



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE GRAU

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *PATJ* EN NEUTRÒFILS EN RESPOSTA A ESTÍMULS ACTIVADORS

Jaume Llinàs Arias

Biologia

Facultat de Ciències

Any acadèmic 2020-21

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *PATJ* EN NEUTRÒFILS EN RESPOSTA A ESTÍMULS ACTIVADORS

Jaume Llinàs Arias

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any acadèmic 2020-2021

Paraules clau del treball:

Ictus isquèmic, neuroinflamació, neutròfils, *PATJ*, *CXCR2*.

Nom del tutor / la tutora del treball: Cristòfol Vives Bauzà, Grup de Neurobiologia de l'Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (IdISBa), Son Espases

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1. RESUM / ABSTRACT

L'ictus és una de les malalties amb major mortalitat i la causa principal de discapacitat en adults a Espanya. Recentment s'ha descobert que la variant rs76221407 del gen *PATJ* està associada a mal pronòstic funcional després d'un ictus isquèmic. *PATJ* és una proteïna implicada en la formació de les unions oclusives entre cèl·lules endotelials. Estudis preliminars del grup receptor han mostrat que *PATJ* s'infra-expressa en cèl·lules endotelials després d'un ictus isquèmic, afavorint així la seva transició a cèl·lules mesenquimals i facilitant l'angiogènesi. Per altra banda, els neutròfils són les úniques cèl·lules leucocitàries que expressen *PATJ*. Els neutròfils juguen un paper important en el dany isquèmic. Després de l'ictus, se produeix permeabilització de la barrera hematoencefàlica, i els neutròfils s'infiltra cap al parènquima cerebral migrant a la zona de penombra colindant a la lesió isquèmica en resposta a citocines quimiotàctiques. Allà alliberen més citocines, exacerbant així la resposta neuroinflamatòria. Actualment no sabem quin és el paper de *PATJ* en neutròfils. La hipòtesi d'aquest treball és que *PATJ* participa en processos de migració, adhesió i/o infiltració en neutròfils modulant l'expressió del receptor de citocines *CXCR2*. Per respondre a la hipòtesis en aquest estudi hem plantejat els següents objectius: 1. Generar un protocol d'aïllament i cultiu de neutròfils primaris. 2. Estudiar l'expressió de *PATJ* i del receptor *CXCR2* en neutròfils en resposta a diferents estímuls quimiotàctics. En primer lloc, s'ha aconseguit establir un protocol d'aïllament de neutròfils a partir de mostres de sang i mantenir la seva supervivència en cultiu fins a 48 hores emprant els estímuls *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) i *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF). En segon lloc, els estudis d'expressió mitjançant RT-PCR han demostrat que tant *PATJ* com *CXCR2* es sobreexpressen en resposta a PMA i G-CSF. No obstant això, les limitacions del treball, destacant la poca quantitat d'ARN que es va poder extreure dels neutròfils, no permeten concloure si dita sobreexpressió ocorre a les primeres hores d'estimulació o si apareix més tard.

Stroke is the leading cause of disability worldwide. It has recently been discovered that the rs76221407 variant of the *PATJ* gene is associated with poor functional outcome after ischemic stroke. *PATJ* is a protein involved in the formation of tight junctions between endothelial cells. Preliminary data from the research group have shown on the one hand that *PATJ* is downregulated in endothelial cells after ischemic stroke, thereby promoting endothelial to mesenchymal transition and activation of angiogenesis. On the other hand, they have shown that neutrophils are the only leukocyte cells that express *PATJ*. Neutrophils play a critical role in ischemic damage. After ischemic stroke, there is a disruption of the blood-brain barrier and neutrophil infiltrate through the brain parenchyma towards the penumbra area in where they release more cytokines, thus exacerbating the neuroinflammatory response. The role of *PATJ* in neutrophils is currently unknown. The hypothesis of this work is that *PATJ* participates in migration, adhesion and/or infiltration processes in neutrophils by modulating the expression of the *CXCR2* cytokine receptor. The study had two specific aims: SA-I, to generate a protocol for primary neutrophils isolation and culture. SA-II, to study *PATJ* and *CXCR2* gene expression in neutrophils upon culture with different chemotactic stimuli. A viable protocol has optimized to

isolate neutrophils from blood and maintaining their survival in culture for up to 48 hours using *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) and *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) as stimuli. RT-PCR expression studies have shown that both *PATJ* and *CXCR2* overexpress in response to PMA and G-CSF. However, due to the low RNA amounts that could be extracted from neutrophils, we cannot clearly conclude whether the overexpression of *PATJ* and *CXCR2* occurs in the early hours of stimulation or whether it appears later.

ÍNDEX

1. RESUM / ABSTRACT	3
2. ABREVIATURES	5
3. INTRODUCCIÓ	6
4. OBJECTIU EXPERIMENTAL	9
5. MATERIALS I MÈTODES	10
5.1. Obtenció de mostres de sang	10
5.2. Disseny experimental	10
5.3. Aïllament i comptatge de neutròfils	11
5.4. Estimulació de neutròfils	12
5.5. Extracció i quantificació d'ARN	12
5.6. Retrotranscripció: Pas d'ARN a ADNc	12
5.7. RT-PCR	13
5.8. Disseny i recta d'eficiència d'encebadors	14
5.9. Electroforesi en gel d'acrilamida	14
5.10. Anàlisi estadística	15
6. RESULTATS	16
6.1. El PMA a dosis adequades augmenta la supervivència cel·lular de neutròfils en cultiu	16
6.2. L'expressió de <i>PATJ</i> i <i>CXCR2</i> es modula en resposta a PMA i G-CSF	16
6.3. Els neutròfils i les cèl·lules hCMEC/D3 presenten distintes variants del gen <i>PATJ</i>	16

7. DISCUSSIÓ	19
8. CONCLUSIONS	22
9. REFERÈNCIES	22

2. ABREVIATURES

CXCR2: *C-X-C motif chemokine receptor 2*

EndMT: *Endothelial to mesenchymal transition*

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

G-CSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*

GWAS: *Genome wide association studies*

IL-1 β : *Interleukin-1 β*

IL-6: *Interleukin-6*

IL-8: *Interleukin-8*

hCMEC/D3: *Cèl·lules endotelials microvasculars cerebrals humanes*

IS: *Ischemic ictus*

MMPs: *Matrix metalloproteinases*

PATJ: *Pals1-associated tight junction*

PDZ: *PSD95/Dlg1/zo-1*

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

ROS: *Reactive oxygen species*

TNF- α : *Tumor necrosis factor α*

3. INTRODUCCIÓ

L'ictus és la segona malaltia més prevalent a nivell mundial (Vivanco-Hidalgo et al., 2019; Avan et al., 2019). A Espanya, representa la principal causa de mort en dones i la segona en homes. Segons la Federació Espanyola de l'Ictus (FEI), anualment 40.000 espanyols moren com a conseqüència d'un ictus, i 120.000 nous casos són detectats. Això implica que aproximadament cada 6 minuts es produeix un nou cas a nivell nacional. L'ictus isquèmic (*Ischemic Ictus, IS*) és el principal tipus d'ictus (85% dels casos (Jayaraj et al., 2019)), i és una de les principals causes de discapacitat i dependència a Espanya. S'estima que el cost socio-sanitari que comporta la dependència associada a l'IS és de 27 711 € per pacient per any, dels quals dos terços són costos socials (Alvarez-Sabin et al., 2017). Tenint en compte això, cada cop més investigació s'està destinant a estudiar els mecanismes rere l'ictus per comprendre la seva fisiopatologia i poder dissenyar tractaments efectius per a millorar el pronòstic.

L'ictus isquèmic consisteix en la interrupció del flux sanguini en una àrea determinada del cervell i la conseqüent pèrdua de la funció neurològica. Aquesta cessació és causada per fenòmens de trombosi o embolisme que oclouen un vas sanguini que porta nutrients i oxigen a certa regió cerebral, resultant amb mort neuronal. Com a conseqüència d'aquesta oclusió es distingeixen dues zones afectades al teixit cerebral. Per una banda, la zona central pateix danys irreversibles. Per altra banda, la zona perifèrica, anomenada regió de penombra, té la capacitat de revertir en certa mesura els danys ocasionats per la isquèmia. Després d'un episodi d'IS, té lloc la mort sobtada per necrosi de les neurones presents al nucli isquèmic, activant tot un conjunt de processos metabòlics que desemboquen en una resposta neuroinflamatòria que contribueix a agreujar encara més la lesió neuronal (Jayaraj et al., 2019; Nakamura i Shichita, 2019).

Recentment, mitjançant estudis d'associació genètica (*GWAS; Genome wide association study*), el grup receptor de Neurobiologia de l'IdISBa ha identificat una variant polimòrfica del gen *PATJ* (rs76221407, al·lel G), que es troba associada al pronòstic funcional de l'IS. *PATJ* (*Pals1-associated tight junction*) és una proteïna amb 10 dominis PDZ d'interacció proteïna-proteïna que forma part del complex proteic Crumbs (CRB). El complex Crumbs, juntament amb altres com *PAR* (*protease activated receptor*) i *SCRIB* (*scribble planar cell polarity protein*), participa en la formació de les unions oclusives o *tight junctions* i regula el procés de polarització de les cèl·lules endotelials durant la seva diferenciació mitjançant vies de senyalització intracel·lular (Li et al., 2020; Halaoui i McCaffrey, 2015). *PATJ* juga un paper en aquest procés regulant la localització de la proteïna quinasa C atípica (aPKC) i *PAR3* en cèl·lules endotelials de fetge caní (Shin et al., 2007).

Un altre estudi del grup receptor ha comprovat que l'expressió de *PATJ* disminueix de manera dràstica després d'un episodi d'IS, cosa que afavoreix la formació de nous vasos sanguinis, procés anomenat angiogènesi. La reducció en l'expressió de *PATJ* fa que les *tight junctions* es dissociïn i que les cèl·lules epitelials perdin la polaritat per convertir-se en cèl·lules mesenquimals. Aquest procés es coneix com EndMT (*Endothelial to mesenchymal transition*). Un cop adoptada la morfologia mesenquimal, aquestes cèl·lules poden migrar cap a la regió del cervell lesionada i tornar a diferenciar-se en cèl·lules endotelials,

recuperant la polaritat i formant nous vasos sanguinis. Amb la formació de nous vasos, oxigen i nutrients arriben a la regió de penombra i ajuden a la recuperació de les neurones danyades.

Aquest plantejament concorda amb el fet que la variant polimòrfica de *PATJ* de major risc (rs76221407) és aquella que s'associa amb una major expressió de *PATJ*, dificultant així els processos d'EndMT i angiogènesi.

Apart de a cèl·lules endotelials, *PATJ* també s'expressa en un sol tipus de leucòcits: els neutròfils. En aquestes cèl·lules, *PATJ* no està implicada en la formació de les *tight junctions*, ja que els neutròfils no estableixen aquest tipus d'unions intercel·lulars. Existeixen evidències experimentals per part del grup receptor que demostren que *PATJ* modula la capacitat de migració i infiltració dels neutròfils. A més, han demostrat també una correlació positiva entre els nivells d'expressió de *PATJ* en neutròfils 10 dies després de l'IS i el grau de dependència funcional.

Després d'un episodi d'IS, la micròglia i altres neurones residents alliberen citocines, molècules que juguen un paper important en l'activació, proliferació i diferenciació de certs tipus cel·lulars i que també estan implicades en l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular. Aquesta alliberació de citocines indueix un augment de l'expressió d'ICAM 1 (*intracellular adhesion molecule 1*), desencadenant-se així la disrupció de la barrera hematoencefàlica al nucli isquèmic. Això suposa un senyal de reclutament per a que leucòcits inflamatoris com macròfags, limfòcits T i NK i neutròfils migrin cap a la zona lesionada. Un cop allà, també alliberen citocines per atreure més leucòcits, exacerbant la resposta neuroinflamatòria (Jayaraj et al., 2019).

Les tres principals citocines proinflamatòries són la interleucina-1 β (IL-1 β), la interleucina-6 (IL-6) i el factor de necrosi tumoral α (TNF- α). Després d'un IS sever, els nivells de TNF- α en el plasma sanguini augmenten, i tots tres tipus de citocines es troben presents en quantitats elevades en el líquid cerebrospinal. A més, TNF- α i IL-1 β promouen l'alliberació de quimiocines que atreuen neutròfils com CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*), i altres que atreuen diferents leucòcits (Jayaraj et al., 2019).

També s'ha demostrat que els nivells d'interleucina-8 (IL-8) augmenten després d'un IS. El receptor CXCR2 és un receptor de quimiocines acoblat a proteïnes G implicat en la migració dels neutròfils que reconeix la IL-8, entre d'altres molècules senyal (Baugher i Richmond, 2008). El correcte funcionament de CXCR2 depèn d'un complex proteic intracel·lular al qual està unit mitjançant un domini PDZ a l'extrem carboxiterminal. Fins ara, s'han identificat només dues proteïnes com a constituents d'aquest complex proteic: NHERF1 (*Na/H exchanger regulatory factor 1*) i PLC- β 2 (*phospholipase- β 2*), que juga un paper en la via de transducció de senyal després de l'arribada d'IL-8 (Wu et al., 2012).

El fet que *PATJ* sigui una proteïna amb dominis PDZ, que de totes les cèl·lules leucocitàries tan sols s'expressi en neutròfils, i que a major nivell d'expressió pitjor sigui el pronòstic funcional després d'un IS, suggereix que *PATJ* podria formar part del complex proteic associat a *CXCR2* i que per tant jugaria un paper

important en la migració dels neutròfils durant la resposta neuroinflamatòria post-isquèmica.

Els neutròfils exposen a la seva membrana plasmàtica unes proteïnes anomenades P-selectines, que, mitjançant la interacció amb receptors de P-selectina presents a la membrana plasmàtica de les cèl·lules endotelials, permeten el seu desplaçament pels vasos sanguinis mitjançant un moviment rodant (Moore et al., 1995). No obstant això, segons Lawrence i Springer (1991), la velocitat de migració dels neutròfils és inversament proporcional al nivell d'expressió de P-selectina.

Els receptors de P-selectina de les cèl·lules endotelials s'emmagatzemen a l'interior cel·lular en unes vesícules anomenades cossos de Weibel-Palade. Front a l'alliberació d'histamina o trombina pròpia de la resposta inflamatòria, la membrana dels cossos de Weibel-Palade se fusiona amb la membrana plasmàtica i les P-selectines s'estableixen a la cara extracel·lular (Bonfanti et al., 1989; Hattori et al., 1989) (Fig. 1). La presència de P-selectines és molt major als marges de la cèl·lula endotelial, on contacta amb altres cèl·lules que constitueixen la paret del vas sanguini. L'adhesió dels neutròfils a l'endoteli vascular es veu fortament afavorida quan la presència de P-selectines exposades a la cara extracel·lular és elevada (Burns et al., 1999) (Fig. 2).

Un cop adherits als marges entre cèl·lules endotelials, els neutròfils poden travessar la barrera hematoencefàlica gràcies a l'acció de les metaloproteïnases de matriu (MMPs; *matrix metalloproteinases*). Les MMPs són enzims proteolítics que es troben a la membrana plasmàtica i que són capaços de degradar els components de la matriu extracel·lular i de la làmina basal que sustenta les cèl·lules endotelials. En condicions normals, juguen un paper en la neuroregeneració, la diferenciació cel·lular, l'angiogènesi i l'apoptosi. Emperò, poc després del IS, la MMP induïble MMP-9 i també MMP-2 degraden proteïnes implicades en la formació de les *tight junctions* (ocluïdina i claudina-5) i les principals proteïnes de la làmina basal de l'endoteli vascular (col·lagen de tipus IV, laminina i fibronectina). D'aquesta manera, s'indueix la disrupció de la barrera hematoencefàlica i es facilita la infiltració de leucòcits, destacant els neutròfils, cap al teixit cerebral danyat. Inicialment, MMP-9 és expressada per les pròpies cèl·lules endotelials i per neutròfils, per passar a ser produïda també per macròfags després de 5 dies de l'IS (Jayaraj et al., 2019). Més tard, al cap de dies o setmanes, sembla que les MMPs juguen un paper beneficiós en la recuperació funcional modulant la remodelació neurovascular (Cunningham, 2005; Zhao et al., 2006).

Els neutròfils són les primeres cèl·lules leucocitàries que arriben a la regió isquèmica després d'un IS. Un cop s'han infiltrat, poden causar danys al teixit cerebral degut a l'elevada quantitat d'enzims proteolítics que contenen, la seva capacitat de generar radicals lliures d'oxigen (ROS) i l'activació del sistema del complement (Hernandez et al., 1987; Nathan, 2006). Per aquest motiu, els casos de pitjor pronòstic funcional després d'un IS es relacionen amb majors nivells de neutròfils infiltrants cap a la regió isquèmica.

En vista de totes aquestes evidències, la hipòtesi d'aquest treball és que *PATJ* en neutròfils participa en processos d'adherència, migració i/o infiltració, modulant l'activitat del receptor de membrana CXCR2.

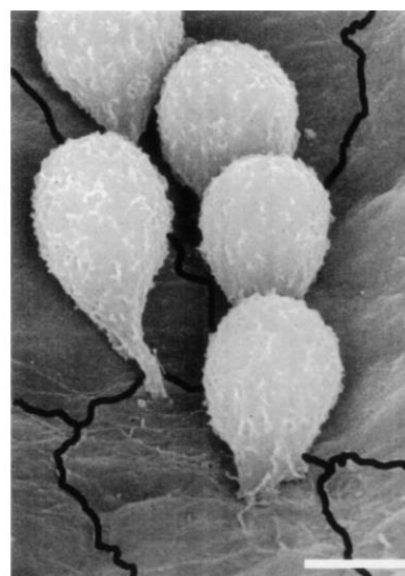
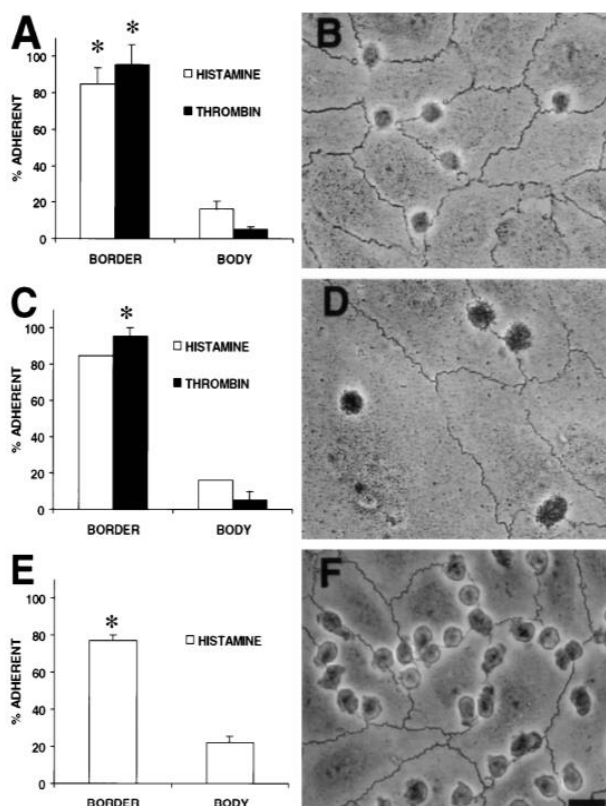


Fig. 2. Micrografia electrònica d'escaneig de neutròfils adherint-se prop dels marges entre cèl·lules endotelials (línies negres). (Burns et al., 1999).

Fig. 1. Adherència de neutròfils a HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) (A, B, E, F) o cèl·lules endotelials microvasculars de pulmó (C, D) després d'un tractament amb histamina (10^{-4} M) o trombina (0,2 U/ml). Les cèl·lules endotelials i els neutròfils foren tenyits amb tinció de plata per destacar el marge cel·lular. Els panells A, C i E mostren que >75% dels neutròfils s'adheriren als marges cel·lulars i no al centre de les cèl·lules endotelials. Els panells B, D i F són micrografies que mostren l'adhesió dels neutròfils després de l'estimulació amb histamina (B, F) o trombina (D). Aquells neutròfils que no reberen estimulació ni per histamina ni per trombina no s'adheriren a les cèl·lules endotelials. (Burns et al., 1999).

4. OBJECTIU EXPERIMENTAL

L'objectiu principal d'aquest treball és determinar si el gen *PATJ* en neutròfils es modula en resposta a estímuls quimiotàctics. Per aconseguir-ho, es plantegen alhora 2 objectius específics (OE):

OE.1. Establir un mètode de cultiu de neutròfils òptim per garantir la seva viabilitat en presència de diferents estímuls quimiotàctics que permeti posteriorment modular l'expressió de *PATJ* *in vitro*.

OE.2. Determinar l'expressió dels gens *PATJ* i *CXCR2* en neutròfils front a estímuls quimiotàctics i en funció de la durada del temps d'estimulació.

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1. Obtenció de mostres de sang

Les mostres de sang a partir de les quals es van aïllar els neutròfils van ser extretes de voluntaris sans mitjançant canulació intravenosa en tubs amb EDTA de 8 ml de capacitat. Immediatament després de l'extracció, es va procedir amb el protocol d'aïllament de neutròfils.

5.2. Disseny experimental

Per al desenvolupament de l'OE.1, els neutròfils van ser estimulats amb PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) i amb G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*). El PMA estimula l'activitat dels neutròfils mitjançant l'associació directa i activació de la proteïna PKC (*protein kinase C*), induint la producció de citocines (Liao et al., 2005). El G-CSF impulsa la maduració de cèl·lules precursoras a neutròfils i promou la supervivència i activació de neutròfils madurs, promocionant funcions importants com la producció d'espècies reactives d'oxigen i la capacitat fagocítica i bactericida (Roberts, 2005). A mesura que s'anaven veient els efectes del PMA i el G-CSF sobre els neutròfils, vam anar modificant la dosi i el temps d'exposició a aquests estimulants per tal d'incrementar la supervivència cel·lular.

En relació a l'OE.2, un cop assolit el temps d'estimulació corresponent, els neutròfils foren congelats. El següent pas fou l'extracció del seu ARN total, per passar-lo a ADN complementari (ADNc) i dur a terme un estudi d'expressió de *PATJ* i *CXCR2* mitjançant PCR a temps real (RT-PCR). Per aconseguir-ho, primer es dissenyaren els oligonucleòtids per amplificar *PATJ* i *CXCR2*, emprant la plataforma bioinformàtica OligoAnalyzer (IDT; <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Després es realitzaren RT-PCRs amb gradient de temperatura per determinar la temperatura òptima d'hibridació, i seguidament realitzàrem corbes d'eficiència de les parelles d'oligonucleòtids de *PATJ* i *CXCR2*.

Per tal de complir els objectius específics esmentats, es plantejaren tres experiments:

Experiment 1. S'estimularen 2×10^6 neutròfils (2 pous) amb PMA (38 ng/ μ l) per a cada una de les següents condicions: durant 8 hores, 24 hores, 48 hores, 72 hores i 96 hores. A més, es deixaren sense estimular 2×10^6 neutròfils durant 8 hores, i 2×10^6 més durant 24 hores. Després s'estudià l'expressió de *PATJ* prenent com a normalitzadors els gens *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) i *18S* (subunitat menor del ARN ribosòmic *18S*).

Experiment 2. Veient la baixa supervivència cel·lular aconseguida a l'experiment 1, optarem per reduir el nombre de punts a analitzar a 8, 24 i 48 hores. Per a cada punt, 2×10^6 neutròfils (2 pous) foren estimulats, per una banda amb PMA a una dosi menor (24 ng/ml), i per altra banda amb G-CSF a 50 ng/ml. Novament, es deixaren sense estimular 2×10^6 neutròfils durant 8 hores, i 2×10^6 més durant 24 hores. Després s'estudià l'expressió de *PATJ* prenent com a normalitzadors els gens *GAPDH* i *18S*.

Experiment 3. Més orientat a estudiar l'expressió de *PATJ* i *CXCR2*, els neutròfils foren estimulats, per una banda amb PMA a 25 ng/ml i per altra banda amb G-CSF a 50 ng/ml. 3×10^6 neutròfils foren sotmesos a cada un dels estímuls durant 8 hores, mentre que 4×10^6 neutròfils van ser tractats amb cada estímul durant 24 hores. Com en els anteriors experiments, 2×10^6 neutròfils es deixaren sense estimulació durant 8 hores, i 2×10^6 més durant 24 hores. Després s'estudià l'expressió de *PATJ* i *CXCR2* emprant com a normalitzador el gen *18S*.

5.3. Aïllament i comptatge de neutròfils

En primer lloc, s'afegiren 2 ml de dextrà als tubs de 8 ml amb la sang, es taparen i s'invertiren per tal d'homogeneïtzar-ho. A continuació, es deixà la sang incubant 45 minuts a 37°C i 5% de CO₂ amb els taps lleugerament desenroscats per permetre l'entrada de CO₂. Passat aquest temps, es recollí la fase plasmàtica superior i es transvasà a nous tubs, mentre que la fase inferior amb els eritròcits fou descartada. Als tubs amb la fase aquosa que contenia neutròfils s'afegí medi RPMI (amb 10% FBS i 1% penicil·lina-estreptomycina) fins a cobrir-ne tot el volum. Tot seguit, es centrifugaren els tubs (1800 rpm, 5 min, taxa d'acceleració de 5 sobre 5, taxa de desceleració de 2 sobre 5, temperatura (T) ambient (Jouan BR4i, París, França)). Es descartà el sobrenedant, es va tornar a afegir medi RPMI i es va repetir la centrifugació amb les mateixes condicions. Tot aquest procés es repetí una tercera vegada a mode de rentat. El següent pas fou la lisi dels possibles eritròcits que quedessin al precipitat. Per fer-ho, es repetí el següent procés fins a tres vegades. Primer s'afegiren 1 ml de sèrum fisiològic i 3 ml d'aigua destil·lada a cada tub i s'homogeneïtzà amb el vòrtex durant 1 minut. Després, s'afegí 1 ml de solució salina 3,5% i es procedí a una centrifugació (1400 rpm, 5 min, taxa d'acceleració de 5 sobre 5, taxa de desceleració de 2 sobre 5, T ambient (Jouan BR4i, París, França)). Després de descartar el sobrenedant i repetir les anteriors passes tres cops, el precipitat amb neutròfils es va resuspendre en 10 ml de medi RPMI.

Per al comptatge de neutròfils, 10 µl de la suspensió de neutròfils es mesclà amb 10 µl de *trypan blue* (dilució 1:2). Tot seguit, es va efectuar el recompte amb una cambra de Neubauer a partir de 10 µl de la dilució 1:2 de la suspensió de cèl·lules.

$$N^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules totals} / \text{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules comptades}}{N^{\circ} \text{ quadrants de la cambra}} \times \text{Factor dilució} \times \frac{1}{\text{Volum cambra (ml)}}$$

N° quadrants de la cambra de Neubauer → 4

Factor de dilució → 2 (10 µl suspensió de neutròfils + 10 µl *trypan blue*)

Volum cambra → Les dimensions de la cambra emprada són 1 mm x 1 mm x 0,1 mm. El volum de la cambra és 0,1 ml.

Un cop determinada la concentració de la suspensió de neutròfils, s'hi afegí el volum de medi RPMI per aconseguir una nova suspensió de 2×10^6 cèl·lules/ml. A cada pou d'una placa de 24 pous es sembraren 1×10^6 cèl·lules/pou en 500 µl de medi RPMI (amb 10% FBS i 1% penicil·lina-estreptomycina).

5.4. Estimulació de neutròfils

Per a tots tres experiments, l'administració de PMA i/o G-CSF es dugué a terme immediatament després de l'aïllament de neutròfils. Ens assegurarem d'homogeneïtzar bé la suspensió de neutròfils de cada pou després de l'addició de l'estimulant per evitar la mort per toxicitat dels neutròfils propers a la zona concreta on s'administrà l'estímul.

5.5. Extracció i quantificació d'ARN

L'extracció d'ARN es va efectuar a partir de la suspensió de neutròfils utilitzant el kit miRNeasy Mini kit de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del comerciant i eluint l'ARN en un volum de 40 µl d'aigua lliure d'ARNases. En primer lloc, es lisaren les cèl·lules amb QIAzol Lysis Reagent, i a continuació s'afegí cloroform per tal de separar els components cel·lulars en diferents fases, quedant els àcids nucleics de neutròfils a la fase superior i les restes d'eritròcits a la fase inferior. Tot seguit es van centrifugar les mostres (12.000 x g, 15 min, 4°C (Eppendorf 5430R, Hamburg, Alemanya)) per establir bé les diferents fases. Un cop transferida la fase superior a nous tubs, es mesclà amb etanol per a netejar l'ARN de restes orgàniques. D'aquí, es transferí a uns tubs amb una membrana a la part mitjana per retenir l'ARN anomenats columnes, i que estan inclosos al kit. A part de l'etanol, es varen fer rentats successius amb els tampons RWT i RPE, també inclosos al kit, centrifugant les columnes després de l'addició de cada tampó (14.500 rpm, 15 s, T ambient (Eppendorf MiniSpin Plus, Hamburg, Alemanya)). A continuació es va fer una nova centrifugació sense afegir cap tampó per tal d'eixugar bé la columna (14.500 rpm, 1 min, T ambient (Eppendorf MiniSpin Plus, Hamburg, Alemanya)). Tot seguit, s'afegiren 40 µl d'aigua lliure d'ARNases i es centrifugà (14.500 rpm, 1 min, T ambient (Eppendorf MiniSpin Plus, Hamburg, Alemanya)) per eluir l'ARN retingut a la membrana de la columna.

La quantificació d'ARN es va dur a terme emprant l'espectrofotòmetre Nano Vue Plus (New Jersey, Geòrgia, Estats Units) a partir de 2 µl d'ARN, considerant sobretot les mostres amb valors de concentració d'ARN superiors a 10 ng/µl i ratios d'absorbància A260/A280 propers a 2.

5.6. Retrotranscripció: Pas d'ARN a ADNc

La retrotranscripció de l'ARN extret dels neutròfils es va dur a terme emprant el kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Londres, Regne Unit), seguint les instruccions del comerciant. A cada tub, s'afegiren 4 µl de 5x TransAmp Buffer, 1 µl de retrotranscriptasa, un volum d'ARN eluït equivalent a 1 µg d'ARN (si fou possible) i el volum d'aigua necessari per arribar a 20 µl totals. Un cop preparades les mostres, es sotmeteren a les condicions que s'especifiquen a la taula 1 (Taula 1) amb l'ús d'un termociclador Biometra Morant (Biometra, Göttingen, Alemanya).

Taula 1. Condicions per a la reacció de retrotranscripció.

Temperatura	Temps	Funció
25°C	10 min	Alineament dels encebadors
42°C	15 min	Retrotranscripció
48°C	15 min	Estabilització
85°C	5 min	Inactivació
4°C	Temps indefinit	Conservació

Taula 2. Cicles de temperatura per a la RT-PCR.

Cicles	Temperatura	Temps	Funció
1	95°C	2 min	Activació de la polimerasa
40	95°C	5 s	Desnaturalització
	54-61°C*	10 s	Alineament dels encebadors
	72°C	10 s	Extensió
	4°C	Temps indefinit	Conservació

**PATJ*: 54°C; *CXCR2*: 54°C; *GAPDH*: 54°C; *18S*: 61°C.

Taula 3. Seqüències dels encebadors emprats.

Gen	Seqüència
<i>PATJ</i> (directe)	5'-TGTCCACAGGCCCTCTAATA-3'
<i>PATJ</i> (invers)	5'-CCTGAGCCATCTGTGAATGA-3'
<i>CXCR2</i> (directe)	5'-GAAGCCATCAGACAGGAAGAT-3'
<i>CXCR2</i> (invers)	5'-GAGGTATTCCACAGAGGAAC-3'
<i>GAPDH</i> (directe)	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
<i>GAPDH</i> (invers)	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'
<i>18S</i> (directe)	5'-TAAGCAACGAGACTCTGGCAT-3'
<i>18S</i> (invers)	5'-CGGACATCTAAGGGCATCACAG-3'

5.7. RT-PCR

Per fer la RT-PCR a partir de l'ADNc es van seguir les instruccions del kit SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, Londres, Regne Unit). A cada pou d'una placa de 96 pous, s'afegiren 5 µl de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix, que és el reactiu del kit que porta la sonda que hibrida amb l'ADNc i emet fluorescència. Després, s'afegiren 0,4 µl tant de l'encebador directe com de l'encebador invers, 4 µl d'ADNc i 0,2 µl d'aigua lliure d'ARNases. Cada mostra es distribuï per triplicat per tal de tenir marge d'error si algun pou no quedava carregat correctament. Un cop preparada la placa de 96 pous, les mostres es sotmeteren als cicles de temperatura especificats a la taula 2 (Taula 2) amb l'ús d'un termociclador BIORAD CFX96 Real-Time System (BIORAD, Hercules, Califòrnia, Estats Units).

Prenent els resultats de Ledderose et al. (2011) com a referència, els gens d'expressió constitutiva que s'empraren com a normalitzadors, foren *GAPDH*, implicat en la via metabòlica de la glucòlisi, i el gen *18S*, constituent de la subunitat menor ribosòmica.

Com a cèl·lules control per estudiar l'expressió de *PATJ* s'empraren dos tipus cel·lulars. Per una banda, es prengueren com a control cèl·lules endotelials hCMC/D3, que expressen *PATJ* per establir correctament les unions oclusives intercel·lulars. Per altra banda, i per tenir un control més fiable i semblant a les mostres problema, s'empraren neutròfils sense cultivar ni estimular. Les cèl·lules

que s'empraren com a control per a l'expressió de *CXCR2* foren també neutròfils sense cultivar ni estimular.

5.8. Disseny i recta d'eficiència d'encebadors

Les seqüències d'ADNc de *PATJ* i *CXCR2* van ser obtingudes des de la base de dades del NCBI. Mitjançant el programa OligoAnalyzer (IDT; <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) es seleccionaren els encebadors proposats procurant que complissin tota una sèrie de requisits per tal de que funcionessin de manera òptima. En primer lloc, havien de tenir una longitud de 18-22 nucleòtids i al voltant d'un 50% de contingut GC. Als 5 primers i 5 últims nucleòtids havien de presentar com a mínim 2/3 guanines o citosines. També s'intentà evitar que el primer i l'últim nucleòtid fossin una adenina i una timina (o viceversa) per prevenir la formació d'estructures secundàries d'auto-aparellament. Per últim, havien d'estar formats per nucleòtids que pertanyessin a dos exons contigus diferents, excloent així nucleòtids de les regions intròniques. Per altra banda, els encebadors dels gens *GAPDH* i *18S* emprats no foren dissenyats específicament per aquest treball. La seqüència dels encebadors emprats es mostra a la taula 3 (Taula 3).

Per estudiar l'eficiència dels encebadors de *PATJ* i *CXCR2* es comprovà el nombre de llindars de cicle (Ct) requerits per tal d'emetre senyal fluorescent emprant dilucions 1:1, 1:10, 1:100 i 1:1000 d'una mostra amb un total de 1000 ng d'ADNc de hCMEC/D3. L'eficiència es va obtenir a partir del pendent entre els Ct per a cada una de les cinc dilucions.

5.9. Electroforesi amb gel d'acrilamida

Les electroforesis en gels d'acrilamida ofereixen una major resolució que els gels d'agarosa, i a més eviten la degradació de l'ADN, per la qual cosa són especialment interessants a l'hora d'analitzar fragments d'ADN de petita longitud. En aquest cas, s'analitzà el producte de RT-PCR de les mostres de neutròfils estimulats durant 24 i 48 hores i de cèl·lules hCMEC/D3 amplificades amb la parella d'encebadors de *PATJ*.

Per preparar el gel d'acrilamida al 12% s'empraren 4,8 ml d'acrilamida al 30%, 4,8 ml d'aigua, 2,4 ml de TBE 5x (*Tris/Borate/EDTA buffer*), 200 µl d'APS al 10% (*ammonium persulphate*) i 10 µl de TEMED (*tetramethylethylenediamine*).

El tampó TBE proporciona millors resultats que el tampó TAE (*Tris/Acetate/EDTA*) i no requereix que el voltatge sigui tan baix i que l'ADN migri a tan baixa velocitat que quan s'empra el tampó TAE. L'APS actua com a catalitzador de la polimerització de l'acrilamida, la qual requereix la presència de radicals lliures que es formen en reaccions d'oxido-reducció impulsades pel TEMED.

Un cop afegida la mescla de reactius a la cubeta, es deixà 45 minuts a temperatura ambient per a que polimeritzés. A continuació, es carregaren el marcador i les mostres d'ADN juntament amb 2 µl de tampó de càrrega, i s'aplicà primer una intensitat de voltatge de 70V per fer sortir les mostres, i un cop aconseguit, aquesta s'incrementà fins a 100V. En haver acabat de córrer, es van

tenyir els gels amb Midori Green Advance (Nippon Genetics; intercalant de la doble hebra d'ADN) per veure quina distància havien recorregut els fragments d'ADN d'interès.

5.10. Anàlisi estadística

El valor de Ct fa referència al nombre de cicles (duplicacions de l'ADNc) necessaris per a que el senyal fluorescent que s'emet quan la sonda *Sybr-Green* s'hibrida amb l'ADNc sigui suficientment intens per a que l'aparell el detecti.

Per inferir els nivells d'expressió dels gens d'interès a partir del nombre de Ct es va emprar el mètode de Pfaffl:

$$\text{Ratio d'expressió} = \frac{E(\text{diana})^{\Delta Ct \text{ diana (control-tractat)}}}{E(\text{ref})^{\Delta Ct \text{ ref (control-tractat)}}$$

E(interès) → Eficiència dels encebadors del gen d'interès (s'ha considerat que tenen una eficiència de 2, és a dir, del 100%).

ΔCt interès (control-tractat) → Diferència de cicles entre la condició control i la condició estimulat per al gen d'interès per a cada punt a analitzar. *

E(ref) → Eficiència dels encebadors del gen normalitzador (s'ha considerat que tenen una eficiència de 2, és a dir, del 100%).

ΔCt ref (control-tractat) → Diferència de cicles entre la condició control i la condició estimulat per al gen normalitzador per a cada punt a analitzar. *

* Per les mostres estimulades durant més de 24 hores, es calculà la diferència de Ct amb les mostres control durant 24 hores. Per les mostres de referència (hCMEC/D3 o neutròfils recentment aïllats), es calculà la diferència de Ct amb les mostres control durant 8 hores.

Un cop aconseguits els valors de rati d'expressió, es van haver de convertir a valors de *fold change* (FC). El FC representa quantes vegades el gen d'interès està més o menys expressat que el gen normalitzador. Si el rati d'expressió és major que 0,9999, el valor de FC pren el mateix que el del rati d'expressió. En canvi, si el rati d'expressió és menor o igual que 0,9999, es fa una conversió que consisteix en dividir -1 entre el valor de rati d'expressió.

Rati d'expressió > 0,9999 → FC = Rati d'expressió

Rati d'expressió < 0,9999 → FC = -1/Rati d'expressió

Feta aquesta conversió, els valor de FC que es troben entre 1,5 i -1,5 s'interpreten com que no hi ha ni sobreexpressió ni infraexpressió del gen d'interès.

Cada un dels tres experiments, on s'establiren unes condicions concretes de tipus i dosi d'estímul, temps d'estimulació i gens estudiats, només es va dur a terme un cop. Per aquest motiu, no hi ha rèpliques biològiques de cada experiment, encara que sí es realitzaren rèpliques tècniques (duplicats o triplicats) a l'hora de carregar les plaques de 96 pous per a la RT-PCR.

6. RESULTATS

6.1. El PMA a dosis adequades augmenta la supervivència cel·lular de neutròfils en cultiu

La supervivència dels neutròfils estimulats amb altes dosis de PMA (38 ng/μl) es va veure molt disminuïda, requerint fins a 38 Ct per tal d'obtenir senyal fluorescent suficient referent a *PATJ* (Fig. 3). Quan es va disminuir la dosi de PMA a (24 ng/ml), els nivells d'expressió de *PATJ* foren superiors, i es requeriren al voltant de 29 Ct per obtenir senyal fluorescent suficient (Fig. 4).

6.2. L'expressió de *PATJ* i *CXCR2* es modula en resposta a PMA i G-CSF

En l'experiment 2, els nivells d'expressió de *PATJ* dels neutròfils estimulats amb PMA durant 8 hores ($p=0,010$) i els de hCMEC/D3 ($p=0,001$) foren significativament inferiors als valors d'expressió dels controls de referència, mentre que l'expressió de *PATJ* en neutròfils estimulats amb PMA durant 48 hores ($p=0,012$) i amb G-CSF durant 48 hores ($p<0,001$) es va veure significativament augmentada (Fig. 4).

Pel que fa a l'experiment 3, els neutròfils estimulats amb PMA durant 8 hores ($p=0,013$) i 24 hores ($p=0,006$), i amb G-CSF durant 8 hores ($p=0,008$) augmentaren l'expressió de *PATJ* de manera significativa. D'igual manera, els neutròfils sense estimular que tot d'una foren sotmesos al procés d'extracció d'ARN també presentaren uns nivells d'expressió de *PATJ* augmentats ($p=0,001$) (Fig. 5; A)

El gen *CXCR2* també es sobreexpressà en neutròfils tractats amb PMA durant 8 hores ($p=0,020$) i 24 hores ($p<0,001$), així com en neutròfils estimulats amb G-CSF durant 8 hores ($p=0,014$). De la mateixa manera, els neutròfils sense estimular ni cultivar experimentaren un augment d'expressió de *CXCR2* ($p=0,031$) (Fig. 5; B)

L'eficiència dels encebadors de *PATJ* va ser del 98,61% (Fig. 6) i la dels de *CXCR2* va ser del 98,15% (Fig. 7).

6.3. Els neutròfils i les cèl·lules hCMEC/D3 presenten distintes variants del gen *PATJ*

La temperatura de fusió per a *PATJ* en cèl·lules endotelials hCMEC/D3 va ser de 80,5°C, mentre que en neutròfils va ser un grau inferior, 79,5°C (Fig. 8; A). Per comprovar si la mida de l'amplicó era diferent, es va efectuar una electroforesi en gel d'acrilamida, i no s'observaren diferències de longitud del fragment d'ADNc amplificat entre hCMEC/D3 i neutròfils (Fig. 8; B).

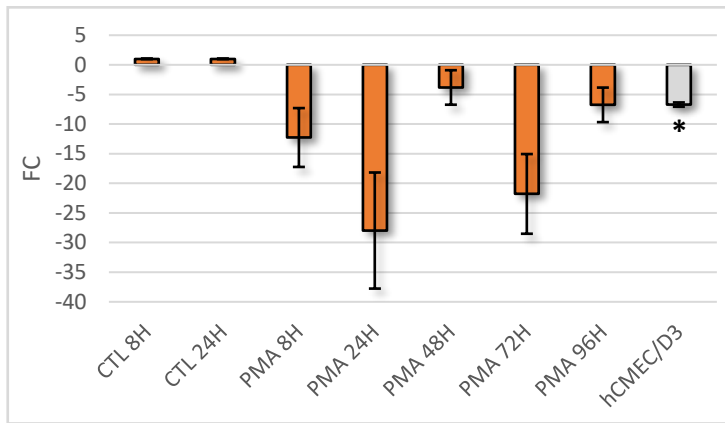


Fig. 3. Experiment 1. Valors de FC d'expressió de *PATJ*. Els neutròfils foren estimulats amb PMA a 38 ng/μl. L'expressió de *PATJ* dels neutròfils estimulats durant 8 h i d'hCMEC/D3 es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 8 h. En neutròfils estimulats durant 24, 48, 72 i 96 h, l'expressió de *PATJ* es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 24 h. 18S com a gen normalitzador.

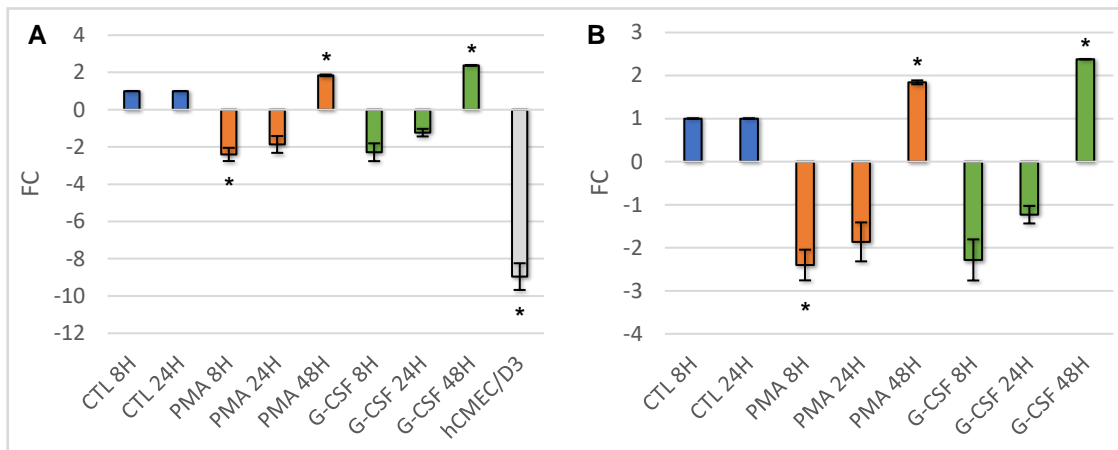


Fig. 4. Experiment 2. Valors de FC d'expressió de *PATJ*. Els neutròfils foren estimulats amb PMA a 24 ng/ml i amb G-CSF a 50 ng/ml. L'expressió de *PATJ* dels neutròfils estimulats durant 8 h i d'hCMEC/D3 es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 8 h. En neutròfils estimulats durant 24 i 48 h, l'expressió de *PATJ* es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 24 h. 18S com a gen normalitzador. **(A)** Es representa també hCMEC/D3. **(B)** No es representa hCMEC/D3. PMA 8h: $p=0,010$; PMA 48h: $p=0,012$; G-CSF 48h: $p<0,001$; hCMEC/D3: $p=0,001$.

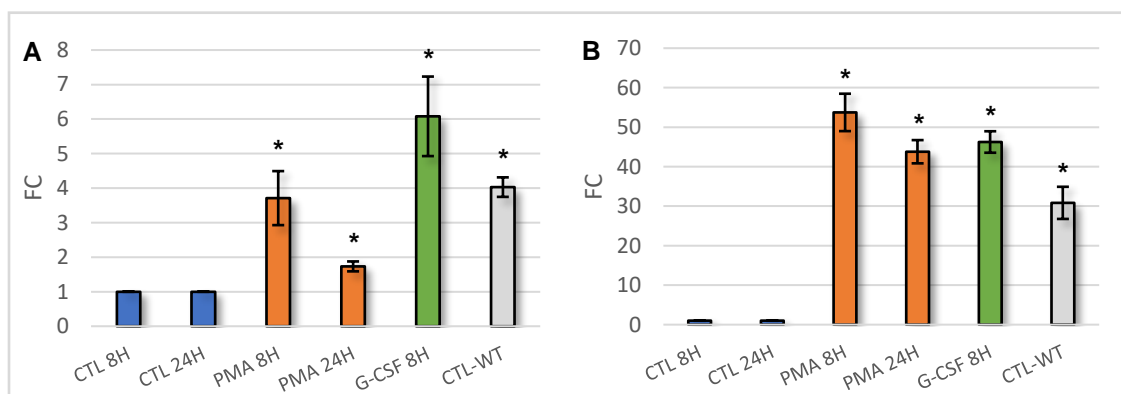


Fig. 5. Experiment 3. Valors de FC d'expressió de *PATJ* **(A)** i *CXCR2* **(B)**. Els neutròfils foren estimulats amb PMA a 25 ng/ml i amb G-CSF a 50 ng/ml. L'expressió dels neutròfils estimulats durant 8 h i sense estimular ni cultivar (CTL-WT) es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 8 h. En neutròfils estimulats durant 24, l'expressió es relativitzà als neutròfils control mantinguts en cultiu durant 24 h. 18S com a gen normalitzador. **(A)** PMA 8h: $p=0,013$; PMA 24h: $p=0,006$; G-CSF 8h: $p=0,008$; CTL-WT: $p=0,001$. **(B)** PMA 8h: $p=0,020$; PMA 24h: $p<0,001$; G-CSF 8h: $p=0,014$; CTL-WT: $p=0,031$.

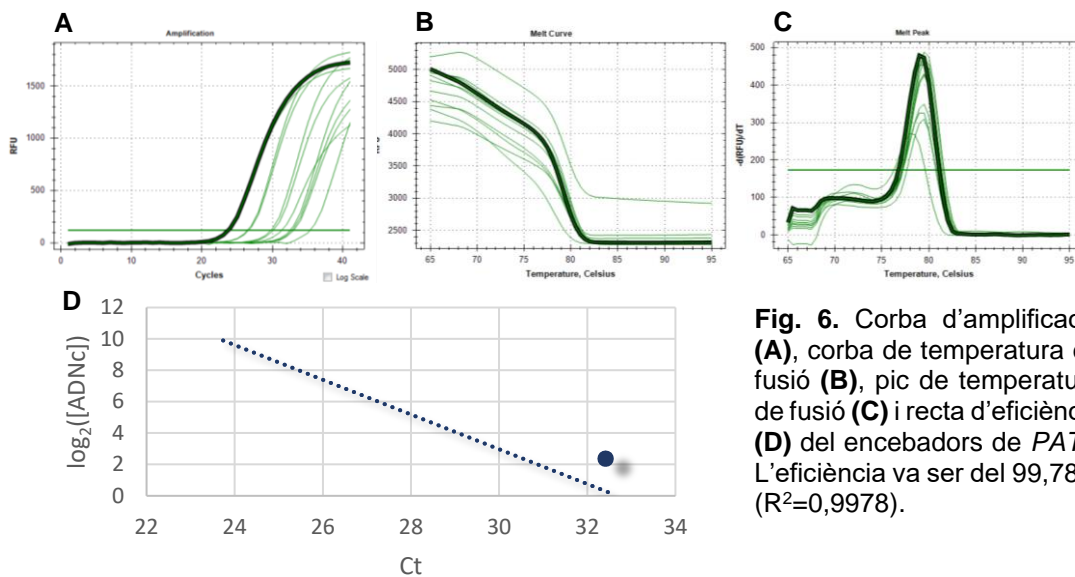


Fig. 6. Corba d'amplificació (A), corba de temperatura de fusió (B), pic de temperatura de fusió (C) i recta d'eficiència (D) del encebadors de *PATJ*. L'eficiència va ser del 99,78% ($R^2=0,9978$).

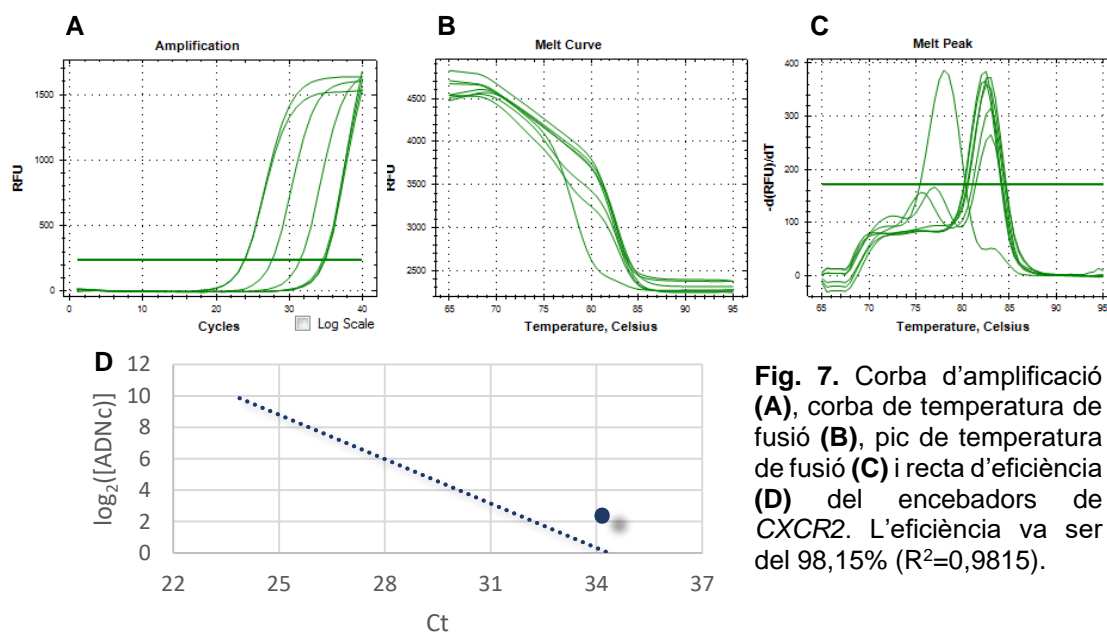


Fig. 7. Corba d'amplificació (A), corba de temperatura de fusió (B), pic de temperatura de fusió (C) i recta d'eficiència (D) del encebadors de *CXCR2*. L'eficiència va ser del 98,15% ($R^2=0,9815$).

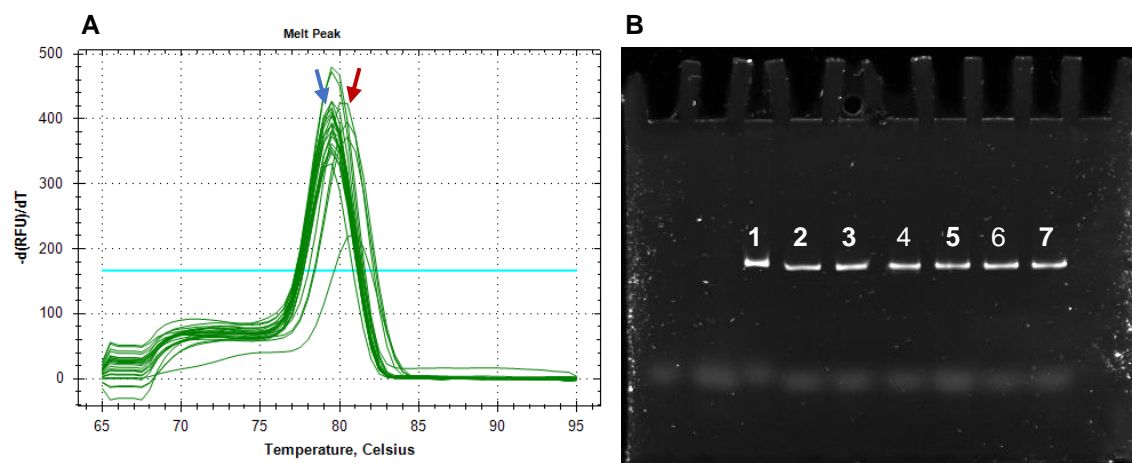


Fig. 8. (A) Pic de temperatura de fusió; la fletxa vermella senyala les hCMEC/D3 ($T_{\text{fusió}}=80,5^{\circ}\text{C}$) i la fletxa blava senyala els neutròfils ($T_{\text{fusió}}=79,5^{\circ}\text{C}$). (B) Gel d'acrilamida revelat que mostra que totes les mostres tenen una mida molt semblant. 1:CTL-14h; 2:PMA-24h; 3:G-CSF-24h; 4:PMA-48h; 5:G-CSF-48h; 6:hCMEC/D3; 7:hCMEC/D3.

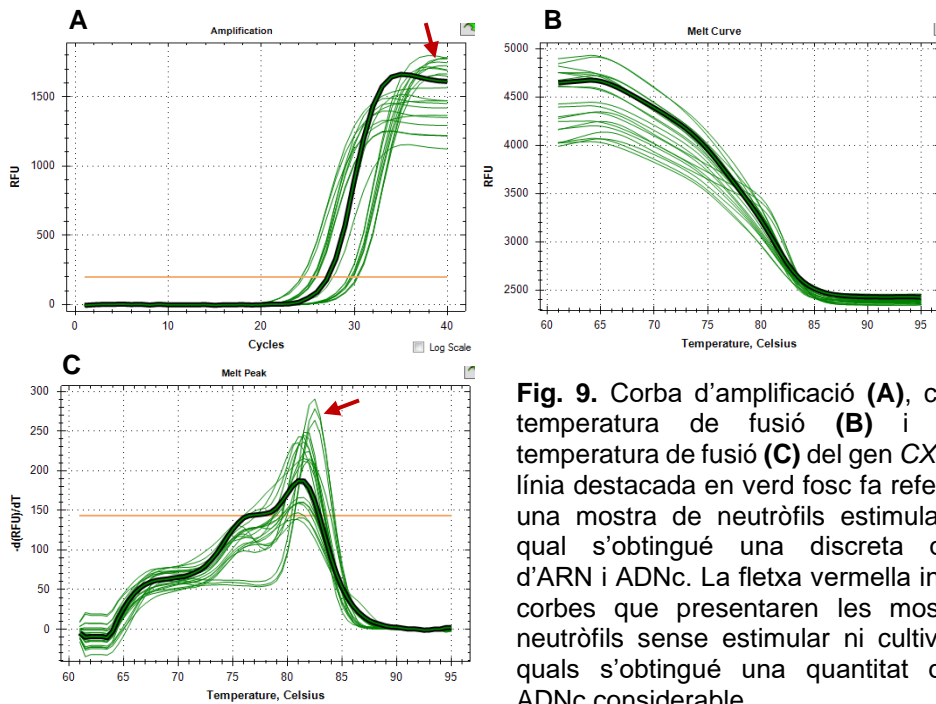


Fig. 9. Corba d'amplificació (A), corba de temperatura de fusió (B) i pic de temperatura de fusió (C) del gen *CXCR2*. La línia destacada en verd fosc fa referència a una mostra de neutròfils estimulats, dels qual s'obtingué una discreta quantitat d'ARN i ADNc. La fletxa vermella indica les corbes que presentaren les mostres de neutròfils sense estimular ni cultivar, dels quals s'obtingué una quantitat d'ARN i ADNc considerable.

7. DISCUSSIÓ

En referència a l'OE.1, sembla que el PMA a 24 ng/ml és l'estímul que més supervivència garanteix fins a 48 hores en cultiu. No obstant això, aquesta conclusió s'ha inferit a partir dels valors d'expressió dels gens *PATJ* i *18S*, quan les diferències poden ser degudes realment a altres factors com l'eficiència dels encebadors per als gens normalitzadors. Per a propers treballs s'hauria de comprovar l'eficiència dels encebadors per als gens normalitzadors en neutròfils. A més, la metodologia ideal per a comprovar la supervivència de neutròfils al llarg del temps s'hauria de valorar amb anàlisis de viabilitat cel·lular, com pugui ser l'assaig MTT o tinció amb iodur de propidi seguida de quantificació colorimètrica, valorant cada un dels punts a analitzar.

Pel que fa a l'OE.2, amb l'experiment 2 es demostra que les cèl·lules endotelials hCMEC/D3 no són un bon control per estudiar l'expressió de *PATJ* en neutròfils. Existeixen evidències per part del grup receptor que les cèl·lules hCMEC/D3 expressen *PATJ*, ja que al ser cèl·lules endotelials, requereixen aquesta proteïna per establir les unions oclusives intercel·lulars. L'eficiència dels encebadors per a *PATJ* es determinà a partir de cèl·lules hCMEC/D3 i no de neutròfils. A més, un cop comprovada la longitud dels productes de RT-PCR emprant els encebadors per a *PATJ*, queda descartat que la diferència en la temperatura de fusió de *PATJ* en hCMEC/D3 i neutròfils s'expliqui perquè presenten isoformes de distinta mida. El més probable és que la composició nucleotídica del gen *PATJ* en hCMEC i en neutròfils presenta alguns polimorfismes diferencials, i que l'afinitat entre les dues cadenes d'ADNc és menor en la variant pròpia de neutròfils, coincidint amb una menor temperatura de fusió. El fet que l'eficiència dels encebadors per a *PATJ* fos determinada a partir de cèl·lules hCMEC/D3 i no de neutròfils, i que la pròpia seqüència nucleotídica del gen *PATJ* difereixi lleugerament entre els dos tipus cel·lulars podria explicar els resultats obtinguts. A partir d'aquest raonament, es pot concloure que és recomanable emprar un sol

tipus cel·lular, en aquest cas neutròfils, per a estudis d'expressió. Amb els resultats aconseguits en aquest experiment sembla que l'estimulació amb PMA a 24 ng/ml i amb G-CSF a 50 ng/ml redueix l'expressió de *PATJ* durant les primeres hores, però després aquest efecte es reverteix, mostrant nivells d'expressió augmentats al voltant de les 48 hores d'exposició a l'estímul.

Amb la idea en ment que les cèl·lules hCMEC/D3 no són un bon control es dissenyà l'experiment 3, on s'empraren neutròfils sense estimular i sense cultivar com a cèl·lules control. En aquest cas els resultats mostren una sobreexpressió tant de *PATJ* com de *CXCR2* en aquells neutròfils tractats amb PMA a 25 ng/ml i amb G-CSF a 50 ng/ml. Interessantment, *PATJ* respon més a l'estímul G-CSF, mentre que el PMA és l'estímul que més promou l'expressió de *CXCR2*. En un estudi, els neutròfils estimulats amb PMA mostraren nivells augmentats d'expressió de gens involucrats en processos com l'activació de granulòcits, entre les quals podria estar-hi present *CXCR2* (Degroote et al., 2020). A diferència de l'experiment 2, l'efecte inductor d'expressió que experimentaren els neutròfils en l'experiment 3 va ser immediat, manifestant-se ja a les 8 hores d'exposició a l'estímul, i disminuint una mica al cap de 24 hores. Això concorda amb el fet que durant les primeres etapes del procés de migració es requereix una intensa activitat de *CXCR2*, mentre que, un cop han arribat a la regió afectada, els neutròfils sobreexpressen en la membranes plasmàtica el receptor *CXCR1*, implicat en l'alliberació de proteases i altres molècules citotòxiques (Nasser et al., 2019). Un aspecte a tenir en compte també és que les mostres de sang emprades per a cada experiment foren diferents i de persones distintes. A més, també podria haver influït el grau d'activació endògena dels leucòcits a l'interior de l'organisme en el moment de l'extracció de sang i aïllament de neutròfils.

Un altre factor important a tenir en compte és que, tot i que segons Ledderose et al. (2011) *GAPDH* i *18S* són bons gens normalitzadors per a neutròfils no estimulats i activats amb LPS, hem vist que realment es modulen en funció del tipus d'estímul i temps d'exposició, i inclús quan no hi ha estimulació. En el cas dels neutròfils estimulats, una possible explicació és que, al activar-se, experimenten una important reprogramació metabòlica on hi està implicada una major despesa energètica i una major síntesi proteica. Segons Awasthi et al. (2019), l'estimulació de neutròfils amb PMA a 50 nM desencadena l'efecte Warburg. Aquest efecte consisteix en la potenciació de la via glucolítica, en la qual hi està implicat *GAPDH*, com a estratègia per produir energia ràpidament, deixant en un segon pla el cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons. Pel que fa al gen *18S*, l'activació dels neutròfils en resposta a LPS i TNF no sembla estar associada a un increment de la síntesi proteica ni a un major requeriment de ribosomes actius (Tennenberg et al., 1993), cosa que no concorda amb el fet que en el nostre cas, *18S* se moduli sota les distintes condicions. En el cas dels neutròfils no estimulats que han modulats l'expressió dels gens normalitzadors, cal tornar a destacar que en aquest treball no s'ha determinat l'eficiència dels encebadors de *GAPDH* ni *18S* en neutròfils. Si bé sembla que *GAPDH* i *18S* són bons normalitzadors en aquestes condicions, Ledderose et al. (2011) afirma que els millors gens normalitzadors per a neutròfils estimulats amb LPS són *ACTB* (β -actin), *TBP* (*TATA box binding protein*) i *SDHA* (*succinate dehydrogenase complex, subunit A*). Altres autors recomanen

alternatives de gens com a normalitzadors per estudis d'expressió, com per exemple *RPL32* (*ribosomal protein L32*) i *GNB2L1* (*guaninenucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1*) en cas que s'aconsegueixi extreure una quantitat intermèdia d'ARN, i *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) per casos amb molt poc ARN (Zhang et al., 2005).

Precisament, un dels factors limitants més importants d'aquest treball ha estat la poca quantitat d'ARN amb la que poder treballar. A l'igual que en altres estudis (Zhang et al., 2005), s'obtingueren de l'ordre de 4 µg d'ARN total de neutròfils a partir de 10 ml de sang. Aquest fet ens limità en el sentit que, tot i sotmetre un nombre considerable de cèl·lules a cada condició d'estimulant i temps d'exposició, la quantitat d'ARN extret d'aquestes cèl·lules fou molt discreta, i no ens va deixar cap tipus de marge per controlar la concentració d'ADNc de cada mostra amb l'objectiu d'obtenir un bon nombre de Ct en l'estudi d'expressió. En relació a això, un cop fet el pas d'ARN a ADNc, haguérem d'emprar gran part del volum del producte de la retrotranscripció per aconseguir ng d'ADNc suficients per poder fer l'estudi d'expressió. Inevitablement, al partir de tant volum, arrossegàrem també els enzims i el tampó específics per a la retrotranscripció per preparar les mostres per a la RT-PCR. Pensem que això ha pogut interferir durant la RT-PCR, cosa que queda reflectida en la corba d'amplificació i de temperatura de fusió d'aquelles mostres on la quantitat d'ARN extret fou molt escassa, especialment quan s'estudià l'expressió de *CXCR2* (Fig. 9). El fet que aquestes interferències no apareguin a les mostres de neutròfils sense estimular ni cultivar (Fig. 9), en què la quantitat d'ARN de partida així com d'ADNc varen ser més grans, dona suport a aquesta hipòtesi.

Per tal d'obtenir resultats més consistents i més fiables, s'ha de partir d'una major quantitat d'ARN i d'ADNc per a l'estudi d'expressió. Per aconseguir-ho, un major nombre de cèl·lules han de ser sotmeses al mateix tractament, arribant com a mínim als $1,5 \times 10^7$ neutròfils per condició. També és necessari replicar cada experiment per tal de tenir més d'un resultat de FC per a cada condició. De cara a un futur, quan el mètode d'estudi d'expressió gènica en neutròfils s'hagi optimitzat, serà interessant estudiar l'expressió de *PATJ* i *CXCR2* front a citocines que s'alliberen després de l'ictus isquèmic com per exemple TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8. D'aquesta manera, més evidències s'aconseguiran al voltant de la hipòtesi que *PATJ* en neutròfils participa en processos d'adherència, migració i/o infiltració, modulant l'activitat del receptor de membrana *CXCR2* i contribuint a la resposta neuroinflammatòria post-isquèmica.

8. CONCLUSIONS

Amb aquest treball s'han pogut definir tres conclusions principals:

- S'han aconseguit aïllar neutròfils i garantir la seva viabilitat fins a les 48 hores estimulant-los amb PMA.
- S'han establert els primers fonaments per dur a terme estudis d'expressió gènica en neutròfils front a distints estímuls quimiotàctics com el PMA o el G-CSF.
- L'expressió del gen *PATJ* es veu modulada en funció de l'exposició a estímuls com PMA i G-CSF, tot i que encara no està clar si l'efecte inductor de l'expressió que tenen aquests estímuls apareix durant les primeres 8 hores o si adquireix més rellevància passades les 48 hores.

9. REFERÈNCIES

- Alvarez-Sabín, J., Quintana, M., Masjuan, J., Oliva-Moreno, J., Mar, J., Gonzalez-Rojas, N., ... & Yebenes, M. (2017). Economic impact of patients admitted to stroke units in Spain. *The European Journal of Health Economics*, 18(4), 449-458.
- Avan, A., Digaleh, H., Di Napoli, M., Stranges, S., Behrouz, R., Shojaeianbabaei, G., ... & Azarpazhooh, M. R. (2019). Socioeconomic status and stroke incidence, prevalence, mortality, and worldwide burden: an ecological analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *BMC medicine*, 17(1), 1-30.
- Awasthi, D., Nagarkoti, S., Sadaf, S., Chandra, T., Kumar, S., & Dikshit, M. (2019). Glycolysis dependent lactate formation in neutrophils: a metabolic link between NOX-dependent and independent NETosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(12), 165542.
- Baugher, P. J., & Richmond, A. (2008). The carboxyl-terminal PDZ ligand motif of chemokine receptor *CXCR2* modulates post-endocytic sorting and cellular chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30868-30878.
- Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B., & Wagner, D. D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 73(5), 1109-1112.
- Burns, A. R., Bowden, R. A., Abe, Y., Walker, D. C., Simon, S. I., Entman, M. L., & Smith, C. W. (1999). P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *Journal of leukocyte biology*, 65(3), 299-306.
- Cunningham, L. A., Wetzel, M., & Rosenberg, G. A. (2005). Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*, 50(4), 329-339.
- Degroote, R. L., Weigand, M., Hauck, S. M., & Deeg, C. A. (2020). IL8 and PMA trigger the regulation of different biological processes in granulocyte activation. *Frontiers in immunology*, 10, 3064.

- Halaoui, R., & McCaffrey, L. (2015). Rewiring cell polarity signaling in cancer. *Oncogene*, 34(8), 939-950.
- Hattori, R., Hamilton, K. K., McEver, R. P., & Sims, P. J. (1989). Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 9053-9060.
- Hernandez, L. A., Grisham, M. B., Twohig, B. E. V. E. R. L. E. I. G. H., Arfors, K. E., Harlan, J. M., & Granger, D. N. (1987). Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 253(3), H699-H703.
- Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., & Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 1-24.
- Lawrence, M. B., & Springer, T. A. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65(5), 859-873.
- Ledderose, C., Heyn, J., Limbeck, E., & Kreth, S. (2011). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC research notes*, 4(1), 1-11.
- Li, P., Lan, P., Liu, S., Wang, Y., & Liu, P. (2020). Cell polarity protein Pals1-associated tight junction expression is a favorable prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Genetics*, 11.
- Liao, X. L., Lou, B., Ma, J., & Wu, M. P. (2005). Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein AI. *Life sciences*, 77(3), 325-335.
- Moore, K. L., Patel, K. D., Bruehl, R. E., Li, F., Johnson, D. A., Lichenstein, H. S., ... & McEver, R. P. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *The Journal of cell biology*, 128(4), 661-671.
- Nakamura, K., & Shichita, T. (2019). Cellular and molecular mechanisms of sterile inflammation in ischaemic stroke. *The Journal of Biochemistry*, 165(6), 459-464.
- Nasser, M. W., Raghuvanshi, S. K., Grant, D. J., Jala, V. R., Rajarathnam, K., & Richardson, R. M. (2009). Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3425-3432.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*, 6(3), 173-182.
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!. *Growth factors*, 23(1), 33-41.
- Vivanco-Hidalgo, R. M., Ribera, A., & Abilleira, S. (2019). Association of socioeconomic status with ischemic stroke survival. *Stroke*, 50(12), 3400-3407.
- Shin, K., Wang, Q., & Margolis, B. (2007). PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO reports*, 8(2), 158-164.

- Tennenberg, S. D., Fey, D. E., & Lieser, M. J. (1993). Oxidative priming of neutrophils by interferon- γ . *Journal of leukocyte biology*, 53(3), 301-308.
- Wu, Y., Wang, S., Farooq, S. M., Castelvete, M. P., Hou, Y., Gao, J. L., ... & Li, C. (2012). A chemokine receptor *CXCR2* macromolecular complex regulates neutrophil functions in inflammatory diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), 5744-5755.
- Zhang, X., Ding, L., & Sandford, A. J. (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC molecular biology*, 6(1), 1-7.
- Zhao, B. Q., Wang, S., Kim, H. Y., Storrie, H., Rosen, B. R., Mooney, D. J., ... & Lo, E. H. (2006). Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nature medicine*, 12(4), 441-445.