



**U SCIENCE TECH**  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
I TECNOLOGIA  
**UVIC-UCC**



TREBALL DE FI DE GRAU

***TERÀPIA AMB MACRÒFAGS BM-M2 I  
RAW-NGAL EN UNA OBSTRUCCIÓ  
URETRAL UNILATERAL***

MIREIA CODINA PEREA

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Directors: Dr JM Cruzado Garrit i Roser Guiteras Vila

Tutora: Montserrat Capellas Herms

Vic, Gener 2016

## **AGRAÏMENTS**

Al doctor Josep Maria Cruzado, director del treball de fi de grau, per deixar-me formar part del laboratori de nefrologia experimental i la confiança donada per portar a terme tot el projecte.

A la doctorant Roser Guiteras, directora adjunta del treball de fi de grau, per guiar-me durant tot el treball, donar-me suport, resoldre tots els dubtes que em sorgien a mesura que avançava en la investigació i explicar-me tot el funcionament del centre.

Al centre d'Investigació Biomèdica de Bellvitge i a la Universitat de Barcelona per cedir-me el material utilitzat i deixar-me utilitzar les instal·lacions.

A la Montserrat Capellas, tutora del treball de fi de grau, per orientar-me en la redacció del treball.

I finalment, a la meva família, sobretot als meus germans David i Raul per animar-me i ajudar-me moralment en tot el que he necessitat. En especial al Carles per aguantar els dies de més nervis i estrès.

Vic, Gener 2016

## ÍNDIX

<b>RESUM .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>5</b>
1.1 Els ronyons .....	5
1.1.1 Estructura del ronyó .....	5
1.1.2 La insuficiència renal .....	6
1.2 La Obstrucció Uretral Unilateral .....	7
1.2.1 Marcadors de dany renal .....	9
1.3 Els macròfags .....	10
1.3.1 Macròfags tipus II .....	12
1.3.2 Els macròfags RAW-NGAL .....	14
<b>2. OBJECTIUS I HIPÒTESI .....</b>	<b>16</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>17</b>
3.1 Realització de la Obstrucció Uretral Unilateral (UUO) .....	18
3.1.1 Validació del model .....	19
3.2 Preparació de la teràpia BM-M2 i RAW-NGAL .....	20
3.2.1 Extracció de moll d'os .....	20
3.2.2 El cultiu de macròfags tipus BM-M2.....	22
3.2.3 Preparació dels macròfags per ser injectats .....	24
3.3 La teràpia amb BM-M2 i RAW-NGAL .....	25
3.3.1 Marcatge amb <i>Vivotrack</i> .....	26
3.4 Sacrifici dels ratolins .....	27
3.5 Histologies .....	28
3.6 Extracció RNA .....	28
3.7 <i>Taq-Man</i> PCR .....	30
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>33</b>
4.1 Marcatge amb <i>Vivotrack</i> .....	33
4.2 Histologies .....	35
4.2.1 Hematoxilina-eosina .....	36
4.2.2 Fibronectina .....	38
4.2.3 Immunofluorescència .....	40
4.3 <i>Taq-Man</i> PCR .....	42
4.3.1 El marcador CD40.....	42
4.3.2 El marcador MCP-1 .....	43
4.3.3 El marcador MMP9 .....	44
4.3.4 El factor TGF- $\beta$ .....	45
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>47</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>49</b>

## **RESUM**

**Títol:** *Teràpia amb macròfags BM-M2 i RAW-NGAL en una Obstrucció Uretral Unilateral*

**Paraules clau:** Insuficiència renal, Obstrucció Uretral Unilateral, Macròfags, BM-M2, RAW-NGAL i reparació.

**Autora:** Mireia Codina Perea

**Tutors:** Dr. JM Cruzado Garrit (IDIBELL) Dra. Montserrat Capellas Herms (UVic-UCC)

**Data:** Gener de 2016

La insuficiència renal és una afectació que pateixen els ronyons quan no són capaços de desenvolupar les seves funcions principals. Un tipus de model per simular una insuficiència renal aguda és la Obstrucció Uretral Unilateral, aquesta obstrucció està caracteritzada per la fibrosis produïda, el dany tubular observat i l'infiltrat inflamatori intersticial. Com a possible teràpia es decideixen utilitzar els macròfags tipus II (BM-M2 i RAW-NGAL) ja que, estudis anteriors han revelat propietats reparatives dels teixits danyats.

Per poder confirmar el paper reparador d'aquests macròfags en el model seleccionat es realitza la obstrucció en ratolins de la soca C57BL6/J, aquests ratolins seran tractats amb els macròfags BM-M2 i RAW-NGAL. Abans de procedir amb la teràpia es comprovarà si aquest macròfags realment arriben al ronyó obstruït. S'analitzaran els resultats utilitzant tincions histològiques (Hematoxilina-eosina i fibronectina), immunofluorescència (F4/80 i CD206), i PCR quantitativa (CD40, MCP-1, MMP9 i TGF- $\beta$ ).

Els resultats obtinguts demostren de manera significativa que els macròfags tipus II actuen de manera beneficiosa disminuint el dany estructural i l'infiltrat inflamatori intersticial, essent més beneficiosos els RAW-NGAL que els BM-M2. L'expressió dels gens CD40, MCP-1, MMP9 i TGF- $\beta$  també corroboren el paper reparatiu d'aquests macròfags.

## **ABSTRACT**

**Title:** *BM-M2 and RAW-NGAL macrophages therapy on Unilateral Urethral Obstruction.*

**Key words:** Renal injury, Unilateral Urethral Obstruction, macrophages, BM-M2, RAW-NGAL and reparative properties.

**Author:** Mireia Codina Perea

**Tutors:** Dr. JM Cruzado Garrit (IDIBELL) Dra. Montserrat Capellas Herms (UVic-UCC)

**Date:** January 2016

Renal injury is an affection on kidneys when they are unable to carry out its main functions. One type of model to simulate an acute renal failure is the unilateral urethral obstruction, the obstruction is characterized by fibrosis, tubular damage and interstitial inflammatory infiltrate. As a possible therapy we decide to use Type II macrophages (BM-M2 and RAW-NGAL), previous studies have revealed reparative properties of damaged tissues.

To confirm the reparative role of these macrophages the selected model is made on C57BL6/J mice which ones are treated with BM-M2 and RAW-NGAL. Before proceeding with the therapy will check if these macrophages can reach the obstructed kidney. Results will be analysed using histological staining (haematoxylin -eosin and fibronectin), immunofluorescence (F4/80 and CD206) and quantitative PCR (CD40, MCP-1, MMP9 and TGF- $\beta$ ).

The results show that significantly Type II macrophages act beneficially decreasing structural damage and interstitial inflammatory infiltrate, being more beneficial RAW-NGAL than BM-M2. Expression of CD40, MCP -1 and TGF-  $\beta$  MMP9 also corroborate the reparative properties of these macrophages.

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Els ronyons

Els ronyons són dos òrgans presents en els animals vertebrats, que tenen les funcions de filtrar la sang de l'aparell circulatori i d'excretar, a través de l'orina, diversos residus metabòlics de l'organisme mitjançant d'un sistema complex que inclou mecanismes de filtració, absorció i excreció.

Els ronyons desenvolupen tres funcions regulatòries essencials per als vertebrats:

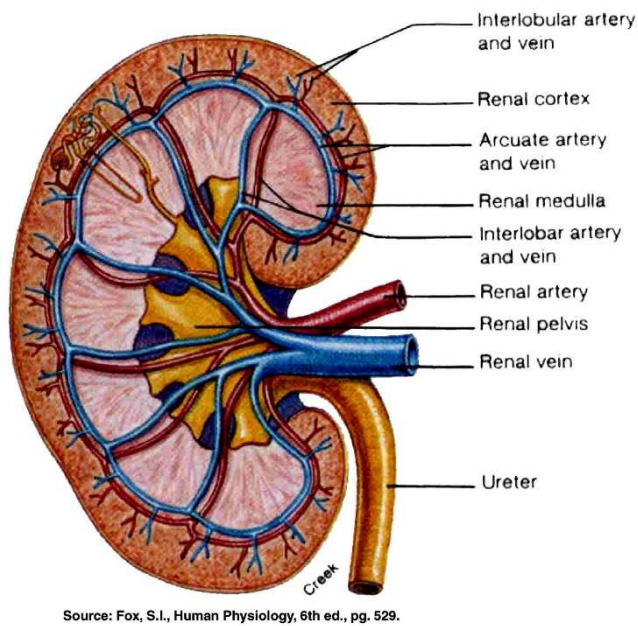
- Filtrar la sang i excretar productes no necessaris o tòxics del metabolisme com són la urea, la creatinina, etc.
- Regular l'ambient intern a través del manteniment de la balança electròlit i àcid base, coneguda amb el nom de homeòstasis.
- Funció endocrina, en sintetitzar metabòlits actius com la vitamina D i substàncies que actuen com a hormones que estimulen la producció de glòbuls vermells, regulen la pressió arterial i mineralitzen l'esquelet.

Els ronyons, igual que altres òrgans com són el fetge o els pulmons, comprenen les funcions principals de l'organisme (1).

#### 1.1.1 Estructura del Ronyó

Anatòmicament el ronyó és un òrgan de color vermellós amb forma de mongeta localitzat en el retroperitoneu en ambdós bandes de l'espina dorsal (Figura 1). En el pol superior de cada ronyó s'hi localitza la glàndula suprarenal. Tant la glàndula com el ronyó es troben recoberts per dues capes de greix, la *perirenal* i la *pararenal*. L'entrada i sortida

de vasos, nervis renals i urèters s'anomena *hil renal* i es situa a la meitat de la conca renal (1).



Source: Fox, S.I., Human Physiology, 6th ed., pg. 529.

Figura 1. Esquema de l'estructura bàsica d'un ronyó.

Des d'un punt de vista morfològic, es poden distingir tres estructures: la *càpsula de Bowman*, el *còrtex* i la *medulla*. El còrtex renal està constituït per diversos corpuscles renals i una complexa xarxa de túbuls que formen part de la nefrona, el qual permet observar el dany estructural en un tall histològic.

La filtració ocorre en petites unitats col·locades dintre dels ronyons anomenades *nefrones*. Cada ronyó té al voltant d'un milió de nefrones. A la nefrona, el glomèrul està envoltat per la càpsula de Bowman, que es continua amb un petit tub col·lector d'orina anomenat túbul. Es produeix un complicat intercanvi de substàncies químiques (glucosa, aminoàcids, fosfat, sodi, clor, potassi, calci, ions d'hidrogen, ions bicarbonat, i aigua) a mesura que es va filtrant la sang i surten les substàncies de rebuig (2).

### 1.1.2 La insuficiència renal

Una insuficiència renal és una condició mèdica en la qual els ronyons deixen de filtrar adequadament els productes de rebuig de la sang. Les dues formes principals són la insuficiència renal aguda, que sol ser reversible amb el tractament adequat i la insuficiència renal crònica, que sovint no és reversible. En ambdós casos, hi sol haver una causa subjacent (2).

La insuficiència renal es determina principalment per una disminució en la taxa de filtració glomerular, la velocitat a la qual la sang es filtra en el glomèrul del ronyó. Això és detectat per una disminució o absència de producció d'orina o de la determinació dels productes de rebuig (creatinina o urea) a la sang. Depenent de la causa, pot haver-

hi la presència d'hematúria (la pèrdua de sang en l'orina) i proteïnúria (la presència de proteïnes en l'orina).

En la insuficiència renal, pot haver-hi problemes de retenció de líquid en el cos (que condueix a edemes), augment dels nivells d'àcid úric, nivells elevats de potassi, disminució dels nivells de calci, augment dels nivells de fosfat, i en les etapes posteriors, anèmia. A llarg termini, els problemes de ronyó estan associats a un major risc cardiovascular (3).

Per a les persones que pateixen una insuficiència renal és indispensable restablir la funció del ronyó (4). Dues de les causes més freqüents de insuficiència renal són la hipertensió arterial i la diabetis, tot i que hi ha altres problemes de salut que també poden afectar-la com són alteracions en les artèries del ronyó, obstrucció del tracte urinari, debilitat immunològica i també degut a un factor hereditari (1,4).

Durant anys, la investigació s'ha centrat en l'estudi dels glomèruls, però actualment s'està donant molta importància a l'estudi del dany tubular i intersticial amb models de isquèmia/reperfusió, dany immunològic i nefrotoxines (5). Alguns científics creuen que la progressió de la insuficiència renal està més relacionada amb la fibrosis intersticial que no amb una patologia glomerular (6), per tant es decideix triar un model de dany renal que estigui associat amb la fibrosis com és la Obstrucció Uretral Unilateral (7).

## **1.2 La Obstrucció Uretral Unilateral**

La Obstrucció Uretral Unilateral (UUO), és un model de dany renal crònic utilitzat en ratolins el qual genera una fibrosis renal progressiva (uropatia obstructiva) (8). S'inicia amb una seqüència ràpida d'esdeveniments en el ronyó obstruït, reduint a les 24h la irrigació renal i la filtració glomerular. Passats diversos dies es produeixen hidronefrosi (presència de líquid en el ronyó), infiltrat inflamatori intersticial (macròfags) i mort cel·lular tubular deguda a l'apoptosi i necrosis. El grau d'infiltrat correlaciona la severitat del dany i la extensió de la fibrosis renal, establint una correlació molt fina entre la presència de macròfags i la fibrosis en malalties renals cròniques. La mort de les cèl·lules epitelials tubulars és causada per un seguit de factors estressants com són isquèmia, hipòxia, dany oxidatiu i deformació axial causada per la dilatació tubular. La fibrosis renal



sol tenir lloc quan el teixit normal es veu reemplaçat per matriu extracel·lular, aquest procés està associat amb el davallament de funció renal (9).

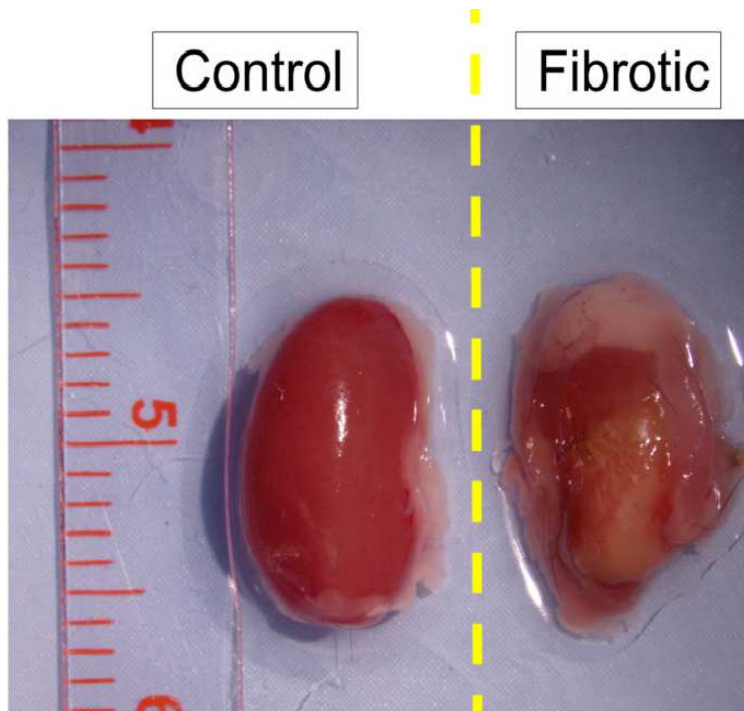


Figura 2. Ronyó sà envers un ronyó obstruït de ratolí. Font: adaptació de Birbrair et al. Stem Cell Research & Therapy 2014

Malgrat algunes limitacions, el model de UUU ha esdevingut un dels model *in vivo* més utilitzats, ja que desenvolupa els principals mecanismes patològics que tipifiquen totes les formes de malaltia renal crònica en un temps relativament curt (Taula 1) (10). Aquest model de uropatia revela biomarcadors útils pel

seguiment de la progressió de dany renal com són el CD40, el MCP1 i el TGF- $\beta$ . La MMP9 és una proteïna la qual no es té clar si desenvolupa un paper proinflamatori o pel contrari atenuador de la fibrosi. La UUU també és de gran utilitat per a l'estudi de noves teràpies, sobretot per poder evitar aquelles que necessiten d'una intervenció quirúrgica abans d'arribar a un dany renal irreversible (8).

Com a pas previ i essencial per a poder aplicar una possible teràpia en humans es necessiten realitzar experiments en models animals. En aquestes dues últimes dècades, el ratolí, ha estat un dels models més ben valorats en el camp de la nefrologia experimental degut al ampli coneixement del seu genoma, el gran nombre d'eines experimentals de les quals es disposa (com són antibiòtics i sondes) i la capacitat de manipular l'expressió gènica a través de l'enginyeria genètica que ens permet investigar la seva funció biològica (8,10).

**Taula 1.** Principals avantatges i inconvenients del model d'obstrucció uretral unilateral.

	<b>Avantatges</b>	<b>Inconvenients</b>
<b>Obstrucció Uretral Unilateral (UUO)</b>	Produeix una fibrosis ràpida i agressiva El dany no és reversible Procediment senzill Es pot treballar amb totes les soques de rates i ratolins	Les característiques de la malaltia no són molt similars a la majoria de malalties cròniques del ronyó No hi ha involucració dels glomèruls, només és tubular No s'obtenen dades de la funció renal

La primera fase de dany en la majoria de malalties renals està caracteritzada per l'associació d'aquest dany amb la mort cel·lular, un procés que està regulat per la producció intracel·lular d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (11). Es coneix que les cèl·lules progenitores i les cèl·lules mare presenten una major resistència a l'estrès oxidatiu degut a la mort cel·lular que no les cèl·lules ja diferenciades, aquesta resistència és un component important per a la capacitat regenerativa dels teixits (12). Aquest dany i la seva reparació comprenen una delicada balança entre la pèrdua de cèl·lules i la proliferació. També es troba relacionat amb l'acumulació intersticial de macròfags (13), on s'ha vist que les cèl·lules derivades de moll d'os poden contribuir en el reemplaçament de les cèl·lules epitelials tubulars a través d'un procés de fusió cel·lular (14).

### **1.2.1 Marcadors de dany renal**

Hi ha diverses citocines que s'utilitzen com a marcadors de dany renal, les utilitzades en aquest estudi són MCP-1, CD40, TGF- $\beta$  i MMP9. Aquestes citocines serveixen per comprovar l'eficiència de la teràpia a nivell molecular.

El MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) també es coneix amb el nom de CCL2, és una de les quimioquines clau que regula la migració i infiltració de monòcits i macròfags. Per tant, estarà relacionada amb l'infiltrat inflamatori intersticial. S'ha demostrat que tant el MCP-1 com el seu receptor indueixen i estan relacionats amb diverses malalties com són la psoriasis, l'artritis reumatoide i l'arteriosclerosi(15).

La MMP9 (*Metalloproteinase 9*) és una proteïnasa la qual s'ha vist que pot contribuir a l'atenuació de les lesions fibròtiques tot i que hi ha certa controvèrsia, alguns científics creuen que pot desenvolupar un paper profibròtic (16). En general la MMP9 s'ha vist que està involucrada en la degradació de la matriu extracel·lular en processos fisiològics normals, com ara el desenvolupament embrionari, la reproducció i la remodelació de teixits, així com en malalties, com l'artritis i la metàstasi. La majoria de les Metalloproteinases (MMP) són secretades com proteïnes inactives que s'activen quan s'escindeixen per proteïnases extracel·lulars. L'enzim codificat per aquest gen degrada col·làgens de tipus IV i V (17).

El TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) pertany a una família de citocines que connecten senyals multifuncionals, les quals regulen funcions crucials pel destí de les cèl·lules i el seu comportament en pràcticament tots els teixits del cos. En el sistema hematopoietic la senyalització de TGF- $\beta$  controla un ampli ventall de processos biològics, des de la homeòstasis del sistema immunològic fins a la quiescència (la cèl·lula es troba en la fase G<sub>0</sub>). És una molècula profibròtica i antiinflamatòria (18).

El CD40 és una proteïna coestimuladora que es troba present en les cèl·lules presentadores d'antigen, la qual és necessària per a la seva activació. El receptor de la proteïna codificada per aquest gen és membre de la superfamília de receptors de *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Aquest receptor és essencial en la mediació d'una àmplia varietat de respostes immunes i inflamatòries incloent el desenvolupament de les cèl·lules B de memòria, i la formació de centre germinal (19). El lligand de CD40 actua com a senyal secundària unint-se al receptor CD40 que es troba a la superfície cel·lular dels macròfags, al rebre aquesta senyal el macròfag expressa més CD40 activant la inducció de substàncies altament microbicides (com espècies reactives d'oxigen i òxid nítric) desencadenant la destrucció de l'agent patològic (20).

### **1.3 Els macròfags**

Els macròfags comprenen una població heterogènia de cèl·lules que formen part del sistema fagocitari mononuclear. Juguen un paper important en la homeòstasis tissular i també són potents reguladors de la immunitat, tot i això són altament reconeguts com

a contribuents en la patogènesis de la fibrosis renal. No obstant, es coneix que els macròfags intersticials i glomerulars poden jugar un paper beneficiós, reparatiu i remodelant de la matriu durant la reparació tissular. Són cèl·lules provinents del moll d'os, com la gran majoria de cèl·lules del sistema immunitari. El procés de formació i desenvolupament de cèl·lules sanguínies madures resultant de la supervivència, proliferació i diferenciació dels progenitors primaris s'anomena hematopoesis (12-14).

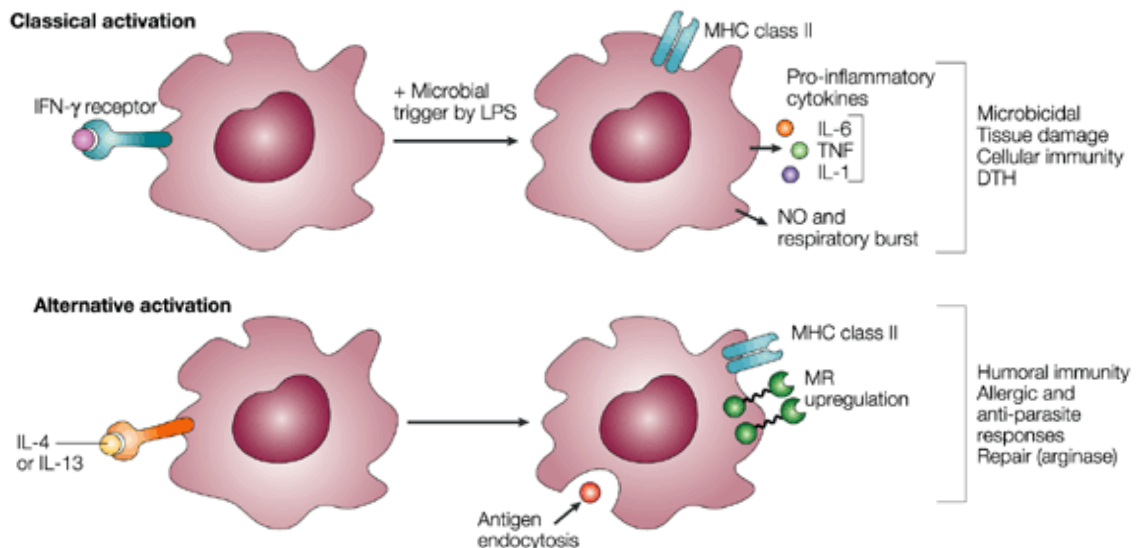
El desenvolupament del macròfag involucra la regulació de diversos factors de transcripció els quals regulen l'expressió d'un nombre de gens i el subsegüent establiment del seu fenotip. Els gens coneguts que determinen el fenotip del macròfag són aquells que codifiquen pel receptor de *Macrophage Colony-Stimulating Factor* o MCSF (essencial per la resposta a MCSF), lisozim, molècules d'adhesió CD11b i CD18, receptor de LPS, receptor INF- $\gamma$  i receptors per la regió constant de la IgG. Els macròfags residents també són identificats per l'expressió específica de F4/80 (13).

Quan els macròfags arriben al focus d'inflamació, o són reclutats a un lloc amb isquèmia, necrosis o apoptosi, deixen de proliferar i s'activen incrementant les seves funcions especialitzades. Pel contrari, en absència de cap estímul els macròfags moriran per apoptosi, establint així una balança en la producció dels seus precursors en el moll d'os i l'eliminació dels macròfags del teixit (16).

Tot i que molts estudis s'han focalitzat sempre en el paper pro-inflamatori i profibròtic dels macròfags en les malalties renals, d'altres s'han centrat en el seu paper reparador (9). S'ha demostrat que els macròfags presenten plasticitat i habilitat per fusionar-se amb ells mateixos o altres tipus cel·lulars, particularment en resposta a un estímul inflamatori. Els monòcits madurs i els macròfags inflamatoris s'ha vist que es transformen en elements vasculars incloent cèl·lules epitelials i miofibroblasts entre altres (21). El descobriment d'aquesta fusió cel·lular juntament amb la seva capacitat de secretar un gran nombre de citocines, quimioquines i factors de creixement obre les portes a enfocar-ho a possibles teràpies de dany tissular i anant més enllà, la possible regeneració d'òrgans (22).

### 1.3.1 Els macròfags tipus II

Des dels anys 60 s'ha entès com a activació clàssica de la immunitat el procés degut a la interacció del macròfag amb un estímul no dependent d'antigen, degut a la infecció d'un ratolí amb *Mycobacterium bovis* o *Listeria monocytogenes* (23). A partir d'aquí es va definir la via clàssica d'activació dels macròfags (macròfags tipus I) la qual depèn dels limfòcits T Helper activats tipus 1 ( $T_H1$ ), i de les Natural Killer (concretament de les interleucines 12 i 18, i de l'interferó gamma  $IFN-\gamma$ ), el senyal secundari és el lligand de CD40 que s'uneix al CD40 present a la superfície cel·lular del macròfag. Com a resultat, els macròfags expressen més receptors CD40 i TNF sobre la seva superfície que ajuda a augmentar el nivell d'activació. L'augment de l'activació dóna com a resultat la inducció de substàncies microbicides potents en el macròfag, incloent espècies reactives d'oxigen i òxid nítric, el que porta a la destrucció del microbi ingerit. L'activació menys coneguda és la alternativa, produïda per la presència de IL-13 i IL-4 en el microambient (24). La IL-13 i IL-4 indueixen el solapament de la superfície cel·lular i altres canvis fenotípics que són diferents d'aquells induïts per  $IFN-\gamma$  i per tant esdevenint un tipus de macròfag diferent, els macròfags tipus II (24) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema representatiu de l'activació clàssica i de l'activació alternativa dels macròfags. FONT: Nature reviews, *Alternative Activation Of Macrophages*.

Els macròfags tipus I (M1) promouen la presentació d'antigen, eliminació dels patògens i activació del sistema immunològic adaptatiu. Molts dels productes secretats pels

macròfags com el TNF- $\alpha$ , IL-13 i IL-6, augmenten el reclutament d'altres cèl·lules del sistema immune, majoritàriament neutròfils, cap al lloc de infecció o inflamació (24).

Els macròfags tipus II (M2) presenten un increment en l'expressió del receptor de manosa i MHC II, augment en la endocitosi i augment en l'expressió del receptor IL-1 i el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra). A més, la immersió de cèl·lules apoptòtiques provoca l'augment de factors de creixement, citocines antiinflamatòries i factors proangiogenics i remodelants de matriu. La captació de cèl·lules apoptòtiques activa als M2 per desenvolupar propietats antiinflamatòries, incrementant la producció de mediadors antiinflamatoris com el Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) i la prostaglandina E<sub>2</sub>, al mateix temps que disminueix l'expressió de IL-8, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Sota la presència de IL-4, IL-13 i IL-10 els M2 són estimulats per augmentar la producció de IL-10 (16).

El coneixement de la diversitat funcional d'aquests macròfags és el que pot oferir la possibilitat d'obtenir noves teràpies per pacients amb una malaltia renal crònica.

L'elevada producció de L-arginina per part dels macròfags provoca l'acumulació de prolines, glutamat i poliamines. Aquestes molècules s'han associat amb l'acceleració de la reparació tissular, la prolina al actuar com a precursor del col·lagen i les poliamines al estar relacionades amb la proliferació cel·lular (26). Els M1 juguen un paper clau en la fase inflamatòria estimulants diversos tipus cel·lulars i la producció de citocines i quimioquines. En la fase inflamatòria són els M2 els encarregats de reparar i remodelar eliminant les cèl·lules apoptòtiques i també per l'activació de l'expressió de citocines antiinflamatòries(27) . Existeixen diferents factors i interleucines que fan possible la polarització a M2, els utilitzats en aquest treball són el MCSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), la Interleucina 4 i la interleucina 13.

El MCSF és un factor de creixement involucrat en la proliferació i diferenciació de monòcits a macròfags i progenitors de cèl·lules de moll d'os (25). El MCSF afecta als macròfags i monòcits en diferents maneres, estimulants l'augment d'activitat fagocítica i quimiotàctica, i augmentant la citotoxicitat de cèl·lules tumorals (26).

La presència de IL-4 (interleucina 4) promou l'activació alternativa dels macròfags fent que aquests obtinguin fenotip M2 i inhibint també la via clàssica d'activació de macròfags M1. L'augment de macròfags reparadors (M2) està lligat amb la secreció de

IL-10 (interleucina anti-inflamatòries) i TGF- $\beta$  com a resultat de la disminució en la inflamació patològica que trobem en el teixit (en aquest cas en el ronyó) tractat amb macròfags M2. L'alliberament d'arginasa, prolina, poliaminases i TGF- $\beta$  per part dels M2 activats està relacionat amb la reparació de dany i fibrosis (27).

La IL-13 (interleucina 13) té efectes similars als de IL-4 però aquests són menys importants. Tot i això es creu que tendeix a ser un mediador central dels canvis fisiològics induïts per inflamació al·lèrgica en diversos teixits. La IL-13 indueix una classe d'enzims degradadors de proteïnes coneguts com a metaloproteases (MMPs) com a part d'un mecanisme de protecció contra una inflamació al·lèrgica excessiva (28).

### 1.3.2 Els macròfags RAW-NGAL

Les tècniques de diagnosi de la insuficiència renal sempre s'han centrat en la mesura de creatinina en sèrum o orina. La necessitat de trobar nous marcadors de insuficiència renal va portar a començar a estudiar la *Lipocalin-2* (Lcn2) o també anomenada *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) (29). La Lcn2 o NGAL és una proteïna encarregada de produir sideròfors. Els sideròfors són ions quelants de Fe<sup>3+</sup> que serveixen per disposar del ferro necessari per al desenvolupament, permeten formar complexos entre ells i el Fe<sup>3+</sup> per poder internalitzar-lo (29,30).

Els macròfags de tipus RAW-NGAL són macròfags de línia cel·lular RAW264.7 modificats genèticament per a l'expressió constitutiva de IL-10, la citoquina anti-inflamatòria per excel·lència, el qual provoca una contínua expressió de manera endògena de la *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (Lcn2/NGAL). De tal manera que s'assegura que els macròfags mantinguin els seu fenotip M2. Estudis previs han demostrat que la Lcn2/NGAL es troba sobre-regulat en les cèl·lules de l'epiteli tubular en la fase de reparació, desencadenant la proliferació cel·lular i la seva remodelació. Per tant, les cèl·lules RAW-NGAL estan modificades per expressar IL-10 i d'aquesta manera poder reparar el teixit danyat gràcies a l'acció de Lcn2/NGAL (17).

Aquestes cèl·lules són cedides per l'Hospital Clínic de Barcelona. Tenen la característica d'expressar Lcn2. S'utilitzen macròfags RAW 267.7 repartits en una densitat de 10<sup>6</sup> cèl·lules per pouet de placa de 6 forats, s'incuben amb LPS (Lipopolisacàrids 15 $\mu$ L/mL)

durant 24h per estimular la producció de Lcn2. Amb aquest estudi es va demostrar que el paper reparador de Lcn2 depèn de l'estat i expressió dels receptors de Lcn2. El Lcn2 és una proteïna involucrada en diversos processos apoptòtics i en la proliferació, en el ronyó es coneix que es produeix en llocs de dany i és capaç de remodelar el teixit danyat.

En aquest treball es decideixen provar dos tipus de macròfags M2 diferents, els que provenen directament de l'extracció de moll d'os d'un ratolí de la sota C57BL6/J (BM-M2) i els macròfags transfectats RAW-NGAL cedits per l'Hospital Clínic de Barcelona.



## 2 OBJECTIUS I HIPÒTESI

L'objectiu del projecte és comprovar *in vivo* l'efectivitat de les cèl·lules BM-M2 i RAW-NGAL com a possible teràpia en la Obstrucció Uretral Unilateral provocada en ratolins. Per a dur a terme l'objectiu del treball, primer s'ha de demostrar que els macròfags injectats arriben a l'òrgan afectat, i per tant que la possible millora del ronyó és gràcies a aquestes cèl·lules. Fins el present estudi no s'havien utilitzat mai els macròfags M2 per a tractar una Obstrucció Uretral Unilateral.

La hipòtesi del treball és que la teràpia utilitzant els macròfags BM-M2 i RAW-NGAL realment funciona i disminueix la inflamació i la fibrosis del ronyó obstruït, essent els macròfags RAW-NGAL més efectius que els BM-M2 degut a la modificació que presenten (17).

### 3 METODOLOGIA

La present investigació es divideix en diferents parts, les tècniques que es necessiten seguir per posar apunt la teràpia, l'aplicació de la teràpia i finalment totes aquelles tècniques a seguir per comprovar l'efectivitat d'aquesta.

En aquest estudi es treballa amb éssers vius, per tant s'ha de tenir en compte el nombre d'individus a utilitzar i s'ha d'intentar que els grups siguin el màxim de reduïts possibles però amb el nombre suficient per obtenir resultats comparables i significatius entre els grups comparats.

Abans de començar a aplicar la teràpia s'ha de demostrar que els macròfags, utilitzats com a teràpia, arriben a l'òrgan afectat. S'utilitza una metodologia de tinció *in vitro* per realitzar el seguiment del destí dels macròfags *in vivo* amb la sonda *Vivotrack 680*.

Les tècniques referents a la valoració de la teràpia consta de parts valorables qualitativa i quantitativament. És necessari assegurar-se que l'eficiència de les cèl·lules BM-M2 i RAW-NGAL no es troba condicionada per el mètode utilitzat. Per tant, es valorarà a través de diverses histologies (Hematoxilina-eosina, fibronectina i immunofluorescència per F4/80 i CD206) i utilitzant la tècnica molecular *Taq-Man* PCR.

S'han utilitzat un total de 48 ratolins C57BL6/J de 8 setmanes d'edat dels quals 43 són els utilitzats per obtenir resultats, la resta ha mort durant la intervenció o no s'han pogut obtenir resultats deguts a danys en la mostra. Aquests ratolins s'agruparan de la següent manera:

- *Wild type*: Són els ratolins utilitzats com a control sà, és a dir, no se'ls hi realitza la obstrucció al ronyó.
- UUU dia 9: Són els ratolins que presenten obstrucció sense teràpia i són sacrificats a les 48h post-teràpia (9 dies després de la intervenció).
- UUU dia 9 + BM-M2: Són els ratolins que presenten obstrucció amb teràpia de macròfags provinents de moll d'os i són sacrificats a les 48h post-teràpia (9 dies després de la intervenció).
- UUU dia 9 + RAW-NGAL: Són els ratolins que presenten obstrucció amb teràpia de macròfags provinents de moll d'os i són sacrificats a les 48h post-teràpia (9 dies després de la intervenció).

- UUU dia 15: Són els ratolins que presenten obstrucció sense teràpia i són sacrificats 9 dies post-teràpia (15 dies després de la intervenció).
- UUU dia 15 + BM-M2: Són els ratolins que presenten obstrucció amb teràpia de macròfags provinents de moll d'os i són sacrificats 9 dies post-teràpia (15 dies després de la intervenció).
- UUU dia 15 + RAW-NGAL: Són els ratolins que presenten obstrucció amb teràpia de macròfags provinents de moll d'os i són sacrificats als 9 dies post-teràpia (15 dies després de la intervenció).

Els sacrificis dels ratolins es realitzen a diferents dies per obtenir més resultats a ser comparats. Per realitzar la valoració del model de UUU es van utilitzar 2 ratolins per dia de sacrifici.

### **3.1 Realització de la Obstrucció Uretral Unilateral (UUU)**

Previ a la teràpia s'ha de provocar la UUU al ratolí, la qual consisteix en la operació quirúrgica de l'animal per poder obstruir un dels dos ronyons. En aquest experiment s'ha decidit realitzar en tots els ratolins en el ronyó esquerra, ja que és el que té un accés més fàcil al trobar-se desplaçat més cap a la part abdominal. Lògicament només es pot realitzar la obstrucció en un dels dos ronyons per evitar la mort a causa d'una disfunció renal.

Per a la intervenció, s'anestesia el ratolí de 8 setmanes a través de la inhalació d'isofluorà (de la marca *Forane*), que es duu a terme amb la màquina anestèsica veterinària Harvard. Primer es deixa el ratolí en una caixa de vidre completament tancada per la qual hi entra l'isofluorà 5% i oxigen 5 l/min contínuament i es deixa a dins fins que es quedi adormit. Quan està adormit es treu de la caixa i es posa en el suport calefactat utilitzat per a les intervencions, s'ha de mantenir anestesiats amb un petit tub al morro (alliberant isofluorà 2,5% i oxigen 2 l/min) mentre duri la operació ja que sinó es despertaria a mitja intervenció.

Per operar primer s'ha d'assegurar que l'animal està anestesiats i ja es pot començar amb la obertura abdominal. Primer s'ha d'obrir la capa de pell realitzant un tall per la línia alba abdominal fins a la cavitat toràcica, després es procedeix a obrir de la mateixa

manera la capa de múscul. Quan l'animal ja està obert es localitza el ronyó esquerre, es busca l'urèter corresponent i es lliga amb un fil de sutura de 0,4mm de diàmetre.

Feta la obstrucció es pot procedir a la sutura del ratolí, la qual es realitzarà de manera inversa a la obertura, és a dir, es comença a tancar el múscul per baix i llavors la capa d'epiteli per dalt. Finalitzada la sutura es pot despertar l'animal traient el tub anestèsic del morro i parant la màquina anestèsica.

Les UOO en aquest estudi es realitzen en grups de 6 animals, d'aquesta manera s'eviten possibles errors en la intervenció com a conseqüència del cansament de l'investigador.

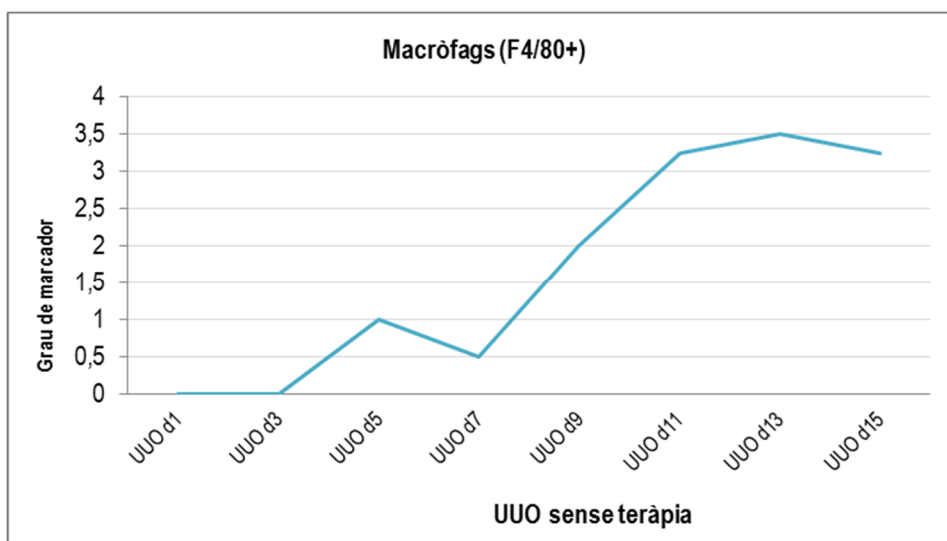
### **3.1.1 Validació del model**

Per poder valorar l'efecte de la teràpia i també l'efecte del model en el ronyó, primer de tot s'ha de validar el model.

Aquesta validació consta de la realització de UOO en ratolins els quals seran sacrificats a diferents dies després d'haver estat operats. Es sacrificaran ratolins a dies 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15. Llavors es valoraran els danys a cada un dels dies per després poder tenir un referent en quan al dany que presenta el ronyó (a nivell histològic i molecular), i d'aquesta manera es podrà determinar si el dany després de la teràpia realment disminueix o pel contrari no presenta cap efecte notable.

Per determinar l'infiltrat del ronyó en els dies esmentats anteriorment es va realitzar una immunofluorescència utilitzant un fluorocrom contra el marcador F4/80. És una glicoproteïna de la superfície cel·lular que s'expressa en alts nivells en els macròfags. Per tant es pot definir el progrés de l'infiltrat inflamatori intersticial en aquest tipus de model i d'aquesta manera determinar el dia més idoni per a aplicar la teràpia (Figura 4). La mesura del dany pren valors entre 0 i 4 (essent 0 el mínim i 4 el màxim observat) els quals provenen de determinar el percentatge de tinció amb F4/80 en un tall histològic del ronyó amb UOO i sacrifici a dies 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 post-intervenció.

En el moment en el què es comença a veure un augment important d'infiltrat és a dia 7. Per tant, aquest és el dia escollit per a aplicar la teràpia degut a aquest augment de macròfags intersticials.



**Figura 4.** Valoració semi-quantitativa del infiltrat de macròfags observat en el ronyó amb el microscopi confocal.

### 3.2 Preparació de la teràpia BM-M2 i RAW-NGAL

Com s'ha observat anteriorment la teràpia s'aplicarà passats 7 dies de la obstrucció del ronyó esquerre. Per tant s'haurà de coordinar la UJO amb el cultiu dels macròfags per poder tenir la teràpia apunt tenint en compte que el cultiu de BM-M2 dura 9 dies.

En aquest apartat s'explica com es preparen les cèl·lules BM-M2 per poder ser injectades a l'animal. Les cèl·lules RAW-NGAL són cedides per l'Hospital Clínic de Barcelona.

#### 3.2.1 Extracció de monòcits del moll d'os

L'extracció de moll d'os serveix per obtenir els BM-M2 utilitzats com a teràpia. Primer s'ha d'extreure el moll d'os d'un ratolí de la mateixa soca i aïllar els monòcits a ser cultivats.

S'utilitza un ratolí de soca C57BL6/J d'aproximadament 8 setmanes d'edat i es sacrifica per sobreinhalació de l'anestèsic isofluorà ja que és una manera ràpida i indolora. Es realitza l'extracció del fèmur i tibia de les potes anteriors. Es retira tot el múscul possible de manera que els ossos quedin el més nets possible i es col·loquen ràpidament dins un

falcon amb medi sense FBS (Fetal Bovine Serum) el qual s'ha de mantenir en gel fins a la seva utilització.

Es prepara medi DMEM amb 10%FBS + 1% antibiòtics (Penicil·lina/Estreptomicina) i es posa en una placa de Petri (s'utilitza el mateix medi que es necessitarà per al posterior cultiu). S'agafen els ossos amb unes pinces i amb l'ajuda d'una gassa es treu tot el múscul restant fins que quedi el màxim de net possible per poder visualitzar i agafar bé l'os. S'injecta el medi amb l'ajuda d'una xeringa de manera i es recull el moll d'os per l'altra banda en una nova placa de Petri. Aquesta operació es repeteix contínuament fins a recuperar tot el moll d'os, és a dir, fins que la tibia o fèmur quedin de color blanquinós.

Una vegada feta l'extracció, el contingut de la placa de petri es fa passar per un filtre de 70µm on el filtrat és recollit en un falcon de 50mL. Aquesta part es realitza per tal d'eliminar restes que no interessin. Es centrifuga el falcon durant 5min a 1500rpm i es resuspèn el pellet molt suaument amb 500µL de PBS (Phosphate Buffered Saline).

Es realitza el recompte de les cèl·lules obtingudes de moll d'os fent la següent dilució: 10µL de cèl·lules + 90µL de PBS + 100µL blau de tripà en un pou d'una placa d'Elisa (utilitzada únicament per realitzar la dilució per recompte). S'afegeixen 10µL d'aquesta barreja en una cambra Neubauer i es compten de cèl·lules en el microscopi invertit:

$$\frac{n^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules 1} + n^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules 2}}{2} \cdot 10^4 \cdot 0,5 \cdot 20 = n^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules de moll d'os}$$

\*Aquesta equació serveix sempre que s'utilitzin les quantitats que s'ha indicat anteriorment.  $10^4$  és el factor de dilució de la cambra Neubauer; 0,5 són els µL amb els quals s'han resuspès les cèl·lules i 20 es el factor de dilució de la tinció amb blau de tripà.

A partir del moll d'os obtingut anteriorment s'han de cultivar els monòcits per a posteriorment polaritzar-los a macròfags tipus 2. Per a realitzar-ho, es segueix el protocol del *EasySep Negative Selection Mouse Monocyte Enrichment Kit* de *Stemcell technologies*. Aquest un kit de selecció negativa que consisteix en un còctel d'anticossos contra no monòcits, els quals estan units a unes partícules magnètiques que permetran la separació gràcies a l'acció d'un imant.

Es segueix el protocol que indiquen els fabricants tenint en compte el volum cel·lular de moll d'os obtingut (generalment utilitzem 500µL). S'afegeixen 25µL de sèrum per

bloquejar els llocs d'unió no específics i 25µL de *Monocyte Enrichment Cocktail* (un còctel per enriquir els monòcits), aquesta suspensió cel·lular es deixa 15min a la nevera. Passats els minuts indicats s'afegeix el medi recomanat per fer un rentat de les cèl·lules i seguidament s'han de centrifugar a 300g durant 10min. Es resuspèn el pellet amb el medi recomanat, s'afegeix el *EasySep Biotin Selection Cocktail* (barreja d'anticossos contra tots els tipus cel·lulars de moll d'os menys els monòcits) i s'incuba a la nevera durant 15min. Llavors s'addicionen les *EasySep D Magnetic Particles* incubant-ho tot a la nevera durant 10min, aquestes partícules magnètiques s'uneixen als anticossos que es troben presents en el *Biotin Selection Cocktail*. Finalment es posa el tub a l'imant i es deixa que actuï durant 5min, aquest captarà totes les partícules magnètiques deixant en el tub els monòcits separats de la resta de cèl·lules que es troben en el moll d'os, ja que no hi havia cap anticòs contra aquest tipus cel·lular.

En aquesta ocasió també s'ha de procedir al recompte de monòcits obtinguts al final del procés. Comptatge de monòcits obtinguts després del Kit: 10µL de monòcits + 90µL de PBS + 100µL blau de tripà. S'agafen 10µL d'aquesta barreja i s'afageixen a la cambra Neubauer.

$$\frac{n^{\circ} \text{ monòcits } 1 + n^{\circ} \text{ monòcits } 2}{2} \cdot 10^4 \cdot 0,5 \cdot 20 = n^{\circ} \text{ monòcits extrets}$$

\*Aquesta equació serveix sempre que s'utilitzin les quantitats que s'ha indicat anteriorment. 10<sup>4</sup> és el factor de dilució de la cambra; 0,5 són els µL amb els quals s'han resuspès les cèl·lules i 20 es el factor de dilució de la tinció amb blau de tripà.

### 3.2.2 El cultiu de macròfags tipus BM-M2

Una vegada obtinguts els monòcits s'han de cultivar i polaritzar en macròfags de fenotip M2, és a dir, aconseguir gràcies a l'acció de la IL-4, IL-13 i MCSF que els macròfags presentin fenotip M2 i així obtenir els BM-M2 utilitzats en la teràpia. S'ha de preparar un medi capaç de realitzar aquesta polarització. Com s'ha comentat anteriorment s'ha de tenir en compte que el cultiu de macròfags és d'una duració de 10 dies ja que es convenient evitar els passatges cel·lulars, és a dir, haver d'aixecar les cèl·lules i cultivar-les en una altra flascó (Figura 5).

El medi utilitzat és el DMEM suplementat amb un 10% de FBS i un 1% d'Antibiòtics (penicil·lina/estreptomicina). Per a cada flascó de 75cm<sup>2</sup> utilitzem 10mL de medi complementats amb 20ng/mL de MCSF, 10ng/mL de IL-13 i 10ng/mL de IL-4; les interleucines s'afegeixen a dia 7 després de l'inici del cultiu. El cultiu es manté a 5% de CO<sub>2</sub> i a 37°C.

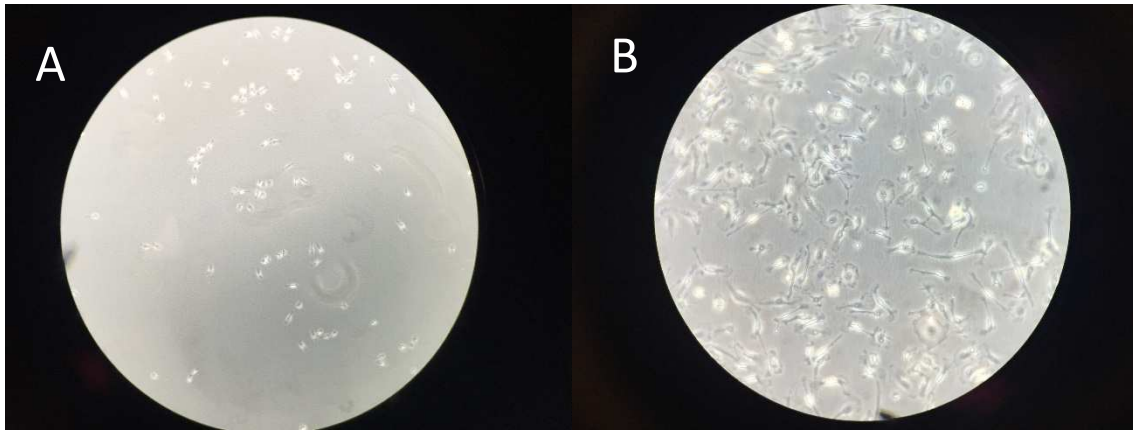
Quan el medi està complementat amb el factor estimulador MCSF (factor de creixement que transforma els monòcits en macròfags) s'afegeixen els µL necessaris de suspensió cel·lular de monòcits, obtinguts després del kit, per tenir aproximadament 250.000 cèl·lules per flascó. Durant els 10 dies es va realitzant un control diari del seu creixement, si s'observa que el medi està molt consumit o que hi ha molta mort cel·lular es renova. La renovació del medi sol ser cada 2 dies.



**Figura 5.** Flascos de 75cm<sup>2</sup> amb cultiu de monòcits en medi DMEM suplementat amb el factor MCSF.

També s'han de tenir en compte el nombre de flascos necessaris segons la quantitat de macròfags a ser injectats depenent del nombre d'animals a tractar. S'ha de tenir present que es necessiten 1M de cèl·lules per a cada ratolí. En un flascó de 250.000 monòcits se'n poden obtenir aproximadament 600.000. No és un nombre molt elevat, això es degut a la fragilitat d'aquestes cèl·lules al realitzar els passos d'aixecament i de centrifuga que dóna una mortalitat elevada.





**Figura 6.** Fotografia presa en un microscopi invertit a 20X. A) Monòcits a dia 0. B) Macròfags a dia 8.

En aquest punt seria indicat comprovar que tots els macròfags presentin el fenotip M2, per això s'hauria de realitzar una citometria utilitzant el marcador CD206 específic de M2 i el CD86 específic de M1; i així obtenir la eficiència en la polarització. No obstant, no es tenen dades per presentar-les en aquest treball.

### **3.2.3 Preparació dels macròfags BM-M2 per ser injectats**

Passats els 10 dies del cultiu es poden recollir i preparar els BM-M2 per injectar-los en els ratolins amb UUO.

En els flascons on es troben els macròfags en cultiu, abans de continuar, es realitza un control de qualitat a nivell microscòpic per comprovar que les cèl·lules estiguin vives i amb la morfologia corresponents

Per obtenir els macròfags en suspensió primer es retira el medi del flascó, s'afegeixen 5mL de PBS a temperatura ambient per netejar les cèl·lules i es torna a retirar, és millor fer-ho dues vegades per netejar-les bé de medi. S'afegeixen 3mL de PBS i amb l'ajuda d'un *scraper*, es rasca suaument la superfície del flascó per tal d'aixecar les cèl·lules mecànicament. S'ha de fer seguint aquest mecanisme ja que el cultiu de BM-M2 és molt delicat i si s'utilitza tripsina s'obtidria una mortalitat de cèl·lules molt més elevada.

Es recull el PBS amb les cèl·lules aixecades i es guarden en un falcon reposat en gel, mantenir-lo així serveix per evitar que els macròfags M2 virin de fenotip abans de ser injectats. Una vegada aixecades totes les cèl·lules de cada un dels flascons, es centrifuga el falcon o falcons obtinguts durant 5min a 1500rpm i es resuspèn el pellet suaument amb 500µL de PBS.

Quan es tenen les cèl·lules amb el PBS s'ha de procedir al recompte al microscopi invertit: 10µL de macròfags + 90µL de PBS + 100µL blau de tripà. S'afegeixen 10µL de la barreja en una cambra Neubauer.

$$\frac{n^{\circ} \text{ macròfags } 1 + n^{\circ} \text{ macròfags } 2}{2} \cdot 10^4 \cdot 0,5 \cdot 20 = n^{\circ} \text{ macròfags extrets}$$

\*Aquesta equació serveix sempre que s'utilitzin les quantitats que s'ha indicat anteriorment. 10<sup>4</sup> és el factor de dilució de la cambra; 0,5 són els µL amb els quals s'han resuspès les cèl·lules i 20 es el factor de dilució de la tinció amb blau de tripà.

### 3.3 La teràpia BM-M2 i RAW-NGAL

A partir del nombre de macròfags extrets s'haurà de calcular els microlitres necessaris que s'han d'infectar tenint en compte que es necessiten 1M de macròfags per animal i que s'ha d'injectar un volum màxim de 250µL (indicacions del veterinari responsable de l'estabulari seguint la normativa). Les cèl·lules seran injectades en suspensió cel·lular amb un xeringa d'insulina per via intravenosa, i en ratolins la manera més senzilla i menys estressant és a través de la vena caudal. Si la vena no es visualitza bé, una solució ràpida i pràctica és posar la cua del ratolí en remull amb aigua calenta (que no cremi), de manera que les venes es dilatin i es visualitzin millor.

És recomanable començar a injectar per la vena central, però si es complica i no s'injecta de manera continua, es procedeix a injectar per les venes laterals. La manera correcta de realitzar la intervenció és començant a punxar per la part de l'extrem final de la cua i pujar si s'observa que no s'injecta directament a la vena.

Es segueix el mateix procés en BM-M2 i RAW-NGAL.

La teràpia s'aplicarà en grups de 6 animals ja que ha d'anar coordinada amb la realització de les UUU, planificant al detall quin dia s'ha de operar preparar el cultiu i injectar les cèl·lules per seguir les pautes temporals marcades.

### **3.3.1 Marcatge amb sonda *Vivotrack***

Per comprovar que els macròfags utilitzats en la teràpia realment arriben al ronyó obstruït, s'utilitza el marcatge *in vitro* dels macròfags amb la sonda *Vivotrack 680* que permetrà la seva visualització i seguiment *in vivo*.

El *Vivotrack 680* és un agent soluble en aigua que marca els macròfags en la franja del vermell llunyà. Els fabricants no revelen com s'uneix aquesta sonda als macròfags (33).

Es tria aquest mètode ja que permet marcar les cèl·lules de manera que no afectin a la funció cel·lular i perquè es pugui fer un seguiment d'aquestes cèl·lules *in vivo* a una longitud d'ona de 680nm. La sonda es proporciona liofilitzada en un vial (0,2mg) i s'ha de resuspendre amb 1,3mL de PBS, obtenint una concentració de 153,8 µg/mL.

Abans de començar amb el marcatge dels macròfags es titularà la sonda per tal de determinar la concentració de sonda *Vivotrack* que proporcioni una menor mort cel·lular. A partir de concentracions del 30, 50, 80 i 100% es valora la intensitat de fluorescència i la mortalitat cel·lular a partir de citometria. Amb els resultats obtinguts es determina que la concentració adequada de treball és la del 30%.

En aquest experiment s'utilitzen 3 ratolins, un *wild type* sense operació ni teràpia, un amb UUU sense teràpia i un amb UUU i teràpia BM-M2. D'aquesta manera s'utilitzen com a control per a poder restar l'autofluorescència del propi animal.

Un cop s'ha determinat la concentració adient de sonda (30%) es procedeix amb el marcatge. Els macròfags són recol·lectats tal i com s'ha explicat en el punt 3.2.3.

El marcatge amb *Vivotrack* ha de ser v/v de suspensió cel·lular en PBS i sonda, tenint en compte que el percentatge de sonda escollit és del 30% (una concentració de 46,14 µg/mL). Es barregen suaument la sonda i la suspensió amb la pipeta, es centrifuga durant 5min a 1200rpm i es renta amb PBS + 1% FBS (aquesta operació s'ha de repetir 3

vegades). Finalment es renta amb PBS sol i es centrifuga 5min a 1200rpm, es resuspèn el pellet amb 250µL PBS (només s'injecta un sol animal).

Al estar treballant amb un agent fluorescent, és important tenir en compte que durant el marcatge s'ha de treballar amb el màxim de foscor possible, embolicant el tub de la mostra amb paper de plata.

A les 24 i 48h es fa una fotografia amb la màquina IVIS LUMINA (s'utilitza per llegir la fluorescència *in vivo*). S'anestesia els ratolins i es posen dins la cambra. El programa de la màquina quantifica la fluorescència despresa. A les 48h, després de fer la segona fotografia, l'animal serà sacrificat i se li extrauran el fetge, melsa ronyó contralateral i ronyó obstruït per poder quantificar la fluorescència present en cada un d'ells.

### **3.4 Sacrifici dels ratolins**

Aplicada la teràpia els animals hauran de ser sacrificats per poder observar l'efecte de la teràpia a nivell molecular i histològic. El sacrifici es du a terme en diferents temps. Uns ratolins seran sacrificats 48h post-teràpia i la resta 8 dies post-teràpia de manera que es poden comparar dos escenaris diferents.

Per sacrificar l'animal, primer s'anestesia (de la mateixa manera que es realitzava en la operació) i es realitza una punció intracardíaca extraient tota la sang que sigui possible mentre el cor encara batega. Aquesta sang es guarda en un microtainer (el qual conté anticoagulant i permet obtenir el sèrum) tot i que no serveix per a realitzar un anàlisis de creatinina ja que en aquest model un dels dos ronyons funciona correctament.

Es guarden la melsa i fetge en criovials, els quals són immediatament desats en nitrogen líquid per tal d'evitar que es degradin. S'extreuen el ronyó dret i el ronyó esquerre. Es tallen en 3 làmines transversals el màxim de primes possible i es posen una en PS i una altra en bloc OCT (serveix per congelar els teixits en nitrogen líquid formant un bloc). La resta del ronyó es posa en un criovial i es guarda immediatament en nitrogen líquid per assegurar la màxima conservació.

### **3.5 Histologies**

A partir de les làmines de ronyó guardades en PS i conservades en parafina es realitzen tincions histològiques i una immunofluorescència les quals serveixen per determinar el dany renal i la eficiència de la teràpia a nivell microscòpic.

Una de les tincions histològiques que es porta a terme és la hematoxilina-eosina. Aquesta tinció serveix per a determinar l'atrofia tubular i l'infiltrat inflamatori a nivell microscòpic. S'utilitza una escala de valoració semi-quantitativa que pren valors de 0 a 4, essent 4 el màxim dany estructural observat en la validació del model.

L'altra tinció que es realitza és la tinció de la fibronectina, la qual ens serveix per avaluar el grau de fibrosis intersticial. Igual que en la tinció anterior, es procedeix a una valoració semi-quantitativa prenent valors entre 0 i 4, essent 4 el màxim de fibrosi observat i 0 el mínim.

Finalment, la immunofluorescència consisteix en utilitzar dos anticossos diferents, un dirigit a F4/80 (com s'ha comentat anteriorment una glicoproteïna altament expressada en macròfags) i el CD206 (receptor de mannanosa expressat en els M2) (31,32). El F4/80 es valora semi-quantitativament amb valors entre 0 i 4 essent 4 el màxim, pel contrari el CD206 es valora de manera quantitativa per cada mostra observada.

En totes les histologies es comparen les teràpies (BM-M2 i RAW-NGAL) respecte la UOO sense teràpia utilitzada per validar el model, tant els sacrificats a dia 9 com els sacrificats a dia 15.

### **3.6 Extracció RNA del ronyó**

S'extreu el RNA ja que interessa conèixer els gens que s'expressen en el ronyó en el moment en què és sacrificat l'animal. Aquesta extracció és necessària per poder determinar l'efectivitat de la teràpia amb BM-M2 i RAW-NGAL a nivell molecular. Aporta dades sobre l'expressió dels marcadors de dany comentats amb anterioritat, de manera que serveix per establir el grau de dany i comprovar si la teràpia és eficient a nivell molecular. És important tenir en compte que s'ha de treballar amb rapidesa i de manera asèptica.

Primer es preparen els tubs necessaris segons les mostres que es tenen. En aquests tubs s'hi addiciona 1ml de *Trizol* per mantenir la integritat del RNA (per tant es treballarà sempre sota campana i en gel). Cal preparar també un tub falcon amb aigua *miliQ* i inhibidor de RNAsa que neteja el molinet amb el que es tritura cada mostra de ronyó per evitar la contaminació entre mostres.

La obtenció del RNA en si consta de dues parts: la separació del teixit i la extracció del RNA.

- SEPARACIÓ: Es talla un fragment de teixit renal d'uns 50-100mg aproximadament vigilant que no es descongeli, s'afegeix en el tub que conté 1 ml de *Trizol*, seguidament s'homogeneïtza bé la mostra amb l'ajuda del molinet (s'ha d'assegurar que a la reixeta del molinet no hi queda cap fragment de mostra sense triturar). Finalitzada aquesta part es realitza una centrífuga de 10' a 12000g i a 4°C, es recupera el sobrenedant s'afegeixen 200µl de cloroform (pel trencament cel·lular, es separa la fase orgànica i la fase aquosa), s'agita tot fort i es centrifuga 15' a 12000g a 4°C. Passada la centrífuga es recupera la fase aquosa (és la que conté el RNA) vigilant de no tocar l'altra fase que és la que conté el *Trizol*, lípids i proteïnes. Finalment s'afegeix un v/v d'etanol 70% i es barreja invertint el tub.
- EXTRACCIÓ: (Seguint el protocol del kit d'extracció de RNA de *Ambion*). Es transfereixen com a màxim 700µl a la columna i es centrifuga 15'' a 12000g descartant el *flow through* (repetir aquesta operació si hi ha més de 700µl de mostra), seguidament s'afegeixen 700µl de *buffer I* a la columna i es centrifuga 15'' a 12000g, es descarta el *flow through*. S'afegeix a la columna 500µl de *buffer II* es centrifuga 15'' a 12000g i es descarta el *flow through* (es repeteix el rentat amb *buffer II* una altra vegada). Els fabricants no revelen la composició dels *buffers*.

Finalment la columna es col·loca en un tub nou i s'afegeixen 30µl de *RNAsa free water* la qual ens serveix per eluir el RNA que queda retingut a la columna i finalment, es centrifuga 2' a 12000g recollint el *flow through* ja que és el que conté el RNA.

El RNA obtingut es llegeix al *Nanodrop* per determinar-ne la concentració (ng/mL) i la puresa (ratio absorbància 260/280), d'aquesta manera s'assegura que no estigui contaminat per *Trizol* ni que hi hagin altres possibles contaminants.

### 3.7 Taq-Man PCR

A partir del RNA obtingut dels ronyons, s'ha d'obtenir el cDNA corresponent per poder mesurar el nivell d'expressió dels marcadors corresponents mitjançant la transcripció reversa. S'igualen inicialment les concentracions de RNA afegint aigua RNAsa free en les mostres que siguin necessàries per a obtenir una concentració final de 400ng en 10µl.

**Taula 2.** Quantitats que necessitem dels components per a realitzar la transcripció reversa. Les quantitats indicades són per una mostra, s'haurà de multiplicar el volum de cada component per el nombre de mostres utilitzades.

KIT	x1 (µl)
10xRT Buffer	2
25xdNTP Mix	0,8
10XRT Random primers	2
Multiscribe RT	1
Rnase Inhibitor	1
H2O free	3,2
<b>Total</b>	<b>10</b>

Es barregen els 10µl de RNA (que són una barreja de RNA i aigua preparada amb anterioritat) que presenten una concentració de 400ng amb els 10µl del kit de reacció que resulta de barrejar les quantitats corresponents (Taula 2). Es posen tots els *eppendroff* amb les mostres en el termociclador programant el cicle corresponent (programa nº 53), el qual consisteix en 30-40 cicles de tres etapes cada un: 1 minut a 94°C, 45 segons a 54°C i 2 minuts a 72°C.

Quan s'ha obtingut el cDNA, es pot procedir a la preparació de les mostres per a la *Taq-Man* PCR. S'utilitzen diferents marcadors de dany renal per a comprovar l'eficiència de la teràpia a nivell molecular, MCP1, MMP9, TGF- $\beta$  i CD40 (Taula 3).

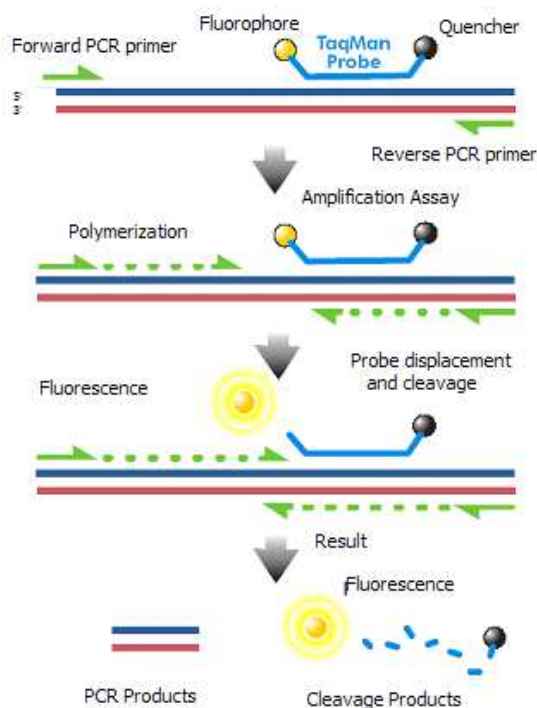
**Taula 3.** Quantitats en  $\mu\text{L}$  que necessitem per a portar a terme la PCR taq-man. S'utilitzen marcadors de dany renal.

Marcador	( $\mu\text{L}$ )
<b>SONDA</b>	1
<b>MMIX</b>	10
<b>CDNA</b>	1
<b>H2O</b>	8

El 18S s'utilitza com a control per comprovar que la amplificació es realitza correctament, ja que al ser un gen constitutiu s'expressa en totes les cèl·lules.

Cada marcador a analitzar correspon a una sonda. Per tant, es necessitaran tantes sondes com marcadors de dany es vulguin analitzar.

Per a la realització de la RT-qPCR s'utilitza una placa de 384 pous i de cada mostra es fan



triplicats per a obtenir una mitjana. A cada pou s'afegeixen 11 $\mu\text{L}$  de barreja de sonda i mmix; i 9 $\mu\text{L}$  de la barreja de cDNA amb H2O DNAsa/RNAsa free, obtenint un volum total de 20 $\mu\text{L}$ .

La PCR quantitativa es basa en, l'activitat exonucleasa 5'  $\rightarrow$  3' de la polimerasa *Taq* per unir la sonda amb la seqüència diana complementària i la detecció basada en el fluoròfor unit a aquesta sonda, on cada senyal de fluorescència serà comptabilitzat obtenint els nivells d'expressió d'aquell gen (Figura 7).

**Figura 7.** Esquema del funcionament de la PCR quantitativa (*Taq-Man*).



El posterior anàlisi dels resultats es porta a terme utilitzant el programa *Expression Suite* i les dades obtingudes es valoren amb el test estadístic Mann-Whitney, un prova no paramètrica que compara les mitjanes de cada UO amb la corresponent teràpia, el resultat és significativament diferent quan el p valor és inferior o igual a 0,05.

## 4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 Marcatge amb *Vivotrack*

El marcatge amb la sonda *Vivotrack* permet confirmar que els BM-M2 arriben a la Zona abdominal del ratolí (Figura 8). En la imatge s'observen 3 ratolins, el primer és el control sà (wild type), el segon ratolí presenta uropatia (agafat com a referència) i el tercer presenta uropatia però és tractat amb BM-M2.. Els que no han estat injectats presenten una fluorescència baixa, pel contrari en el ratolí injectat s'observa una fluorescència elevada,  $3,244 \cdot 10^8$ .

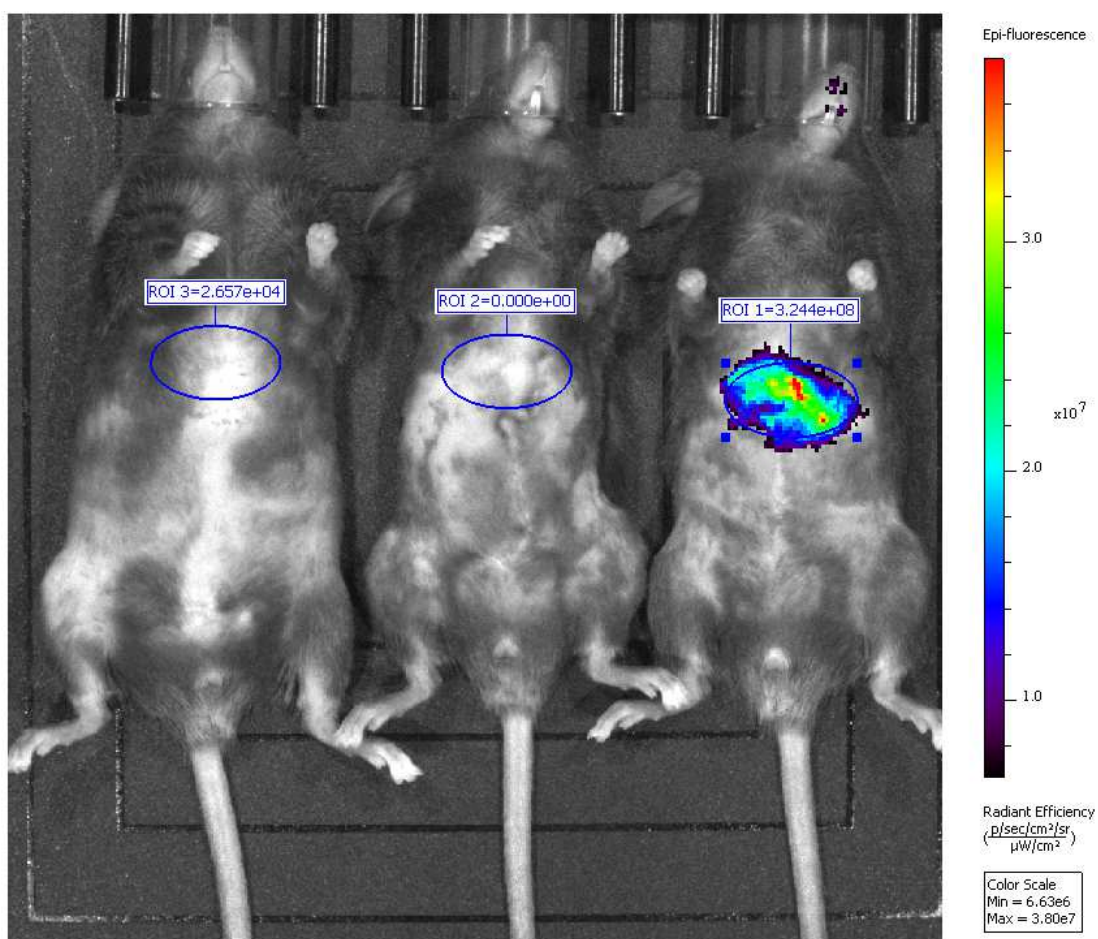
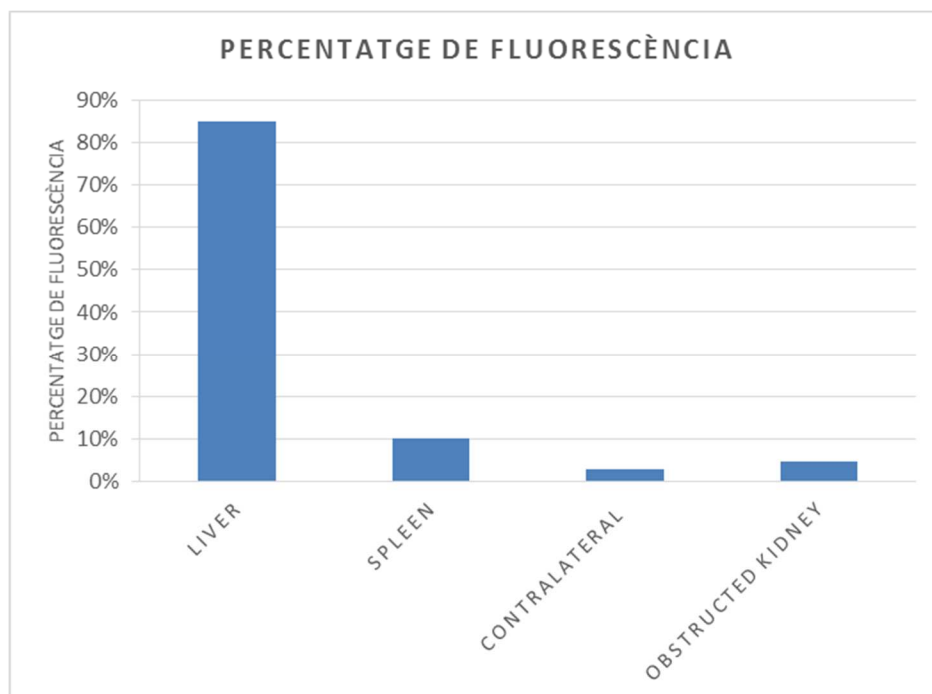


Figura 8. Fotografia amb IVIS LUMINA presa a les 24h després de la injecció dels macròfags marcats amb *Vivotrack*.

No obstant s'ha d'assegurar que els macròfags arribin al ronyó obstruït. Per això, es sacrifica l'animal a les 48h i es realitza la fotografia dels òrgans per determinar-ne la fluorescència. Es mesura el marcatge fluorescent en el fetge, melsa, ronyó contralateral

i ronyó obstruït, es comparen els ronyons amb altres òrgans ja que la injecció es realitza per via intravenosa i per tant els macròfags no estan dirigits a l'òrgan afectat (Figura 5).

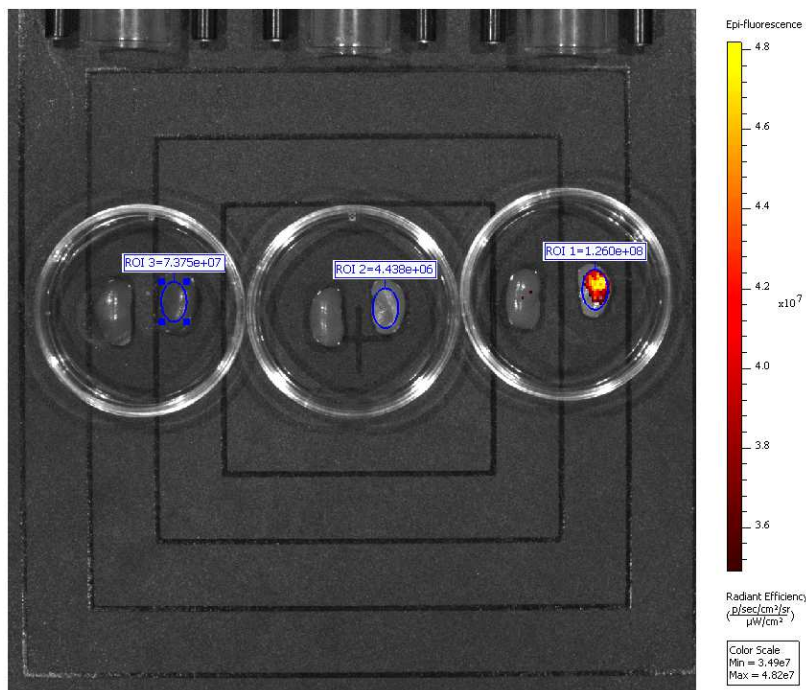


**Figura 9.** Percentatge de fluorescència a 680nm, determinada amb el programa de l'IVIS LUMINA, en 4 òrgans diferents; fetge, melsa, ronyó contra lateral i ronyó obstruït.

Es pot veure com el fetge reté la majoria dels macròfags infiltrats presentant el 85% de fluorescència total observada en l'animal. Pel contrari en el ronyó contra lateral (no obstruït) s'observa només una fluorescència del 2'8% i en l'obstruït 4'6% (Figura 9). Es comparen els ronyons contra laterals amb els ronyons drets de cada animal. En el ronyó obstruït amb teràpia s'observa una fluorescència de  $1,260 \cdot 10^8$ , més elevada que en el ronyó wild type i que en el obstruït (Figura 10).

Primer de tot es pot afirmar que els BM-M2 injectats per via intravenosa arriben al ronyó obstruït, aquest és un pas important ja que tot el treball realitzat es basa en l'efecte d'aquestes cèl·lules en un model de UUO. Tot i això, s'observa que la majoria de macròfags injectats queden retinguts al fetge (Figura 9). Aquest resultat és lògic ja que, al ser injectats a la vena caudal, entren en circulació en el torrent sanguini arribant abans al fetge, òrgan filtrador, i per tant quedaran retinguts gran part d'aquests BM-M2 marcats amb *Vivotrack*.

No obstant, al ronyó obstruït s'ha demostrat que, en menor nombre que el fetge, però també hi arriben els BM-M2 (Figura 10). També es mostra que el percentatge de fluorescència a 680nm en el ronyó contralateral és inferior a al del ronyó obstruït (Figura 9). La primera placa és el control sà (wild type), la segona presenta uropatia i la tercera presenta uropatia però el ratolí és tractat amb BM-M2. Els ronyons de l'esquerra són els contra laterals i els de la dreta els obstruïts. Aquest fet podria ser degut a que en el ronyó obstruït es genera un microambient que fa que els macròfags regeneratius siguin atrets, però per poder demostrar-ho caldria un estudi extens de les citocines presents en aquest microambient concret que actua com a atraient dels BM-M2.



**Figura 10.** Fotografia amb IVIS LUMINA presa a les 48h després de la injecció dels macròfags marcats amb *Vivotrack*.

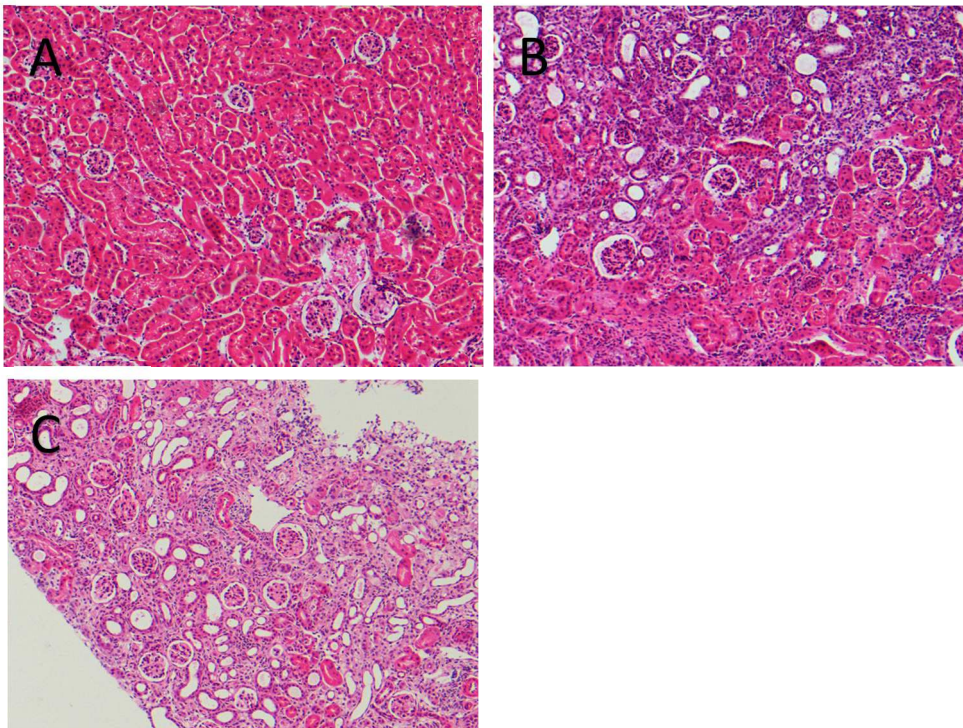
#### 4.1 Histologies

A partir de les histologies dels animals tractats es pot determinar a nivell estructural l'eficiència de la teràpia en comparació amb les fotos preses durant la validació del model. Tenint en compte que s'han de comparar les imatges dels ratolins sacrificats

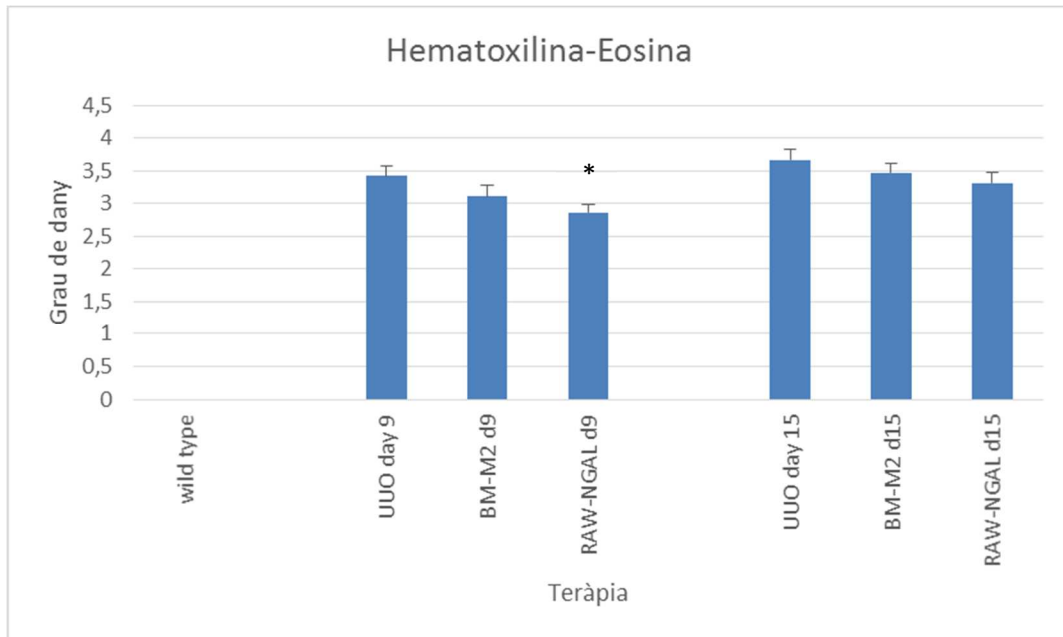
s'utilitzaran els controls amb UUO sacrificats a dies 9 i 15 (Figura 7) per comparar amb aquells tractats amb BM-M2 i RAW-NGAL (Figura 9).

#### 4.2.1 Hematoxilina-Eosina

En un control sà, el còrtex del ronyó presenta una estructuració tubular estable, és a dir, no s'observen túbuls dilatats en la mostra. En blau es mostren els nuclis de les cèl·lules i en rosat el citoplasma cel·lular mostrant la morfologia renal (glomèruls i túbuls). Els glomèruls s'observen esfèrics mantenint l'estructura del corpuscle renal i no s'observa presència d'infiltrat intersticial (Figura 11A). Pel contrari en un ronyó amb uropatia es pot veure com l'estructura es desordena creant les dilatacions, els glomèruls en general es mantenen en la seva forma però en alguns no es manté el corpuscle renal (Figura 11B i C). També es pot veure com el ronyó a dia 9 i a dia 15 presenta infiltrat a causa de la UUO, en canvi, el ronyó sà no presenta aquest infiltrat. L'infiltrat és la part on s'observen gran quantitat de nuclis desfent la estructura tubular del ronyó. Com més dies passen més infiltrat i més dany tubular presenta el còrtex del ronyó obstruït (Figura 11C).



**Figura 11.** Tinció amb hematoxilina-eosina de un tall histològic de ronyó a 10X del còrtex renal en un microscopi convencional. A) Control sà, tall histològic de un ronyó sense uropatia obstructiva. B) Ronyó amb obstrucció de 9 dies. C) ronyó amb obstrucció de 15 dies.



**Figura 12.** Resultats de la valoració semiquantitativa de les mostres amb fibronectina; UUO, UUO+BM-M2 i UUO + RAW-NGAL separant a dies 9 i 15. El wild type és el control sense UUO.

Es pot observar una tendència a reduir el dany estructural tan amb els BM-M2 com amb els RAW-NGAL tot i que els macròfags RAW-NGAL sacrificats a dia 9 presenten un valor de  $2,86 \pm 0,12$ ; essent l'únic valor significatiu amb un p valor de 0,02 comparat amb el valor de la UUO dia 9, que és el valor a comparar amb cada una de les dues teràpies (Figura 12). Els altres valors encara que no presentin significació si que indiquen certa tendència a reduir el dany estructural i l'infiltrat inflamatori intersticial. S'observa que el dany a dia 15 és més intens que a dia 9, es comparen els dos dies de sacrifici per separat. El wild type és el control, el qual en totes les ocasions és menor a les UUO.

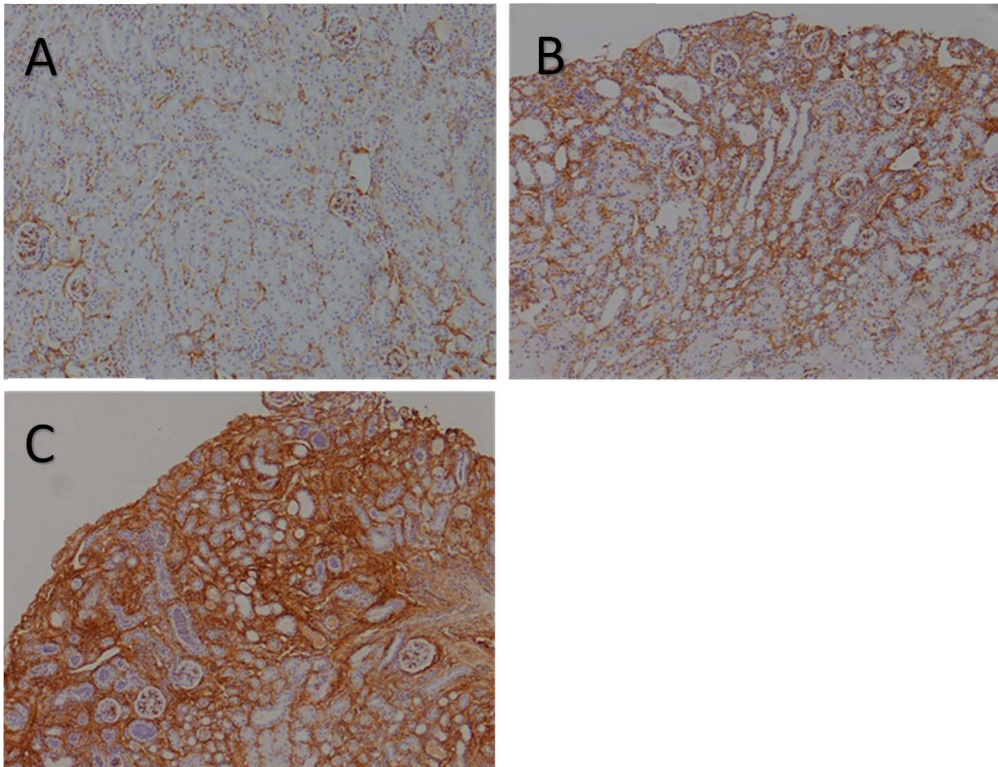
El dany estructural mesurat semi quantitativament a través de la tinció hematoxilina-eosina és més intens en la UUO a mesura que avancen els dies, la qual cosa és coherent ja que la Obstrucció Uretral Unilateral és una afectació tubular, és a dir, s'observa dany estructural en els túbuls presents en el còrtex. A part del dany tubular, també es pot observar com el grau d'infiltrat inflamatori intersticial augmenta de la mateixa manera que ho fa el dany tubular (Figura 12). Aquest resultat concorda amb el dany provocat per la Obstrucció Uretral Unilateral, la qual promou el la mort cel·lular tubular en el còrtex i augmenta l'infiltrat inflamatori intersticial. No obstant, en la teràpia amb RAW-NGAL en els animals sacrificats a dia 9, s'observa una reducció significativa del dany renal

indicant que la teràpia amb aquest tipus de macròfags és efectiva. En la resta de grups, el resultat obtingut no és significatiu però segueix una tendència a reduir el dany estructural. Aquesta significació a dia 9 i no a dia 15 es creu és deguda a la polarització dels M2 a proinflamatoris, aquest canvi es possible que esdevingui pel tipus de microambient hostil trobat en el ronyó obstruït que al mateix temps que els recluta els polaritza a M1.

#### **4.2.2 Fibronectina**

Una altra tinció que serveix per valorar el dany renal és la fibronectina, glicoproteïna present a la matriu extracel·lular. La fibronectina exerceix una funció crucial en la curació de ferides, es diposita en el teixit lesionat formant una capa protectora. A mesura que repara teixit lesionat, fibroblasts i macròfags comencen a remodelar la zona danyada, substituint la capa protectora per cèl·lules similars a les que es troben presents en el teixit normal (34,35).

Com més fibronectina s'observa, més dany presentarà el ronyó ja que mesura el grau de fibrosi. En marró es veuen les fibres de fibronectina i en blau els nuclis cel·lulars. En un ronyó sà (Figura 13A) s'hi observa fibronectina però en quantitats baixes. A mesura que avancen els dies s'observa com la fibronectina intersticial augmenta de manera visible (Figura 13B i 13C).

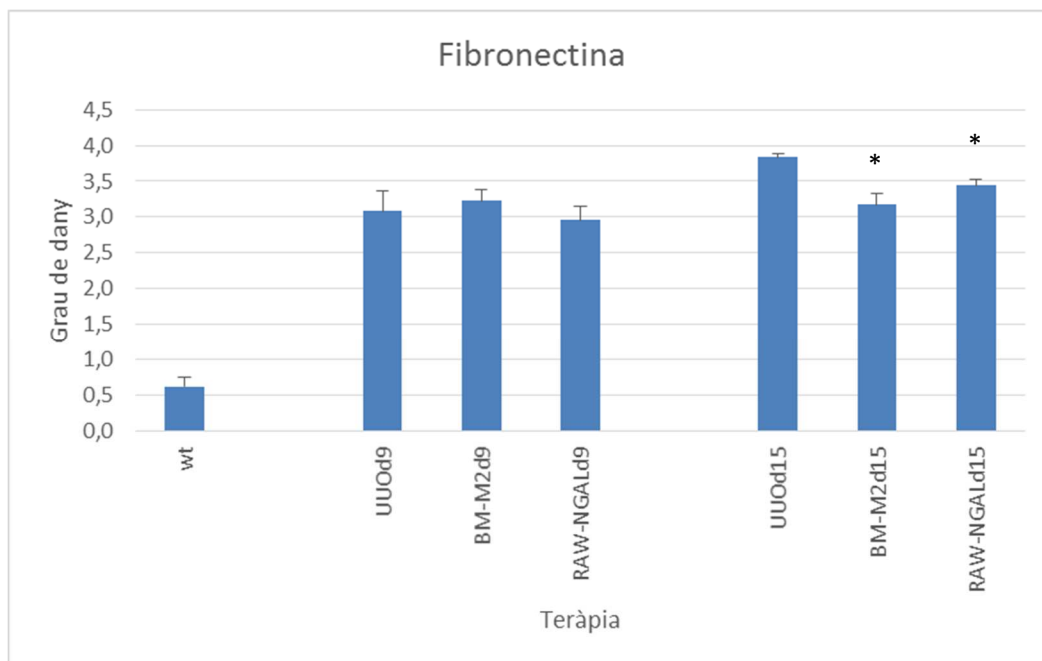


**Figura 13.** Tinció de fibronectina de un tall histològic de ronyó a 10X del còrtex renal. A) Control sà, tall histològic de un ronyó sense uropatia obstructiva. B) ronyó amb obstrucció de 9 dies. C) ronyó amb obstrucció de 15 dies.

En la tinció de la fibronectina els resultats no són tan clars com en la de hematoxilina-eosina. No obstant, s'obtenen resultats significatius en les dues teràpies a dia 15; per BM-M2 el valor de dany és de  $3,17 \pm 0,05$  i un p valor de 0,02. Per RAW-NGAL és  $3,44 \pm 0,09$  amb un p valor de 0,009 (Figura 14). En aquesta ocasió s'observa un millor resultat en la teràpia amb BM-M2.

Als sacrificis a dia 9 post-intervenció no es veuen resultats significatius. A part, la teràpia amb BM-M2 no té efectes beneficiosos ja que sembla augmentar el grau de dany en comparació amb la UUO sense teràpia.





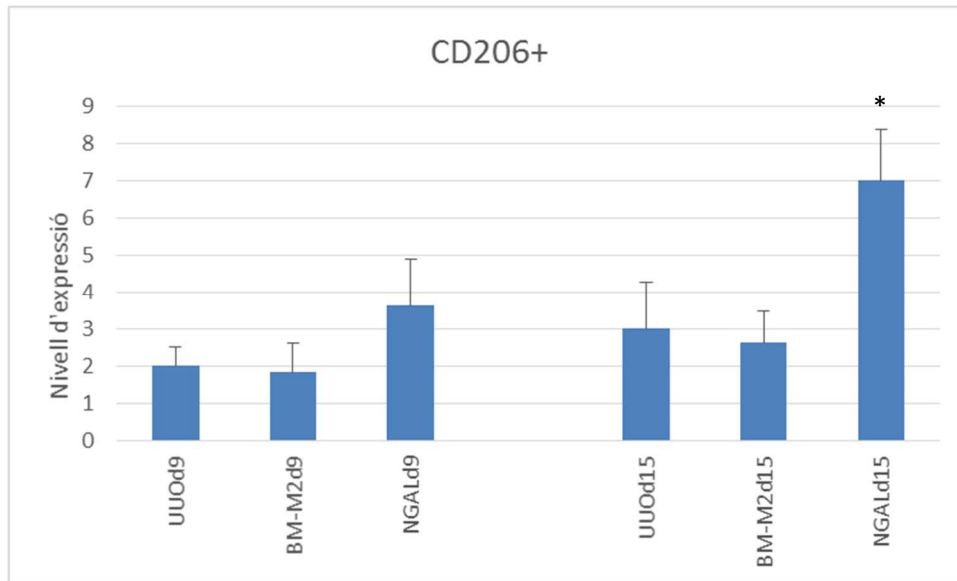
**Figura 14.** Resultats de la valoració semiquantitativa de les mostres amb hematoxilina-eosina; UUO, UUO+BM-M2 i UUO + RAW-NGAL separan a dies 9 i 15.

Referent a la fibrosi observada es demostra una millora en els ronyons obstruïts tractats amb BM-M2 i amb RAW-NGAL. S'ha de tenir en compte que es treballa amb models *in vivo* i es troben afectats per molts factors que no es poden controlar com per exemple el seu metabolisme.

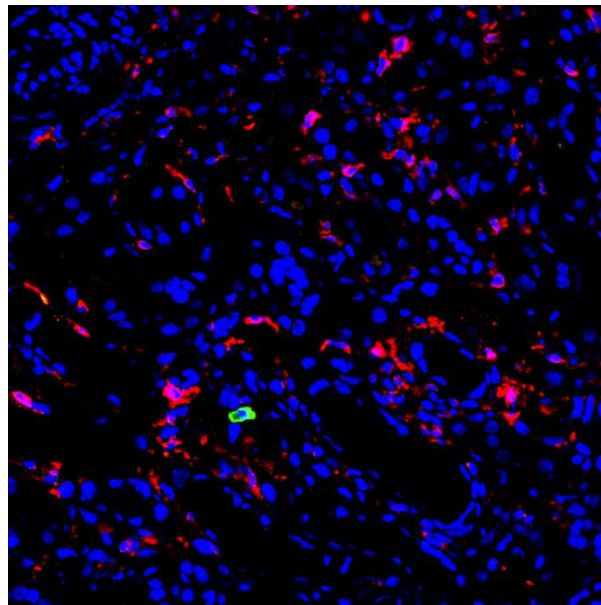
#### 4.2.3 Immunofluorescència (F4/80 i CD206)

Amb la immunofluorescència es pot determinar si els M2 (BM-M2 i RAW-NGAL) es troben presents en la mostra. Es realitza el recompte de macròfags M2 en cada mostra, és a dir, el recompte dels macròfags que presenten CD206 (marcatge de color verd). Els resultats obtinguts indiquen que el nombre de macròfags en els animals tractats amb RAW-NGAL i sacrificats a dia 15 augmenta significativament amb un p valor de 0,03.

En blau es mostren els nuclis cel·lulars, en vermell es poden veure els macròfags en general ja que es un marcador que es troba present tant en els M1 com en els M2 i en verd en canvi només es poden veure els M2 ja que el marcador CD206 es troba únicament en aquest tipus cel·lular (32)(Figura 16). Per tant, es pot afirmar que els macròfags tipus II es troben en el ronyó obstruït.



**Figura 15.** Valoració quantitativa de M2 presents en un pla d'imatge a 20x del ronyó.



**Figura 16.** Immunofluorescència en vermell el marcador F4/80 i en verd el CD206. Imatge presa amb microscopi confocal. Mostra amb UUO + RAW-NGAL sacrificat a dia 15.

Tot i això, amb aquest resultat no es pot determinar si els macròfags són endògens o exògens

## **4.2 Taq-Man PCR**

En aquest apartat s'expliquen els resultats obtinguts de l'amplificació del DNA dels marcadors moleculars a analitzar, és a dir, s'obtenen els nivells d'expressió de cada gen en les diferents situacions estudiades.

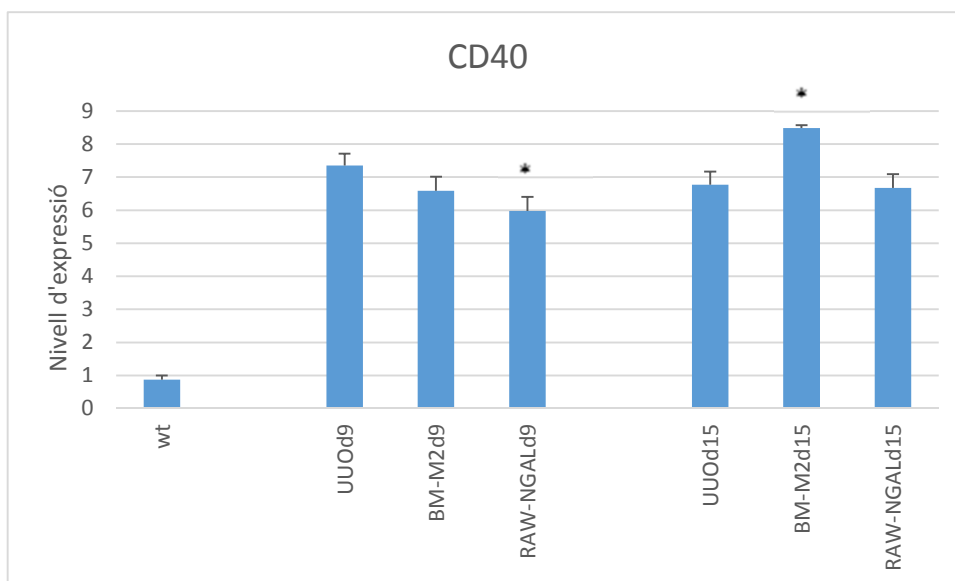
### **4.3.1 El marcador CD40**

A mesura que augmenta el dany augmenta l'expressió d'aquest biomarcador. El CD40 és una molècula coestimuladora que es troba present en les cèl·lules presentadores d'antigen, aquestes cèl·lules responen als estímuls del teixit danyat reclutant macròfags del tipus 1 i per tant donant una resposta inflamatòria (24).

El marcador CD40 es troba expressat en nivells baixos en el control sà. Pel contrari al provocar la obstrucció augmenten més de 6 vegades els nivells d'expressió d'aquest gen. En els ratolins sacrificats a dia 9 s'observen resultats significatius en la teràpia amb RAW-NGAL amb un resultat de  $5,98 \pm 0,42$  respecte al control sà i un p valor de 0,04 comparant amb la UUO. Els BM-M2, encara que el resultat no sigui significatiu, es pot veure una disminució en l'expressió de CD40 creant una tendència (Figura 17).

En els sacrificats a dia 15 els resultats són diferents, els BM-M2 presenten un nivell d'expressió de  $8,48 \pm 0,09$  respecte al control sà i un p valor de 0,005. Aquest valor d'expressió és més elevat que la UUO sense teràpia. Referent a la teràpia amb RAW-NGAL el nivell d'expressió és molt similar al de la UUO dia 15 amb un p valor de 0,77 i per tant sense significació (Figura 17). Aquesta expressió es veu reduïda utilitzant les dues teràpies. Tot i això, a dia 15 en els BM-M2 es pot observar com augmenta l'expressió de CD40.

Les diferències observades a dies 9 i 15 són degudes a una possible polarització dels macròfags. Aquests es poden tornar pro-inflamatoris, sobretot els BM-M2 al no portar la modificació genètica NGAL (Lcn2).



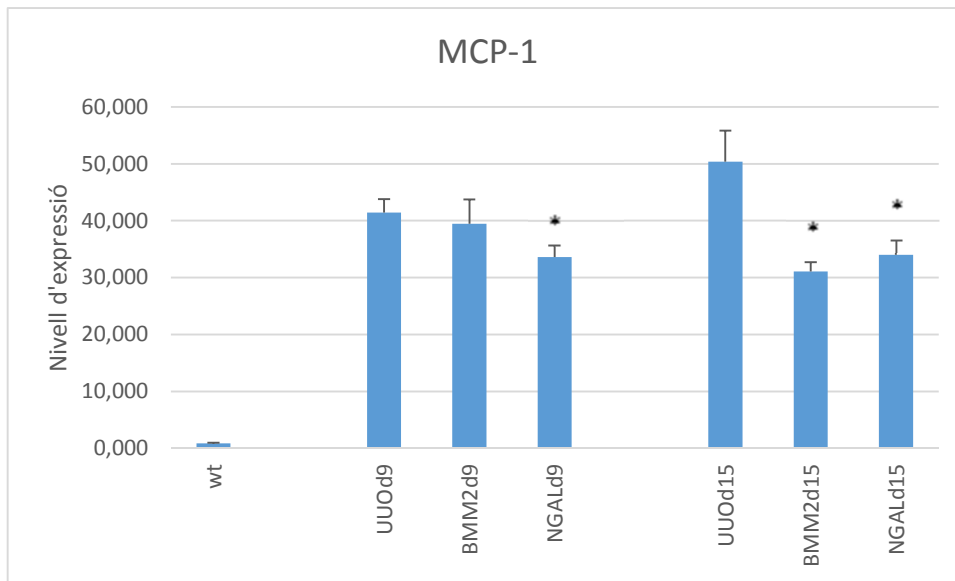
**Figura 17.** Representació gràfica dels nivells d'expressió de CD40 respecte al control sà (wt).

En un dany com és la UUO és lògic que es reclutin macròfags al lloc de dany, al presentar-se aquests macròfags els nivells d'expressió de CD40 augmenten ja que l'expressen de manera constitutiva. Per tant, es pot determinar que la teràpia és efectiva ja que disminueixen els nivells d'expressió respecte al control amb UUO, indicant que el dany ha disminuït i no hi ha necessitat de reclutar més cèl·lules del sistema immunitari.

#### 4.3.2 El marcador MCP-1

En els resultats dels nivells d'expressió de MCP-1 en les diverses situacions tractades, es pot observar que a dia 9 s'obté significació en el grup tractat amb RAW-NGAL disminuint l'expressió a  $33,59 \pm 2,19$  amb un p valor de 0,03. En els sacrificis a dia 15 s'obtenen resultats significatius en les dues teràpies, disminuint en els nivells d'expressió respecte a la UUO. El nivell d'expressió en BM-M2 pren el valor de  $31,08 \pm 1,64$  amb un p valor de 0,01; en RAW-NGAL pren el valor de  $34 \pm 2,61$  amb un p valor de 0,02 (Figura 18). Aquests nivells d'expressió, com es pot observar, són més baixos en els ratolins tractats amb BM-M2.

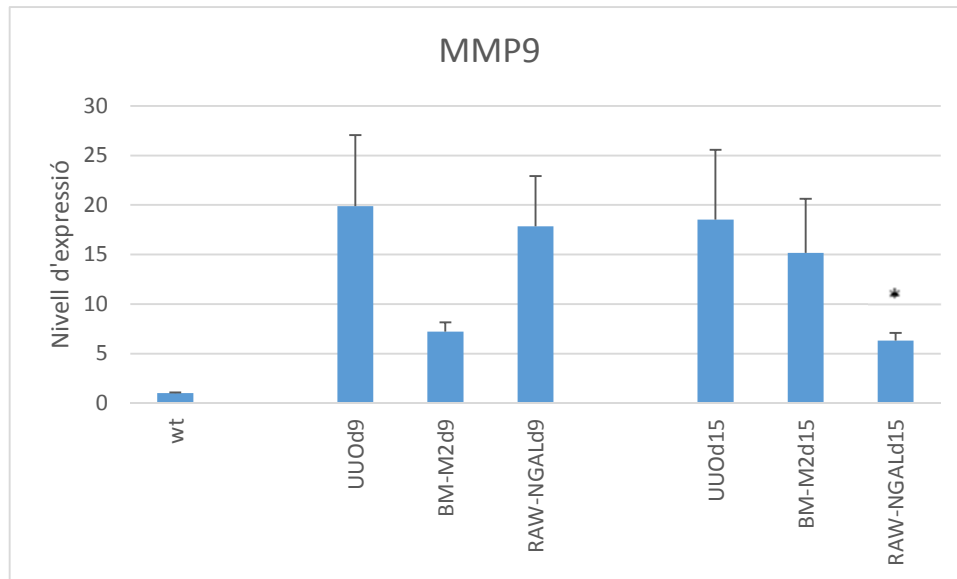
Amb aquests resultats es pot confirmar que els macròfags tipus II són efectius reduint l'infiltrat inflamatori intersticial, i per tant essent efectius reduint el dany provocat per la obstrucció de l'urèter.



**Figura 18.** Representació gràfica dels nivells d'expressió de MCP1 respecte al control sà (wt).

### 4.3.3 El marcador MMP9

L'expressió de MMP9 en els ratolins sacrificats a dia 9 no segueix cap patró concret. En la UUO sense teràpia es pot veure una expressió de  $19,9 \pm 7,14$ ; l'error estàndard és molt elevat. En la teràpia amb BM-M2 el nivell baixa però no de manera significativa, amb un valor de  $7,22 \pm 0,95$  i un p valor de 0,2. Pel contrari en la teràpia amb RAW-NGAL s'observa una expressió similar a la UUO, amb un valor de  $17,84 \pm 5,08$  i p valor de 0,9 (Figura 19). No obstant, en els animals sacrificats a dia 15, es pot observar un patró en els nivells d'expressió de MMP9. La teràpia amb RAW-NGAL presenta una diferència significativa respecte al control de UUO, amb un valor de  $6,33 \pm 0,77$  i un p valor de 0,05.

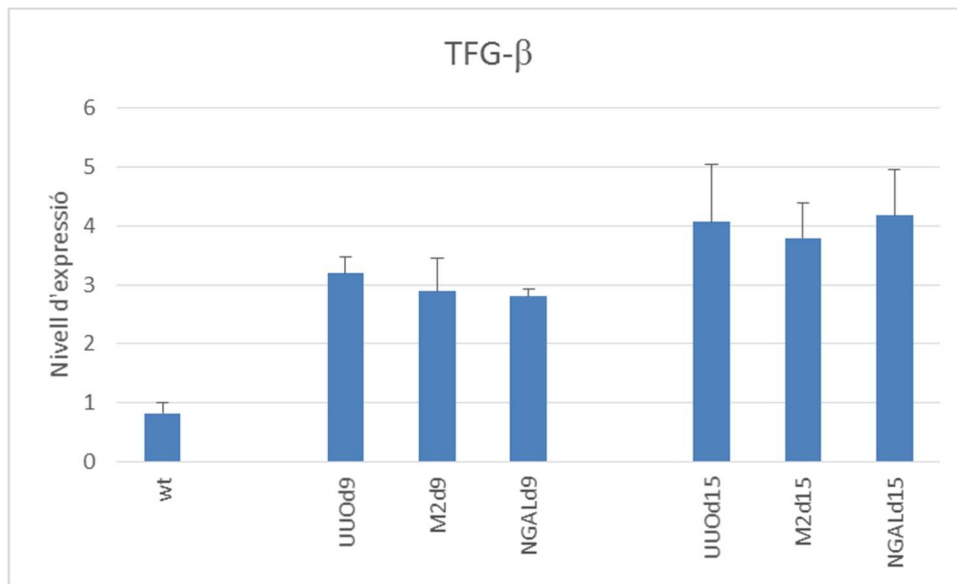


**Figura 19.** Representació gràfica dels nivells d'expressió de MMP9 respecte al control sà (wt).

Referent a la MMP9 hi ha cert controvèrsia envers els seus efectes davant un dany renal agut, alguns creuen que té efectes reparatius atenuant les lesions fibròtiques, d'altres en canvi creuen que en realitat actua com a molècula profibròtica. En aquest estudi es demostra la segona hipòtesis, és a dir, desenvolupa un paper fibròtic ja que en les situacions de dany renal augmenta en gran nombre els nivells d'expressió, reduint de manera notable en els ratolins tractats amb macròfags.

#### 4.3.4 El factor TGF- $\beta$

Finalment, es poden observar els resultats dels nivells d'expressió de TGF- $\beta$ . No presenta cap resultat significatiu, però 48h post-teràpia s'observa una tendència en disminuir-ne l'expressió tant en BM-M2 com en RAW-NGAL (Figura 20). Referent als animals sacrificats a dia 15 no s'observa cap tendència, els resultats de les dues teràpies són molt similars als resultats obtinguts en la UUO. En aquest cas, com en els anteriors, s'agafa com a referència el *wild type* mesurant les vegades que s'expressen de més la resta de mostres (Figura 20).



**Figura 20.** Representació gràfica dels nivells d'expressió de TGF- $\beta$  respecte al control sà o *wild type* (wt).

En general el TGF- $\beta$  segueix una tendència a la reducció quan s'aplica la teràpia amb BM-M2 i RAW-NGAL, no obstant els resultats no són significatius. Al tractar-se d'una citocina profibròtica es pot veure com augmenta el seu nivell d'expressió quan el ronyó es troba danyat, no obstant aplicant la teràpia no s'observen resultats clars en quan a disminució d'aquest dany.

## 5 CONCLUSIONS

Es pot afirmar que els macròfags injectats via intravenosa arriben al ronyó obstruït, no obstant, s'ha observat que arriben en un percentatge reduït. Per aquest motiu abans de continuar amb la investigació d'aquesta teràpia, s'hauria de intentar dirigir específicament aquests macròfags per evitar que la gran majoria quedin retinguts en el fetge. Per a dirigir-los seria interessant poder-se ajudar del microambient hostil que es genera en el model de dany, per tant es necessitaria un estudi complert de les citocines presents en aquesta situació i dirigir els macròfags envers aquest microambient.

El model de UUU és un model de dany molt agressiu i per això alguns dels resultats no han arribat a ser significatius. Per tant, es podria realitzar un model de UUU reversible, és a dir, que es pugui desfer la obstrucció del ronyó de manera que els macròfags no es trobarien davant de un dany tan agut.

Com a conclusió general es pot afirmar que les macròfags de tipus II, especialment els RAW-NGAL gràcies a la secreció continua de IL-10, són reparadors en una Obstrucció Uretral Unilateral. Aquest resultat és important per poder començar a desenvolupar teràpies amb les pròpies cèl·lules immunològiques, evitant d'aquesta manera possibles problemes de rebuig o al·lèrgies que provoquen les teràpies actuals, com són els transplants o medicament químics. No obstant, s'ha de seguir investigant abans de poder passar a estudis en humans ja que encara es troba en fases experimentals i per tant s'estudia el seu efecte en ratolins.

Un pas per poder demostrar la teoria de la importància del microambient pel fenotip dels macròfags en el ronyó, és demostrar el fenotip que presenten en cada una de les situacions (UUU i també comprovar si aquests macròfags són endògens o exògens. Per a dur a terme aquesta comprovació s'haurien d'analitzar els ronyons per sortir (citometria en la qual es recuperen les cèl·lules al final del procés), s'haurien de marcar amb *Vivotrack* per distingir els exògens, és a dir, els que s'injecten i amb anticossos marcats que s'uneixin a diferents marcadors moleculars que permetin distingir els M1 dels M2 com serien el CD86 i CD206 respectivament. El sortir és més útil en aquest cas que una citometria convencional, ja que permet recuperar les cèl·lules i per tant poder realitzar un anàlisi dels gens que s'expressen en cada mostra. També interessaria saber



si aquestes cèl·lules estan vives o mortes, de manera que s'utilitzaria el DAPI (s'introdueix en el citoplasma d'elles cèl·lules mortes). A part, s'hauria de confirmar que en el cultiu inicial de BM-M2 els macròfags són de tipus M2 calculant la eficiència de polarització. En aquesta ocasió també s'utilitzaria un citòmetre per determinar-ne el fenotip.

## 6 BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

1. GERICH J.E. (2010). "Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications". *Diabetic Medicine* 27 (2): 136–142.
2. MANTHON, A. et al. (1993). "Biology and Health". *Englewood cliffs*.
3. Medline Plus. (2012). "Kidney Failure". *National Institutes of Health*.
4. [www.gencat.cat](http://www.gencat.cat)
5. SCHNAPER H.W., et al. (2006). Why kidneys fail: Report from an American Society of Nephrology Advances in Research Conference. *J Am Soc Nephrology*. 17:1777–1781.
6. SCHAINUCK L., et al. (1970) Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. *Human Pathology*. 1: 631–641.
7. TZU-HAN L., Kai-Yu T. (2014). "TERM-1 regulates macrophage polarization in uretral obstruction". *Kidney International*. 86:1174-1186.
8. ROBERT L., et al. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney International*. 75: 1145–1152.
9. MENG, X.M., et al. (2014). "Inflammatory processes in renal fibrosis". *Nature Reviews Nephrology*. 10:493-503.
10. ALLISON A., et al. (2012). Investigating Mechanisms of Chronic Kidney Disease in Mouse Models. *Pediatric Nephrology*. 27(8): 1233–1247.
11. SEDEEK M., et al. (2013) "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe". *Journal American Society Nephrology*. 24:1512-1518.
12. LINKERMANN A., et al. (2012). "Programmed necrosis in acute kidney injury". *Nephrology Dialysis Transplantation*. 27:3412-3419.
13. POULSOM R., et al. (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration". *Journal pathology*. 163:553-562.
14. LEE L., et al. (2007). "Renal and bone marrow cells fuse after renal ischemic injury." *Journal American Society Nephrology*. 18:3067-3077.
15. SATISH L., et al. (2009). "Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview". *Journal of interferon & citokine resarch*. 29(6).

16. DUFFIELD J.S. (2003). "The inflammatory macrophage; a story of Jekyll and Hyde". *Clinical Society (London)*. 104:27-38.
17. VINUESA E., et al. (2008). "Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines". *American Journal Physiology*. 295:1555-1562.
18. BLANK U., et al. (2015). "TGF- $\beta$  signaling in the control of hematopoietic stem cells". *Blood*. 25(23):3542-3550.
19. [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) "Entrez Gene: CD40 CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5".
20. PYPE S., et al. (2000). "TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation". *The Journal of Biological Chemistry* 275(24): 18586–18593.
21. HANS-JOACHIM A. (2014). "Immune System modulation of kidney regeneration -mechanisms and implications". *Nature Reviews Nephrology*. 10:347-357.
22. VIGNERY, A. (2000). "Osteoclasts and giant cells: macrophage fusion mechanism". *International Journal Experimental Pathology*. 81:291-304.
23. MACKANESS G.B. (1964). "The immunological basis of acquires cellular resistance". *Journal Experimental Medicine*. 120:105.
24. GORDON S. (2002). "Alternative activation of macrophages". *Nat. Rev.* 3:23-35.
25. STANLEY E.R., et al. (1997). "Biology and action of colony--stimulating factor-1". *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1): 4–10.
26. NEMUNAITIS J. (1993). "Macrophage function activating cytokines: potential clinical application". *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 14 (2): 153–71.
27. PRASAD D. (2010). "Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kindey injury". *Nephrology*. 15:419-428.
28. ASTER J., et al. (2009). "Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (8th ed.)". *Philadelphia: Saunders*. p. 54.
29. WYNN T.A. (2003). "IL-13 effector functions". *Annu. Rev. Immunol.* 21: 425–56.
30. POLLARD J.W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease". *Nat. Rev. Immunol.* 9,4:259-270.

31. Abd Serotec . "F4/80 Antibody Mini Review. The marker and the antibody". *Bio-Rad Laboratories, Inc.*
32. JUN L., et al. (2015). "Clinicopathological significance of CD206-positive macrophages in patients with acute tubulointerstitial disease". *Int J Clin Exp Pathol* 8(9):11386-11392.
33. PETERSON J.D. (2013). "A method of NIR fluorescent cell labeling for in vivo cell tracking". *Perkin Elmer*. Application note.
34. GRINNELL F. (1984). "Fibronectin and wound healing". *Journal of Cellular Biochemistry*. 26 (2): 107–116.
35. VALENICK L.V., et al. (2005). "Fibronectin fragmentation promotes alpha4beta1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix". *Experimental Cell Research*. 309 (1): 48–55.