (Rose, 1990). A alta concentració l'àcid ascòrbic reduït inhibeix la lipoperoxidació a

l'actuar com a *scavenger* del radical  $\text{OH}\cdot$  i del  $\text{O}_2\cdot^-$ . En canvi, a concentració baixa i en presència d'ions metàl·lics catalítics pot estimular la generació del radical  $\text{OH}\cdot$ . Al citosòl i al sèrum l'ascorbat es manté a concentracions altes (37-78  $\mu\text{M}$ ).

Els grups tiol, per la seva banda, actuen com a *scavengers* pels radicals lliures al perdre un hidrogen del grup  $-\text{SH}$ . Els radicals tiil formats ( $-\text{S}\cdot$ ), poden interactuar entre ells i formar ponts disulfur ( $-\text{S}-\text{S}-$ ).

Un tercer mecanisme de defensa seria la descomposició dels productes finals de la lipoperoxidació mitjançant, probablement, enzims del metabolisme xenobiòtic. En aquest sentit s'ha descrit una activitat protectora del citocrom P-450 ja que podria actuar metabolitzant lípids endògens i prostaglandines (Fehér, 1987).

Comparat amb les cèl·lules, el medi extracel·lular està menys eficientment protegit de les reaccions amb radicals lliures. Una SOD d'alt pes molecular, la ceruloplasmina, la transferrina, i probablement també la glucosa i l'urat serien responsables de l'acció antioxidant. El paper biològic de la ceruloplasmina és el de ser una ferroxidasa que catalitza l'oxidació de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Aquesta darrera és la forma que es fixa a la transferrina. L'activitat ferroxidasa de la ceruloplasmina, en inhibir les reaccions dependents de  $\text{Fe}^{2+}$ , actua com un important antioxidant extracel·lular (Gutteridge i col., 1981).

Un factor limitant en la producció del radical  $\text{OH}\cdot$ , per la reacció de Fenton, seria la disponibilitat dels metalls de transició capaços de catalitzar aquesta reacció. Així les proteïnes fixadores de ferro eviten l'existència de grans quantitats de ferro lligat a compostos de baix pes molecular. Per aquest mateix motiu s'ha proposat (Gutteridge i col., 1979) un paper per als quelants de ferro en la prevenció de les malalties associades als processos de stress oxidant.

## 5.- Objectiu del treball

El ferro és un element vital al metabolisme dels vertebrats. Dos terços del ferro de l'organisme es troben en l'hemoglobina, però també està implicat en altres processos intracel·lulars, formant part de la composició d'enzims que intervenen en reaccions de catàlisi o en la respiració de les cèl·lules.

El paper del ferro en la inflamació i en les malalties cròniques és actualment objecte de molts estudis (Sousa, 1989). Les observacions clíniques de que la incidència de l'artritis reumatoide en dones incrementa després de la menopausa (Blake i col., 1981) o de que la deficiència en ferro en humans protegeix de certes infeccions bacterianes (Weinberg, 1984) ens confirmen l'existència d'una relació entre el ferro i els processos inflamatoris.

Una característica dels processos inflamatoris és l'aparició d'una anèmia (Haurani i col., 1965). L'estudi d'aquesta anèmia ha portat a la conclusió de que durant els processos inflamatoris es produeix un canvi en la distribució i el metabolisme del ferro, així com també d'altres elements traça (Meacock i col., 1981). Sorprenentment, però, Blake i Bacon (1982) van observar com l'administració oral de ferro a pacients amb artritis reumatoide donava lloc a l'agreujament de la sinovitis. Així doncs, hi hauria una segona relació entre el ferro i la inflamació, probablement degut al paper catalitzador del ferro en la reacció de Fenton, reacció que dona lloc a la formació de radicals lliures, mediadors implicats en la inflamació.

L'objectiu de la primera part d'aquest treball ha estat estudiar el paper del ferro en la inflamació. D'una banda s'han analitzat paràmetres relatius al metabolisme del ferro en animals inflamats, en un model experimental que ens permet estudiar l'evolució d'una inflamació aguda a una crònica. D'altra banda s'ha valorat la repercussió dels nivells de ferro en l'organisme en els paràmetres inflamatoris, creant una situació de sobrecàrrega, mitjançant l'administració de ferro-dextrà, i una situació de deficiència, administrant desferrioxamina, un potent quelant del ferro.

Els radicals lliures que actuen com a mediadors en els processos

inflamatoris poden atacar diverses biomolècules, entre elles els àcids grassos poliinsaturats dels lípids de les membranes cel·lulars, donant lloc a la lipoperoxidació, procés que disminueix la fluïdesa de les membranes impedit-ne les seves funcions normals. Degut a que la composició en àcids grassos poliinsaturats de les membranes està, en part, influenciada pels greixos de la dieta, es podria modificar l'estat de la inflamació variant el contingut en àcids grassos de la dieta. Per aquest motiu l'objectiu de la segona part del treball va estar dirigit a observar si l'alimentació amb una dieta deficient en àcids grassos poliinsaturats disminuïa els paràmetres de lipoperoxidació en animals inflamats. Administrant ferro-dextrà o desferrioxamina es va estudiar el paper del ferro en la propagació de la lipoperoxidació.

**PRIMERA PART:**

**METABOLISME DEL FERRO EN LA INFLAMACIÓ. MODULACIÓ PELS  
NIVELLS DE FERRO EN L'ORGANISME.**



## MATERIAL I METODES

### 1.- Animals i dietes.

L'estudi es va realitzar amb rates mascles de la soca Sprague Dawley de pesos compresos entre 150 i 200 g, procedents de l'estabulari de la Facultat.

Els animals es van mantenir amb aigua *ad libitum* i amb una dieta standard (Panlab, pinso de manteniment A-04) amb la següent composició:

- Valor calorífic 2.900 cal/kg
- Humitat 12%
- Pròtids 17%
- Lípids 3%
- Glúcids 58,7%
- Cel.lulosa 4,3%
- Minerals 5%

Per espectroscopia d'absorció atòmica vam analitzar el contingut en ferro del pinso, el qual va resultar ser de 304,78  $\mu\text{g}$  per g de pinso.

Les rates es mantien en grups de 4 animals en gàbies de plàstic, i es marcaven en diferents posicions amb àcid pícric per a la seva identificació durant l'experiència.

### 2.- Mètode experimental.

#### 2.1.- Inducció del granuloma per carragenina.

La substància inductora de la inflamació que es va utilitzar va ser la carragenina (Viscarín 402 de Marine Colloids, USA). La carragenina és un dels irritants no específics més utilitzats per a la producció i estudi de la inflamació. És una barreja de polisacàrids derivats d'algues marines (Brito, 1989). La seva activitat inflamatòria va ser estudiada per Winter i col. (1962) en el model inflamatori de l'edema subplantar en rata. El mecanisme pel qual causa

inflamació no es coneix, si bé destaca la seva capacitat d'activar el complement i de ser citotòxica per les cèl.lules, que es creu deu tenir un paper important en el desenvolupament del procés inflamatori.

El granuloma per carragenina es va induir seguint la tècnica descrita per Fukuhara i Tsurufuji (1969), que modifica l'anterior descrita per Seyle (1953) de formació d'una bossa d'aire subcutània.

Vint-i-quatre hores abans de l'administració de carragenina, s'injectaven en el dors dels animals 6 ml d'aire. En la bossa d'aire formada s'induïa la inflamació injectant 4 ml de la solució de carragenina que es preparava el dia de la prova al 2% en solució salina fisiològica estèril, tractada amb Chelex 100 (Bio-Rad) per tal d'eliminar les traces de ferro. S'escalfava fins a 100°C durant 15 minuts per dissoldre-la i es deixava refredar fins a temperatura ambient abans de la injecció. Totes les manipulacions es realitzaven amb les màximes condicions d'esterilitat.

En posició dorsal s'observava el desenvolupament del granuloma. La inflamació produïda s'avaluà mesurant la massa del granuloma format, la quantitat de fluid exsudat present en la cavitat i el nombre de cèl.lules que l'exsudat contenia.

Aquest model inflamatori permet estudiar la resposta inflamatòria de diferent cronicitat, segons el temps transcorregut des de la inducció de la inflamació.

Els animals varen ser sacrificats entre 1 i 8 dies després de la inducció de la inflamació. Previ al sacrifici els animals foren sotmesos a un dejuni de 18 hores amb aigua *ad libitum*.

### **2.1.1.- Administració de ferro-dextrà.**

L'acció d'una sobrecàrrega en ferro sobre la inflamació es va estudiar injectant el complex ferro-dextrà (Fe-dextrà; Imferon, Fisons plc. Anglaterra). El Fe-dextrà conté un 5% de ferro i 20% de dextrà (amb un pes molecular aproximat de 7.500) i es va injectar a la dosi de 100 mg/kg el mateix dia de

l'administració de carragenina a l'interior de la bossa d'aire.

### **2.1.2.- Administració de desferrioxamina.**

La deficiència en ferro sobre la inflamació es va estudiar administrant un quelant de ferro, desferrioxamina metasulfonat (Dfo; Desferal, laboratoris Ciba Geigy, Barcelona).

La Dfo és una hidroxilamina produïda per *Streptomyces pilosus* que li permet captar el ferro del seu ambient (Keberle, 1964). Aquest sideròfor lliga  $Fe^{3+}$  (una molècula de ferro fèrric per molècula de Dfo) amb una constant d'estabilitat molt alta ( $K_a = 10^{31}$ ) al mateix temps que presenta poca afinitat per altres ions metàl·lics. Per aquest motiu s'ha utilitzat molt la Dfo com a agent terapèutic en casos d'enverinament per ferro (Robotham i Lietman, 1980) i en pacients talassèmics amb sobrecàrrega de ferro deguda a la teràpia de transfusions (Modell i col., 1982).

La Dfo s'ha utilitzat també freqüentment per inhibir la producció de radicals hidroxil per la reacció de Fenton catalitzada pel ferro. Per aquest motiu contribueix a entendre millor el paper del ferro en els processos inflamatoris (Blake i col., 1983; Yoshino, 1984; Andrews i col., 1987).

La Dfo es va administrar a la dosi de 100 mg/kg i dia. L'administració s'iniciava 3 dies abans de la inducció de la inflamació injectant-la, dissolta en salí estèril, via subcutània. El mateix dia de la injecció de carragenina i fins el dia abans del sacrifici la Dfo s'administrava a l'interior de la bossa del granuloma.

## **3.- Obtenció de mostres.**

### **3.1.- Obtenció de plasma.**

El dia del sacrifici s'anestesiaven els animals amb èter. Es pesaven i es realitzava l'extracció de sang heparinitzada per punció cardíaca, seccionant el tòrax longitudinalment i exposant el cor. Per aquest procediment s'obtenien uns

El teixit format en el lloc de la inflamació (granuloma) era extret, separat de la dermis, rentat amb sèrum fisiològic i s'obtenia el seu pes humit.

#### **4.- Anàlisi hemàtiques relacionades amb el metabolisme del ferro.**

##### **4.1.- Hematòcrit.**

El microhematòcrit ens dóna, en una quantitat de sang total, quin volum és ocupat pels hematies.

La mostra de sang obtinguda s'havia d'agitar per inversió amb molta cura per tal de resuspendre les cèl.lules. Es submergeia un tub capil.lar per un dels seus extrems en el tub d'assaig que contenia la mostra de sang i l'altre extrem s'obturava amb una pasta. El capil.lar així obtingut es centrifugava en una centrífuga de microhematòcrit durant 6 minuts. La lectura del capil.lar centrifugat indicava quin percentatge del volum sanguini era ocupat per hematies i quina part per plasma.

##### **4.2.- Hemoglobina.**

La concentració d'hemoglobina en sang va ser determinada pel mètode de Drabkin i Austin (1935). Es va prendre una mostra de sang de 20  $\mu$ l i s'afegí a un tub que contenia 5 ml del reactiu de Drabkin, agitant bé fins a aconseguir una homogenització perfecta.

El reactiu de Drabkin va ser preparat amb ferricianur potàsic 0,61 mM, cianur potàsic 0,77 mM i bicarbonat potàsic 10 mM. Aquest reactiu pot ser conservat un mes a la foscor. La tècnica de Drabkin consisteix en la conversió de l'hemoglobina en cianmetahemoglobina, que és determinada 10 minuts després a 540 nm, longitud d'ona a la qual el seu espectre presenta un màxim d'absorció.

La concentració d'hemoglobina en sang s'expressa en g per 100 ml de sang.

### 4.3.- Ferro en plasma.

El ferro plasmàtic (siderèmia) va ésser determinat amb batofenantrolina seguint les recomanacions del International Committee for Standardization in Haematology (ICSH, 1971). Aquesta tècnica comporta la desproteïnitació prèvia del plasma per l'addició de HCl 1N i àcid tricloracètic 1,23 M a 0,5 ml de plasma. El sobrenedant de la desproteïnitació va ser recollit en un tub amb la solució cromògena.

La solució cromògena contenia piro-sulfit sòdic (0,1 M) i p-metil-amino-fenol (5,5 mM) que redueixen el  $\text{Fe}^{3+}$  (contingut a les proteïnes plasmàtiques) en  $\text{Fe}^{2+}$ , el qual forma un complex de color rosa amb la batofenantrolina disulfonada (0,51 mM preparada amb acetat sòdic 4 M). Aquest complex es va llegir a l'espectrofotòmetre a 540 nm de longitud d'ona front a un blanc d'aigua destil·lada i utilitzant com a standard una solució de  $\text{FeCl}_3$  17,9  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g}$  Fe/ml).

El material de vidre utilitzat en la preparació de les solucions va ser prèviament rentat amb àcid clorhídric diluït al 10% i amb aigua destil·lada per a eliminar les traces de ferro que pogués quedar adherides al vidre. També per aquest motiu es van utilitzar tubs de centrífuga de polipropilè.

El resultat s'expressa en  $\mu\text{g}$  de ferro per 100 ml de plasma.

### 4.4.- Capacitat total de fixació del ferro (TIBC).

El TIBC va ser determinat pel mètode descrit per Ramsay (1957). Aquest mètode consisteix en l'addició d'un excés de ions de  $\text{Fe}^{3+}$  al plasma o sèrum per tal de saturar la transferrina. A mostres de 0,5 ml de plasma heparinitzat se'ls va afegir 1,25 ml d'una solució de ferro 89,5  $\mu\text{M}$  i van ser incubats durant 20 minuts a temperatura ambient. El ferro no fixat va ser precipitat amb 0,1 g de carbonat alcalí de magnesi. Les mostres varen ser centrifugades i el sobrenedant s'utilitzà per a la determinació del ferro amb el mètode, ja descrit (apartat 4.3.), de la batofenantrolina amb desproteïnitació (ICSH 1971).

La capacitat total de fixació del ferro s'expressa en  $\mu\text{g}$  de ferro per 100 ml de plasma.

#### 4.5.- Ceruloplasmina en plasma.

El mètode utilitzat per a la determinació de la ceruloplasmina en plasma es basa en la tècnica descrita per Sunderman i Nomoto (1970).

Aquest mètode consisteix en mesurar l'oxidació d'un substrat, la p-fenil - endiamida dihidroclor (PPD). El color porpra resultant de l'oxidació del PPD-2HCl pot llegir-se a l'espectrofotòmetre a 525 nm i és proporcional a la concentració de ceruloplasmina.

Mostres de 0,1 ml de plasma varen ser incubades amb 2 ml de tampó acetat ( $\text{pH}=5,2$ ) i 1 ml de la solució de PPD (0,5 g en 100 ml de tampó acetat) a  $37^\circ\text{C}$ . A la reacció d'oxidació del PPD hi ha una fase de retard deguda a una oxidació inicial de l'àcid ascòrbic del sèrum. Per evitar un error de valoració en excés, es compta l'oxidació del PPD deguda a la ceruloplasmina a partir dels 5 minuts inicials: en una sèrie de mostres (referència) la reacció va ser aturada als 5 minuts amb l'addició d'azida sòdica 1,5 M, mentre que la segona sèrie s'incubà 30 minuts més (prova). Després de la incubació les mostres es varen centrifugar i l'absorbància del sobrenedant es va llegir a 525 nm contra un blanc de tampó acetat. El valor  $D.O._{\text{prova}} - D.O._{\text{referència}}$  per a cada mostra va ser interpolat a la corba patró. Aquesta va ser preparada amb ceruloplasmina comercial (Serva) en un rang de concentracions entre 10 mg/ml i 100 mg/ml (de  $2,4 \times 10^{-7}$  M a  $24 \times 10^{-7}$  M)

La concentració de ceruloplasmina en plasma s'expressa en mg per 100 ml de plasma.

#### 5.- Determinació de ferro als òrgans de reserva.

Es va determinar la concentració en ferro ferritínic i ferro no hemínic als òrgans de reserva fetge i melsa.

En primer lloc es va homogenitzar la mostra. En el cas del fetge es van prendre 2 g de teixit dels diferents lòbuls, ja que el ferro no està homogèniament repartit. En el cas de la melsa s'homogenitzà tot l'òrgan. L'homogenització es va fer en aigua destil·lada a la proporció de 1:4 (pes/volum) en un homogenitzador Braun amb vareta de teflon, segons la tècnica descrita per Drysdale i Munro (1966).

### 5.1.- Ferro ferritínic.

Per a la determinació del ferro ferritínic vam utilitzar la tècnica de Drysdale i Munro (1966). Aquesta tècnica respon a la propietat que té la ferritina de no desnaturalitzar-se a l'escalfar el teixit fins a 76°C. D'aquesta manera s'eliminen altres proteïnes de l'homogenat, que es coagulen.

Mostres d'homogenat del teixit van ser incubades incrementant la temperatura paulatinament de 40°C fins a 76°C en un bany d'aigua amb agitació. A l'arribar a aquesta temperatura altres proteïnes havien precipitat. Les mostres es varen centrifugar i el sobrenedant, que contenia la ferritina, va ser tractat amb sulfat d'amoni al 50% de saturació durant 12 hores a 0°C. D'aquesta manera la ferritina precipita. El precipitat va ser dissolt amb 0,2 ml d'aigua destil·lada i es sotmetè a una digestió àcida amb 0,5 ml d'una solució que contenia HCl 3N i àcid tricloracètic 0,61 M a 80°C durant 48 hores. Amb aquest procés el ferro s'allibera de l'escorça proteica.

El ferro així obtingut va ser determinat mitjançant el mètode de la batofenantrolina disulfonada. Es va prendre una alíquota del sobrenedant de la digestió (0,2 ml) que reaccionà amb 5 ml de la solució cromògena. Aquesta s'ha de preparar el mateix dia de la prova amb 1 volum d'una solució de batofenantrolina disulfonada 1,86 mM i àcid tioglicòlic 143 mM, 5 volums de solució saturada d'acetat sòdic i 5 volums d'aigua destil·lada.

L'absorbància es va llegir a 535 nm i els resultats es van interpolar a una corba patró preparada amb Tritisol (Merck, FeCl<sub>3</sub>) amb un rang de concentracions entre 0,5 i 10 µg de Fe/ ml.

Els resultats s'expressen en  $\mu\text{g}$  de ferro ferritínic per g de teixit o per òrgan total.

### **5.2.- Ferro no hemínic.**

El mètode de determinació del ferro no hemínic que vam utilitzar va ser descrit per Torrance i Bothwell (1980). Consisteix en l'extracció del ferro no hemínic mitjançant una hidròlisi àcida (ja que la molècula hemo n'és molt resistent) i la mesura del ferro així alliberat.

Utilitzant les condicions descrites per Torrance i Bothwell (1980) vam incubar 0,7 ml d'homogenat del teixit estudiat (fetge o melsa) amb 2 ml d'una solució àcida que contenia HCl 3M i àcid tricloracètic 0,61 M, durant 20 hores a 65°C a l'interior d'una estufa amb circulació d'aire calent. Durant la incubació el teixit es va desintegrar i vam obtenir un extracte clar i un petit residu fosc i viscos. Una petita alíquota de l'extracte va ser utilitzada per a la determinació del ferro, amb el cromògen batofenantrolina disulfonada tal i com s'ha descrit per al ferro ferritínic (apartat 5.1.)

Els resultats s'expressen en g de ferro no hemínic per gram de teixit o per òrgan total.

## **6.- Anàlisi dels paràmetres inflamatoris.**

### **6.1.- Comptatge, viabilitat i distribució cel.lular.**

Les cèl.lules obtingudes per centrifugació del líquid exsudat van ser tractades amb solucions hipoosmòtiques de NaCl per tal de lisar els hematies.

La lisi consistia en resuspendre les cèl.lules amb NaCl al 0,2% durant 2 minuts. Passat aquest temps s'afegia a la suspensió un volum igual de NaCl al 1,6%. Es procedia a la centrifugació de les cèl.lules a 900 xg a 4°C, i els hematies lisats es trobaven en el sobrenedant. Les cèl.lules precipitades es resuspenien en sèrum fisiològic.



El comptatge de les cèl.lules fou realitzat per duplicat microscòpicament amb un hemocitòmetre. Els resultats obtinguts expressen el nombre absolut de cèl.lules en exsudat total.

La viabilitat cel.lular s'estudià diluint la suspensió cel.lular al 50% (v/v) amb blau tripà al 2%. A les cèl.lules mortes el nucli es tenyeix amb el blau tripà. Comptant amb un hemocitòmetre, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl.lules vives respecte a cèl.lules mortes.

Per a distingir els diferents tipus cel.lulars presents en l'exsudat vam utilitzar la tècnica de l'esterasa no específica (Ornstein i col., 1973, 1976). Les esterases són enzims molt estesos a la natura que asseguren el procés de regulació. Són capaços d'hidrolitzar nombrosos substrats sintètics i per això poden ser fàcilment demostrables a cèl.lules o teixits. Amb aquest objectiu es van realitzar frotis amb la suspensió cel.lular que es tenyien amb  $\alpha$ -naftil butirat. La tècnica es basa en que el naftol és alliberat per una esterasa no específica i s'uneix a una sal dinitrogenada produint un nitrògen colorejat, brillant i insoluble que tenyeix els monòcits. Contrastant després amb blau metilè, que tenyeix els nuclis, s'observaven els nuclis polilobulats dels leucòcits polimorfonuclears.

Els resultats obtinguts s'expressen en percentatge dels diversos tipus cel.lulars.

## **6.2.- Observació de les cèl.lules amb microscopia electrònica.**

Les cèl.lules de l'exsudat inflamatori es varen observar amb microscopia electrònica de transmissió (MET) i de rastreig (MER).

Un cop aïllades, es varen fixar durant 2 hores a 4°C en una mescla d'aldehids que contenia glutaraldehyd al 2,5% i paraformaldehyd al 2%. Després de rentar les mostres en tampó fosfat es realitzà una postfixació durant 2 hores a 4°C amb una solució de tetraòxid d'osmi al 1,5%. Les mostres destinades a MET varen ser rentades amb tampó fosfat i deshidratades amb alcohol. Es realitzà una inclusió amb parafina i les seccions tallades amb un ultramicrotom varen ser observades amb un MET model Phillips 301. Les mostres preparades

per MER es varen deshidratar amb acetona i acetat d'amil. Després de ser recobertes amb una fina capa d'or es varen observar amb un MER model Cambridge S120.

### 6.3.- Quimioluminiscència.

L'activitat fagocítica de les cèl.lules de l'exsudat es va estudiar utilitzant la tècnica de la quimioluminiscència ampliada pel luminol (Allen i col., 1972; Bird i Giroud, 1985; Dowling i col., 1986).

Les cèl.lules que emigren al lloc de la inflamació són una font important de mediadors inflamatoris. Durant la fagocitosi es produeixen espècies reactives d'oxigen: radical superòxid, peròxid d'hidrògen, oxigen singlet i radical hidroxil. S'ha observat com l'alliberament d'aquestes espècies reactives d'oxigen estava associada amb l'emissió de llum (Trush i col; 1978). Això es dona perquè les molècules passen a un estat energètic excitat per l'absorció d'energia. Des d'aquest estat excitat la molècula torna al seu estat normal desprenent la diferència d'energia entre ambdós estats mitjançant l'emissió d'un fotó. Aquest procés s'ha anomenat quimioluminiscència nativa i degut a la baixa intensitat de la llum produïda no pot ser utilitzada com a mesura del procés fagocític (Cadenas i Sies, 1984). Tanmateix la producció de llum pot ser amplificada afegint un compost, com la lucigenina o el luminol, que interaccioni amb les espècies oxidants per a produir llum. En el nostre cas es va utilitzar luminol (figura 9).

El procés fagocític va ser així mesurat mitjançant el luminòmetre (Biocunter M 2010, LUMAC).

Com a estimulador de la fagocitosi es va utilitzar zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*). Per tal que els leucòcits reconeixessin les partícules de zymosan calia opsonitzar-les. L'opsonització consisteix en el recobriment de les proteïnes del llevat per anticossos provinents del sèrum. Amb aquesta finalitat, el zymosan va ser preparat amb sèrum fisiològic i es va dispersar sonicant amb ultrasons.

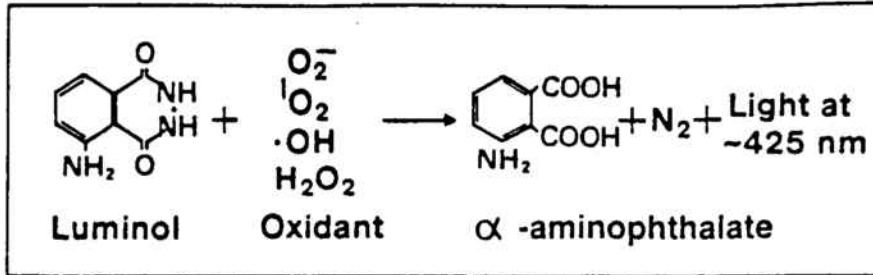


Figura 9: El luminol (5 amino-2, 3-dihidro-1, 4-ptalazinediò), quan interacciona amb les espècies reactives d'oxigen, produeix llum mesurable a 425 nm.

Després de bullir el zymosan, va ser centrifugat i es rentà el precipitat amb salí dues vegades. Es va opsonitzar dissolvent 150 mg de zymosan en 15 ml de sèrum fresc de rata i 15 ml de salí. Seguidament s'incubà a 37°C durant 30 minuts en un bany d'aigua amb agitació. Es va centrifugar i el precipitat (zymosan opsonitzat) fou dissolt en salí. Aquest procés es va repetir tres vegades. Finalment el zymosan opsonitzat fou resuspès en 25 ml de salí. Alíquotes de 1 ml (6 mg de zymosan opsonitzat) es van congelar a -40°C. El dia de la prova es descongelava i centrifugava el zymosan per a resuspendre'l amb medi 199 (Eurobio) a una concentració de 1 mg per ml de medi.

El protocol experimental consistia en incubar 200 µl d'una suspensió de 4x10<sup>6</sup> cèl.lules/ml (en medi 199) amb 100 µl de medi 199 i 100 µl de luminol (prèviament diluït amb dimetil sulfòxid al 1%) a la concentració 0,42 mM en medi 199. S'iniciava la lectura amb el luminòmetre. La gràfica que es registrava

dibuixava un pic inicial degut al peròxid d'hidrogen present a la suspensió cel·lular. Quan el pic baixava fins a establir-se en un mínim (aproximadament 1 minut) s'afegien 200  $\mu$ l de zymosan. Els leucòcits començaven a fagocitar les partícules de zymosan opsonitzat formant vacuoles de fagocitosi on anaven a parar les vacuoles lisosomals amb la producció dels diferents radicals, els quals travessaven la membrana cel·lular i reaccionaven amb el luminol. El luminol es transformava en el compost activat  $\alpha$ -aminoptalidanió el qual retornava a l'estat basal emeten un senyal lumínic a la longitud d'ona de 425 nm.

Es va registrar el màxim d'emissió i els resultats s'expressen en les unitats lumíniques relatives (RLU) detectades pel luminòmetre.

#### **6.4.- Determinació de ferro en l'exsudat.**

Ens interessava saber si en l'exsudat inflamatori hi havia ferro que pogués catalitzar la reacció de Fenton. Per aquest motiu vam analitzar mostres de l'exsudat segons la tècnica descrita per Gutteridge i col. (1981) i modificada per Gutteridge (1987) que detecta la presència de ferro lligat a compostos de baix pes molecular. S'utilitzà també la tècnica de Drysdale i Munro (1966) per a detectar la presència de ferro ferritínic, que varem modificar per aplicar-la a l'exsudat.

##### **6.4.1.- Ferro dèbilment lligat.**

La presència de ferro dèbilment lligat a molècules de baix pes molecular (ATP, AMP, àcids orgànics, grups polars dels lípids de les membranes, ADN) present en fluids corporals en casos patològics va ser detectada per Gutteridge i col. (1981). Aquests autors van trobar concentracions  $\mu$ M de ferro a fluids biològics (fluid sinovial humà procedent de pacients amb artritis reumatoide, líquid cerebrospinal humà i fluid pleural de rata) que serien suficients per a formar radicals hidroxil a partir del radical superòxid i del peròxid d'hidrogen.

La tècnica que descriuen es basa en que el ferro dèbilment lligat és

alliberat de les molècules de baix pes molecular i s'uneix a la bleomicina. En presència d'ascorbat, la bleomicina-Fe (II) degrada el DNA originant uns productes que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBA) (figura 10). La degradació del DNA per la bleomicina és totalment depenent de la presència d'ions Fe (II). D'una banda, aquest mètode no detecta el ferro lligat a proteïnes. De l'altra, encara que altres ions metàl·lics s'uneixin a la bleomicina, aquestes unions no resulten en degradació del DNA. Per tot això, la taxa de degradació del DNA pot ser utilitzada com a mesura del ferro unit a molècules de baix pes molecular.

Les mostres d'exsudat (100 - 200  $\mu$ l) van ser incubades 2 hores a 37 °C amb 35  $\mu$ u de bleomicina (Bleomicina, laboratoris Almirall) i 500  $\mu$ g de DNA en presència de 0,75  $\mu$ mol d'àcid ascòrbic. Per tal de bloquejar els radicals produïts al DNA es va afegir 0,1 ml d'una solució de MgCl<sub>2</sub> 50 mM. El pH de les mostres es va mantenir al voltant de 7,3. Tots els reactius es varen preparar amb aigua lliure de pirògens i van ser tractats amb Chelex-100 per tal d'extreure tanta contaminació de ferro com fos possible. També per aquest motiu la reacció va tenir lloc en tubs de plàstic.

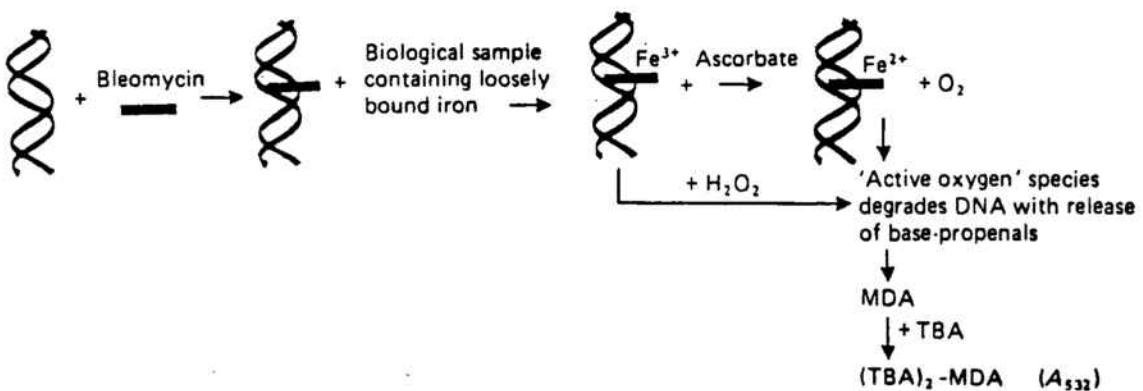


Figura 10: Degradació del DNA per part de la Blm-Fe (II), tècnica per a detectar el ferro lligat a molècules de baix pes molecular (Gutteridge, 1987).

En aquestes condicions el ferro s'uneix al fàrmac neoplàsic bleomicina i en presència d'oxigen i ascorbat degrada el DNA produïnt fragments semblants al malondialdehid (fragments TBA-reactius).

La reacció va ser aturada amb 0,1 ml d'EDTA 0,1 M. Les mostres foren transferides a tubs de vidre per a la detecció dels productes fragmentats del DNA. Incubant 10 minuts a 100 °C amb 1 ml d'àcid tiobarbitúric (TBA al 1 % en NaOH 50 mM) i 1ml de HCl 8 N, es va obtenir un compost colorejat l'absorbància del qual es mesurà a 532 nm. La corba patró es va preparar amb FeCl<sub>3</sub> amb concentracions entre 0,3 i 10 μmol de ferro.

Els resultats obtinguts es van expressar en nmol de ferro per exsudat total i en concentració nM.

#### **6.4.2.- Ferro ferrític.**

La presència de ferro lligat a la ferritina es va determinar en 0,1 ml d'exsudat basant-nos en la tècnica ja descrita de Drysdale i Munro (1966). Els resultats obtinguts els vàrem expressar en μmol de ferro per exsudat total i en nM.

#### **6.5.- Ceruloplasmina en exsudat.**

La ceruloplasmina continguda en el fluid exsudat va ser determinada per la tècnica abans descrita de Sunderman i Nomoto (1970) en 0,1 ml d'exsudat. Els resultats es van expressar en μg de proteïna per ml d'exsudat.

#### **6.6.- PGE<sub>2</sub> en exsudat.**

Els valors fisiològics normals d'eicosanoides són molt baixos i per això calen mètodes d'alta sensibilitat per a la determinació d'aquests compostos en líquids biològics. En el cas de la determinació dels nivells de PGE<sub>2</sub> en exsudat es va utilitzar un radioimmunoassaig (RIA KIT, Advanced Magnetics Inc;

Massachusetts, U.S.A.)

Aquest RIA permet la quantificació dels nivells de la  $PGE_2$  en fluids biològics. El principi del RIA es basa en la competència d'un compost en una mostra biològica ( $PGE_2$ ) amb un compost marcat radioactivament ( $^3H$ - $PGE_2$ ) per un nombre limitat de llocs d'un anticòs específic (anti- $PGE_2$ ). Quant més alta és la concentració del compost en la mostra menys compost marcat es lligarà a l'anticòs específic. El compost lligat a l'anticòs es separa del no lligat amb carbó actiu i dextrà magnètic per centrifugació i és quantificat amb un comptador de centelleig líquid.

Abans d'aplicar el RIA, s'havia de realitzar l'extracció de les prostaglandines de la mostra d'exsudat. Amb aquesta finalitat, a una mostra de 0,2 ml d'exsudat se li va afegir HCl per a reduir el pH a valors àcids, entre 3 i 4. S'afegien també 3 volums d'acetat d'etil i s'agitava bé la mostra amb un vòrtex. La fase orgànica es separava de l'aquosa per centrifugació (10 minuts a 4°C a 2000 xg). Es recollien 2,5 ml de la fase orgànica i amb nitrogen s'evaporava l'acetat d'etil. El residu era diluït en 0,5 ml de tampó fosfat (0,01 M de fosfat amb 0,1% de  $\gamma$ -globulina bovina i 0,1 % d'azida sòdica, a pH 7) i els tubs s'agitaven durant 30 minuts.

Una corba patró va ser preparada diluïnt una patró de  $PGE_2$  de 100 ng/ml en tubs de polipropilè amb tampó fosfat en el rang entre 8,2 i 2000 pg/0,1 ml.

L'assaig consistia en incubar 100  $\mu$ l de cada punt de la patró, mostra o tampó fosfat amb 100  $\mu$ l de  $PGE_2$  marcada amb triti i 100  $\mu$ l d'anti- $PGE_2$  preparada en conill, a 25°C en un bany d'aigua amb agitació durant 2 hores. Després de la incubació s'afegien 750  $\mu$ l de carbó actiu amb dextrà lligat a partícules magnètiques (Mag DCC amb 0,1 % d'azida sòdica) a cada tub i s'agitava durant 3-5 segons.

Seguidament, en un interval de temps no superior a 5 minuts, es centrifugaven els tubs a 1800 xg durant 15 minuts per tal de separar la  $PGE_2$  lliure de la lligada a l'anticòs, la qual queda en el sobrenedant. Aquesta va ser quantificada en 0,5 ml de sobrenedant amb 3,5 ml de líquid de centelleig. D'aquesta manera es varen obtenir els comptes per minut (cpm) de cada mostra,

blanc i patró. Per a cada mostra o patró es va calcular el percentatge lligat normalitzat restant el blanc a cada valor i fent una correcció amb el valor 0 de la recta patró, que era la que no contenia PGE<sub>2</sub> freda.

La quantitat de PGE<sub>2</sub> a cada mostra es va determinar interpolant el percentatge lligat normalitzat de cada mostra en la corba patró.

Els resultats venen expressats en ng de PGE<sub>2</sub> per ml d'exsudat.

## **7.- Disseny experimental.**

### **7.1.- Experiment 1.**

Es va treballar amb 2 grups de 8 animals.

- Grup control: Es van injectar 6 ml d'aire al dors dels animals. Seguits 24 hores després de 4 ml de salí estèril.

- Grup inflammat: Es van injectar al dors dels animals 6 ml d'aire. Després de 24 hores es van injectar a la bossa d'aire 4 ml de carragenina al 2%.

Els animals van ser sacrificats a 1 i 8 dies després de la injecció de salí o carragenina.

### **7.2.- Experiment 2.**

Es va treballar amb grups de 8 animals (figura 11).

- Grup inflammat (I): Es van injectar 6 ml d'aire al dors dels animals, seguits 24 hores després de la injecció dorsal via subcutània de 4 ml de carragenina al 2%. Grups de 8 animals van ser sacrificats a les 0 hores i 1, 2, 4, 6 i 8 dies després de la inducció de la inflamació per carragenina.

- Grup inflammat + Fe-dextrà (I Fe): Com s'ha descrit per al grup anterior es va induir la inflamació. Al mateix temps que s'injectava la carragenina es va administrar Fe-dextrà a la dosi de 100 mg de Fe/kg a la bossa d'aire. Els animals es varen sacrificar a 1, 2, 4, 6 i 8 dies després de la inducció de la inflamació.

- Grup inflammat + Desferrioxamina (I Dfo): La Dfo a la dosi de 50 mg/kg



es va administrar subcutàniament des de 3 dies abans de l'administració de carragenina i després directament a la bossa del granuloma fins al dia anterior al sacrifici. Els animals es varen sacrificar a 1, 2, 4, 6 i 8 dies després de la inducció de la inflamació.

Tots els grups varen ser injectats amb salí estèril per tal d'obtenir el mateix volum final de líquid injectat.

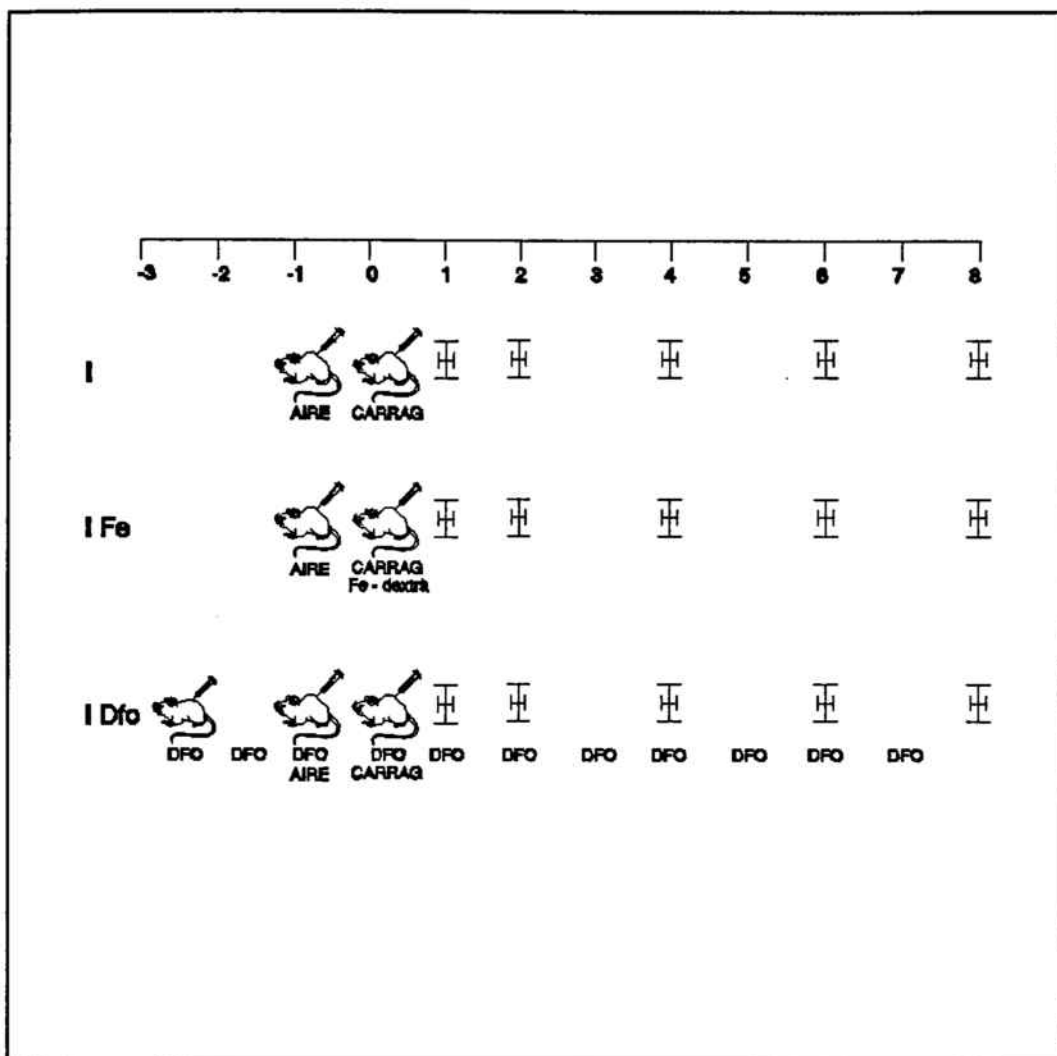


Figura 11: Esquema dels tractaments administrats.

## 8.- Criteris estadístics aplicats.

### 8.1.- Experiment 1.

Els resultats vénen expressats per la mitja de 8 animals  $\pm$  el seu error standard (ESM). El grup inflammat s'ha comparat amb el corresponent control aplicant el test t de comparació de mitges, donant per suposat que les variables biològiques que s'han estudiat segueixen distribucions Normals.

El test de comparació de mitges ( $m_1$  i  $m_2$ ) de dues poblacions Normals amb variança comú ( $\sigma$ ) i desconeguda es basa en el següent resultat:

Siguin

$$x_1, \dots, x_{n_1}$$

variables aleatòries independents amb distribució Normal N ( $m_1, \sigma$ )

i

$$y_1, \dots, y_{n_2}$$

variables aleatòries independents amb distribució Normal N ( $m_2, \sigma$ )

Suposem que ambdós conjunts de variables són també independents entre sí.

Si considerem el contrast d'hipòtesi:

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_1: m_1 \neq m_2$$

Si  $H_0$  és certa, l'estadístic:

$$t = \frac{(\bar{x}_{n_1} - \bar{y}_{n_2})}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) (n_1 s_x^2 + n_2 s_y^2)}}} \quad (1)$$

(1) Segueix una t de Student amb  $(n_1 + n_2 - 2)$  graus de llibertat. (Essent  $x_{n_1}$  i  $y_{n_2}$  les mitges, i  $s_x^2$  i  $s_y^2$  les desviacions standard de les variables aleatòries  $x_1, \dots, x_{n_1}$  i  $y_1, \dots, y_{n_2}$ .)

Els valors de la distribució t de Student estan tabulats i les taules donen l'àrea de les dues cues de la distribució per a cada valor dels graus de llibertat.

Si:

$|t| > t_\epsilon$  es rebutja  $H_0$

$t_\epsilon$  és tal que  $p(|t| > t_\epsilon) = \epsilon$

Els coeficients de confiança  $1-\epsilon$  escollits han estat del 95% (\* $p < 0,05$ ), 99% (\*\* $p < 0,01$ ) i 99,9 % (\*\* $p < 0,001$ ) (Alonso i col; 1979; Finney, 1980).

## 8.2.- Experiment 2.

Els resultats vénen expressats per la mitja de 8 animals i el seu error standard (ESM).

En el **grup inflammat** les dades varen ser avaluades mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA) amb 6 poblacions per variable. De manera que si tenim  $k$  poblacions simultànies:

$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n_1}$

$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n_2}$

.....

$y_{k1}, y_{k2}, \dots, y_{kn_k}$

i representem per  $y_i$  la mitja de la mostra a la població  $i$ , i per  $y_{..}$  la mitja total de totes les variables observades, es calcula l'estadístic:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (y_i - y_{..})^2 / (k-1)}{\sum_{i,j} (y_{ij} - y_i)^2 / (n-k)} \quad (2)$$

Que segueix la distribució F de Fisher-Snedecor amb  $(k-1, n-k)$  graus de llibertat. El criteri de decisió és el següent: fixat el nivell de significació  $\epsilon$  ( en el nostre cas del 0,05), es determina F tal que

$$p(F > F_\epsilon) = \epsilon$$

Quan  $F > F_\epsilon$  es rebutja la hipòtesi que les mitges de les poblacions són

iguals.

Quan els efectes de la variable eren estadísticament diferents els seus grups es van comparar amb un mètode de comparances múltiples. Vam utilitzar el test de Bonferroni que permet comparar les poblacions anteriors per parelles, construïnt intervals de confiança per als paràmetres que representen aquestes mitges (Miller, 1966; Cuadras, 1984).

A les mitges i errors se'ls donà una lletra que permetès la comparació de la significació estadística entre grups. Grups de la mateixa fila que tenen almenys una lletra en comú no són estadísticament diferents.

Els **grups tractats amb Fe-dextrà** i els **grups tractats amb Dfo** s'han comparat estadísticament respecte al grup inflammat corresponent amb el test de la t-Student (apartat 8.1.) prenent  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Aquests càlculs estadístics es van realitzar al Centre de Càlcul de la Facultat de Biologia amb el programa p2V (BMDP Statistical Software. University of California, 1983).

## RESULTATS

### Experiment 1:

#### **1.1- Pes corporal.**

Es van utilitzar rates de pesos compresos entre 169 i 230 g (taula II). No s'aprecien diferències al comparar els grups inflamats amb els seus controls. L'increment de pes va ser similar en els dos grups durant els 7 dies de la prova.

#### **1.2.- Valors hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.**

##### **1.2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.**

Els valors de l'hematòcrit i de l'hemoglobina són a la taula II. S'observa un descens en l'hematòcrit als animals inflamats de 8 dies ( $p > 0,01$ ) i no es detecten canvis en la concentració d'hemoglobina en sang a animals inflamats respecte als seus controls.

##### **1.2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.**

Un dia després de produir-se la inflamació es presenta ja la hipoferrèmia descrita a les malalties inflamatòries, observant-se un descens important en els nivells de ferro plasmàtic (taula III) arribant a  $55 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ . Aquest descens fa disminuir el percentatge de saturació de la transferrina al grup d'un dia des d'un 38% (animals control) a un 14% (animals inflamats) al no modificar-se el TIBC. Als vuit dies de produir-se la inflamació els valors de ferro plasmàtic s'estan recuperant, car la transferrina està saturada al 22%, encara que sense assolir els nivells normals. Observem també que no hi ha variacions respecte als valors de ferro plasmàtic i de TIBC entre els animals control de 1 o 8 dies.

Taula II: Pes corporal, hematòcrit i hemoglobina a animals control i inflamats a 1 i 8 dies després d'induir-se la inflamació.

Dia	Grup	Pes corporal (g)	Hematòcrit (%)	Hemoglobina (g/100ml)
1	Control	188 ± 10,0	39,7 ± 1,0	14,6 ± 0,60
	Inflamat	173 ± 4,0	39,9 ± 0,9	14,3 ± 0,80
8	Control	222 ± 8,9	42,0 ± 0,5	14,9 ± 0,23
	Inflamat	216 ± 8,0	37,1 ± 1,2**	14,2 ± 0,70

Mitja ± ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

### 1.2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.

Respecte a la concentració de ceruloplasmina en plasma (taula III), tant a 1 com a 8 dies, els animals inflamats mostren uns valors incrementats d'aquesta proteïna ( $p < 0,01$ ) mentre que es manté la seva concentració en els grups control.

### 1.3.- Pes del fetge i la melsa i contingut en ferro.

#### 1.3.1.- Pes i reserves de ferro al fetge.

El pes del fetge (taula IV) és superior en els animals inflamats a 1 dia de produir-se la inflamació ( $p < 0,05$ ) però no s'observen diferències el dia 8.

Les reserves en fetge estan incrementades als grups inflamats, tant a 1 com a 8 dies d'induir-se la inflamació. Això s'observa quan els resultats s'expressen en  $\mu\text{g}$  de ferro per g de teixit (taula IV) com en  $\mu\text{g}$  de ferro per òrgan total (figures 12 i 13).

El percentatge que representa el ferro ferritínic respecte el ferro no hemínic del fetge (taula IV) és d'un 22% als animals control i d'un 30% als inflamats a 1 dia de produir-se la inflamació. El dia 8, el ferro emmagatzemat com a ferro ferritínic representa el 27% del ferro no hemínic contingut en fetge als animals control i el 31% als inflamats. Així l'increment del ferro de reserva durant la inflamació afavoreix l'emmagatzematge en forma de ferro ferritínic sobretot a 1 dia. D'altra banda és important remarcar que no hi ha diferències en el ferro de reserva al fetge entre els grups control de 1 i 8 dies.

#### 1.3.2.- Pes i reserves de ferro a la melsa.

No hi ha diferències quant al pes de la melsa dels diferents grups.

A la melsa les reserves en ferro estan incrementades a 1 i 8 dies als animals inflamats (taula V, figures 14 i 15). Respecte a la forma com



Taula III: Ferro, capacitat total de fixació de ferro per la transferrina (TIBC), saturació de la transferrina i ceruloplasmina al plasma d'animals control i inflamats a 1 i 8 dies després d'induir-se la inflamació.

Dia	Grup	Fe plasmàtic ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	TIBC ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Saturació transf(%)	Ceruloplasmina ( $\text{mg}/100\text{ml}$ )
1	Control	145 $\pm$ 15,9	382 $\pm$ 10	38	38,2 $\pm$ 1,64
	Inflamat	55 $\pm$ 6,5***	386 $\pm$ 18	14	53,7 $\pm$ 4,14**
8	Control	147 $\pm$ 17,0	397 $\pm$ 16	37	38,2 $\pm$ 2,24
	Inflamat	93 $\pm$ 10,3*	417 $\pm$ 15	22	73,2 $\pm$ 10,87**

Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Taula IV: Pes del fetge i reserves de ferro al fetge en forma de ferro ferrític i no hemínic a animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Dia	Grup	Pes fetge (g)	Fe ferrític ( $\mu\text{g Fe/g}$ )	Fe no hemínic ( $\mu\text{g Fe/g}$ )	Fe ft/Fe no hem (%)
1	Control	7,3 $\pm$ 0,4	13,4 $\pm$ 1,4	68,0 $\pm$ 4,0	22
	Inflamat	8,7 $\pm$ 0,4*	29,6 $\pm$ 2,3***	91,7 $\pm$ 5,0**	30
8	Control	8,1 $\pm$ 0,5	16,1 $\pm$ 1,9	67,0 $\pm$ 3,6	27
	Inflamat	7,7 $\pm$ 0,2	24,0 $\pm$ 2,0*	79,1 $\pm$ 3,8*	31

Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

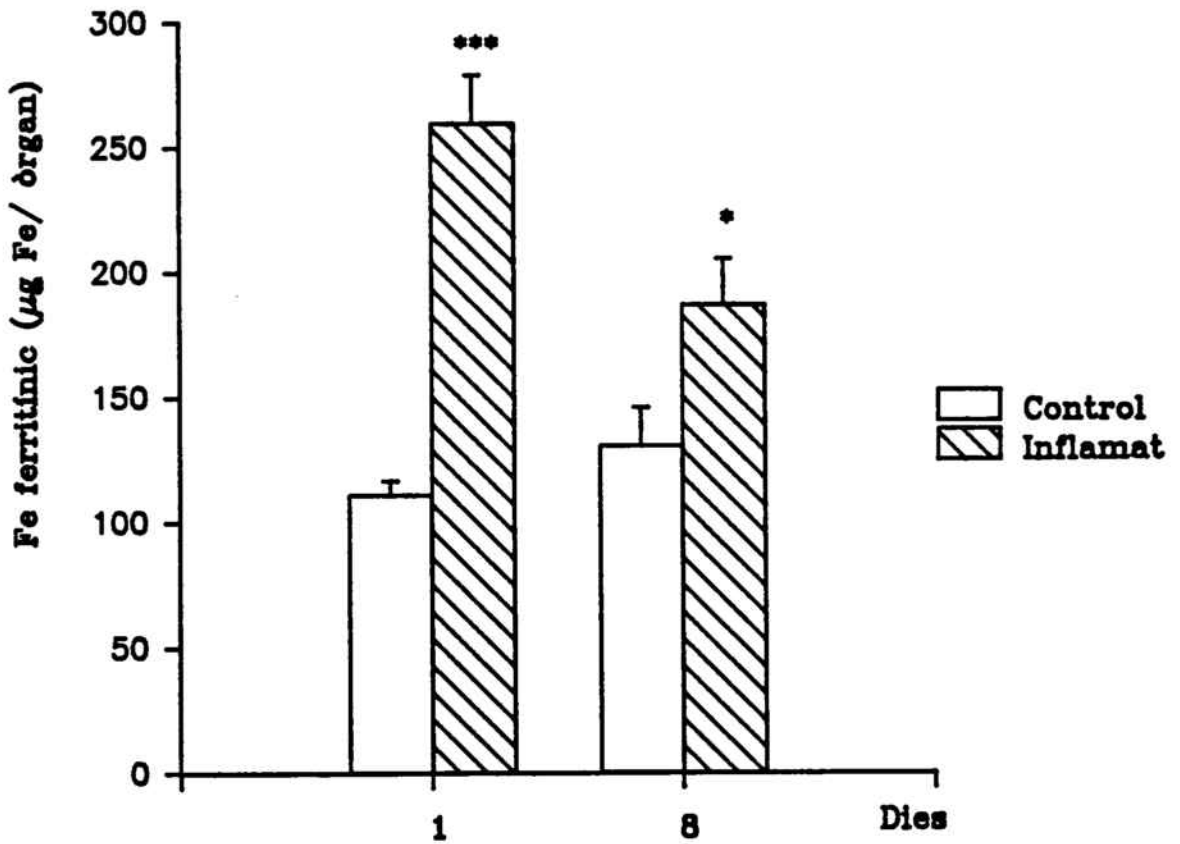


Figura 12: Ferro ferritínic al fetge d'animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

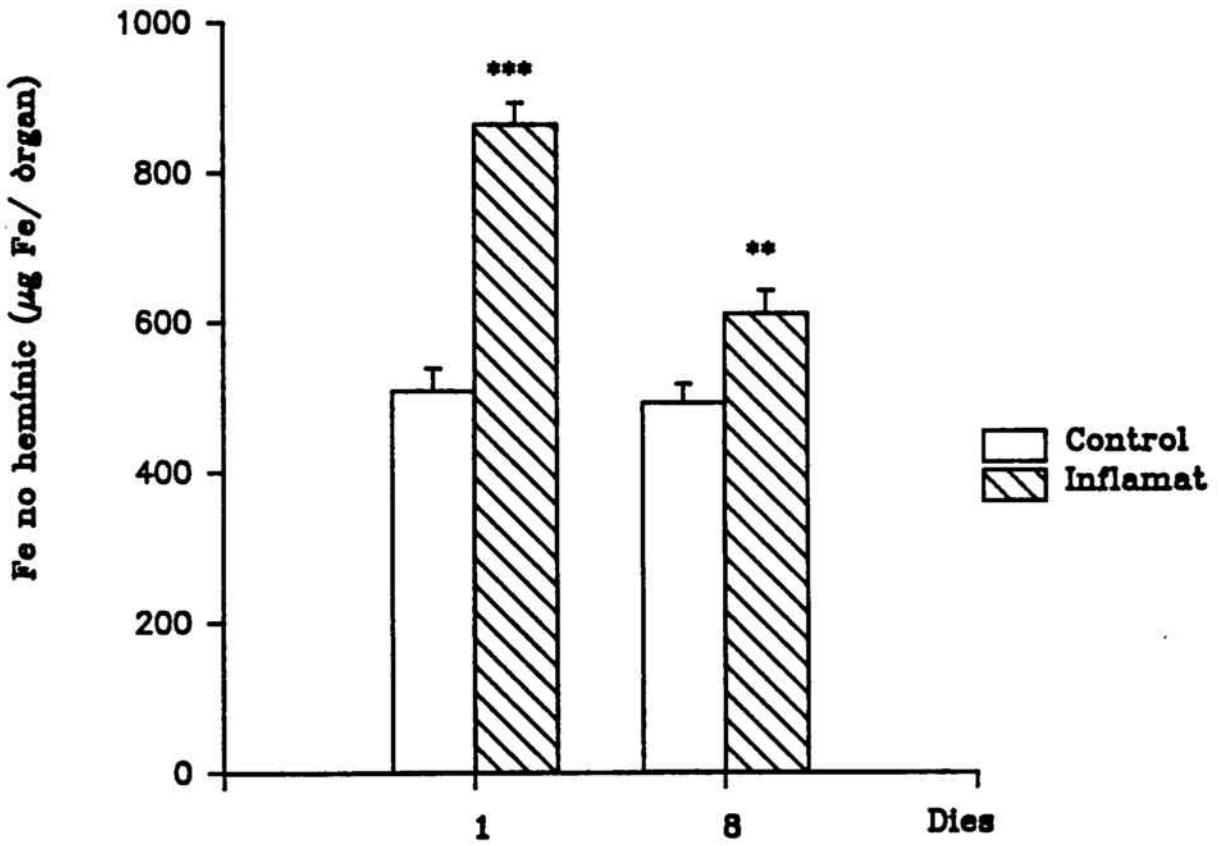


Figura 13: Ferro no hemínic al fetge d'animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Taula V: Pes de la melsa i reserves de ferro a la melsa en forma de ferro ferrític i no hemínic a animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Dia	Grup	Pes melsa (g)	Fe ferrític ( $\mu\text{g Fe/g}$ )	Fe no hemínic ( $\mu\text{g Fe/g}$ )	Fe ft/Fe no hem (%)
1	Control	0,7 $\pm$ 0,02	14,0 $\pm$ 1,75	45,5 $\pm$ 3,0	31
	Inflamat	0,6 $\pm$ 0,04	21,7 $\pm$ 1,00**	67,8 $\pm$ 5,0**	31
8	Control	0,8 $\pm$ 0,02	14,0 $\pm$ 1,69	36,3 $\pm$ 4,9	41
	Inflamat	0,9 $\pm$ 0,07	15,6 $\pm$ 1,87	67,5 $\pm$ 6,7**	27

Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

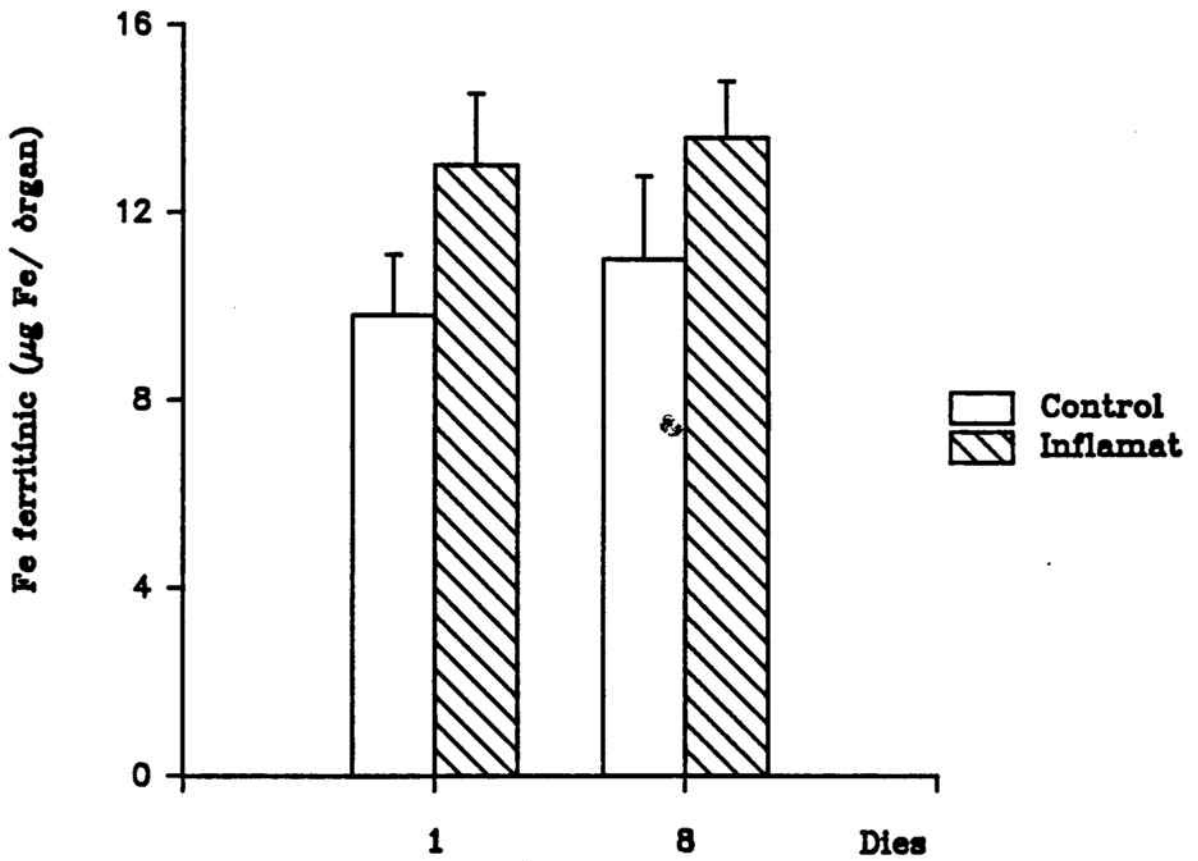


Figura 14: Ferro ferritínic a la melsa d'animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

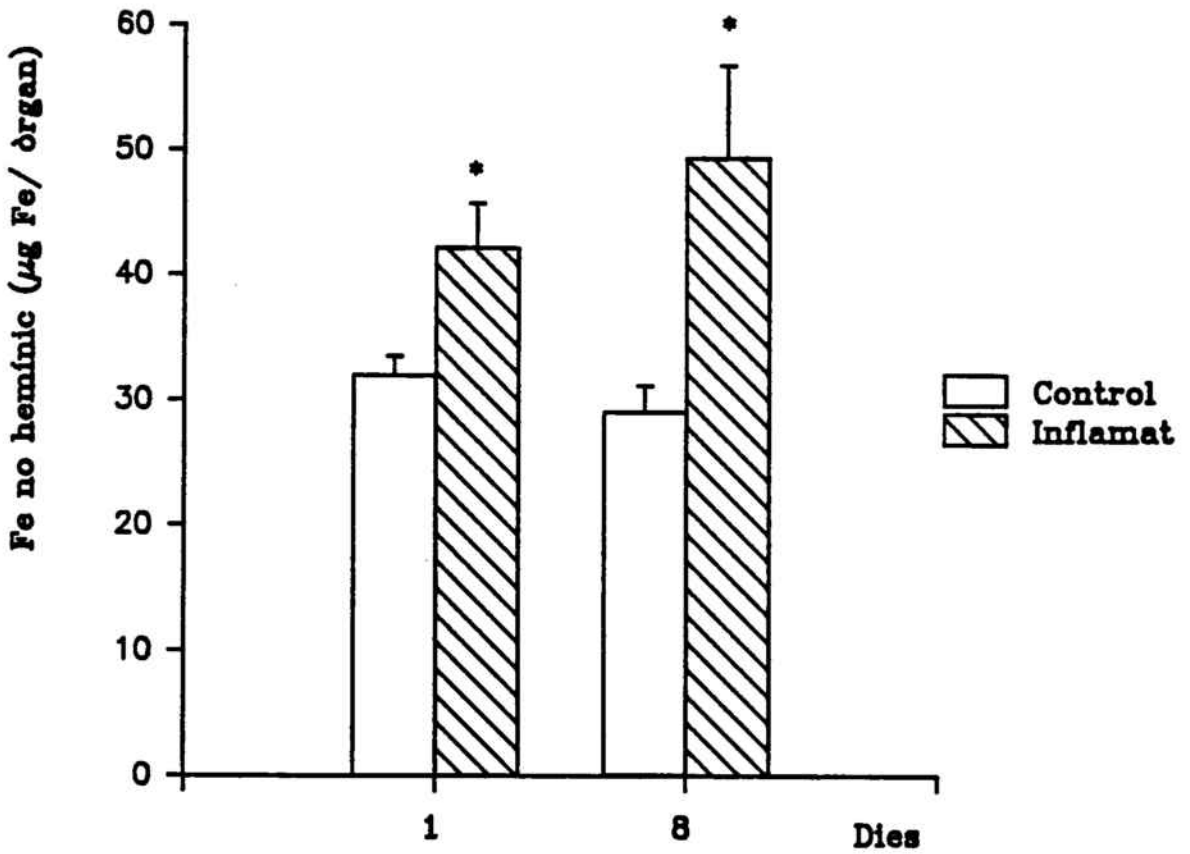


Figura 15: Ferro no hemínic a la melsa d'animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte al grup control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

s'emmagatzema el ferro (taula V), el dia 1 de la inducció de la inflamació s'observa un increment del ferro ferritínic, però no el dia 8. D'aquesta manera el percentatge de ferro ferritínic respecte a no hemínic és del 31% a animals control i inflamats el dia 1, mentre que al dia 8 disminueix d'un 41% als animals control a un 27% als inflamats. En melsa, doncs, la inflamació està afavorint l'emmagatzematge de ferro en forma de ferro hemosiderínic.

#### **1.4.- Paràmetres inflamatoris.**

Al grup control, l'administració en el dors dels animals de 4 ml de sèrum fisiològic estèril, precedida de la injecció de 6 ml d'aire, no originà cap procés inflamatori, com es dedueix de l'absència de granuloma i d'exsudació, tant al grup estudiat a 1 dia de l'administració de sèrum com al de 8 dies després (taula VI).

En el grup estimulat amb la injecció de carragenina al 2% s'observa l'aparició d'un teixit granulomatós (figura 16). El dia 1 el granuloma té 7,0 g de pes humit i s'incrementa el dia 8 fins a 17,2 g (taula VI). El volum d'exsudat va passar de 2,3 ml a 17,7 ml del primer al vuitè dia respectivament de la inducció de la inflamació.

Degut a que l'administració de salí no produeix exsudació ni formació de granuloma aquest grup pot considerar-se com a grup control. En aquest control no s'han observat modificacions quant al metabolisme del ferro en els 7 dies que va durar l'experiment, per la qual cosa es va considerar que es podia eliminar aquest grup en l'estudi evolutiu del procés inflamatori de 1 a 8 dies, i considerar un grup inflammat a temps 0 com a grup control.





Figura 16: Granuloma format en posició dorsolateral en una rata als 8 dies de l'administració de carragenina al 2%.

Taula VI: Pes del granuloma i volum d'exsudat a animals control i inflamats a 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Dia	Grup	Pes granuloma (g)	Volum exsudat (ml)
1	Control	----	----
	Inflamat	$7,0 \pm 0,37$	$2,3 \pm 0,77$
8	Control	----	----
	Inflamat	$17,2 \pm 1,66$	$17,7 \pm 4,94$

## **Experiment 2:**

### **2.1.- Pes corporal.**

Els animals utilitzats tenien pesos compresos entre 175 i 250 g (taula VII). Les variacions obtingudes quant al pes corporal en els grups d'animals inflamats o tractats amb Fe-dextrà i Dfo no poden ser imputades només als tractaments, sino probablement aquestes diferències ja existien quan es varen rebre els animals i varen ser distribuïts en lots. Aquesta distribució es va fer de manera que les rates que es sacrificaven un mateix dia tinguessin pesos semblants a l'inici dels tractaments.

### **2.2.- Valor hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.**

#### **2.2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.**

Al llarg del desenvolupament del procés inflamatori s'observa un lleuger descens de l'hematòcrit els dies 2 i 6 d'induir-se la inflamació amb valors del 36,4 % (taula VII), mentre que la concentració d'hemoglobina és mínima el dia 6 (12,8 g/100 ml, respecte als 14,5 g/100 ml inicials).

L'administració de Fe-dextrà no canvia ni l'hematòcrit ni la concentració d'hemoglobina dels animals inflamats.

El tractament amb Dfo tampoc no altera els valors d'hematòcrit. S'observa, no obstant, una tendència a la disminució dels valors de l'hemoglobina, que es manté entre 13,6 g/100 ml i 12,8 g/100 ml però que només és significativa a un dia de la inducció ( $p < 0,05$ ).

#### **2.2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.**

A la taula VIII s'observa al grup inflammat un valor molt baix de ferro plasmàtic durant tot el procés inflamatori, que es manifesta sobretot a 1 i 6 dies

Taula VII: Pes corporal, hematòcrit i hemoglobina a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 0 i 8 dies de produir-se la inflamació.

Grup	0 hores	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies	
Pes corporal (g)	I	188 ± 2,2 <sup>a</sup>	228 ± 2,5 <sup>d</sup>	198 ± 4,9 <sup>ab</sup>	199 ± 4,0 <sup>b</sup>	213 ± 3,6 <sup>c</sup>	194 ± 3,4 <sup>ab</sup>
	I Fe		220 ± 5,0	207 ± 4,8	195 ± 3,3	185 ± 3,2 <sup>**</sup>	181 ± 5,9
	I Dfo		218 ± 4,3	199 ± 3,3	212 ± 2,7 <sup>*</sup>	200 ± 1,5 <sup>*</sup>	185 ± 7,8
Hematòcrit (%)	I	39,3 ± 1,3 <sup>bc</sup>	40,0 ± 0,7 <sup>c</sup>	36,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	38,4 ± 0,5 <sup>bc</sup>	36,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	37,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>
	I Fe		39,2 ± 0,7	37,8 ± 0,8	37,3 ± 0,7	37,8 ± 0,8	36,1 ± 0,8
	I Dfo		37,5 ± 1,8	35,8 ± 0,8	37,2 ± 1,4	37,8 ± 0,9	36,1 ± 0,9
Hemoglobina (g/100 ml)	I	14,5 ± 0,6 <sup>bc</sup>	15,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	13,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>	14,6 ± 0,5 <sup>bc</sup>	12,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	13,5 ± 0,3 <sup>ab</sup>
	I Fe		14,7 ± 0,3	12,8 ± 0,3	14,0 ± 0,3	13,5 ± 0,3	13,3 ± 0,3
	I Dfo		12,9 ± 0,6 <sup>*</sup>	12,9 ± 0,3	13,0 ± 0,5	12,8 ± 0,3	13,6 ± 0,5

Mitja ± ESM de 8 animals. Les mitges dels animals inflamats (I) d'una mateixa fila que no estan seguides de la mateixa lletra (a, b, c, d) són significativament diferents per l'anàlisi de la varianza ( $p < 0,05$ ) i pel test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Les diferències entre animals del grup I amb els grups I Fe i I Dfo s'han analitzat amb el test t-Student ( $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

de la inducció (38  $\mu\text{g Fe/ml}$  i 54,4  $\mu\text{g Fe/ml}$  respectivament).

En el grup tractat amb Fe-dextrà el ferro plasmàtic està molt poc incrementat respecte al grup inflammat durant tot el procés, llevat del dia 1 en el qual aquest increment és significatiu ( $p < 0,05$ ).

En canvi, és en el grup tractat amb Dfo on s'observen valors més alts de ferro plasmàtic, a 1 (79  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) i 2 (109  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) dies de la inducció aquest increment és significatiu respecte al grup control.

Cal remarcar la mateixa tendència en els tres grups: El ferro plasmàtic és baix a 1 dia, es recupera el dia 2 per a tornar a baixar els dies 4, 6 i 8.

La capacitat total de fixació del ferro per la transferrina (TIBC) es manté sempre dins de valors fisiològics normals (taula VIII), presentant-se incrementada durant tot el procés inflamatori.

El tractament amb Fe-dextrà dóna lloc a un descens del TIBC el dia 1 de la inducció ( $p < 0,001$ ), mentre que es mantenen els nivells en la resta de grups.

En el grups tractats amb Dfo es mantenen els nivells de TIBC excepte un increment ( $p < 0,05$ ) el dia 2.

És interessant estudiar el percentatge de saturació de la transferrina (taula VIII). Aquest valor, degut a una davallada del ferro plasmàtic durant la inflamació, es manté sempre molt baix (per sota del 26% del grup inflammat a temps 0). El percentatge de saturació de la transferrina és mínim el dia 1 (9,5%), incrementa el dia 2 (19,3%) per a mantenir-se al voltant del 15% fins al dia 8.

Els tractaments amb Fe-dextrà i Dfo tenen un comportament semblant respecte al percentatge de saturació de la transferrina. Aquest és més alt que el grup inflammat els dies 1 i 2 per a disminuir a valors propers al grup inflammat la resta de dies.

### **2.2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.**

A la taula VIII s'observen els nivells de la ceruloplasmina en plasma, que van augmentant a mesura que progressa la inflamació, amb un valor màxim els dies 4 i 6, on obtenim 85 i 86,1  $\text{mg}/100\text{ ml}$  respectivament, front als 38,2

Taula VIII: Ferro, capacitat total de fixació de ferro per la transferrina (TIBC), saturació de la transferrina i ceruloplasmina al plasma d'animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 0 i 8 dies de produir-se la inflamació.

Grup	0 hores	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
<b>Fe plasmàtic</b>						
( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )						
I	89,0 $\pm$ 6,4 <sup>d</sup>	38,0 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>	81,2 $\pm$ 3,1 <sup>d</sup>	66,1 $\pm$ 3,8 <sup>c</sup>	54,4 $\pm$ 8,1 <sup>ab</sup>	63,7 $\pm$ 7,4 <sup>bc</sup>
I Fe		67,0 $\pm$ 9,9 <sup>c</sup>	101,0 $\pm$ 11,7	67,0 $\pm$ 1,9	63,0 $\pm$ 2,7	85,6 $\pm$ 15,9
I Dfo		79,0 $\pm$ 15,2 <sup>c</sup>	109,0 $\pm$ 6,8 <sup>**</sup>	77,0 $\pm$ 10,2	65,0 $\pm$ 5,2	72,0 $\pm$ 6,8
<b>TIBC</b>						
( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )						
I	338 $\pm$ 11,5 <sup>a</sup>	399 $\pm$ 10,3 <sup>bc</sup>	421 $\pm$ 13,8 <sup>c</sup>	426 $\pm$ 13,8 <sup>c</sup>	387 $\pm$ 11,1 <sup>b</sup>	416 $\pm$ 10,4 <sup>bc</sup>
I Fe		315 $\pm$ 11,8 <sup>***</sup>	438 $\pm$ 8,5	420 $\pm$ 13,8	376 $\pm$ 5,9	487 $\pm$ 21,4
I Dfo		404 $\pm$ 39,2	494 $\pm$ 23,6 <sup>*</sup>	427 $\pm$ 29,8	440 $\pm$ 32,6	486 $\pm$ 35,5
<b>Saturació transf. (%)</b>						
I	26,3	9,5	19,3	15,5	14,1	15,3
I Fe		21,3	23,1	16,0	16,8	17,6
I Dfo		19,6	22,1	18,0	14,8	14,8
<b>Ceruloplasmina</b>						
( $\text{mg}/100 \text{ ml}$ )						
I	38,2 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	53,7 $\pm$ 4,14 <sup>b</sup>	63,1 $\pm$ 4,00 <sup>b</sup>	85,0 $\pm$ 7,20 <sup>f</sup>	86,1 $\pm$ 5,10 <sup>e</sup>	67,8 $\pm$ 11,6 <sup>bc</sup>
I Fe		55,3 $\pm$ 3,33	63,5 $\pm$ 2,97	81,6 $\pm$ 3,60	86,7 $\pm$ 3,06	55,8 $\pm$ 6,2
I Dfo		36,9 $\pm$ 2,01 <sup>**</sup>	42,2 $\pm$ 1,85 <sup>***</sup>	42,7 $\pm$ 4,93 <sup>***</sup>	52,5 $\pm$ 4,55 <sup>***</sup>	112,7 $\pm$ 5,3 <sup>**</sup>

Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

mg/100ml del grup inflammat a temps 0.

Els valors de ceruloplasmina en els grups tractats amb Fe-dextrà no són estadísticament diferents dels animals inflamats, mentre que en el grup tractat amb Dfo la concentració de ceruloplasmina en plasma està disminuïda respecte al grup inflammat sense tractament els dies 1 ( $p < 0,01$ ), 2, 4 i 6 ( $p < 0,001$ ) i incrementada en el dia 8 ( $p < 0,01$ ).

### **2.3.- Pes del fetge i la melsa i contingut en ferro.**

#### **2.3.1.- Pes i reserves de ferro al fetge.**

El pes del fetge (taula IX) va variant poc al llarg del procés, depenent aquesta dada del pes dels animals. Els tractaments administrats no modifiquen el pes del fetge, excepte en el grup tractat amb Fe-dextrà el dia 2 de la inducció ( $p < 0,05$ ).

Al grup inflammat les reserves de ferro en fetge (taula IX) van incrementant-se amb el temps, observant-se un màxim de ferro no hemínic el dia 2 de la inducció ( $84,4 \mu\text{g Fe/g}$  de teixit) i el dia 4 de ferro ferritínic ( $35 \mu\text{g Fe/g}$  de teixit). El dia 6 de la inducció, el ferro ferritínic representa un  $48,5\%$  respecte al ferro no hemínic de fetge, a partir del qual disminueix el percentatge de ferro ferritínic respecte al ferro no hemínic ( $31,8\%$  el dia 8). Degut que a temps 0 el ferro ferritínic representa el  $19\%$  del ferro no hemínic, podem concloure que el ferro va essent emmagatzemat en primer lloc com a ferro ferritínic, i a partir del dia 6 es va reconvertint en ferro hemosiderínic. En òrgan total s'observa també un màxim quant a ferro ferritínic el dia 4 (figura 17) i com a ferro no hemínic el dia 2 (figura 18).

Als grups tractats amb Fe-dextrà, les reserves en fetge estan incrementades respecte al grup inflammat tant en forma de ferro ferritínic com d'hemosiderínic. L'increment és estadísticament significatiu els dies 1, 2 i 8 quant a ferro ferritínic i en tots els dies estudiats quant a ferro no hemínic. Si observem les reserves de ferro per òrgan total (figures 18 i 19) l'increment és màxim el dia

2 de la inducció, quan el fetge conté 1467  $\mu\text{g}$  de ferro de reserva, dels quals 557  $\mu\text{g}$  estan emmagatzemats en la ferritina. El percentatge de ferro ferrític respecte a no hemínic ens indica que l'administració de ferro està incrementant les reserves en forma de ferro ferrític a l'inici de la inducció, ja que el dia 6 el ferro ferrític representa el 20,9% del ferro no hemínic als animals tractats amb Fe-dextrà front al 48,5% que s'observa als animals inflamats sense tractament. D'aquest fet es pot deduir que l'administració de Fe accelera el pas de ferro ferrític a hemosiderínic.

Les reserves de ferro ferrític al fetge del grup tractat amb Dfo es mantenen per sota dels valors del grup inflammat. Estadísticament, la Dfo mobilitza el ferro ferrític de reserva els dies 2, 4, 6 i 8. El ferro no hemínic disminueix els dies 2, 4 i 8. A partir del dia 4 el percentatge de ferro ferrític respecte al no hemínic en el grup tractat amb Dfo és inferior al grup inflammat. El dia 4 observem que el contingut en ferro no hemínic del fetge és de (figura 18) 586  $\mu\text{g}$ , on 181  $\mu\text{g}$  estan com a ferrític (figura 17). El dia 6 el fetge conté 403  $\mu\text{g}$  de ferro dels quals 81,6  $\mu\text{g}$  estan com a ferrític, de manera que el ferro no hemínic del fetge ha disminuït en un 31% mentre que el ferro ferrític ho feia en un 55%. Això indica que, d'una banda, la Dfo mobilitza el ferro emmagatzemat com a ferritina i, de l'altra, afavoreix el pas de ferro ferrític a hemosiderínic.

### 2.3.2.- Pes i reserves de ferro a la melsa.

El pes de la melsa (taula X) augmenta amb el temps de l'estudi, alhora que els dos tractaments tenen poca influència sobre aquesta dada.

Les reserves de ferro en melsa es poden observar a la taula X i a les figures 19 i 20. El ferro emmagatzemat com a ferritina no incrementa amb el procés inflamatori, sinó que disminueix a partir del segon dia de la inducció de la inflamació, mantenint-se entre 7 i 8,3  $\mu\text{g/g}$ , front als 12,6  $\mu\text{g/g}$  inicials. S'incrementa, però, el ferro hemosiderínic, com es desprén dels resultats obtinguts quant a ferro no hemínic, a partir del dia 2 de la inducció. D'aquesta



Taula IX: Pes del fetge, i reserves de ferro al fetge en forma de ferro ferritínic i no hemínic a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup		0 hores	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
Pes fetge (g)	I	6,5 ± 0,34 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,21 <sup>d</sup>	9,0 ± 0,44 <sup>c</sup>	7,6 ± 0,19 <sup>b</sup>	7,9 ± 0,27 <sup>bc</sup>	7,0 ± 0,31 <sup>ab</sup>
	I Fe		10,4 ± 0,23	10,8 ± 0,45 <sup>*</sup>	8,0 ± 0,28	7,8 ± 0,30	6,9 ± 0,41
	I Dfo		9,7 ± 0,20	9,1 ± 0,21	8,0 ± 0,29	7,3 ± 0,18	6,9 ± 0,31
Fe ferritínic (µg Fe/g)	I	10,9 ± 2,26 <sup>a</sup>	14,8 ± 2,30 <sup>a</sup>	23,4 ± 2,85 <sup>b</sup>	35,0 ± 4,04 <sup>c</sup>	26,5 ± 0,98 <sup>bc</sup>	24,8 ± 1,53 <sup>b</sup>
	I Fe		26,5 ± 3,40 <sup>*</sup>	52,7 ± 3,93 <sup>***</sup>	43,6 ± 2,26	30,5 ± 2,62	30,0 ± 1,76 <sup>*</sup>
	I Dfo		13,0 ± 1,23	15,5 ± 1,34 <sup>**</sup>	23,8 ± 1,27 <sup>*</sup>	11,1 ± 0,97 <sup>***</sup>	13,8 ± 0,43 <sup>***</sup>
Fe no hemínic (µg Fe/g)	I	57,2 ± 7,7 <sup>ab</sup>	71,1 ± 5,3 <sup>bc</sup>	84,4 ± 6,1 <sup>c</sup>	75,8 ± 4,4 <sup>bc</sup>	54,6 ± 4,9 <sup>a</sup>	77,9 ± 4,1 <sup>c</sup>
	I Fe		92,6 ± 5,8 <sup>**</sup>	143,0 ± 12,5 <sup>***</sup>	136,0 ± 5,8 <sup>***</sup>	146,0 ± 4,1 <sup>***</sup>	102,0 ± 9,1 <sup>*</sup>
	I Dfo		59,6 ± 4,8	60,8 ± 2,3 <sup>**</sup>	58,9 ± 2,8 <sup>**</sup>	55,6 ± 1,5	46,6 ± 3,1 <sup>***</sup>
Fe ft/Fe no hem (%)	I	19	20,8	27,7	46,1	48,5	31,8
	I Fe		28,6	36,9	32,1	20,9	29,4
	I Dfo		21,8	25,5	40,4	20,0	29,6

Mitja ± ESM de 8 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

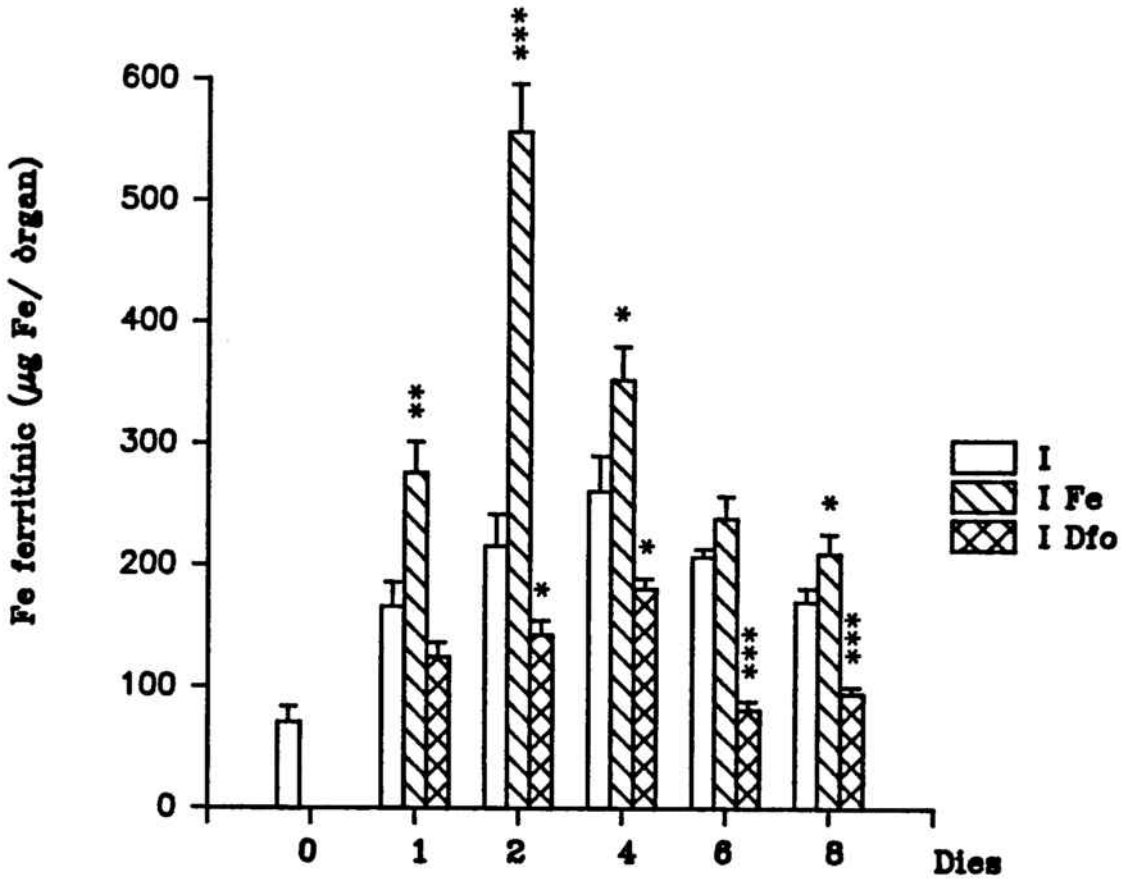


Figura 17: Ferro ferritínic al fetge d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamats: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

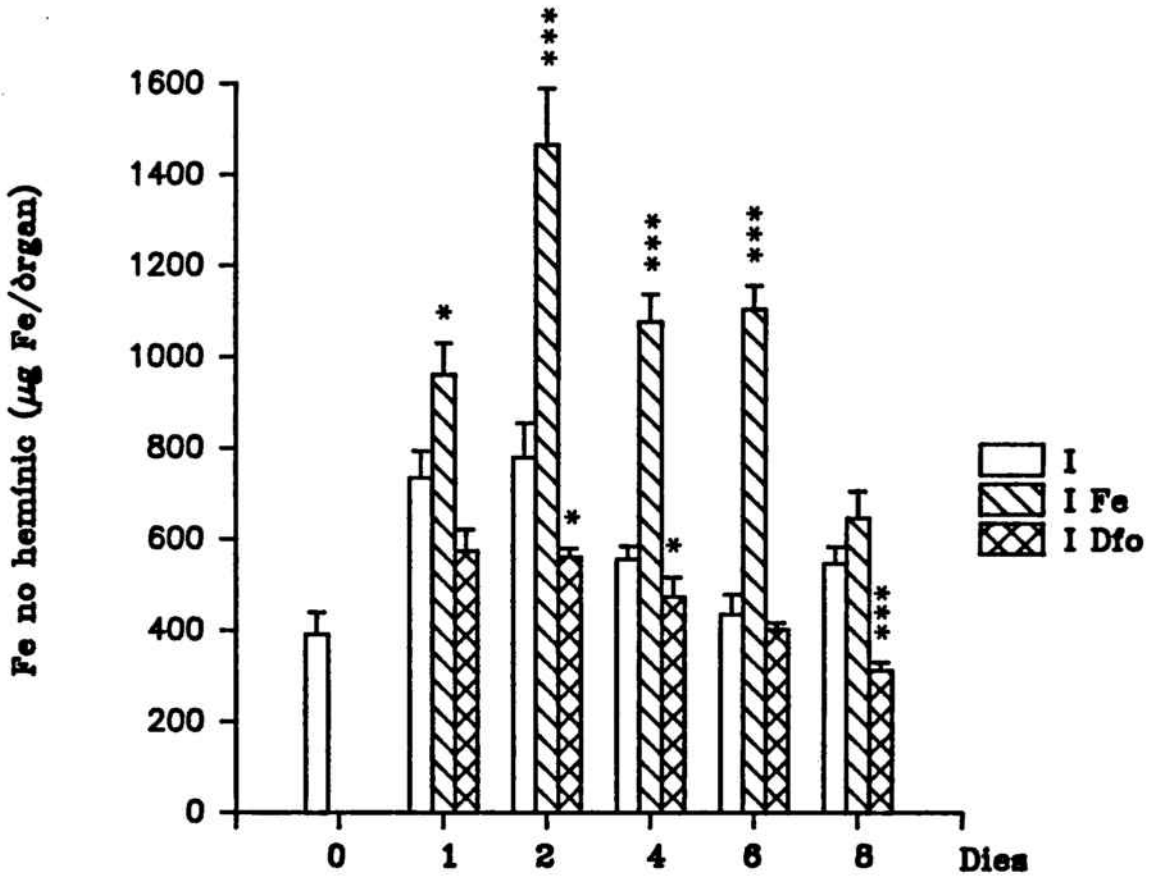


Figura 18: Ferro no hemínic al fetge d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamats: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

manera el ferro ferritínic representa entre el 13,2% i el 10% des del dia 2 al 8, quan en el grup de temps 0 aquest percentatge és del 29%.

El tractament amb Fe-dextrà incrementa les reserves en melsa des del primer dia de la inducció i fins el sisè dia, quan es compara amb el corresponent grup inflammat. Això s'observa tant en les reserves de ferro ferritínic com en els valors de ferro no hemínic, de manera que no s'observen canvis en el percentatge que el ferro ferritínic representa en el ferro no hemínic, comparant amb el grup inflammat sense tractament. Aquest augment també es manifesta expressant els resultats per òrgan (figures 19 i 20).

La Dfo no dóna lloc a diferències quant a ferro ferritínic comparant amb el grup inflammat sense tractament, excepte un increment el dia 2 ( $p < 0,05$ ). Quan s'expressen els resultats per òrgan total (figura 19) no s'observa, però, aquest increment, i sí una disminució el dia 1 de la inducció ( $p < 0,01$ ). D'altra banda, les reserves de ferro no hemínic en òrgan (figura 20) estan augmentades de manera significativa els dies 1, 4 i 6 de la inducció. A la melsa, doncs, la Dfo afavoreix la derivació de ferro ferritínic en hemosiderínic i aquest darrer no és mobilitzat.

## **2.4.- Paràmetres inflamatoris.**

### **2.4.1.- Pes del granuloma.**

El pes del teixit granulomatós format (taula XI) incrementa amb el temps de la inflamació, presentant un màxim el dia 6 de la inducció.

Aquest paràmetre no sembla estar afectat pel tractament amb Fe-dextrà.

El grup tractat amb Dfo presenta una disminució significativa ( $p < 0,001$ ) del teixit del granuloma el dia 6 de la inducció, quan aquest pesa 15,8 g front als 22,2 g del grup inflammat.

Taula X: Pes de la melsa i reserves de ferro a la melsa en forma de ferro ferritínic i no hemínic a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup		0 hores	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
Pes melsa (g)	I	0,68 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,99 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,12 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,77 ± 0,12 <sup>ab</sup>
	I Fe		0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,05	1,00 ± 0,07	1,15 ± 0,12	1,12 ± 0,07 <sup>*</sup>
	I Dfo		0,60 ± 0,07 <sup>*</sup>	0,69 ± 0,07	1,03 ± 0,04	1,03 ± 0,08	1,02 ± 0,17
Fe ferritínic (µg Fe/g)	I	12,6 ± 1,43 <sup>b</sup>	13,6 ± 0,99 <sup>b</sup>	8,2 ± 0,89 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,35 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,96 <sup>a</sup>	8,2 ± 1,10 <sup>b</sup>
	I Fe		27,0 ± 1,54 <sup>**</sup>	20,3 ± 1,92 <sup>***</sup>	19,0 ± 2,20 <sup>***</sup>	18,6 ± 4,30 <sup>*</sup>	10,1 ± 0,75
	I Dfo		11,7 ± 1,13	12,6 ± 1,70 <sup>*</sup>	7,7 ± 1,64	6,5 ± 0,70	9,1 ± 2,00
Fe no hemínic (µg Fe/g)	I	43,3 ± 4,1 <sup>a</sup>	56,2 ± 4,7 <sup>ab</sup>	61,9 ± 4,6 <sup>b</sup>	65,6 ± 4,4 <sup>b</sup>	65,6 ± 3,5 <sup>b</sup>	67,0 ± 5,9 <sup>b</sup>
	I Fe		105,0 ± 12,8 <sup>**</sup>	164,0 ± 19,8 <sup>***</sup>	186,0 ± 18,6 <sup>***</sup>	153,0 ± 13,9 <sup>***</sup>	86,1 ± 10,7
	I Dfo		93,7 ± 8,9 <sup>**</sup>	81,8 ± 9,5 <sup>**</sup>	95,2 ± 9,5 <sup>*</sup>	90,0 ± 4,7 <sup>***</sup>	73,9 ± 4,4
Fe ft/Fe no hem (%)	I	29	25,6	13,2	12,7	10,1	12,2
	I Fe		25,7	12,4	10,2	12,2	11,7
	I Dfo		12,5	15,4	8,1	7,2	12,3

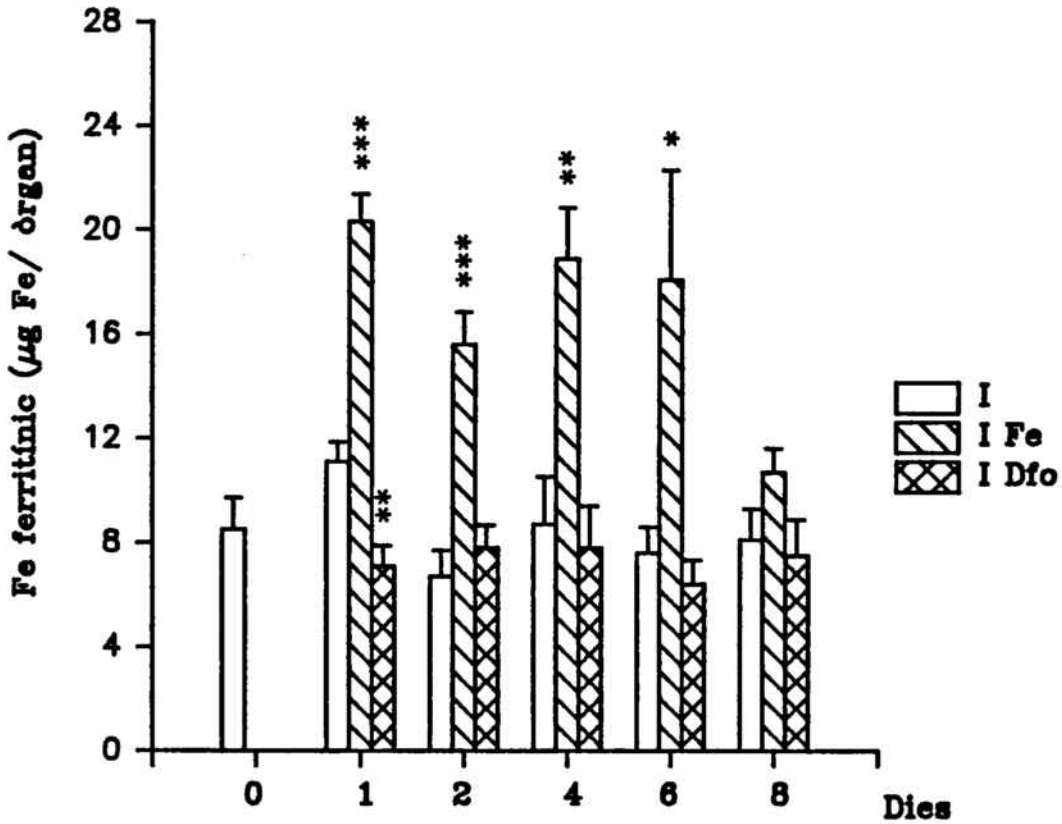


Figura 19: Ferro ferritínic a la melsa d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamat: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

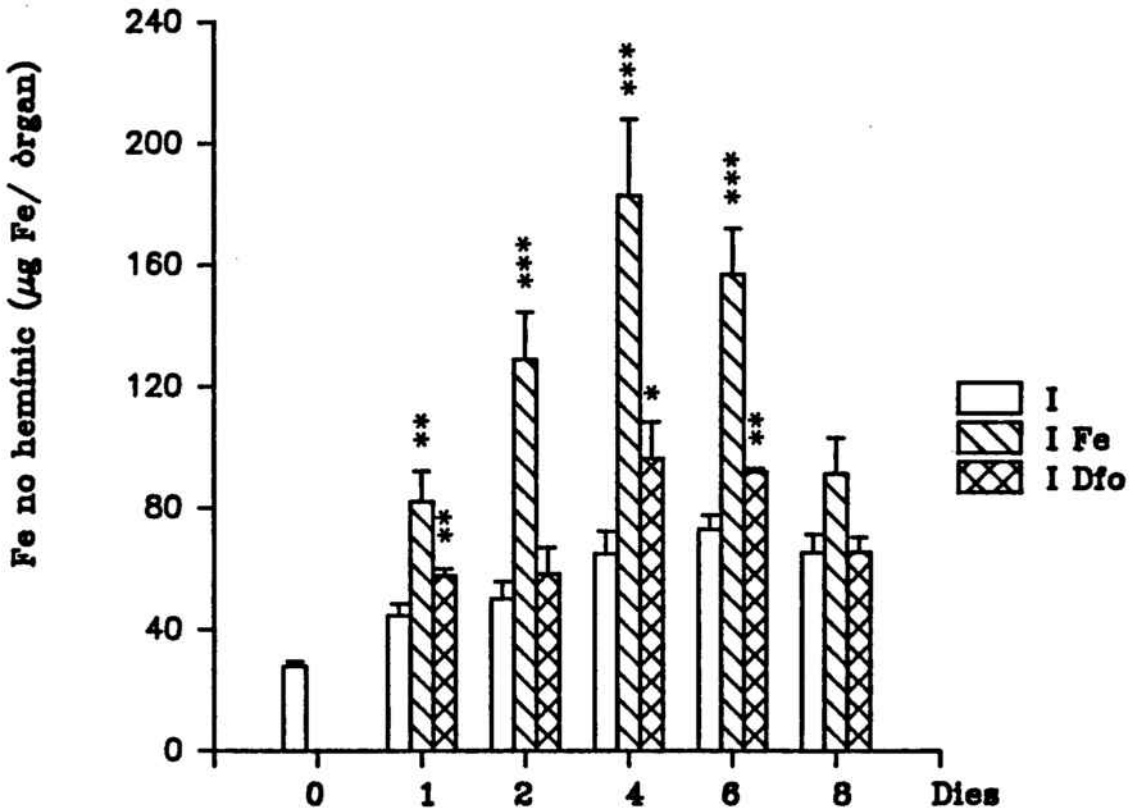


Figura 20: Ferro no hemínic a la melsa d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 0 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamat: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 2.4.2.- Volum d'exsudat.

En el grup inflammat el volum d'exsudat incrementa amb el temps, arribant a un màxim de 13,2 ml el dia 6 (taula XI). Observem així un comportament paral·lel quant al pes del granuloma i al volum d'exsudat.

A diferència del pes del granuloma, el volum de líquid exsudat sí que és modificat pels tractaments.

El tractament amb Fe-dextrà fa disminuir el volum d'exsudat de manera significativa el dia 6 de la inducció ( $p < 0,01$ ).

La Dfo estimula l'acumulació d'exsudat amb un increment significatiu els dies 1, 2 i 4.

### 2.4.3.- Nombre de leucòcits.

El nombre de leucòcits (taula XI) es manté durant tot el procés al grup inflammat en valors al voltant de  $160 \times 10^6$  cèl.lules. La concentració màxima s'obté el dia 2 (figura 21) quan es comptabilitzen  $128,5 \times 10^6$  cèl.lules per ml d'exsudat, mentre que la mínima s'observa els dies 6 i 8 ( $11,7 \times 10^6$  i  $14,3 \times 10^6$  cèl.lules per ml respectivament).

Els tractaments amb Fe-dextrà i Dfo tenen efectes oposats sobre el nombre de leucòcits de l'exsudat: El tractament amb Fe en disminueix el seu nombre absolut (dies 1, 2, 4 i 6) així com la seva concentració (dies 1, 2 i 4). En canvi, la Dfo incrementa el nombre de leucòcits significativament a partir del dia 2, presentant un màxim el dia 6 de la inducció ( $1299 \times 10^6$  cèl.lules) mentre que la seva concentració és superior al grup inflammat del dia 4 al 6 (figura 21).

### 2.4.4.- Viabilitat cel·lular.

En el grup inflammat, la viabilitat de les cèl.lules de l'exsudat supera el 90% durant tots els dies estudiats, llevat del dia 8 (88,8%) (taula XII).



Taula XI: Evolució del pes del granuloma, volum del líquid exsudat i nombre de leucòcits a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
<b>Pes granuloma</b>					
I	11,6 ± 1,46 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,77 <sup>a</sup>	18,3 ± 0,66 <sup>b</sup>	22,2 ± 1,95 <sup>c</sup>	16,1 ± 1,00 <sup>b</sup>
I Fe	15,4 ± 1,46	11,5 ± 0,58	18,8 ± 1,49	22,4 ± 1,83	19,5 ± 1,24
I Dfo	9,7 ± 0,75	12,7 ± 0,77	16,9 ± 1,18	15,8 ± 0,59 <sup>**</sup>	14,2 ± 1,03
<b>Vol. exsudat</b>					
I	1,6 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,99 <sup>b</sup>	13,2 ± 1,40 <sup>c</sup>	11,2 ± 0,86 <sup>c</sup>
I Fe	1,8 ± 0,67	1,0 ± 0,25	4,9 ± 1,15	4,3 ± 1,91 <sup>**</sup>	8,4 ± 2,21
I Dfo	4,4 ± 0,62 <sup>***</sup>	4,2 ± 0,68 <sup>***</sup>	9,2 ± 1,06 <sup>c</sup>	13,9 ± 1,92	14,6 ± 1,70
<b>Nº leucòcits</b>					
I	145 ± 28,2 <sup>a</sup>	167 ± 37,3 <sup>a</sup>	184 ± 40,8 <sup>a</sup>	155 ± 58,4 <sup>a</sup>	160 ± 8,8 <sup>a</sup>
I Fe	67 ± 13,4 <sup>c</sup>	51 ± 12,0 <sup>c</sup>	67 ± 15,0 <sup>c</sup>	57 ± 22,0 <sup>c</sup>	106 ± 34,0
I Dfo	126 ± 13,0	437 ± 98,0 <sup>c</sup>	1038 ± 225,0 <sup>**</sup>	1299 ± 307,0 <sup>**</sup>	404 ± 61,0 <sup>**</sup>

Mitja ± ESM de 8 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

El tractament amb Fe-dextrà indueix a un descens en la viabilitat de les cèl.lules durant tot el procés estudiat, que es manté entre el 74,3% (dia 1) al 82,6% (dia 6), però aquestes variacions no són significatives comparades amb el respectiu grup inflammat.

La viabilitat de les cèl.lules de l'exsudat tractades amb Dfo es manté entre 80,2% (dia 6) i 87,3% (dia 4), sense presentar diferències significatives amb el grup inflammat.

#### 2.4.5.- Distribució dels leucòcits.

A la figura 22 s'observa una extensió de cèl.lules aïllades de l'exsudat inflamatori en la qual s'ha aplicat la tinció esterasa no-específica.

Durant tot el procés s'observa que els leucòcits polimorfonuclears (PMN) predominen sobre monòcits (taula XII, figura 23).

El dia 1 els PMN representen el 80,7% de tots els leucòcits de l'exsudat, disminuint a un 79,9% el dia 4 i fins a un 50,3% el dia 6, en que el nombre de leucòcits PMN és mínim. La disminució de PMN afavoreix l'increment del percentatge de monòcits, els quals representaven el 15,3% el dia 1 arriben a un màxim del 39,1% el dia 6. El dia 8 de la inducció, s'incrementa el percentatge de leucòcits PMN a un 65,1% a expenses dels monòcits, que disminueixen fins al 22%. El percentatge restant (figura 23) que oscil.la entre un 5% el dia 1, al 11% el dia 6 estaria constituït principalment per limfòcits.

El percentatge de distribució dels tipus cel.lulars es manté en el grup tractat amb Fe respecte al grup inflammat, on també s'observa un mínim en el percentatge de PMN (51,5%) i un màxim quant als monòcits (35,3%) el dia 6 de la inducció.

El tractament amb Dfo incrementa el nombre absolut de leucòcits (taula XI), afectant sobretot els leucòcits PMN (figura 23), que va acompanyada d'una davallada de monòcits els dies 6 i 8 ( $p < 0,001$ ), essent el seu percentatge del 5,8 i del 5,5 respectivament.

#### **2.4.6.- Observació de les cèl.lules amb microscopia electrònica.**

Leucòcits aïllats de l'exsudat de rates inflamades, 1 dia després de la inducció, varen ser observats amb MET i amb MER. Les fotografies obtingudes mostren un leucòcit PMN tal i com s'observa amb MET (figura 24) del qual destaca el nucli polilobulat, i es poden veure evaginacions de la membrana plasmàtica degut al procés fagocític. Amb el MER varem observar agregacions de PMN (figura 25) dels quals cal destacar les evaginacions de la membrana plasmàtica (figura 26).

#### **2.4.7.- Activitat fagocítica.**

A la taula XII s'observa com al llarg de la inflamació l'activitat fagocítica de  $0,8 \times 10^6$  leucòcits, front a una estimulació amb zymosan, mesurada per unitats llumíniques relatives de quimioluminiscència (RLU) ampliada pel luminol va decreixent del dia 1 (17,6 RLU) al dia 8 (1,8 RLU).

Els tractaments amb Fe-dextrà i Dfo provoquen una disminució en l'activitat fagocítica dels leucòcits. La disminució de l'activitat fagocítica en el grup tractat amb Fe-dextrà ja s'inicia el dia 1 de la inducció, on obtenim 9,5 RLU de quimioluminiscència, i els dies 4, 6 i 8 aquesta activitat ja és molt poc detectable (0,32, 2,5, 0,20 RLU respectivament).

El tractament amb Dfo també indueix a una disminució de l'activitat fagocítica de les cèl.lules els dies 1, 4 i 6, però el dia 8 l'activitat és superior a la del grup inflammat. Si comparem aquest resultat als obtinguts prèviament en el comptatge de leucòcits, veiem que la Dfo provoca un increment en el nombre de leucòcits, però aquests són menys actius.

Taula XII: Estudi dels leucòcits de l'exsudat: viabilitat cel·lular, percentatge de polimorfonuclears i monòcits, i activitat fagocítica a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup		1 dia	4 dies	6 dies	8 dies
<b>Viabilitat (%)</b>	I	92,6 ± 8,1 <sup>a</sup>	93,6 ± 12,1 <sup>a</sup>	92,3 ± 11,6 <sup>a</sup>	88,8 ± 11,1 <sup>a</sup>
	I Fe	74,3 ± 9,4	75,0 ± 8,4	82,6 ± 7,8	77,5 ± 7,3
	I Dfo	87,0 ± 9,8	87,3 ± 12,0	80,2 ± 8,3	82,7 ± 7,9
<b>PMN (%)</b>	I	80,7 ± 2,9 <sup>c</sup>	70,9 ± 5,5 <sup>bc</sup>	50,3 ± 3,2 <sup>a</sup>	65,1 ± 6,0 <sup>ab</sup>
	I Fe	77,1 ± 1,6	63,3 ± 4,9	51,5 ± 3,4	70,2 ± 2,8
	I Dfo	79,8 ± 2,9	70,6 ± 5,5	84,3 ± 5,6 <sup>***</sup>	84,6 ± 3,0 <sup>*</sup>
<b>Monòcits (%)</b>	I	15,3 ± 1,07 <sup>a</sup>	17,4 ± 1,56 <sup>ab</sup>	39,1 ± 3,32 <sup>c</sup>	22,0 ± 1,89 <sup>b</sup>
	I Fe	14,6 ± 1,17	17,3 ± 1,21	35,3 ± 3,14	19,4 ± 1,16
	I Dfo	13,3 ± 0,93	14,6 ± 1,10	5,8 ± 0,44 <sup>***</sup>	5,5 ± 0,30 <sup>***</sup>
<b>Q.luminiscència RLU/0,8x10<sup>6</sup>cèl.</b>	I	17,6 ± 4,27 <sup>c</sup>	12,7 ± 2,98 <sup>bc</sup>	8,0 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,55 <sup>a</sup>
	I Fe	9,5 ± 0,33	0,3 ± 0,07 <sup>**</sup>	2,5 ± 0,48 <sup>***</sup>	0,2 ± 0,07 <sup>*</sup>
	I Dfo	2,9 ± 0,37 <sup>**</sup>	1,62 ± 0,43 <sup>***</sup>	0,5 ± 0,11 <sup>***</sup>	4,1 ± 0,15 <sup>*</sup>

Mitja ± ESM de 5 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

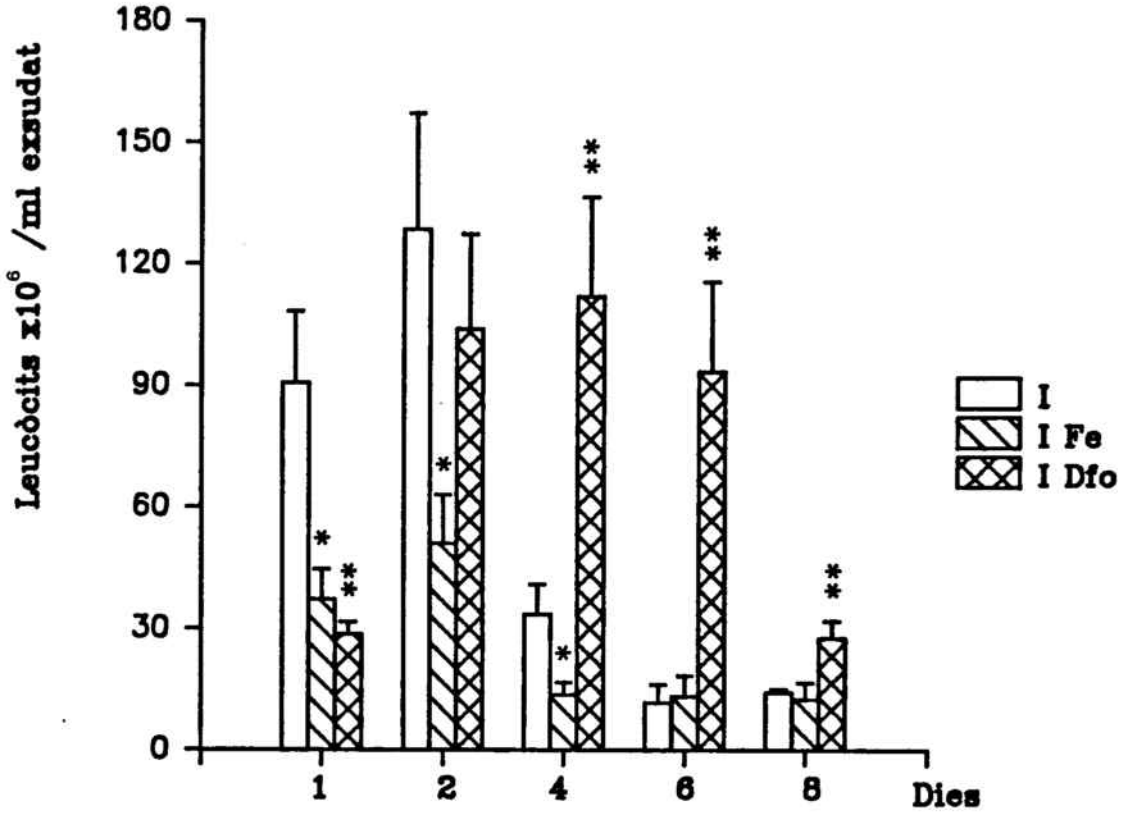


Figura 21: Nombre de leucòcits en 1 ml d'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamat: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

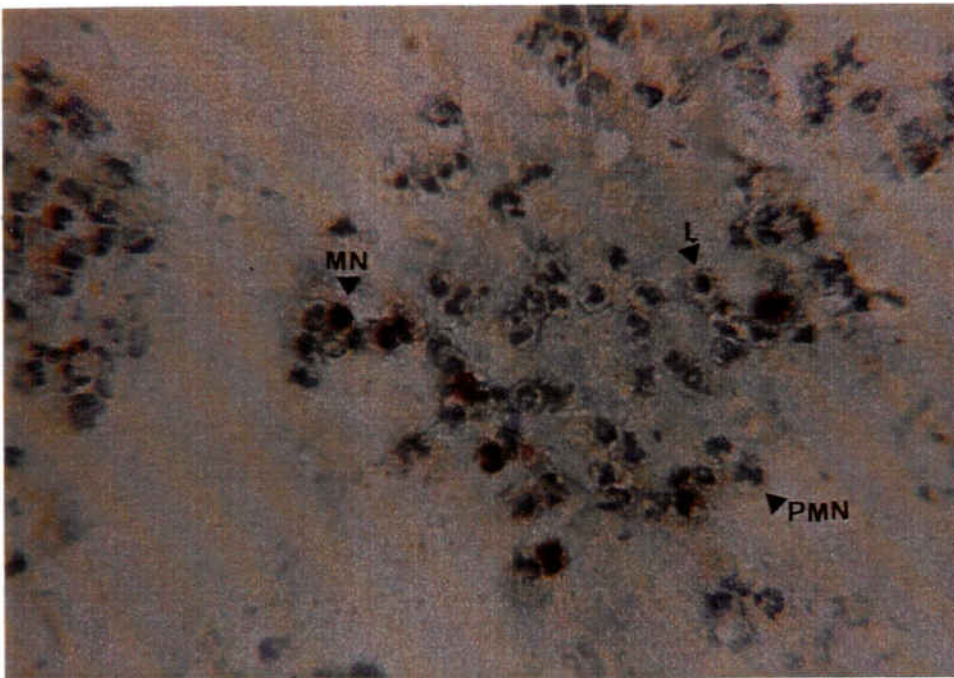


Figura 22: Observació amb microscopia òptica d'un frotis de cèl.lules procedents de l'exsudat inflamatori a 1 dia d'induir-se la inflamació. Tinció amb la tècnica de l'esterasa no-específica. Augments aproximats x400 amb oli d'immersió.

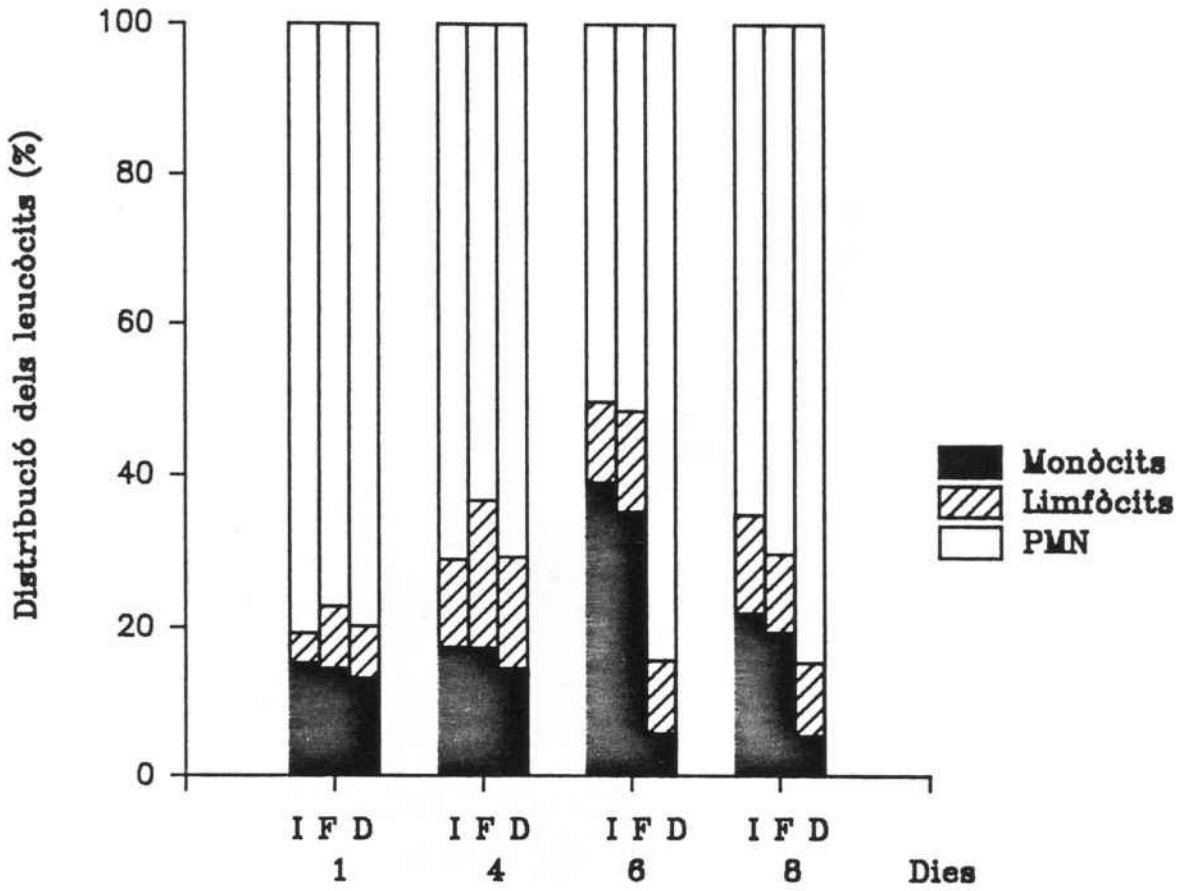


Figura 23: Percentatge de distribució dels leucòcits de l'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo entre 1 i 8 dies d'induïr-se la inflamació. Mitja de 5 animals.

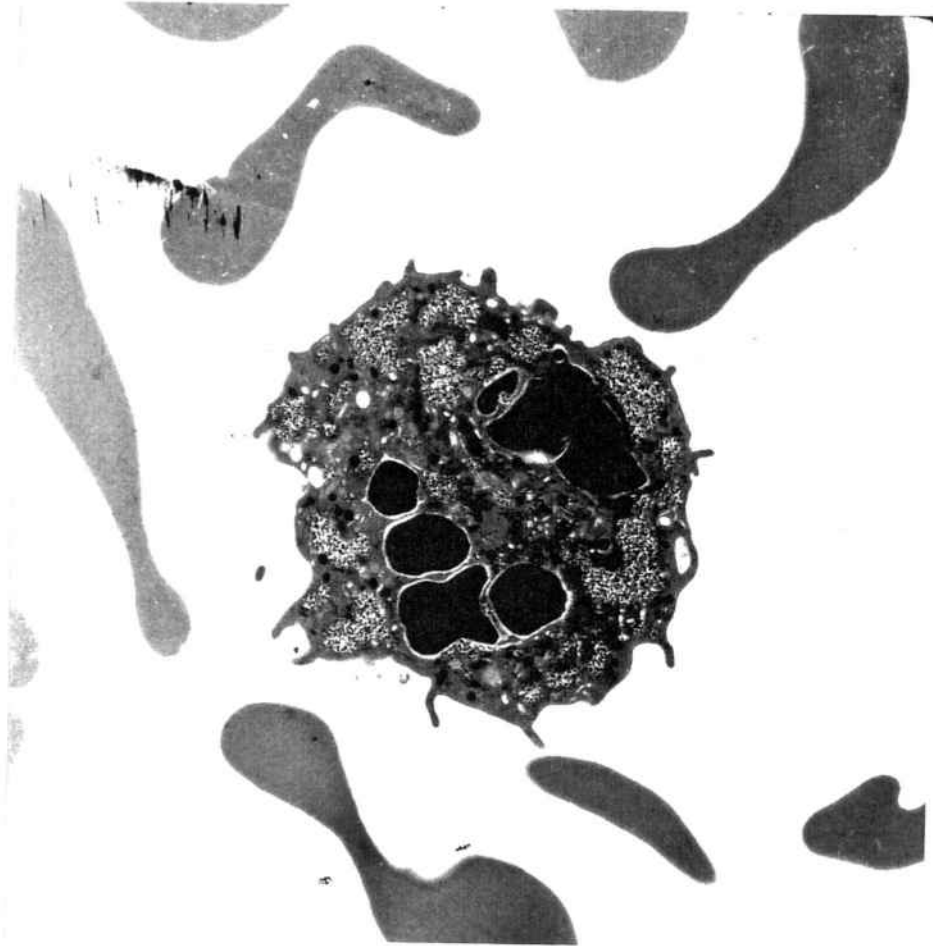


Figura 24: Observació amb MET d'un leucòcit PMN aïllat de l'exsudat inflamatori. S'observa el nucli polilobulat i les extensions de la membrana plasmàtica. Augments aproximats x7000.



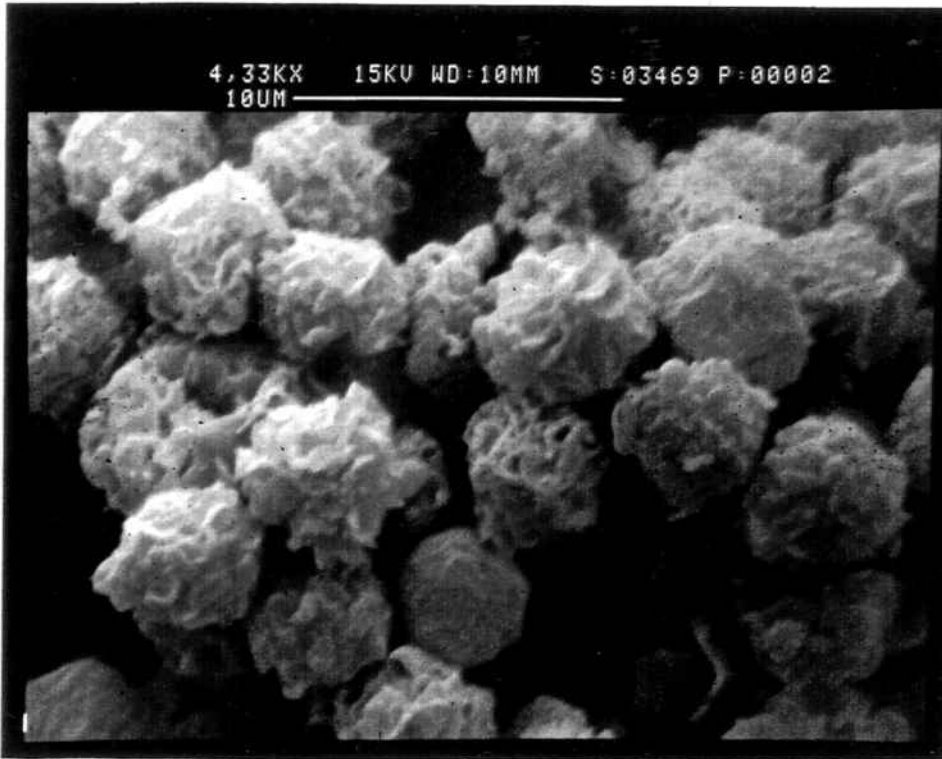


Figura 25: Observació amb MER de leucòcits PMN aïllats de l'exsudat inflamatori formant agregats. Augments aproximats x4300.

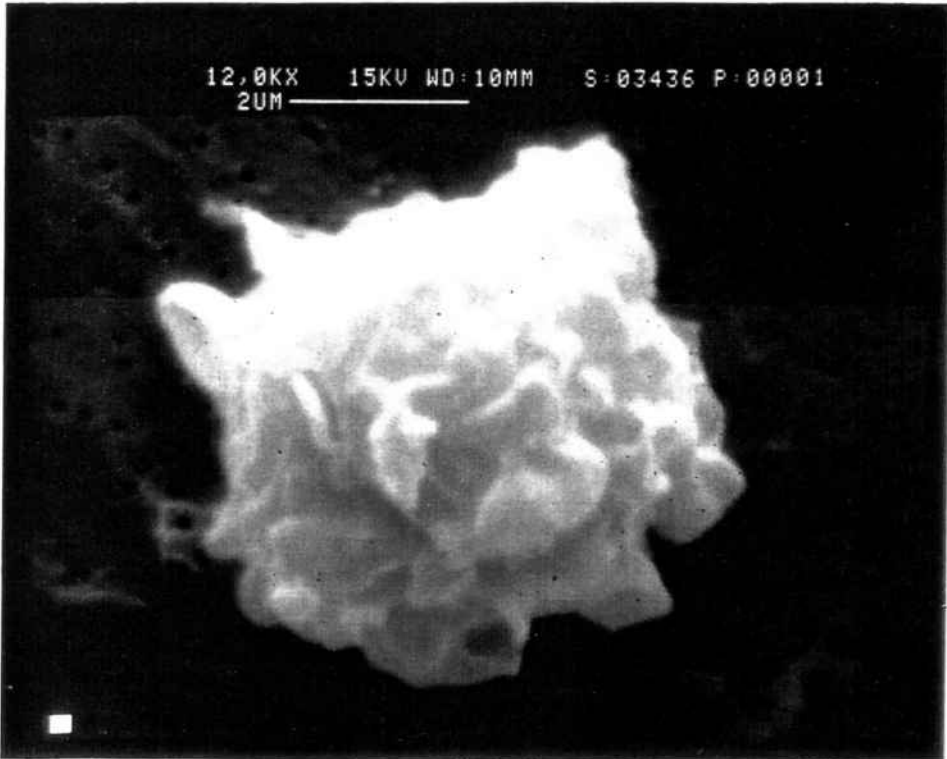


Figura 26: Observació amb MER d'un leucòcit PMN aïllat de l'exsudat inflamatori. A destacar les evaginacions de la membrana. Augments aproximats x12000.

## 2.4.8.- Nivells de ferro a l'exsudat.

### a) Ferro dèbilment lligat.

Es troba ferro lligat a compostos de baix pes molecular a l'exsudat de rates inflamades a l'inici del procés inflamatori en la concentració de 6,3 nM (taula XIII) que significa un valor absolut de 10 nmol/exsudat (figura 27). Els nivells d'aquest ferro van decreixent i el dia 6 la concentració és indetectable.

En els grups tractats amb Fe-dextrà es troben valors significativament molt superiors de ferro dèbilment lligat. Això es manté en tots els dies estudiats. La concentració és màxima els dies 1 i 2 (75 i 102 nM), disminueix els dies 4 i 6 (30 i 20 nM) i torna a augmentar el dia 8 (123 nM). El dia 1 el ferro dèbilment lligat representa el 0,04% del total del ferro injectat (135,2 nmol de Fe/exsudat) mentre que s'observa una resposta molt incrementada el dia 8 (1035 nmol de Fe/exsudat) (figura 27).

El ferro dèbilment lligat presenta valors lleugerament més baixos en els animals tractats amb Dfo que en els inflamats sense tractament (1,7 nM el dia 1) i és indetectable els dies 6 i 8 de la inducció.

Els errors alts que s'observen en el grup inflammat i en el grup tractat amb Dfo es deuen a que el nombre d'animals que donaven 0 en aquesta determinació era més gran a mesura que avançava el procés inflamatori.

### b) Ferro ferrític.

S'observa com la concentració de ferro ferrític (taula XIII) és màxima el dia 2 (115 nM), per a disminuir els dies 4 i 6.

Al grup tractat amb Fe-dextrà s'observen valors més alts que al grup inflammat durant tot el procés amb un màxim el dia 1 (7111 nM). El ferro ferrític en exsudat total (figura 28) és de 12,8  $\mu$ mol el primer dia i representa un 3,6% del ferro injectat. El dia 6 els nivells de ferro ferrític s'igualen amb els dels animals inflamats sense tractament, però el dia 8 tornen a augmentar fins

a 2,02  $\mu\text{mol/exsudat}$ .

La concentració de ferro ferritínic en els animals tractats amb Dfo és significativament inferior al grup inflammat durant els dies 1, 2, 4 i 8, però expressat en valor absolut, els nivells oscil·len al voltant del grup inflammat.

#### **2.4.9.- pH de l'exsudat.**

No s'observen variacions en el pH de l'exsudat que es manté al voltant de 7,3 durant la inflamació (taula XIV).

Tampoc no s'observen variacions amb l'administració de Fe, que només incrementa el pH lleugerament fins el valor de 7,6 en el primer dia de la inducció.

Amb Dfo el pH s'acidifica respecte el grup inflammat, durant tot el procés. El pH més àcid s'obté els dies 4 i 6 ( $p < 0,001$ ) amb valors de 6,75 i 6,98 respectivament. Això estaria en relació amb l'alt nombre absolut de leucòcits descrit en aquests dies (taula XI).

#### **2.4.10.- Ceruloplasmina a l'exsudat.**

La concentració de ceruloplasmina a l'exsudat (taula XIV) és màxima el dia 1 (350  $\mu\text{g/ml}$ ) i disminueix a partir del dia 2, amb un mínim el dia 6 (112  $\mu\text{g/ml}$ ).

En els grups tractats amb Fe-dextrà els valors de ceruloplasmina es mantenen generalment per sota dels valors en animals sense tractament i de manera significativa els dies 1 i 8 ( $p < 0,01$ ) de la inducció.

El tractament amb Dfo dóna lloc a una disminució de la concentració de ceruloplasmina en exsudat, de manera significativa els dies 1, 4, 6 i 8 de la inducció, amb un mínim el dia 6 (61  $\mu\text{g/ml}$ ).

Taula XIII: Ferro lligat a complexes de baix pes molecular i ferro ferrític a l'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup		1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
Fe dèbilment lligat (nM)	I	6,3 ± 1,93 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,86 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
	I Fe	75,1 ± 10,59 <sup>***</sup>	102,2 ± 18,40 <sup>***</sup>	30,20 ± 3,27 <sup>***</sup>	20,70 ± 2,22 <sup>***</sup>	123,20 ± 34,40 <sup>***</sup>
	I Dfo	1,7 ± 0,83 <sup>*</sup>	0,8 ± 0,32	0,23 ± 0,15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Fe ferrític (nM)	I	81 ± 0,6 <sup>c</sup>	115 ± 7,7 <sup>d</sup>	33 ± 3,6 <sup>a</sup>	27 ± 6,1 <sup>a</sup>	49 ± 6,3 <sup>b</sup>
	I Fe	7111 ± 112,2 <sup>***</sup>	1570 ± 190,0 <sup>***</sup>	165 ± 29,0 <sup>***</sup>	84 ± 3,5 <sup>***</sup>	240 ± 38,0 <sup>***</sup>
	I Dfo	61 ± 1,1 <sup>***</sup>	38 ± 7,1 <sup>***</sup>	16 ± 3,2 <sup>**</sup>	27 ± 2,9	26 ± 3,4 <sup>**</sup>

Mitja ± ESM de 8 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

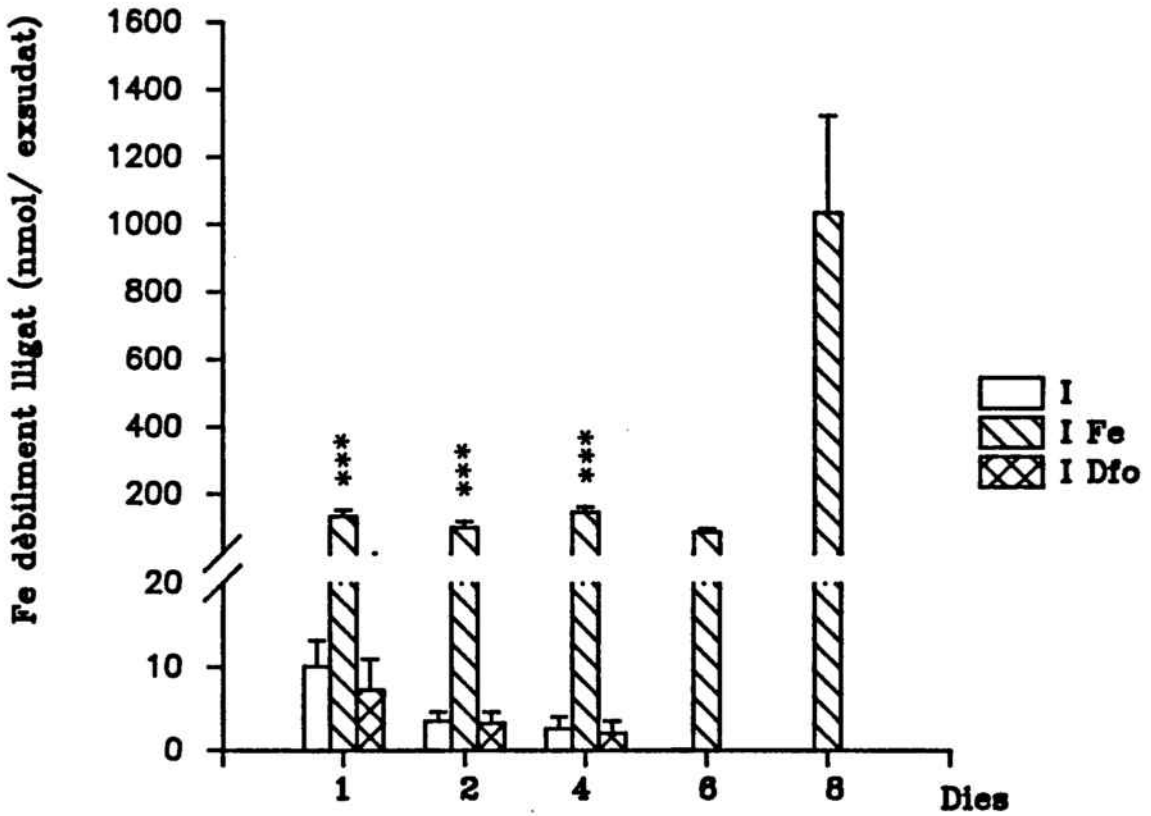


Figura 27: Ferro dèbilment lligat a l'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamat: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

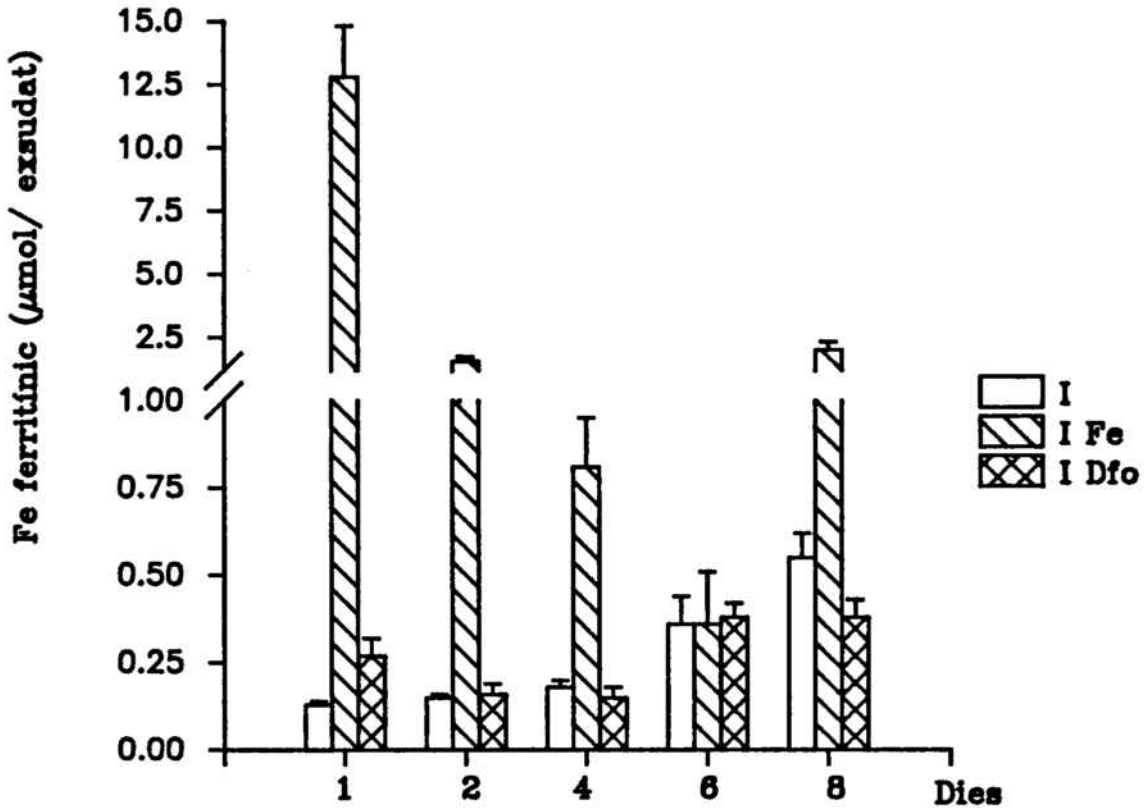


Figura 28: Ferro ferritínic a l'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe-dextrà i Dfo, entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació. Mitja  $\pm$  ESM de 8 animals. Comparacions respecte el grup inflamat: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

**2.4.11.- Nivells de PGE<sub>2</sub> a l'exsudat.**

La concentració de PGE<sub>2</sub> en el líquid exsudat és de 110 ng/ml el dia 1 (taula XIV) i va disminuint per a mantenir-se entre 14 ng/ml (dia 4) i 17 ng/ml (dia 8).

El tractament amb Fe-dextrà fa incrementar ( $p < 0,001$ ) els valors de PGE<sub>2</sub> el dia 1 (164 ng/ml) que disminueixen els dies 2, 4 i 6 (sense ser significativament diferents del grup inflammat) per a tornar a incrementar el vuitè dia (42 ng/ml).

La Dfo actua incrementant els nivells de PGE<sub>2</sub> durant els dies 2 i 4 respecte el grup inflammat, i els disminueix el dia 6.



Taula XIV: pH, ceruloplasmina i PGE<sub>2</sub> a l'exsudat d'animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo entre 1 i 8 dies d'induir-se la inflamació.

Grup	1 dia	2 dies	4 dies	6 dies	8 dies
<b>pH exsudat</b>					
I	7,21 ± 0,030 <sup>a</sup>	7,36 ± 0,096 <sup>a</sup>	7,20 ± 0,076 <sup>a</sup>	7,31 ± 0,030 <sup>a</sup>	7,24 ± 0,090 <sup>a</sup>
I Fe	7,60 ± 0,068 <sup>***</sup>	7,33 ± 0,080	7,11 ± 0,124	7,43 ± 0,087	7,15 ± 0,058
I Dfo	7,03 ± 0,068 <sup>**</sup>	7,08 ± 0,038 <sup>*</sup>	6,75 ± 0,085 <sup>***</sup>	6,98 ± 0,042 <sup>***</sup>	7,06 ± 0,024
<b>Ceruloplasmina</b>					
(µg/ml)					
I	350 ± 25 <sup>c</sup>	215 ± 38 <sup>b</sup>	265 ± 46 <sup>bc</sup>	112 ± 11 <sup>a</sup>	177 ± 21 <sup>b</sup>
I Fe	183 ± 33 <sup>**</sup>	220 ± 30	159 ± 41	126 ± 35	98 ± 13 <sup>**</sup>
I Dfo	161 ± 34 <sup>***</sup>	143 ± 16	155 ± 20 <sup>*</sup>	61 ± 6 <sup>**</sup>	73 ± 11 <sup>***</sup>
<b>PGE<sub>2</sub></b>					
(ng/ml)					
I	110 ± 7,7 <sup>e</sup>	58 ± 7,7 <sup>b</sup>	14 ± 1,4 <sup>a</sup>	15 ± 1,9 <sup>a</sup>	17 ± 0,7 <sup>a</sup>
I Fe	164 ± 6,9 <sup>***</sup>	50 ± 17,8	22 ± 4,7	18 ± 4,1	42 ± 8,1 <sup>**</sup>
I Dfo	123 ± 13,8	98 ± 15,9 <sup>*</sup>	42 ± 6,6 <sup>**</sup>	7 ± 1,0 <sup>**</sup>	8 ± 4,2

Mitja ± ESM de 8 animals. Valoració estadística a la Taula VII.

**SEGONA PART:**  
**MODULACIÓ DE LA INFLAMACIÓ PER UNA DIETA DEFICIENT EN**  
**AGPI**

## MATERIAL I METODES

### 1.- Animals i dietes.

Les experiències es van portar a terme amb rates Sprague Dawley mascles. En el moment del deslletament quaranta rates van ser pesades i distribuïdes en dos lots que van ser alimentats amb diferents dietes semisintètiques en pols durant 4 mesos. Un lot va ser alimentat amb una dieta control, i l'altre grup amb un pinso deficient en AGPI (UAR).

Seguint les recomenacions de Poitier de Courcy i col. (1989), els lípids representaven el 5% del pinso en ambdues dietes. La dieta control contenia 25 g/kg d'oli de cacahuet i 25 g/kg d'oli de colza. Aquesta és la mescla recomenada per tal d'assegurar l'aport dels àcids grassos insaturats essencials, àcid linolèic (18:2) i àcid linolènic (18:3).

El contingut en àcids grassos d'aquests dos olis és el següent:

	AG Saturats (%)	AG Insaturats (%)			
		18:1	18:2	18:3	22:2
<b>Oli de cacahuet</b>	18	60	21	-	-
<b>Oli de colza</b>	8	57	22	9	2

En la dieta deficient en AGPI el contingut lipídic s'havia substituït íntegret per tripalmitina, triacilglicèrid del palmític, àcid gras saturat del tipus 16:0.

Analitzant els dos tipus de pinso amb espectrofotometria d'absorció atòmica, ambdós contenien 58 mg Fe/kg.

## **2.- Mètode experimental.**

Després de 4 mesos d'alimentació amb la dieta control o amb la dieta deficient en AGPI es va iniciar l'estudi de les modificacions de la mobilització del ferro i de la lipoperoxidació en rates a les que es va induir el granuloma per carragenina.

Grups d'animals de cada lot, control (C) o deficient (D), van rebre el mateix tractament.

### **2.1.- Inducció del granuloma per carragenina.**

El granuloma va ser induït pel mètode ja descrit (veure pàg. 54) de Fukuhara i Tsurufuji (1969) injectant 4 ml d'una solució al 2% de carragenina en NaCl 0,9%. Els animals varen ser sacrificats 6 dies després de la inducció.

#### **2.1.1.- Administració de Fe-dextrà.**

En un grup inflammat (alimentat amb dieta control o deficient en AGPI) es va produir una sobrecàrrega en ferro a l'administrar a la bossa del granuloma 3 injeccions, els dies 0, 2 1/2 i 5 de 50 mg Fe/kg cadascuna.

#### **2.1.2.- Administració de Dfo.**

En un tercer grup inflammat (control o deficient en AGPI) es va produir una deficiència en ferro administrant Dfo a la dosi de 100 mg/kg, des de 3 dies abans de la injecció de carragenina via subcutània i fins el dia 5 a la cavitat del granuloma.

### 3.- Obtenció de mostres.

#### 3.1.- Gasos expirats.

Un mètode de sistema tancat de recollida d'hidrocarburs (Wendel i Dumelin, 1981; Wendel 1987) va ser posat a punt al laboratori de l'INSERM U-87 de Tolosa.

La mesura d'hidrocarburs expirats ha despertat un gran interès des dels treballs de Riely i col. (1974) ja que és un mètode no invasiu que permet estudiar els processos de peroxidació lipídica *in vivo*. En efecte, durant aquest procés, la degradació dels àcids grassos insaturats de les membranes allibera età i pentà en petita quantitat que són exhalats en l'aire expirat per l'animal (Lawrence i Cohen, 1982, 1984).

La gran sensibilitat aportada per la cromatografia en fase gasosa ens permet mesurar les quantitats traces d'aquests hidrocarburs volàtils. Sembla ser que la mesura d'età ens dóna més informació sobre la lipoperoxidació ja que el pentà és metabolitzat al fetge (Wendel, 1987; Müller i Sies, 1984).

Després del període de tractament (dia 6) es col·locaven 4 animals d'un mateix grup en una cambra dissenyada especialment per a la recollida de gasos expirats (figura 29). En la cambra s'injectaven (g) 50 ml d'una mescla standard de gasos que contenia:

- 14,77 ppm de metà
- 15,00 ppm d'età
- 14,98 ppm de propà
- 15,01 ppm de butà
- 15,17 ppm de pentà
- 15,01 ppm d'hexà

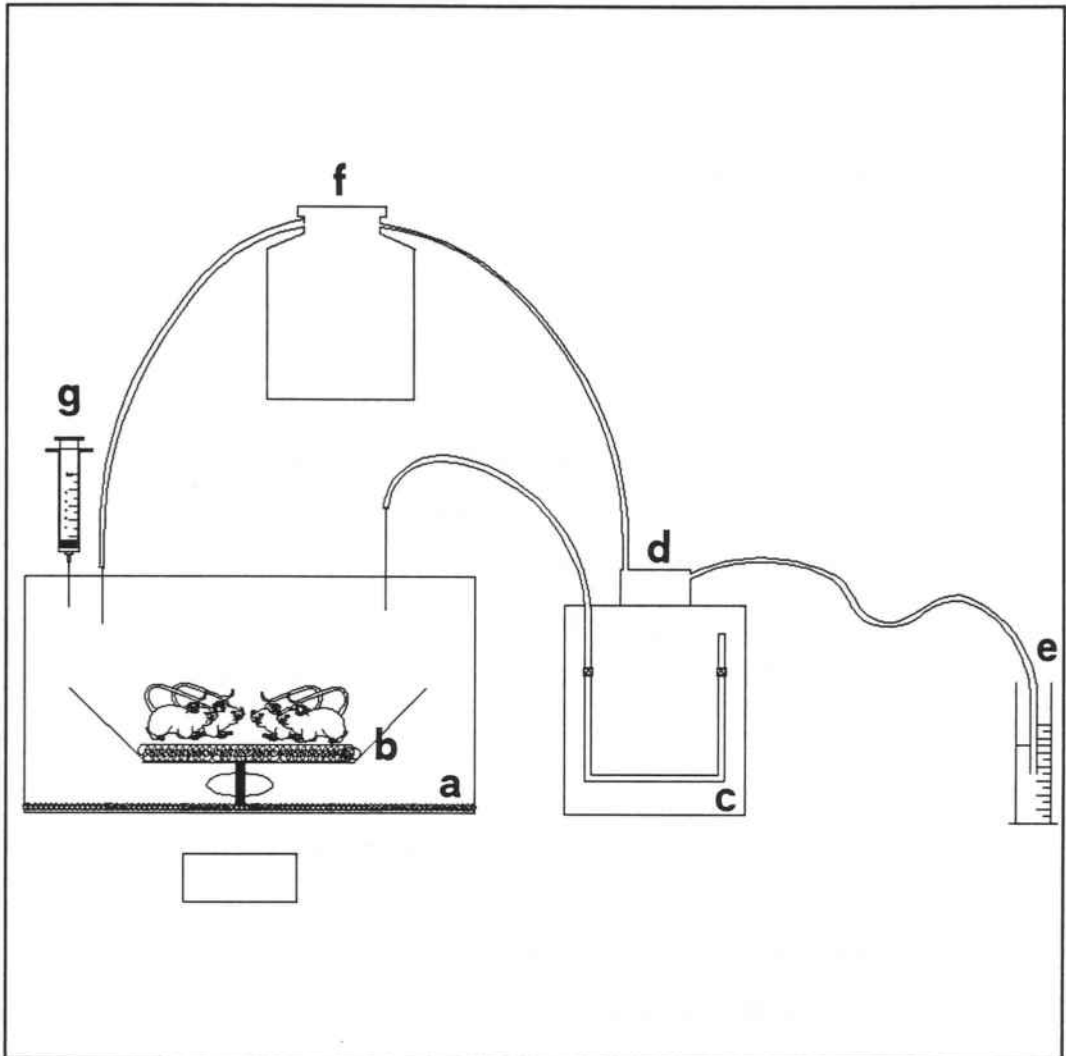


Figura 29: Dispositiu experimental per a la recollida de gasos espirats.

A sota de la reixeta on eren els animals s'introduïa calç sodada (a), que absorbeix el  $\text{CO}_2$  i gel de sílice (b), per absorbir el vapor d'aigua. La pressió a l'interior de la cambra era igual a la pressió atmosfèrica. Un manòmetre (c) amb líquid de Brodie ens indicava les variacions de pressió.

La respiració comporta el consum de cert volum d'oxigen. El volum total del gas que disminuïa equivalia al volum d'oxigen consumit. Aquest es mesurava per la disminució del volum d'aigua a la proveta annexa (e):

- Al disminuir l'oxigen consumit, disminuïa la pressió a l'interior de la cambra. Això era detectat per dues cèl·lules fotoelèctriques (c) que impulsaven la bomba (d). Al posar-se la bomba en marxa enviava aigua de la proveta (e) al flascó d'oxigen (f) lligat al dessecador on eren les rates. El volum d'aigua desplaçava l'oxigen vers el dessecador.

En intervals d'una hora, des de 5 minuts després de col·locar les rates fins a 4 hores després, s'extreien, amb una xeringa (g) de vidre, 10 ml de gas de l'interior de la cambra. El contingut en età de la fase gasosa era mesurada en un cromatògraf de gasos.

### **3.2.- Obtenció de plasma.**

Posteriorment els animals eren anestesiats amb èter i s'extreia sang per punció cardíaca. Els tubs on es mantenia la sang eren de polipropilè i havien estat tractats amb heparina al 5%. Una sèrie de tubs (per a la determinació de prostaglandina  $E_2$ ) van ser tractats també amb indometacina 0,04M dissolta en etanol, tot evaporat a l'estufa a  $60^\circ\text{C}$ . Per centrifugació es va obtenir el plasma (veure pàg. 56) que va ser conservat a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.3.- Extracció de fetge.**

Després de la dessagnació per punció cardíaca es perfondia el fetge a través de la vena hepàtica amb salí, s'extreia i congelava en nitrogen líquid i era conservat a  $-80^\circ\text{C}$  per a posteriors anàlisi.

### **3.4.- Extracció del granuloma.**

Com s'ha descrit anteriorment (veure pàg. 57) s'extreia el teixit del granuloma i se n'obtenia el seu pes humit.

### **4.- Anàlisi hemàtiques relacionades amb el metabolisme del ferro.**

El percentatge de volum sanguini ocupat pels eritròcits es va determinar com ja s'ha descrit (veure pàg. 58).

La determinació de la concentració d'hemoglobina en sang es va realitzar seguint el mètode de Drabkin i Austin (1935). Els resultats s'expressen en mg d'hemoglobina per 100 ml de sang (veure pàg. 58).

Es va valorar el ferro plasmàtic seguint les recomanacions del ICSH (1971), (veure pàg. 59). Els resultats s'expressen en  $\mu\text{g}$  de ferro per 100 ml de plasma.

El TIBC va ser determinat pel mètode de Ramsay (1957) (veure pàg. 59). Els resultats expressen la capacitat total de fixació del ferro per la transferrina en  $\mu\text{g}$  de ferro per 100 ml de plasma.

Com ja s'ha descrit (veure pàg. 60) es van determinar els nivells de ceruloplasmina en plasma segons la tècnica de Sunderman i Nomoto (1970). Els resultats s'expressen en mg de ceruloplasmina per 100 ml de plasma.

### **5.- Determinació de ferro en fetge.**

En homogenats de fetge es van estudiar els nivells de ferro ferrític (Drysdale i Munro, 1966) i de ferro no hemínic (Torrance i Bothwell, 1980) (veure pàg. 61 i 62). Els resultats s'expressen en  $\mu\text{g}$  de ferro per g de teixit i en òrgan total.



## **6.- Estudi de la lipoperoxidació.**

### **6.1.- Età expirat.**

El contingut en età de la fase gasosa es va mesurar en un cromatògraf de gasos Intersmat, equipat amb un detector de ionització de flama a 190°C . La columna, de 2 mm de diàmetre per 2 m de longitud, utilitzava heli com a gas vector al fluxe de 35 ml/min.

Es va treballar amb una programació de temperatura. La temperatura inicial es fixà a 50°C i la final a 170°C amb un increment de temperatura de 20°C per minut. Amb aquestes condicions s'obtenia un pic d'età entre 3 i 4 minuts després d'injectar els 10 ml de la mostra en el bucle d'injecció del cromatògraf.

Els pics obtinguts en els cromatògrafs i quantificats per l'integrador (Intersmat) corresponien a certes quantitats d'età quan s'interpolaven a una corba patró determinada prèviament. Aquests valors s'expressen en nmol d'età eliminats durant 4 hores per kg de pes corporal.

### **6.2.- PGE<sub>2</sub> en plasma.**

Els nivells plasmàtics de PGE<sub>2</sub> varen ser estudiats com a indicadors de la peroxidació lipídica. Com s'ha descrit (veure pàg. 68) la PGE<sub>2</sub> va ser determinada per radioimmunoassaig (RIA KIT, Advanced Magnetics Inc, Massachusetts, U.S.A.) en mostres de 200 µl de plasma. Els resultats s'expressen en ng de PGE<sub>2</sub> per ml de plasma.

### **6.3.- Malondialdehid en plasma.**

Els nivells de malondialdehid (MDA) en plasma van ser detectats per la reacció de l'àcid tiobarbitúric (TBA), tècnica descrita per Yagi (1984). Aquest és un mètode standard per a la determinació del nivell de lipoperoxids en plasma

o sèrum. Es basa en la descomposició àcida dels lipoperòxids, durant la qual es produeix malondialdehid. La reacció del MDA amb TBA produeix un cromògen vermell.

La primera part de la tècnica consisteix en aïllar els lípids per tal d'eliminar altres substàncies que poguéssin reaccionar amb el TBA. Això s'aconsegueix amb el sistema àcid fosfotúngstic-sulfúric que precipita els lípids.

Seguint aquesta tècnica es varen incubar 0,5 ml de plasma amb 2 ml de  $H_2SO_4$  (1/12 N) durant 10 minuts a temperatura ambient. Es van afegir 0,5 ml d'àcid fosfotúngstic al 10% (v/v), es van agitar els tubs i es van incubar 5 minuts a temperatura ambient. Les mostres es van centrifugar a 2000 xg i es rebutjà el sobrenedant on hi havia les substàncies TBA-reactives hidrosolubles.

El precipitat es tornà a rentar amb  $H_2SO_4$  i àcid fosfotúngstic i després de centrifugar va ser dissolt amb aigua destil.lada i 1 ml de TBA al 1% (v/v) amb àcid acètic al 50% amb aigua destil.lada.

Les mostres es van portar a ebullició durant 60 minuts, es van centrifugar a 1000 xg durant 15 minuts i el sobrenedant va ser llegit a 532 nm. Els valors de densitat òptica van ser convertits en nanomols de MDA utilitzant el coeficient d'extinció del complex MDA-TBA que és de  $1,37 \times 10^5$ .

Els nivells de lipoperòxids s'expressen en termes de nmol de MDA per ml de plasma.

## 7.- Disseny experimental.

Es va treballar amb 8 grups (4 alimentats amb dieta control i 4 amb dieta deficient en AGPI) de 5 animals mascles cadascun de pesos compresos entre els 350 i els 450 g (figura 30).

- Grup control (C): Alimentat amb dieta control.
- Grup deficient (D): Alimentat amb dieta deficient en AGPI.
- Grup inflammat: En un grup tractat amb dieta control (CI) i en un grup amb dieta deficient (DI) es va induir el granuloma per carragenina.
- Grup inflammat + Fe-dextrà: La sobrecàrrega en ferro es provocà a un

grup inflammat amb dieta control (CI Fe) i a un grup inflammat tractat amb dieta deficient (DI Fe).

- Grup inflammat + Dfo: La deficiència en ferro es va induir administrant Dfo en grups control i inflamats (CI Dfo i DI Dfo, respectivament).

Els animals varen rebre injeccions subcutànies de solució salina estèril per tal que el volum injectat fos sempre el mateix. El sacrifici es produí el sisè dia de la inducció de la inflamació.

### **8.- Mètodes estadístics.**

Els resultats vénen expressats per la mitja de 5 animals amb el seu corresponent error standard (ESM). Les dades van ser avaluades mitjançant l'anàlisi de la varianza (ANOVA) amb 8 poblacions per paràmetre. Quan els efectes de la variable eren estadísticament significatius els seus grups es van comparar amb el mètode de Bonferroni de comparances múltiples.

S'ha atorgat una lletra a les mitges i errors de cada grup que permet la comparació de la significació estadística entre grups amb  $\epsilon = 0.05$ . Els grups de la mateixa columna que tenen almenys una lletra en comú no són estadísticament diferents.

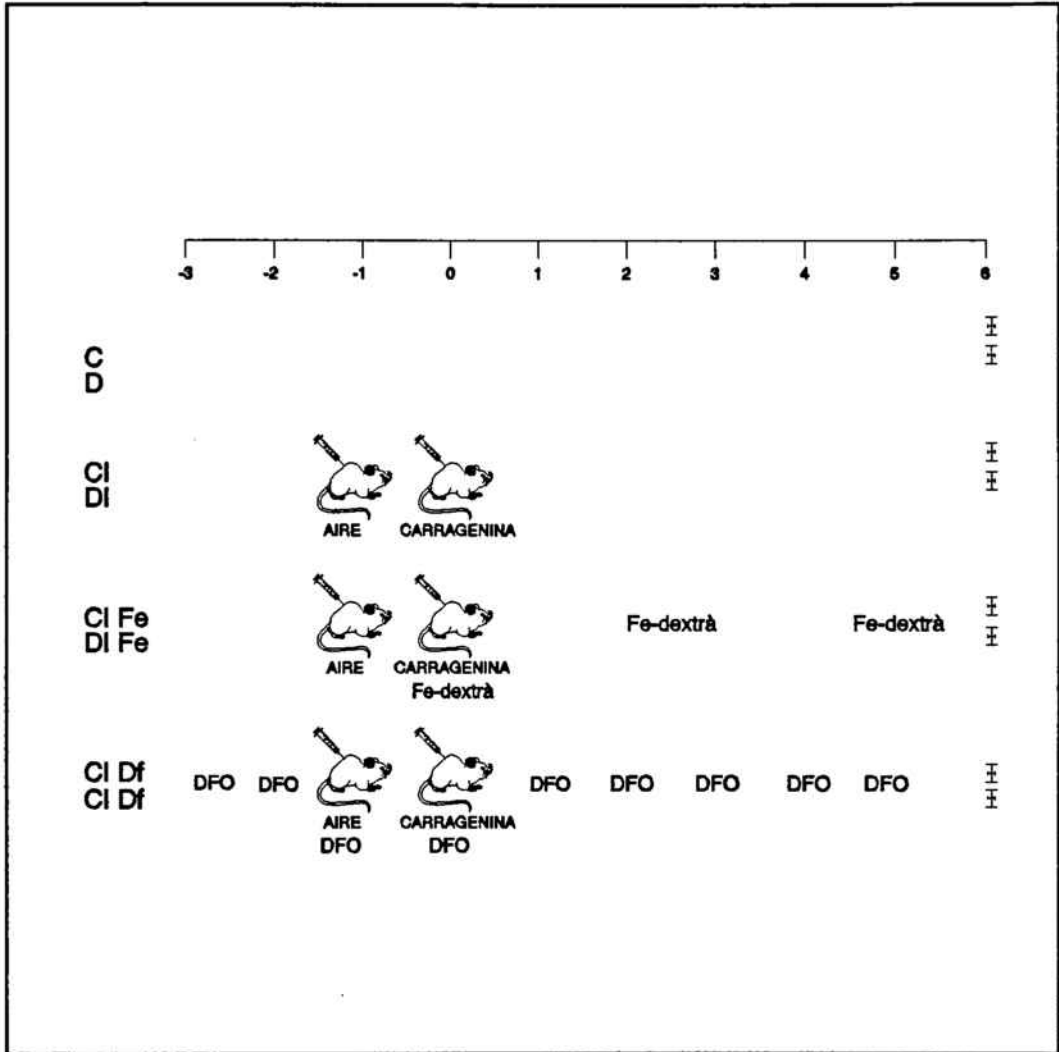


Figura 30: Esquema dels tractaments a que es van sotmetre animals alimentats amb dieta control i animals alimentats amb dieta deficient en AGPI.

## RESULTATS

### 1.- Pes corporal.

Es va treballar amb rates de pesos compresos entre 340 i 470 g (taula XV). Un règim deficient en AGPI no modifica significativament el pes dels animals ni tampóc s'observen modificacions amb cap dels tractaments administrats, excepte en el cas del grup DI Dfo en què els valors són inferiors als del seu control CI Dfo.

### 2.- Valors hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.

#### 2.1.- Hematòcrit i hemoglobina.

La dieta deficient en AGPI no provoca modificacions en l'hematòcrit ni en l'hemoglobina (taula XV).

El procés inflamatori en una dieta normal no dona lloc a modificacions en els valors de l'hematòcrit, però, en canvi, produeix una disminució de l'hemoglobina fins a 11,1 g/100 ml. Quan el procés inflamatori s'indueix en animals alimentats amb una dieta deficient en AGPI els valors normals d'hemoglobina es restableixen (13,6 g/100 ml).

En els animals inflamats tractats amb Fe-dextrà es mantenen els nivells normals d'hematòcrit i es segueixen presentant valors disminuïts de la concentració d'hemoglobina en plasma, tant si s'han alimentat amb una dieta control (12,1 g/100 ml) com amb una dieta deficient en AGPI (12,9 g/100 ml), encara que en aquest darrer grup la disminució és menys marcada.

Quan el tractament administrat als animals inflamats ha estat Dfo, els valors de l'hematòcrit no difereixen dels grups no inflamats C i D, mentre que la concentració d'hemoglobina segueix essent més baixa que als animals no inflamats. Aquest descens és més accentuat en el grup CI Dfo (11,6 g/100 ml).

Taula XV: Pes corporal, hematòcrit i hemoglobina a animals control, inflamats, tractats amb Fe o Dfo sotmesos a una dieta control o deficient en AGPI.

Grup	Pes corporal (g)	Hematòcrit (%)	Hemoglobina (g/100 ml)
C	422 ± 13,0 <sup>ab</sup>	46 ± 1,3 <sup>ab</sup>	14,4 ± 0,40 <sup>a</sup>
D	391 ± 11,0 <sup>bc</sup>	46 ± 1,3 <sup>ab</sup>	13,9 ± 0,27 <sup>a</sup>
CI	378 ± 22,0 <sup>bc</sup>	42 ± 1,9 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,78 <sup>c</sup>
DI	396 ± 14,0 <sup>ab</sup>	46 ± 0,6 <sup>ab</sup>	13,6 ± 0,34 <sup>ab</sup>
CI Fe	458 ± 23,0 <sup>a</sup>	47 ± 0,2 <sup>ab</sup>	12,1 ± 0,16 <sup>c</sup>
DI Fe	395 ± 17,0 <sup>abc</sup>	48 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,32 <sup>bc</sup>
CI Dfo	437 ± 12,0 <sup>a</sup>	47 ± 0,7 <sup>ab</sup>	11,6 ± 0,47 <sup>c</sup>
DI Dfo	358 ± 18,0 <sup>f</sup>	46 ± 0,2 <sup>ab</sup>	12,6 ± 0,39 <sup>bc</sup>

Mitja ± ESM de 5 animals. Comparacions entre grups amb l'anàlisi de la variància i el test de Bonferroni. Grups de la mateixa columna que tenen almenys una lletra en comú no són estadísticament diferents amb  $p < 0,05$ .

## **2.2.- Ferro plasmàtic, TIBC i saturació de la transferrina.**

El ferro plasmàtic i la capacitat total de fixació del ferro per la transferrina (taula XVI) són lleugerament més elevats en animals alimentats amb una dieta deficient en AGPI quan se'ls compara amb animals que han rebut una dieta control, però aquesta diferència no és significativa.

La inducció de la inflamació produeix una disminució en la capacitat total de fixació de ferro per la transferrina, mentre que en animals deficients en AGPI el TIBC recupera valors normals.

L'administració de Fe-dextrà fa augmentar el ferro plasmàtic i el TIBC, tant en animals alimentats amb la dieta control com amb la dieta deficient en AGPI, grup aquest darrer on s'observa una gran variabilitat.

El tractament amb Dfo a animals inflamats, amb qualsevol de les dues dietes, ens remet a valors estadísticament semblants als animals no inflamats quant a ferro plasmàtic i TIBC, amb una saturació normal de la transferrina (33%).

## **2.3.- Ceruloplasmina plasmàtica.**

La concentració de ceruloplasmina en plasma no difereix en els dos grups no inflamats (taula XVI).

Amb la inducció de la inflamació, la concentració de ceruloplasmina incrementa, passant de 27 mg/100 ml en el grup C a 49 mg/100 ml en el grup CI. Amb la dieta deficient l'increment és molt més marcat, obtenint-se el valor de 71 mg/100 ml per al grup DI.

El tractament amb Fe-dextrà o amb Dfo no modifica els valors de ceruloplasmina respecte al grup inflamats, de manera que en animals alimentats amb una dieta control els valors no són estadísticament diferents del grup CI, i en animals alimentats amb una dieta deficient els nivells de ceruloplasmina no difereixen dels nivells en el grup DI.

Taula XVI: Ferro, capacitat total de fixació de la transferrina, percentatge de saturació de la transferrina i ceruloplasmina al plasma d'animals control, inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control o deficient en AGPI.

Grup	Fe plasmàtic ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )	TIBC ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )	Saturació transf. (%)	Ceruloplasmina ( $\text{mg}/100 \text{ ml}$ )
C	131 $\pm$ 16,0 <sup>c</sup>	491 $\pm$ 29,0 <sup>b</sup>	27	27 $\pm$ 2,7 <sup>d</sup>
D	173 $\pm$ 33,0 <sup>bc</sup>	502 $\pm$ 32,0 <sup>b</sup>	34	32 $\pm$ 3,4 <sup>d</sup>
CI	112 $\pm$ 5,0 <sup>c</sup>	359 $\pm$ 12,0 <sup>c</sup>	31	49 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>
DI	191 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>	514 $\pm$ 26,0 <sup>b</sup>	37	71 $\pm$ 1,0 <sup>ab</sup>
CI Fe	487 $\pm$ 12,0 <sup>a</sup>	730 $\pm$ 50,0 <sup>a</sup>	67	53 $\pm$ 3,4 <sup>bc</sup>
DI Fe	766 $\pm$ 155,5 <sup>a</sup>	1026 $\pm$ 159,0 <sup>a</sup>	75	71 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>
CI Dfo	157 $\pm$ 31,0 <sup>bc</sup>	481 $\pm$ 14,0 <sup>b</sup>	33	54 $\pm$ 4,3 <sup>bc</sup>
DI Dfo	154 $\pm$ 49,0 <sup>bc</sup>	461 $\pm$ 29,0 <sup>b</sup>	33	67 $\pm$ 5,6 <sup>ab</sup>

Mitja  $\pm$  ESM de 5 animals. Valoració estadística a la taula XV.



### 3.- Pes del fetge i contingut en ferro.

No hi ha diferències pel que fa al pes del fetge (taula XVII) en els diferents grups, i només s'observa una disminució d'aquest en el grup DI Dfo, relacionat amb el seu menor pes corporal.

Una dieta deficient en AGPI produeix increment en les reserves hepàtiques de ferro (taula XVII) en forma de ferro ferritínic i de ferro no hemínic, de manera que en animals sense inflamar s'obtenen valors de ferro no hemínic de 128  $\mu\text{g/g}$  de teixit (grup C) que s'incrementen fins a 186  $\mu\text{g/g}$  de teixit quan els animals són alimentats amb una dieta deficient en AGPI (D). El percentatge de ferro ferritínic respecte al no hemínic és del 14% al grup C i del 32 % al grup D, de manera que l'increment de ferro de reserva que es produeix amb la dieta deficient en AGPI ocupa el *pool* de ferro ferritínic. Quant al contingut en ferro per òrgan total (figures 31 i 32) observem com la dieta deficient en AGPI dóna lloc a un increment del ferro de reserva en tots els grups, llevat del DI Dfo.

Els animals inflamats alimentats amb dieta control presenten un increment en les reserves de ferro no hemínic hepàtic quan es comparen amb el grup alimentat amb dieta control no inflammat, de manera que el grup CI presenta uns valors de ferro 159  $\mu\text{g/g}$  de teixit. Com que el percentatge de ferro ferritínic es manté en aquest grup (15%), aquest increment de ferro s'està produïnt en el *pool* de ferro hemosiderínic.

En el grup inflammat alimentat amb una dieta deficient en AGPI, s'observa un increment en quant a ferro ferritínic i no hemínic estadísticament superior al grup inflammat sotmés a una dieta control. Tammateix aquests nivells de ferro de reserva no difereixen dels nivells de ferro als animals que han rebut una dieta deficient en AGPI i no han estat inflamats, amb l'única diferència que el percentatge que el ferro ferritínic representa respecte al ferro no hemínic és, en el grup DI del 19%, quant al grup D era del 32%, de manera que la inflamació està afavorint un emmagatzematge en forma d'hemosiderina.

Quan els animals inflamats han estat tractats amb Fe-dextrà l'increment

de reserves hepàtiques de ferro ferrític i no hemínic és important, i com s'ha vist per als grups anteriors, superiors als animals sotmesos a una dieta deficient en AGPI.

El tractament amb Dfo fa disminuir les reserves hepàtiques en ferro, sobretot les de ferro no hemínic, respecte als animals inflamats. Curiosament, els valors no difereixen per a ambdues dietes estudiades.

Les variacions són del mateix ordre a l'expressar els resultats de les reserves de ferro per òrgan (figures 31 i 32).

#### **4.- Paràmetres inflamatoris**

##### **4.1.- Pes del granuloma.**

No s'observen diferències significatives quant al pes del granuloma (taula XVIII) entre els grups alimentats amb una dieta control, de manera que en el grup CI aquest teixit pesa 24,7 g, el valor més alt correspon al grup tractat amb Fe-dextrà (27,6g) i el més baix al grup tractat amb Dfo (20,9 g).

No obstant, aquest es troba disminuït en tots els grups alimentats amb una dieta deficient en AGPI, sense observar-se diferències significatives entre els grups DI (14,1 g), DI Fe (18,2 g) i DI Dfo (16,1 g).

#### **5.- Paràmetres de lipoperoxidació.**

##### **5.1.- Età expirat.**

Els valors acumulatius d'età expirat entre 1 i 4 hores es poden observar a la figura 33.

Els nivells basals d'età expirat durant 4 hores no varien amb una dieta control o deficient en AGPI (entre 5,1 i 8,6 nmols/kg).

Taula XVII: Pes del fetge i reserves de ferro al fetge en forma de ferro ferrític i no hemínic a animals control i inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control o deficient en AGPI.

Grup	Pes fetge (g)	Fe ferrític ( $\mu\text{g/g}$ )	Fe no hemínic ( $\mu\text{g/g}$ )	Fe ft/Fe no hem (%)
C	10,3 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	18 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>	128 $\pm$ 8 <sup>c</sup>	14
D	10,7 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 9,6 <sup>ab</sup>	186 $\pm$ 22 <sup>cd</sup>	32
CI	9,8 $\pm$ 0,57 <sup>ab</sup>	23 $\pm$ 2,1 <sup>c</sup>	159 $\pm$ 9 <sup>d</sup>	15
DI	9,1 $\pm$ 0,35 <sup>bc</sup>	48 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	253 $\pm$ 22 <sup>bc</sup>	19
CI Fe	9,7 $\pm$ 0,59 <sup>abc</sup>	37 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	303 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	12
DI Fe	9,5 $\pm$ 0,38 <sup>abc</sup>	70 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	519 $\pm$ 37 <sup>a</sup>	14
CI Dfo	9,8 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>	22 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	106 $\pm$ 9 <sup>e</sup>	21
DI Dfo	8,1 $\pm$ 0,42 <sup>c</sup>	21 $\pm$ 3,3 <sup>c</sup>	138 $\pm$ 22 <sup>de</sup>	15

Mitja  $\pm$  ESM de 5 animals. Valoració estadística a la taula XV.

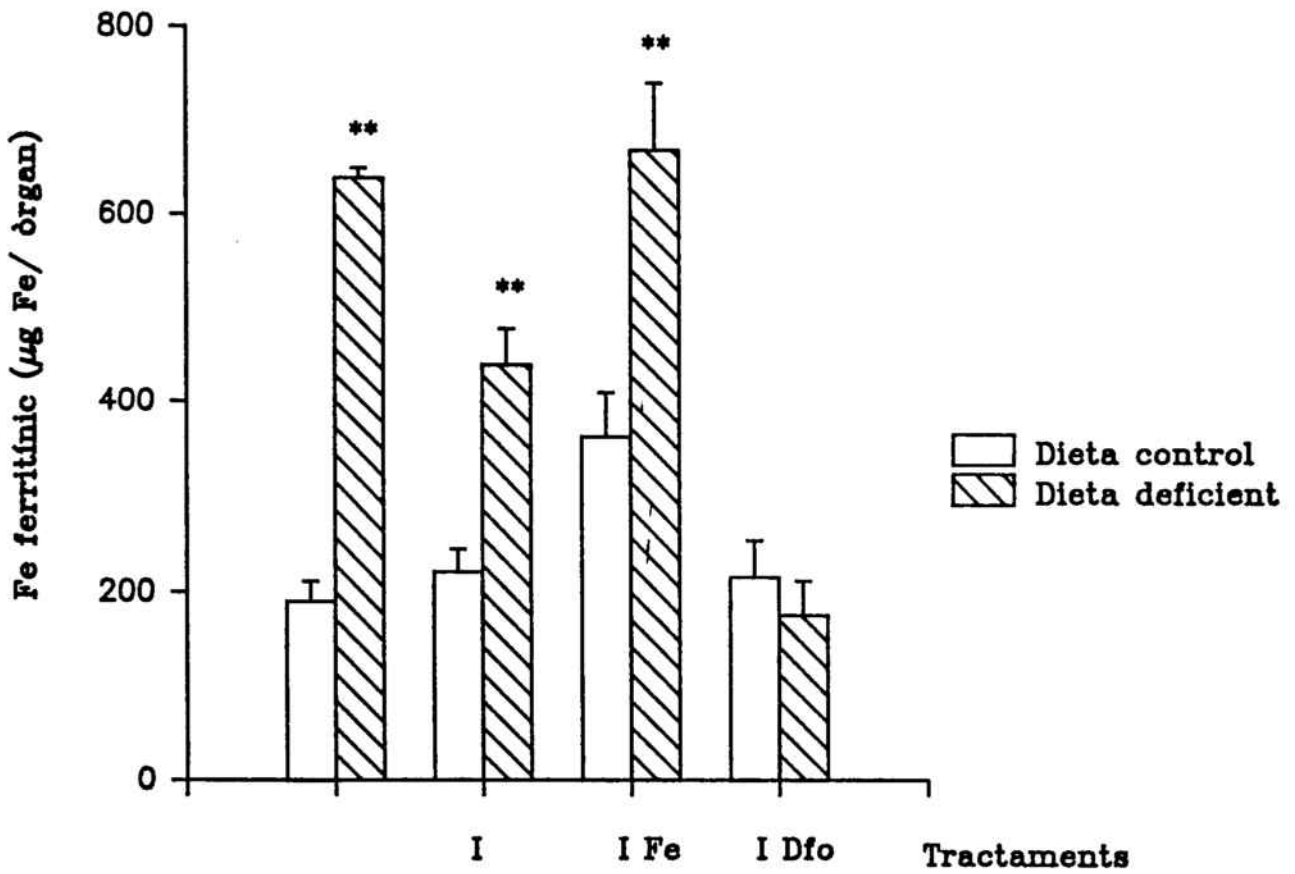


Figura 31: Ferro ferritínic al fetge d'animals control, inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control o deficiet en AGPI. Mitja  $\pm$  ESM de 5 animals. Comparacions amb el respectiu grup alimentat amb dieta control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

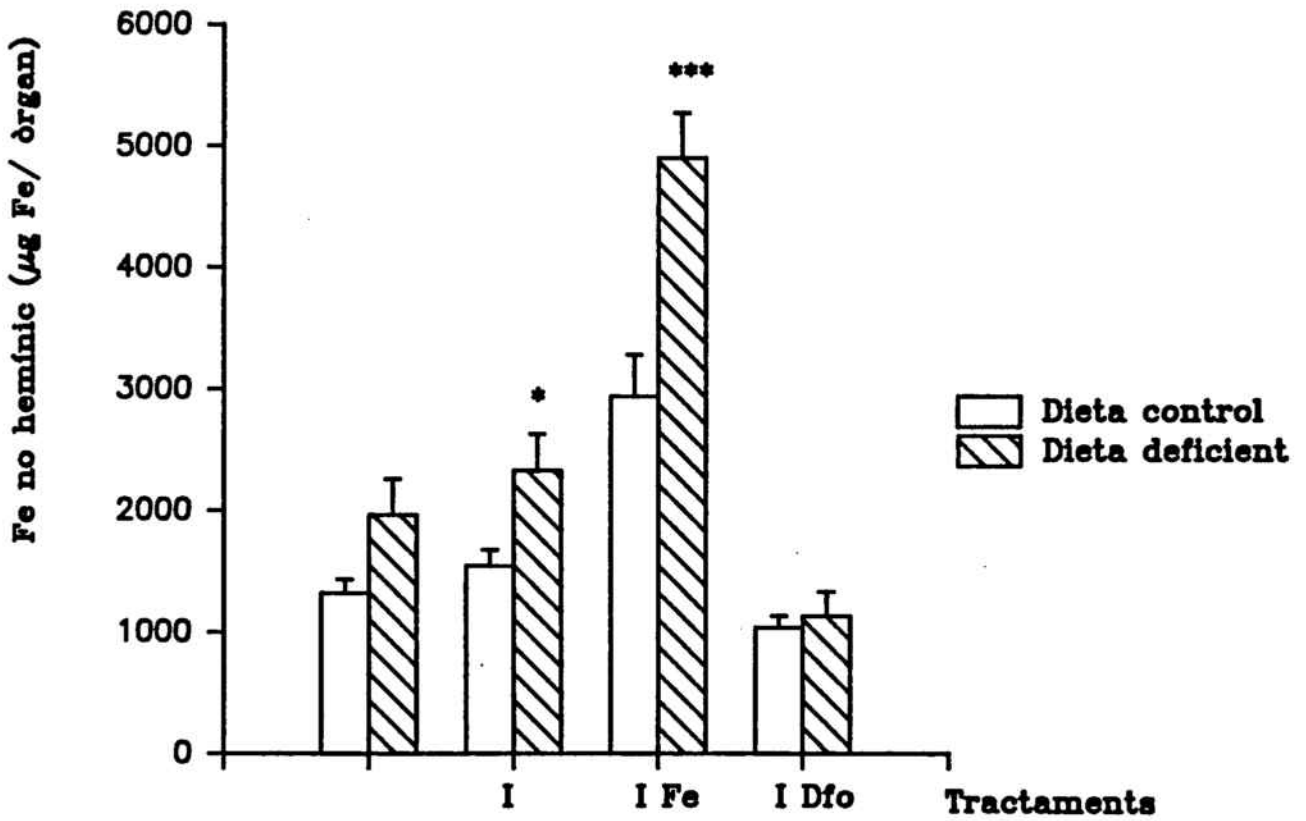


Figura 32: Ferro no hemínic al fetge d'animals control, inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control o deficient en AGPI. Mitja  $\pm$  ESM de 5 animals. Comparacions amb el respectiu grup alimentat amb dieta control: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Taula XVIII: Pes del granuloma a animals inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control o deficient en AGPI.

Grup	Pes granuloma (g)
CI	24,7 ± 2,67 <sup>ab</sup>
DI	14,1 ± 1,15 <sup>c</sup>
CI Fe	27,6 ± 2,46 <sup>a</sup>
DI Fe	18,2 ± 2,36 <sup>bc</sup>
CI Dfo	20,9 ± 1,00 <sup>ab</sup>
DI Dfo	16,1 ± 1,69 <sup>c</sup>

Mitja ± ESM de 5 animals. Valoració estadística a la taula XV.

Els valors màxims d'età expirat s'obtenen en el grup CI Fe, (49 nmols/kg), indicant-nos que el tractament amb Fe-dextrà ha donat lloc a un increment de la lipoperoxidació. Seguidament s'observen els animals tractats amb Dfo, CI Dfo, amb valors molt semblants als animals inflamats CI (24 i 22 nmols/kg, respectivament).

El règim deficient en AGPI produeix una disminució de l'età exhalat en els grups DI (12 nmols/kg), tractats amb Fe-dextrà, DI Fe (8,6 nmols/kg) i tractats amb Dfo, DI Dfo (4 nmols/kg), no observant-se diferències entre l'età expirat per aquests grups i els nivells basals.

### **5.2.- Nivells plasmàtics de PGE<sub>2</sub>**

La inflamació dóna lloc a un increment en els nivells de PGE<sub>2</sub> plasmàtica, obtenint-se un valor de 3,86 ng/ml en el grup CI front al 1,68 ng/ml del grup C.

En els animals alimentats amb una dieta control, el tractament amb Fe-dextrà o amb Dfo disminueix lleugerament els nivells de PGE<sub>2</sub> respecte als grups CI de manera que no són significativament diferents ni del grup C ni del grup CI.

Una dieta deficient en AGPI produeix una disminució de PGE<sub>2</sub> en plasma en tots els tractaments: sense inflamar, D (1,06 ng/ml); inflamats, DI (0,88 ng/ml); tractat amb Fe-dextrà, DI Fe (1,19 ng/ml) i tractat amb Dfo, DI Dfo (1,28 ng/ml), no provocant diferències significatives cap d'aquests tractaments.

### **5.3.- Nivells plasmàtics de MDA.**

La inflamació produeix un increment dels nivells de MDA plasmàtic, des de 2 nmol/ml en el grup C a 2,88 nmol/ml en el grup CI (taula XIX). No s'observen diferències entre els animals tractats amb una dieta control o deficient en AGPI.

En els animals tractats amb Fe-dextrà i alimentats amb una dieta control

els nivells de MDA en plasma incrementen significativament fins a 3,45 nmol/ml en el grup CI Fe. Aquesta tendència s'inverteix si el grup ha estat alimentat amb una dieta deficient en AGPI, disminuint els nivells de MDA des de 2,38 nmol/ml en el grup DI, a 1,55 nmol/ml en el grup DI Fe.

Els grups tractats amb Dfo presenten una disminució en els nivells de MDA en plasma, tant en el grup sotmés a una dieta control com deficient en AGPI.



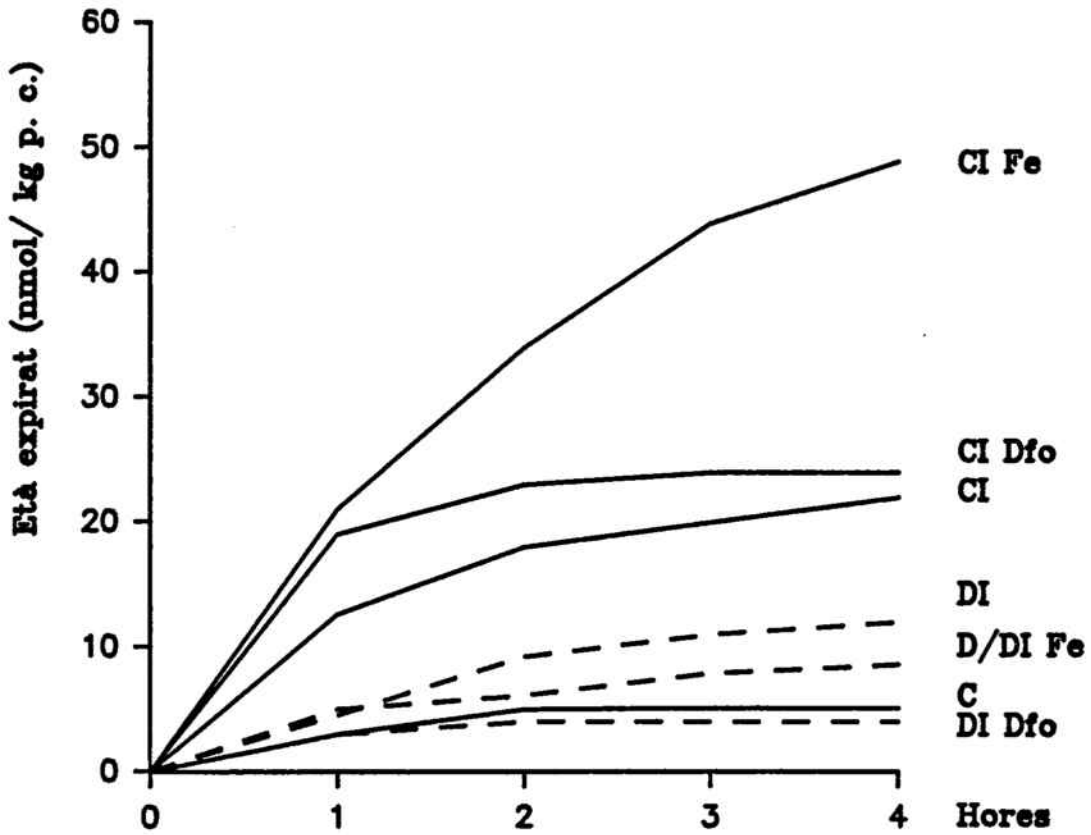


Figura 33: Età expirat durant 4 hores a animals control i inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control (línia contínua) o deficient (línia discontinua) en AGPI. Mitja de 4 animals.

Taula XIX: PGE<sub>2</sub> i Malondialdehid al plasma d'animals control i inflamats, tractats amb Fe i Dfo i sotmesos a una dieta control, o deficient en AGPI.

Grup	PGE <sub>2</sub> (ng/ml)	MDA (nmol/ml)
C	1,68 ± 0,33 <sup>bc</sup>	2,00 ± 0,11 <sup>c</sup>
D	1,06 ± 0,08 <sup>d</sup>	2,13 ± 0,13 <sup>c</sup>
CI	3,86 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,19 <sup>b</sup>
DI	0,88 ± 0,10 <sup>d</sup>	2,38 ± 0,33 <sup>bc</sup>
CI Fe	2,30 ± 0,53 <sup>abc</sup>	3,45 ± 0,09 <sup>a</sup>
DI Fe	1,19 ± 0,49 <sup>cd</sup>	1,55 ± 0,09 <sup>d</sup>
CI Dfo	2,50 ± 0,23 <sup>ab</sup>	1,13 ± 0,15 <sup>d</sup>
DI Dfo	1,28 ± 0,30 <sup>cd</sup>	1,29 ± 0,14 <sup>d</sup>

Mitja ± ESM de 5 animals. Valoració estadística a la taula XV.

**DISCUSSIÓ**

La inflamació origina complexes alteracions en el metabolisme del ferro, alhora que el ferro descompartimentat pot influenciar el desenvolupament del procés inflamatori. El model inflamatori experimental del granuloma per carragenina ens permet estudiar aquestes interaccions que es manifesten en els nivells de ferro circulant en els animals i en l'activitat pro-inflamatòria del ferro administrat a l'interior de la bossa del granuloma.

### **1.- Alteracions en els paràmetres relacionats amb el metabolisme del ferro.**

Una de les observacions més constants en els processos inflamatoris és el desenvolupament de l'anèmia de grau mig, AICD (Cartwright i Lee, 1971; Lukens i col., 1967). Aquesta anèmia seria la darrera manifestació d'alteracions en el metabolisme del ferro, que donarien lloc a hipoferrèmia, malgrat l'existència de nivells de ferro normals o elevats als òrgans de reserva.

En les nostres condicions, la hipoferrèmia es manifesta ja a un dia de produir-se la inflamació, car s'observa un descens important del ferro plasmàtic. Aquest es recupera el dia 2, per a tornar a disminuir, mantenint-se en valors inferiors als control durant tot el procés. D'aquesta manera la saturació de la transferrina es manté al voltant del 10-15%. Aquest valor és molt baix respecte els valors descrits en situació normal, malgrat que l'increment de ceruloplasmina en plasma durant la inflamació podria estar ajudant a incrementar el percentatge de saturació de la transferrina, ja que s'ha descrit que la ceruloplasmina tindria una activitat ferroxidasa, que catalitza l'oxidació de ferro ferrós a fèrric (Frieden i Hsieh, 1976), el qual podria així lligar-se a la transferrina.

Diversos autors, en diferents models experimentals, coincideixen en remarcar la disminució del ferro plasmàtic durant la inflamació: en gossos artrítics (Feldman i Kaneko, 1980), en rates amb inflamació induïda per adjuvant de Freund (Lukens i col., 1967; Mikolajew i col., 1969b; Carbonell i col., 1989) o induïda per turpentina (Hershko i col., 1974).

La hipoferrèmia pot acabar en anèmia. Mikolajew i col. (1969a) varen

observar una disminució dels valors de l'hematòcrit i l'hemoglobina en rates Wistar sotmeses a 1, 2 o 3 injeccions d'adjuvant de Freund de manera que es mantinguessin els símptomes de l'artritis fins als 64 dies de la primera injecció. Una disminució significativa d'aquests dos paràmetres també va ser descrita per nosaltres (Carbonell i col., 1989) en el model de l'artritis experimental als 7 dies de la inducció de la inflamació.

En el model del granuloma per carragenina obtenim els valors més baixos de l'hemoglobina i l'hematòcrit el dia 6 de la inducció de la inflamació, indicant-nos l'aparició de la lleu anèmia descrita per altres autors durant les malalties inflamatòries i cròniques (Cartwright i Lee, 1971).

Les causes de l'AICD són complexes i, probablement, hi hagi més d'un mecanisme implicat (veure pàg. 37). La hipòtesi actualment més acceptada (Konijn i Hershko, 1989) estableix que, en la majoria dels casos on s'observa AICD, la proliferació d'eritròcits està limitada per la poca disponibilitat de ferro (Douglas i Adamson, 1975). Aquesta afirmació no deixa de ser sorprenent si tenim en compte que es considera que els pacients amb AICD mantenen uns nivells normals o incrementats de ferro de reserva. En aquests casos la valoració ha estat feta de manera indirecte, prenent com a indicador la concentració de ferritina sèrica. Aquest és un mètode habitual en clínica des que Jacobs i col. (1972) varen descriure que la concentració de ferritina present normalment en sèrum reflexava la quantitat de ferro de reserva en l'organisme. Realment la ferritina sèrica està incrementada en pacients amb malalties inflamatòries (Baynes i col., 1986; Birgegard, 1980), però segons Bigergard i col. (1978) la ferritina sèrica estaria actuant com una proteïna de fase aguda, és a dir, la seva síntesi estaria regulada no només per la concentració de ferro, sinó també per un senyal de fase aguda, com la inflamació. Per aquesta raó, durant les malalties cròniques i inflamatòries, alguns autors qüestionen la validesa de la determinació de la ferritina sèrica com un bon indicador de l'estat de les reserves en ferro (Coenem i col., 1991) i apunten que alguns pacients han estat diagnosticats erròniament.

Pel que fa a models experimentals, pocs treballs han valorat de manera directe els nivells de ferro en òrgans de reserva, malgrat la importància d'aquesta dada per a explicar la seva anòmala mobilització durant la inflamació. Els nivells de ferro no hemínic al fetge han estat valorat per Feldman i col. (1981a,b,c,d) en gossos artrítics, mentre que en els nostres treballs hem determinat tant el ferro no hemínic com el ferro ferritínic en diversos models inflamatoris en rates (Carbonell i col., 1989). Les dades obtingudes clarament demostren que el ferro de reserva està incrementat o es manté en nivells normals durant el desenvolupament de la inflamació, demostrant que la hipoferrèmia no es deu a una deficiència en ferro sino a una defectiva reutilització del mateix (Erslev, 1972; Haurani i col., 1965). La poca disponibilitat d'aquest ferro de reserva per a l'eritropoesi ha portat a alguns autors a parlar d'un *segrest* del ferro intracel.lular, particularment a les cèl.lules RE (Roeser, 1980). Una especial avidesa de les cèl.lules RE pel ferro de la transferrina i un bloqueig en l'alliberament del ferro per part d'aquestes cèl.lules explicarien aquesta situació.

Konijn i Hershko (1977), utilitzant eritròcits no viables marcats amb  $^{59}\text{Fe}$ , varen observar un increment en la retenció del ferro en les cèl.lules RE de rates inflamades, la qual cosa donava lloc a un decreixement en el *turnover* plasmàtic de ferro. En cèl.lules parenquimals de rates inflamades amb turpentina i injectades amb complexos d'hemoglobina i haptoglobina marcades amb  $^{59}\text{Fe}$  aquest grup també havia demostrat un increment en la retenció del ferro (Hersko i col., 1974). Més recentment, en estudis *in vitro* Birgegard i Caro (1984) han descrit que l'absorció de  $^{59}\text{Fe}$  lligat a la transferrina és 4 vegades més gran en macròfags obtinguts de ratolins inflamats amb turpentina que en macròfags peritoneals de ratolins normals.

Aquest increment en la captació de ferro per part de les cèl.lules RE expansionaria el *pool* de ferro làbil de la cèl.lula. Aquest *pool* de ferro intracel.lular, anomenat també de ferro en trànsit (Roeser, 1980) o de baix pes molecular (Fontecave i Pierre, 1991), no ha estat identificat, però la seva existència i funció són indispensables per a poder explicar els processos de

transport a l'interior de la cèl·lula, ja que les proteïnes que contenen ferro (transferrina, ferritina, proteïnes mitocondrials...) no interactuen directament entre elles. Probablement aquest *pool* estigui constituït per complexos de ferro ferrós de baix pes molecular (Fontecave i Pierre, 1991).

Si el ferro captat per les cèl·lules en els òrgans d'emmagatzematge es quedés formant part del *pool* làbil, podria tornar a ésser mobilitzat per a incorporar-se a la transferrina, i, de fet, això s'observa el dia 2 de la inducció de la inflamació, quan hi ha un restabliment del seu nivell circulant. Per a explicar la poca mobilització del ferro intracel·lular que es produeix a partir del dia 4, aquest ferro incorporat ha de ser desviat a formes més estables com la ferritina o l'hemosiderina.

La desviació del ferro del *pool* làbil a ferro de reserva pot ser una conseqüència directa de l'expansió d'aquest *pool* (Lynch i col., 1974), car Drysdale i Munro (1966) varen observar com l'administració *in vivo* de ferro en rates donava lloc a un increment en la síntesi d'apoferritina hepàtica, concluint que actuaria com una proteïna induïble. La regulació de l'expressió de la ferritina mediada per ferro es realitza a nivell traduccional, i s'ha identificat una seqüència 5' responsable d'aquesta regulació (Leibold i Munro, 1988).

Però aquest no és l'únic factor que intervé en l'expressió de la ferritina, els treballs de Konijn i Hershko (1977) en rates inflamades per turpentina mostren que la ferritina es comporta com una proteïna de fase aguda: les dades que varen obtenir indiquen que les alteracions en la taxa de síntesi d'apoferritina precedeixen els canvis en ferro plasmàtic. La incorporació de [<sup>3</sup>H]-leucina a la ferritina a les 4 hores de la inflamació era el doble que el normal, mentre que el ferro plasmàtic i el *turnover* de ferro en plasma encara no havien canviat. La síntesi de ferritina es mantenia elevada fins a les 8 hores de la inducció de la inflamació, mentre que la màxima reducció en els nivells de ferro es donava al cap de 12 hores, quan la síntesi d'apoferritina havia tornat al valor normal. Segons aquestes dades l'increment en la síntesi d'apoferritina durant la inflamació no seria induïda pel *pool* làbil, sinó com a resposta de fase aguda.

Aquesta apoferritina sintetitzada *de novo* atraparà el ferro del *pool* làbil, fent-lo no apte per a l'alliberament a l'apotransferrina circulant. Aquest mateix grup (Konijn i col., 1981) va observar una segona etapa en l'increment de la síntesi de ferritina que començaria a les 24 hores de la inducció de la inflamació i encara es mantindria incrementada a les 48 hores.

El mecanisme que regula la síntesi de ferritina durant la inflamació induïda per turpentina ha estat estudiat per Campbell i col. (1989) a fetge i melsa, situant aquests autors la regulació a nivell traduccional. A les 12 hores de la inflamació, aquests autors observen un desplaçament del mRNA de ferritina cap als poliribosomes. Separant per gradients la fracció polisòmica, varen observar que els poliribosomes que intervenen en la síntesi de ferritina en resposta a la inflamació presentaven un patró de mida diferent (més petit) als que intervenien en resposta a la sobrecàrrega en ferro. Queda, però, per aclarir si en algun pas es dona un increment en la transcripció de mRNA ferrític i fins a quin punt la resposta a la inflamació (que aquests autors observen a les 12 hores, però no a les 2 hores de la inducció de la inflamació) pot ser mediada en algun estadi pel ferro.

Amb les dades que hem obtingut no es pot decidir si ha estat el ferro incorporat al *pool* làbil el que ha estimulat la síntesi de ferritina, o si aquesta s'havia iniciat prèviament, ja que la davallada del ferro plasmàtic es dona pràcticament de manera simultània a l'increment de ferro emmagatzemat a fetge i melsa.

A la vista de les dades es pot deduir que inicialment el ferro s'incorpora al *pool* làbil (per això és mobilitzat el dia 2 de la inflamació) per a desviar-se seguidament cap al *pool* de ferro ferrític (ja que a partir del dia 2 el *pool* de ferro ferrític va augmentant, i el percentatge de ferro ferrític respecte al ferro no hemínic total del fetge va incrementant-se fins a representar el 48,5% el dia 6 de la inflamació). Pot ser que a partir d'aquest moment una part de la ferritina intracel·lular sigui desnaturalitzada per a formar hemosiderina i d'aquesta manera el percentatge de ferro ferrític respecte al no hemínic començaria a



disminuir. S'ha descrit que la conversió de ferritina en hemosiderina estaria accelerada per la inflamació, probablement per mecanismes intracel·lulars activats pels mediadors inflamatoris (Konijn i Hershko, 1989). Segons Feldman i Kaneko (1980) a l'augmentar els nivells de ferritina durant la inflamació s'inhibiria la catalasa, de manera que incrementaria la concentració de  $H_2O_2$ , el qual dirigeix la conversió de ferritina en hemosiderina.

Respecte al tipus de proteïna que emmagatzema el ferro, hem obtingut resultats diferents quant al comportament en fetge i melsa. Mentre que al fetge les reserves durant la inflamació s'estan emmagatzemant principalment en el *pool* de ferritina, a la melsa el ferro ferrític disminueix el dia 2, de manera que pensem que el ferro s'està emmagatzemant preferentment com a hemosiderina. Aquest diferent comportament potser estigui en consonància amb el tipus de cèl·lules en aquests òrgans. Així s'ha descrit que, en rates femelles, la melsa conté un 25% del ferro de reserva en forma ferrítica, mentre que en fetge, les cèl·lules de Kupffer contindrien un 7% de ferro ferrític i a les cèl·lules parenquimals (més abundants) un 70% del ferro no hemínic emmagatzemat estaria en forma de ferritina (Cook i col., 1974).

Els estudis *in vivo* de Konijn i Hershko (1977) on s'observa un increment en la síntesi de ferritina hepàtica durant la inflamació, no aclareixen si són les cèl·lules de Kupffer o els hepatòcits els responsables d'aquest increment.

El metabolisme del ferro en macròfags ha estat estudiat més recentment per Alvarez-Hernández i col. (1986). Aquest autors varen estudiar *in vitro* la captació i l'alliberament de immuno-complexes de  $^{59}Fe$ -transferrina-antitransferrina per macròfags peritoneals de ratolí. Els seus resultats mostren que, en els macròfags obtinguts de ratolins inflamats amb tioglicolat, el ferro marcat s'incorpora en compostos semblants a l'hemosiderina, anomenats *hemosiderin-like*, o bé compostos solubles diferents de la ferritina. L'alliberament de ferro per part d'aquests macròfags era menor que en macròfags d'animals no inflamats o estimulats per agents immunològics. Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules RE estan desviant una proporció significativa cap a un *pool*

intracel·lular que no sigui reactiu. És lògic aleshores que el ferro que va essent captat per la melsa, amb una proporció més gran de cèl·lules RE que el fetge, s'emmagatzemi preferentment com a hemosiderina.

L'efecte de la inflamació en els paràmetres del metabolisme del ferro estudiats indiquen un bloqueig de ferro als òrgans de reserva deguda, en part, a una desviació del ferro del *pool* làbil a formes més segures d'emmagatzematge, com hem demostrat en els nostres resultats, reduint d'aquesta manera els nivells de ferro circulant.

S'han implicat altres mecanismes que ajudarien a mantenir aquesta situació d'hipoferrèmia, com una reducció en l'absorció intestinal de ferro (Hershko i col., 1974) o un increment de la seva excreció en processos inflamatoris de més cronicitat (Mikolajew i col., 1969b).

### **1.1.- Repercussions de l'administració de Fe-dextrà i de Dfo.**

L'anèmia que presentaven els pacients de malalties cròniques, va portar a administrar-los una teràpia en ferro. En pacients amb artritis reumatoide tant l'administració intravenosa (Winyard i col., 1987) com oral (Blake i Bacon, 1982) de Fe-dextrà produïa una exacerbació de la sinovitis inflamatòria, sense millorar l'anèmia.

L'administració de Fe-dextrà via subcutània, al mateix lloc que es produeix la inflamació, no incideix en el restabliment dels paràmetres hemàtics. Els valors de l'hematòcrit i l'hemoglobina es mantenen en la tendència a manifestar una anèmia poc lleu. El ferro plasmàtic és elevat respecte al grup inflamat el dia 1, però no mostra diferències significatives en la resta de grups, de manera que l'administració de Fe-dextrà ha incrementat el ferro de reserva, però aquest ferro no és, tampoc, mobilitzable.

En estudis recents sobre el processament subcel·lular del Fe-dextrà administrat via intraperitoneal en rates, Andrews i col. (1988) observen que el ferro és processat al fetge en siderosomes. El contingut d'aquests siderosomes

va variant al llarg del temps, així els primers dies contenen Fe-dextrà, després ferro ferrític i finalment, hemosiderínic. En el nostre model, el percentatge de ferro ferrític respecte a ferro no hemínic és màxim el dia 2 de la inducció de la inflamació, però menor que al grup control els dies 4 i 6, suggerint que s'està produïnt el pas de ferritina a hemosiderina.

No sabem quin mecanisme evita que el ferro administrat sigui mobilitzable per l'apotransferrina. Segons les observacions de Shoden i col. (1953) la proporció d'hemosiderina respecte a ferritina augmenta quan més alt és el contingut en ferro del teixit, probablement aquest hagi estat transformat en ferro hemosiderínic, accentuant la seva potent acció segrestadora del ferro produïda per la inflamació. Hem obtingut, però uns resultats sorprenents el dia 8 de la inducció de la inflamació, quan s'observa una disminució del ferro de reserva concomitant a un augment del ferro plasmàtic. Estudis sobre ferrocínètica en humans (Finch i col., 1970) demostren que quan s'injecta ferro radioactiu aquest desapareix inicialment del plasma, des d'una hora després de la injecció, per a seguidament tornar cap al plasma en un procés que aquest autors anomenen de refluxe. Aquest refluxe consisteix en una fase ràpida de tornada al plasma, amb un temps mig de 8 hores, que representa del 5 al 10% del ferro administrat, i d'una fase lenta, amb temps mig de 8 dies, que representa el 25% del ferro radioactiu injectat. Aquest temps de refluxe ens podria explicar que el Fe-dextrà hagi estat processat a les cèl.lules RE i als 8 dies, iniciat el procés de reparació de la inflamació, sigui disponible per a la seva mobilització.

Els intents de mobilitzar el ferro de reserva durant la inflamació han portat a assajar l'estratègia contrària: administrar un quelant d'aquest metall. El més utilitzat és la desferrioxamina (Dfo). Infusions prolongades de Dfo ja s'havien utilitzat en clínica quan l'acumulació de ferro provinent de transfusions regulars de sang durant les talassèmies donava lloc a danys hepàtics, endocrins o cardíacs (Pippard, 1989). L'administració de Dfo millorava la funció hepàtica, abans de que s'observés un marcat descens del ferro total en fetge (Hoffbrand i col., 1979). Aquestes dades suggerien que la Dfo estava mobilitzant una fracció

de ferro particularment tòxica.

La fracció de ferro capaç de ser quelada per la Dfo ha estat estudiada per Gower i col. (1989). Aquests autors descriuen que la Dfo quela la forma fèrrica, però pot també exercir una potent activitat ferroxidasa en el ferro ferrós. El ferro quelat per la Dfo constituïria el total del *pool* de baix pes molecular, i algun ferro derivat de la ferritina, probablement el més dèbilment fixat a la superfície proteica.

L'activitat quelant de la Dfo s'observa durant tot el procés, ja que el ferro de reserva en fetge es manté per sota del grup inflammat, i, tal com han descrit Gower i col. (1989), el ferro que està essent quelat formava part del *pool* làbil o estava lligat a la ferritina, en obtenir-se un menor percentatge de ferro ferrític respecte a no hemínic. En canvi, a la melsa, les reserves augmenten, suggerint-nos que els macròfags esplènics emmagatzemen el ferro preferentment com a hemosiderina, i aquest no pot ésser captat per la Dfo.

Els dies 1 i 2 de la inducció de la inflamació el ferro plasmàtic és restablert a valors normals en el grup tractat amb Dfo. Podria ser que la Dfo, en quelar el ferro que estava formant part de la ferritina, el fes més disponible per a passar al *pool* làbil i per a ser captat per l'apotransferrina circulant. Encara que no ens sigui possible obtenir una explicació clara, altres autors també han observat aquest fenomen en pacients amb artritis reumatoide (Giordano i col., 1986).

La Dfo saturada en ferro esdevé ferrioxamina. Aquesta és eliminada per via urinària o biliar. La seva utilització clínica, a part de causar efectes secundaris indesitjables, és difícil perquè és ràpidament eliminada del plasma.

Sembla, doncs, que la hipoferrèmia dels processos inflamatoris es manté malgrat l'administració de Fe-dextrà o d'un quelant de ferro.

En la explicació de la patogènesi de la hipoferrèmia s'han implicat els mediadors inflamatoris: actualment es pensa que els canvis en la cinètica del ferro formarien part de la reacció sistèmica que es dona durant la inflamació,

que inclouria, a més, febre, dolor, leucocitosi i síntesi incrementada de les proteïnes de fase aguda i que aquests canvis serien el resultat de la producció de mediadors inflamatoris pels diferents tipus cel.lulars que acudeixen al lloc inflamat.

## **2.- Modulació de la resposta inflamatòria pels nivells de ferro en l'organisme.**

El model inflamatori que hem escollit ens permet l'estudi quantitatiu i qualitatiu de les cèl.lules implicades en la inflamació, del fluid exsudat (que conté alguns dels mediadors) i del grau de reacció tissular.

El màxim de la inflamació se situa el dia 6, quan tant el pes del granuloma (22 g) com el volum d'exsudat (13 ml) són màxims. Pel que fa al nombre de leucòcits, en exsudat total el seu nombre es manté sense diferències del dia 1 al dia 8.

El teixit del granuloma està format per fibroblasts i macròfags (Bonney i col., 1978). Parham i col. (1981) varen suggerir que els macròfags serien responsables de la formació i del desenvolupament del granuloma per la seva capacitat de produir un factor soluble que estimularia els fibroblasts a secretar col.làgen. Maroussem i col. (1984) varen quantificar el contingut en mucopolisacàrids i col.làgen en el teixit granulomatós als 7 dies de produir-se la inflamació per carragenina. En granulomes d'aproximadament 11,9 g de pes varen obtenir 7,73 mg de glucosamina (mucopolisacàrid) i 12,24 mg d'hidroxiprolina (col.làgen).

De l'exsudat obtingut varem separar per filtració els *clusters* formats per cèl.lules mortes i fibrina (Marouseem i col., 1984) i, per centrifugació, el fluid exsudat i les cèl.lules. La viabilitat de les cèl.lules separades es va mantenir al voltant del 90% al llarg del procés estudiat.

La resposta inflamatòria es caracteritza per l'acumulació de leucòcits PMN (principalment neutròfils) que són subseqüentment reemplaçats per leucòcits mononuclears (Paz i Spector, 1962). L'estudi del tipus cel.lular i de la

seva activitat en el nostre model experimental va desvelar que les cèl·lules infiltrades són principalment leucòcits PMN en la fase aguda de la inflamació (80,7% el dia 1), i fins al dia 6, en que disminueix el seu percentatge fins al 50,3%, alhora que el percentatge de monòcits infiltrant-se en l'exsudat incrementa fins al 39% el dia 6. Un petit percentatge restant, que no varia al llarg del procés, estaria constituït per limfòcits. Aquests resultats corroboren els prèviament obtinguts per Hambleton i Miller (1989) en el mateix model inflamatori.

L'activitat fagocítica va ser mesurada per quimioluminiscència, tècnica que detecta la formació de radicals superòxid i d'oxigen singlet. Observem com l'activitat de  $0,8 \times 10^6$  cèl·lules va disminuïnt al llarg del procés, de manera que si bé el nombre total de cèl·lules es manté, aquestes són menys eficaces en terme de produir radicals superòxid. La correlació positiva que s'observa entre el percentatge de leucòcits PMN i la producció de quimioluminiscència, ens suggereix que aquests serien els responsables principals de l'explosió respiratòria. Però per explicar la disminució de l'activitat quimioluminiscent, també hem de tenir en compte que ha d'existir un mecanisme regulador de la fagocitosi, ja que la producció en excés de radicals acabarà autolesionant els propis leucòcits PMN, i produïnt el fenòmen de peroxidació de les biomolècules que formen el teixit inflamatori.

Quant al nombre de cèl·lules i al volum d'exsudat, el tractament amb Fe-dextrà i amb Dfo tenen efectes contraposats. Mentre que el tractament amb ferro disminueix ambdòs paràmetres, la Dfo els incrementa.

El tractament amb Fe-dextrà, no altera el pes del teixit format, disminueix l'exsudació, el nombre absolut de leucòcits i la seva capacitat fagocítica. L'efecte del tractament amb Fe-dextrà sobre les cèl·lules es deuria al *stress* oxidant que el ferro promou. Van Asbeck i col. (1984) varen demostrar *in vitro* que els efectes deleteris del ferro en la funció fagocítica dels PMN podria ser deguda a un efecte directe del ferro en la membrana cel·lular, o a un efecte indirecte a l'estimular la producció de les espècies reactives d'oxigen (ROS) que danyarien

els propis PMN. Aquests mecanismes induïrien a una reducció en el nombre de leucòcits.

Un cop separades les cèl·lules del *cluster* de cèl·lules mortes, la viabilitat cel·lular, ens va indicar una tendència a la disminució quan es va comparar amb els animals inflamats sense tractament. Cal tenir en compte que s'ha descrit que les cèl·lules poden excloure el blau tripà, però no funcionar metabòlicament.

L'estudi de la distribució dels leucòcits ens indica el mateix procés que als animals inflamats sense tractament: l'infiltrat inicial està compost predominantment per PMN, que van essent reemplaçats per monòcits, indicant un canvi de la fase aguda a la fase crònica de la inflamació, de manera que el tractament amb Fe-dextrà afecta per igual a tots els tipus cel·lulars. La capacitat de produir ROS està disminuïda el dia 1 de la inducció. L'administració de Fe-dextrà es va realitzar al mateix temps que la injecció de carragenina, de manera que el ferro estimularia a les primeres cèl·lules que s'infiltrarien al lloc inflamat a la producció de ROS, especialment el radical superòxid, que alliberat a l'exsudat en presència del ferro i de  $H_2O_2$ , donaria lloc al radical hidroxil, el qual lesionaria els propis PMN.

Quan s'administra Dfo des de 3 dies abans de la inducció de la inflamació i fins al dia anterior al sacrifici, s'observa un descens de la resposta tissular juntament amb un increment de l'exsudació i del nombre de leucòcits.

L'efecte de la Dfo sobre el teixit granulomatós pot explicar-se en termes de deficiència en ferro: la Dfo, a l'extreure el ferro necessari per a la seva replicació, limita la proliferació dels fibroblasts del teixit granulomatós, ja que el ferro és necessari per a la síntesi del DNA al formar part de l'enzim ribonucleòtid reductasa que redueix els ribonucleòtids cap als seus corresponents desoxiribonucleòtids. D'altra banda, el ferro és un important cofactor en la síntesi de col·làgen a l'estadi de la hidroxilació de la lisina i de la prolina, per la qual cosa l'efecte quelant de la Dfo es manifestaria en un menor contingut en col·làgen en el teixit format.

Els estudis en cultius cel·lulars de fibroblast pulmonars de Hunt i col.

(1979) mostren que a l'afegir Dfo al medi de cultiu els fibroblast realitzen de manera incorrecta la síntesi de DNA i redueixen la formació de col·làgen. Altres treballs més recents (Poot i col., 1989) en fibroblasts epitelials humans, detecten que quan s'afegeix Dfo al medi de cultiu el creixement cel·lular disminueix, i les cèl·lules s'acumulen en la fase G<sub>2</sub> del cicle cel·lular, detectant-se moltes cèl·lules hiperploides. La interpretació d'aquests resultats seria que, si bé el DNA s'havia pogut replicar, no hi hauria prou ferro pels enzims dels cicles respiratoris i oxidatius, de manera que cadascuna de les cèl·lules filles formades no podria rebre un lot complet d'enzims, i la incompetència funcional d'aquests enzims proveiria de cert senyal que inhibiria la divisió cel·lular. Resultats idèntics han estat descrits per altres autors en cultius de cèl·lules malignes en medis deficientes en ferro (Reddel i col., 1985).

L'increment en el volum de líquid exsudat i en el nombre de leucòcits en els animals tractats amb Dfo ha estat descrit també per altres autors, en un model experimental semblant, la inflamació induïda per un antigen en la bossa d'aire (Yoshino i col., 1984). Aquests autors justifiquen l'increment en el nombre cel·lular en termes de que la Dfo, al lligar el ferro que catalitza la reacció de Fenton, incrementaria la vida mitja dels leucòcits PMN, i, per tant, el seu nombre. Tanmateix, la vida mitja dels leucòcits PMN és molt curta. Així, en líquid sinovial de pacients amb artritis reumatoide, la vida mitja dels leucòcits PMN neutròfils s'ha estimat en 4 hores (Brown, 1988). La concentració de leucòcits que es produeix amb aquest tractament podria també estar relacionada amb un increment en la quantitat d'alguna substància quimiotàctica.

Els propis neutròfils descarreguen els seus grànols, que contenen una proteasa capaç de trencar el component C5 del complement en C5a, la forma activa, que és un potent agent quimiotàctic, atraent més neutròfils a la zona i, per tant, incrementant la resposta inflamatòria de manera exponencial, sino fos interrompuda. Matzner i col. (1983) varen descriure l'existència d'una proteïna inhibidora de la quimiotaxi dels neutròfils en el fluid sinovial, que tindria una activitat primària cap al C5a. Aquest inhibidor seria probablement secretat pels



fibroblasts (Matzner i Brzezinski, 1984). Podria ser que la Dfo, en inhibir la proliferació dels fibroblasts, estigui afectant la síntesi d'aquest inhibidor de la quimiotaxi? Això ens podria explicar els nostres resultats però, sens dubte, l'estudi dels mediadors inflamatoris ens portarà més claus sobre tots els mecanismes que hi estan implicats.

Malgrat l'increment en el nombre de cèl.lules, aquestes són menys actives. Els nostres resultats contradiuen els obtinguts per Van Asbeck i col. (1984) en PMN aïllats de sang humana. Aquests autors varen observar que la incubació de PMN durant 20 hores en presència de Dfo incrementava la capacitat de producció de superòxid i la quimioluminiscència.

En canvi, les nostres dades anirien en la mateixa línia que els treballs obtinguts amb deficiència en ferro. Així, en neutròfils aïllats de conills amb anèmia deficient en ferro s'ha descrit una disminució en la producció de radical superòxid, mesurada pel test de reducció del NBT (nitroblautetrazoli) (Celada i col., 1979). Aquests resultats i els de Moore i Humbert (1984) suggereixen que l'activitat de la NADPH oxidasa (enzim que conté ferro) està reduïda. També estaria afectada per la deficiència en ferro l'activitat de la mieloperoxidasa (Mackler i col., 1984). Ambdòs enzims són indispensables en el procés de l'explosió respiratòria dels leucòcits PMN.

A nivell de l'exsudat inflamatori, el medi on es troben les cèl.lules, l'estudi esdevé interessant per a conèixer els mecanismes propagadors i inhibidors de la peroxidació.

Ja hem comentat que els leucòcits PMN són una font important de ROS que, alliberats al medi i en presència de metalls de transició (particularment ferro) produiran, via reacció de Fenton, el radical hidroxil. Per aquest motiu és important estudiar la presència de ferro en el exsudat. En els nostres resultats s'observa la presència de ferro lligat a complexes de baix pes molecular (ferro dèbilment lligat) i de ferro ferritínic en els exudats d'animals inflamats.

La presència de concentracions micromolars de ferro dèbilment lligat a compostos de baix pes molecular, va ser demostrada per Gutteridge i col.

(1981). Aquests autors van exposar que concentracions nanomolars d'aquest ferro són capaces d'iniciar el procés de peroxidació. Fins al moment no està clar quin seria l'origen d'aquests complexes. En el líquid sinovial (Etherington i col., 1981) s'ha descrit que aquest ferro seria alliberat de la transferrina degut al baix pH detectat. Aquest no seria el nostre cas, ja que el pH de l'exsudat es manté proper al valor fisiològic durant tot el procés, ara bé, s'ha descrit que en el microambient dels fagòcits activats es donaria una disminució del pH (Halliwell i col., 1985). Però cal tenir en compte que entre els productes alliberats pels neutròfils hi ha lactoferrina (Baggiolini i col., 1970) la qual captaria el ferro alliberat en aquestes condicions. Altres autors (Biemond i col., 1988) suggereixen que la transferrina del líquid sinovial podria haver perdut la capacitat de fixar el ferro al ser danyada per les proteases, pels radicals lliures o per altres mediadors inflamatoris.

El dany tissular, resultant en la mort cel.lular, podria ser la causa de l'alliberament del ferro lligat a complexes de baix pes molecular del *pool* làbil de ferro intracel.lular (Willson, 1977) així com del *pool* de ferro ferritínic. Malgrat que es considera la ferritina com una forma segura d'emmagatzemar el ferro, s'ha observat com el radical superòxid pot mobilitzar el ferro de la ferritina (Biemond i col., 1984) el qual pot també promoure la formació de OH.

L'administració de Fe-dextrà incrementa la presència de ferro dèbilment lligat i ferritínic en l'exsudat. El ferro dèbilment lligat representa el dia 1 el 0,04% del ferro injectat, i experimenta un gran increment el dia 8. Els valors alts durant el procés poden ser deguts a una combinació de diverses causes: un increment en la mort cel.lular fa que s'alliberi el ferro al medi; aquest contingut és elevat perquè les cèl.lules fagociten el Fe-dextrà injectat i, finalment, per la saturació en ferro de les proteïnes que l'emmagatzemen.

Els efectes quelants de la Dfo també s'observen en la reducció del ferro en l'exsudat i ens poden explicar la potencial activitat antiinflamatòria de la Dfo descrita per diversos autors (Blake i col., 1983; Mitjavila i col., 1990; Yoshino i col., 1984). Però també s'ha descrit que la Dfo actuaria com a *scavenger* del

radical superòxid (Blake i col., 1983; Gutteridge i col., 1979; Sinaceur i col., 1984) i del radical hidroxil (Hoe i col., 1982). Els treballs *in vitro* de Davies i col. (1987) demostren que en solucions neutrals la Dfo pot reaccionar amb el superòxid per a formar radicals lliures de nitrogen, explicant d'aquesta manera el mecanisme de *scavenging* sobre el radical superòxid.

En les mostres d'exsudat es va valorar la concentració de ceruloplasmina. La seva presència s'explicaria per l'activitat antioxidant. D'una banda per la seva capacitat ferroxidasa (Frieden i Hsieh 1976), a l'oxidar el  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  evitaria així que catalitzés la reacció de Fenton. D'altra banda s'ha descrit que la ceruloplasmina tindria una lleugera activitat SOD, actuant com a *scavenger* extracel·lular (Goldstein i col., 1979). La concentració de ceruloplasmina en el fluid sinovial de pacients amb artritis reumatoide és alta (Biamond i col., 1984) i s'ha observat que la seva extracció produeix un 70% de pèrdua de protecció contra les reaccions amb radicals oxigenats. La concentració de ceruloplasmina en l'exsudat dels animals tractats amb Dfo està disminuïda, probablement perquè aquest grup necessita menys protecció.

Un altre paràmetre valorat en l'exsudat ha estat la concentració de la  $PGE_2$ . La implicació de les prostaglandines com a mediadors de certes fases de la inflamació fou descrita després d'observar la presència de  $PGE_2$  en exsudats inflamatoris (Willis, 1970) i al descobrir que els antiinflamatoris no esteroïdals inhibien la formació de prostaglandines a partir del àcid araquidònic, a l'inhibir la via de la cicloxigenasa (Lewis, 1983). Aquesta inhibició reduïa la vasodilatació, edema i dolor de la inflamació. En el nostre model inflamatori, ja varem observar (Mitjavila i col., 1990) que el tractament amb indometacina disminuïa els nivells de  $PGE_2$  en l'exsudat.

En les nostres dades s'observa una concentració màxima de  $PGE_2$  a l'inici de la inflamació, que va decreixent, Sedgwick i Lees (1986) varen descriure que la concentració dels eicosanoides en l'exsudat era màxima a les 6 hores de la injecció de carragenina. La mateixa tendència s'observa en el tractament amb Fe-dextrà i amb Dfo. La presència d'aquesta prostaglandina en l'exsudat es deu

a la síntesi d'aquest i altres eicosanoides pels PMN i macròfags durant la inflamació (Mathieu i col., 1990).

La relació de la PGE<sub>2</sub> amb altres mediadors inflamatoris, particularment amb els radicals lliures, ha estat molt estudiada. Mentre que s'ha descrit (Egan i col., 1976) que els ROS es formen durant el metabolisme de l'àcid araquidònic per la via de la cicloxigenasa, també s'ha demostrat que l'activitat d'aquest enzim és amplificada pels lipoperòxids formats pel *stress* oxidatiu produït pels radicals als lípids (Hemler i Lands, 1980).

Malgrat la seva implicació en la propagació del dany tissular, també s'ha descrit que la PGE<sub>2</sub> podria actuar com a agent antiinflamatori, ja que inhibeix la formació de granulomes en el model del *cotton pellet* en rates (Bonta i Parnham, 1978). Aquestes dades han portat a Lewis (1983) a suggerir un paper regulador de la resposta cel·lular immune per a la PGE<sub>2</sub>.

Altres mediadors del procés inflamatori estant actualment essent estudiats per diversos autors. Entre aquests, Konijn i Hershko (1989) proposen un paper central per a les limfocines, especialment la IL-1, alliberada pels monòcits activats, en la modulació del procés inflamatori.

A la vista dels resultats se'ns planteja la qüestió de quin seria el significat fisiològic d'aquesta hipoferrèmia. Weinberg (1986) ha suggerit que la hipoferrèmia pot representar un mecanisme defensiu contra les cèl·lules malignes o els organismes invasors, al privar-los del ferro necessari per a la seva replicació. Ara bé, si el ferro és necessari per a la replicació de les cèl·lules malignes, també ho és per a les cèl·lules en estat normal, especialment per a la proliferació dels limfòcits (Brock, 1989). Per aquest motiu s'ha descrit una implicació considerable entre el ferro i la funció cel·lular immune. Així, mentre que alguns autors (Weinberg, 1984; 1990) han introduït el terme *immunitat nutricional*, altres consideren que la deficiència en ferro contribueix a la susceptibilitat a les infeccions (Brock, 1989).

Però també cal tenir en compte que la implicació del ferro en la formació

de ROS que promouen el dany oxidatiu, fa que l'emmagatzematge del ferro en proteïnes on aquest sigui poc mobilitzable es pugui considerar biològicament avantatjós (Halliwell i Gutteridge, 1989). Els ROS tenen un paper important en molts processos fisiològics, però si els mecanismes de control són defectius o bé es dóna un increment en la seva producció, com s'ha descrit en els processos inflamatoris, s'iniciarà l'atac a les biomolècules. Un lloc preferent per a l'oxidació per part dels ROS són els lípids de les membranes cel·lulars, fenòmen conegut com a lipoperoxidació.

### **3.- Efectes d'una dieta deficient en AGPI sobre la lipoperoxidació.**

La manipulació del contingut en lípids de la dieta ha esdevingut un tema clau per a nutricionistes i fisiòlegs interessats en buscar un substracte lipídic que modifiqui l'estat de la inflamació així com d'altres moltes patologies.

És poc habitual que un tipus d'aliment pugui tenir un impacte en el desenvolupament de certes malalties, però això és el que s'ha observat en el cas dels lípids, a partir dels estudis epidemiològics en poblacions d'esquimals, on s'ha observat una relació entre l'elevat consum d'oli de peix i la baixa incidència de malalties coronàries (Bang i col., 1976). Els efectes atribuïts a l'oli de peix es deuen probablement al seu alt contingut en AGPI del tipus n-3, els quals han estat descrits com a hipocolesterolèmics.

Els àcids grassos (AG) són components fonamentals dels lípids complexes i llur estructura està formada per una cadena hidrocarbonada que pot ser saturada o amb un doble enllaç (monosaturada) o més d'un doble enllaç (poliinsaturada). La longitud de la cadena i la posició i el nombre de dobles enllaços els confereix llur especificitat. Segons la posició del doble enllaç relativa al carboni terminal distal es classifiquen en AG n-9 (com el monoinsaturat olèic), n-6 (com el linolèic) o n-3 (com l' $\alpha$ -linolèic). Els AGPI n-6 són predominants en la dieta de tipus occidental, mentre que l'oli de peix és ric en AGPI n-3.

La relació molar dels diferents tipus de lípids en una membrana es troba

determinada genèticament i no pot ser alterada per la dieta. Tanmateix els AG components dels lípids individuals no són fixes i varien amb l'estat de nutrició i la temperatura ambient. Així s'ha observat com les baixes temperatures induïxen a la conversió d'AG saturats en insaturats, constituint així un mecanisme d'adaptació que permet mantenir el punt de fusió del conjunt de lípids cel.lulars per sota de la temperatura ambient, ja que els AG insaturats tenen punts de fusió més baixos que els saturats.

Els primers treballs sobre com la composició dels AG de la dieta influenciava la composició en AG de les membranes cel.lulars es varen fer estudiant la composició de les membranes dels eritròcits (Walker i Kummerov, 1963). Diversos estudis mostren com el tipus d'AG de la dieta influencia la composició en AG de les membranes de les cèl.lules i dels orgànols (Tahin i col., 1981) i com aquests canvis són reversibles.

En diversos models inflamatoris s'ha utilitzat la manipulació del contingut en AGPI de la dieta com a possible mecanisme antiinflamatori.

Una estratègia ha estat administrar un suplement en AGPI del tipus n-3, tant en models inflamatoris experimentals (Leslie i col., 1985; McColl i col., 1987) com en estudis clínics (Kremer i col., 1985; 1987). L'efecte protectiu d'aquest tipus de dieta es deuria a que els AG s'incorporen en els lípids segons l'ordre de preferència n-3 > n-6 > n-9. Els AGPI del tipus n-6 donen lloc a l'àcid araquidònic, el qual és precursor de les prostaglandines de la sèrie 2 i dels leucotriens de la sèrie 4, ambdòs moduladors de la inflamació. En canvi, els AGPI del tipus n-3 donen lloc a l'àcid eicosapentanoic, precursor de les prostaglandines de la sèrie 3 i dels leucotriens de la sèrie 5, coneguts per la seva menor activitat (Kinsella i col., 1989; Wan i col., 1989).

La segona estratègia consisteix en administrar una dieta deficient en AGPI essencials (Bonta i col., 1976; 1978; Yoshino i Ellis, 1987). Els AGPI essencials són l'àcid linolèic (18:2 n-6) i el linolènic (18:3 n-3). Quan les rates són alimentades amb una dieta deficient en AGPI essencials els precursors de les prostaglandines presents en els fosfolípids de les membranes cel.lulars són

substituïts per l'àcid 5,8,11-eicosatrienoic, àcid que no és un substrate apte per la ciclooxigenasa, amb la qual cosa aquests animals no poden produir prostaglandines en el lloc de la inflamació. Els resultats de Bonta i col. (1976) varen portar a considerar els animals alimentats amb una dieta deficient en AGPI essencials com un bon model per a estudiar les funcions de les prostaglandines endògenes en certs models inflamatoris. Els treballs de Denko (1976) mostren com rates Sprague Dawley alimentades amb una dieta deficient en AGPI essencials desenvolupaven una artritis per adjuvant més lleu que els animals alimentats amb una dieta standard. En l'edema induït per carragenina (Bonta i col., 1976) s'observa com la dieta deficient en AGPI essencials comporta una disminució dels paràmetres inflamatoris. L'administració d'antiinflamatoris no esteroidals, com la indometacina, no disminueix els valors ja baixos de prostaglandines trobats en els animals inflamats alimentats amb una dieta deficient en AGPI essencials. Això confirma que la deficiència en AGPI essencials modula la inflamació a l'inhibir la formació dels precursors d'aquests eicosanoides.

La dieta que hem utilitzat substitueix els AG d'una dieta standard, que conté els requeriments en AGPI essencials, per un AG saturat, el palmític (16:0). A partir del palmític es poden formar AG de cadena més llarga, mitjançant reaccions d'elongació, catalitzades per enzims situats a la cara citosòlica de la membrana del reticle endoplasmàtic. Aquestes elongacions es porten a terme afegint fragments de dos carbonis a l'extrem carboxílic de l'àcid palmític, o de l'AG corresponent, tant saturat com insaturat. L'àcid palmític és també el precursor de l'àcid palmitolèic (16:1). Aquesta reacció es porta a terme per acció de la monoxigenasa situada al reticle endoplasmàtic del fetge i del teixit adipós. Els mamífers no tenen enzims capaços d'introduir dobles enllaços a partir del novè àtom de carboni de la cadena, de manera que a partir de la dieta administrada no podran sintetitzar els AGPI essencials i tots els seus derivats.

L'aventatge d'utilitzar una dieta deficient en AGPI, o dieta saturada, és que provoquem una deficiència en AGPI essencials conjuntament amb una

membranes cel·lulars.

No obstant no s'observen canvis en un altre indicador de la peroxidació com és la concentració de MDA en plasma. Aquest és un producte final de la lipoperoxidació de les membranes. Esperariem que una disminució de la presència de dobles enllaços en els lípids de les membranes cel·lulars es reflexés en una menor producció de lipoperòxids i, per tant, de MDA. Concordants amb els nostres resultats són els treballs de Lynch i Strain (1989). Aquests autors varen mesurar la presència de MDA hepàtic a animals sotmesos a dietes saturades o poliinsaturades. En els animals alimentats amb una dieta rica en AG saturats, incrementava el ferro hepàtic i l'activitat de l'enzim xantina oxidasa, amb la qual cosa s'esperaria que aquests dos factors induïsin un increment de la lipoperoxidació. Però no varen observar diferències en la producció de MDA. Possiblement doncs, estem davant de dos factors amb efectes contraposats: mentre que els AG saturats són menys susceptibles que els AGPI al dany oxidatiu, l'administració d'una dieta saturada indueix a un increment en l'activitat de la xantina oxidasa, una de les principals fonts intracel·lulars de producció de radical superòxid (McCord, 1985).

#### **4.- Efectes d'una dieta deficient en AGPI sobre els nivells de ferro en l'organisme.**

Tot i que diversos autors han estudiat els canvis locals produïts durant la inflamació per la deficiència en AGPI essencials, no s'ha determinat si aquesta deficiència podria afectar altres paràmetres sistèmics de la inflamació. En els nostres treballs hem estudiat l'anòmala redistribució del ferro que es produeix durant la inflamació.

La dieta deficient en AGPI produeix un increment de les reserves de ferro, emmagatzemat sobretot com a ferro ferrític que representa el 14% als animals alimentats amb la dieta control i el 32% als animals deficients en AGPI. Quan s'indueix un procés inflamatori, el qual dóna lloc a un increment en les



reserves de ferro, als animals alimentats amb la dieta deficient aquest increment és més accentuat i es manifesta en un increment en la fracció emmagatzemada com a hemosiderina. En la dieta deficient aquest ferro pot ser mobilitzat, de manera que incrementa el ferro plasmàtic i la concentració d'hemoglobina, suggerint que aquesta dieta podria estar actuant com un sistema tamponador dels efectes de l'anèmia de la inflamació, encara que caldrien més estudis per tal de clarificar aquesta situació.

La interrelació entre els lípids de la dieta i el metabolisme del ferro ha estat observada en diversos casos. Van Dokkum i col. (1983) varen descriure que un increment en el consum d'àcid linolèic en humans (18:2 n-6) causava una reducció en el balanç de ferro. En la situació contrària, les dietes riques en AG saturats (Lynch i Strain, 1989) donen lloc a un increment en el ferro hepàtic.

Els factors que afecten la disponibilitat del ferro de la dieta per a l'absorció han estat molt estudiats (Turnbull, 1974). A part de l'estat fisiològic de l'organisme que consumeix el ferro, altres components de la dieta influencien la seva absorció. L'efecte dels factors micronutrients, com altres minerals, àcid ascòrbic i els fitats en l'absorció intestinal de ferro s'han estudiat en detall (Hallberg, 1981), però les influències dels macronutrients com proteïnes, lípids i carbohidrats ha estat menys definida. Els treballs de Bowering i col. (1977) mostren que a l'incrementar el nivell de greixos de la dieta i canviar-lo per una dieta més saturada, incrementa l'absorció intestinal de ferro en rates. Així mateix s'ha observat que el desenvolupament de la deficiència en ferro en rates és promoguda per l'administració d'una dieta rica en lípids insaturats (Rao i col., 1983) i retardada per una dieta amb lípids saturats (Rao i col., 1980).

La interacció entre el consum de lípids i l'absorció intestinal de ferro hemínic o no hemínic en rates va ser estudiada per Johnson i col. (1987). Aquests autors varen observar que les dietes amb un alt contingut en lípids augmentaven l'absorció intestinal del ferro en les seves dues formes, hemínic i no hemínic, en rates. Quan els nivells de ferro en la dieta eren baixos (10 ppm) els animals amb una dieta rica en lípids amb AG saturats incrementaven

l'absorció intestinal de ferro, mentre que una dieta rica en AGPI donava uns índex d'absorció intestinal de ferro menors i un menor status de ferro en l'animal. El mecanisme pel qual els lípids de la dieta poden afectar l'absorció de ferro no està gens clar. S'ha suggerit que els lípids es saponificarien formant compostos de ferro insolubles a l'intestí, fent que el ferro no pogués ser absorbit fàcilment. Tanmateix Johnson i col. (1987) varen observar que els lípids saturats es saponifiquen més fàcilment que els insaturats, de manera que de ser així hauriem de trobar resultats contraris als observats per nosaltres i altres autors (Lynch i Strain, 1989; Johnson i col., 1987).

Concomitant a l'increment de ferro hepàtic Lynch i Strain (1989) descriuen també un increment en el coure hepàtic en rates alimentades amb lípids saturats. Això ens explicaria l'increment de la ceruloplasmina en la dieta deficient en AGPI. Durant la inflamació es produeix un increment de la ceruloplasmina degut a que es una proteïna de fase aguda (Rice, 1961). Segons Samokyszyn i col. (1991) la ceruloplasmina inhibeix la lipoperoxidació al reincorporar el ferro a la ferritina per la seva activitat ferroxidasa. Mentre que en els grups inflamats la concentració de ceruloplasmina està incrementada, aquest augment és molt més marcat en els animals alimentats amb la dieta deficient, produïnt-se doncs, un efecte sinèrgic entre l'increment en la síntesi de ceruloplasmina com a proteïna de fase aguda durant la inflamació i com a resposta a l'augment de coure hepàtic.

Els màxims nivells de lipoperoxidació els trobem en els animals tractats amb Fe-dextrà. La dieta deficient en aquests animals baixa els signes inflamatoris en alguns paràmetres, de manera que disminueix la producció d'età, i la presència de PGE<sub>2</sub> i de MDA en plasma, mentre que augmenten les reserves de ferro i aquest és poc mobilitzable per a la síntesi d'hemoglobina.

El paper de la deficiència en ferro es va estudiar amb l'administració de Dfo. S'observa en la disminució dels nivells de MDA i PGE<sub>2</sub> en plasma, i en l'età expirat. Quan els animals han estat sotmesos a una dieta deficient en AGPI els

valors de lipoperoxidació estan encara més disminuïts, suggerint que actuen sobre mediadors diferents. El paper antiinflamatori de la Dfo es relaciona amb la seva capacitat de quelar el ferro, mentre que la dieta deficient en AGPI actuaria mitjançant la incorporació d'AG saturats a les membranes cel·lulars i inhibint la formació d'eicosanoides. L'efecte quelant de la Dfo també s'observa a nivell de les reserves, mobilitzant sobretot el ferro emmagatzemat en la fracció ferritínica.

L'administració d'una dieta deficient en AGPI ha produït en el nostre model inflamatori una disminució d'alguns dels paràmetres relacionats amb la inflamació. Quan els animals són alimentats amb una dieta amb lípids rics en AGPI l'activitat de la SOD incrementa, comparada amb els animals alimentats amb una dieta rica en AG monoinsaturats (Davies i col., 1990), suggerint que les primeres estan més exposades al dany oxidatiu. Aquestes observacions i les de que una dieta deficient en AGPI essencials disminueix el precursor dels eicosanoides que actuen de mediadors inflamatoris, ens farien esperar un paper protector de les dietes deficientes en AGPI en les malalties inflamatòries. Tanmateix, la dieta deficient en AGPI indueix un increment en les reserves de ferro en la seva forma més fàcilment mobilitzable, ferro ferritínic, de manera que un balanç de ferro incrementat accelerarà els processos oxidatius.

L'efecte positiu en els nivells de ferro en l'organisme produïts per una dieta saturada permeten especular en els efectes que els consells dietètics actuals poden tenir sobre la població occidental. Les recomenacions actuals són que s'ha de reduir el percentatge d'energia obtinguda a partir dels greixos i reduir el consum dels lípids saturats (U.S. Department of Agriculture and Health, Education and Welfare, 1980). Si els efectes observats en aquests estudis són extrapolables als humans, aquestes recomenacions podrien afectar de manera indirecte els nivells de ferro en aquestes poblacions.

## **CONCLUSIONS**

- 1.- L'administració de salí al dors de les rates no produeix exsudació ni formació de granuloma, posant de manifest que s'ha treballat en les màximes condicions d'esterilitat i considerant aquest com a grup control.
- 2.- A 1 dia de la inducció de la inflamació s'observa ja hipoferrèmia, al disminuir el ferro plasmàtic i la saturació de la transferrina. Aquests símptomes es manifesten també el dia 8 de la inducció.
- 3.- La inflamació produeix a una lleugera anèmia que es manifesta als 6 dies de la inducció amb valors baixos d'hemoglobina i hematòcrit. Això coincideix amb el màxim desenvolupament de la inflamació avaluada pel pes del teixit així com del volum d'exsudat.
- 4.- Durant el desenvolupament del procés inflamatori s'observa un increment del ferro de reserva. Al fetge aquest ferro s'incorpora inicialment en el *pool* làbil i seria captat per la ferritina, fins a representar un màxim el dia 6 de la inflamació. A la melsa el ferro s'emmagatzema preferentment com a ferro hemosiderínic.
- 5.- S'observa un increment de la ceruloplasmina plasmàtica alhora que es desenvolupa el procés inflamatori, amb una màxima concentració els dies 4 i 6, i que pot estar relacionat amb la capacitat ferroxidasa d'aquesta proteïna.
- 6.- El nombre absolut de leucòcits en l'exsudat es manté durant tot el procés, així com el seu percentatge de viabilitat. A l'inici de la inflamació predominen els leucòcits PMN (81%) i als 6 dies el seu percentatge disminueix (50%) per a incrementar-se el percentatge de monòcits (39%).
- 7.- L'activitat fagocítica dels leucòcits estimulats amb zymosan opsonitzat, mesurada per quimioluminiscència ampliada pel luminol, disminueix amb el desenvolupament del procés inflamatori.

**8.-** A nivell de l'exsudat inflamatori hem observat la presència de ceruloplasmina, les concentracions de la qual són màximes a 1 dia de la inducció i mínimes el dia 6, així com la concentració de PGE<sub>2</sub>, que també disminueix amb el temps.

**9.-** En l'exsudat inflamatori s'han detectat concentracions nM de ferro dèbilment lligat a complexos de baix pes molecular, aquest ferro podria ser responsable de la catalització de la reacció de Fenton. Aquestes concentracions són màximes el dia 1 de la inflamació i indetectables els dies 6 i 8. També s'ha valorat el ferro ferritínic, amb una concentració màxima el dia 2 de la inducció. Aquest pot provenir de la lisi dels leucòcits de l'exsudat.

**10.-** L'administració de Fe-dextrà a la cavitat del granuloma produeix un increment del ferro hemosiderínic en fetge. Aquest ferro no és mobilitzable ja que es mantenen la hipoferrèmia i els símptomes de l'anèmia poc greu. No obstant, a partir del dia 8 s'observa una tendència a disminuir el ferro de reserva i a incrementar el ferro circulant.

**11.-** El tractament amb Fe-dextrà no varia la resposta tissular però disminueix la resposta exsudativa i el nombre absolut de leucòcits, probablement degut a un increment del stress oxidant. El ferro afecta per igual a tots els tipus cel·lulars, però l'activitat fagocítica d'aquestes cèl·lules està molt disminuïda.

**12.-** Els nivells de ferro en l'exsudat estan molt incrementats, tant pel que fa al ferro dèbilment lligat, com al ferro ferritínic. Aquests nivells són màxims el dia 1, disminueixen amb el temps, però s'observa una resposta incrementada el dia 8. Aquest ferro seria responsable de l'increment del stress oxidant, accelerant la mort de les cèl·lules i afectant llur capacitat fagocítica.

**13.-** La fracció de ferro quelada per la Dfo constitueix el *pool* làbil i el ferro ferritínic del fetge, ja que el ferro emmagatzemat com a hemosiderina no pot ser captat per la Dfo. La mobilització del ferro que produeix la Dfo fa que aquest

pugui ser captat per l'apotransferrina circulant, de manera que a l'inici del tractament s'observa un restabliment dels paràmetres hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro.

**14.-** La Dfo dóna lloc a una disminució en la resposta tissular juntament amb un increment de l'exsudació i del nombre de leucòcits que és deu vegades superior al nombre de leucòcits del grup inflammat els dies 4 i 6, incrementant sobretot l'acumul de leucòcits PMN. L'activitat fagocítica d'aquestes cèl.lules és menor que la del grup inflammat.

**15.-** L'activitat quelant de la Dfo s'observa també a nivell de l'exsudat, ja que la concentració de ferro dèbilment lligat i de ferro ferritínic està disminuïda. També està disminuïda la concentració de ceruloplasmina, probablement degut a que menys protecció antioxidant és necessària.

**16.-** El significat fisiològic de la retenció de ferro als òrgans de reserva que es produeix durant la inflamació pot estar relacionat amb limitar la disponibilitat de ferro per a la replicació bacteriana i/o amb disminuir el ferro que intervé en la catalització de la reacció de Fenton, els productes de la qual són responsables de la peroxidació de les molècules biològiques.

**17.-** La manipulació del contingut de lípids de la dieta modifica l'estat de la inflamació al modificar el substracte de lipoperoxidació.

**18.-** Una dieta deficient en AGPI mostra una tendència a incrementar els paràmetres hemàtics relacionats amb el metabolisme del ferro i dóna lloc a un augment de ferro hepàtic. Aquesta dieta no modifica el nivell basal d'età expirat ni de MDA plasmàtic, però disminueix la concentració plasmàtica de PGE<sub>2</sub>.

**19.-** En rates alimentades durant 4 mesos amb una dieta deficient en AGPI, la inducció de la inflamació no provoca la disminució dels valors hemàtics

relacionats amb el metabolisme del ferro quan es compara amb els animals alimentats amb una dieta lipídica control, alhora que es mantenen altes les reserves hepàtiques d'aquest element. S'observa també que la concentració de ceruloplasmina plasmàtica està incrementada.

**20.-** La inflamació dóna lloc a una resposta tissular i a la formació de ROS. La lipoperoxidació, resultat de l'atac dels ROS als lípids, s'ha valorat pels nivells de MDA plasmàtic i per l'età expirat. L'administració de Fe-dextrà a la cavitat del granuloma dóna lloc a un increment de la lipoperoxidació, mentre que l'administració de Dfo no modifica el nivell d'età expirat, però sí disminueix la concentració de MDA plasmàtic.

**21.-** En rates inflamades, alimentades amb una dieta deficient en AGPI disminueix la resposta tissular inflamatòria i la lipoperoxidació, com es manifesta en el manteniment dels nivells basals d'età expirat. La disminució de la lipoperoxidació s'observa també en rates tractades amb Fe-dextrà o amb Dfo, que, a més, presenten uns nivells disminuïts de MDA plasmàtic.

**22.-** Els nostres resultats posen de manifest les complexes interrelacions entre el metabolisme del ferro i la propagació del stress oxidatiu i com aquest pot ser modificat pel contingut en AGPI de la dieta.



## **BIBLIOGRAFIA**

ADAMS, D.O. i MARINO, P. (1983). Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as a model for study of macrophage development.- A "Contemporary topics in Hematology - Oncology, III). (Girdon, A.S., Silber, R. i Lobue, J., eds.). Plenum. New York.

AISEN, P. (1981). The transferrins.- A "Iron in Biochemistry and Medicine II" (Jacobs, A. i Worwood, M. ed). Academic Press. New York, p. 87.

AISEN, P. (1984). Conceptos actuales del metabolismo del hierro.- A "Trastornos del metabolismo del hierro" (Jacobs, A. ed.). Saunders. London, p. 1.

AISEN, P. i LITOWSKY, I. (1980). Iron transport and Storage Proteins.- Ann. Rev. Biochem. 49 357.

ALLEN, R.C., STERNHOLM, R.L., STEELE, R.H. (1972). Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 47 679.

ALONSO, G., OCAÑA, J. i CUADRAS, C.M. (1979). Fundamentos de probabilidad en bioestadística.- EUNIBAR. Barcelona.

ALVAREZ-HERNANDEZ, X., FELSTEIN, M.V. i BROCK, J.H. (1986). The relation between iron release, ferritin synthesis and intracellular iron distribution in mouse peritoneal macrophages. Evidence for a reduced level of metabolically available iron in elicited macrophages.- Biochim. Biophys. Acta. 886 214.

AMOURIC, M., MARVALDI, J., PICHON, J., BELLOT, F. i FIGARELLA, C. (1984). Effect of lactoferrin on the growth of a human adenocarcinoma cell line-comparison with transferrin.- In vitro 20 543.

ANBALAGAN, K. i SADIQUE, J. (1984). Role of prostaglandins in acute phase proteins in inflammation.- Biochem. Med. 31 236.

ANDERSON, B.F., BAKER, H.M., DODSON, E.J., NORRIS, G.E., RUMBALL, S.V., WATERS, J.M. i BAKER, E.N. (1987). Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 1768.

ANDREWS, F.J., MORRIS, C.J. i KONDRATOWICZ, G. (1987). Effect of iron chelation on inflammatory joint disease.- *Am. Rheum. Dis.* 46 327.

ANDREWS, S.C., BRADY, M.C., TREFFRY, A., WILLIAMS, J.M., MANN, S., CLETON, M.I., BRUJN, W. i HARRISON, P.M. (1988). Studies on haemosiderin and ferritin from iron-loaded rat liver.- *Biol. Metals.* 1 33

AROSIO, P., ADEHAM, T.G. i DRYSDALE, J.W. (1978). On ferritin heterogeneity-further evidence for heteropolimers.- *J. Biol. Chem.* 253 4451.

ARUOMA, O.I. i HALLIWELL, B. (1987). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation?.- *Biochem. J.* 241 273.

ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., LAUGHTON, M.J., QUINLAN, G.J. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II) - iron (III) complex.- *Biochem. J.* 158 617.

ATKIN, C.L., THELANDER, L., REICHARD, P. i LANG, J. (1973). Iron and free radicals in ribonucleotide reductase.- *J. Biol. Chem.* 248 7464.

AUST, S.D., MOREHOUSE, L.A. i THOMAS, C.E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions.- *Free Radical Biol. Med.* 1 3.

BAGGIOLINI, M., DUVE, C. de, MASSON, P.L. i HEREMANS, J.F. (1970). Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes.- *J. Exp. Med.* 131 559.

BANG, H.O., DYERBERG, J. i HJONE, N. (1976). The composition of food consumed. Greenland Skinos. - *Acta Med. Scand.* 200 69.

BARRET, A.J. (1975). Lysosomal and related proteinases.- A "Proteases and biological control". (Reich, E., Rifkin, D.B. i Shaw, E., eds.). Cold Spring Harbor Labs. New York, p. 467.

BAYNES, R., BESWOOT, W., BOTHWELL, T., KHAN, Q. i MANSOOR, N. (1986). The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron binding capacity, lactoferrin

and C-reactive protein.- *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 46 695.

BEAVEN, M.A. (1976). Histamine.- *N. Engl. J. Med.* 294 30.

BERGSTRONG, S., CARLSON, L.A. i WEEKS, J.R. (1968). The prostaglandins: a family of biologically active lipids.- *Pharmacol. Rev.* 20 1.

BERLIN, R.D., OLIVER, J.M., UKENA, T.E. i YIN, H.H. (1975). The cell surface.- *N. Engl. J. Med.* 292 515.

BESSIN, P., BONNET, J., APFFEL, P., SOULARD, C., DESGROU, L., PELASSI, I. i

BENVENISTE, J. (1983). Acute circulatory shock caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs.- *Eur. J. Pharmacol.* 86 403.

BEVILACQUA, M.P., POBER, J.S., WHEELER, M.E., COTRAN, R.S. i GIMBRONE, M.A. (1985). Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related cell lines.- *J. Clin. Invest.* 76 2003.

BIEMOND, P., SWAAK, A.J.C., VAN EIJK, H.G. i KOSTER, J.F. (1988). Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory disease.- *Free Radical Biol. Med.* 4 185.

BIEMOND, P., VAN EIJK, H.G., SWAAK, A.J.C. i KOSTER, J.F. (1984). Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes.- *J. Clin. Invest.* 73 1576.

BIRD, J. i GIROUD, J.P. (1985). An appraisal of the technique of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence as a means to detect compounds with antiinflammatory activity.- *J. Pharmacol. Methods* 14 305.

BIRGEGARD, G. (1980). The source of serum ferritin during infection. Studies with concanavalin A-sepharose absorption.- *Clin. Sci.* 59 385.

BIRGEGARD, G. (1989). Erythropoiesis and inflammation. A "Erythropoietin: From molecular structure to clinical application".- *Contrib. Nephrol. Basel.* vol. 76 p.330.

- BIRGEGARD, G. i CARO, J. (1984). Increased ferritin synthesis and iron uptake in inflammatory mouse macrophages.- *Scand. J. Haematol.* 33 43.
- BLAKE, D.R. i BACON, P.A. (1982). Effect of oral iron on rheumatoid patients.- *Lancet* i 623.
- BLAKE, D.R., HALL, N.D., BACON, P.A., DIEPPE, P.A., HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1981). The importance of iron in rheumatoid disease.- *Lancet* ii 1142.
- BLAKE, D.R., HALL, N.D., BACON, P.A., DIEPPE, P.A., HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1983). Effect of a specific iron chelating agent on animal models of inflammation.- *Ann. Rheum. Dis.* 42 89.
- BOMFORD, A.B. i MUNRO, H.N. (1980). Byosynthesis of ferritin and isoferritins.- A "Iron in Biochemistry and Medicine II" (Jacobs, A. i Worwood, M., eds.). Academic Press. New York, p. 173.
- BONNEY, R.B., GERY, I., LIN, T.Y., MEYENHOFER, M.F., ACEVEDO, W. i DAVIES, P. (1978). Mononucler phagocytes from carrageenan-induced granulomas.- *J. Exp. Med.* 48 261.
- BONTA, I.L. (1983). Icosanoides, macrophages et inflammation.- A "Actualités Biochimiques en rheumatologie". Ed. Marson. Paris.
- BONTA, I.L., BULT, H., PARHAM, M.J. i VINCENT, J.E. (1978). Inflammatory Models in rats depleted of endogenous precursors of prostaglandins.- *Agents and Actions* 8 98.
- BONTA, I.L., BULT, H., VEN, L.L.M. i NOORDHAEK, J. (1976). Essential fatty acid deficiency: A condition to discriminate prostaglandin and non-prostaglandin mediated components of inflammation. - *Agents and Actions* 6 154.
- BONTA, I.L. i PARNHAM, M.J. (1978). Prostaglandins and chronic inflammation.- *Biochem. Pharmac.* 27 1611.
- BOOGS, D.R. (1975). Physiology of neutrophil proliferation, maturation and circulation.- *Clin. Haematol.* 4 535.

- BOTHWELL, T.H., BAYNES, R.D., MACFARLANE, B.J. i MACPHAIL, A.P. (1989). Nutrition iron requirements and food iron absorption.- *J. Int. Med.* 226 357.
- BOWERING, J., MOSCH, G.A. i LEWIS, A.R. (1977). Enhancement of iron absorption in iron depleted rats by increasing dietary fat.- *J. Nutr.* 107 1678.
- BRAQUET, P., TOUQUILL, SHEN, T.Y. i VERGAFTIG, B.B. (1987). Perspectives in platelet-activating factor research.- *Pharmacol. Rev.* 39 97.
- BRITO, F.B. de (1989). Pleurisy and pouch models of acute inflammation.- A "Pharmacological methods in the control of inflammation". (Chang, J.Y. i Lewis, A.J., eds.). Alan R. Liss. New York, p. 173.
- BROCK, J.H. (1985) The transferrins.- A "Metalloproteins" Part 2. (Harrison, P.M. ed.) Mc Millan. London, p. 183.
- BROCK, J.H. (1989). The biology of iron.- A "Iron in immunity, cancer and inflammation" (Sousa, M. de i Brock, J.H., eds.). Wiley. Chichester, p. 35.
- BROWN, J.P., HEWICK, R.M., HELLSTRÖM, I., HELLSTROM, K.E., DIILITTLE, R.F. i DREYER, W.J. (1982). Human melanoma-associated antigen p 97 is structurally and functionally related to transferrin.- *Nature* 246 171.
- BROWN, K.A. (1988). The polymorphonuclear cell in rheumatoid Arthritis.- *Brit. J. Rheum.* 27 150.
- BUHI, W.C., DUCSAY, C.A., BAZER, F.W. i ROBERTS, R.M. (1982). Iron transfer between the purple phosphatase uteroferrin and transferrin and its possible role in iron metabolism in the fetal pig.- *J. Biol. Chem.* 257 1712.
- BURTON, G.W. i INGOLD, K.U. (1986). Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the explanation of its structure and function.- *Arc. Chem. Res.* 19 194.
- CADENAS, E. i SIES, H. (1984). Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems.- *Meth. Enzymol.* 105 221.

CAMBON-GROS, C., FERNANDEZ, Y., MITJAVILA, M.T., CARBONELL, T., PUIG-PARELLADA, P. i MITJAVILA, S. (1990). Combined effect of a PUFA deficient diet and iron levels on lipid peroxidation induced by  $\text{CCl}_4$ . - Food Add. Cont. 7 108.

CAMPBELL, C.H., SOLGONICK, R.M. i LINDER, M.C. (1989). Translational regulation of ferritin synthesis in rat spleen. Effects of iron and inflammation.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 160 453.

CARBONELL, M.T., SAIZ, M.P., MARTI, M.T., QUERALT, J. i MITJAVILA, M.T. (1989). Iron mobilization on three animals models of inflammation.- Rev. espan. Fisiol. 45 163.

CARSWELL, E.A., OLD, L.J., KASSELL, R.L., GREEN, S., FIORE, N. i WILLIAMSON, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 3666.

CARTWRIGHT, G.E. i LEE, G.R. (1971). The anaemia of chronic disorders.- Br. J. Haematol. 21 147.

CAVILL, I. i BENTLEY, D.P. (1982). Erythropoiesis in the anemia of rheumatoid arthritis.- Br. J. Haematol. 50 583.

CELADA, A., HERRERAS, V., PUGIN, P. i RUDOLF, M. (1979). Reduced leucocyte alkaline phosphatase activity and decreased NBT reduction test in induced iron deficiency.- Br. J. Haematol. 43 457.

CHARLTON, R.W. i BOTHWELL, T.H. (1983). Iron absorption.- Ann. Rev. Med. 34 55.

CHASTEEN, N.D.(1983). The identification of the probable locus of iron and anion binding transferrins.- Trends. Biochem. Sci. 8 272.

CHENOWETH, D.E. i TUGLI, T.E. (1978). Demostration of specific C5a receptor on intact human polimorphonuclear leukocytes.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 3943.

CLARK, E.R., CLARK, E.L. i REX, R.D. (1936). Observations on polymorphonuclear leukocytes in the living animal.- Am. J. Anat. 59 123.

CLARK, I.A. i CHAUDHIRI, G. (1989). Inflammation and parasitic disease. - A "Iron in immunity, cancer and inflammation". (Sousa, M. de i Brock, J.H., eds.). Wiley. Chichester, p. 177.

CLARK, I.A., VIREILIZIER, J.L., CARSWELL, E.A. I WOOD, P.R. (1981). Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria.- *Infect. Immun.* 32 1058.

CLARK, W.R. (1983). The experimental foundations of modern immunology. Wiley. New York, p. 143.

COENEM, J.L.L.M., VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., VAN PELT, J., VAN DEURSEN, C.T.B.M., FICKENS, M.M.F., VAN WERSCH, J.W.J. i BROMBACHER, P.J. (1991). Measurements of serum ferritin used to predict concentrations of iron in bone marrow in anemia of chronic disease.- *Clin. Chem.* 37 560.

COLLAWM, J.F. i FISH; W.W. (1985). Hydrogen-tritium exchange by aprotransferrin and ferritin.- *Arch. Biochem. Biophys.* 240 242.

CONRAD, M.E. i BARTON, J.C. (1981). Factors affecting iron balance.- *Am. J. Haematol.* 10 199.

COOK, J.D., HERSKO, C. i FINCH, C.A. (1974). Storage of iron kinetics. IV Cellular distribution of ferritin iron stores in rat liver.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145 1378.

COOK, S.F. (1929). The structure and composition of hemosiderin.- *J. Biol. Chem.* 82 595.

CUADRAS, C.M. (1984). Problemas de Probabilidades y estadística. Vol. 2: Inferencia estadística. PPU Barcelona.

DALE, H.H. i LAIDLAW, P.P. (1919). Histamine shock.- *J. Physiol.* 52 355.

DANCEY, J.T., DEUBELBEISS, K.A., HARKER, L.A. i FINCH, C.A. (1976). Neutrophil kinetics in man.- *J. Clin. Invest.* 58 705.

DAVIES, C.D., NEY, D.M. i GEGER, J.L. (1990). Manganesen, iron and lipid interactions in rats. - *J. Nutr.* 120 507.



DAVIES, M.J., DONKOR, R., DUNSTER, C.A., GEE, C.A., JONAS, S. i WILLSON, R.L. (1987). Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide.- *Biochem. J.* 246 725.

DENKO, C.W. (1976). Modifications of Adjuvant inflammation in rats deficient in essential fatty acids. - *Agents and Actions* 5-6 636

DICKSON, D.P.E., REID, N.M.K., MANN, S., WADE, V.J., WARD, R.J. i PETERS, T.J. (1988). Mössbauer spectroscopy, electron microscopy and electron diffraction studies of the iron cores in various human and animal haemosiderins. - *Biochim. Biophys. Acta* 975 81

DOUGLAS, S.W. i ADAMSON, J.W. (1975). The anaemia of chronic disorders. Studies of marrow regulation and iron metabolism.- *Blood* 45 55.

DOWLING, E.J., SYMONS, A.M. i PARKE, D.V. (1986). Free radical production at the site of an acute inflammatory reaction as measured by chemiluminescence.- *Agents and actions* 19 203.

DRABKIN, D.L. i AUSTIN, J.H. (1935). Spectrophotometric studies II. Preparation from washed blood cells: nitric oxide hemoglobin and sulphhemoglobin.- *J. Biol. Chem.* 112 51.

DRYSDALE, J. W. (1971). Ferritin phenotypes: structure and metabolism.- A "Iron metabolism". *Ciba simposium* 51 41.

DRYSDALE, J.W. i MUNRO, H.N. (1966). Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver.- *J. Biol. Chem.* 241 3630 .

EGAN, R.W., PAXTON, J. i KUEHL, F.A. (1976). Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase.- *J. Biol. Chem.* 251 7329.

ERSLEV, A.J. (1972). Anemia in chronic disorders.- A "Hematology" (Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. i Rundless, R.W., eds.) Mc Graw Hill. New York, p. 371.

ETHERINGTON, D.J., PUGH, G.I. i SILVER, I.A. (1981). Collagen degradation in an experimental inflammatory lesion: studies in the role of the macrophage.- *Acta. Biol. Med. Germ.* 40 1625.

FANTONE, J.C., KUNKEL, S.L., WARD, P.A. i ZURIER, R.B. (1980). Suppression by prostaglandin E<sub>1</sub> of vascular permeability induced by vasoactive inflammatory mediators.- *J. Immunol.* 125 2591.

FARIAS, R.N., BLOJ, B., MORERO, R.D., SINERIZ, F. i TRUCCO, R.E. (1975). Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition.- *Biochim. Biophys. Acta.* 415 231.

FEHER, J., CSOMOS, G. i VERECKEI, A. (1987). *Free radical reactions in Medicine.* Springer-Verlag, Berlin.

FELDMAN, B.F. i KANEKO, J.J. (1980). The anemia of inflammatory disease in the dog. I. The nature of the problem.- *Vet. Res. Com.* 4 237.

FELDMAN, B.F., KANEKO, J.J. i FARVER, T.B. (1981a).- Anemia of inflammatory disease in the dog: Ferrokinetics of adjuvant-induced anaemia.- *Am. J. Vet. Res.* 42 583.

FELDMAN, B.F., KANEKO, J.J. i FARVER, T.B. (1981b). Anemia of inflammatory disease in the dog: Availability of storage iron in inflammatory disease.- *Am. J. Vet. Res.* 42 586.

FELDMAN, B.F., KANEKO, J.J. i FARVER, T.B. (1981c). - Anemia of inflammatory disease in the dog: Clinical characterization.- *Am. J. Vet. Res.* 42 1109.

FELDMAN, B.F., KEEN, C.L., KANEKO, J.J. i FARVER, T.B. (1981d). Anemia of inflammatory disease in the dog: Measurement of hepatic superoxide dismutase, hepatic nonheme iron, copper, zinc, and ceruloplasmin and serum iron, copper and zinc.- *Am. J. Vet. Res.* 42 1114.

FINCH, C.A., DEUBELBEISS, K., COOK, J.D., ESCHBACH, J.W., GANZONI, A. i GIBLETT, E.R. (1970). Ferrokinetics in man.- *Medicine* 49 17.

FINNEY, D.J. (1980). *Statistics for Biologists.* Chapman and Hall Ltd. London.

FISCHBACH, F.A., GREGORY, D.W., HARRISON, P.M., HOY, T.G. i WILLIAMS, J.M. (1971). On the structure of haemosiderin and its relationship to ferritin.- *J. Ultrastruc. Res.* 37 495.

FONTECAVE, M. i PIERRE, J.L. (1991). Iron metabolism: The low-molecular-mass iron pool.- Biol. Metals 4 133.

FORD-HUTCHINSON, A.W., BRAY, M.A., DOIG, M.V., SHIPLEY, M.E. i SMITH, M.J.H. (1980). Leukotriene B: a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.- Nature 286 264.

FRIDOVICH, I. (1986 a). Superoxide dismutases.- Meth. Enzymol. 58 61.

FRIDOVICH, I. (1986 b). Biological effects of the superoxide radical.- Arch. Biochem. Biophys. 247 1.

FRIEDEN, E. i AISEN, P. (1980). Forms of iron transferrin.- Trends. Biochem. Sci. 49 11.

FRIEDEN, E. i HSIEH, H.S. (1976). Ceruloplasmin: The copper transporting protein with essential oxidase activity.- A "Advances in Enzymologie" 44 (Meister, A. ed.). Wiley. London, p. 187.

FUKUHARA, M. i TSURUFUJI, S. (1969). The effect of locally injected drugs on the carrageenan granuloma on rats.- Biochem. Pharmacol. 18 475.

GIORDANO, N., SANCASCIANI, S., BORGHI, C., FIORAVANTI, A. i MARCOLONGE, R. (1986). Antianemic and potential anti-inflammatory activity of desferrioxamine: possible usefulness in rheumatoid arthritis.- Clin. Exp. Rheum. 4 25.

GOLDSTEIN, I.M., KAPLAN, H.B., EDELSON, H.S. i WEISSMAN, G. (1979). Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals.- J. Biol. Chem. 254 4040.

GOUBIN, G., GOLDMAN, D.S., LUCE, J., NEIMAN, P.E. i COOPER, G.M. (1983). Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken  $\beta$ -cell lymphoma DNA.- Nature 302 114.

GOWER, J.D., HEALING, G., i GREEN, C.J. (1989). Determination of desferrioxamine available iron in biological tissues by high-pressure liquid chromatography.- Anal. Biochem. 180 126.

GRAHAM, G., BATES, G.W., RACHMILEWITZ, E.A. i HERSHKO, C. (1979). Nonspecific serum iron in thalassemia: quantitation and chemical reactivity.- *Am. J. Hematol.* 6 207.

GUTTERIDGE, J.M.C. (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobins by peroxides.- *FEBS Lett.* 201 291.

GUTTERIDGE, J.M.C. (1987). Bleomycin-detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin.- *Biochem. J.* 245 415.

GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B., TREFFRY, A., HARRISON, P.M. i BLAKE, D. (1983). Effect of ferritin-containing fractions with different iron loading on lipid peroxidation.- *Biochem. J.* 224 761.

GUTTERIDGE, J.M.C., RICHMOND, R. i HALLIWELL, B. (1979). Inhibition of the iron catalysed formation of lipid peroxidation by desferrioxamine.- *Biochem. J.* 184 469.

GUTTERIDGE, J.M.C., ROWLEY, D.A. i HALLIWELL, B. (1981). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts.- *Biochem. J.* 199 263.

HABER, F. i WEISS, J.J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts.- *Proc. Soc. London Sci. A.* 147 332.

HAHN, D. i GANZONI, A.M. (1975). Functional heterogeneity of the transport iron compartment II. In vivo differences between transferrin iron-binding sites and in vitro interbinding site iron exchange.- *Acta. Haematol.* 53 321.

HALLBERG, L. (1981). Bioavailability of dietary iron in man.- *Ann. Rev. Nutr.* 1 123

HALLIWELL, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant.- *Free. Radical Res. Commun.* 9 1.

HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases.- *Molec. Aspects Med.* 8 89.

HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1986 a). Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection.- *Trends. Biochem. Sci.* 11 372.

HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1986 b). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts.- *Arch. Biochem. Biophys.* 246 501.

HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1988). Iron as a biological pro-oxidant.- *Isi Atlas of Science: Biochemistry.* p. 48.

HALLIWELL, B. i GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine.* Clarendon Press. Oxford. (2<sup>a</sup> edició).

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. i BLAKE, D. (1985). Metal ions and oxygen radical reactions in human inflammatory joint disease.- *Phil. Trans. R. Soc. London* 311 679.

HAMBERG, M., SVENSSON, J. i SAMUELSON, B. (1975). A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.- *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 2994.

HAMBLETON, P. i MILLER, P. (1989). Pharmacological investigation of acute cellular accumulation in immunological air pouch inflammation.- *Agents and Actions* 28 73.

HAMOR, G.H. (1981). Nonsteroidal anti-inflammatory agents.- A "Principals of medicinal chemistry" 2<sup>a</sup> edició (Fogel, W.O. ed.). Lea and Febiger. Philadelphia, p. 561.

HARRIS, D.C., GRAY, G. i AISEN, P. (1974). <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of the spatial relation of the metal and anion-binding sites of human transferrin.- *J. Biol. Chem.* 249 5261.

HARRISON, P.M., CLEGG, G.A. i MAY, K. (1980). Ferritin structure and function.- A "Iron in biochemistry and medicine II" (Jacobs, A. i Worwood, M., eds). Academic Press. New York, p. 131.

HARRISON, P.M., HOURE, R.J., HOY, T.G. i MACARA, I.G. (1974). Ferritin and hemosiderin: structure and function.- A "Iron in biochemistry and medicine" (Jacobs, A. i Worwood, M., eds). Academic Press. New York, p. 73.

HAURANI, F.I., BURKE, W. i MARTINEZ, E.J. (1965). Defective reutilization of iron in the anemia of inflammation.- *J. Lab. and Clin. Med.* 65 560.

HÄUSERMAN, H. (1899). Über den Eisengehalt des Blutplasmas und der Leukocyten. *Hoppe Seylers.- Z. Physiol. Chem.* 26 436.

HECBERG, S. i ROUAUD, C. (1981). Metabolisme du fer.- *Cah. Nutr. Diét.* XVI 3 189.

HEMLER, M.E. i LANDS, W.E.M. (1980) Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis.- *J. Biol. Chem.* 255 6253.

HERSHKO, C., COOK, J.D. i FINCH, C.A. (1974). Storage iron kinetics VI The effect of inflammation on iron exchange in the rat.- *Br. J. Haematol.* 28 67.

HERSHKO, C. i KONIJN, A.M. (1977). Pathogenesis of impaired iron release in inflammation.- A "Proteins of iron metabolism". (Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. i Crichton, R.R., eds.) Grune and Stratton. New York, p. 417.

HOE, S., ROWLEY, D.A. i HALLIWELL, B. (1982). Reactions of ferrioxamine and desferrioxamine with the hydroxyl radical.- *Chem. Biol. Interact.* 41 75.

HOFFBRAND, A.V., GANESHAGURU, K., HOOTON, J.W.L. i TATTERSALL, M.H.N. (1979). Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells.- *Br. J. Haematol.* 33 517.

HOLGATE, S.T. (1983). Mast cells and their mediators.- A "Immunology in Medicine". (Holborow, E.J. i Reeves, W.G., eds.) Academic Press. London, p. 79.

HORNSTRA, G. (1982). Thromboxanes and ischaemic vascular disease.- *Neth. J. Med.* 25 6.

HUEBERS, H.A., BAUER, W., HUEBERS, E., CSIBA, E. i FINCH, C. (1981). The behavior of transferrin iron in the rat.- *Blood* 57 218.

HUEBERS, H.A. i FINCH, C.A. (1985). Molecular aspects of iron absorption and its control.- A "Proteins of iron Metabolism" (Spik, G.; Montreuil, J.; Crichton R.R. i Mozurier, J., eds.).

Elsevier. Amsterdam, p. 263.

HUNT, J., RICHARDS, R.J., HARWOOD, R. i JACOBS, A. (1979). The effect of desferrioxamine on fibroblasts and collagen formation in cell cultures.- *Br. J. Haematol.* 41 69.

HURLEY, J.V. (1978). The sequence of early events.- A "Inflammation" (Vane, J.R. i Ferreira, S.H. Ed.). Springer-Verlag. Berlin, p.26.

International Committee for Standardization in Haematology. (1971). Proposed recommendations for measurement of serum iron in human blood.- *Br. J. Haematol.* 20 451.

JACOBS, A. (1977). Iron overload-clinical and pathological aspects.- *Semin. Hematol.* 14 84.

JACOBS, A. (1980). The pathology of iron overload.- A "Iron in Biochemistry and Medicine, II". (Jacobs, A. i Worwood, M., eds.). Academic Press. London, p.428.

JACOBS, A., MILLER, F., WORWOOD, M., BEAMISH, M.R. i WARDROP, C.A. (1972). Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload.- *Br. Med. J.* 4 206.

JONHSON, P.E., LUKASKI, H.C. i BOWMAN, T.D. (1987). Effects of level and saturation of fat and iron level and type in the diet on iron absorption and utilization by the rat.- *J. Nutr.* 117 501.

KAPLAN, A.P. (1981). Coagulation, kinins and inflammation. Cellular functions in immunity and inflammation. (Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L. i Polter, M., eds.). Elsevier North. Holland, p. 397.

KEBERLE, H. (1964). The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism.- *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 119 758.

KINSELLA, J.E., COKESH, B., CROSET, M., BLACK, M. i SURELTE, M. (1989). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids: Effects on membrane enzyme activities and macrophage eicosanoid synthesis.- A "Health effects of fish and fish oils". (Chandra, R.E. ed.). ARTS Biomedical publishers and distributions. St. John's New-foundland, p. 81.

- KLEBANOFF, S.J., VADOS, M.A., HARLAN, J.M., SPARKS, L.H., GAMBLE, J.R., AGOSTI, J.M. i WALTERSDORPH, A.M. (1986). Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.- J. Immunol. 136 4420.
- KONIJN, A.M., CARMEL, N., LEVY, R. i HERSHKO, C. (1981). Ferritin synthesis in inflammation. II Mechanism of increased ferritin synthesis.- Br. J. Haematol. 49 361.
- KONIJN, A.M. i HERSHKO, C. (1977). Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release.- Br. J. Haematol. 37 7.
- KONIJN, A.M. i HERSHKO, C. (1989). The anaemia of inflammation and chronic disease.- A "Iron in immunity, cancer and inflammation". (Sousa, M. de i Brock, J.H., eds.). Wiley. Chichester, p. 111.
- KREMER, J.M., BIGAOUETTE, J., MICHALEK, A.V., TIMCHALK, M.A., LININGER, LI., RYNES, R.I., HUYCK, C., ZIEMINSKI, J. i BARTOLOMEW, L.E. (1985). Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis.- Lancet i 184.
- KREMER, J.M., JUBIZ, W., MICHALEK, A., RYNES, R.I., BARTHOLOMEW, L.E., BIGAOUETTE, J., TIMCHALK, M., BEELER, D. i LININGER, LI. (1987). Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blind, controlled, crossover study.- Ann. Int. Med. 106 497
- LAURELL, C.B., i INGLEMAN, D. (1947). Fe-binding protein of Swine Serum.- Acta Chem. Scand. 1 770.
- LAWRENCE, G.D. i COHEN, G. (1982). Ethane exhalation as an index of in vivo lipid peroxidation, concentrating ethane from a breath collection chamber.- Anal. Biochem. 122 283.
- LAWRENCE, G.D. i COHEN, G. (1984). Concentrating ethane from breath to monitor lipid peroxidation *in vivo*.- Meth. Enzymol. 105 305.
- LAY, W.H. i NUSSENZWEIG, V. (1968). Receptors for complement on leukocytes.- J. Exp. Med. 128 991.



- LEE, G.P. (1983). The anaemia of chronic disease.- *Semin. Hematol.* 20 61.
- LEIBOLD, E.A. i MUNRO, H.N. (1988). Cytoplasmic proteins binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of the ferritin heavy and light subunit mRNAs.- *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 2171.
- LEFER, A.M., MULLER, H.F. i SMITH, J.B. (1984). Pathophysiological mechanisms of sudden death induced by platelet-activating factor.- *Br. J. Pharmacol.* 83 125.
- LESLIE, C.A., GONNERMAN, W.A., ULLMAN, M.D., HAYS, K.C., FRANZBLAU, C. i CATHCART, E.S. (1985). Dietary fish oil modulates macrophage fatty acids and decreases arthritis susceptibility in mice.- *J. Exp. Med.* 162 1336
- LEWIS, G.P. (1983). Immunoregulatory activity of metabolites of arachidonic acid and their role in inflammation.- *Brit. Med. Bul.* 39 243.
- LOEBS, L.A., JAMES, E.A., WALTERSDOPH, A.M. i KLEBANOFF, S.J. (1988). Mutagenesis by the autoxidation of iron with isolated DNA.- *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 P. 3918.
- LÖNNERDAL, B. (1985). Biochemistry and physiological function of human milk proteins.- *Am. J. Clin. Nutr.* 42 1299.
- LUDEWIG, S. (1957). Hemosiderin; isolation from horse spleen and characterisation.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95 514.
- LUDEWIG, S. i FRANZ, S.W. (1970). Hemosiderin V: The occurrence of heme and lipids in hemosiderin.- *Arch. Biochem.* 138 397.
- LUKENS, J.N., CARTWRIGHT, G.E. i WINTROBE, M.M. (1967). Anemia of adjuvant-induced inflammation in rats.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126 346.
- LYNCH, S.M. i STRAIN, J.J. (1989). Dietary saturated or polyunsaturated fat and copper deficiency in the rat. - *Biol. Trac. El. Res.* 22 131.
- LYNCH, S.R., LIPSCHITZ, D.A., BOTHWELL, T.H. i CHARLTON, R.W. (1974). Iron and

the reticuloendothelial system. - A "Iron in Biochemistry and Medicine I" (Jacobs, A. i Worwood, W., eds.). Academic Press. London, p. 563.

MACKLER, B., PERSON, R., OCHS, H. i FINCH, C.A. (1984). Iron deficiency in the rat: effects on neutrophil activation and metabolism.- *Pediatr. Res.* 18 549.

MANDELL, G.L. (1974). Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils.- *Infect. Immun.* 9 337.

MARCHAL, G. i MILON, G. (1986). Control of hemopoiesis in mice by sensitized L3T4+LytZ-Lymphocytes during infection with *Bacillus Calmette-Guerin*.- *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 3977.

MAROUSSEM, D., PIPY, B., BERAUD, M. i DERACHE, R. (1984). The effects of locally injected antibiotic on carrageenan induced granuloma in rats.- *Eur. J. Pharmacol.* 99 303.

MARTIN, A.W.; HUEBERS, E.; HUEBERS, H.; WEBB, J. i FINCH, C.A. (1984). A monosited transferrin from a representative deuterostome: the ascidian *Pyura stolonifera* (Subphylum urochordata).- *Blood* 64 1047.

MASSON, P.L. i HEREMANS, J.F. (1968). Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein). I. The involvement of bicarbonate in the reaction.- *Eur. J. Biochem.* 6 579.

MATHIEU, J., TISSOT, M., NOLIBE, D., FLORENTIN, I., KERGONOU, J.F. i GIROUD, J.P. (1990). Local and systemic affects of an acute inflammation on eicosanoid generation capacity of polymorphonuclear cells and macrophags.- *Int. J. Exp. Path.* 71 603.

MATIOLI, G.T. i BAKER, R.F. (1963). Denaturation of ferritin and its relationship with hemosiderin.- *J. Ultrastruc. Res.* 8 477.

MATZNER, Y. i BRZEZINSKI, A. (1984). A C5a inhibition in peritoneal fluid.- *J. Lab. Clin. Med.* 103 227.

MATZNER, Y., PARTRIGDE; R.E.H. i BABIOR, B.M. (1983). A Chemotactic inhibitor in synocial fluid.- *Immunology.* 4a 131.

MAYER, M.M. (1972). Mechanism of cytolysis by complement.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69 2954.

MAZUR, A., GREEN, S. i CARLETON, A. (1960). Mechanism of plasma iron incorporation into hepatic ferritin.- J. Biol. Chem. 235 595.

McCANCE, R.A. i WIDDOWSON, E.M. (1937). Absortion and excretion of iron.- Lancet, ii 680.

McCOLL, M.R., CLELAND, L.G., WHITEHOUSE, M.W. i VERNON-ROBERTS, B. (1987). Effect of dietary polyunsaturated fatty acid (PUFA) suplamentation on adjuvant induced polyarthrititis in rats.- J. Rheum. 14 197.

McCORD, J.M. (1985). Oxygen derived free radicals in post ischaemic tissue injury.- N. Engl. J. Med. 312 159.

McCORD, J.M. i FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase, an enzymatic function for erytrocuprein (hemocuprein). - J. Biol. Chem. 244 6049.

McGILLIVRAY, R.T.A. i BREW, K. (1977). Structure and evolution of serum transferrin. A "Proteins of iron metabolism". ( Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. i Crichton, R.C., eds) Grune and Stratton. New York, p. 133.

McKAY, R.H. i FINEBERG, R.A. (1964). Horse spleen hemosiderin II. Further caracterization.- Arch. Biochem. Biophys. 194 496.

MEACOCK, S.C.R., SWANN, B.P. i DAWSON, W. (1981). The dynamics and possible roles of metal complexes in inflammation.- A "Trace elements in the pathogenesis and treatment of inflamation". (Rainsford, K.D., Brune, K. i Whitehouse, M.W., eds) Birkhäuser Verlag. Basel, p. 145.

MERRY, P., WINYARD, P.G., MORRIS, C.J., GROOTVELD, M. i BLAKE, D.R. (1989). Oxygen free radicals, inflamation and synovitis: the current status.- Ann. Rheum. Dis. 48 864.

METCALFE, D.D. i KALINER, M. (1981 a). Mast cells and basophils.- A "Cellular functions

in immunity and inflammation. (Oppenheim, J.J.; Rosenstreich, D.L. i Polter, M., eds.). Elsevier North. Holland, p. 301.

METCALFE, D.D. i KALINER, M. (1981 b). The role of prostaglandins in allergic inflammation.- A "Cellular functions in immunity and inflammation". (Oppenheim, J.J.; Rosenstreich, D.L. i Polter, M., eds.). Elsevier. North Holland. P. 355.

METCHNIKOFF, E. (1892). Leçons sur la Pathologie comparée de l'inflammation.- Masson. Paris, p. 6.

METZ, S.A. (1981). Anti-inflammatory agents as inhibitors of prostaglandin synthesis in man.- Med. Clin. M. Am. 65 713.

METZ-BOUTIGUE, M.H.; JOLLES, J.; MAZURIER, J.; SCHOENTGEN, F.; LEGRAND, D.; SPIK, G., MONTREUIL, J. i JOLLES, P. (1984). Human lactotransferrin: aminoacid sequence and structural comparisons with other transferrines.- Eur. J. Biochem. 145 659.

MIKOLAJEW, M., KURATOWSKA, Z., KOSSAKOWSKA, M., PLACHEKA, M. i KOPEC, M. (1969 a). Haematological changes in adjuvant disease in the rat. I. Peripheral blood and bone marrow after repeated injections of Freund's adjuvant.- Ann. Rheum. Dis 28 35.

MIKOLAJEW, M. KURATOWSKA, Z., KOSSAKOWSKA, M., PLACHEKA, M. i KOPEC, M. (1969 b). Haematological changes in adjuvant disease in the rat. II Iron metabolism and <sup>51</sup>Cr erythrocyte survival.- Ann. Rheum. Dis. 28 172.

MILLER, R.G. Jr. (1966). Simultaneous statistical inference. Mc Graw Hill. New York.

MINOTTI, G. i AUST, S.D. (1987). The role of iron in the irritation of lipid peroxidation.- Chem. Phys. Lipids. 44 191.

MITJAVILA, M.T., CARBONELL, M.T., SAIZ, M.P., MUNTANE, J., SANCHEZ, J. i PUIG-PARELLADA, P. (1990). Role of iron in carrageenan-induced Granuloma: Action of desferroxamine and indometacin. - Pharmacol. 40 236.

MODELL, B., LETSKY, E.A., FLYNN, D.M., PETO, R. i WEATHERALL, D.J. (1982).

Survival and desferrioxamine in thalassaemia major.- *Br. Med. J.* 284 1081.

MONCADA, S., FLOWEN, R.J. i VANE, J.R. (1980). Prostaglandins, prostacyclin and therapeutics". (Gihnan, A.G., Goodman, L.S. i Gibman, A., eds.). McMillan. New York, p. 668.

MOORE, L.C. i HUMBERT, J.R. (1984). Neutrophil bactericidal dysfunction towards oxidant radical-sensitive microorganisms during experimental iron deficiency.- *Pediatr. Res.* 18 684.

MORTON, A.G. i TAVILL, A.S. (1977). The control of hepatic iron uptake: correlations with transferrin synthesis.- *Brit. J. Haematol.* 36 383.

MÜLLER, A. i SIES, H. (1984). Assay of ethane and pentane from isolated organs and cells.- *Methods. Enzymol.* 105 311.

NASJLETTI, A. i MALIK, KU. (1979). Relationship between the kallikein-kinin and prostaglandin systems.- *Life Sci.* 25 99.

NICHOLLS, P. i ELLIOT, W.B. (1974). The cytochromes.- A "Iron in biochemistry and medicine". (Jacobs, A. i Worwood, M., eds.). Academic Press. New York, p. 221.

OCTAVE, J.N., SCHENEIDER, Y.J. TROUET, A. i CRICHTON, R.R. (1983). Iron uptake and utilization by mammalian cells. I: Cellular uptake of transferrin and iron.- *Trends. Biochem. Sci.* 8 217.

O'CONNELL, M.J.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C.P.; ACREONA, O.I.; BAUM, H. i PETERS, T.J. (1986). Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism?.- *Biochem. J.* 234 727.

O'CONNELL, M.J., WARD, R.J., BAUM, H., TREFFRY, A. i PETERS, T.J. (1988). Evidence of a biosynthetic link between ferritin and haemosiderin.- *Biochem. Soc. Trans.* 16 828.

OLIVA, J.C., CASTELL, M. QUERALT, J. i CASTELLOTE, C. (1987). Effect of chronic inflammation on copper and zinc metabolism.- *Rev. espan. Fisiol.* 43 25.

- ORNSTEIN, L., ANSLEY, H. i SAUNDERS, A. (1976). Improving Manual differential white cell counts with cytochemistry.- *Blood cells* 557.
- ORNSTEIN, L., JANOFF, A., SWEETMAN, F. i ANSLEY, A. (1973). Histochemical demonstration of an elastase-like human neutrophil esterase.- *J. Histochem. Cytochem.* 21 411.
- PARHAM, M.J., SHOSHAN, S., SCHOENMAKER i BONTA, I.L. (1981). Macrophage regulation of collagen deposition in granuloma tissue in vivo and the effect of prostaglandin E<sub>2</sub>-  
*Scand. J. Rheumatol.* 40 72.
- PAZ, R.A. i SPECTOR, W.G. (1962). The mononuclear cell response to injury.- *J. Path. Bact.* 84 85.
- PEÑA, J. (1982). *Inmunología*. Pirámide. Madrid, p. 46.
- PIPPARD, J.M. (1989) Clinical use of iron chelation.- A "Iron in immunity, cancer and inflammation". (Sousa, M. de i Brock, J.H., eds.). Wiley. Chichester, p. 361.
- PLANAS, J. (1983). El hierro: metal precioso para los seres vivos.- *Mundo Científico* 3 392.
- POITIER DE COURCY, G., DURAND, G., ABRAHAM, J. i GUEGUEN, L. (1989). Recommandations sur les conditions d'alimentation des animaux de laboratoire (Rats et souris).- *Sci. Al.* 9 209.
- POLLACK, S. i LASKY, F.D. (1976). A new iron-binding protein isolated from intestinal mucosa.- *J. Lab. Clin. Med.* 87 670.
- POLLYCOVE, M. (1978). Haemochromatosis.- A "The metabolic basis of inherited disease". (Stanbury, J.B., Wyngarden, J.B. i Fredrickson, D.S., eds.). Mc Graw Hill. New York, p. 1127.
- POOT, M., RABINOLITCH, P.S. i HOEHN, H. (1989). Free radical mediated cytotoxicity of Desferroxamine.- *Free Radical Res. Commun.* 6 373.
- POWANDA, M.C. (1981). Sistemic alterations in metal metabolism during inflammation as a

part of an integrated response to inflammation.- A "Trace elements in the pathogenesis and treatment of inflammation". (Rainsford, K.D., Brune, K. i WhiteHouse, M.W., eds). Birkhäuser Verlag. Basel, p. 121.

POWANDA, M.C., COCKERELL, G.L. i PEKEAREK, R.S. (1973). Amino acid and zinc movement in relation to protein synthesis early in inflammation.- *Am. J. Physiol.* 225 399.

POWANDA, M.C., COCKERELL, G.L., MOC, J.B. ABELES, F.B., PEKEAREK, R.S. i CANONICO, P.G. (1975). Induced metabolic sequelae of tularemia in the rat: correlation with tissue damage.- *Am. J. Physiol.* 229 479.

RAMSAY, W.N.M. (1957). The determination of iron in blood plasma or serum.- *Clin. Chim. Acta.* 2 214.

RAO, G.A., CRAVE, R.T. i LARKIN, E.C. (1983). Reduction of hepatic stearyl-CoA desaturase activity in rats fed iron-deficient diets.- *Lipids* 18 537.

RAO, G.A., MANIX, M. i LARKIN, E.C. (1980). Reduction of essential fatty acid deficiency in rats fed a low iron fat free diet.- *Lipids* 15 55.

REDDEL, R.P., HEDLEY, D.W. i SUTHERLAND, R.L. (1985). Cell cycle effects of iron depletion on T-470 human breast cancer cells.- *Exp. Cell. Res.* 161 277.

REFSUM, S.B. i SCHREINER, B.I. (1984). Regulation of iron balance by absorption and excretion. A critical view and a new hypothesis.- *Scand. J. Gastroenterol.* 18 867.

RICE, E.W. (1961). Evaluation of the role of caeruloplasmin as an acute-phase reactant.- *Clin. Chim. Acta* 6 652.

RIELY, C.A., COHENS, G.A. i LIEBERMAN, H. (1974). Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation.- *Science* 183 208.

RITCHER, G.W. (1958). Electron microscopy of hemosiderin: presence of ferritin and occurrence of crystalline lattices in hemosiderin deposits.- *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 55.

ROBOTHAM, J.L. i LIETMAN, P.S. (1980). Acute iron poisoning. A review.- *Am. J. Dis. Chil.* 134 875.

ROCHA e SILVA, M. (1978). A Brief History of Inflammation. - A "Inflammation". (Vane, J.R. i Ferreira, S.H. eds.). Springer-Verlag. Berlin, p. 6.

ROESER, H.P. (1980). Iron metabolism in inflammation and malignant disease.- A "Iron in biochemistry and medicine II" (Jacobs, A. i Worwood, M., eds) Academic Press. New York. p. 605.

ROOT, R.K. i CHEN, M.S. (1981). The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils.- *Rev. Infect. Dis* 3 565.

ROSE, R.C. (1990). Ascorbic acid metabolism protection against free radicals. A radiation model.- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 2.

ROSSI, F. (1986). The superoxide-forming oxidase of phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. - *Biochim. Biophys. Acta* 853 65

RUSH, J.D. i KOPPENOL, W.H. (1986). Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. Reaction with organic molecules and ferrocyclochrome C.- *J. Biol. Chem.* 261 6730.

SAMOKYSZYN, V.M. REIF, D.W., MILLER, D.M. i AUST, S.D. (1991). Effects of ceruloplasmin on superoxide-dependent iron release from ferritin and lipid peroxidation.- *Free Radical Res. Commun.* 12-13 153.

SAWATZAKI, G., HORADAM, V.M. i WRIGHT, T.L. (1983). The role of iron binding proteins, lactoferrin and transferrin in *Salmonella tiphimurium* infection in mice. - A "Structure and function of iron storage and transport proteins". (Urushizaki, I., Aisen, P., Litowsky, I. i Drysdale, J. W., eds.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

SCHOOLEY, J.C., KULLGREN, B. i ALLISON, A.C. (1987). Inhibition by Interleukin-1 of the action of erythropoietics on erythroid precursors and its possible role in the pathogenesis of hypoplastic anaemias.- *Br. J. Haematol.* 67 11.



SEDGWICK, A.D. i LEES, P. (1986). Studies of eicosanoid production in the rat air pouch model of synovial inflammation.- *Agents and Actions* 18 429.

SEGAL, A.W. (1985). Variations on the theme of chronic granulomatous disease. - *Lancet*. i 1378.

SEVANIAN, A. i HOCHSTEIN, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems.- *Ann. Rev. Nutr.* 5 365.

SEYLE, H. (1953). Use of granuloma pouch tecnic in the study of antiphlogistic corticoids.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82 328.

SHADE, S.G. (1972) Normal incorporation of oral iron into intestinal ferritin in inflammation.- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139 620.

SHODEN, A., GABRIO, B.W. i FINCH, C.A. (1953) The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man.- *J. Biol. Chem.* 204 823.

SINACEUR, J., RIBIERE, C., NORDMANN, J. i NORDMANN, R. (1984). Desferrioxamine. a scavengers of superoxide radicals?.- *Biochem. Pharmacol.* 33 1693.

SMITH, C.V. i ANDERSON, R.E. (1987). Methods for determination of lipid peroxidation in biological Samples.- *Free Radical Biol. Med.* 3 341.

SORENSEN, J.R.J. (1976). An evaluation of altered copper, iron, magnesium and zinc concentrations in rheumatoid arthritis.- *Inorg. Persp. Biol. Med.* 2 1.

SOUSA, M. de (1989). Iron and the lymphomyeloid system: A growing knowledge.- A "Iron in immunity, cancer and inflammation". (Sousa, M. de i Brock, J.H., eds). Wiley. Chichester, p. 3.

SPIRO, T.G. (1977). Chemistry and biochemistry of iron. - A "Proteins of Iron Metabolism". (Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. i Crichton, R.R., eds.). Grune and Straton. New York, p. 23.

SPIRO, T.G., i SALTMAN, P. (1974). Inorganic Chemistry, A "Iron in Biochemistry and Medicine" (Jacobs, A i Worwood, M., eds.). Academic press. London, p. 1.

- SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H. i VLIEGENTHART, J.F.G. (1982). Primary structure of the glycans from human lactotransferrin.- *Eur. J. Biochem.* 121 413.
- STEINMAN, R.M. i COHN, Z.A. (1974). The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes.- A "The inflammatory process". (Zweifach, B.W., Grant, L. i Cluskey, R.T. eds.). Academic Press. New York, p.449.
- STOSSEL, T.P. (1974) Phagocytosis.- *N. Engl. J. Med.* 29 717.
- STURGEON, P. i SHODEN, A. (1964) Mechanisms of iron storage.- A "Iron metabolism". (Gross, F. ed.). Springer-Verlag. Berlin p. 121.
- SUNDERMAN, F.W. i NOMOTO, S. (1970). Measurement of human serum ceruloplasmin by its P-phenylenediamine oxidase activity.- *Clin. Chem.* 16 11.
- TAHIN, Q.S., BLUM, M. i CARAFDI, E. (1981) The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart and brain: diet-induced modifications.- *Eur. J. Biochem.* 121 5.
- TAYLOR, P., MARTINEZ-TORRES, C., LEETS, I., RAMIREZ, J., GARCIA-CASAL, M.N. i LAYRISSE, M. (1988). Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrins and serum ferritin concentration in humans.- *J. Nutr.* 118 1110.
- THOMSON, A.J. (1985). Iron-sulphur proteins. (Harrison, P.M. ed.). Metalloproteins, Part I. Mc Millan. London, p. 74.
- THOMSON. R.A. (1983). Complement. A "Immunology in Medicine" (Holborow, E.J.; Reeses, W.G.) Academic Press. London, p. 45.
- THRUSH, M.A., WIBON, M.E. i VAN DYKE, K. (1978). "The Generation of Chemiluminescence by Phagocytic cells.- *Meth. Enzymol.* 57 462.
- TILL, G., KOWNATZKI, E., SEITZ, M. i GEMSA, D. (1979). Chemokinetic and Chimiotactic activity of various prostaglandins for neutrophil granulocytes.- *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12 111.

- TOREILLES, J. i GUERIN, M.C. (1989). L'oxigene un mal necesaire.- Sauramps medical.
- TORRANCE, J.D. i BOTHWELL, T. H. (1980). Tissue Iron Stores. A "Iron Methods in hematology." (Cook, J. ed.) Vol. I. Churchill. Livingstone, p. 90.
- TREFFRY, A. i HARRISON, P.M. (1984). Iron-random distribution of iron entering rat liver ferritin *in vivo*.- Biochem. J. 220 857.
- TRUMP, B.F., VALIGORSKY, J.M., ARSTILA, A.V., MERGMER, W.E.J. i KINNEY, T.D. (1973). The relationship of intracellular pathways of iron metabolism to cellular iron overload and the iron storage diseases.- Am. J. Path. 72 295.
- TURNBULL, A. (1974). Iron absorption. - A "Iron in Biochemist and Medicine". (Jacobs, A., Worwood, M., eds.). Academic Press. New York, p. 370.
- U.S. Department of Agriculture and Health, Education and Welfare (1980). Nutrition and your health. Dietary guidelines for americans. Government Printing Office. Washington.
- VAN ASBECK, B.S., MARX, J.J.M., ATRUYVENBERG, A., KATS, J.H.V. i VERHOEF, J. (1984). Desferroxamine enhances phagocytic function of human polymorphonuclear leukocytes.- Blood. 63 714.
- VAN DOKKUM, W., CLOUGHLEY, F.A., HULSHOF, K.F.A.M. i OOSTERVEN, L.A.M. (1983). Effect of variations in fat and linoleic acid intake on the calcium, magnesium and iron balance of young men.- Ann. Nutr. Metabol. 27 361.
- WALKER, B.L. i KUMMEROW, F.A. (1963). Dietary fat and the structure properties of rat erythrocytes and the effect of dietary fat on the erythrocyte lipids.- J. Nutr. 81 75.
- WAN, J.M.F., HAW, M.P. i BLACKBURN, G.L. (1989). Nutrition, immune function and inflammation: an overview. - Proc. Nutr. Soc. 48 315.
- WEINBERG, E.D. (1984). Iron withholding: a defense against infection and neoplasia.- Physiol. Rev. 64 65.

- WEINBERG, E.D. (1986). Iron, infection and neoplasia.- Clin. Physiol. Biochem. 4 50.
- WEINBERG, E.D. (1990). Cellular iron metabolism in health and disease.- Drug Metabolism Reviews 22 531.
- WEISSMAN, G. (1982). Activation of neutrophil and the lesions of rheumatoid arthritis.- J. Lab. Clin. Med. 100 322.
- WENDEL, A. (1987). Measurement of *in vivo* lipid peroxidation and toxicological significance.- Free Radical Biol. Med. 3 355.
- WENDEL, A. i DUMELIN, E.E. (1981). Hydrocarbon exhalation.- Meth. Enzymol. 77 10.
- WILLIAMS, R.J.P. (1974). Haem proteins and oxygen.- A "Iron in biochemistry and medicine". (Jacobs, A. i Worwood, M. eds). Academic Press. New York, p. 183.
- WILLIS, A.L. (1970). Identification of prostaglandin E<sub>2</sub> in rat inflammatory exudate.- Pharmacol. Res. Commun. 2 297.
- WILLOUGHBY, D.A., SEDGWICK, A.D., GIRAUD, J.P., AL-DUAIJ, Y. i BRITO, F. de (1986). The use of air pouch to study experimental synovitis and cartilage breakdown.- Biomed. Pharmacoterap. 40 45.
- WILLSON, R.L. (1977). Iron, zinc, free radicals and oxygen in tissue disorders and cancer control.- Ciba Found. Symp. 51 331.
- WILKINSON, P.C. (1983). Mononuclear Phagocytes and granulocytes. A "Immunology and Medicine". (Holborow, E.J. i Reeves, W.G., eds.). Academic Press. London, p. 59.
- WINTER, C.A., RISELY, E.A. i NUSS, G.V. (1962). Carrageenan-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs.- J. Pharm. Exp. Ther. 141 360.
- WINYARD, P.G., LUNEC, J., CHIRICO, S., GUTTERIDGE, J.M.C. i BLAKE, D.R. (1984). Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin.- Int. J. Biochem. 16 1273.

WINYARD, P.G., BLAKE, D.R., CHIRICO, S., GUTTERIDGE, J.M.C. i LUNEC, J. (1987). Mechanism of exacerbation of rheumatoid synovitis by total dose infusion of iron dextran: *In vivo* demonstration of iron promoted oxidant stress.- *Lancet* 1 69.

WINYARD, P.G., HIDER, R.C., BRAILSFORD, S., DRAKE, A.F., LUNEC, J. i BLAKE, D.R. (1989). Effects of oxidative stress on some physicochemical properties of caeruloplasmin.- *Biochem. J.* 258 435.

WRIGHT, D.G. i GALLIN, J.I. (1977). Functional differentiation of human neutrophil granules: Generation of C5a by a specific granule product and inactivation of C5a by azurophil granule products.- *J. Immunol.* 119 1068.

YAGI, K. (1982). *Lipid peroxides in Biology and Medicine*. Academic Press. New York.

YAGI, K. (1984). Assays for blood plasma or serum.- *Meth. Enzymol.* 105 328.

YOSHINO, S., BLAKE, D.R. i BACON, P.A. (1984). The effect of desferrioxamine on antigen-induced inflammation in the rat air pouch.- *J. Pharm. Pharmacol.* 36 543.

YOSHINO, S. i ELLIS, E.F. (1987). Effects of a fish-oil-supplemented diet on inflammation and immunological processes in rats.- *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 84 233.

YOULTEN, C.J.F. (1978). Inflammatory mediators and vascular events. A "Handbook of experimental pharmacology." (Vane, J.R. i Fencina, S.H., eds.). Springer-Verlag. Berlin, p. 571.

YOUNG, S.P. i AISEN, P. (1981). Transferrin receptors and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes.- *Hepatology* 1 114.

ZARRABI, M.H., LYSIK, R. i ZUCKER, S. (1977). The anemia of chronic disorders: studies of iron reutilization of the anaemia of experimental malignancy and chronic inflammation.- *Br. J. Haematol.* 35 647.