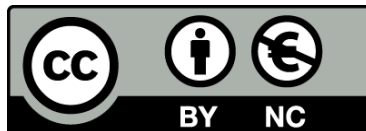




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi dels exosomes com a mecanisme de comunicació intercel·lular en patologies pancreàtiques

Laia Bonjoch Gassol



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona
Programa de Doctorat en Biomedicina

Treball realitzat al departament de Patologia Experimental de
l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC)

Estudi dels exosomes com a mecanisme de comunicació intercel·lular en patologies pancreàtiques

Memòria per optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona presentada per

Laia Bonjoch Gassol

Director: Dr. Daniel Closa Autet

Tutor: Dr. Marçal Pastor Anglada

Barcelona. Febrer de 2017.



© Laia Bonjoch Gassol

Coberta: Fagocitosis d'exosomes (vermell) per part de les cèl·lules de Kupffer (verd)

Impressió i enquadernació: Blackcolor. Barcelona (2017)

*When different experiments
give you the same result,
it is no longer subject to your opinion.
That's the good thing about science:
It's true whether or not you believe in it.
That's why it works.*

Neil deGrasse Tyson

Agraïments

Quan vaig entrar al CSIC, a finals del 2011, poc m'imaginava que hi acabaria fent una Tesi. Però aquí està, la teniu a les mans, ja és una realitat! I no puc pas oblidar tota la gent que he anat trobant pel camí, als quals vull agrair haver posat el seu petit gra de sorra tant a nivell de contingut com de creixement personal de l'autora.

Al Dr. Closa. Al *jefe*. Senzillament al Dani. Suposo que podríem dir allò de *Centpeus, contigo empezó todo!* Gràcies per creure que una *freak* de la bio marina podia ser apta per fer una tesi de biomedicina al teu lab. Per tenir la porta del despatx sempre oberta i donar-me plena confiança per fer i desfer. Perquè si tinc una proposta, el primer que fas és esborrar la pissarra, donar-me un retolador i deixar-me fer volar les idees. Per intentar amb totes les teves forces que tingués més confiança en mi mateixa. Per la paciència, perquè sé que desxifrar-me de vegades podria ser una tesi paral·lela. Per fer de la ciència una aventura divertida i emocionant. Per saber cuidar la gent que treballa amb tu i fer-nos sentir imprescindibles. Pel projecte Narguile. Per Cosmos. Pel *quina és la pregunta que vols respondre?* Per poder parlar amb tu d'absolutament qualsevol cosa. De tot cor, ha estat un privilegi. Mil gràcies.

A l'Adela Mazo, per acceptar ser la meva tutora amb entusiasme. Malgrat que ja no pugui llegir aquesta tesi, el seu record es manté viu, i volia dedicar-li aquest petit racó. Al Dr. Marçal Pastor per acceptar ser-ho després i acompanyar-nos en el tram final.

Al *Pancreas Team*, que tot i ser reduït, ja se sap: al pot petit hi ha la bona confitura! En primer lloc donar gràcies a la Sabrineta, la meva mentora. Quan vaig arribar acabaves de ser doctora, i durant 4 mesos vaig ser la teva ombra. Gràcies per introduir-me al grup, ensenyar-me tot el que sabies i per repetir-me i demostrar-me que amb esforç, tot es pot. I a la Laura, la nova incorporació, que ha convertit el grup pàncrees altre cop en una $n=3$! Es extremadamente fácil trabajar contigo, has sido un apoyo constante. Te ha tocado aguantar mi ritmo y mis neuras (que no son pocas) a lo largo de este último año, el más difícil, así que eres una campeona! Gracias por nuestras largas sesiones de psicología y por querer aprenderlo siempre todo. Además, eres mi camello de cabecera de chocolate!

A tots els *pulmonetis* del 710, que m'heu acollit i animat al llarg de tot aquest temps que hem passat junts. Amb vosaltres he après ciència, a cuinar, com esferificar, com fer una barca que suri al Segre, com ballar un sirtaki... El normal, no? Moltes gràcies per tot, aquesta tesi també és una mica vostra.

A l'Anna, amb qui podria parlar de gatets tot el dia. És que són tan *cuquis*! Gràcies a tu vaig poder optar a la beca, sempre t'estaré molt agraïda. A més, ets un exemple d'èxit i superació científica en aquesta selva que pot arribar a ser la recerca. Gràcies també per deixar-me assistir a un dels trasplantaments, va ser una experiència al·lucinant que tinc molt present.

A la Gemma, que quan t'escriu un whatsapp maquejat pel corrector a les 9 del matí t'alegra el dia. Quan després d'una reunió amb els *jefes* em vas dir "m'odiaràs" no et vaig entendre, però tres anys després, quan compto totes les hores que he passat confinada a la ultra aïllant exosomes... Buf! Però el treball que n'ha acabat sortint ha valgut la pena, no?

A Nacho, que tan pronto te hace un ELISA como un baile de *funky* en medio de lab. Contigo he aprendido (aunque a veces me cueste ponerlo en práctica) que las pausas son buenas y necesarias, y que si vienen con un abrazo-péndulo o un beso de abuela, son aún mejor!

A la Paula, que tot i menjar coses estranyes com *bajoques* i *safanòries*, l'estimem igual! És broma! Ets un solete, sempre tens un somriure als llavis i vas arribar com una alenada d'aire fresc. Molts ànims amb tot el que et proposis!

Als ex-710, als que ja no hi són però que van deixar petja. A la Raquel, un terratrèmol tota ella, una de les persones més multi-tasca que conec. Gràcies per la confiança, pels ànims tot i estar a més de 1000 km de distància i pels teus grans sopars (inclòs el meu primer, el dels pebrotets assassins!). A la Valeria, que va haver d'aguantar com la perseguia mentre feia immunos i Westerns. Al Lluís, que tot i que ara rondes per la 6^a, encara ens seguim trobant i xerrant pels passadissos. I a l'Oriol, que des de que et vaig conèixer no miro els símbols de la mateixa manera!

La sala de cultius és un microcosmos dins de l'IIBB, hi ha uns quants habituals que sempre fan que la feina sigui més distreta i agradable. A la Chrisa, el Mateu, l'Elis i l'Ester, gràcies per estar disposats a ajudar-me i a xerrar una estona entre centri i centri.

A la Sara i els seus concerts memorables els divendres a les 7 de la tarda passant cèl·lules. A la Carme i la Lorena, per mantenir-ho tot en ordre, per l'ajuda i els cafès compartits.

Als veïns del 711 (Petar *àlies* la wikipedia, Núria, Marga), gràcies també per estar encantats sempre de donar un cop de mà. He tingut la vostra porta oberta i m'heu aconsellat i deixat mil coses quan ho he necessitat. A la resta de companys de la 7^a i en especial al Mohamed, el Western King, de tenacitat envejable. Em vas fer partícip dels teus projectes i idees, conèixer-te ha estat molt enriquidor. Als companys de la 6^a a qui de ben segur he molestat en algun moment perquè m'ensenyessin alguna tècnica (gràcies Alba per la *masterclass* de criostat!) o per fer quadrar reserves quan em planificava malament. Espero haver-vos pogut ajudar jo també en algun moment! També voldria agrair al personal de l'estabulari (Ignacio, Iván) la seva professionalitat i paciència, ja que de ben segur heu suportat els meus nervis i males cares els dies de pancreatitis. I finalment, un gràcies enorme al personal de neteja i de l'administració, els que quan no hi són, es nota. Pedro, Antonio, Salva, Mari Ángeles, Edu, Rafa... Els experiments i congressos són possibles també gràcies a vosaltres.

A les meves pancreatòlogues preferides, l'Elena i la Irene, les veïnes del CEK. Sempre esteu disposades a tot, ja sigui fer un cafè, un dinar de tupper... o una cervesa envoltades de *hooligans* britànics! Els EPCs no haurien estat el mateix sense vosaltres. Recordeu que hi ha un desig penjant en un arbre de la catedral de Liverpool que espera fer-se realitat! També voldria donar les gràcies a la resta de pancreatòlegs amb els quals he compartit *coffee breaks* i converses científiques súmament enriquidores (Quique, Txell, Xavi, Eva). Gràcies per trencar barreres i donar-me la confiança per creure que els novells també podem tenir bones idees.

A Juan Iovanna, una combinació excelente de eminencia y a la vez proximidad. Gracias por hacer posible el proyecto de REG3 β , por permitirme realizar experimentos en tu instituto y por la confianza depositada. Nunca imaginé que las reuniones más productivas serían con una cerveza en mano!

Als amics, començant per la Griselda, que a part de ser una biòloga excel·lent crec que és una de les millors persones que conec. Tenir-te al meu costat des de fa tants anys és tot un privilegi. Sembla que fos ahir quan a la Vila de la UAB fèiem apostes sobre quin Nobel guanyaria cadascuna de nosaltres, eh! Gràcies per haver-te interessat sempre pel que feia, per fer tantes excursions al Clínic per fer un cafè quan només tenia una horeta

per veure'ns, per saber viure la vida agafant les coses bones que et va donant. T'estimo molt. Ah! I gràcies per oferir-te a revisar aquest totxo!

Ja ho diuen: tesi nova, vida nova. L'inici d'aquesta aventura no va venir sola, però a la ciutat que m'ha acollit hi he trobat gent fantàstica. A en Xavier i la Patrícia, per obrir-me les portes de casa seva dia sí dia també, per les mil barbacoes i mojitos a la terrassa, i per encoratjar-me quan m'han publicat un article. Sé que amb vosaltres mai faltaran ni les bromes ni una Estrella! Als d'Esquerra, per fer-me sentir una més, pels dinars i les cerveses compartides. Per extensió, amb tot aquest conjunt de canvis també van arribar els de la Comunitat del Fosfat, els BQ en majúscules. GG, Rach, Gerard, Txaro, gràcies per allargar-me la mà des del primer dia i fer-me sentir com si sempre hagués estat allà. Tots heu patit els efectes d'una tesi, directament o de manera col·lateral. M'heu sabut entendre a la perfecció i heu estat pendents de com m'anaven les coses. Sou encantadors, i els miniBQ uns científics en potència!

A la meva família. A la mama, qui mai m'ha posat traves perquè fos allò que volia ser. Perquè tot i que el que fem al laboratori et soni una mica a ciència ficció sempre et mostres orgullosa dels passos que vaig fent, i aquesta tesi no ha estat una excepció. A l'Oriol, de qui segurament se m'ha enganxat la vena *freak* i l'interès per la informàtica, uns grans aliats d'aquesta tesi. A la iaia i la tieta. Moltes gràcies per acollir-me a casa vostra durant el meu primer any de Màster, per interessar-vos pel que faig i per patir tant com jo per si les cèl·lules *menjaven bé* o no. A la Pepi, per ser la meva segona iaia. A en Bloggins, un dels membres més nous de la família. Gràcies per fer-me companyia al llarg de tantes nits d'escriptura i pel teu bon criteri a l'hora d'esborrar les versions dels articles que encara no estaven prou bé per ser enviades a *Nature*. Tu sí que en saps!

A en Sergi, perquè sense una crossa com tu aquesta tesi tampoc hagués arribat fins aquí. Gràcies per creure en mi des del principi dels temps i acompanyar-me en la distància en cadascun dels passos que anava fent. Al llarg d'aquesta tesi has estat pacient, m'has ajudat a relativitzar les coses i sempre m'has animat quan em fallaven les forces. Gràcies per venir-me a buscar, per trobar-me. Per ensenyar-me que estimar no és gens complicat i que les barreres ens les posem nosaltres mateixos. *Me falten paraules per explicar què signifiqués per jo*. T'estimo.

Índex de continguts

Índex de figures.....	I
Índex de taules	III
Abreviatures	V
INTRODUCCIÓ.....	1
1. EL PÀNCREES	3
1.1. Fisiologia del pàncrees exocrí	3
2. PANCREATITIS AGUDA.....	5
2.1. Etiologia, epidemiologia i classificació	6
2.2. Fisiopatologia	7
2.3. Resposta inflamatòria	9
2.3.1. SIRS i MOF.....	9
2.3.2. Inflamació pulmonar.....	11
2.3.3. Mediadors inflamatoris.....	12
2.3.4. Paper dels macròfags en la AP	15
2.4. REG3 β	17
2.4.1. Estructura	18
2.4.2. Funcions fisiològiques.....	20
2.4.3. REG3 β en malalties pancreàtiques.....	21
3. EXOSOMES.....	23
3.1. Caracterització	24
3.1.1. Mida i morfologia	24
3.1.2. Composició.....	24
3.1.3. Mètodes d'aïllament.....	28
3.2. Biogènesi	28
3.3. Secreció	29
3.4. Adhesió i internalització	30
3.5. Funcions.....	31
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	35

MATERIALS I MÈTODES.....	39
1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	41
1.1. Animals	41
1.2. Model experimental.....	41
2. CULTIUS CEL·LULARS.....	42
2.1. Condicions de cultiu	42
2.2. Línies cel·lulars	42
2.2.1. THP-1	42
2.2.2. MIA PaCa-2.....	43
2.3. Cultius primaris	43
2.3.1. Macròfags alveolars de rata.....	43
2.3.2. Hepatòcits de rata	43
2.3.3. Cèl·lules de Kupffer de rata	44
3. REG3β	44
4. DISSENY EXPERIMENTAL	45
4.1. <u>ESTUDI 1</u> . Paper dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada	45
4.1.1. Caracterització de les poblacions d'exosomes en un model experimental de AP severa	45
4.1.2. Avaluació de la capacitat dels exosomes circulants d'arribar a l'espai alveolar i anàlisi del seu potencial inflamatori.....	46
4.1.3. Anàlisi del perfil proteòmic dels exosomes circulants.....	47
4.1.4. Valoració del paper del fetge com a filtre dels exosomes generats a la cavitat peritoneal	48
4.2. <u>ESTUDI 2</u> . Caracterització del mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes.....	49
4.2.1. Determinació dels nivells circulants de REG3 β durant la AP	49
4.2.2. Valoració de la unió de REG3 β als exosomes durant la AP.....	50
4.2.3. Caracterització de les poblacions d'exosomes de línies cel·lulars	50
4.2.4. Caracterització del mecanisme molecular que regula la interacció entre REG3 β i els exosomes.....	51
4.2.5. Efecte de REG3 β en la captació dels exosomes	52

5. MÈTODES	52
5.1. Lipasa.....	52
5.2. Mieloperoxidasa	53
5.3. Aïllament d'exosomes	54
5.3.1. A partir de cultiu cel·lular.....	54
5.3.2. A partir de plasma i líquid ascític de rata.....	55
5.4. Microscòpia electrònica de transmissió	56
5.5. Immunomarcatge per microscòpia electrònica.....	57
5.6. Western Blot.....	57
5.7. qPCR.....	60
5.8. Seguiment dels exosomes mitjançant fluorescència	62
5.9. Histologies	62
5.10. Immunofluorescència	63
5.11. Cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses	63
5.12. Assaig d'unió	65
5.12.1. En microplaca	65
5.12.2. En esferes magnètiques	66
5.13. Immunoprecipitació	67
5.14. Anàlisi estadístic.....	67
RESULTATS	69
1. <u>ESTUDI 1.</u> Paper dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada	71
1.1. Indicadors de dany pancreàtic.....	71
1.2. Resposta inflamatòria pulmonar associada a la AP severa	71
1.3. Caracterització de les poblacions d'exosomes en plasma i PAAF	72
1.4. Els exosomes generats durant la AP activen els macròfags alveolars.....	74
1.5. Els exosomes circulants arriben a l'espai alveolar	76
1.6. Anàlisi del perfil proteòmic dels exosomes circulants	76
1.7. Els exosomes del PAAF són retinguts al fetge	79
2. <u>ESTUDI 2.</u> Caracterització del mecanisme d'interacció entre REG3β i els exosomes	82
2.1. Els nivells de REG3 β circulant incrementen durant la AP.....	82
2.2. Durant la AP, els exosomes plasmàtics presenten REG3 β unida a la membrana	82

2.3. REG3 β interacciona amb els exosomes a través del seu domini lectina	83
2.4. REG3 β inhibeix la captació dels exosomes	87

DISCUSSIÓ	89
------------------------	-----------

CONCLUSIONS.....	101
-------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	105
---------------------------	------------

APÈNDIX	121
----------------------	------------

Article: *Involvement of exosomes in lung inflammation associated with experimental acute pancreatitis.*

Taula suplementària I: Anàlisi quantitatiu del conjunt de proteïnes detectades amb un alt grau de confiança (pèptids únics) en exosomes circulants d'animals control i d'animals amb AP.

Taula suplementària II: Llista total de proteïnes detectades (amb un alt grau de confiança o amb un únic pèptid) en el conjunt de totes les mostres.

Índex de figures

Figura 1.	Anatomia del pàncrees	4
Figura 2.	Activació dels enzims durant la AP	8
Figura 3.	Progressió de la AP severa. SIRS i MOF	10
Figura 4.	Paper del fetge en la inflamació pulmonar associada a la AP	12
Figura 5.	Polarització dels macròfags	15
Figura 6.	Membres de la família de les lectines tipus C.....	19
Figura 7.	Paper de REG3 β en malalties pancreàtiques.....	23
Figura 8.	Exosomes: estructura i composició	27
Figura 9.	Secreció i internalització dels exosomes	31
Figura 10.	Disseny experimental de la perfusió d'exosomes	48
Figura 11.	Disseny experimental de l'assaig d'unió dels exosomes a REG3 β	51
Figura 12.	Protocols d'aïllament d'exosomes	56
Figura 13.	Detecció i quantificació de proteïnes per LC-MS/MS.....	64
Figura 14.	Indicadors de dany pancreàtic: activitat lipasa en plasma i MPO en pàncrees	71
Figura 15.	Resposta inflamatòria pulmonar associada a la AP severa	72
Figura 16.	Micrografies d'exosomes aïllats de plasma i PAAF	72
Figura 17.	Caracterització per Western Blot dels exosomes plasmàtics i de PAAF	73
Figura 18.	Quantificació dels exosomes plasmàtics	74
Figura 19.	Polarització dels macròfags alveolars amb exosomes plasmàtics (1).....	75
Figura 20.	Polarització dels macròfags alveolars amb exosomes plasmàtics (2).....	75
Figura 21.	Captació <i>in vivo</i> dels exosomes plasmàtics generats durant la AP per part dels macròfags alveolars	76
Figura 22.	Retenció dels exosomes del PAAF en la perfusió per la vena porta.....	79
Figura 23.	Retenció dels exosomes del PAAF: anàlisi histològic del teixit hepàtic	80
Figura 24.	Captació dels exosomes per part dels hepatòcits i les cèl·lules de Kupffer	81
Figura 25.	Nivells de REG3 β en plasma durant la AP	82
Figura 26.	Unió dels exosomes plasmàtics AP a REG3 β	83
Figura 27.	Caracterització d'exosomes de línies cel·lulars	84
Figura 28.	Posada a punt de l'assaig d'unió dels exosomes de línies cel·lulars	84
Figura 29.	Dosi-dependència de la unió dels exosomes a REG3 β	85
Figura 30.	Immunomarcatge de REG3 β unit a la membrana exosomal	86
Figura 31.	La unió dels exosomes a REG3 β depèn del domini lectina	86

Figura 32. Bloqueig de la captació dels exosomes en presència de REG3 β	87
Figura 33. Esquema resum de l'Estudi 1	97

Índex de taules

Taula I.	Nomenclatura de la proteïna REG3 β en diferents espècies	18
Taula II.	Composició dels tampons i gels utilitzats al Western Blot	59
Taula III.	Anticossos utilitzats al Western Blot.....	60
Taula IV.	Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats a la qPCR.....	61
Taula V.	Catàleg de les proteïnes sobreexpressades de manera diferencial entre exosomes circulants d'animals control o AP.....	77

Abreviatures

ANOVA	Anàlisi de la variança
AP	Pancreatitis aguda
ARDS	Síndrome del destret respiratori agut
BSA	Albúmina sèrica bovina
CARS	Síndrome de resposta anti-inflamatòria compensatòria
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CP	Pancreatitis crònica
CRD	Domini de reconeixement de carbohidrats
CTLD	<i>C-Type Lectin Domain</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
ExoAP	Exosomes aïllats de plasma d'animals amb pancreatitis aguda
ExoC	Exosomes aïllats de plasma d'animals control
ExoPAAF	Exosomes aïllats de líquid ascític
GO	Gene Ontology
HBSS	Solució salina tamponada de Hank
HIP	<i>Hepatocarcinoma Intestine Pancreas</i>
IgG	Immunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1ra	Receptor antagonista de la IL-1
LBP	Proteïna d'unió a lipopolisacàrid
LC-MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
LPS	Lipopolisacàrid
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MBP-C	Proteïna d'unió a mannososa
MHC-II	Complex Major d'Histocompatibilitat II
miRNAs	micro RNAs
MOF	Fallida multiorgànica
MPO	Mieloperoxidasa
MRC-1	Receptor de la mannososa
mRNAs	Àcid ribonucleic missatger
MVB	Cossos multivesiculars
NAG	N-acetilglucosamina

NaTc	Taurocolat de sodi
NFκB	Factor nuclear κB
NK	Cèl·lules Natural Killer
NO	Òxid nítric
PAAF	<i>Pancreatitis-Associated Ascitic Fluid</i>
PAF	Factor activador de plaquetes
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PAP	Proteïna Associada a la Pancreatitis
PBS	Tampó fosfat
PDAC	Adenocarcinoma ductal de pàncrees
PMA	Forbol 12-miristat-13-acetat
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa semiquantitativa
REG3β	<i>Regenerating islet-derived 3 beta</i>
rhREG3A	Proteïna recombinant humana REG3A
SEM	Error estàndard de la mitjana
SIRS	Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica
TBS	Tampó Tris
TMTs	Etiquetes de masses en tàndem (<i>Tandem-mass tags</i>)
TNF	Factor de necrosi tumoral
UA	Unitat d'absorbància
UFAs	Àcids grassos insaturats

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES

El pàncrees és una glàndula digestiva, situada al retroperitoneu, amb una longitud que oscil·la entre 15-23 cm i un pes d'entre 70 i 150 g en humans adults. Està unit a la nansa duodenal i s'hi comunica directament a través de l'ampolla de Vater o papil·la duodenal major. A més, està en contacte amb diversos òrgans com l'estómac, el còlon transvers, la melsa i el ronyó esquerre.

Fisiològicament, el pàncrees presenta funcions tant endocrines com exocrines. La part endocrina representa un 1-2 % de la massa total i s'encarrega de regular el metabolisme de la glucosa. Està formada per quatre tipus cel·lulars especialitzats que s'organitzen en els illots de Langerhans, els quals fabriquen i secreten hormones cap al torrent sanguini. Les cèl·lules α i les β regulen l'ús de la glucosa mitjançant la producció de glucagó i insulina, respectivament. Els altres dos tipus cel·lulars, les cèl·lules PP i les δ , secreten el polipèptid pancreàtic i la somatostatina per modular les propietats secretores de la resta de cèl·lules del pàncrees [1]. La resta del teixit pancreàtic conforma la part exocrina, formada majoritàriament per cèl·lules acinars, les quals s'encarreguen de la secreció d'enzims digestius. El pàncrees exocrí té un paper central i essencial en el procés digestiu, ja que quan deixa de funcionar correctament es veu compromesa l'absorció de nutrients, fet que desemboca en malnutrició.

1.1. Fisiologia del pàncrees exocrí

El pàncrees exocrí està format principalment per les cèl·lules acinars, les quals són la major part del teixit pancreàtic, i les ductals, que formen el sistema ramificat de conductes. Les cèl·lules acinars es disposen en petits grups anomenats acinus, els quals conformen la unitat funcional bàsica del pàncrees exocrí, capaç de sintetitzar els enzims pancreàtics (Figura 1). Altres tipus cel·lulars i estructures, com les cèl·lules estrellades del pàncrees, nervis, vasos sanguinis i vasos limfàtics componen la resta del teixit connectiu de l'òrgan [2].

Les cèl·lules acinars estan especialitzades per produir, emmagatzemar i alliberar enzims digestius. Tenen un gran reticle endoplasmàtic a la part basal, ja que requereixen una

gran capacitat de síntesi proteica, mentre que a la part apical és on s'hi acumulen els grànuls d'enzims en la seva forma inactiva (zimògens). Totes les cèl·lules d'un mateix acinus alliberen el seu contingut a la llum del conducte que el drena. Aquest conducte desemboca al sistema interlobular, i aquest al conducte pancreàtic principal, que acaba alliberant els enzims digestius al duodè [2].

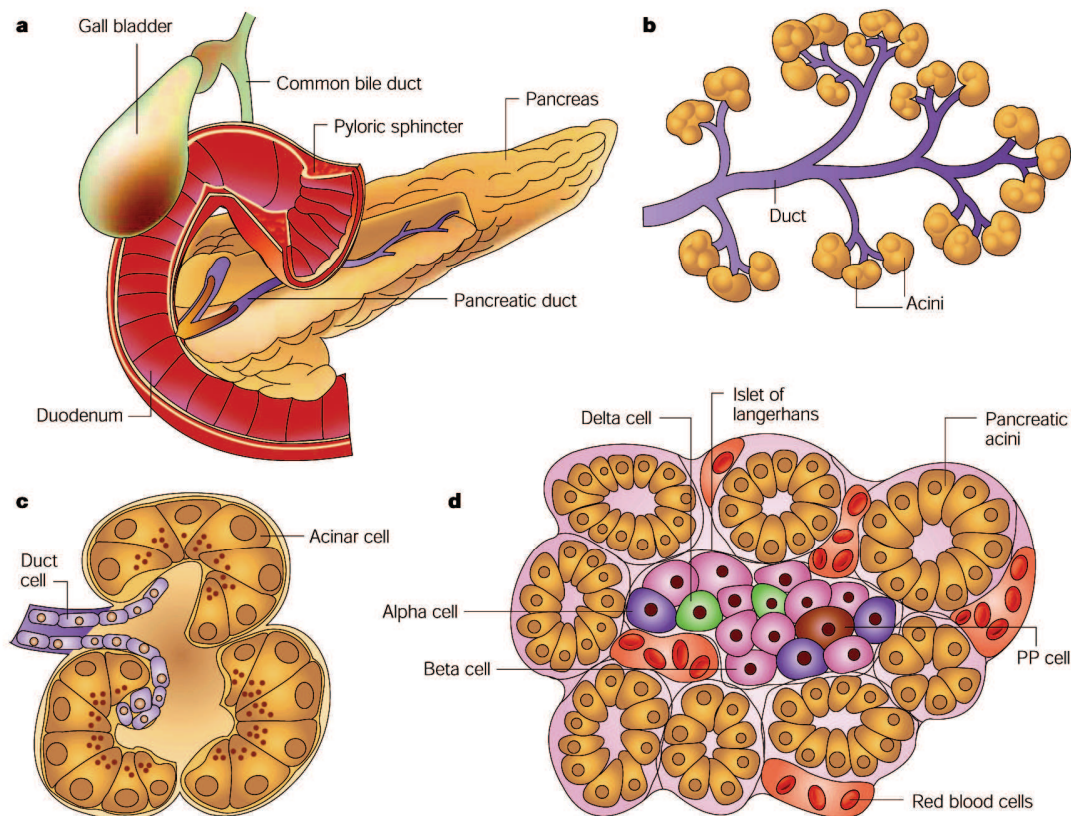


Figura 1. a, Anatomia del pàncrees. b, Organització del pàncrees exocrí en sistema ductal i acinar. c, Acinus. d, Illot pancreàtic envoltat de teixit exocrí [1].

La secreció del pàncrees exocrí està regulada per l'acció colinèrgica del nervi vague i per factors hormonals, d'entre els quals destaquen l'acció de la secretina i la colecistoquinina. La secretina participa en la secreció del component aquós i del bicarbonat que componen el suc pancreàtic [3], mentre que la colecistoquinina estimula les cèl·lules acinars per promoure l'alliberament del component enzimàtic [4], format principalment per la lipasa, l'amilasa, el tripsinogen, la carboxipeptidasa, l'elastasa i diverses ribonucleases [5]. Un cop al duodè, l'enteropeptidasa hidrolitza el tripsinogen (precursor inactiu) tot transformant-lo en tripsina, la qual converteix la resta de zimògens en enzims actius.

El pàncrees és un òrgan que requereix una gran quantitat de mecanismes d'autoprotecció, ja que una activació prematura dels enzims digestius podria provocar la digestió de les cèl·lules acinars. Entre ells destaquen la síntesi d'enzims en forma de zimògens, el seu encapsulament en grànuls, la secreció de l'inhibidor de la tripsina o el fet que el pàncrees sigui l'òrgan que més proteïnes d'estrès sintetitza [6], fet que permet que petites lesions puguin ser autolimitades.

Les afectacions de la part exocrina del pàncrees són sobretot d'origen inflamatori i tumoral. Pel que fa a la patologia inflamatòria, la pancreatitis aguda (AP) és la més freqüent i la que té una major repercussió [7]. Dins dels processos tumorals, l'adenocarcinoma de pàncrees (PDAC) és el més comú, essent un 85 % de tots els tipus de càncer de pàncrees [1].

2. PANCREATITIS AGUDA

La AP és un procés inflamatori agut del pàncrees desencadenat per una activació inapropiada dels enzims pancreàtics, la qual cursa amb afectació variable d'altres teixits regionals i òrgans allunyats [8].

El símptomes clàssics que acompanyen la AP són dolor abdominal, vòmits, febre, taquicàrdia, leucocitosi i nivells elevats d'enzims pancreàtics en sang i/o orina. De fet, per fer-ne un correcte diagnòstic, el pacient ha de complir dos dels següents tres requisits: tenir dolor abdominal, una activitat lipasa o amilasa tres vegades per sobre del normal, i que a través de sistemes de diagnosi d'imatge com la tomografia computeritzada, l'ultrasonografia transabdominal o la ressonància magnètica es detectin els signes típics de la malaltia (edema, necrosi, etc.) [8].

La majoria dels cops la malaltia és lleu i autolimitada, de manera que els pacients milloren amb tractaments simptomàtics. No obstant, de vegades apareix de forma sobtada i amb un quadre clínic de gravetat extrema. Les complicacions més freqüents a nivell local són la necrosi pancreàtica, les col·leccions de fluid, els pseudocists i les col·leccions necròtiques, mentre que quan la malaltia progressa i s'estén a nivell sistèmic sol aparèixer fallida òrganica [8].

La irregularitat pel que fa a les diferents vessants de la malaltia, tant a nivell histopatològic com clínic, n'han dificultat l'estudi i el tractament al llarg dels anys.

Actualment, per a les variants de la malaltia que no són autolimitades, l'únic tractament existent és el manteniment vital dels pacients a la unitat de cures intensives amb nutrició parenteral, administració d'antibiòtics i restitució de fluids [9].

2.1. Etiologia, epidemiologia i classificació

La llista de factors etiològics en la AP és extensa. No obstant, hi ha dos factors principals que causen aproximadament el 75 % de les AP: la litiasi biliar i l'alcoholisme.

La **litiasi biliar** és l'origen del 40 % dels casos de AP, ja que provoca reflux biliar cap a l'interior del conducte pancreàtic. **L'alcoholisme**, responsable del 36 % dels casos, actua a través de diferents mecanismes moleculars i funcionals [10], tot modificant la resposta immune davant del dany cel·lular [11]. La resta de casos de AP tenen bàsicament un origen **post-quirúrgic**, sorgeixen després de la realització d'una **colangiopancreatografia retrògrada endoscòpica** (entre un 1-10 % dels pacients poden tenir simptomatologia) o estan relacionats amb processos **infecciosos**, **traumatismes** i **tractaments farmacològics**. No obstant, cal recordar que fins a un 10 % dels casos de AP són **idiopàtics** [7,12].

En els últims anys, la **obesitat** ha cobrat protagonisme com a factor de risc relacionat amb la AP. Si bé fins al moment no s'ha pogut demostrar encara que l'obesitat incrementi la mortalitat de la malaltia, sí que s'ha descrit que n'empitjora el pronòstic. Més en concret, se sap que els individus amb un índex de massa corporal >30 i una circumferència abdominal superior a 105 cm tenen un major risc de desenvolupar la malaltia i de patir-ne la variant severa [7].

La AP és una de les principals causes de tipus gastrointestinal d'ingrés hospitalari al món. Als Estats Units, per exemple, al llarg dels últims 20 anys s'ha doblat el nombre d'hospitalitzacions, enregistrant-se l'any 2009 fins a 275.000 ingressos [13]. La incidència de la malaltia s'ha anat incrementant progressivament, situant-se avui en dia entre 13-45 casos per cada 100.000 habitants i any [7]. La franja d'edat més freqüent d'aparició de la AP es situa entre els 35 i els 70 anys, amb un pic d'incidència als 52 anys [14]. Tanmateix, aquestes estimacions poden variar d'una regió a una altra a causa de les dificultats per establir un diagnòstic precís, l'ús de diferents criteris o els factors de risc que té associats cada població de referència.

Per aquest motiu, durant gran part de la segona meitat del segle XX es van començar a redefinir els criteris de diagnòstic, pronòstic i gestió dels pacients amb AP. Tots aquests esforços van culminar en el simposi celebrat a Atlanta l'any 1992, on es van establir estàndards internacionals per definir la malaltia i la seva clínica, així com un nou sistema de classificació aplicable tant per metges com per investigadors [15]. Aquests criteris van ser revisats i modernitzats l'any 2012 per millorar-ne la claredat [8].

En base a aquestes últimes modificacions, es poden diferenciar dos tipus de AP: la **intersticial edematosa**, que afecta al 80-90 % dels pacients; i la **necrosant**, que inclou el 10 % restant. La pancreatitis edematosa es caracteritza per la presència d'edema al teixit i pel fet que és autolimitada i es resol al cap d'una setmana normalment. En canvi, la pancreatitis necrosant cursa amb necrosi del parènquima pancreàtic i també del teixit peripancreàtic, els quals s'infecten en un 33 % dels casos.

En la revisió d'Atlanta, a més, es van definir i estratificar tres graus de severitat de la malaltia, els quals són importants per identificar en el moment d'arribada a l'hospital aquells pacients que poden desenvolupar una variant severa de la malaltia:

- **AP lleu** (66 % dels casos). No presenta complicacions locals o sistèmiques ni tampoc fallida orgànica.
- **AP moderadament severa** (30 % dels casos). Presenta fallida orgànica que es resol en menys de 48 h i/o complicacions locals o sistèmiques, sense fallida orgànica persistent.
- **AP severa** (4 % dels casos). Presenta fallida orgànica persistent, superior a 48 h, la qual pot afectar a un òrgan o a més d'un (fallida multiorgànica, MOF). Els pacients amb MOF tenen un alt risc de mortalitat, d'entre el 36 i el 50 %, el qual s'incrementa si a més hi ha necrosi infecciosa del teixit [16].

2.2. Fisiopatologia

La AP està causada per un desajust en els factors que regulen el manteniment de l'homeòstasi cel·lular del pàncrees, tot i que el mecanisme exacte que origina el dany tissular encara és objecte de debat. La hipòtesi més acceptada, postulada fa més d'un segle, considera que la AP comença per un dany en la cèl·lula acinar, el qual provoca l'alliberament d'enzims pancreàtics a l'interior de l'òrgan i la seva conseqüent autodigestió [17]. Aquest procés causa el trencament de membranes cel·lulars, la desestructuració de l'arquitectura pròpia dels acins i l'aparició de processos inflamatoris

a nivell local, que participen en el dany tissular i propicien l'aparició de les complicacions sistèmiques associades a la malaltia (Figura 2).

Actualment encara es desconeix el motiu pel qual els zimògens s'activen prematurament. Hi ha diverses línies d'investigació que estudien la implicació de diferents factors, tals com la desregulació del calci intracitosòlic [18], el pH extracel·lular [19], la fusió dels grànuls de zimògens amb lisosomes [20] o els processos d'autofàgia [21].

Tot i que l'activació dels enzims és un factor clau en l'aparició de la AP, els tractaments amb inhibidors enzimàtics han fracassat reiteradament al no ser capaços de frenar la progressió sistèmica de la malaltia [14]. Aquest fet ha posat de manifest que la AP no és únicament un procés autodigestiu, i ha promogut que en els últims anys l'estudi d'aquesta malaltia es focalitzi en els mecanismes que en regulen la resposta inflamatòria.

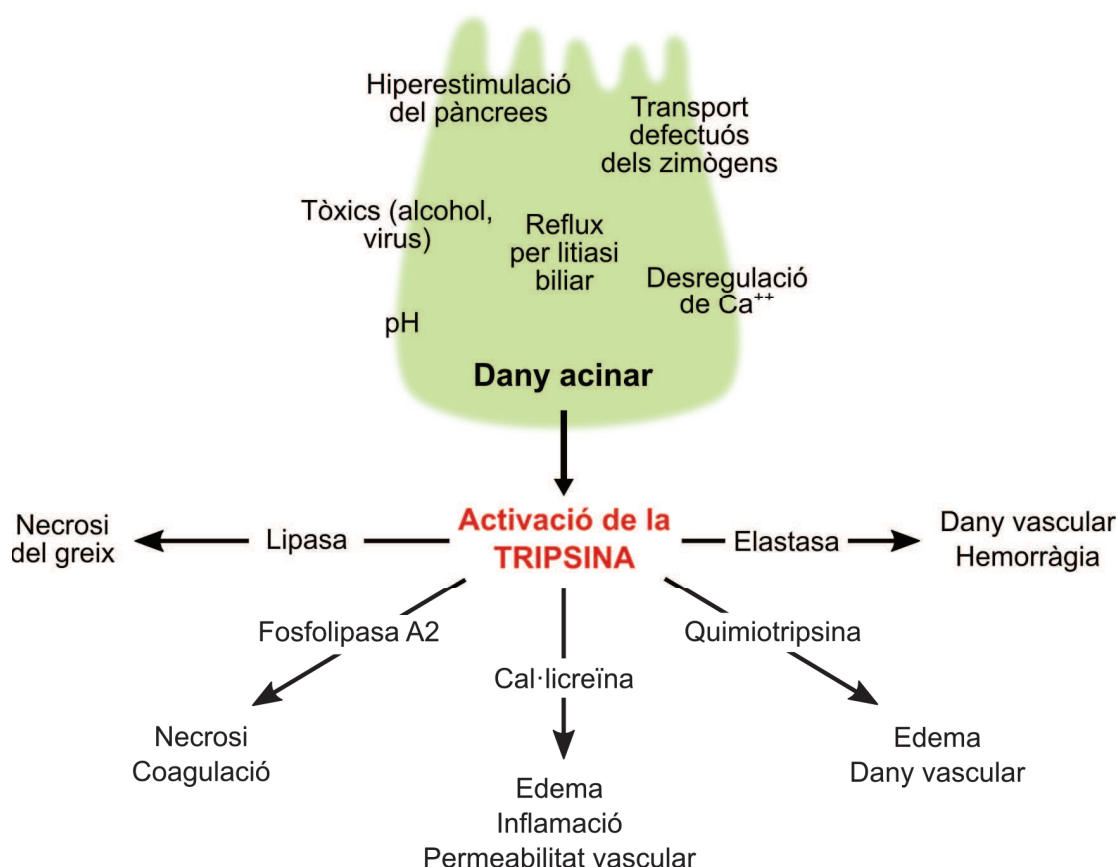


Figura 2. Factors responsables de l'activació de la tripsina durant la AP, activació secundària de la resta d'enzims digestius i patogènesi associada. Adaptat de [22].

2.3. Resposta inflamatòria

Durant la AP, arran de l'activació enzimàtica i l'autodigestió del pàncrees, s'inicia una resposta inflamatòria a nivell local. En aquesta fase el pàncrees pateix tot un seguit d'afectacions de tipus vascular (vasoconstricció, perfusió inadequada, increment de la viscositat de la sang i de la permeabilitat vascular) que provoquen l'edematització de la glàndula. Paral·lelament, les cèl·lules pancreàtiques alliberen grans quantitats de mediadors inflamatoris i proteïnes d'estrès que desencadenen el reclutament i activació de leucòcits a l'òrgan edematós. A més, l'increment de permeabilitat provoca una extravasació massiva cap a la cavitat peritoneal de fluid intravascular (PAAF, de l'anglès *Pancreatitis-Associated Ascitic Fluid*), molt ric en tots els mediadors inflamatoris i enzimàtics produïts per la glàndula i pels teixits colindants afectats.

Quan la malaltia no és autolimitada, la resposta inflamatòria s'estén a altres òrgans i provoca la síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS). Encara avui en dia es desconeix quins mecanismes en són els principals responsables, de manera que en les fases inicials de la malaltia no és possible predir si un pacient desenvoluparà una variant lleu o severa de AP. De les diferents hipòtesis, les més acceptades apunten que les citocines generades pel pàncrees, pels macròfags activats [23] i els mediadors recollits pel PAAF [24,25] causen l'extensió de la resposta inflamatòria a nivell sistèmic, probablement viatjant a través dels sistemes portal i limfàtic [26].

2.3.1. SIRS i MOF

La AP severa és un procés bifàsic. La fase inicial de la malaltia té lloc durant els primers 7 dies, quan la resposta inflamatòria local no es resol i s'estén a nivell sistèmic donant lloc a la SIRS. Quan la SIRS és persistent, la contínua infiltració leucocitària i la producció de mediadors inflamatoris en altres òrgans causa dany endotelial, trombosi intravascular, vasodilatació i hipotensió [27]. En aquest estadi poden aparèixer complicacions sistèmiques greus tals com vessaments pleurals, insuficiència renal, síndrome del destret respiratori agut (ARDS), desequilibri metabòlic i fallida orgànica (Figura 3).

Per tal de determinar l'aparició de SIRS en un pacient cal que mostri dos o més dels criteris següents: freqüència cardíaca elevada (> 90 batecs/min), desregulació de la temperatura corporal (<36 °C o >38 °C), recompte leucocitari alterat (<4000 o >12000 cèl·lules/mm³), freqüència respiratòria >20 /min o $PCO_2 < 32$ mm Hg [8].

El determinant de la gravetat de la AP durant la primera fase és principalment la presència i durada de la fallida orgànica. Si persisteix més de 48 h i afecta a més d'un òrgan (normalment pulmó, ronyó o sistema cardiovascular) es considera MOF, la qual incrementa substancialment la mortalitat dels pacients [28]. Aproximadament un 20 % dels pacients amb AP severa desenvolupen MOF. D'aquests, un 30-50 % no responen correctament al tractament de suport i tenen un alt risc de mortalitat durant els 6-10 primers dies de l'evolució de la malaltia [29].

Si la inflamació de la primera fase no es reverteix els pacients evolucionen cap a la segona fase de la malaltia, que els estudis més recents han descrit com a Síndrome de Resposta Antiinflamatòria Compensatòria (CARS) [30–32]. La CARS es caracteritza per la inhibició del sistema immune, que afavoreix l'alteració de la translocació bacteriana i l'aparició de sèpsia i infecció de la necrosi pancreàtica. En aquest punt s'inicia un cercle viciós que, en cas de no aturar-se, acaba provocant MOF irreversible i la mort del pacient.

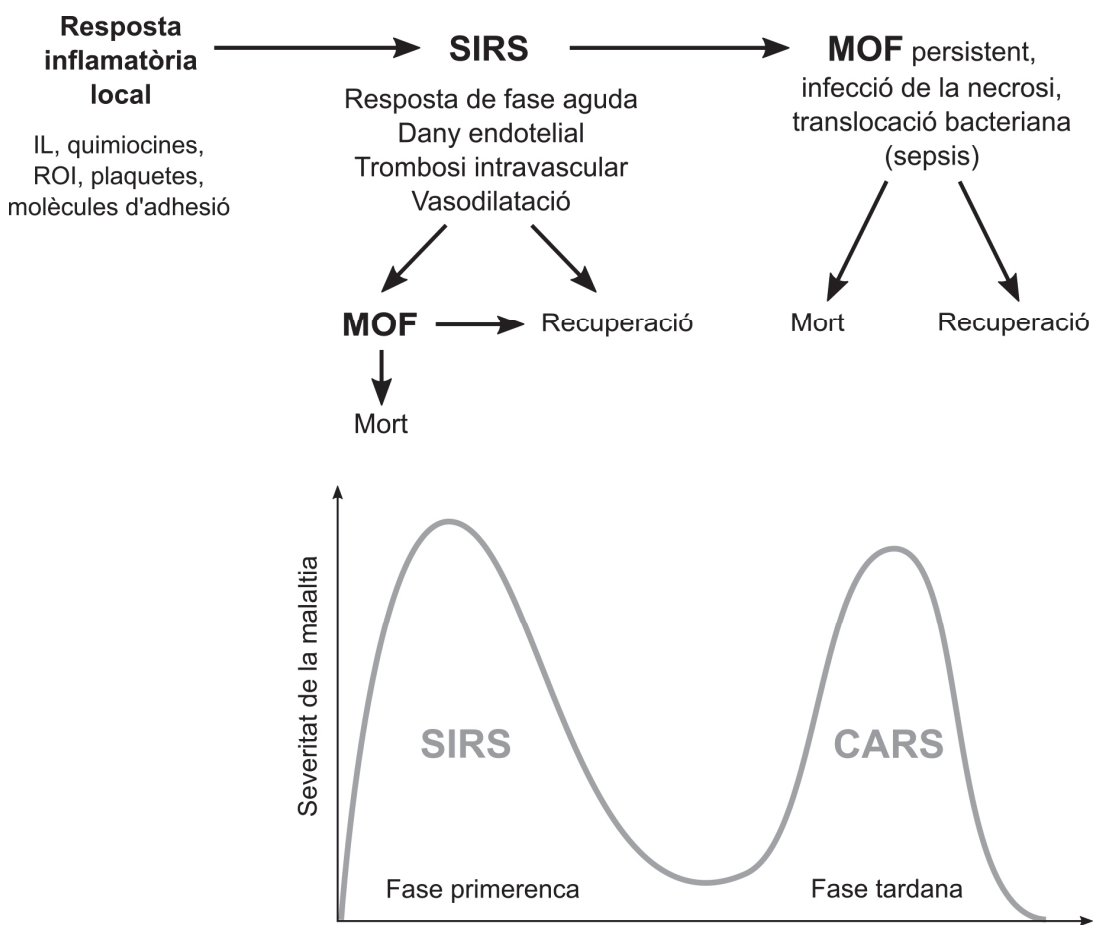


Figura 3. Progressió de la AP severa. Adaptat de [31,33].

2.3.2. Inflamació pulmonar

El pulmó és un dels òrgans més afectats en el transcurs de la AP severa. L'afectació pulmonar secundària a l'aparició de la AP es manifesta com a dany pulmonar agut i la seva variant més severa, ARDS. De fet, durant la primera setmana, la mortalitat dels pacients està associada en un 60 % a insuficiència respiratòria.

A nivell clínic, el dany pulmonar agut es caracteritza per una fase exudativa durant els primers 3 dies, en la qual s'altera la difusió alveolar, incrementa la necrosi dels pneumòcits tipus I i hi ha un gran infiltrat de cèl·lules inflamatòries i líquid. Posteriorment apareix una segona fase de tipus proliferativa, entre el 3r i 7è dia, basada en la reparació del teixit pulmonar, la hiperplàsia dels pneumòcits tipus II i la proliferació de fibroblasts [33,34].

Els mecanismes fisiopatològics que determinen la disfunció pulmonar es basen en el trencament de l'homeòstasi de la barrera alveolocapil·lar, la qual està formada per dues barreres separades: l'endoteli microvascular i l'epiteli alveolar. Durant la primera fase de la AP hi ha un increment de la permeabilitat dels capil·lars, que provoca edema intersticial, extravasació de leucòcits i engrossiment de la barrera alveolocapil·lar. En aquest punt, multitud de citocines i altres mediadors activen els macròfags pulmonars, els quals amplifiquen la resposta inflamatòria i indueixen la síntesi de mediadors proinflamatoris per part de les cèl·lules estructurals del pulmó [35]. El procés culmina amb hemorràgia intraalveolar, l'alteració de l'intercanvi de gasos i la conseqüent hipoxèmia.

Diferents estudis amb models animals de AP severa han permès definir millor la histopatologia del procés i els principals responsables de la lesió pulmonar. En el cas dels neutròfils, per exemple, s'ha observat que la seva depleció i el bloqueig de la seva adhesió amb anticossos contra CD18 disminueix la desestructuració del teixit i millora la taxa de supervivència [36]. Altres mecanismes, com les molècules d'adhesió, també semblen tenir un paper destacat en el dany pulmonar associat a la AP severa. S'ha demostrat que els radicals superòxid generats per la xantina oxidasa incrementen l'expressió de P-selectina a l'endoteli pulmonar, tot afavorint el reclutament de neutròfils i la producció de proteïnes d'estrès per part d'aquests, com la Hsp72 [37]. La deficiència d'una altra molècula d'adhesió, ICAM-1, també s'ha descrit que redueix la severitat de la malaltia i el dany pulmonar associat [38].

El paper del fetge és un altre dels factors clau per comprendre com la resposta inflamatòria local acaba provocant inflamació sistèmica i fallida pulmonar. Els mediadors inflamatoris pancreàtics i el PAAF de la cavitat peritoneal són drenats, en part, pel sistema portal hepàtic. Així doncs, el fetge està localitzat en un indret per on passen els mediadors generats a la cavitat peritoneal abans de ser alliberats a circulació sistèmica. Un conjunt d'estudis realitzats al nostre laboratori mostren que, en un model animal de AP induïda per taurocòlic, en realitzar una desviació porto-cava millora la inflamació pulmonar associada a la AP severa [39,40] (Figura 4). Aquest mètode, el qual evita que els mediadors recollits pel sistema portal passin pel fetge, posa de manifest que la inflamació sistèmica associada a la AP està molt relacionada amb aquest òrgan. S'ha demostrat, també, que aquests mediadors provenen del pàncrees i del fetge [41,42] i no del sistema intestinal [43]. Això suggereix que el fetge té un paper actiu durant la AP, alliberant mediadors inflamatoris a circulació sistèmica en resposta a la inflamació pancreàtica.

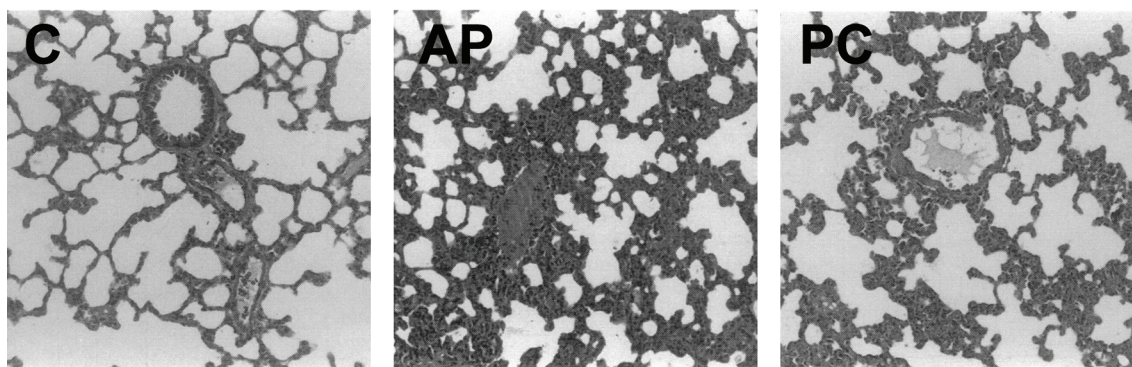


Figura 4. L'alteració del teixit pulmonar durant la AP es pot prevenir parcialment amb la desviació porto-cava, fet que reforça el paper actiu del fetge en la progressió de la malaltia. C, control; AP, pancreatitis aguda; PC, desviació porto-cava. Extret de [40].

2.3.3. Mediadors inflamatoris

Citocines

Els mediadors solubles, i en particular les citocines, són un dels factors més destacats en el desenvolupament de la resposta inflamatòria, ja que són transportades pel torrent sanguini cap a la resta d'òrgans del cos. En el marc de la AP severa, les citocines inflamatòries més rellevants són el factor de necrosi tumoral α (TNF- α), les interleucines (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 i IL-18, el factor activador de plaquetes (PAF) i diverses quimiocines, tals com IL-8, CCL2 i CCL5. Per altra banda, els mediadors de tipus antiinflamatori més

destacats són la IL-10, la IL-4 i el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1ra). El desequilibri entre les vies de secreció inflammatòries i antiinflammatòries és el que acaba provocant SIRS i dany multiorgànic [44].

El **TNF- α** és una de les citocines més potents que participen en la resposta inflammatòria durant la AP. Diferents estudis mostren que s'expressa en el transcurs de la malaltia tan a nivell pancreàtic com en altres òrgans, entre els quals destaquen el pulmó, el fetge i la melsa [42]. La unió al seus receptors activa la via dependent de NF κ B i altres vies de mort cel·lular, promovent l'exacerbació de la resposta inflammatòria i participant, probablement, en l'apoptosi cel·lular i necrosi dels teixits. Algunes teràpies amb anti-TNF- α o amb el receptor del TNF (TNFR-I) en models experimentals han mostrat resultats esperançadors, tot reduïnt l'edema, la inflamació i la mortalitat associats a la AP [45,46]. En pacients amb AP severa s'han detectat nivells elevats de TNF- α [47]; no obstant, la seva vida mitja curta en dificulta la detecció i l'establiment d'una clara correlació amb la severitat de la malaltia. El que sí s'ha demostrat és que el polimorfisme AG TNF- α -238 s'associa a MOF i a l'etiologia biliar de la malaltia [48].

La **IL-1 β** és l'altra citocina inflammatòria per antonomàsia en la AP. Mostra efectes sinèrgics amb el TNF- α , tot participant en l'inici de la cascada inflammatòria i activant l'endoteli. També s'expressa a nivell local i sistèmic durant el transcurs de la malaltia [42]. Activa diferents vies de senyalització, tot promovent l'expressió d'altres citocines i mediadors inflamatoris. Per exemple, indueix la translocació de NF κ B, així com la fosforilació de diversos components de la via de les MAPK [44]. En models experimentals, la inactivació de la IL-1 β ja sigui genèticament o amb antagonistes (IL-1ra) disminueix la mortalitat i els efectes histopatològics de la malaltia [35,49]. En pacients amb AP, tot i que presenten nivells elevats de IL-1 β en sèrum, els estudis en fase clínica amb diferents inhibidors no han aportat resultats esperançadors.

La resta de citocines que participen en la AP, si bé també tenen un paper destacat, no han estat tan estudiades. La **IL-6**, produïda pels leucòcits activats i les cèl·lules endotelials, promou l'alliberament de proteïnes de fase aguda per part dels hepatòcits [44]. Alguns estudis apunten que pot ajudar a predir la severitat de la AP, ja que té un pic d'expressió 72 h després de l'aparició dels signes clínics de la malaltia i la seva detecció es pot fer amb gran sensibilitat i especificitat [31]. A més, el polimorfisme CC IL-6-174 s'ha associat amb fallida orgànica en pacients amb AP severa [48]. La **CCL2**, també coneguda com a proteïna quimiotàctica de macròfags 1 (MCP-1), participa activament en el reclutament de macròfags i per tant, en l'expansió de la resposta

inflamatòria als diferents òrgans. El seu bloqueig s'ha considerat com una possible estratègia per frenar aquest procés [33]. La **IL-10** és la citocina antiinflamatòria més estudiada en la AP. A nivell experimental, els tractaments amb agonistes disminueixen el dany pulmonar i la mortalitat, mentre que en models *knock-out* s'ha observat un increment dels mediadors inflamatoris i de la severitat de la malaltia [50]. Malgrat ser un potent antiinflamatori, és una citocina bastant pleiotròpica que de vegades s'ha associat a alta mortalitat, sobretot en malalties infeccioses [44].

Mediadors lipídics

La necrosi del teixit adipós és un dels signes més comuns de la AP severa. Els alts nivells de lipasa alliberats pel pàncrees provoquen la hidròlisi del greix peripancreàtic i visceral, i l'alliberament d'una gran multitud de mediadors lipídics tant a nivell local com al torrent sanguini. L'estudi de la toxicitat d'aquests mediadors, juntament amb el fet que l'obesitat incrementa el risc de patir una variant severa de AP, els ha anat convertint al llarg dels últims anys en una diana a considerar en la predicció de la severitat de la malaltia.

Diversos estudis realitzats amb extractes lipídics provinents del teixit adipós necròtic han intentat definir quin és el paper d'aquests mediadors durant la AP. S'ha descrit que provoquen mort cel·lular i que potencien la resposta inflamatòria [51], ja que polaritzen els macròfags cap a un fenotip inflamatori tot bloquejant l'activació de les vies antiinflamatòries [52,53].

La major part dels lípids són àcids grassos lliures provinents de la hidròlisi dels triglicèrids, dels quals els àcids grassos insaturats (UFAs) semblen ser els més nocius. En estudis *in vitro* s'ha vist que els UFAs activen les cèl·lules acinars pancreàtiques, tot provocant inflamació i necrosi [54]. Paral·lelament, diversos estudis *in vivo* han confirmat la seva toxicitat i importància en el desenvolupament de la malaltia, afirmant que la lipòlisi del greix peripancreàtic és el que determina que una AP moderada esdevingui severa [55,56]. Així mateix, en un model animal d'obesitat s'ha vist que la inhibició de la lipòlisi millora l'evolució de la AP tot frenant el dany renal i pulmonar, la inflamació i reduint la mortalitat [54].

Un dels potencials dels UFAs és la presència de dobles enllaços, que els permet reaccionar i ser modificats. Durant la AP, els UFAs són capaços de reaccionar amb l'àcid hipoclorós produït pels neutròfils, tot generant àcids grassos halogenats. El nostre

grup de recerca va ser el primer a detectar-los tant en un model animal de AP severa com en plasma de pacients i a definir-ne el seu potencial proinflamatori [57].

2.3.4. Paper dels macròfags en la AP

Els macròfags són un dels tipus cel·lulars més versàtils del sistema immunitari, capaços de produir una gran varietat de mediadors inflamatoris i mobilitzar més leucòcits cap al focus inflamatori. La seva gran plasticitat els ha convertit en una diana terapèutica i en un dels principals objectes d'estudi a l'hora d'intentar controlar la resposta inflamatòria sistèmica derivada de la AP.

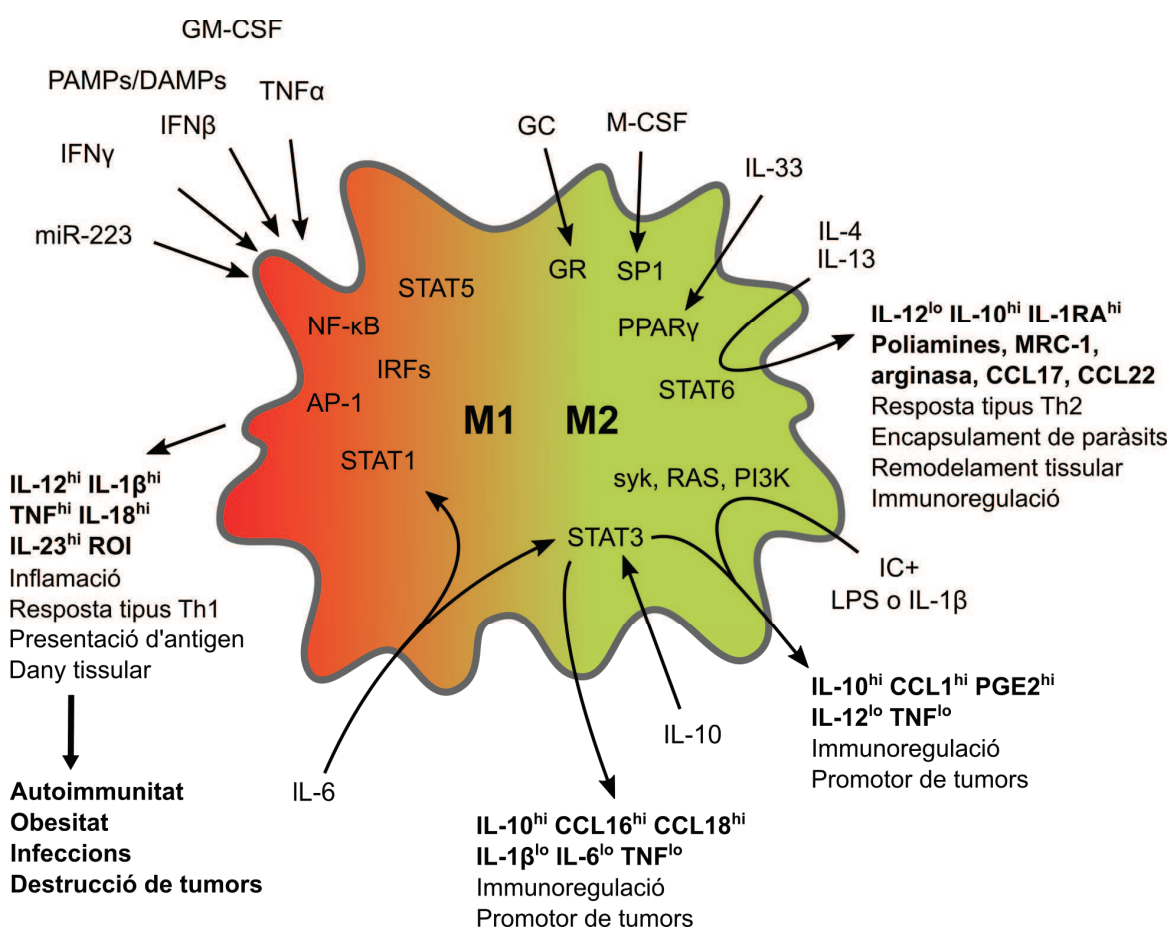


Figura 5. Esquema de la polarització dels macròfags cap a fenotips de tipus M1 o M2, els quals coexisteixen i se solapen. CSF, factor estimulador de colònies; GC, glucocorticoides; IRFs, factors reguladors de l'interferó; IC, immunocomplexes; LPS lipopolisacàrid; MRC-1, receptor de la mannanosa; ROI, espècies reactives d'oxigen. Adaptat de [58,59].

Fa gairebé dues dècades que es va crear un marc conceptual per tal de classificar els macròfags segons el seu estat d'activació. La proposta, de la mà de Mill i col·laboradors, es basava en la resposta dels macròfags davant d'estímuls inflamatoris clàssics com el LPS i l'interferó-gamma (IFN γ), o estímuls de tipus antiinflamatori i de resposta a al·lèrgens i paràsits (IL-4, IL-13). Per analogia amb la classificació Th1-Th2 dels limfòcits es van establir dues categories: els macròfags **M1**, d'activació "clàssica" proinflamatòria, i els **M2**, d'activació "alternativa" [60]. Posteriorment la classificació M2 es va diversificar en tres subtipus: la M2a, de caire antiinflamatori i de resposta a patògens, la M2b, de resposta a immunocomplexes i naturalesa immunoreguladora, i la M2c, de reparació i remodelació tissular. La primera classificació M1/M2, però, data de l'època pre-genòmica, en la qual es van fer servir molt pocs marcadors per definir la resposta dels macròfags davant diferents estímuls. Els avenços científics demostren que la polarització dels macròfags és molt més complexa i que s'ha d'entendre com un espectre d'activació [59,61]. De fet, avui en dia s'accepta que les respostes M1 i M2 no s'exclouen l'una a l'altra sinó que, fins i tot, coexisteixen en un equilibri dinàmic (Figura 5).

A nivell tissular existeixen poblacions de macròfags residents, indispensables pel manteniment de l'homeòstasi tissular i per l'inici d'una ràpida resposta davant de qualsevol dany. Les diferents poblacions, presents al teixit des de l'etapa neonatal, s'autoperpetuen i tenen funcions específiques per al nínxol que ocupen. Gràcies al gran ventall de receptors que tenen contra patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) i associats a dany (DAMPs) són capaces de censar l'ambient i, en condicions inflamatòries, reclutar monòcits del torrent sanguini [62]. En el marc de la AP, les poblacions de macròfags més rellevants són els macròfags peritoneals, els alveolars i les cèl·lules de Kupffer.

Durant la AP, els **macròfags peritoneals** presenten un perfil d'activació proinflamatori a través de l'expressió de TNF- α , IL-1 β i òxid nítric (NO), entre altres [63,64]. En experiments *in vitro* s'ha demostrat la seva plasticitat, ja que còctels de citocines de tipus M2 poden revertir-ne el fenotip. No obstant, els tractaments amb citocines no són efectius per polaritzar-los *in vivo* a causa de l'alta activitat hidrolítica del PAAF [63]. És important, però, trobar noves maneres de controlar-los. En estudis en els quals es deplecionen els macròfags peritoneals s'observa com la resposta inflamatòria a nivell sistèmic és molt menor, evidenciant el paper d'aquestes cèl·lules en el procés SIRS que caracteritza la AP [65].

Les **cèl·lules de Kupffer**, residents al teixit hepàtic, participen en l'homeòstasi del ferro i del metabolisme lipídic. No obstant, quan els mediadors inflamatoris generats pel pàncrees arriben al fetge, s'activen i amplifiquen l'alliberament de citocines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), radicals superòxid i eicosanoids al torrent sanguini [66]. Diferents estudis demostren que el bloqueig de les cèl·lules de Kupffer disminueix la quantitat de citocines en circulació i la inflamació a nivell pulmonar [67,68]. Així doncs, la mortalitat en la AP severa pot estar relacionada, en part, amb l'alliberament secundari de citocines hepàtiques per part de les cèl·lules de Kupffer. Cal tenir en compte, però, que hi ha mecanismes independents de l'activació hepàtica que participen en l'extensió de la SIRS. Per exemple, s'ha demostrat que l'expressió de P-selectina a l'endoteli pulmonar no depèn de l'activació de les cèl·lules de Kupffer i per tant, aquestes no influencien l'extravasació neutrofílica a pulmó [41].

Els **macròfags alveolars** són considerats un dels principals inductors de l'ARDS que caracteritza la AP severa [40]. Són cèl·lules amb una gran capacitat de resposta, ja que són els *sentinelles* del sistema immunitari per fer front als patògens que entren a través de les vies respiratòries. Durant la AP adopten un fenotip proinflamatori a través de l'activació de vies dependents de NF κ B i la proteïna activadora 1 (AP-1). Això promou la secreció de diversos mediadors inflamatoris (NO, TNF- α , MIP-2, IL-1 β , Hsp72), els quals participen en el reclutament de leucòcits i el dany pulmonar [66,69]. Tanmateix, a nivell pulmonar hi ha altres poblacions de macròfags residents, els **macròfags intersticials**, els quals tenen una resposta diferent durant la malaltia. En un model animal s'ha demostrat que, mentre que els alveolars adopten un fenotip proinflamatori durant les fases inicials, els intersticials es polaritzen cap a un perfil de tipus M2 en fases més tardanes, a través de l'activació del receptor nuclear PPAR γ i la secreció de citocines com la IL-10 [69].

2.4. REG3 β

Al anys vuitanta, el grup de Keim i col·laboradors va descriure la presència d'una nova proteïna en el suc pancreàtic de rates amb AP [70]. No la van detectar en condicions normals, però la seva concentració augmentava fins a 100 vegades durant la fase aguda de la malaltia [71], es mantenia elevada durant 3-4 dies i desapareixia quan finalitzava el procés inflamatori, motiu pel qual va ser denominada *pancreatitis-associated protein* (PAP). Es va observar que la proteïna es sintetitzava al reticle endoplasmàtic rugós de les cèl·lules acinars i s'emmagatzemava en grànuls de zimògens abans de ser secretada, de manera similar a altres proteïnes de secreció del pàncrees. Anys més

tard, el grup de Lasserre i col·laboradors va identificar una altra proteïna. En condicions normals només era detectable a l'intestí prim i al pàncrees, però en canvi se sobreexpressava en 9 de 27 carcinomes hepatocel·lulars, per la qual cosa va rebre el nom de HIP (*Hepatocarcinoma Intestine Pancreas*) [72]. El clonatge i seqüenciació de la PAP tant en rata com en humans [73,74] va permetre arribar a la conclusió que tant la PAP com la HIP eren la mateixa proteïna.

Paral·lelament, s'havia descrit una proteïna que només s'expressava en illots pancreàtics en procés regeneració i no pas en condicions normals, el *regenerating factor* (REG) [75]. Estudis posteriors van demostrar que el gen *Reg* estava molt conservat en ratolí, rata i humana, i que moltes altres proteïnes hi tenien un cert grau d'homologia, incloent la proteïna PAP/HIP [76]. Anys més tard totes aquestes proteïnes es van renomenar i agrupar sota la família REG, dividida en 4 subfamílies (*Reg* I-IV) segons el seu grau d'homologia [77]. Gairebé totes les proteïnes REG s'expressen de manera constitutiva al sistema gastrointestinal (intestí prim, pàncrees o fetge) i a nivell genètic el seu locus està molt conservat.

Les diferents nomenclatures històriques i la no correspondència en el nom dels gens ortòlegs poden dificultar la comprensió d'aquesta classificació. Els diferents estudis d'homologia han clarificat que la proteïna humana PAP/HIP/REG3A és l'ortòleg de REG3 β en ratolí i REG3 β en rata (Taula I). Per evitar confusions, la proteïna ha estat anomenada sempre **REG3 β** (*Regenerating islet-derived 3 beta*) al llarg d'aquest l'estudi.

Taula I. Nomenclatura de la proteïna REG3 β en diferents espècies

Espècie	Nom	Altres noms	Entrez ID	UniProt ID
Humà	REG3A	HIP, PAP1, PBCGF, REG-III, REG3	5068	Q06141
Ratolí	REG3 β	PAP1, Pap, RegIII (beta), REG-III	18489	P35230
Rata	REG3 β	Pap1, Pap, REG-3-beta, REG-2	24618	P25031

2.4.1. Estructura

REG3 β és una proteïna petita, de tan sols 16 kDa, que pertany a la família de les lectines tipus C, les quals són dependents de calci (Figura 6). Gràcies a la presència d'un ió Ca²⁺ poden unir-se als carbohidrats de les glicoproteïnes, tot coordinant els grups

hidroxil de l'anell dels sucres amb el seu lloc d'unió, el CRD (Domini de reconeixement de carbohidrats) [78]. Donat que el seu CRD depèn de calci, en el cas de les lectines de tipus C el domini s'anomena CTLD (*C-Type Lectin Domain*). REG3 β és la lectina tipus C més petita que existeix, ja que a part del domini CTLD només té un pèptid de senyalització a l'extrem N-terminal [79]. A més, també és l'única lectina tipus C secretada en mamífers.

SOLUBLES

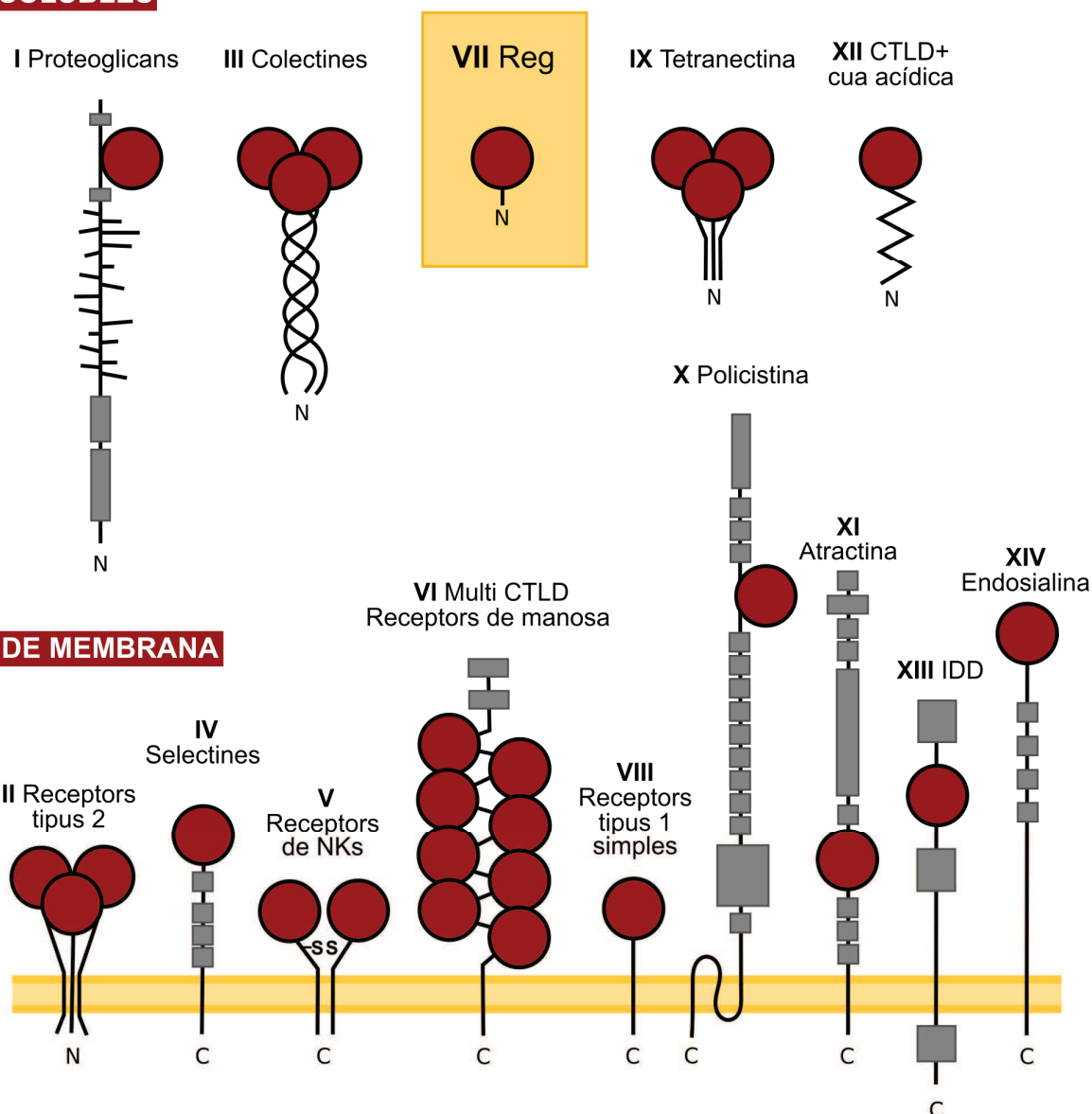


Figura 6. Membres de la família de les lectines tipus C, amb el domini d'unió a sucres CTLD (cercle vermell). *IDD*, síndrome de Di George. Adaptat de [78,80].

Avui en dia encara es desconeix el receptor de REG3 β , tot i que per les similituds observades amb altres vies de senyalització s'assumeix que depèn de la glicoproteïna

130 (gp130). Diferents estudis han demostrat que REG3 β s'expressa en resposta a citocines de la família de la IL-6 [81] i que senyalitza a través de la via JAK2/STAT3 [82,83], processos normalment dirigits per gp130. A més, és una proteïna que per retroalimentació positiva indueix la seva pròpia expressió [84], igual que les vies que depenen de gp130.

Pel que fa a la seva capacitat d'unió a carbohidrats, els experiments amb bateries de mono- di- i polisacàrids han demostrat que REG3 β no és capaç d'unir-se a sucres monomèrics tals com la mannososa, la sucrosa, la fucosa o la galactosa, però en canvi sí que interacciona amb sucres més complexos com la N-acetilglucosamina (NAG) o el mannà, un polímer de mannososa [85].

2.4.2. Funcions fisiològiques

La glicosilació de les proteïnes és una de les modificacions post-traduccionals més comunes i una de les més rellevants en el camp de la senyalització cel·lular. Els carbohidrats participen en múltiples processos, com ara el trànsit de proteïnes, l'adhesió cel·lular, el contacte cèl·lula-cèl·lula o el reconeixement immune. És per això que la capacitat de REG3 β d'unir-se a aquests carbohidrats la converteix en una proteïna amb un paper potencialment significatiu en tots aquests processos.

Resposta inflamatòria

REG3 β és una proteïna que s'expressa en diverses condicions inflamatòries o immunocompromeses. A banda de la AP, també s'ha detectat que se n'incrementa la síntesi durant la malaltia de Crohn, la colitis ulcerosa, la malaltia inflamatòria intestinal (IBD), alguns adenocarcinomes (gàstric, colorectal, tracte biliar, hepatocel·lular, pancreàtic) i la malaltia d'Alzheimer [86–89]. Els primers indicis sobre el possible paper de REG3 β en la resposta inflamatòria apareixen ja a nivell genètic, ja que a nivell de promotor hi té elements de resposta a IL-6 [90]. A més, experimenta una forta inducció en resposta a citocines inflamatòries com IFN γ , TNF- α i IL-6 [90,91], motiu pel qual inicialment es va catalogar com a proteïna de fase aguda.

Posteriorment, però, diferents estudis van acabar de definir el seu paper com a molècula amb propietats antiinflamatòries. El bloqueig de la síntesi de REG3 β empitjora els signes de la AP i exacerba l'activació leucocitària en el model animal [92]. A nivell molecular, se sap que REG3 β inhibeix l'activació de NF κ B i, en conseqüència, la producció de citocines i de molècules d'adhesió que en depenen [87]. A més, ho fa a través d'un

mecanisme dependent de la via JAK2-STAT3 similar al de la citocina antiinflamatòria IL-10 [83,84]. També se sap que REG3 β actua a través d'altres vies de transducció de senyals relacionades amb la resposta inflamatòria, tals com les MAPK [93–95].

Oponització de bacteris

En condicions normals REG3 β s'expressa a les cèl·lules de Paneth, però encara no es coneix del tot per què se'n requereix la seva expressió constitutiva a nivell intestinal. A causa del seu domini lectina, una de les hipòtesis amb més suport defensa el paper de REG3 β en el control de la flora intestinal. S'ha demostrat que REG3 β és capaç d'unir-se a la paret dels bacteris i induir-ne l'opsonització [96] i que incrementa dràsticament durant la colonització de l'intestí d'animals *germ-free* [97]. Sembla ser, doncs, que REG3 β pot estar participant en el manteniment de l'homeòstasi i la relació comensal amb els bacteris residents a l'intestí.

Regeneració i mitogènesi

Tots els membres de la família *Reg*, tal i com el seu nom indica, estan involucrats en processos de proliferació, regeneració i diferenciació, els quals són necessaris quan hi ha dany cel·lular o una resposta inflamatòria. Pel que fa a REG3 β , s'ha descrit que promou l'adhesió dels hepatòcits a proteïnes de la matriu extracel·lular [98] i que actua com a factor de creixement de motoneurons [81], cèl·lules de Schwann [99], cèl·lules epitelials intestinals [100], queratinòcits [101] i hepatòcits [102]. A més, en condicions de citotoxicitat protegeix les cèl·lules pancreàtiques i hepàtiques de morir per apoptosi [103,104] i té un fort efecte neuroprotector [105].

2.4.3. REG3 β en malalties pancreàtiques

En el pàncrees sa, REG3 β s'expressa constitutivament a les cèl·lules α dels illots de Langerhans [98]. En canvi, en el pàncrees exocrí, REG3 β bàsicament s'expressa quan hi ha un dany a les cèl·lules acinars [73].

En el marc de la AP hi ha certes contradiccions a l'hora d'interpretar el paper de REG3 β , ja que té un efecte dual. En models experimentals *knock out* de REG3 β s'ha observat com la severitat de la malaltia disminueix (hi ha menys necrosi pancreàtica) però, al mateix temps, la resposta inflamatòria és major. Mitjançant l'administració de REG3 β exògena és possible revertir el fenotip inflamatori i apoptòtic de la malaltia [106], fet que sembla indicar que REG3 β tindria un efecte protector en el transcurs de la AP. Altres estudis *in vivo* han demostrat, en la mateixa línia, que el bloqueig de REG3 β amb

anticossos específics empitjora la progressió de la malaltia [94,107], incrementant la inflamació, la necrosi i la infiltració de leucòcits. En conjunt, aquests estudis suggereixen que REG3 β actua a través de mecanismes antiinflamatoris (Figura 7).

Arran de l'increment de REG3 β circulant durant la AP es va plantejar el seu possible paper com a biomarcador de severitat. No obstant, tot i que nivells més elevats de REG3 β en sèrum es correlacionen amb pancreatitis de major gravetat [88,108], la detecció no és prou sensible com per diferenciar les AP lleus de les greus ni suposa cap avenç respecte el mètode clàssic de detecció de la proteïna C reactiva. Per aquest motiu s'ha descartat el seu possible paper com a marcador de lesió pancreàtica [109].

Una situació d'inflamació pancreàtica recurrent pot acabar cronificant i desembocar en un procés de pancreatitis crònica (CP), el qual és un factor de risc del PDAC. Tot i que els mecanismes que regulen la transició d'inflamació a càncer encara no es coneixen del tot, se sap que la sinèrgia entre la mutació dels oncogens i els mediadors proinflamatoris és essencial perquè s'iniciïn els processos neoplàsics.

REG3 β és sintetitzada per les cèl·lules acinars durant la fase inicial de desdiferenciació cel·lular, però va disminuint de manera gradual a mesura que avança el procés tumoral. De fet, quan el PDAC està completament establert, les cèl·lules tumorals no fabriquen REG3 β sinó que ho fan les cèl·lules acinars sanes adjacents a la massa tumoral, probablement degut a l'estrès a què estan sotmeses [110] (Figura 7). En aquest estadi, els pacients amb PDAC tenen nivells elevats de REG3 β en sèrum i suc pancreàtic [82].

A nivell molecular, se sap que el procés de desdiferenciació acinar està molt condicionat per l'activació de la via IL17A-REG3 β -gp130-JAK2-STAT3 [83,110]. Diferents estudis han descrit que REG3 β incrementa la proliferació de les cèl·lules canceroses [82,111], i que probablement ho fa activant l'expressió de gens com JAK1, STAT3, IL10, FOXM1, KRAS, MYC, CyclinD1 o c-fos [112]. A més, REG3 β reforça l'estroma de la massa tumoral, tot promovent l'angiogènesi i la polarització dels macròfags cap a un fenotip de tipus TAM (*Tumor Associated Macrophages*) [82].

Tot i que sembla tenir diverses funcions i cap d'elles específica, REG3 β és una molècula clau en la progressió de CP cap a PDAC: s'ha demostrat que en un model animal *knock out* de KRAS, la inactivació genètica de REG3 β disminueix dràsticament l'aparició de tumors, fenotip que es pot reestablir amb l'administració exògena de REG3 β [110].

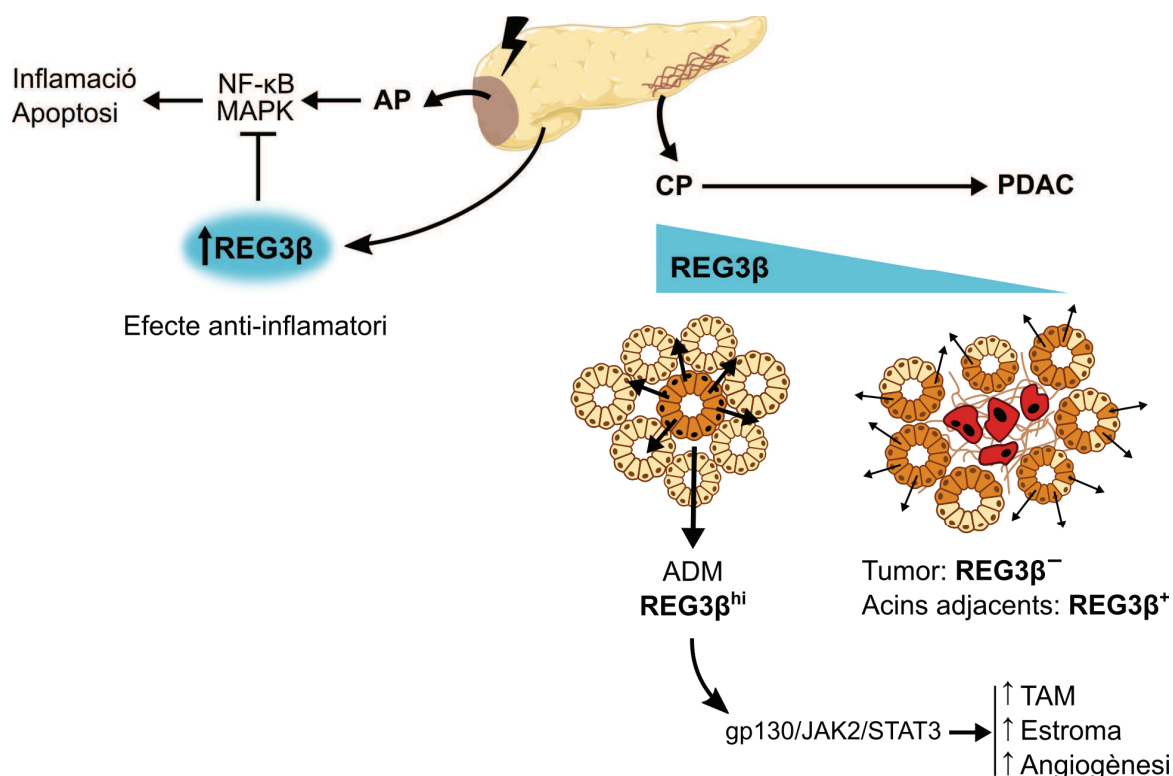


Figura 7. Paper de REG3 β en malalties pancreàtiques. El seu potencial antiinflamatori i anti-apoptòtic ajuda a reduir la inflamació associada a AP. Contràriament, en el cas de la CP afavoreix la transformació de les cèl·lules acinars, la conformació d'un estroma fibrós i l'establiment d'una resposta immune pro-tumoral. ADM, metaplàsia d'acinar a ductal; AP, pancreatitis aguda; CP, pancreatitis crònica; PDAC, adenocarcinoma pancreàtic; TAM, macròfags associats a tumor.

3. EXOSOMES

Els processos de comunicació intercel·lular són essencials en els organismes pluricel·lulars i poden ser mediat per contacte directe cèl·lula-cèl·lula o a través de mediadors solubles. No obstant, durant les últimes dues dècades ha pres protagonisme un tercer mecanisme basat en la transferència de vesícules extracel·lulars [113]. Aquestes vesícules, anomenades **exosomes**, són partícules esfèriques delimitades per una bicapa lipídica que conformen un sistema vesicular molt conservat evolutivament. S'han detectat en una gran varietat de fluids biològics tals com sang, orina, semen, saliva, ascites tumoral, líquid amniòtic, llet materna, bilis o líquid cefaloraquídi, i en múltiples condicions tant fisiològiques com patològiques [114].

El terme *exosoma* va ser emprat per primer cop als anys vuitanta per definir una població de vesícules, d'entre 40 i 1000 nm, que eren "exfoliades" de la membrana cel·lular i que tenien activitat 5' nucleotidasa [115]. A finals de la dècada, però, el terme es va redefinir. El grup de Johnstone i col·laboradors va detectar que els reticulòcits, en el seu procés de maduració cap a eritròcits, alliberaven vesícules d'origen endosomal. Aquests "nous" exosomes, d'entre 30 i 100 nm, es generaven en cossos multivesiculars (MVB) i contenien el receptor de la transferrina, un marcador de membrana que es descarta en el procés de maduració [116]. Per aquest motiu, els exosomes van ésser considerats un sistema d'excreció i reciclatge de proteïnes de membrana innecessàries pel metabolisme cel·lular, i el seu interès va disminuir. No va ser fins a finals dels anys noranta que es va descobrir que els limfòcits B i les cèl·lules dendrítiques també alliberaven exosomes, i que la seva composició proteica diferia molt de la composició de la membrana plasmàtica [117,118]. Aquests estudis van confirmar l'origen endosomal dels exosomes i els van atribuir, per primer cop, funcions de transport i comunicació intercel·lular.

3.1. Caracterització

3.1.1. Mida i morfologia

Els exosomes són vesícules nanomètriques d'entre 30 i 150 nm de diàmetre. La seva mida està condicionada tant per la pròpia bicapa lipídica, la rigidesa de la qual no permet que es formin estructures de menys de 30 nm, com pel seu origen, ja que els compartiments endosomals on s'emmagatzemen tenen una mida d'entre 300 i 500 nm [119]. Tot i que són vesícules esfèriques, amb els mètodes clàssics de visualització per microscòpia electrònica solen adoptar una forma còncava de "copa", la qual és un artefacte dels mètodes de fixació i contrast. Per crio-microscòpia electrònica és possible observar-les en la seva estructura nativa, ja que mitjançant mètodes de vitrificació s'evita la deformació de les membranes [113].

3.1.2. Composició

L'estudi dels exosomes és un camp en continu creixement i evolució. No totes les poblacions d'exosomes són iguals, la seva composició pot ser molt variable segons el tipus cel·lular d'origen o l'estat metabòlic en el qual han estat secretades. A més, alguns dels mètodes d'immuno-aïllament emprats al llarg dels últims anys han provocat un biaix en l'estudi d'aquestes nanovesícules, ja que la selecció de determinats exosomes amb

marcadors de membrana comporta el descart de la resta de subpoblacions [114]. Per tot això, la composició exacta dels exosomes encara es desconeix avui en dia i tan sols podem fer-ne una aproximació amb els resultats dels diferents treballs publicats.

Proteïnes

Els exosomes contenen dos grans tipus de proteïnes: aquelles que depenen del tipus cel·lular que els ha secretat, de naturalesa molt variable, i les que es troben a la majoria de poblacions d'exosomes independentment del tipus cel·lular d'origen, les quals se solen fer servir per identificar-los [114].

Al llarg dels últims anys s'ha pogut identificar quines proteïnes formen part dels exosomes mitjançant mètodes com el Western Blot o les anàlisis de proteòmica. Solen ser proteïnes relacionades amb la formació dels MVB (Alix, TSG101, Syntenines), amb funcions específiques de transport i fusió de membrana (GTPases, Annexines, Flotilines), molècules d'adhesió associades a microdominis (tetraspanines, ADAM10, integrines), proteïnes presentadores d'antigen com el complex major d'histocompatibilitat II (MHC-II) o de naturalesa estructural, entre d'altres (Figura 8) [113,114,119]. A més, s'ha demostrat també la presència de proteïnes glicosilades a la membrana [120], les quals són especialment rellevants en els processos de selecció del contingut exosomal [121], així com en el reconeixement i captació dels exosomes per part de les cèl·lules diana [122].

Tanmateix, un dels principals problemes i tema de controvèrsia és quines d'aquestes proteïnes poden servir com a marcador d'exosomes, ja que moltes d'elles també formen part d'altres tipus de vesícules extracel·lulars. De la mateixa manera, és important saber quines proteïnes no formen part dels exosomes, ja que la seva presència indica que hi ha hagut un creuament entre poblacions vesiculars d'origens diferents. Els estudis més recents proposen que, per una correcta identificació, s'ha de demostrar l'origen endosomal dels exosomes (amb la coexistència de tetraspanines i molècules participants en la formació dels MVB) i alhora descartar la presència de proteïnes específicament nuclears, mitocondrials, de reticle endoplasmàtic o de Golgi [113,123]. L'absència de marcadors d'altres compartiments, com la Calnexina o la GP96, denota que els exosomes són un sistema de tràfic vesicular específic i no pas una mescla descontrolada i aleatòria de fragments subcel·lulars [114].

Àcids nucleics

No va ser fins l'any 2007 que es va descriure, per primer cop, la presència d'àcids nucleics a l'interior dels exosomes [124]. En aquell primer estudi es van detectar RNAs missatgers (mRNAs) de fins a 1300 gens, els quals no eren presents a les cèl·lules d'origen dels exosomes i que, a més, un cop incorporats a les cèl·lules diana eren funcionals. També es van detectar altres RNAs petits, entre els quals els micro RNAs (miRNAs). Arran d'aquests resultats, els exosomes van passar a ser considerats un sistema "llançadora" no només de proteïnes sinó també d'àcids nucleics, motiu pel qual el grup de Valadi i col·laboradors va encunyar el terme esRNAs (*exosomal shuttle RNAs*).

Actualment se sap que els exosomes transporten mRNAs i miRNAs a l'espai intraluminal, protegits de les ribonucleases. Aquests RNAs no són encapsulats de manera aleatòria, sinó que tenen petites seqüències de reconeixement que indiquen que han de ser exportats [125,126]. Així doncs, els exosomes transporten de manera selectiva i dirigida els RNAs cap a les cèl·lules diana, on exerciran diverses funcions. Els mRNAs poden ser traduïts i donar lloc a proteïnes, mentre que els miRNAs funcionen bàsicament com a inhibidors de la traducció de les seves dianes. Alguns estudis també afirmen haver detectat la presència d'altres RNAs no codificants en vesícules extracel·lulars, tals com l'Y-RNA, vault-RNA, RNA de transferència (tRNA) o RNAs d'interferència petits (siRNAs) [113,114], tot i que encara hi ha certa controvèrsia respecte el seu origen exosomal [114].

El descobriment dels RNAs intraexosomals ha posat de manifest que la transferència de material genètic no és només cosa d'organismes procariotes, sinó que també forma part dels processos fisiològics i patològics dels eucariotes [127].

Lípids

Contràriament a la gran quantitat d'informació de la que disposem sobre la composició proteica i de RNAs dels exosomes, avui en dia encara hi ha molt pocs estudis que hagin analitzat el perfil lipídomic d'aquestes vesícules. Inicialment es considerava que la composició lipídica de la membrana dels exosomes no era gaire diferent de la membrana plasmàtica de la cèl·lula d'origen [128], ja que contenia lípids tan clàssics com el colesterol o la fosfatidilserina. Tanmateix, els estudis més recents han demostrat no només que la membrana exosomal difereix de la cel·lular [129], sinó que a més els lípids són una part molt representativa dels exosomes: en comparació amb les cèl·lules, els exosomes tenen fins a 8 vegades més lípids per mil·ligram de proteïna [130].

Els principals lípids presents a la membrana dels exosomes són l'esfingomielina, la fosfatidilserina, el colesterol, les ceramides i els àcids grassos saturats de cadena llarga (Figura 8) [114,119]. Aquests lípids no són específics dels exosomes, sinó que també són presents a les membranes cel·lulars però en proporcions molt diferents. Concretament, els exosomes tenen fins a 15 vegades més colesterol, glicoesfingolípid, fosfatidilserina i esfingomielina que no pas les membranes cel·lulars [130]. Aquesta composició lipídica és similar, però no idèntica, a la de les basses lipídiques (*lipid rafts*) presents a la membrana cel·lular [113,119,129]. L'alt grau de glicosilació d'alguns d'aquests lípids, a més, els postula com a possibles biomarcadors o com a molècules clau en determinats processos de senyalització [130]. Totes aquestes diferències evidencien, doncs, que la síntesi dels exosomes és complexa i que requereix un procés de selecció del seu contingut a tots els nivells, tant proteic com lipídic.

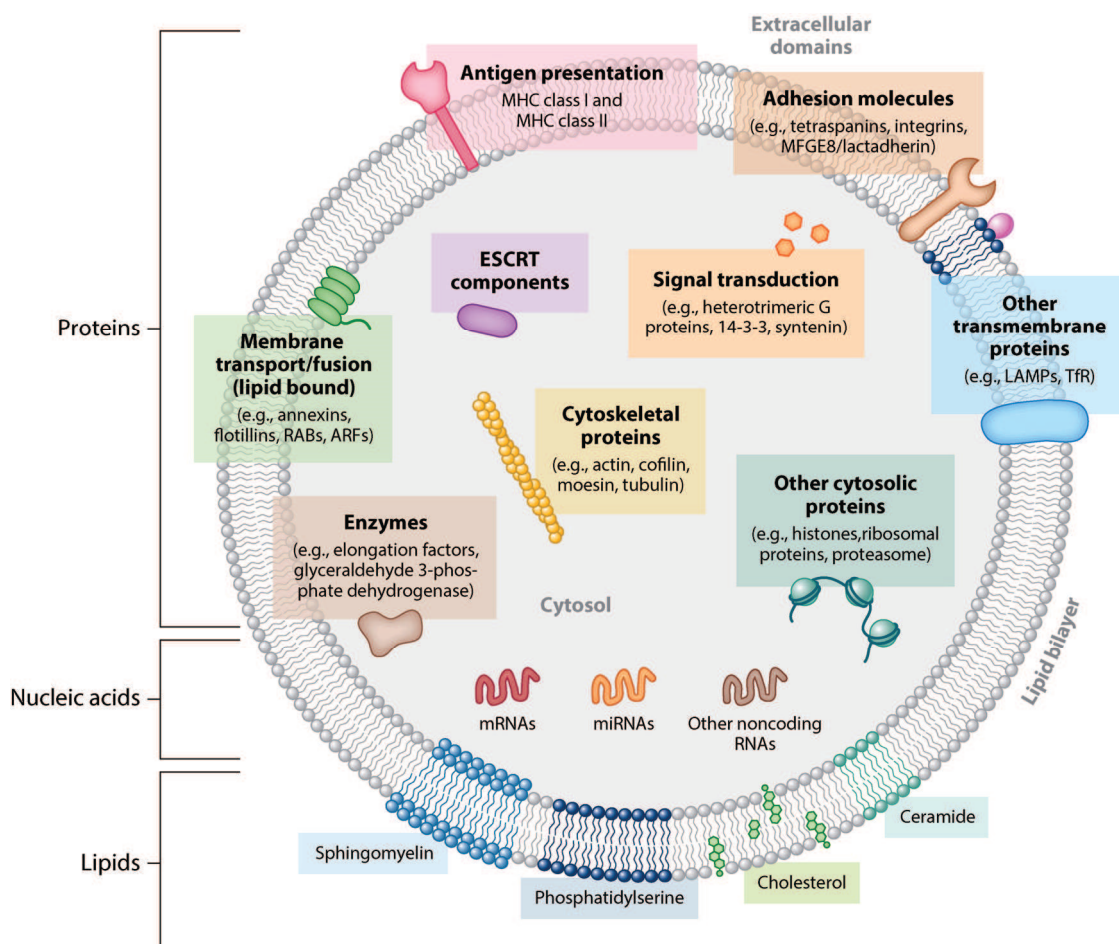


Figura 8. Representació dels components dels exosomes (proteïnes, lípids i àcids nucleics), així com de la seva localització i orientació a la membrana [114].

3.1.3. Mètodes d'aïllament

Avui en dia existeixen diferents mètodes per aïllar exosomes, els quals s'han anat modificant i combinant entre ells per tal d'aconseguir una població el més pura i homogènia possible.

El mètode més clàssic és el d'aïllament per **ultracentrifugació** [131]. Es basa en la centrifugació diferencial de les vesícules extracel·lulars, descartant les de mida gran (les quals sedimenten a baixa velocitat) i seleccionant les de mida petita, entre les quals trobem els exosomes, que sedimenten a 100,000 xg. Malgrat tot, amb aquest mètode hi poden haver contaminacions d'agregats proteics i altres partícules que també sedimentin a la mateixa velocitat de centrifugació. Per solventar-ho, el mètode d'ultracentrifugació es combina normalment amb la realització d'un coixinet o **gradient de densitat** de sucrosa o iodixanol [123], ja que la densitat a la qual s'equilibren els exosomes és coneguda. Un cop ultracentrifugat el gradient, es pot recuperar la fase en la qual suren els exosomes de manera selectiva.

Els mètodes d'aïllament comercials es basen en la **immunocaptura** dels exosomes aprofitant alguns dels seus marcadors de membrana, com ara les tetraspanines [123,131]. Tot i que permeten obtenir una població més homogènia de vesícules, el seu ús aïllat (i no pas en combinació amb els mètodes anomenats anteriorment) pot no ser recomanable, ja que no s'ha descrit encara cap marcador que sigui present únicament i exclusiva a la membrana dels exosomes [123]. També hi ha altres mètodes, tot i que menys emprats, que es basen en **l'aïllament amb lectines** [132–134]. L'alt grau de glicosilació de les membranes dels exosomes [135] fa que aquests puguin ésser capturats amb proteïnes d'unió a carbohidrats com les lectines, que solen tenir una alta especificitat d'unió.

3.2. Biogènesi

Els exosomes es formen a l'interior dels MVB com a resultat de la invaginació de la seva membrana. Els mecanismes que dirigeixen tot aquest procés encara són força desconeguts, tot i que se sap que n'hi ha de dos tipus, principalment: aquells que depenen dels complexos proteics ESCRT (de l'anglès *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), i els que són independents de ESCRT [114,136].

Pel que fa als components de la maquinària ESCRT destaquen la proteïna TSG101, involucrada en la formació de les invaginacions [137], i el complex Alix-syntenin-syndecan, responsable de la invaginació i escissió de les vesícules de la membrana del MVB per esdevenir exosomes individuals [138]. També hi ha, però, proteïnes del complex ESCRT que participen en el segrest de proteïnes ubiquitinades per tal d'incorporar-les als exosomes [137]. Cal tenir en compte que aquests mecanismes també formen part d'altres processos, com la citocinesi o la reparació de la membrana plasmàtica, motiu pel qual el seu bloqueig experimental en l'estudi dels exosomes pot interferir en altres vies no desitjades [136].

Els mecanismes independents de ESCRT coneguts a dia d'avui inclouen diferents tipus de molècules. D'una banda hi ha els lípids, com les ceramides o l'àcid fosfatídic [139,140]. Tot i que els resultats publicats no són prou concloents, es creu que ambdós participen en la curvatura de la membrana interna dels MVB tot promovent la invaginació i formació dels exosomes. D'altra banda hi ha les tetraspanines (CD9, CD63, CD81, TSPAN8), considerades un dels principals marcadors dels exosomes, les quals intervenen en la selecció de les proteïnes que han de ser intraluminals [141]. Finalment, també s'ha descrit que la xaperona HSC70 promou l'encapsulament de certes proteïnes de manera selectiva, ja que en reconeix una seqüència determinada [142].

3.3. Secreció

Els exosomes són secretats de manera espontània per la majoria de tipus cel·lulars. No obstant, diferents estímuls poden incrementar-ne l'alliberament al medi extracel·lular, fet que potencia el seu paper com a sistema de comunicació intercel·lular. Diversos estudis han demostrat com la secreció es pot veure potenciada per la interacció amb limfòcits T i B, per processos de despolarització neuronal, per estimulació amb neurotransmissors [143], per mecanismes que incrementen l'acumulació de calci intracel·lular [144], per estimulació amb LPS [145], de manera secundària a l'activació de p53 [146], etc. Malgrat tot, els mecanismes intracel·lulars que regulen aquests processos encara no s'han descrit.

A nivell molecular, el procés de secreció requereix la mobilització de proteïnes del citosquelet, de les GTPases RAB i de proteïnes que dirigeixin la fusió de la membrana dels MVB amb la plasmàtica, com les proteïnes SNARE [113]. De tot aquest procés encara se'n coneixen poques coses. A dia d'avui només s'ha postulat una hipòtesi que defensa l'existència de dues vies principals de secreció: aquelles associades a

compartiments endosomals primerencs, dependents de RAB11/RAB35, i les associades a compartiments endosomals tardans, regulades per RAB27 [114,136] (Figura 9).

3.4. Adhesió i internalització

Els exosomes alliberats al medi extracel·lular són capturats per les cèl·lules diana a través de diferents mecanismes, la majoria d'ells dependents d'interaccions proteïna-proteïna. Una de les famílies proteiques més involucrades són les **tetraspanines**, molt abundants tant a la membrana dels exosomes com a les membranes cel·lulars. Poden formar complexos moleculars amb integrines ($\alpha 4$, $\beta 4$), molècules d'adhesió (ICAM-1) o coreceptors (CD4, CD8), i es creu que això contribueix a que s'agrupin en basses lipídiques tots els elements necessaris per al reconeixement i transmissió de senyal a la cèl·lula diana [147]. S'ha demostrat també que la presència de membres de la **superfamília de les immunoglobulines** a la membrana exosomal participa en la captura dels exosomes, sobretot per part de limfòcits T i B. Els exemples més clars en són els exosomes que expressen ICAM-1 o MHC-II, els quals poden interaccionar amb els seus respectius lligands, LFA-1 i TCR [122,148]. Finalment, l'abundància de glicoproteïnes a la membrana dels exosomes fa que les **lectines** siguin també un mecanisme a tenir en compte en el procés de captació. Mitjançant l'ús de quelants i d'anticossos s'ha demostrat que les lectines tipus C, com DC-SIGN i DEC-205 [148], i algunes lectines independents de calci, com la Galectina-5 [149], participen en l'ancoratge dels exosomes a les cèl·lules diana.

Un cop ancorats, els exosomes poden ser internalitzats mitjançant la fusió amb la membrana cel·lular o per diferents processos d'endocitosi, els quals es resumeixen a la Figura 9. Pel que fa al procés de fusió, tot i que encara hi ha molts interrogants, es creu que es podria veure afavorit per la composició de la membrana exosomal. Malgrat tot, diferents estudis postulen que aquesta via és minoritària i que els exosomes són capturats principalment per endocitosi. Els mecanismes endocítics més estudiats són els que depenen de **receptors**, com les vesícules recobertes de clatrina [150], o els que estan relacionats amb les **basses lipídiques**, com les de caveolina [151]. Ambdós processos requereixen la presència de lligands específics a la membrana exosomal i d'estructures concretes a la cèl·lula diana, fet que reforça la hipòtesi de l'especificitat dels exosomes com a mecanisme de comunicació, en part, dirigit. Els exosomes també poden ser endocitats per **fagocitosi**, un mecanisme molt rellevant en el cas dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques. El procés, dependent d'actina, dinamina i fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) [152], podria veure's afavorit per la presència de fosfatidilserina a la

monocapa externa de l'exosoma [153], la qual es troba normalment a la monocapa interna cel·lular. Una altra via d'endocitosi és la **macropinocitosi**, que consisteix en tot un seguit de protrusions de la membrana que engloben no només els exosomes sinó també líquid extracel·lular i partícules de l'entorn. La macropinocitosi dels exosomes depèn de sodi, colesterol i PI3K. Tanmateix, la disparitat de resultats obtinguts fins al dia d'avui considera que és el mecanisme menys rellevant en el marc de l'endocitosi d'exosomes [147].

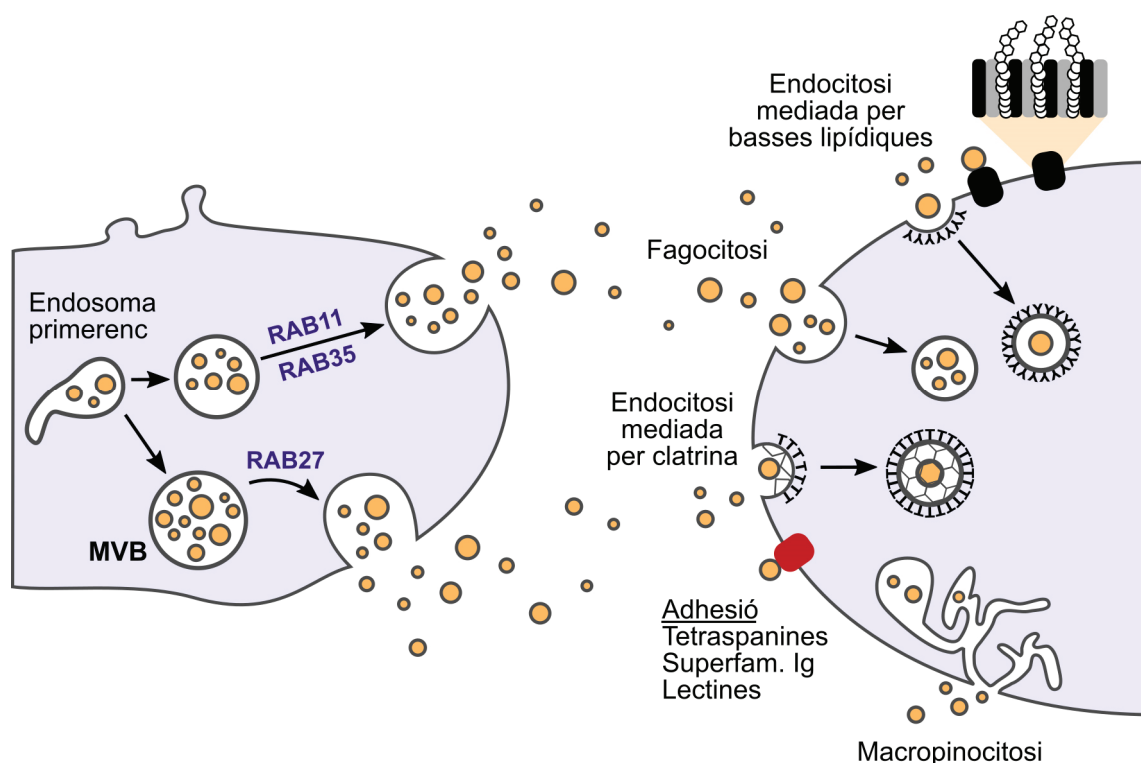


Figura 9. Resum dels processos de secreció i internalització dels exosomes per part de les cèl·lules diana. Adaptat de [114,122].

3.5. Funcions

Tot i que inicialment es va considerar que els exosomes eren un mer sistema de gestió dels productes de rebuig, al llarg dels anys s'ha demostrat que tenen funcions específiques i un paper clau en la comunicació intercel·lular. En conseqüència, cada cop hi ha més interès en les aplicacions clíniques dels exosomes, que poden ser emprats com a teràpia o com a biomarcadors de pronòstic [127]. Actualment, el càncer i la regulació de la resposta inflamatòria són els dos camps en els que s'ha aprofundit més en l'estudi dels exosomes.

Des dels primers treballs on es definien els exosomes com a missatgers intercel·lulars [117] va quedar palesa la implicació d'aquestes vesícules en la resposta immune, sobretot pel fet d'expressar molècules MHC a nivell de membrana. Certes poblacions d'exosomes poden actuar elles mateixes com a presentadores d'antigen, ja que transporten no només MHC-I i MHC-II sinó també tot el conjunt de molècules coestimuladores i d'adhesió necessàries per la presentació i inici del procés de senyalització [113,154]. Tanmateix, els exosomes que transporten antigens associats al MHC també poden ser incorporats per les cèl·lules dendrítiques, les quals processen i presenten l'antigen tot promovent l'activació dels limfòcits CD4⁺ i CD8⁺ [155]. Segons les cèl·lules que els han secretat, els antigens transportats pels exosomes poden ser tumorals, provenir de cèl·lules infectades amb algun patògen o fins i tot poden ser al·lèrgens, de manera que els exosomes podrien estar implicats també en la tolerància als aliments a nivell intestinal [127,156].

Els exosomes també poden activar la resposta immunitària a través d'altres mecanismes independents del MHC. Certes poblacions contenen molècules d'estrès com HSP60 i HSP70, les quals promouen la maduració de les cèl·lules dendrítiques i activen els macròfags i les cèl·lules *natural killer* (NK) [156,157]. S'ha observat també que macròfags infectats amb patògens alliberen exosomes que contenen PAMPs, els quals poden activar els *toll-like receptors* (TLRs) d'altres macròfags diana [158]. A nivell intraluminal s'ha descrit la presència de mediadors inflamatoris com IL-1 β , PAF, enzims de síntesi de leucotriens i membres de la superfamília del TNF. En el cas d'aquests últims, l'alta concentració a l'interior dels exosomes afavoreix la seva agregació en trímers, que comporta un major grau d'activació biològica [159].

La supressió de la resposta immunitària mediada per exosomes s'ha estudiat sobretot en el marc del càncer. Els exosomes alliberats per les cèl·lules tumorals sovint contenen membres de la superfamília del TNF (FasL, TRAIL) o Galecina-9, els quals disminueixen el grau d'activació dels limfòcits T i en promouen l'apoptosi [156]. En alguns casos també s'ha observat com aquests exosomes inhibeixen l'expressió del receptor NKG2D en cèl·lules NK i CD8⁺, el qual reconeix lligands de cèl·lules infectades o tumorals [160]. Aquest mecanisme redueix la resposta citotòxica de les cèl·lules, ja que sense el receptor no reconeixen els antigens. A més a més, en un context tumoral, s'ha descrit com els exosomes alteren la diferenciació dels monòcits per tal que es converteixin en cèl·lules mieloides supressores (MDSCs), les quals al seu torn activen les cèl·lules T reguladores [161]. Els exosomes tumorals, per tant, sembla ser que activen vies

antiinflamatòries i d'escapament del sistema immune que afavoreixen la progressió de la massa tumoral.

En els processos cancerígens, la interacció entre les cèl·lules tumorals i el microambient que les envolta regula el creixement i disseminació del tumor. En aquest diàleg també hi participen els exosomes, prenent part no només en l'evasió del sistema immune sinó també en la remodelació de la matriu extracel·lular, l'angiogènesi, la proliferació de les cèl·lules tumorals i la metàstasi. Alguns exemples en són la capacitat dels exosomes tumorals de transformar els fibroblasts en miofibroblasts [162], de transferir factors de creixement com EGF, oncoproteïnes com KRAS i MET, o molècules com Dll4, que en ser incorporada per les cèl·lules endotelials promou la formació de filopodis i posteriorment, vasos sanguinis [156]. Molts d'aquests efectes s'han associat també als miRNAs que podem trobar a l'interior dels exosomes [163], tot i que aquests tenen una acció dual. Alguns com miR-17-92, miR-155, miR-372 o miR-373 són considerats oncogenes, ja que potencien el creixement tumoral directament o indirectament a través del bloqueig de l'apoptosi. D'altres com let-7, miR-15a o miR-16-1 funcionen com a supressors de tumors, bloquejant RAS i membres de la família BCL per promoure l'apoptosi i l'arrest del cicle cel·lular [164]. Pel que fa a la metàstasi, estudis recents han demostrat que els exosomes ajuden a establir nínxols pre-metastàtics allunyats del focus tumoral, sensibilitzant les cèl·lules del teixit receptor i generant un microambient favorable per l'establiment d'un nou tumor [165,166]. Un altre dels aspectes més rellevants és que aquests exosomes poden contenir antígens tumorals. Cal tenir en compte, doncs, que poden funcionar com a biomarcadors o fer la funció de presentadors d'antígens, dos mecanismes molt potents en el marc terapèutic.

Tot i que, tal i com s'ha mencionat anteriorment, el càncer i la regulació immune són els dos principals camps d'estudi dels exosomes, aquest mecanisme de comunicació intercel·lular també s'ha vist implicat en moltes altres malalties. Diferents agregats proteics involucrats en neurodegeneració, tals com els cossos de Lewis en Pàrkinson o els agregats de Tau i α -amiloide en Alzheimer, s'han detectat associats a exosomes. En malalties cardiovasculars, alguns estudis han descrit la presència d'exosomes amb propietats pro-angiogèniques i pro-coagulants. També podrien tenir un paper rellevant en l'estadi d'embaràs i desenvolupament fetal, ja que s'han observat determinades poblacions d'exosomes que promouen l'apoptosi de certs tipus cel·lulars i disminueixen l'activació de cèl·lules NK i CD8⁺, afavorint que el fetus "s'escapi" del sistema immune matern [156].

En darrer terme, els exosomes s'han començat a utilitzar com a eina de diagnòstic aprofitant que cada cop s'identifiquen més perfils associats a patogenicitat. A més, la seva presència gairebé generalitzada als fluids biològics en permet un aïllament de manera semi-invasiva o fins i tot no invasiva, com en el cas de l'orina i la femta. També cal destacar que, paral·lelament, s'han anat desenvolupant diferents estratègies terapèutiques basades en exosomes. Gràcies a la seva estabilitat s'hi poden afegir pèptids i petits RNAs d'interferència, fet que permet emprar-los com a vacunes. Alguns estudis clínics ja estan en fase I i II, i és que la recerca en exosomes no només ha progressat ràpidament al llarg dels últims anys sinó que està en contínua evolució [119].

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La AP severa és encara avui en dia una malaltia per la qual no hi ha un tractament específic, de manera que les teràpies que s'apliquen es limiten a la restitució de fluïds i el control de l'evolució de la simptomatologia. No obstant, el descobriment dels exosomes com a sistema de comunicació intercel·lular obre un nou camp d'investigació en diverses malalties, i en la AP en particular. La transferència de mediadors encapsulats protegits d'un ambient altament degradatiu permetria que aquests arribessin a òrgans allunyats del focus de la malaltia, disseminant la resposta inflamatòria a nivell sistèmic. En tot aquest procés també hi podria jugar un paper destacat la lectina REG3 β , una de les proteïnes sintetitzades en major quantitat en el transcurs de la malaltia.

La hipòtesi d'aquest treball és que els exosomes generats durant la AP participen en la progressió de la malaltia, tot afavorint la disseminació de la resposta inflamatòria a nivell sistèmic.

Objectiu general:

Investigar el paper dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica que se'n deriva.

Objectius concrets:

1. Analitzar els canvis qualitius i quantitius dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada.
2. Definir i caracteritzar el mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

1.1. Animals

Es van utilitzar rates mascle (*Rattus norvegicus*) de la soca Wistar (Charles River Laboratories, França) de 220-240 g de pes. L'estabulació es va fer sota condicions ambientals constants de temperatura (22-24 °C) i humitat relativa del 70 % amb cicles alternats de llum/fosc de 12 h. Se'ls va subministrar una dieta estàndard de pinso A04 (Panlab, Barcelona) i aigua de la xarxa de Barcelona *ad libitum*. Tots els estudis es van realitzar d'acord amb les directrius de la Unió Europea per models d'experimentació animal (2010/63/EU del 22 de Setembre de 2010) i amb l'aprovació del Comitè Ètic per l'Experimentació Animal (CEEA).

1.2. Model experimental

Un dels objectius de la tesi és determinar el paper dels exosomes en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada a la AP severa. Per aquest motiu s'ha escollit un model experimental de AP per administració intraductal d'una sal biliar, ja que reproduïx la progressió de la malaltia i uns efectes sistèmics comparables als de la AP severa en humans.

El model experimental de AP severa es basa en l'efecte detergent de les sals biliars com el taurocolat sòdic (NaTc). L'administració intraductal d'aquesta sal biliar provoca la destrucció de les membranes cel·lulars i granulars, l'alliberament del contingut enzimàtic i la desestructuració de l'òrgan. Aquest model, el qual permet modular la severitat de la lesió inflamatòria segons la concentració de NaTc utilitzada, no és útil per estudiar els esdeveniments locals que desencadenen la AP. No obstant, és altament reproduïble i un bon model per investigar els efectes extrapancreàtics de la malaltia, ja que en mimetitza una de les vies responsables (el reflux de la bilis cap al conducte pancreàtic) i les lesions que causa són similars a les de la pancreatitis biliar clínica (lobulars enlloc de difoses i homogènies).

Els animals van ser anestesiats per administració intraperitoneal de pentobarbital sòdic (50 mg/kg de pes corporal). La inducció de la AP es va fer segons el mètode descrit inicialment pel grup d'Aho i col·laboradors [167], que provoca una AP necrotitzant. Aquest mètode consisteix en practicar una laparotomia mitja i exposar la part duodenal de la glàndula pancreàtica. Amb una agulla es fa un petit orifici al duodè i s'hi introdueix una cànula de 0.28 mm de diàmetre intern, la qual es fa passar per l'ampul·la de Vater fins situar-la a la part proximal del conducte biliopancreàtic. La part distal del conducte es tanca amb un clamp vascular per evitar el pas de la solució cap al fetge. A continuació, mitjançant una bomba de perfusió (Harvard Instruments, Edenbridge, UK), s'administra NaTc al 5 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a una dosi de 0.1 ml/100 g de pes corporal i a flux constant (0.3 ml/min). En els grups control s'administra solució salina (NaCl 0.9 %).

Sis hores després de la inducció de la malaltia la inflamació pulmonar derivada dels efectes sistèmics de la AP ja s'ha establert, moment en el qual es va procedir al sacrifici dels animals amb una sobredosi d'anestèsic i a la obtenció de mostres de teixit, plasma i PAAF.

2. CULTIUS CEL·LULARS

2.1. Condicions de cultiu

Tots els tipus cel·lulars, ja fossin línies tumorals establertes o cultius primaris, es van mantenir en incubadors sota una atmosfera controlada d'aire/CO₂ (95:5), al 95 % d'humitat i a una temperatura de 37 °C.

2.2. Línies cel·lulars

2.2.1. THP-1

Línia cel·lular monocítica humana derivada d'un pacient amb leucèmia monocítica aguda. El medi de cultiu utilitzat va ser el medi RPMI-1640 suplementat amb sèrum fetal boví Gibco™ al 10 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), L-glutamina estable i dos antibiòtics: penicil·lina (100 U/ml) i estreptomina (100 µg/ml).

Aquestes cèl·lules es van utilitzar com a model de macròfags humans mitjançant el mètode de diferenciació amb forbol 12-miristat-13-acetat (PMA). Aquest èster de forbol activa la proteïna kinasa C, indueix l'adhesió de les cèl·lules i l'expressió de marcadors de superfície associats amb la diferenciació cel·lular cap macròfags. El protocol emprat va consistir en tractar les cèl·lules THP-1 amb PMA 50 nM durant 24 h, i deixar descansar el cultiu amb RPMI fresc sense PMA durant 24 h més abans de fer els experiments.

2.2.2. MIA PaCa-2

Línia cel·lular epitelial humana derivada d'un tumor primari d'un pacient amb PDAC. El medi de cultiu utilitzat va ser el medi DMEM suplementat amb sèrum fetal boví Gibco™ al 10 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), amb L-glutamina estable i dos antibiòtics: penicil·lina (100 U/ml) i estreptomina (100 µg/ml). Les cèl·lules es van mantenir en cultiu fins que assolien una confluència del 85 %, moment en el qual es tractaven amb tripsina per desadherir-les dels flascons i tornar-les a sembrar.

2.3. Cultius primaris

2.3.1. Macròfags alveolars de rata

Els macròfags residents a l'espai alveolar es van aïllar mitjançant rentats broncoalveolars. Aquest mètode consisteix en extreure la tràquea i els pulmons *en bloc* i realitzar 5 rentats broncoalveolars amb 10 ml de NaCl al 0.9 %. Els rentats es centrifuguen a 180 xg i el precipitat cel·lular es resuspèn amb medi RPMI-1640 suplementat. Seguidament, les cèl·lules es sembren en plaques de cultiu durant 2 h. Després d'aquest període es descarten les cèl·lules que han quedat en suspensió, mentre que els macròfags alveolars s'han adherit a la placa amb una puresa que supera el 95 %.

2.3.2. Hepatòcits de rata

Els hepatòcits es van aïllar seguint un mètode basat en el descrit inicialment per Berry i Friend [168], amb algunes modificacions. Aquest mètode es basa en la infusió d'una sol·lució de col·lagenasa que disgrega el teixit.

Un cop anestesiats, als animals se'ls practica una laparotomia mitja i s'exposa el fetge. S'introdueix una cànula per la vena porta, la qual està connectada a una xeringa que conté solució de rentat (solució salina tamponada de Hank (HBSS) sense Ca ni Mg), a 4 °C. A continuació, s'inicia la infusió del HBSS amb l'ajut d'una bomba de perfusió, a 4 ml/min durant 10 min. A més, es fa un tall a la vena cava inferior per permetre la sortida del flux. Quan el fetge és net de sang i ha canviat de color, es canvia la solució de rentat per la solució de digestió (HBSS amb col·lagenasa IV al 0.05 %) prèviament escalfada a 37 °C i es continua amb el procés de perfusió a la mateixa velocitat. Els canvis de color i de consistència del teixit s'han d'anar monitoritzant fins que es considera que aquest està prou disgregat. En aquest punt, s'extreu el fetge amb cura, es talla a trossos petits i s'incuba durant 30 min més amb la solució de digestió.

Per acabar d'extreure els hepatòcits, els trossets de teixit es van disgregar amb un rascador de cèl·lules i es van filtrar a través d'una malla de 100 µm. L'eluit es va centrifugar a 50 xg durant 1 min. El precipitat cel·lular, que conté els hepatòcits, es va rentar amb medi DMEM suplementat i es va repetir el procediment 3 vegades. El sobrenedant, que conté la fracció cel·lular no parenquimal, es va reservar en cada cas per prosseguir amb l'aïllament de cèl·lules de Kupffer.

2.3.3. Cèl·lules de Kupffer de rata

Per aïllar les cèl·lules de Kupffer es va partir dels sobrenedants obtinguts a l'últim pas del procediment d'extracció d'hepatòcits. Es van centrifugar a 180 xg durant 5 min per fer precipitar les cèl·lules, es van resuspendre amb medi RPMI suplementat i es va repetir el procés de rentat 3 vegades. Tot seguit, les cèl·lules es van sembrar en plaques de cultiu i es van deixar adherir durant 2 h, descartant finalment les cèl·lules en suspensió. La puresa de la preparació es va verificar amb el marcatge de CD163.

3. REG3β

Per a l'estudi de REG3β s'ha utilitzat una proteïna recombinant humana de REG3A (rhREG3A) i un anticòs policlonal obtingut en conills immunitzats amb rhREG3A, cedits per Dynabio SA (Dynabio, Marseille, França). Tal i com s'ha esmentat a la introducció, es considera que l'homòleg de la REG3A humana és REG3β en rata, ja que ambdós proteïnes presenten un alt grau de similitud. A més, Dynabio SA ha caracteritzat que aquest anticòs, de naturalesa policlonal, reconeix tant la proteïna humana com la murina

i la de rata. Per aquest motiu, en tots els experiments s'ha fet servir la mateixa proteïna i el mateix anticòs: en els experiments de rata s'assumeix que l'anticòs reconeix REG3 β i en els experiments realitzats amb línies cel·lulars humanes, REG3A.

4. DISSENY EXPERIMENTAL

4.1. Estudi 1. Paper dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada

4.1.1. Caracterització de les poblacions d'exosomes en un model experimental de AP severa

Per caracteritzar les poblacions d'exosomes generades durant la AP severa es van realitzar els següents grups experimentals:

- Control (n=6). Administració intraductal de NaCl al 0.9 %
- AP severa (n=6). Administració intraductal de NaTc al 5 %

El protocol de perfusió va ser el descrit anteriorment.

El dany pancreàtic es va corroborar a través dels nivells de lipasa en sang i l'activitat mieloperoxidasa en pàncrees. La propagació de la resposta inflamatòria a nivell sistèmic es va avaluar mesurant els nivells de mieloperoxidasa en teixit pulmonar i l'activació dels macròfags alveolars per PCR a temps real, amb *Il1b*, *Ccl2* i *Il6* com a marcadors proinflamatoris i *Mrc1* i *Cd36* com a marcadors de fenotip alternatiu.

Les mostres de sang i PAAF es van processar immediatament per a l'obtenció d'exosomes. Un cop aïllats, cal comprovar que s'han purificat correctament. Bàsicament, cal confirmar que són nanovesícules d'entre 30 i 150 nm, i que el seu perfil proteic es correspon amb el que s'ha descrit per als exosomes, a través de la detecció de proteïnes associades a endosomes i l'absència de proteïnes específiques de reticle endoplasmàtic [123]. La mida i morfologia dels exosomes es va avaluar per tinció negativa de les mostres i observació per microscòpia electrònica de transmissió. Per Western Blot es va analitzar la presència de marcadors clàssics d'exosomes (CD63, TSG101, Alix) i l'absència de Calnexina com a marcador de reticle endoplasmàtic. La

quantificació dels exosomes presents en plasma es va fer mesurant el seu contingut proteic a través del mètode de Bradford.

L'efecte del PAAF sobre la integritat dels exosomes es va avaluar per Western Blot. En aquest cas, exosomes aïllats de plasma d'animals control es van incubar a 37 °C durant 5 min en presència de PAAF deplecionat d'exosomes. Després es va procedir a la detecció dels marcadors Alix i CD63.

4.1.2. Avaluació de la capacitat dels exosomes circulants d'arribar a l'espai alveolar i anàlisi del seu potencial inflamatori

Els macròfags alveolars són un dels tipus cel·lulars involucrats en la fallida pulmonar que caracteritza la AP, ja que durant la progressió de la malaltia adopten un fenotip proinflamatori. Un cop activats, secreten citocines i mediadors que contribueixen a incrementar la resposta inflamatòria a nivell sistèmic.

Per estudiar si els exosomes que circulen en sang poden participar en l'activació dels macròfags alveolars, es va realitzar primer un experiment *in vitro*. Els grups experimentals van ser els següents:

- Macròfags alveolars control (n=6)
- Macròfags alveolars + Exosomes de plasma d'animals control (ExoC) (n=6)
- Macròfags alveolars + Exosomes de plasma d'animals AP (ExoAP) (n=6)

Es van aïllar macròfags alveolars d'animals donants i, un cop sembrats, es van incubar durant 16 h amb exosomes obtinguts a partir d'1 ml de plasma d'animals control o amb AP. Paral·lelament, l'experiment també es va realitzar incubant els macròfags amb 2 µg/ml d'ExoC o ExoAP. El grau d'activació dels macròfags es va analitzar per PCR a temps real, amb *Il1b*, *Ccl2* i *Il6* com a marcadors proinflamatoris i *Mrc1* i *Cd36* com a marcadors de fenotip alternatiu.

A continuació, per tal de determinar si els exosomes que circulen pel plasma durant la AP són capaços d'arribar a l'espai alveolar, es va realitzar un segon experiment, aquest cop *in vivo*. Els grups experimentals van ser els següents:

- Control vena cava inferior (n=4). Perfusió de tampó fosfat salí (PBS) processat amb PKH26 de la mateixa manera que els exosomes (control de tinció), a través de la vena cava inferior.
- Perfusió vena cava inferior (n=4). Perfusió d'ExoAP tenyits amb PKH26 a través de la vena cava inferior.

L'experiment es va realitzar en dos dies diferents. El primer dia es va induir una AP en animals donants seguint el protocol establert, i se'n van aïllar els exosomes circulants en plasma (ExoAP). El segon dia, els exosomes van ser tenyits amb PKH26 i perfosos a través de la vena cava inferior. Tots els ExoAP d'un animal van ser perfosos en un altre animal, de manera que per a cada perfusió es requeria un animal donant amb AP del qual poder extreure'n exosomes. La perfusió dels exosomes es va realitzar a raó de 4 ml/h, durant 15 min. Després de 30 min, els animals van ésser sacrificats i es va procedir a l'extracció dels macròfags alveolars.

Per microscòpia de fluorescència es va avaluar la incorporació dels exosomes PKH26⁺ a l'interior dels macròfags alveolars.

4.1.3. Anàlisi del perfil proteòmic dels exosomes circulants

L'alteració de l'homeòstasi cel·lular davant estímuls inflamatoris fa que els exosomes alliberats experimentin canvis importants en el seu proteoma, i per tant, que es modifiquin els mediadors que són transferits a altres tipus cel·lulars. Per tal de definir els canvis que pateix el proteoma dels exosomes circulants en condicions de AP es va realitzar un nou experiment. Els animals es van distribuir en els següents grups:

- Control (n=3). Administració intraductal de NaCl al 0.9 %
- AP severa (n=3). Administració intraductal de NaTc al 5 %

El protocol de perfusió va ser el descrit anteriorment.

Les mostres de sang es van processar immediatament per a l'obtenció d'exosomes (ExoC, ExoAP). Un cop sedimentats, es van resuspendre en tampó de lisi RIPA (Taula II) i es van congelar immediatament a -80 °C. Per fer-ne un perfil proteòmic, les mostres es van analitzar per espectrometria de masses al Servei de Proteòmica CSIC/UAB.

4.1.4. Valoració del paper del fetge com a filtre dels exosomes generats a la cavitat peritoneal

El proteoma dels exosomes circulants generats durant la AP mostrava que aquests tenien sobreexpressades poques proteïnes d'origen pancreàtic i que per contra, estaven enriquits amb proteïnes d'origen hepàtic. Per aquest motiu, es va realitzar un experiment adicional enfocat a avaluar el possible paper del fetge com a filtre dels exosomes generats pel pàncrees, els quals són alliberats en part a la cavitat peritoneal. Per fer-ho, es van obtenir exosomes del PAAF (ExoPAAF) i es van tenyir amb PKH26 per tal de fer-ne un seguiment. Els grups experimentals per a aquest protocol van ser:

- Control vena cava inferior (n=5). Perfusió de PBS processat amb PKH26 de la mateixa manera que els exosomes (control de tinció), a través de la vena cava inferior.
- Control vena porta (n=5). Perfusió de PBS processat amb PKH26 de la mateixa manera que els exosomes (control de tinció), a través de la vena porta.
- Perfusió vena cava inferior (n=5). Perfusió d'ExoPAAF tenyits amb PKH26 a través de la vena cava inferior.
- Perfusió vena porta (n=8). Perfusió d'ExoPAAF tenyits amb PKH26 a través de la vena porta.

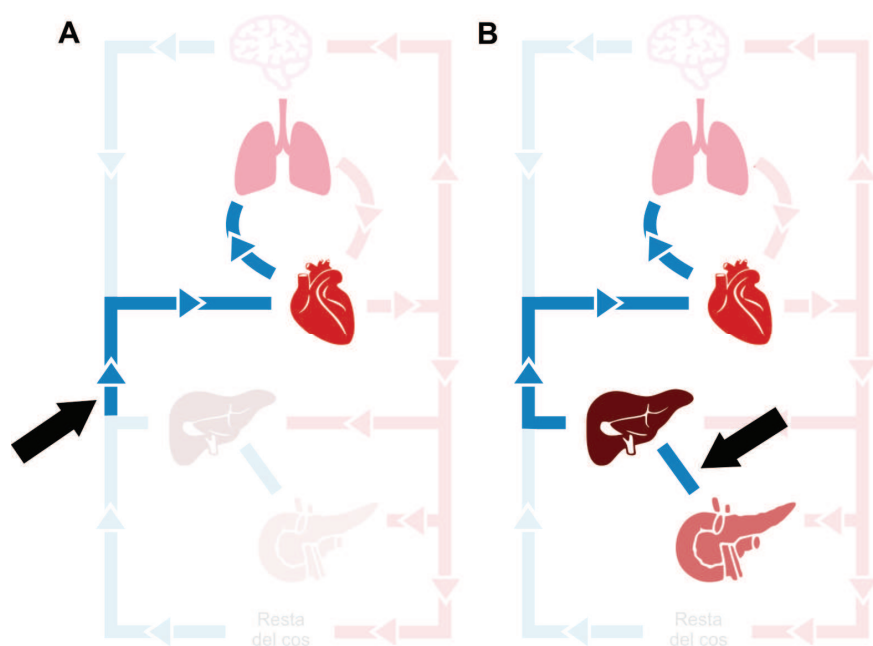


Figura 10. Representació esquemàtica de l'experiment de perfusió d'exosomes a través de **A**, la vena cava o **B**, la vena porta.

L'experiment es va realitzar en dos dies diferents. El primer dia es va induir una AP en animals donants seguint el protocol establert i se'n van aïllar els exosomes del PAAF. El segon dia, els ExoPAAF van ser tenyits amb PKH26 i la mostra es va dividir en dos parts idèntiques: una part va ser perfosa a través de la vena cava inferior i l'altra a través de la vena porta, en animals diferents. Per tant, es requeria un animal amb AP del qual poder extreure'n exosomes per fer dues perfusions, una de cada tipus. La perfusió dels exosomes es va realitzar a raó de 4 ml/h, durant 15 min. Després de 30 min, els animals van ésser sacrificats i es va procedir a l'extracció dels macròfags alveolars i del fetge.

Per microscòpia de fluorescència es va avaluar i quantificar la incorporació dels exosomes a l'interior dels macròfags alveolars sota ambdues condicions de perfusió, fotografiant 10 camps per mostra i comptant el nombre de cèl·lules PKH26⁺.

Els fetges obtinguts d'animals perfosos a través de la vena porta es van processar de dues maneres diferents: 5 d'ells es van criopreservar per fer-ne talls histològics; la resta (3) es van digerir per aïllar-ne els hepatòcits i les cèl·lules de Kupffer. En ambdós casos es van seleccionar algunes preparacions per detectar per immunofluorescència CD163, marcador pel qual les cèl·lules de Kupffer són positives. Per microscòpia de fluorescència es va avaluar la presència d'exosomes retinguts al teixit hepàtic i, més específicament, la seva localització cel·lular.

4.2. Estudi 2. Caracterització del mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes

4.2.1. Determinació dels nivells circulants de REG3 β durant la AP

La proteïna REG3 β s'expressa en nivells molt baixos en condicions normals, però es veu fortament induïda durant la fase aguda de la AP [88,169]. De fet, pot arribar a representar fins al 5 % de la proteïna total del suc pancreàtic [96]. Per tal de corroborar la inducció de la síntesi d'aquesta proteïna en el model animal de NaTc, es va realitzar un experiment amb els següents grups:

- Control (n=6). Administració intraductal de NaCl al 0.9 %
- AP severa (n=6). Administració intraductal de NaTc al 5 %

El protocol de perfusió va ser el descrit anteriorment. Les mostres de sang es van processar immediatament, i quantitats iguals de plasma es van emmagatzemar a -80 °C per a la posterior immunoprecipitació i detecció de REG3 β per Western Blot.

4.2.2. Valoració de la unió de REG3 β als exosomes durant la AP

La membrana dels exosomes és molt rica en glicoproteïnes, les quals s'ha demostrat que participen en la senyalització i captació dels exosomes per part de les cèl·lules diana. Donat l'increment en la síntesi de REG3 β durant la AP i la seva naturalesa de tipus lectina, es va realitzar un experiment per tal de determinar si aquesta proteïna era capaç d'interaccionar amb els exosomes plasmàtics. Per fer-ho, es van definir els següents grups experimentals:

- Exosomes plasmàtics d'animals control (ExoC) (n=6)
- Exosomes plasmàtics d'animals AP (ExoAP) (n=6)

Els exosomes van ser obtinguts d'animals perfosos amb NaCl al 0.9 % (control) o amb NaTc al 5 %, seguint el protocol descrit. Posteriorment, van ser tenyits amb PKH26 i es va dur a terme l'assaig d'unió en microplaca sota dues condicions: presència o absència de REG3 β . En cada cas, es va afegir 1 ng/ μ l d'exosomes i es van fer triplicats.

4.2.3. Caracterització de les poblacions d'exosomes de línies cel·lulars

Un cop descrita la capacitat dels exosomes d'unir-se a REG3 β , es van realitzar assaigs amb línies cel·lulars per tal de caracteritzar millor la unió i definir-ne el mecanisme molecular. Les dues línies cel·lulars escollides van ser la THP-1 (macròfags) com a model de tipus cel·lular inflamatori i la MIA PaCa-2, una línia epitelial de pàncrees.

Un cop purificats, la mida i morfologia dels exosomes es va avaluar per tinció negativa de les mostres i observació per microscòpia electrònica de transmissió. Per Western Blot es va analitzar la presència de marcadors clàssics d'exosomes (CD81, TSG101, Alix) i l'absència de Calnexina com a marcador de reticle endoplasmàtic.

4.2.4. Caracterització del mecanisme molecular que regula la interacció entre REG3 β i els exosomes

En primer lloc, es va realitzar un assaig d'unió per tal de determinar si els exosomes de línies cel·lulars eren capaços d'unir-se a la proteïna REG3 β . Per fer-ho, es va adsorbir l'anticòs contra REG3 β a una microplaca tipus ELISA, i es va saturar amb la proteïna REG3 β (500 ng/ml). Afegint concentracions creixents d'exosomes de macròfags THP-1 (0.008, 0.04, 0.2, 1 i 5 ng/ μ l) es va avaluar la seva capacitat d'unió a REG3 β i es van establir les condicions de treball per als següents assaigs. La unió no específica es va analitzar afegint concentracions creixents d'exosomes en absència de REG3 β .

A continuació es va avaluar la dosi-dependència de la unió de REG3 β als exosomes. L'assaig es va fer amb exosomes THP-1 i de MIA PaCa-2, fent triplicats i en dos suports diferents: microplaques i esferes magnètiques. Els grups experimentals eren:

- Exosomes (1 ng/ μ l) + 0 ng/ml de REG3 β (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 4 ng/ml de REG3 β (n=4) [només en microplaca]
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 20 ng/ml de REG3 β (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 100 ng/ml de REG3 β (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 500 ng/ml de REG3 β (n=4)

Per corroborar que la unió entre l'exosoma i REG3 β tenia lloc a través del domini lectina, es va realitzar un assaig d'unió competitiva amb exosomes de THP-1 en presència de tres sucres diferents: mannososa, mannà o NAG. Els grups experimentals eren:

- Exosomes (1 ng/ μ l) + 0 ng/ml de REG3 β + mannososa, mannà o NAG (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 20 ng/ml de REG3 β + mannososa, mannà o NAG (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 100 ng/ml de REG3 β + mannososa, mannà o NAG (n=4)
- Exosomes (1 ng/ μ l) + 500 ng/ml de REG3 β + mannososa, mannà o NAG (n=4)

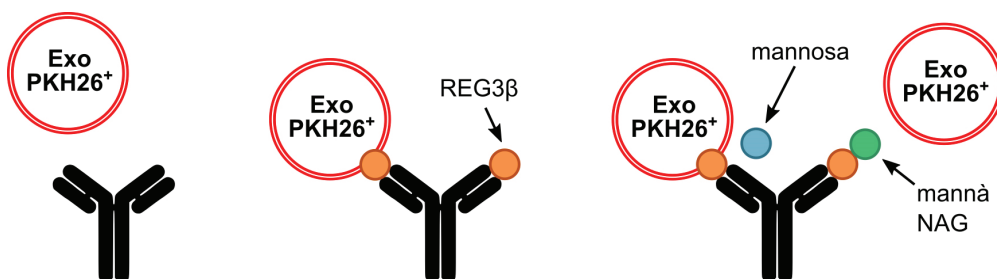


Figura 11. Assaig d'unió dels exosomes a REG3 β

Finalment, per visualitzar la proteïna REG3 β unida a la membrana de l'exosoma, es va realitzar un immunomarcatge per microscòpia electrònica. En primer lloc, es van aïllar exosomes de macròfags THP-1 i es van incubar amb REG3 β durant 30 min per tal de recobrir-los amb la proteïna. Posteriorment, es va fer l'immunomarcatge de REG3 β i es va determinar la seva localització per microscòpia electrònica.

4.2.5. Efecte de REG3 β en la captació dels exosomes

Les glicoproteïnes de membrana són molècules sovint involucrades en mecanismes de reconeixement i senyalització. Per exemple, en el cas dels exosomes, de les diferents vies d'internalització que s'han descrit fins al moment n'hi ha que depenen de proteïnes glicosilades. Així doncs, per tal d'analitzar si la presència de REG3 β podria modificar la interacció entre els exosomes i les seves cèl·lules diana, es va realitzar un assaig *in vitro* amb la següent distribució de grups experimentals:

- Macròfags THP-1 + Exosomes de MIA PaCa-2 (n=4)
- Macròfags THP-1 + Exosomes de MIA PaCa-2 + 20, 100 o 500 ng/ml de REG3 β (n=4)
- MIA PaCa-2 + Exosomes de macròfags THP-1 (n=4)
- MIA PaCa-2 + Exosomes de macròfags THP-1 + 20, 100 o 500 ng/ml de REG3 β (n=4)

En cada cas, les cèl·lules diana es van incubar amb exosomes tenyits amb PKH26 (3 μ g/ml) per tal de fer un seguiment de la seva captació. No obstant, a causa de la diferent capacitat fagocítica dels dos tipus cel·lulars, els temps d'incubació van ser de 30 min per als macròfags i 2 h per a les cèl·lules pancreàtiques. Per microscòpia de fluorescència es va avaluar i quantificar la incorporació dels exosomes PKH26⁺ a l'interior de les cèl·lules diana sota les diferents condicions d'incubació.

5. MÈTODES

5.1. Lipasa

La lipasa és un enzim digestiu secretat pel pàncrees que hidrolitza els triglicèrids en glicerol i àcids grassos. En el cas de la AP, aquest enzim es troba en elevades

concentracions en plasma, fet que permet utilitzar-lo com a marcador de dany pancreàtic. Per determinar els nivells de lipasa tant en plasma com en PAAF es va utilitzar un kit comercial de lipasa (Randox, Crumlin, UK). Aquest kit es basa en la degradació de la trioleïna en monoglicèrids i àcid oleic per part de la lipasa. Com a resultat de la hidròlisi la mostra pateix un canvi de terbolesa, la qual es pot mesurar a una longitud d'ona de 340 nm. Realitzant l'assaig en paral·lel amb un estàndard de lipasa es pot determinar l'activitat enzimàtica de la mostra en valor absolut.

5.2. Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) és un enzim sintetitzat durant la diferenciació mieloide, el qual és el component principal dels grànuls primaris dels neutròfils polimorfonuclears. Per aquest motiu, es pot fer servir com a marcador per avaluar la infiltració de neutròfils en teixits inflamats. Aquest enzim actua com a mecanisme de defensa, destruint els microorganismes fagocitats a nivell intracel·lular i, quan és secretat, creant un ambient tòxic a la zona afectada. *In vivo*, la MPO catalitza la reacció entre l'H₂O₂ i ions clorur, generant àcid hipoclorós (HOCl).

Per aïllar l'enzim, els teixits es van homogenitzar amb bromur d'hexadeciltrimetilamoni al 0.5 % dissolt en PBS 50 mM a pH 6.0. A continuació els homogenats es van sonicar durant 30 s (Braun Biotech, Inc., Allentown, PA) i es van sotmetre a 3 cicles de congelació-descongelació per trencar els grànuls. Les mostres es van incubar a 60 °C durant 2 h i es van centrifugar a 15,000 xg durant 15 min. Els sobrenedants es van fer servir per determinar l'activitat MPO.

La quantificació de l'activitat MPO es basa en la catalització de la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) per part de la MPO, descrita per primer cop per Trush i col·laboradors [170]. La base de l'assaig és que en presència de peròxid d'hidrogen, la MPO present a la mostra catalitza la reducció de la TMB donant lloc a un producte de color blau. Mitjançant un espectrofotòmetre es mesura l'increment de color a 650 nm, i es defineix una unitat de MPO com la quantitat d'enzim capaç d'incrementar una unitat d'absorbància (UA) per minut. Finalment, es mesura la quantitat de proteïna present a la mostra mitjançant el mètode de Bradford [171] i s'expressen les unitats de MPO en funció dels mg de proteïna presents a la mostra (U MPO/mg prot), corregint així les possibles diferències causades per variacions en el pes inicial del teixit emprat.

5.3. Aïllament d'exosomes

Per tal d'obtenir la fracció microvesicular corresponent als exosomes, es va fer servir un protocol estàndard d'aïllament per ultracentrifugació [131]. Aquest protocol consta de diferents passos de centrifugació, incrementant successivament la velocitat, de manera que es poden separar les restes cel·lulars i les vesícules de mida gran de la fracció exosomal desitjada.

5.3.1. A partir de cultiu cel·lular

Per obtenir exosomes de cultius cel·lulars primer cal preparar el medi amb el qual s'incubaran les cèl·lules, ja que el sèrum fetal boví que s'utilitza normalment conté exosomes que poden contaminar la mostra [131]. Per eliminar els exosomes del sèrum cal ultracentrifugar-lo a 120,000 xg, velocitat a la qual els exosomes sedimenten. No obstant, a causa de la seva alta viscositat, no és possible centrifugar sèrum pur ja que perdriem una gran quantitat de proteïnes indispensables pel creixement cel·lular, les quals precipitarien en forma d'agregats. Per aquest motiu el sèrum es dissol al 20 % en medi de cultiu i s'ultracentrifuga a 120,000 xg durant 16 h. Posteriorment es recull el sobrenedant, es fa passar per un filtre de 0,2 µm i es guarda a 4 °C. En el moment de fer-lo servir es fa una dilució 1:2 d'aquest medi amb medi sense suplementar, de manera que s'aconsegueix un medi de cultiu al 10 % de sèrum fetal boví del qual s'han eliminat els exosomes (Medi *Exo-free*).

En cadascun dels experiments, les cèl·lules es van cultivar a un 70 % de confluència amb medi *Exo-free* durant 48 h. Posteriorment, es va recollir el medi de cultiu i es va procedir a l'aïllament d'exosomes per centrifugacions successives a 4 °C seguint el protocol establert, tal i com mostra la Figura 12.

En primer lloc, el medi es centrifuga a 2,000 xg durant 10 min per eliminar les cèl·lules mortes. Es recull el sobrenedant i es centrifuga a 10,000 xg durant 30 min per descartar fraccions subcel·lulars, restes de cèl·lules mortes i vesícules de mida gran, les quals sedimenten. En aquest pas també es recull el sobrenedant, el qual es fa passar per un filtre de 0,2 µm per eliminar vesícules de mida superior a 200 nm. Tot seguit, el medi filtrat es centrifuga a 120,000 xg durant 70 min, en el nostre cas, utilitzant l'ultracentrifuga Optima L-90K amb el rotor 90.Ti i tubs de policarbonat resistents a deformació i temperatura (Beckman Coulter, Brea, CA). En aquest pas els exosomes sedimenten, de manera que es descarta el sobrenedant, es resuspenen en PBS i es

repeteix el pas de centrifugació a 120,000 xg, per tal de fer-ne un rentat i eliminar proteïnes contaminants.

Finalment, el precipitat d'exosomes es va resuspendre en PBS (per a assajos funcionals), en una solució de paraformaldehid al 2 % (per microscòpia electrònica) o en tampó de lisi RIPA (per Western Blot).

5.3.2. A partir de plasma i líquid ascític de rata

Per aïllar exosomes de plasma i PAAF el protocol que es va seguir és similar al que s'ha detallat per als cultius cel·lulars, tot i que a causa de l'alta viscositat de les mostres va caldre modificar-lo lleugerament (Figura 12).

En el cas del plasma, les mostres es van centrifugar a 2,000 xg durant 10 min i a 10,000 xg durant 30 min. A continuació, el sobrenedant es va dissoldre en 8 ml de PBS, es va dipositar sobre un coixinet de sucrosa al 30 % dissolta en tampó Tris 20 mM i es va centrifugar a 120,000 xg durant 70 min. Gràcies a aquest pas es va aconseguir eliminar elements contaminants, com ara proteïnes no associades als exosomes o grans agregats proteics, els quals sedimenten per ultracentrifugació però en canvi no suren en un gradient de sucrosa [131]. Finalment es va recuperar el coixinet de sucrosa en el qual suraven els exosomes, es va dissoldre en PBS, es va filtrar i es va centrifugar altre cop a 120,000 xg per fer-los sedimentar.

Per al PAAF, a causa dels alts nivells de fibrinogen que conté, va caldre fer-ne un tractament addicional per tal d'evitar la presència d'un precipitat insoluble en els passos successius. Després de centrifugar les mostres a 2,000 xg, aquestes es van tractar amb 5 U/ml de trombina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durant 10 min a temperatura ambient. Gràcies a aquest pas la trombina trenca la molècula de fibrinogen i la converteix en fibrina, la qual forma un coàgul insoluble. A continuació, les mostres es van centrifugar a 10,000 xg durant 5 min per tal que la fibrina sedimentés. El precipitat es va descartar i el sobrenedant es va utilitzar per seguir amb el procés de purificació, tal i com s'ha descrit per a les mostres de plasma.

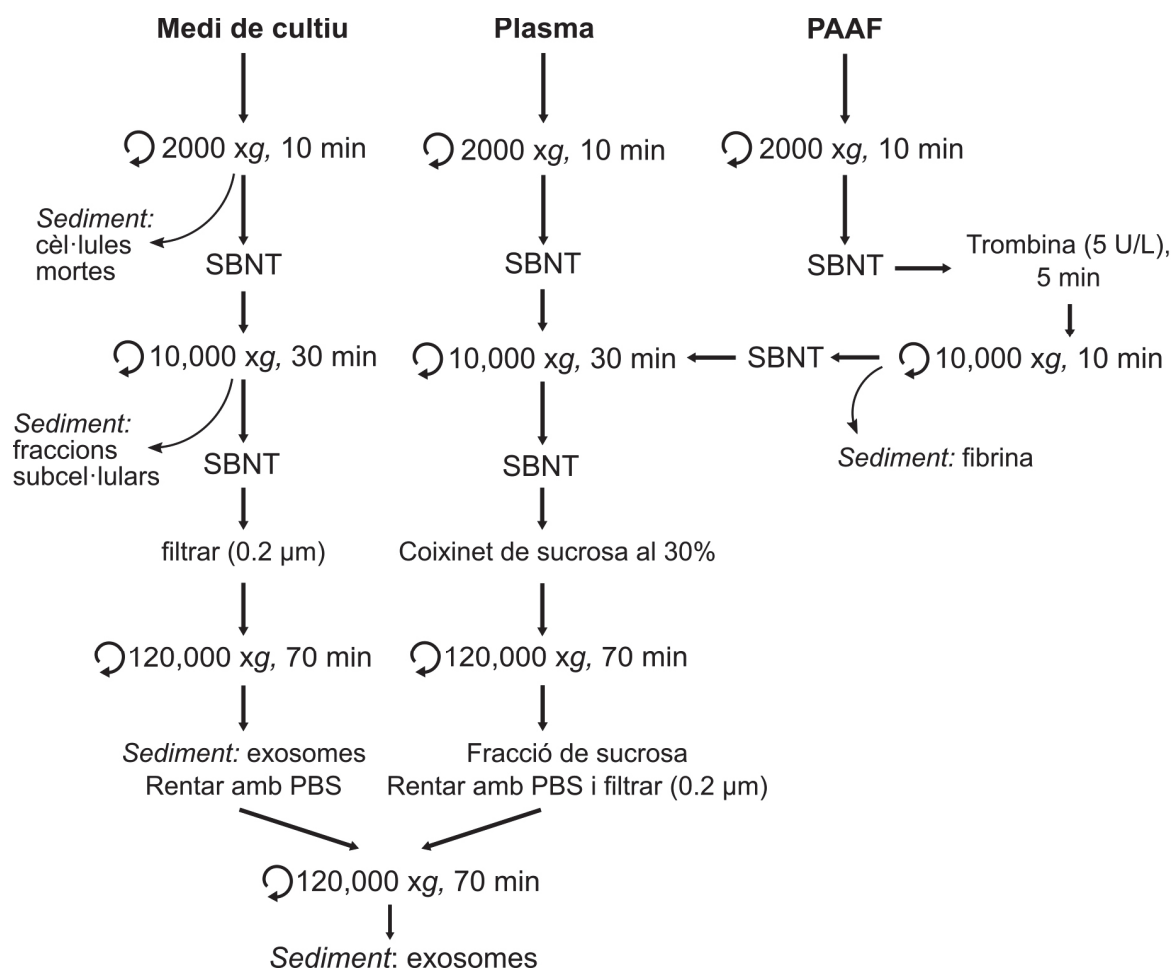


Figura 12. Esquema del protocol d'aïllament d'exosomes a partir de cultiu cel·lular o de mostres de plasma i PAAF de rata. *SBNT*, sobrenedant.

5.4. Microscòpia electrònica de transmissió

La preparació de les mostres i la seva posterior observació es va dur a terme en règim d'autoservei a la Unitat de crio-microscòpia electrònica del Parc Científic de Barcelona, la qual forma part dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB).

Un cop aïllats, els exosomes es van fixar en una solució de paraformaldehid al 2 % en PBS. Es van adsorbir durant 20 min en reixetes de coure (300 *mesh*) recobertes amb una pel·lícula de carbó de 14nm, prèviament tractades per *glow discharge* per incrementar la seva hidrofilitat. Després, es van rentar amb aigua Milli-Q i es van contrastar amb oxalat d'uranil al 2 % durant 5 min. Les reixetes es van observar amb el microscopi electrònic de transmissió JEOL-1010 a 80 kV.

5.5. Immunomarcatge per microscòpia electrònica

Aquesta tècnica permet identificar la presència d'una determinada proteïna en una mostra i analitzar-ne la localització i distribució a nivell ultraestructural. En aquest estudi, l'immunomarcatge per microscòpia electrònica es va fer seguint un protocol estàndard [131] per tal d'avaluar la presència de la proteïna REG3 β a la membrana dels exosomes. La preparació de les mostres i la seva posterior observació es va dur a terme en règim d'autoservei a la Unitat de crio-microscòpia electrònica del Parc Científic de Barcelona, la qual forma part dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB).

Les mostres d'exosomes, un cop fixades, es van adsorbir durant 30 min en reixetes de níquel (200 *mesh*) recobertes amb una pel·lícula del polímer formvar. Donada la sensibilitat del níquel al tractament *glow discharge*, en aquest cas les reixetes es van irradiar amb raigs ultraviolats durant 5 min. Després, es van bloquejar els llocs d'unió inespecífics amb una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) a l'1 % durant 10 min, i es van rentar amb una solució de BSA però en aquest cas al 0.1 %. A continuació les reixetes es van incubar amb l'anticòs primari contra la proteïna d'interès REG3 β (Dynabio SA, Marseille, França), dissolta en solució de bloqueig a 20 μ g/ml durant 1 h. Els controls negatius es van tractar amb el mateix volum de solució de bloqueig però en absència d'anticòs primari. Seguidament, les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb una partícula d'or col·loidal de 12 nm (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), dissolt 1:30 en solució de bloqueig durant 30 min. Després de l'immunomarcatge, es va procedir a la post-fixació de les mostres amb glutaraldehid al 2.5 % durant 10 min. Finalment, per tal de poder visualitzar els exosomes, se'n va fer una contratinció primer amb oxalat d'uranil al 2 %, i després amb una solució de metilcel·lulosa 2% i acetat d'uranil 4%. Aquest pas final incrementa el contrast i afegix una fina pel·lícula protectora que preserva la mostra durant més temps. Les reixetes es van observar amb el microscopi electrònic de transmissió JEOL-1010 a 80 kV.

5.6. Western Blot

El Western Blot és una tècnica que permet identificar proteïnes concretes en una mostra i fer-ne una anàlisi semiquantitativa. En primer lloc, cal obtenir l'extracte proteic de la mostra a analitzar i determinar-ne la concentració de proteïna. Posteriorment, les

diferents proteïnes que componen l'extracte se separen per electroforesi, es transfereixen a una membrana i es detecta la proteïna d'interès per immunofluorescència. La composició dels diferents reactius emprats es resumeix a la Taula II.

Per obtenir l'extracte proteic es va utilitzar un mètode de lisi estàndard. Els exosomes, un cop sedimentats, es van resuspendre en tampó de lisi RIPA al qual s'hi van afegir inhibidors de proteases i fosfatases (Taula II). A continuació, la mostra es va incubar 15 min en gel per lisar els exosomes i es va quantificar mitjançant el mètode colorimètric de Bradford [171] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), seguint les instruccions del fabricant i fent servir la BSA com a estàndard. Els extractes es van congelar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins el moment d'ésser utilitzats. Com a control es van emprar extractes proteics cel·lulars, preparats seguint el mateix protocol esmentat.

Prèviament a l'electroforesi, les mostres es van diluir amb tampó de càrrega Laemmli que contenia tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) com a agent reductor. En el cas de la detecció de CD63 i CD81 les mostres es van dissoldre amb tampó en condicions no reductores, condició necessària per a que l'anticòs en reconegui l'epítop. Després es van escalfar a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 5 min i es van deixar refredar abans de carregar-les al gel.

La separació de les diferents proteïnes de l'extracte segons el seu pes molecular es va dur a terme per SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate-poliacrilamide gel electrophoresis*) en condicions desnaturalitzants, seguint un protocol estàndard [172]. Es van fer servir minigels de poliàcrilamida que constaven d'un gel empaquetador al 5 % d'acrilamida, el qual serveix per alinear i compactar les proteïnes de la mostra abans de separar-les, i un gel separador al 12 % d'acrilamida, que permet la separació electroforètica de les proteïnes per pes molecular. Es van carregar $10\text{ }\mu\text{g}$ de proteïna a cada pou (línies) o bé proteïna aïllada del mateix volum de plasma (rata). En paral·lel, es va fer córrer un marcador de pesos moleculars pre-marcats (Prism Ultra Protein Ladder, Abcam, Cambridge, UK). L'electroforesi es va dur a terme amb l'aparell Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a voltatge constant (120 V) i en fred.

Un cop separades, les proteïnes es van transferir a una membrana de polifluorur de vinilidè (Immobilion-P, Merck Millipore, Billerica, MA) per la seva posterior manipulació. La transferència es va fer en humit amb la cubeta i adaptadors del Mini-PROTEAN, durant 90 min i a amperatge constant (400 mA). En acabar, es va comprovar la correcta

transferència de les proteïnes per tinció reversible amb Ponceau S (Ponceau S al 0.2 %, acid acètic glacial al 5 %).

Després de la transferència es va procedir al bloqueig de la membrana i a la immunodetecció de les proteïnes d'interès. La incubació de les membranes amb solució de bloqueig (llet descremada en pols al 5 % en tampó Tris, TBS) es va dur a terme durant 1 h a temperatura ambient, recobrint així la superfície restant de la membrana amb proteïnes no reactives. A continuació, les membranes es van incubar amb l'anticòs primari corresponent (Taula III) diluït en solució de bloqueig preparada amb tampó TBS-tween (TBS-T), durant tota la nit i a 4 °C. Tant la presència de Tween-20 com la incubació en fred incrementen l'especificitat de la unió proteïna-anticòs. Després de 3 rentats amb TBS-T, les membranes es van incubar amb l'anticòs secundari marcat amb fluorescència Dylight 800 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) durant 1 h a temperatura ambient. Finalment, es van realitzar 3 rentats més i es va procedir a la detecció de senyal mitjançant l'aparell *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Taula II. Composició dels tampons i gels utilitzats al Western Blot

Tampó	Composició
Tampó de lisi RIPA	Tris-Cl 10 mM (pH 8), NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1 %, Tritó X-100 1 %
Inhibidors de proteases i fosfatases	Inhibidor de la tripsina 0.3 µM, aprotinina 0.3 µM, PMSF 0.1 mM, EDTA 1 mM, NaF 6.25 mM, ortovanadat de sodi 1.25 Mm
Gel d'empaquetament	Tampó Tris 62.5 mM (pH 6.8), bis-acrilamida (37.5:1) 5%, APS 0.1 %, SDS 0.1 %, TEMED 0.1 %
Gel separador	Tampó Tris 375 mM (pH 8.8), bis-acrilamida (37.5:1) 10-15%, APS 0.1 %, SDS 0.1 %, TEMED 0.1 %
Tampó d'electroforesi	Tampó Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 192 mM, SDS 0.1%
Tampó de transferència	Tampó Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 192 mM, SDS 0.1%, Metanol 20 %
Tampó TBS	Tampó Tris 25 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM
Tampó TBS-T	Tampó TBS amb Tween-20 0.05%

Taula III. Anticossos utilitzats al Western Blot

Anticòs	Casa comercial	Ref.	Dilució	kDa
CD63	ProteinTech	25682-1-AP	1:1000	25 (core)/ 50-65 (glic.)
CD81	Invitrogen	10630D	1:1000	25
TSG101	ProteinTech	14497-1-AP	1:1000	46
Alix/PDCD6IP	ProteinTech	12422-1-AP	1:1000	96
Calnexina	ProteinTech	10427-2-AP	1:1000	90
REG3β	Dynabio	(cedit)	1:2000	16
Dylight 800 anti-rabbit	Thermo Fisher	SA5-10036	1:10.000	
Dylight 800 anti-mouse	Thermo Fisher	SA5-10176	1:10.000	

5.7. qPCR

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) permet estudiar l'expressió de gens d'interès. En primer lloc s'extreu l'RNA total, després es transcriu a cDNA per transcripció inversa i finalment s'amplifica per PCR a temps real semiquantitativa (qPCR) utilitzant encebadors específics.

L'extracció de l'RNA total es va fer per homogeneïtzació amb TRizol[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), una solució de fenol i isotiocianat de guanidina la qual lisa les cèl·lules i dissol els seus components tot mantenint la integritat de l'RNA. El procediment es va realitzar d'acord amb les instruccions del fabricant. El material lisat amb TRizol[®] es barreja amb cloroform i es centrifuga, obtenint així dues fases separades: una orgànica, amb el DNA, i una aquosa, que conté l'RNA. Es recull la fase aquosa, es fa precipitar l'RNA amb isopropil alcohol, i es fa un rentat amb etanol al 75 %. Finalment, l'RNA purificat es dissol amb aigua dietil pirocarbonada (DEPC) i se'n determina la concentració per densitat òptica a 260 i 280 nm mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

La conversió d'1 μ g d'RNA a cDNA es va dur a terme amb el kit iScript cDNA de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El procés de transcripció inversa es va realitzar amb un termociclador Eppendorf[®] Mastercycler (Hamburg, Alemanya) i va

consistir en 3 cicles: incubació a 25 °C durant 5 min, a 42 °C durant 30 min i finalment a 85 °C durant 5 min. El cDNA obtingut es va dissoldre en aigua per ajustar la concentració a 10 ng/µl.

Finalment, es va procedir a la quantificació de l'expressió dels gens d'interès per qPCR. Per fer-ho, es van utilitzar oligonucleòtids específics per a cada gen d'interès, les seqüències dels quals es mostren a la Taula IV, així com el fluoròfor iTaq™ SYBR® Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). L'especificitat dels oligonucleòtids, juntament amb la naturalesa intercal·lant del SYBR Green fan que la senyal fluorescent detectada pel termociclador sigui específica del producte a estudiar i proporcional a la quantitat de cadenes de cDNA que hi havia a l'inici del procés. L'aparell utilitzat va ser el DNA Engine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

El protocol d'amplificació va consistir en un primer pas d'1 min i 30 s a 95 °C per tal d'activar la polimerasa, seguit de 40 cicles d'amplificació. Cada cicle consistia en un primer pas de desnaturalització per separar les cadenes de cDNA (15 s a 95 °C), seguit de la hibridació del cDNA amb els oligonucleòtids (30 s a 60 °C), i l'elongació (20 s a 72 °C). Finalment, les mostres es sotmeten a una corba de temperatures (de 55 °C a 95 °C) per tal de confirmar l'especificitat dels productes de qPCR i descartar amplifcacions inespecífiques o la formació de dímers d'oligonucleòtids.

Taula IV. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats a la qPCR

Nom	NM	Seqüència
Gapdh	NM_017008.3	F: 5'-CTG TGT CTT TCC GCT GTT TTC-3' R: 5'-TGT GCT GTG CTT ATG GTC TCA-3'
Il1b	NM_031512.2	F: 5'-AAA AAT GCC TCG TGC TGT CT-3' R: 5'-TCG TTG CTT GTC TCT CCT TG-3'
Ccl2	NM_031530.1	F: 5'-TAG CAT CCA CGT GCT GTC TC-3' R: 5'-TGC TGC TGG TGA TTC TCT TG-3'
Il6	NM_012589.2	F: 5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3' R: 5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'
Mrc1	NM_001106123.1	F: 5'-GCA GGT GGT TTA TGG GAT GT-3' R: 5'-GGG TTC AGG AGT TGT TGT GG-3'
Cd36	NM_031561.2	F: 5'-CCA GAA CCC AGA CAA CCA CT-3' R: 5'-CAC AGG CTT TCC TTC TTT GC-3'

Els resultats es van avaluar mitjançant el programa Opticon Monitor 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), d'acord amb les recomanacions del fabricant. Les mostres es van normalitzar segons el mètode ΔC_t , utilitzant la *Gapdh* com a gen control de l'expressió gènica endògena.

5.8. Seguiment dels exosomes mitjançant fluorescència

Per tal de fer un seguiment dels exosomes i poder estudiar les seves possibles dianes, aquests van ser tenyits amb el tint fluorescent de membrana PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a una concentració 0.8 μ M. Com que la presència de sals fa precipitar el colorant, tant la mostra com el PKH26 es van diluir amb el *Diluent C* que incorpora el kit, el qual és iso-osmòtic i manté la integritat de les membranes. Els exosomes es van incubar amb el PKH26 durant 5 min, i la reacció es va aturar amb BSA al 3 %. Per tal d'eliminar la fracció de colorant no unit, els exosomes es van rentar amb PBS tres cops utilitzant els concentradors Nanosep 300K (Pall Corporation, New York City, NY).

5.9. Histologies

Els animals designats per a estudis histològics van ser perfosos per la vena porta, primer amb NaCl 0.9 % per eliminar la sang i després amb una solució tamponada de formol al 4 %, monitoritzant el canvi de color i de consistència de l'òrgan. Posteriorment es va extreure el fetge, es va tallar a trossets i es va rentar amb PBS durant 10 min. Tot seguit, es va criopreservar el teixit incubant-lo de manera seriada amb solucions de sucrosa de concentració creixent (10 %, 20 %, 30 % i 40 %). En cada cas, el temps d'incubació va dependre del temps que trigués el tros de teixit a equilibrar la seva densitat amb la de la sucrosa. L'última incubació amb sucrosa al 40 % es va deixar tota la nit. Per congelar els trossos de teixit criopreservats, aquests es van submergir en un bany d'isopentà a -40 °C, on la congelació és immediata.

Per fer els talls histològics, els trossos de teixit es van incloure amb un compost O.C.T. (No. 4583, Sakura Finetek, Torrance, CA) i es van fer talls de 10 μ m de gruix amb un criòstat Microm HM550 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Els talls es van adherir a portaobjectes Superfrost (VWR, Radnor, PA) i es van guardar a -80 °C fins al moment de ser tenyits.

5.10. Immunofluorescència

Per fer la tinció immunofluorescent dels talls de teixit, les mostres es van descongelar, deixar assecar durant 30 min i rehidratar amb PBS fred durant 15 min. El bloqueig de les unions inespecífiques es va dur a terme amb una solució de sèrum fetal boví al 5 % i BSA al 1.5 % durant 1 h i 30 min. L'anticòs primari monoclonal anti-CD163 (BM4001, Acris antibodies, Herford, Alemanya) es va diluir 1:100 en una solució de BSA a l'1 % i Tritó X-100 al 0.3 %, i es va incubar amb les mostres durant 1 h a temperatura ambient. Com a anticòs secundari es va fer servir l'Alexa-488 (10729174, Life Technologies, Carlsbad, CA), del qual se'n va fer una dilució 1:1000 en la mateixa solució de BSA i Tritó X-100 mencionada anteriorment, i es va incubar amb les mostres durant 1 h. Finalment es va fer una contratinció dels nuclis amb 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durant 3 min. La presència d'exosomes en teixit, així com la colocalització d'aquests amb les cèl·lules de Kupffer (CD163⁺) es va avaluar amb el microscopi de fluorescència Nikon, model Eclipse E 1000.

5.11. Cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses

L'anàlisi d'exosomes de plasma per cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) es va dur a terme al Servei de Proteòmica CSIC/UAB situat a la Universitat Autònoma de Barcelona, el qual té el certificat ISO 9001:2008.

Els extractes de proteïna total d'exosomes (80 µg de cadascuna de les mostres) es van digerir amb una tripsina modificada resistent a autolisi (Promega, Madison, WI), seguint el protocol FASP (*Filter Aided Sample Preparation*) [173]. Cadascuna de les suspensions de pèptids obtingudes es va marcar amb "etiquetes de masses en tàndem" (TMTs) (Thermo Scientific, Rockford, IL), seguint el protocol estàndard indicat pel fabricant. Les TMTs són marcadors de massa isobàrics, és a dir, diferents formes d'una molècula que tenen la mateixa massa. Aquestes TMTs s'uneixen a l'extrem amino terminal dels pèptids i dels residus de lisina, de manera que tots els pèptids d'una mostra queden marcats covalentment amb una TMT específica i és aquesta marca la que permetrà fer la quantificació relativa de les mostres (Figura 13). Després del marcatge, les diferents mostres es van combinar, evaporar i netejar de sals fent servir columnes d'extracció en fase sòlida C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

L'anàlisi de la mostra amb tots els pèptids marcats es va fer per LC-MS i per triplicat, fent servir l'aparell LTQ-Orbitrap XL, equipat amb una font d'ions nanoESI (Proxeon, Odense, Dinamarca) i seguint el protocol establert [174]. La separació dels pèptids es va fer amb una pre-columna C-18 (Agilent Technologies) connectada a una columna de fase reversa C18 de 15 cm de longitud i 100 µm de diàmetre intern (Nikkyo Technos Co, Japan), a un flux de 0.4 µl/min en un gradient d'acetonitril (del 0 a 40 %) en àcid fòrmic. L'aparell LTQ-Orbitrap es va configurar amb el mode d'ions positius, a 1.8 kV i un rang de rastreig de m/z 400-2000. En l'anàlisi MS/MS, els ions peptídics es van dissociar per HCD (*Higher-energy collisional dissociation*). En aquest pas, cadascun dels TMTs utilitzats es fragmenta per un lloc diferent, generant diferents ions *reporter* que poden ser identificats. L'abundància de cadascun d'ells permet fer la quantificació relativa dels pèptids detectats.

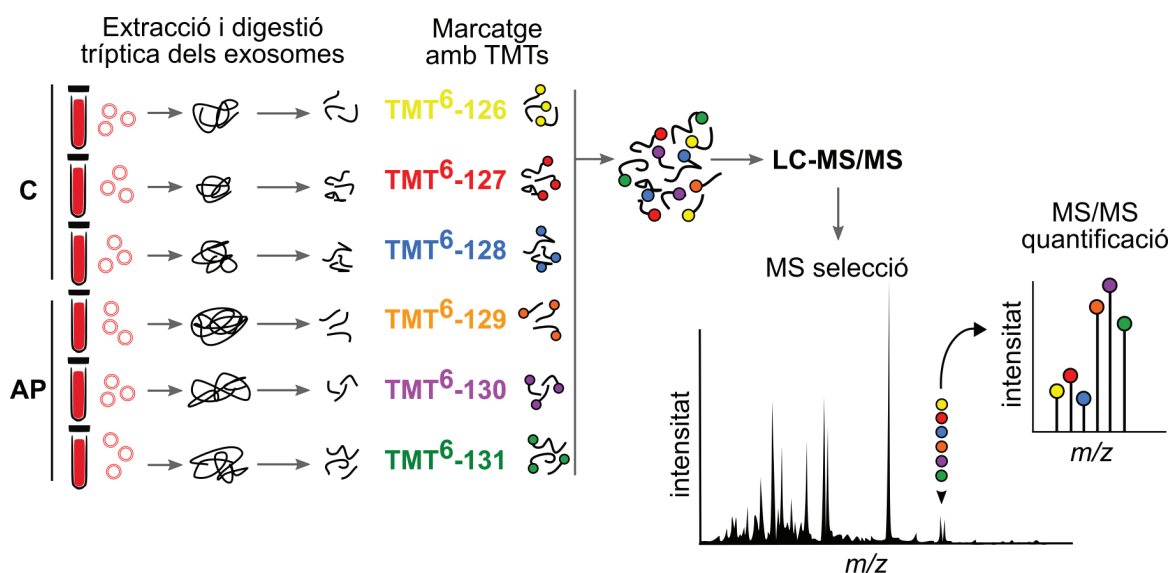


Figura 13. Detecció i quantificació de proteïnes per espectrometria de masses. Els extractes de proteïna es redueixen, alquilen i digereixen. Cadascuna de les mostres es marca amb un TMT diferent, i se'n fa un *pool*. Les mostres s'analitzen per LC-MS/MS. L'abundància relativa de cadascuna de les proteïnes o pèptids es mesura tot comparant els patrons de massa generats pels diferents TMTs en ser fragmentats. Adaptat de [175] i Thermo Fisher Scientific™.

La identificació de les proteïnes es va fer amb el programari Protein Discoverer (ThermoFisher, San Jose, CA), consultant la base de dades UniProt i amb els següents paràmetres: *parent tolerance*, 20 ppm; *fragment tolerance*, 0.8 Da; *enzyme*, tripsina; *missed cleavages*, 1; *fixed modifications*, carbamidometilació; *variable modifications*,

oxidació. El programa DanteR [176] es va fer servir per a la quantificació relativa i l'anàlisi estadístic dels pèptids TMT. Només els pèptids únics, és a dir, aquells que permetien identificar una proteïna inequívocament, es van considerar aptes per a l'anàlisi. Es va normalitzar la intensitat de cadascun dels ions *reporter* derivats de TMTs i es va fer una ANOVA amb el programari DanteR, comparant els pèptids *Control* vs. *AP* en un model lineal. Els valors de p es van ajustar amb la correcció Benjamini & Hochberg *False Discovery Rate* (FDR). El valor llindar de p es va ajustar a 0.05, i es van considerar significatius els canvis amb una ràtio AP/C inferior a 0.67 o superior a 1.5.

Les bases de dades Gene ontology (GO) [177], KEGG orthology [178] i BioGPS [179] es van fer servir per classificar les proteïnes en què s'havien detectat canvis significatius en la seva expressió en condicions inflamatòries.

5.12. Assaig d'unió

Per avaluar la capacitat de REG3 β d'unir-se a les glicoproteïnes de membrana dels exosomes, es va dissenyar un assaig d'unió exosoma-REG3 β inspirat en els protocols clàssics d'assaigs tipus ELISA en microplaca. L'assaig es basa en el segrest de REG3 β i la posterior addició dels exosomes marcats amb PKH26. Mitjançant un fluorímetre és possible fer una anàlisi semiquantitativa de la retenció dels exosomes, proporcional al seu grau d'interacció amb REG3 β . L'assaig es va dur a terme amb dos suports diferents: microplaques i esferes magnètiques.

5.12.1. En microplaca

Per fer l'assaig es van fer servir plaques de 96 pous de color negre FLUOTRAC-600 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Àustria), les quals absorbeixen la llum, redueixen el soroll de fons i minimitzen la interferència entre pous contigus. Les plaques es van recobrir amb l'anticòs contra REG3 β (Dynabio SA, Marseille, França) dissolt en tampó bicarbonat 0.2 M (pH 9.2) a una concentració de 10 $\mu\text{g/ml}$. Per una correcta adsorció, les plaques es van segellar i es van deixar a 4 °C durant tota la nit. L'endemà, es van bloquejar amb BSA al 3 % durant 2 h, i després s'hi va afegir la proteïna REG3 β (Dynabio SA, Marseille, França) dissolta en la solució de bloqueig durant 1 h. Finalment, després de rentar les plaques amb PBS-Tween al 0.05 %, es van afegir els exosomes tenyits amb PKH26. Les concentracions de REG3 β i d'exosomes emprades s'especifiquen al disseny experimental de cada assaig. Al cap d'1 h d'incubació, les plaques es van rentar 5 cops per tal d'eliminar tots els exosomes no units, i es van llegir

amb el fluorímetre Spectramax Gemini XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Tots els passos es van realitzar a temperatura ambient i en agitació constant (PMS-1000 Microplate Shaker, Grant Instruments, Cambridge, UK).

Per confirmar que la unió exosoma-REG3 β era dependent del domini lectina de la proteïna es va dur a terme un assaig d'unió competitiva en presència de diferents sucres. L'adsorció de l'anticòs i el segrest de REG3 β a la placa es van fer seguint el protocol esmentat. No obstant, la incubació dels exosomes tenyits es va fer en presència de D-mannosa 5 mM (1 mg/ml), mannà (1 mg/ml) o bé NAG 5 mM. Els rentats previs a la lectura van permetre eliminar els sucres i els exosomes que no havien interaccionat amb REG3 β .

5.12.2. En esferes magnètiques

Per fer aquest assaig, l'anticòs es va adsorbir en esferes magnètiques Surebeads™ conjugades amb proteïna A (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les esferes contenen un nucli superparamagnètic, que permet aïllar-les del sobrenedant i rentar-les instantàniament tot posant-les en contacte amb un imant. Gràcies a la proteïna A, la qual té alta afinitat per les immunoglobulines G (IgGs), s'hi pot adsorbir l'anticòs que es desitgi.

L'assaig es va realitzar seguint les recomanacions del fabricant. Per a cada condició, 50 μ l d'esferes magnètiques (0.5 mg) es van rentar per imantació i es van recobrir amb 10 μ g d'anticòs contra REG3 β durant 10 min. Un cop eliminat l'anticòs no unit, es van incubar durant 1 h amb diferents concentracions de REG3 β dissolta en PBS. Després de rentar-les, es van resuspendre amb exosomes prèviament tenyits amb PKH26 i es van incubar durant 1 h més. Finalment, els exosomes retinguts es van dissociar del complex mitjançant un tampó d'elució a pH àcid (glicina 20 mM, pH 2.0), es van col·locar en una microplaca FLUOTRAC-600 i aquesta es va llegir amb el fluorímetre. La senyal fluorescent detectada per a cada condició va ser proporcional a la quantitat d'exosomes retinguts al complex format per les esferes magnètiques, l'anticòs i REG3 β . Tots els passos es van realitzar a temperatura ambient i en un agitador orbital de tubs.

5.13. Immunoprecipitació

Aquesta tècnica ens permet aïllar de manera selectiva una proteïna present en una solució, mitjançant el reconeixement antigen-anticòs. En aquesta tesi es va emprar per aïllar la proteïna REG3 β de plasma, pas previ a la seva detecció per Western Blot.

Per fer aquest assaig, 50 μ l (0.5 mg) d'esferes magnètiques Surebeads™ conjugades amb proteïna A (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) es van saturar amb l'anticòs contra REG3 β (10 μ g), durant 1 h i a temperatura ambient. Tenint en compte que la proteïna A té afinitat per les IgG, és important saturar-les amb l'anticòs desitjat per tal d'evitar que les immunoglobulines presents al plasma s'hi uneixin en els passos posteriors. Un cop eliminat l'anticòs no unit, les esferes magnètiques es van incubar durant tota la nit i a 4 °C amb les diferents mostres de plasma, provinents d'animals control o animals AP. L'endemà, després de rentar-les, es van resuspendre amb tampó de càrrega, es van escalfar a 85 °C durant 5 min i van ser carregades immediatament en un gel de Western Blot per procedir a la seva detecció.

5.14. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programari GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad software Inc, San Diego, CA). Els resultats estan expressats com el valor promig \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM). Els tests estadístics emprats van ser el t-Student de dos cues per a la comparació de dos grups, o l'anàlisi de variança ANOVA (*one-way analysis of variance*) per comparar tres grups o més. Quan l'ANOVA va indicar l'existència de diferències entre grups es va realitzar el test post hoc de Tukey. Les diferències significatives es van acceptar amb un interval de confiança del 95 % ($p < 0.05$), 99 % ($p < 0.01$) o 99,9 % ($p < 0.001$), segons s'indica en cada cas.

En l'experiment de detecció i quantificació dels nivells de REG3 β en plasma, la densitometria de les bandes de Western Blot es va realitzar amb el software ImageJ.

Per l'anàlisi estadístic dels assaigs d'unió, la intensitat de fluorescència detectada en els experiments de dosi-dependència es va ajustar al model d'hipèrbola *one-site binding*. Els valors de R^2 quantifiquen el grau amb què els valors s'ajusten a la corba calculada. Per a l'assaig de competició en presència de sucres, es va realitzar el F test per detectar variacions en la unió dels exosomes a REG3 β .

RESULTATS

RESULTATS

ESTUDI 1. Paper dels exosomes generats durant la AP severa en el desenvolupament de la resposta inflamatòria sistèmica associada

1.1. Indicadors de dany pancreàtic

Sis hores després de la inducció de la AP, els nivells de lipasa en plasma van augmentar significativament respecte l'activitat detectada en animals control. A nivell de PAAF, a la cavitat peritoneal, els nivells d'activitat lipasa detectats eren encara més notables, essent fins a deu vegades superiors que no pas en plasma (Figura 14A). La resposta inflamatòria a nivell local es va corroborar mesurant els nivells de MPO en teixit pancreàtic, els quals van incrementar significativament en els animals malalts (Figura 14B). Ambdós marcadors permeten validar la correcta inducció de la AP en el model animal.

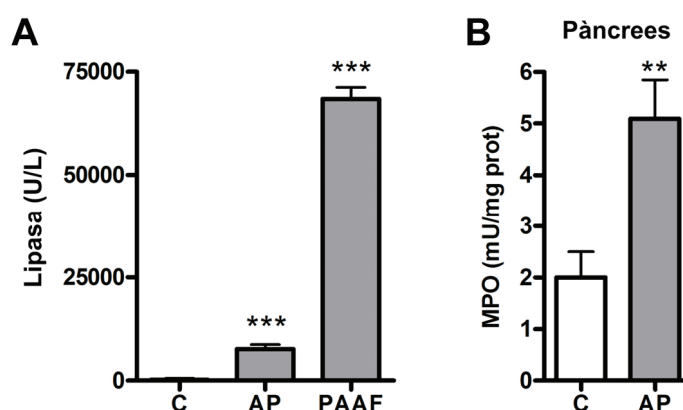


Figura 14. **A**, activitat lipasa en plasma i líquid ascític; **B**, activitat MPO en teixit pancreàtic. C, control; AP, pancreatitis aguda; PAAF, líquid ascític associat a la pancreatitis. $n=6$. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. ** $p<0.01$ vs C. *** $p<0.001$ vs C.

1.2. Resposta inflamatòria pulmonar associada a la AP severa

Un dels motius pels quals s'ha triat el model animal de taurocòlic és perquè reproduïx molt bé els efectes sistèmics associats a la malaltia. Sis hores després d'haver induït la AP, la resposta inflamatòria havia progressat a nivell sistèmic tal i com demostren els nivells de MPO elevats en teixit pulmonar (Figura 15A). També es va confirmar

l'activació dels macròfags alveolars cap a un fenotip proinflamatori, amb l'increment de l'expressió dels marcadors de tipus M1 (*Il1b*, *Ccl2*, *Il6*)(Figura 15B) i la inhibició dels marcadors de tipus M2 (*Mrc1*, *Cd36*)(Figura 15C).

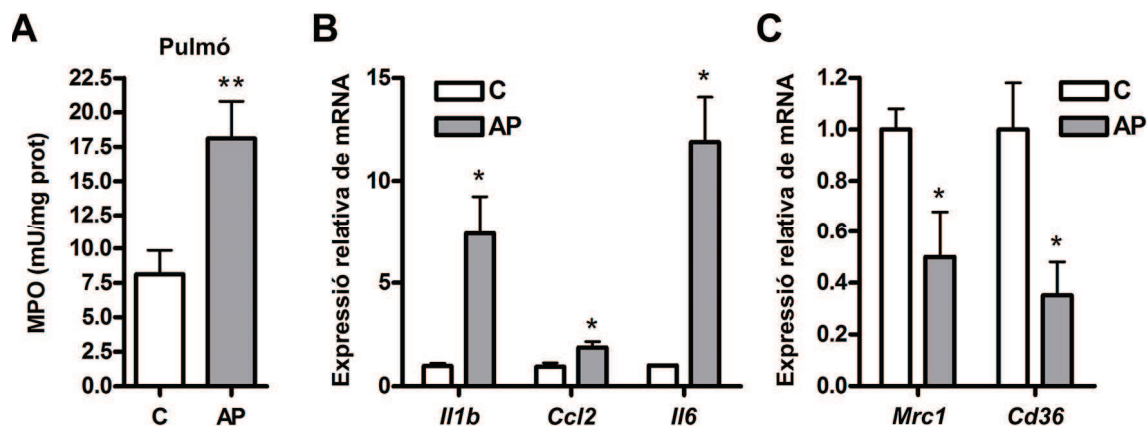


Figura 15. A, activitat MPO en teixit pulmonar; B i C, expressió d'mRNA dels marcadors M1 (B) i M2 (C) en macròfags alveolars 6 h després de la inducció de la malaltia. $n=6$. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$ vs C. ** $p<0.01$ vs C.

1.3. Caracterització de les poblacions d'exosomes en plasma i PAAF

La caracterització morfològica dels exosomes aïllats de plasma (ExoC i ExoAP), així com de l'ascites (ExoPAAF), es va fer per microscòpia electrònica de transmissió (Figura 16). Es van detectar vesícules d'entre 40 i 120 nm de diàmetre, les quals presentaven doble membrana i forma de "copa" com a resultat dels mètodes de tinció i contrast. En el cas dels ExoPAAF, però, es van observar no només exosomes de morfologia normal sinó també exosomes parcialment degradats, que havien perdut la integritat de membrana.

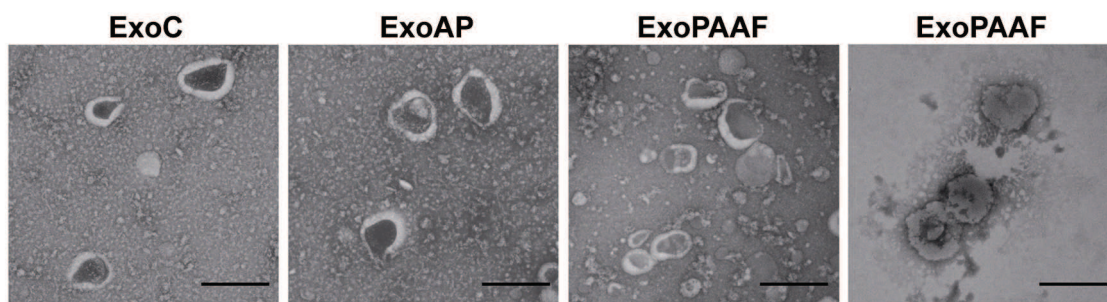


Figura 16. Micrografies d'exosomes aïllats de plasma i PAAF. Tinció negativa amb oxalat d'urani. En el cas del PAAF, es mostren imatges representatives dels dos tipus de morfologies observades. Escala: 200 nm.

Per acabar de confirmar l'enriquiment de la població de vesícules extracel·lulars en exosomes, es van avaluar per Western Blot els marcadors CD63, Alix, TSG101 i Calnexina (Figura 17A). La coexpressió de la tetraspanina CD63 i de TSG101, juntament amb l'absència de la proteïna de reticle Calnexina, van permetre definir la població de vesícules extracel·lulars com a exosomes. En el cas de CD63, les diferents bandes observades es corresponen amb els diferents graus de glicosilació de la proteïna, essent la banda de 25 kDa la proteïna nucli.

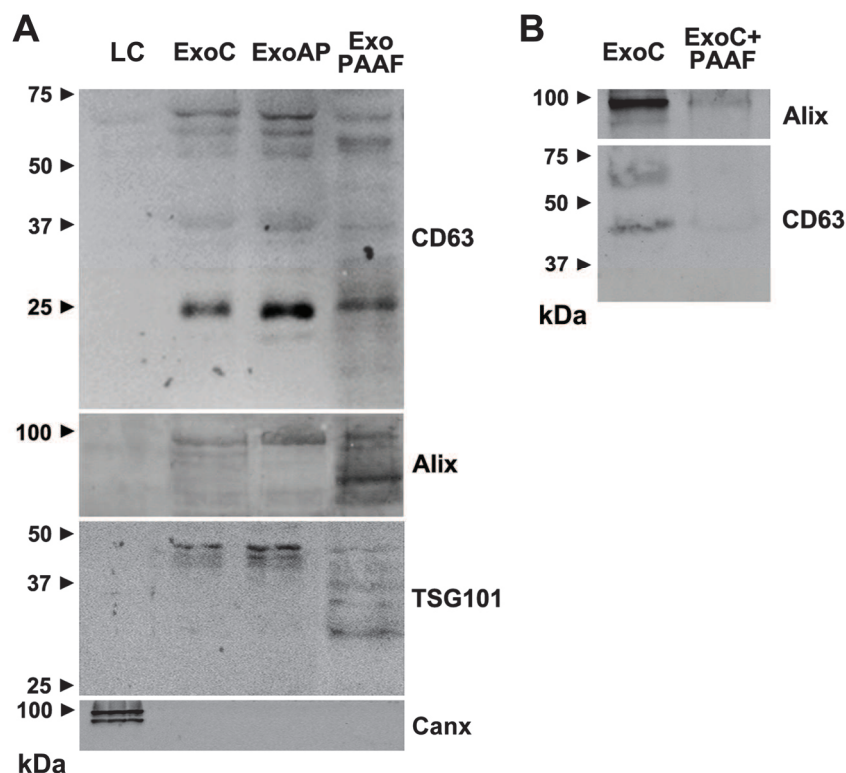


Figura 17. A, anàlisi per Western Blot del lisat cel·lular (LC) i dels extractes proteics d'exosomes (ExoC, ExoAP, ExoPAAF). *Canx*, calnexina. **B**, lisi experimental dels exosomes amb PAAF. Imatges representatives de tres experiments. A l'esquerra de les imatges es mostra l'escala de pesos moleculars.

Tots els marcadors mostraven un patró similar tant en el cas dels ExoC com els ExoAP. En el cas dels ExoPAAF, però, els diferents marcadors analitzats tenien un patró de bandes múltiple, de menor pes molecular que no pas les bandes detectades als exosomes circulants. Aquest resultat, en la mateixa línia que el que s'havia observat anteriorment per microscòpia electrònica, indicava que els ExoPAAF estaven parcialment degradats, segurament a causa de la gran activitat hidrolítica de l'ascites. Per comprovar-ho, es van tractar exosomes de plasma control amb el PAAF (lliure

d'exosomes) i es van analitzar per Western Blot (Figura 17B). L'absència de bandes post-tractament tant en CD63 com Alix va permetre confirmar l'efecte del PAAF sobre la integritat dels exosomes.

Paral·lelament, es van quantificar els exosomes circulants en condicions control i de AP de manera indirecta, determinant la quantitat de proteïnes pel mètode de Bradford (Figura 18). Els resultats mostren que durant la progressió de la malaltia hi ha un increment significatiu en la concentració d'exosomes plasmàtics.

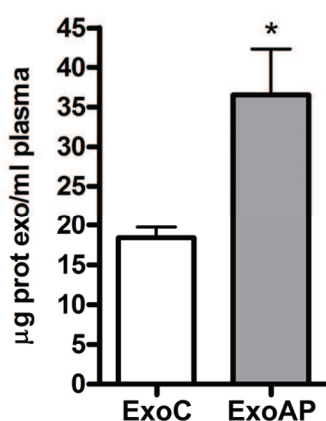


Figura 18. Quantificació dels exosomes plasmàtics mitjançant el mètode de Bradford. $n=6$. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$ vs ExoC.

1.4. Els exosomes generats durant la AP activen els macròfags alveolars

La capacitat dels exosomes per activar els macròfags alveolars es va analitzar en assaigs *in vitro*. En el primer experiment, els macròfags es van incubar amb exosomes aïllats del mateix volum de plasma (1 ml) per tal de fer una aproximació al flux d'exosomes que potencialment arriba a l'espai alveolar. Els resultats evidencien que els ExoAP eren capaços d'activar els macròfags i polaritzar-los cap a un fenotip M1, tal i com demostra l'increment en l'expressió de les citocines inflamatòries *Il1b* i *Il6*, de la quimiocina *Ccl2* (Figura 19A), i la inhibició d'un dels marcadors M2, *Mrc1* (Figura 19B). Els ExoC també van tenir un efecte lleugerament proinflamatori sobre els macròfags alveolars, reflectit en l'augment en l'expressió de *Il1b* i la inhibició de *Mrc1*. Amb ambdós tractaments, tot i que l'expressió de *Cd36* va augmentar lleugerament, aquest canvi no va ser significatiu.

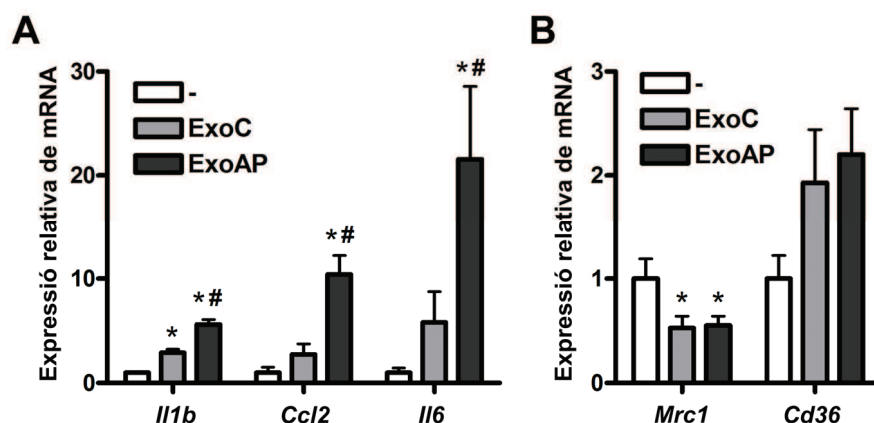


Figura 19. Anàlisi de l'expressió d'mRNA de marcadors de tipus M1 (A) o M2 (B) en macròfags alveolars tractats amb ExoC/ExoAP aïllats d'1 ml de plasma. $n=6$. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$ vs *no tractat*, # $p<0.05$ vs *ExoC*.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, durant la AP hi ha un increment en la concentració d'exosomes plasmàtics. Per tal de descartar que les diferències observades en l'activació dels macròfags fossin per aquest motiu, es va realitzar un segon experiment on els macròfags van ser incubats en presència d'una quantitat fixa (2 $\mu\text{g/ml}$) de cadascuna de les poblacions d'exosomes plasmàtics. En aquest cas, els macròfags alveolars es van polaritzar cap a un fenotip M1 només en presència dels ExoAP, tal i com s'observa en els canvis dels mateixos marcadors analitzats anteriorment (Figura 20).

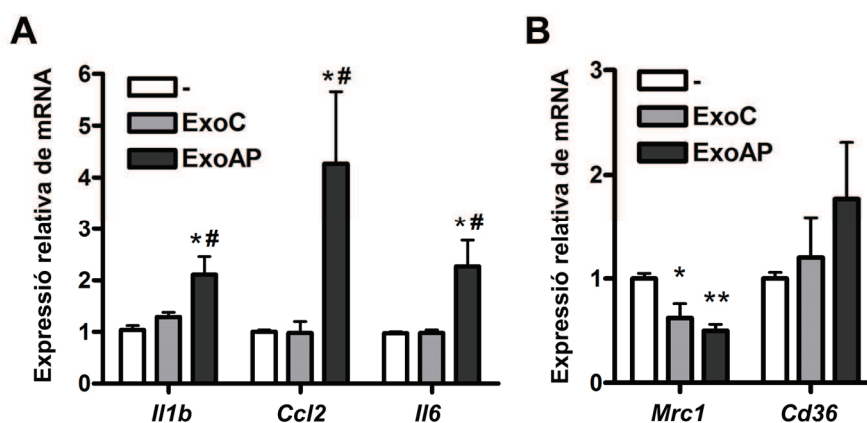


Figura 20. Anàlisi de l'expressió d'mRNA de marcadors de tipus M1 (A) o M2 (B) en macròfags alveolars tractats amb 2 $\mu\text{g/ml}$ de ExoC/ExoAP. $n=6$. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$ vs *no tractat*, ** $p<0.01$ vs *no tractat*, # $p<0.05$ vs *ExoC*.

1.5. Els exosomes circulants arriben a l'espai alveolar

Un cop demostrat que els ExoAP activaven els macròfags alveolars, es va voler comprovar si aquesta situació podia tenir lloc també *in vivo*, és a dir, si els exosomes plasmàtics eren capaços d'arribar a l'espai alveolar per polaritzar els macròfags. Mitjançant un experiment de perfusió a través de la vena cava es va observar que, 45 min després d'haver injectat els exosomes tenyits (ExoAP-PKH26), aquests havien estat incorporats pels macròfags alveolars (Figura 21). Aquest fet confirmava, doncs, que els exosomes generats durant la AP són capaços de travessar la barrera epitelial alveolar *in vivo* i que, un cop allà, són captats pels macròfags alveolars.

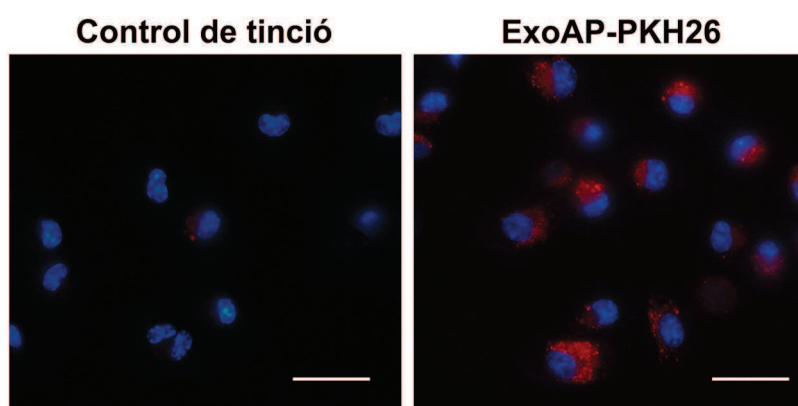


Figura 21. Perfusió d'ExoAP tenyits a través de la vena cava. La captació *in vivo* dels exosomes s'observa en els macròfags alveolars PKH26⁺ (vermell). Contratinció dels nuclis amb DAPI (blau). Com a control de tinció s'ha fet una perfusió de PBS processat amb PKH26. Imatges representatives de $n=4$. Escala: 20 μm .

1.6. Anàlisi del perfil proteòmic dels exosomes circulants

Després d'haver identificat diferències en el potencial inflamatori d'exosomes d'animals control i d'animals amb AP, es va voler definir quin perfil proteòmic tenien les dues poblacions d'exosomes circulants. A través d'una anàlisi d'espectrometria de masses es van identificar fins a 188 proteïnes amb un alt grau de confiança, és a dir, amb una coincidència d'almenys dos pèptids tríptics. D'aquestes, 17 eren proteïnes que es troben a la majoria de poblacions d'exosomes, com ara la tetraspanina CD9. En el conjunt de proteïnes identificades amb un sol pèptid destaca la presència d'altres marcadors d'exosomes com CD82 o Rab27 (veure Apèndix, Taula II).

El marcatge de les mostres amb TMTs va permetre identificar i quantificar quines proteïnes s'expressaven diferencialment entre ambdues poblacions. Els resultats obtinguts es van introduir a les bases de dades GO, KEGG i BioGPS per definir la funció principal i el teixit on se solen expressar més aquestes proteïnes, per tal de fer una aproximació al possible origen dels exosomes circulants.

En conjunt, es van identificar 27 proteïnes sobreexpressades i 6 infraexpressades significativament en la població d'ExoAP respecte els ExoC (Taula V). Segons l'anàlisi de GO, aquestes proteïnes estan relacionades principalment amb la Resposta immune, el Transport d'oxigen, el Transport de lípids i el Transport d'ions. Sorprenentment, en realitzar la cerca a les bases de dades vam observar que moltes de les proteïnes identificades són secretades clàssicament pel fetge i per cèl·lules del sistema immunitari, ja sigui en condicions normals o patològiques. Alguns exemples en són les apolipoproteïnes, les globines, l'anhidrasa carbònica II o els antígens de superfície de leucòcits com CD47. Tot i que de manera més minoritària, també es van detectar proteïnes sintetitzades clàssicament a ronyó i al sistema gastrointestinal, sobretot de naturalesa transportadora. Un altre dels aspectes més destacables de l'anàlisi va ser el fet que, contràriament al que s'esperaria, gairebé no es van detectar proteïnes amb un clar origen pancreàtic sobreexpressades a les mostres ExoAP.

Taula V. Catàleg de les proteïnes sobreexpressades de manera diferencial entre exosomes circulants d'animals control o AP

Proteïna	F. Bio.	Origen	Ratio	P	Refs.
Embigin	AC, TL	S. Imm.	6,98	4,68E-04	[180]
Anhidrasa carbònica 2	TI	Hepàtic , SGI, R	5,51	1,60E-03	[177,181]
Hba2	TO	Hepàtic , MO	5,27	1,44E-66	[182–184]
Anhidrasa carbònica 1	MC	Hepàtic , SGI, P	5,14	1,07E-06	[181,185]
Zero β-globina	TO	Hepàtic , MO	4,87	4,26E-05	[183]
Hemoglobina sub β-2	TO	Hepàtic , MO	4,83	7,19E-15	[183]
Prot d'intercanvi iònic	TI	R, MO	4,45	1,02E-24	[177,186]
CD47	Mcell	S. Imm.	4,06	2,00E-03	[187]
Aquaporina-1	TA	R	3,49	8,19E-04	[177,188]
Hbb-b1	TO	Hepàtic , MO	3,00	2,01E-08	[183]
Proteïna RGD1565355	AC		2,93	1,70E-02	[177]

Proteïna	F. Bio.	Origen	Ratio	P	Refs.
Hemoglobina sub β -1	TO	Hepàtic, MO	2,88	9,65E-23	[183]
Cadena alfa del MHC-I	RI	S. Imm.	2,75	1,65E-04	[177]
Rab-10	TP	S. Imm.	2,65	6,70E-04	[177,189]
Prot. d'unió a mannososa C (MBP-C)	RI	Hepàtic	2,51	1,34E-08	[190]
MCT1	TL	S. Imm, SGI	2,37	3,00E-02	[191,192]
Prot d'unió a LPS	RI, TL	Hepàtic	2,35	1,32E-03	[193]
Queratina tipus II- 73	R mt.		2,23	6,98E-06	[177]
Homòleg de tweety	TI	R, saliva	2,06	1,02E-03	[194]
Apolipoproteïna C-I	TL	Hepàtic	1,92	2,16E-09	[184]
Ficolina-2	RI	S. Imm.	1,76	3,64E-02	[190,195]
Proteïna Stom			1,75	1,39E-02	
S100-A9	RI, Qt.	S. Imm., SGI	1,75	3,99E-02	[196]
Queratina tipus II- 2	Quer.	SGI, pell	1,54	3,25E-04	[177]
Apolipoproteïna A-II	TL, RI	Hepàtic	1,53	1,82E-04	[177,197]
S100-A8	RI. Qt.	S. Imm.	1,53	3,34E-04	[196]
Queratina tipus I- 10	Quer.	Pell	1,53	3,76E-10	[177]
Pancrina	TP, Reg	P, SGI	0,60	1,60E-03	[198,199]
Miosina, heavy polip. 9	TC, Endo	R, S. Imm.	0,59	2,21E-02	[177,200]
Ficolina-1	RI	Hepàtic, S. Imm.	0,54	1,81E-02	[190,195]
Complement C6	RI	Hepàtic	0,49	1,28E-05	[201]
Lox11	Rta. LPS		0,47	2,15E-02	
Haptoglobina	F. aguda, RI	Hepàtic	0,30	7,87E-46	[202]

F. Bio (categoria *biological process*, GO): AC (adhesió cel·lular), Endo (endocitosi), MC (metabolisme del carboni), Mcell (migració cel·lular), Qt. (quimiotaxi), Quer. (queratinització), Reg (regeneració), RI (resposta immune), R. mt. (regulació mitocondrial), Rta. LPS. (resposta a lipopolisacàrid), TA (transport d'aigua), TC (transport de calci), TI (transport d'ions), TL (transport de lactat), TO (transport d'oxigen), TP (Transport de proteïnes). *Origen*: MO (moll de l'os), R (renal), SGI (sistema gastrointestinal), S. Imm. (sistema immune). *Altres*: LPS (lipopolisacàrid), Refs (referències).

1.7. Els exosomes del PAAF són retinguts al fetge

L'anàlisi de proteòmica mostra com, durant la AP, els exosomes circulants tenen sobreexpressades poques proteïnes pancreàtiques i estan enriquits en proteïnes d'origen hepàtic. Per aquest motiu, es va realitzar un experiment de perfusió addicional enfocat a avaluar el possible paper del fetge com a filtre dels exosomes generats pel pàncrees, els quals són alliberats en part a la cavitat peritoneal i recollits pel PAAF.

En primer lloc es va repetir l'experiment de perfusió, però aquest cop els exosomes emprats van ser ExoPAAF i la perfusió es va fer per dues vies diferents: la vena cava inferior i la vena porta. En fer la perfusió a través de la vena porta només un 25 % dels macròfags alveolars havien fagocitat els exosomes PKH26⁺, mentre que amb la perfusió a través de la vena cava la quantitat de macròfags PKH26⁺ arribava fins al 70 % (Figura 22). Els resultats mostren, doncs, que una part dels exosomes perfosos a través de la vena porta no eren capaços d'arribar a l'espai alveolar, fet que remarcava el possible paper del fetge com a filtre d'aquests exosomes.

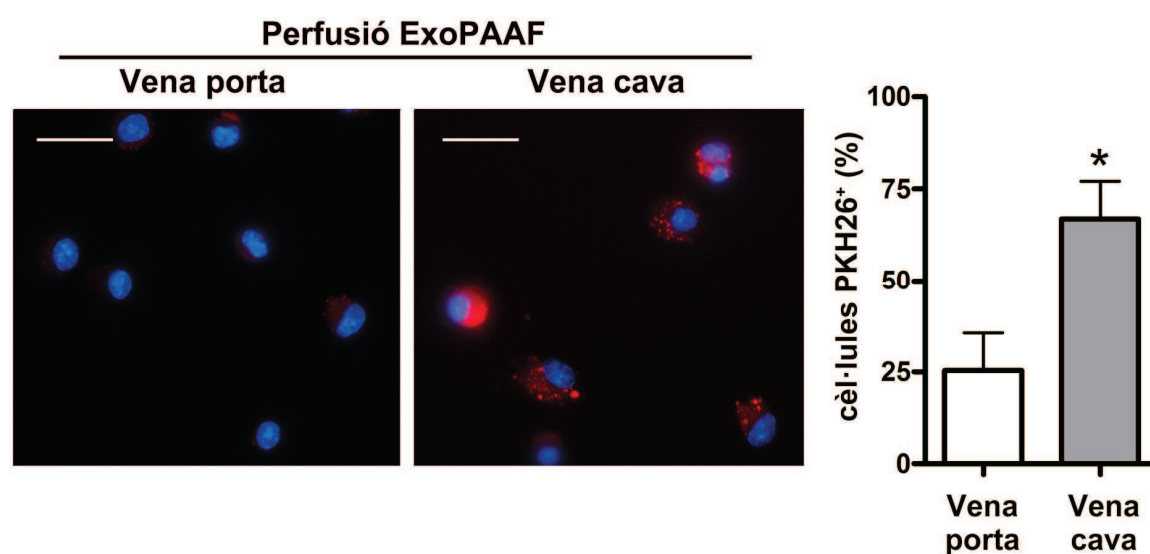


Figura 22. Perfusió de la mateixa quantitat d'ExoPAAF a través de la vena porta o la vena cava. La captació *in vivo* dels exosomes s'observa en els macròfags alveolars PKH26⁺ (vermell). Contraintenció dels nuclis amb DAPI (blau). Imatges representatives de $n=5$. Escala: 20 μm . A la dreta, quantificació dels macròfags PKH26⁺ sota ambdues condicions de perfusió (recompte de 10 camps per mostra). Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$ vs vena porta.

Per confirmar si aquests exosomes eren retinguts al teixit hepàtic es va realitzar una anàlisi histològica del fetge dels animals perfosos a través de la vena porta. Els talls histològics mostren la presència d'exosomes PKH26⁺ retinguts al parènquima hepàtic, sobretot als hepatòcits, fet que revela que els exosomes perfosos eren capturats principalment per aquestes cèl·lules (Figura 23). Tanmateix, tenint en compte que un dels tipus cel·lulars més fagocítics del fetge són les cèl·lules de Kupffer, també es va realitzar una contratinció dels talls histològics amb CD163, un marcador per a aquestes cèl·lules. Es va observar molt poca colocalització entre els marcadors PKH26 i CD163, fet que reforçava la presència dels exosomes sobretot a l'interior dels hepatòcits.

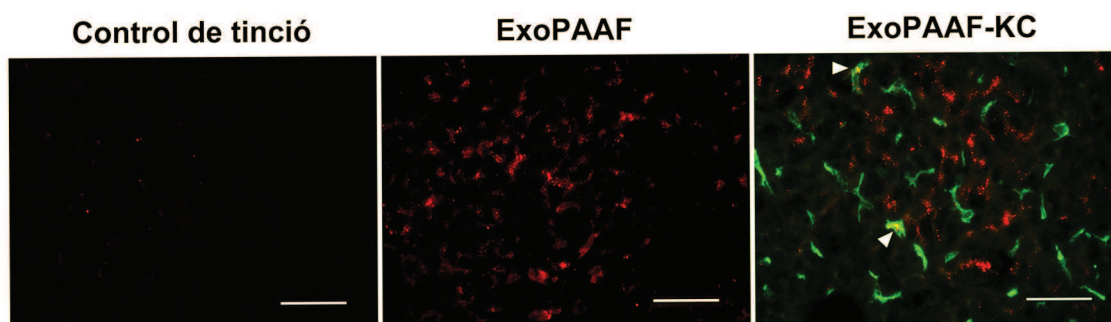


Figura 23. Seccions representatives de fetges d'animals perfosos amb ExoPAAF a través de la vena porta. La retenció dels ExoPAAF al parènquima hepàtic (vermell) mostra un baix nivell de colocalització amb les cèl·lules de Kupffer (KC, CD163⁺, verd). Les fletxes indiquen la colocalització d'ambdós marcadors. Com a control de tinció es mostra una secció de fetge perfós amb PBS processat amb PKH26. $n=5$. Escala: 50 μm .

Aquests resultats es van poder confirmar mitjançant la digestió de fetges perfosos i el posterior aïllament dels hepatòcits i les cèl·lules de Kupffer. El grau d'exosomes PKH26⁺ fagocitats era molt superior als hepatòcits en comparació amb les cèl·lules de Kupffer (Figura 24), fet que reforçava els resultats anteriors i confirmava que els exosomes absorbits pel sistema portal són retinguts majoritàriament pels hepatòcits.

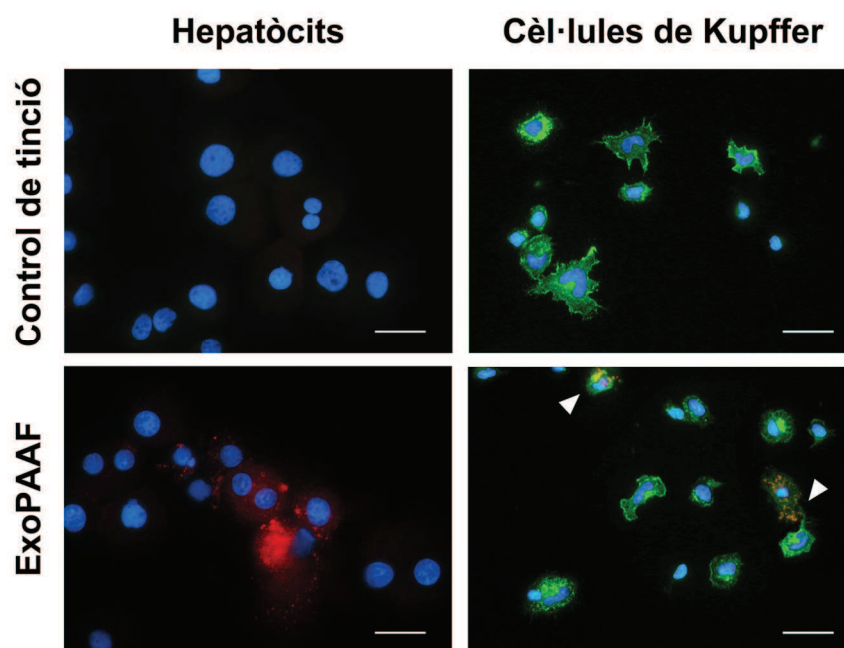


Figura 24. Hepatòcits i cèl·lules de Kupffer aïllats de fetges sota les mateixes condicions de perfusió: PBS processat amb PKH26 (control de tinció) o bé exosomes tenyits amb PKH26 (ExoPAAF, vermell). Confirmació de la puresa de l'aïllament de les cèl·lules de Kupffer amb anti-CD163 (verd). Les fletxes indiquen la colocalització d'ambdós marcadors. Contratinció dels nuclis amb DAPI (blau). Imatges representatives de $n=3$. Escala: 20 μm .

ESTUDI 2. Caracterització del mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes

2.1. Els nivells de REG3 β circulant incrementen durant la AP

Els nivells de REG3 β es van mesurar en mostres de plasma 6 h després de la inducció de la AP (Figura 25). Els resultats van permetre confirmar com la síntesi i secreció d'aquesta proteïna d'estrès sintetitzada pel pàncrees incrementen significativament durant la progressió de la malaltia. Cal destacar que gran part de la proteïna es va detectar en forma de trímers (48 kDa) i tetràmers (64 kDa).

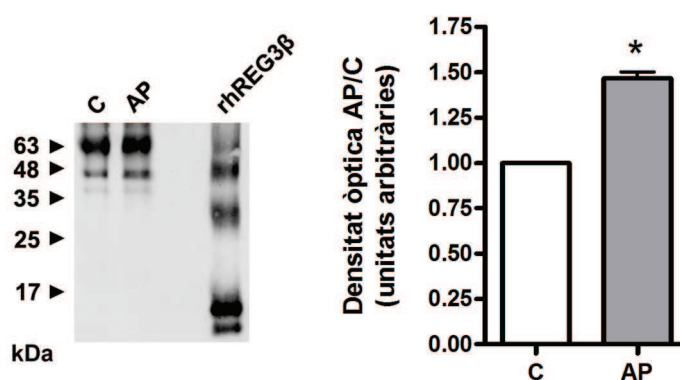


Figura 25. Anàlisi per Western Blot dels nivells de REG3 β en plasma. C, control; AP, pancreatitis aguda; *rhREG3 β* , control positiu de REG3 β recombinant. A l'esquerra de la imatge es mostra l'escala de pesos moleculars. A la dreta, l'anàlisi per densitometria.

2.2. Durant la AP, els exosomes plasmàtics presenten REG3 β unida a la membrana

Tenint en compte l'alta concentració de REG3 β en plasma durant la AP i la premissa que els exosomes són capaços d'interaccionar amb lectines, es va avaluar si els exosomes circulants tenien REG3 β unida a la membrana mitjançant un assaig d'unió. Gràcies a la tinció dels exosomes amb PKH26 i la posterior lectura fluoromètrica es podia detectar si aquests quedaven retinguts al sistema. Els resultats obtinguts mostren com només adsorbint l'anticòs anti-REG3 β a la placa ja és possible capturar els ExoAP, mentre que es detecta molt poca senyal en el cas dels ExoC (Figura 26). Aquest fet demostra que els ExoAP circulants ja tenen REG3 β unida a la membrana *in vivo*. En canvi, quan a la placa s'hi afegeix l'anticòs i seguidament la proteïna REG3 β , les dues poblacions d'exosomes (tant els exosomes ExoC com els ExoAP) són capaços d'adherir-se a la placa, assolint nivells de saturació. En el cas dels ExoAP, tenint en

compte que inicialment ja tenien REG3 β unida, la diferència entre les dues condicions (\pm REG3 β) és molt menor.

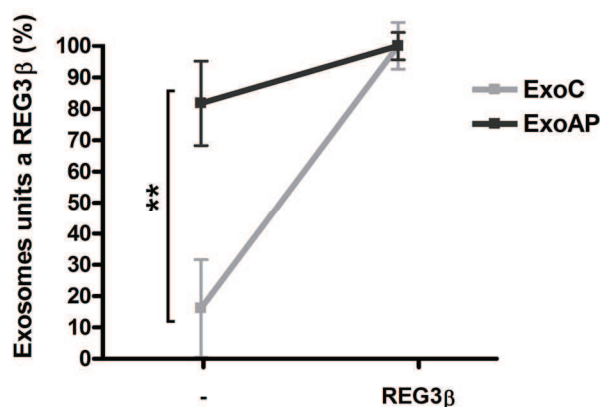


Figura 26. Assaig d'unió dels exosomes de rata en microplaca amb anti-REG3 β adsorbit (sense tractament, -) o saturant la microplaca amb anticòs i REG3 β (REG3 β). La quantitat d'exosomes retinguts es mesura de manera indirecta, en funció de la fluorescència detectada. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM en relació al nivell de saturació (tractament amb REG3 β per a cada població). $n=4$. ** $p<0.01$ vs *ExoC*.

2.3. REG3 β interacciona amb els exosomes a través del seu domini lectina

Un cop demostrada la capacitat dels exosomes plasmàtics d'unir-se a REG3 β , es van realitzar assaigs amb línies cel·lulars per caracteritzar millor la unió i definir-ne el mecanisme molecular.

Primerament es van caracteritzar les poblacions d'exosomes de les línies cel·lulars escollides: la THP-1, una línia monocítica la qual es va diferenciar a macròfags, i la MIA PaCa-2, una línia cel·lular de pàncrees. L'anàlisi per microscòpia electrònica va permetre corroborar que les vesícules aïllades tenien entre 50 i 150 nm de diàmetre, i que estaven delimitades per una bicapa lipídica (Figura 27). Paral·lelament, la detecció per Western Blot de CD81, Alix i TSG101 va ratificar que la població de vesícules aïllades estava enriquida en exosomes.

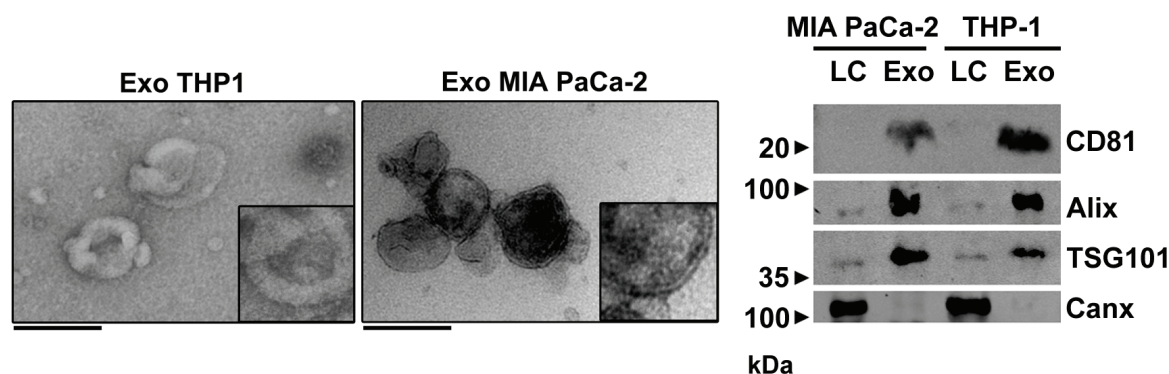


Figura 27. A l'esquerra, imatges representatives dels exosomes per microscòpia electrònica, amb una magnificació 2x per apreciar la doble membrana. Escala: 200 nm. A la dreta, Western Blot del lisat cel·lular (LC) i dels exosomes (Exo). *Canx*, calnexina.

A continuació es va comprovar si els exosomes de línies cel·lulars també eren capaços d'unir-se a REG3 β , i es van determinar les condicions de treball per als experiments posteriors. Els resultats obtinguts mostren com, en presència de REG3 β , la quantitat de senyal detectada incrementava en funció de la quantitat d'exosomes afegida al sistema, arribant a nivells de saturació a partir de la concentració d'1 ng/ μ l d'exosomes (Figura 28). A més, es va observar molt poca retenció d'exosomes en absència de REG3 β (unió inespecífica), un indicador de l'especificitat dels resultats obtinguts. Prenent com a base aquests resultats, en els experiments posteriors la concentració d'exosomes emprada va ser d'1 ng/ μ l.

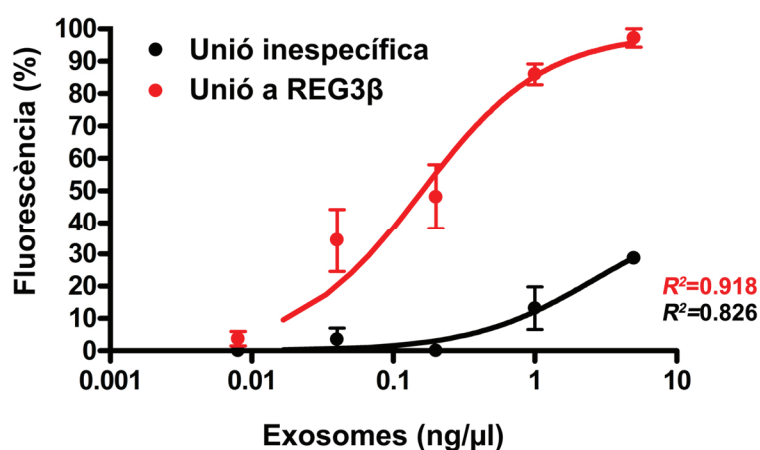


Figura 28. Posada a punt de l'assaig d'unió amb exosomes de macròfags THP-1. La quantitat d'exosomes retinguts es mesura de manera indirecta, en funció de la fluorescència detectada. Les dades s'expressen en relació a la quantitat màxima d'exosomes afegida (5 ng/ μ l). $n=4$. Es mostra l'ajust de les dades al model d'hipèrbola *one-site binding*, i els valors de R^2 resultants.

Un cop definida la concentració de treball (1 ng/ μ l), es va realitzar un assaig per caracteritzar la dosi-dependència de la unió a REG3 β . A més, per validar l'assaig, aquest es va realitzar en dos suports diferents: en microplaca i amb esferes magnètiques. La intensitat de senyal detectada (és a dir, d'exosomes units al sistema) va anar incrementant de manera progressiva d'acord amb la concentració de REG3 β afegida (Figura 29). Es va poder demostrar, doncs, que els exosomes de les dues línies cel·lulars eren capaços d'unir-se a REG3 β i que aquesta unió no depenia del tipus cel·lular que hagués secretat els exosomes. A més, es van obtenir perfils molt similars tant amb microplaca com amb les esferes magnètiques, fet que donava solvència als resultats obtinguts i al disseny de l'assaig.

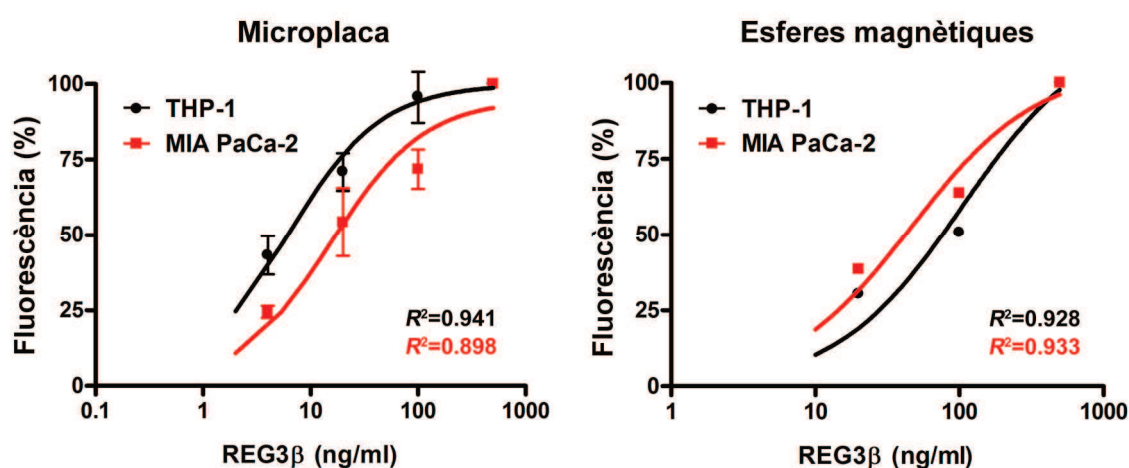


Figura 29. Assaigs d'unió dels exosomes a REG3 β en dos suports diferents. S'observa, en ambdós casos, com la unió és dosi-dependència. La quantitat d'exosomes retinguts es mesura de manera indirecta, en funció de la fluorescència detectada. Les dades s'expressen en relació al nivell de saturació (REG3 β 500 ng/ml). $n=4$. Es mostra l'ajust de les dades al model d'hipèrbola *one-site binding*, i els valors de R^2 resultants.

Per acabar de corroborar la unió entre els exosomes i la lectina REG3 β es va fer un immunomarcatge per microscòpia electrònica. Els exosomes aïllats de macròfags THP-1, un cop recoberts amb REG3 β , es van incubar amb un anticòs primari contra REG3 β i l'anticòs secundari corresponent, el qual estava marcat amb una partícula d'or de 12 nm opaca als electrons. Per microscòpia electrònica es va poder observar com els exosomes recoberts amb REG3 β estaven marcats amb partícules negres (Figura 30), un reflex de la presència de REG3 β a nivell de membrana. Per contra, el marcatge dels exosomes que no havien estat incubats amb la lectina era gairebé negligible.

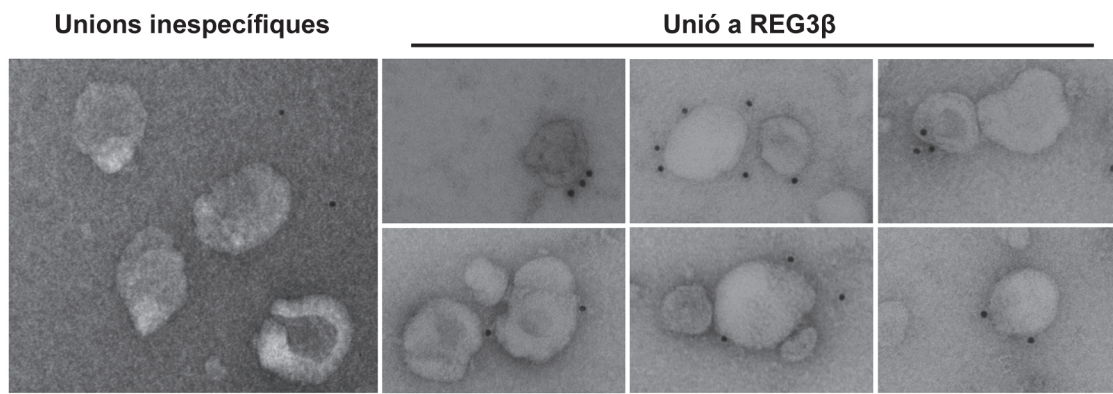


Figura 30. Visualització de l'immunomarcatge de REG3 β per microscòpia electrònica. Les partícules opaques als electrons indiquen la presència de REG3 β .

Tal i com s'ha comentat a la introducció, REG3 β és una de les lectines tipus C més petites que hi ha. La seva activitat es centra en l'únic domini que té, el CTLD, el qual li confereix la capacitat d'unir-se a sucres. Per validar si la unió entre exosomes i REG3 β tenia lloc a través dels glicolípidis i glicoproteïnes de membrana, es va dur a terme un assaig d'unió competitiva. Els resultats mostren com la mannanosa, un sucre simple, no modifica la capacitat d'unió dels exosomes a REG3 β . En canvi, els sucres complexos com el mannà i la NAG (els quals interaccionen amb REG3 β) bloquegen notablement la interacció exosoma-REG3 β , de manera que fins i tot quan el sistema està saturat de REG3 β la quantitat de senyal detectada és aproximadament del 60 % (Figura 31).

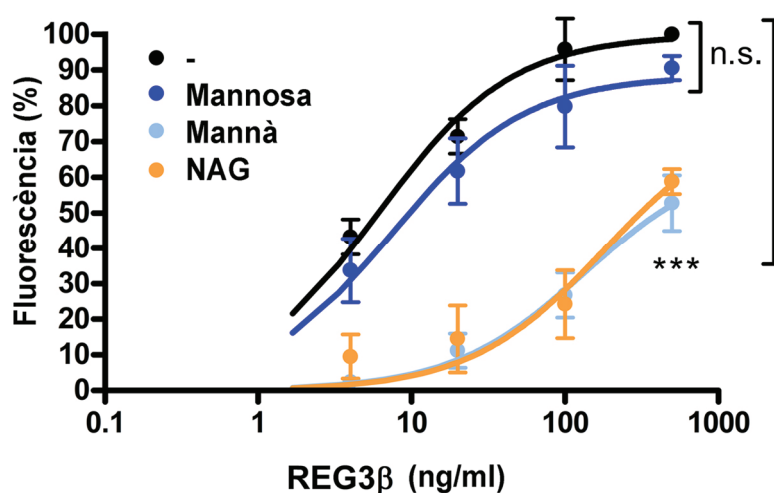


Figura 31. La unió dels exosomes a REG3 β depèn del domini lectina. La quantitat d'exosomes retinguts es mesura de manera indirecta, en funció de la fluorescència detectada. Les dades s'expressen en relació al nivell de saturació (REG3 β 500 ng/ml, sense tractament). Es mostra l'ajust de les dades al model d'hipèrbola *one-site binding*. $n=4$. n.s, no significatiu. *** $p < 0.001$ vs *sense tractament* (-).

2.4. REG3 β inhibeix la captació dels exosomes

Un cop demostrada la interacció dels exosomes amb REG3 β , es va voler investigar si aquesta unió tenia efectes funcionals, ja que s'ha descrit que les lectines poden participar en l'adhesió i internalització dels exosomes per part de les cèl·lules diana.

La captació d'exosomes tenyits en presència de REG3 β es va avaluar de manera creuada entre les dues línies cel·lulars emprades. Els resultats obtinguts demostren com, en incubar els exosomes aïllats de cèl·lules pancreàtiques amb els macròfags, la captació dels exosomes disminueix de manera clara i dosi-dependent en presència de REG3 β , essent ja significativament inferior a partir de 100 ng/ml de REG3 β (Figura 32A). En la mateixa línia, quan els exosomes de macròfags van ser incubats amb cèl·lules pancreàtiques, es va observar una tendència similar, tot i la menor capacitat fagocítica d'aquestes cèl·lules. En aquest cas, la captació va disminuir significativament només en presència de la dosi més elevada de REG3 β (Figura 32B).

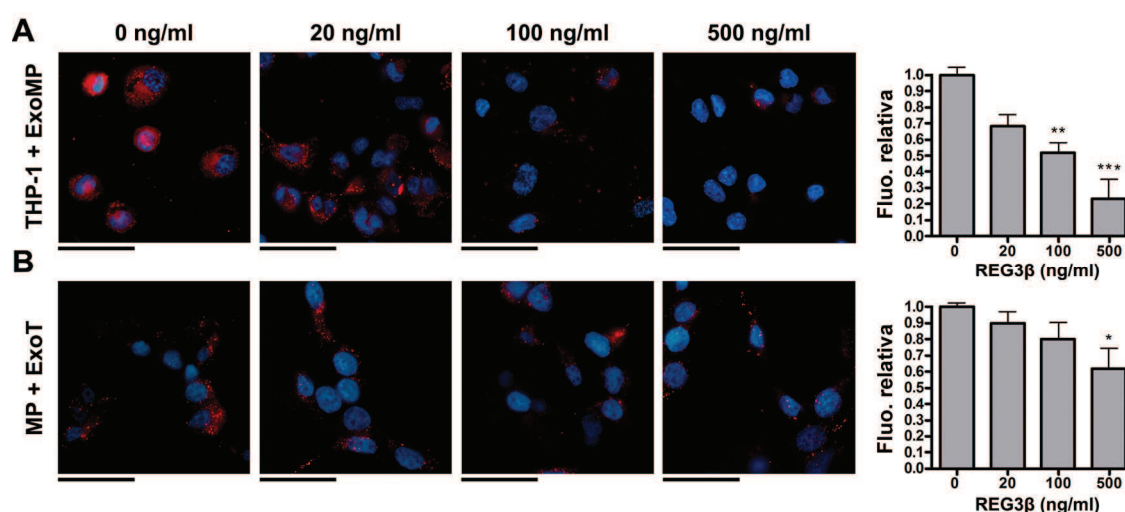


Figura 32. Efecte funcional de la unió de REG3 β als exosomes. **A**, macròfags THP-1 incubats amb exosomes tenyits de cèl·lules MIA PaCa-2 (ExoMP) i **B**, cèl·lules pancreàtiques MIA PaCa-2 (MP) incubades amb exosomes tenyits de macròfags THP-1 (ExoT). En ambdós casos el tractament és de 3 μ g/ml d'exosomes PKH26 (vermell) i concentracions creixents de REG3 β . Contratació dels nuclis amb DAPI (blau). Imatges representatives de $n=5$. Escala: 50 μ m. A la dreta, quantificació de la internalització dels exosomes per fluorimetria en relació al nivell màxim de captació (0 ng/ml REG3 β). Les dades s'expressen com la mitjana \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs 0 ng/ml REG3 β .

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Segons la història, els 12 últims dies d'Alexandre el Gran van ser un autèntic calvari. Durant un dels copiosos banquetes que freqüentava, els quals eren coneguts per l'alt consum d'alcohol, va emmalaltir de sobte. Sembla ser que patia un dolor abdominal molt fort que irradiava cap a l'esquena, el qual el va deixar molt dèbil però lúcid. Tot i que va romandre estable uns dies, aproximadament una setmana més tard va tenir una recaiguda, de la qual ja no es va recuperar. Tenint en compte tots aquests indicis, el Dr. Lars Breimer, de l'Hospital Universitari d'Örebro, va proposar que Alexandre el Gran podria haver mort d'un episodi de AP severa [203]. Una malaltia que pot fer caure un imperi. Però ni tan sols això és suficient per atraure l'interès dels grups de recerca. Un article recent, publicat l'Octubre de 2016, destacava com al llarg dels últims 50 anys hi hagut una davallada dramàtica de la recerca en AP [204]. Des de finals del segle XIX, gràcies a treballs com els de Fitz [205] i Chiari [17] coneixem la fisiopatologia de la malaltia i com la desregulació dels enzims pancreàtics n'és la causa principal. Des d'aleshores, un dels principals objectius de la recerca en AP ha estat trobar un tractament efectiu que permeti frenar el transcurs de la malaltia. Malauradament, més de 125 anys després d'aquella descripció encara tenim massa poques eines per tal de poder-ne predir el grau de severitat o reduir la mortalitat dels pacients, i potser, tot plegat, està molt lligat a aquest cercle viciós que ha relegat la Pancreatologia a un segon pla. Avui en dia, les teràpies que s'apliquen es limiten a la restitució de fluids i el control de l'evolució de la simptomatologia.

Tot i que l'activació dels zimògens és un factor clau en l'aparició de la AP, els tractaments amb inhibidors enzimàtics han fracassat reiteradament al no ser capaços de frenar la progressió sistèmica de la malaltia [206]. Això ha posat de manifest que la AP no és únicament un procés autodigestiu i ha promogut que en els últims anys l'estudi d'aquesta malaltia es focalitzi en els mecanismes que regulen la resposta inflamatòria, des del dany local fins l'afectació sistèmica. Amb aquest objectiu, diversos estudis han proposat estratègies per tal d'inhibir o bloquejar mediadors inflamatoris que se sap que participen en l'exacerbació de la resposta inflamatòria, des de les citocines com el TNF- α [45], passant pels neutròfils [36], les molècules d'adhesió com ICAM-1 [207], l'estrès oxidatiu, l'apoptosi [44,206], etc. Però tot i que alguns d'ells han mostrat resultats prometedors *in vitro* i en models animals, cap dels tractaments ha estat prou efectiu com per aplicar-se de manera rutinària en pacients. També s'han considerat els tractaments

farmacològics enfocats a modular el propi sistema immunitari, per tal de polaritzar els macròfags cap a fenotips antiinflamatoris i frenar així la progressió de la inflamació sistèmica [63]. Tot i que aquests processos són reproduïbles *in vitro*, l'alt ambient degradatiu generat pels enzims hidrolítics durant la AP degrada els còctels de citocines i redueix dràsticament l'efectivitat del tractament.

Al llarg dels últims anys hi ha hagut un interès creixent en els sistemes de comunicació intercel·lular mitjançant vesícules, mecanismes que transporten senyals de naturalesa molt diversa. D'entre tots ells, els exosomes han resultat ser un dels sistemes més estudiats a causa de la seva presència ubiqüa a la majoria de fluids biològics i la seva capacitat no només de transportar molècules sinó també d'iniciar cascades de senyalització [113]. Per tot això, en aquest treball ens vam plantejar el possible paper dels exosomes en el marc de la AP severa. Un sistema de comunicació com els exosomes, els quals són capaços de viatjar pel torrent sanguini, podria tenir un paper molt rellevant en la propagació de la resposta inflamatòria cap a òrgans allunyats del focus de la malaltia, com ara el pulmó. A més, els mediadors transportats estarien protegits per una doble membrana i, per tant, aïllats del medi degradatiu que caracteritza aquesta malaltia. Tot això, a més, podria explicar per què els diferents tractaments emprats fins ara no han estat efectius, ja que s'enfocaven únicament al control i bloqueig dels mediadors solubles.

En aquesta tesi hem descrit per primer cop, en un model experimental, que durant la AP hi ha canvis en el patró d'exosomes circulants i com això podria ésser un factor implicat en el desenvolupament de la malaltia.

El primer dels objectius plantejats va ser descriure la presència d'exosomes en plasma i PAAF en el transcurs de la malaltia, motiu pel qual es va haver de posar a punt la metodologia idònia per fer-ho. En el cas del PAAF va caldre adaptar els protocols clàssics d'aïllament [131], ja que la gran quantitat de fibrinogen que conté impossibilitava l'aïllament de les vesícules. Per microscòpia electrònica es van caracteritzar morfològicament (Figura 16), i per Western Blot es van detectar els marcadors clàssics d'exosomes CD63, TSG101 i Alix (Figura 17A). D'aquesta manera ens vam poder assegurar que treballàvem amb una població de vesícules d'origen endosomal enriquida en exosomes i que no contenia vesícules del compartiment reticular.

En tot aquest procés de caracterització, els ExoPAAF mereixen una menció a part. Tant a nivell morfològic com proteic els resultats mostren la presència de dues poblacions

d'exosomes clarament diferenciades: s'observen exosomes de morfologia normal però també exosomes parcialment degradats que han perdut la integritat de membrana. Aquest fet suggeria que, en la AP, la gran activitat hidrolítica dels enzims a la cavitat peritoneal promou la degradació dels exosomes. Aquesta hipòtesi es va confirmar mitjançant la incubació d'exosomes control amb el PAAF (Figura 17B).

Una de les primeres diferències observades entre animals control i amb AP va ser la quantitat d'exosomes circulants. Diversos estudis ja han descrit com l'activació metabòlica de les cèl·lules en els processos patològics activa la síntesi i secreció d'exosomes. El cas més paradigmàtic són els processos tumorals [208], però també s'ha demostrat en malalties inflamatòries del tracte gastrointestinal com la hepatitis [209] o la malaltia de Crohn [210]. En aquest treball, però, hem descrit per primer cop l'increment en la concentració d'exosomes plasmàtics en el transcurs de la AP severa (Figura 18).

Quan la resposta inflamatòria progressa a nivell sistèmic, un dels primers òrgans afectats és el pulmó [33,35]. Tot i que encara es desconeix quins mediadors desencadenen l'inici de la lesió pulmonar, se sap que els macròfags alveolars residents hi juguen un paper important, tot secretant mediadors inflamatoris i reclutant més leucòcits del torrent sanguini [40,69,211]. Tenint en compte l'augment en la concentració d'exosomes circulants durant la AP, ens vam plantejar que podrien participar en l'activació dels macròfags alveolars residents a pulmó. Amb experiments *in vitro* hem confirmat que els exosomes generats durant el transcurs de la malaltia són capaços de polaritzar els macròfags alveolars cap a un fenotip proinflamatori, ja que hem observat un increment en l'expressió de citocines i quimiocines com *Il1b*, *Il6* i *Ccl2*, i la inhibició o invariabilitat de marcadors de fenotips tipus M2 (Figures 19 i 20). En canvi, els exosomes presents en plasma en condicions normals no indueixen aquesta resposta, un primer indicatiu sobre les diferències entre ambdues poblacions d'exosomes. És evident, però, que la situació *in vivo* és més complexa. Els exosomes no poden ser considerats els únics responsables del dany pulmonar, però sí un mediador més que actua de manera sinèrgica amb citocines i altres mediadors en l'exacerbació de la inflamació sistèmica.

Tot i haver demostrat el potencial proinflamatori dels exosomes durant la AP, cal tenir en compte que els exosomes circulants en plasma no estan en contacte directe amb els macròfags alveolars. Per comprovar, doncs, que els exosomes poden ser captats pels macròfags alveolars també *in vivo*, vam dissenyar un experiment de seguiment de les

vesícules mitjançant el tint PKH26, el qual marca les membranes de color vermell. Els resultats mostren com els ExoAP són capaços de creuar la barrera alveolocapil·lar i ser fagocitats pels macròfags alveolars en condicions *in vivo* (Figura 21). Diversos estudis havien descrit prèviament la capacitat d'altres poblacions de macròfags, com les cèl·lules de Kupffer, de fagocitar els exosomes circulants [165,212]. També hi ha articles que mostren com els macròfags alveolars responen als exosomes instil·lats directament a la cavitat alveolar [213], però encara no es disposava de dades que confirmessin que els exosomes hi poden arribar des del torrent sanguini. En conjunt, els resultats obtinguts mostren que la polarització dels macròfags alveolars per part dels exosomes pot tenir lloc també *in vivo*, i obre un nou ventall de possibilitats en el tractament de la malaltia. Fins ara els exosomes no s'havien tingut en compte en la AP, però cal considerar-los com una probable diana terapèutica a l'hora d'intentar controlar l'expansió de la resposta inflamatòria a nivell sistèmic.

Un dels principals objectius de la tesi era caracteritzar els canvis quantitius i qualitius dels exosomes generats durant la AP severa, motiu pel qual vam realitzar una anàlisi per LC-MS. D'entrada, hem detectat tot un conjunt de proteïnes expressades de manera diferencial en els exosomes circulants en condicions control o inflamatòries (Taula V). Això ens confirma que durant la AP els canvis en els exosomes no es restringeixen només al fet de detectar-ne més en plasma, sinó que es generen exosomes nous i diferents dels que podem trobar en condicions control.

El resultat més sorprenent de l'anàlisi va sorgir arran de la classificació de les proteïnes segons el teixit del qual probablement podien provenir, d'acord amb les bases de dades existents. Si bé els exosomes no són pas una còpia de les cèl·lules que els han secretat, la presència de determinades proteïnes pot ésser un indicador del seu origen. Així doncs, hi ha treballs que descriuen com els exosomes secretats pels limfòcits B solen tenir CD19 o CD20 a nivell de membrana [214], o com determinats marcadors tumorals (PCA-3, TMPRSS2) s'han detectat a l'interior d'exosomes en pacients amb càncer [215]. En el nostre cas, hem detectat que la majoria de proteïnes sobreexpressades eren produïdes clàssicament pel teixit hepàtic i el sistema immune, i de manera menys marcada pel sistema gastrointestinal i el ronyó. Tot i que les proteïnes que formen part d'aquesta classificació no són exclusives dels òrgans o compartiments esmentats, sí que s'hi troben enriquides i la seva presència i activitat se sol associar a funcions clàssiques d'aquests. En humans, per exemple, l'apolipoproteïna AII o la MBP-C formen part de les 12 proteïnes amb nivells més alts d'expressió al fetge, enriquides entre 1000 i 5000 vegades més que en el segon òrgan que les sintetitza al

cos [216]. D'entre la resta de proteïnes sobreexpressades podem destacar l'anhidrasa carbònica, la proteïna d'unió a lipopolisacàrid (LBP) i multitud de globines, sintetitzades també de manera abundant pel fetge [193,216]. I fins i tot entre les proteïnes detectades amb un alt grau de confiança i que mostren una tendència a estar enriquides en ExoAP, tot i no ésser canvis estadísticament significatius (veure Apèndix, Taula I), hem detectat proteïnes com l'angiotensinogen, l'albumina, la fibronectina, les proteïnes del complement, la trombina o la proteïna C reactiva, indiscutiblement secretades pel fetge tant en condicions basals com en múltiples situacions inflamatòries [217,218]. Paral·lelament, l'anàlisi de proteòmica ens ha proporcionat una altra dada important: entre les proteïnes sobreexpressades en els ExoAP, gairebé no n'hi ha que tinguin un clar origen pancreàtic. Per tant, contràriament al que podríem esperar, els resultats de proteòmica ens suggereixen que el fetge, i no pas el pàncrees, podria ser la font principal dels exosomes circulants secretats durant la AP.

Hi ha diferents mecanismes que ens poden ajudar a comprendre la manca de marcadors pancreàtics en els ExoAP. Un dels primers factors a tenir en compte és que una part dels mediadors secretats pel pàncrees són alliberats al PAAF, a la cavitat peritoneal [219]. Com que els exosomes presents en aquest fluid (els quals serien, en part, d'origen pancreàtic) estan parcialment degradats a causa de l'alta activitat enzimàtica (Figures 16 i 17) sembla poc probable que arribin finalment a circulació sistèmica. Aquesta hipòtesi pren força en la caracterització dels ExoAP i els ExoPAAF. En el cas dels exosomes circulants no s'han detectat patrons de degradació proteica ni exosomes amb pèrdua de la integritat de membrana, fet que evidencia les diferències entre ambdues poblacions. No obstant, també ens indica que en aquest fluid, fins i tot un sistema de comunicació vesicular que manté els mediadors encapsulats i protegits, resulta ineficient. Paral·lelament a la toxicitat del PAAF, també cal tenir en compte la localització anatòmica del pàncrees i el drenatge del sistema gastrointestinal. Els mediadors que allibera el pàncrees en el transcurs de la malaltia arriben a circulació sistèmica majoritàriament a través del sistema portal, tant si són alliberats directament al sistema venós com si són abocats al PAAF, el qual és reabsorbit trans-peritonealment [220,221]. Per tant, el fetge esdevé un "lloc de pas" de molts mediadors pancreàtics. Diversos estudis han descrit que el pas de substàncies a través del fetge promou l'activació d'aquest i l'alliberament de citocines i mediadors inflamatoris secundaris a la inflamació del pàncrees, els quals promouen l'extensió de la resposta inflamatòria a nivell sistèmic [39,40,43]. En aquesta mateixa línia, doncs, el fetge també podria estar actuant com a filtre dels exosomes que arribessin directament del pàncrees o del PAAF, evitant que arribessin a circulació sistèmica.

El següent pas de l'estudi va ser comprovar si realment el fetge exercia de filtre dels exosomes derivats del PAAF. Per fer-ho, vam realitzar un experiment de seguiment d'exosomes del PAAF *in vivo*, tot fent-ne la perfusió per dues vies diferents: per la vena porta, assegurant el seu pas a través del fetge; o bé per la vena cava, injectant-los directament a circulació sistèmica (Figura 10). Posteriorment vam avaluar el grau de captació dels exosomes per part dels macròfags alveolars en ambdues condicions de perfusió. Els resultats obtinguts mostren com la quantitat d'exosomes que arriben a la cavitat alveolar és molt menor quan es realitza la perfusió a través de la vena porta (Figura 22), un primer indicador de que el fetge podia estar actuant com a filtre dels exosomes pancreàtics. L'anàlisi histològic del fetge evidencia com els hepatòcits, i les cèl·lules Kupffer en menor grau, són els principals responsables de la retenció hepàtica dels exosomes del PAAF (Figures 23 i 24).

Ja fa anys que se sap que el fetge juga un paper important en el desenvolupament de la AP severa [40]. Un cop activat, les citocines i mediadors que allibera són, en gran part, responsables del dany pulmonar que caracteritza la malaltia [67]. Se sap que els hepatòcits secreten grans quantitats de TNF- α [222] i proteïnes de fase aguda [44], tot i que sempre s'ha considerat que les cèl·lules de Kupffer, les quals també s'activen, eren les principals responsables de la resposta del fetge a la inflamació pancreàtica [68,223]. Fins ara també es desconeixia quins estímuls activaven aquestes cèl·lules, tot i que alguns treballs ja havien atribuït aquest paper a la gran quantitat de mediadors presents al PAAF recollit pel sistema portal [219,224]. En aquest sentit, els nostres resultats obren un nou marc conceptual i plantegen un nou mecanisme a valorar en el desenvolupament de la AP severa. Hem demostrat com els exosomes del PAAF són retinguts al fetge i per tant, poden ser un estímulo que participi en l'activació d'aquest òrgan. A més, el fet de detectar proteïnes d'origen clarament hepàtic a l'interior dels exosomes circulants indica que els hepatòcits poden tenir un paper més destacat que el que se'ls havia atribuït fins ara. Tot això ens suggereix que el fetge està generant i secretant nous exosomes a circulació sistèmica en el transcurs de la malaltia (Figura 33). No obstant, calen més estudis per tal de confirmar-ho i per comprendre si ambdós processos de captació i secreció estan relacionats o no. De moment, aquests resultats donen llum a un nou camp de recerca en la AP i plantegen una possible diana a tenir en compte en el control de la resposta inflamatòria sistèmica que caracteritza la malaltia.

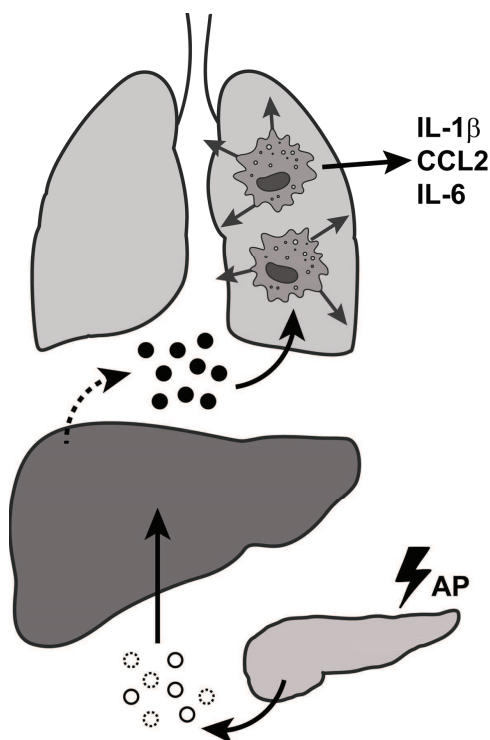


Figura 33. Els exosomes alliberats pel pàncrees durant la AP estan parcialment degradats a causa de l'activitat hidrolítica del PAAF (cercles buits, línia de punts). Aquests exosomes arriben al fetge a través del sistema portal, on són retinguts. El fet que els exosomes circulants continguin proteïnes produïdes clàssicament per les cèl·lules hepàtiques ens condueix a la hipòtesi que el fetge podria estar generant i alliberant nous exosomes durant la AP (cercles plens, fletxa de punts). Un cop a circulació sistèmica, aquests nous exosomes són capaços de creuar la barrera epitelial alveolar i activar els macròfags alveolars cap a un fenotip inflamatori.

El segon dels objectius plantejats en aquesta tesi era definir i caracteritzar el mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes. REG3 β és una de les proteïnes d'estrès més sintetitzades pel pàncrees durant la AP, la concentració de la qual pot arribar a augmentar fins a 100 vegades durant la fase aguda de la malaltia [71]. En el nostre model animal hem confirmat com els nivells de REG3 β en plasma incrementen significativament (Figura 25) i com aquesta proteïna tendeix a agrupar-se en dímers, trímers i tetràmers. L'augment detectat no ha estat tan marcat com les diferències existents entre individus sans i pacients amb AP [88], però sí que és similar als resultats obtinguts en altres estudis amb aquest model animal [169], on s'evidencia que el fet de realitzar una perfusió intraductal de solució salina ja indueix l'alliberament de REG3 β en plasma. Això segurament va lligat al fet que el pàncrees respon de seguida a petits estímuls, arran de la perillositat que comporta qualsevol tipus de lesió [6]. Pel que fa a la

seva oligomerització, coincideix amb el fet que les lectines tipus C sovint s'organitzen en homodímers, homotrímers i altres oligòmers a través del seu domini CTLD [78].

Una de les característiques dels exosomes és la gran quantitat de glicosilacions que presenten a nivell de membrana [135]. Prèviament ja s'havia descrit com la senyalització dels exosomes estava relacionada amb aquests patrons de glicosilació [122], i com proteïnes d'unió a sucres hi interaccionaven [149]. Amb aquesta base, i tenint en compte la sobreexpressió de REG3 β durant la AP, ens vam plantejar la hipòtesi que REG3 β es podia unir a la membrana dels exosomes generats en el transcurs de la AP. Vam dissenyar un assaig d'unió, basat en els assaigs tipus ELISA, per tal de poder capturar els exosomes a una microplaca en funció de la presència o absència de REG3 β a nivell de membrana (Figura 11). Els nostres resultats demostren com els exosomes circulants durant la AP tenen unida la proteïna REG3 β , mentre que els exosomes circulants en condicions normals no (Figura 26). Aquest fet, però, no sembla estar condicionat pel patró de glicosilació de les vesícules en les dues condicions, ja que de manera experimental era possible també capturar els exosomes control a la microplaca, afegint REG3 β al sistema. Diversos treballs ja havien descrit amb anterioritat la interacció entre les lectines i els exosomes. De fet, existeixen mètodes d'aïllament d'exosomes basats en aquest principi, tot i que són poc usats i estan dissenyats la majoria d'ells amb lectines d'origen vegetal [225]. També hi ha estudis que descriuen com el mecanisme de captació dels exosomes pot dependre de receptors cel·lulars que presenten dominis tipus CTLD (com ara DC-SIGN o DEC-205) i que per tant, ancoren els exosomes a les cèl·lules diana gràcies al patró de sucres de la membrana [148]. En el nostre cas, hem atribuït una nova funció a la proteïna REG3 β , la qual se sintetitza *per se* en el transcurs de la malaltia. En futurs experiments caldrà investigar quines implicacions funcionals té aquesta unió.

Per tal de caracteritzar millor el mecanisme d'interacció entre REG3 β i els exosomes, gran part de l'estudi 2 ha estat realitzat amb línies cel·lulars. Un cop optimitzat el disseny de l'assaig d'unió en microplaca, vam fer diferents experiments amb exosomes aïllats de dues línies cel·lulars: de les cèl·lules THP-1 diferenciades a macròfags o bé de les cèl·lules MIA PaCa-2, una línia epitelial pancreàtica. Els resultats obtinguts mostren com la retenció dels exosomes al sistema és dependent de la dosi de REG3 β utilitzada (Figura 29). A més, el patró d'unió dels exosomes a la microplaca o les esferes magnètiques és similar en els exosomes de macròfags i de cèl·lules pancreàtiques. Això ens indica que la unió de REG3 β als exosomes té lloc a través de glicoproteïnes o glicolípidis presents a la majoria de membranes exosomals [120], ja que no depèn del

tipus cel·lular d'origen de les vesícules. El fet d'haver obtingut resultats similars emprant tres tècniques (Figures 29 i 30) i dues línies cel·lulars diferents ens permet confirmar amb solvència la capacitat de REG3 β d'unir-se als exosomes.

Una de les particularitats de la proteïna REG3 β és la seva mida. En tractar-se d'una proteïna petita de tan sols 16 kDa només té un domini funcional, el CTLD, i un petit pèptid a l'extrem N-terminal [79]. Per tant, podem esperar que les funcions que exerceixi aquesta proteïna estiguin condicionades sobretot per la seva capacitat d'interaccionar amb sucres [85]. A través d'un assaig competitiu hem observat com determinats sucres bloquejaven la unió entre REG3 β i els exosomes, fet que ens permet confirmar que la interacció té lloc gràcies al domini CTLD de la proteïna (Figura 31). Per tant, tot i que la interacció entre REG3 β i els exosomes sigui inespecífica del tipus cel·lular d'origen de les vesícules, sí que té certa especificitat, ja que REG3 β no és capaç d'unir-se a tots els sucres. Així doncs, la composició dels polímers presents a les membranes dels exosomes condicionarà la seva interacció amb REG3 β .

A continuació, per tal d'avaluar si la unió de REG3 β als exosomes tenia conseqüències funcionals, vam fer un seguiment de la captació dels exosomes en presència de REG3 β , tant en macròfags com amb cèl·lules pancreàtiques. Els resultats demostren com REG3 β impedeix que els exosomes siguin captats per les cèl·lules diana de manera dosi-dependent (Figura 32). A més, tal i com ja havíem observat anteriorment, el mecanisme és inespecífic de tipus cel·lular, tot i que el grau de captació en ambdós casos és diferent a causa de que les cèl·lules epitelials són poc fagocítiques i en canvi els macròfags ho són molt. Aquests resultats demostren com la unió de REG3 β als exosomes provoca que aquests no siguin captats per les cèl·lules diana, i que per tant, no puguin dur a terme la seva funció.

Els resultats obtinguts en aquest segon estudi posen de manifest la rellevància de les lectines secretades com a mecanisme regulador de la internalització i funcionalitat dels exosomes. La majoria d'estudis en el camp dels exosomes es centren en l'anàlisi del seu contingut [226,227], en l'estudi de quins estímuls cel·lulars promouen la seva secreció [114,138] o, per contra, quins canvis cel·lulars indueixen en ser fagocitats per les cèl·lules diana [228]. En aquest treball, però, evidenciem que cal avaluar no només la funció dels exosomes sinó també el context en el qual han estat secretats. REG3 β és una lectina que se secreta no només durant la AP sinó també en diferents condicions patològiques, entre les quals destaquen diversos tipus de càncer de l'aparell gastrointestinal [88]. Considerant que el càncer és un dels camps en el qual l'estudi dels

exosomes està evolucionant més ràpidament [143,163,229], cal tenir en compte que la presència de lectines secretades com REG3 β podria estar condicionant el trànsit d'exosomes que té lloc al microambient tumoral. I en el marc de la AP, la malaltia en la qual s'ha detectat una major síntesi i secreció de REG3 β , els diferents resultats obtinguts ens porten certes contradiccions. Si bé hem definit com els exosomes circulants presenten REG3 β unida a la membrana, un mecanisme que en assaigs *in vitro* bloqueja la captació de les vesícules, també hem demostrat que aquests mateixos exosomes circulants són capaços de creuar la barrera epitelial alveolar i ser fagocitats pels macròfags alveolars. No obstant, cal tenir en compte les diferències entre ambdós contextos. En primer lloc, en els assaigs *in vitro* hem treballat amb exosomes aïllats de plasma, mentre que en condicions *in vivo* aquests exosomes estan en contacte amb múltiples mediadors i tipus cel·lulars. I en segon lloc, desconeixem a través de quin mecanisme els exosomes arriben a l'espai alveolar, el qual pot ser independent del reconeixement de sucres de membrana o bé pot estar mediat per algun tipus d'interacció que sigui més forta i que desplaci la unió de REG3 β a la membrana de l'exosoma. En conjunt, doncs, aquestes dades ens indiquen que cal avaluar cada context de manera individual per poder interpretar el paper de REG3 β en la comunicació intercel·lular mitjançant exosomes. A més, podem hipotetitzar que, en aquelles malalties en les quals els exosomes tinguin un paper rellevant, l'administració de REG3 β o d'anticossos contra REG3 β podria ser un mecanisme eficaç per modular els seus efectes.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

En un model animal de AP hi ha un increment dels exosomes circulants. Aquests exosomes són capaços d'arribar a l'espai alveolar i d'activar els macròfags alveolars cap a un fenotip proinflamatori.

La presència de proteïnes d'origen hepàtic i de marcadors inflamatoris als exosomes circulants, juntament amb la manca de marcadors pancreàtics, suggereix que el fetge podria estar secretant nous exosomes cap al torrent sanguini.

Els exosomes generats pel pàncrees i abocats a la cavitat peritoneal són retinguts pel fetge. Aquesta retenció està mediada principalment pels hepatòcits i, en menor grau, per les cèl·lules de Kupffer.

REG3 β , una de les proteïnes més sobreexpressades per les cèl·lules acinars durant la AP, és present a la membrana dels exosomes circulants durant la fase inflamatòria sistèmica de la malaltia.

La unió de REG3 β als exosomes té lloc a través de les glicoproteïnes i/o glicolípidis de membrana, ja que depèn del seu domini lectina. Es tracta d'un mecanisme general, que no depèn del tipus cel·lular d'origen dels exosomes.

La unió de REG3 β als exosomes comporta el bloqueig de la captació d'aquestes vesícules per part de les cèl·lules diana.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. 2002; **2**(12):897–909.
2. Pandol SJ. The Exocrine Pancreas. Morgan & Claypool Life Sciences. San Rafael (CA); 2010.
3. Afroze S, Meng F, Jensen K, et al. The physiological roles of secretin and its receptor. *Ann Transl Med*. 2013; **1**(3):29.
4. Chandra R, Liddle R a. Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; **25**(5):441–6.
5. Appelt G, Schulze B, Rogos R, et al. Analysis of human exocrine pancreatic proteins by means of pore gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomed Biochim Acta*. 1988; **47**(2):133–40.
6. Savković V, Gaiser S, Iovanna JL, et al. The stress response of the exocrine pancreas. *Dig Dis*. 2004; **22**(3):239–46.
7. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013; **144**(6):1252–61.
8. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis-2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013; **62**(1):102–11.
9. Singh VK, Moran RA, Afghani E, et al. Treating acute pancreatitis: what's new? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; **9**(7):901–11.
10. Yadav D, Papachristou GI, Whitcomb DC. Alcohol-Associated Pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007; **36**(2):219–38.
11. Yadav D, Whitcomb DC. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; **7**(3):131–45.
12. Wang G-J, Gao C-F, Wei D, et al. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009; **15**(12):1427–30.
13. Peery AF, Dellon ES, Lund J, et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. 2012; **143**(5):1179–83.
14. Singh VK, Bollen TL, Wu BU, et al. An assessment of the severity of interstitial pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; **9**(12):1098–103.
15. Bradley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg*. 1993; **128**(5):586–90.
16. Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, et al. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2006; **93**(6):738–44.
17. Chiari H. Ueber Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkd*. 1896; **17**:69–96.
18. Sutton R, Criddlea D, Raraty MGT, et al. Signal transduction, calcium and acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2003; **3**(6):497–505.

19. Bhoomagoud M, Jung T, Atladottir J, et al. Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats. *Gastroenterology*. 2009; **137**(3):1083–92.
20. Watanabe O, Baccino FM, Steer ML, et al. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol*. 1984; **246**(4):G457–67.
21. Gukovsky I, Pandol SJ, Mareninova OA, et al. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; **27**(s2):27–32.
22. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol*. 2000; **30**(4):343–56.
23. Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*. 1995; **130**(9):966–70.
24. Denham W, Yang J, Fink G, et al. Pancreatic ascites as a powerful inducer of inflammatory cytokines. The role of known vs unknown factors. *Arch Surg*. 1997; **132**(11):1231–6.
25. Pérez S, Pereda J, Sabater L, et al. Pancreatic ascites hemoglobin contributes to the systemic response in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 2015; **81**(s1):s44.
26. Landahl P, Ansari D, Andersson R. Severe acute pancreatitis: gut barrier failure, systemic inflammatory response, acute lung injury, and the role of the mesenteric lymph. *Surg Infect (Larchmt)*. 2015; **16**(6):651–6.
27. Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, et al. Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut*. 1998; **42**(6):886–91.
28. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2005; **5**(2–3):132–44.
29. Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol*. 2007; **13**(38):5043–51.
30. Gunjaca I, Zunic J, Gunjaca M, et al. Circulating cytokine levels in acute pancreatitis - model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity. *Inflammation*. 2012; **35**(2):758–63.
31. Meher S, Mishra TS, Sasmal PK, et al. Role of biomarkers in diagnosis and prognostic evaluation of acute pancreatitis. *J Biomarkers*. 2015; **2015**:ID 519534, 13p.
32. Mayerle J, Dummer A, Sendler M, et al. Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; **27**(s2):47–51.
33. Zhou MT, Chen CS, Chen BC, et al. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. *World J Gastroenterol*. 2010; **16**(17):2094–9.
34. Tomashefski Jr. JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*. 2000; **21**(3):435–66.
35. Akbarshahi H, Rosendahl AH, Westergren-Thorsson G, et al. Acute lung injury in acute pancreatitis - awaiting the big leap. *Respir Med*. 2012; **106**(9):1199–210.
36. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, et al. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg*. 1995; **130**(1):93–8.

37. Folch E, Closa D, Neco P, et al. Pancreatitis induces HSP72 in the lung: Role of neutrophils and xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; **273**(3):1078–83.
38. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, et al. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology.* 1999; **116**:694–701.
39. Closa D, Bardají M, Hotter G, et al. Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol.* 1996; **270**(1):G6–13.
40. Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, et al. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg.* 1999; **229**(2):230–6.
41. Folch E, Prats N, Hotter G, et al. P-Selectin expression and Kupffer Cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2000; **45**(8):1535–44.
42. Norman JG, Fink GW, Denham W, et al. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis: A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci.* 1997; **42**(8):1783–8.
43. Hoyos S, Granell S, Heredia N, et al. Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery.* 2005; **137**(2):186–91.
44. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; **9**(4):401–10.
45. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, et al. Anti-TNF alpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg.* 1996; **171**(2):274–80.
46. Norman JG, Fink GW, Messina J, et al. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery.* 1996; **120**(3):515–21.
47. Hirota M, Nozawa F, Okabe A, et al. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* 2000; **21**(2):141–6.
48. De-Madaria E, Martínez J, Sempere L, et al. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas.* 2008; **37**(3):295–301.
49. Norman JG, Fink GW, Sexton C, et al. Transgenic animals demonstrate a role for the IL-1 receptor in regulating IL-1beta gene expression at steady-state and during the systemic stress induced by acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1996; **63**(1):231–6.
50. Gloor B, Todd KE, Lane JS, et al. Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice. *J Surg Res.* 1998; **80**(1):110–4.
51. Franco-Pons N, Gea-Sorlí S, Closa D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *J Pathol.* 2010; **221**(2):175–82.
52. Gutierrez PT, Folch-Puy E, Bulbena O, et al. Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. *Gut.* 2008; **57**(5):642–8.
53. Bonjoch L, Gea-Sorlí S, Closa D. Lipids generated during acute pancreatitis increase inflammatory status of macrophages by interfering with their M2 polarization. *Pancreatol.* 2015; **15**(4):352–9.

54. Navina S, Acharya C, DeLany JP, et al. Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity. *Sci Transl Med*. 2011; **3**(107):107–10.
55. Patel K, Trivedi RN, Durgampudi C, et al. Lipolysis of visceral adipocyte triglyceride by pancreatic lipases converts mild acute pancreatitis to severe pancreatitis independent of necrosis and inflammation. *Am J Pathol*. 2015; **185**(3):808–19.
56. Noel P, Patel K, Durgampudi C, et al. Peripancreatic fat necrosis worsens acute pancreatitis independent of pancreatic necrosis via unsaturated fatty acids increased in human pancreatic necrosis collections. *Gut*. 2016; **65**(1):100–11.
57. Franco-Pons N, Casas J, Fabriàs G, et al. Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis. *Ann Surg*. 2013; **257**(5):943–51.
58. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; **11**(10):889–96.
59. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014; **6**:13.
60. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000; **164**(12):6166–73.
61. Xue J, Schmidt S V., Sander J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014; **40**(2):274–88.
62. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013; **14**(10):986–95.
63. Gea-Sorlí S, Closa D. In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC Immunol*. 2009; **10**:42.
64. Satoh A, Shimosegawa T, Kimura K, et al. Nitric oxide is overproduced by peritoneal macrophages in rat taurocholate pancreatitis: the mechanism of inducible nitric oxide synthase expression. *Pancreas*. 1998; **17**(4):402–11.
65. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas*. 2003; **27**(3):253–60.
66. Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. 2010; **16**(32):3995–4002.
67. Gloor B, Todd KE, Lane JS, et al. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg*. 1998; **2**(5):430–5.
68. Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: The role of Kupffer cells. *J Pathol*. 2007; **211**(4):383–8.
69. Gea-Sorlí S, Guillamat R, Serrano-Mollar A, et al. Activation of lung macrophage subpopulations in experimental acute pancreatitis. *J Pathol*. 2011; **223**(3):417–24.
70. Keim V, Rohr G, Stöckert HG, et al. An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion*. 1984; **29**(4):242–9.
71. Keim V, Iovanna JL, Rohr G, et al. Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis. *Gastroenterology*. 1991; **100**(3):775–82.
72. Lasserre C, Christa L, Simon MT, et al. A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. *Cancer Res*. 1992; **52**(18):5089–95.

73. Orelle B, Keim V, Masciotra L, et al. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 1992; **90**(6):2284–91.
74. Frigerio JM, Dusetti NJ, Keim V, et al. Identification of a second rat pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning, gene structure, and expression during acute pancreatitis. *Biochemistry*. 1993; **32**(35):9236–41.
75. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, et al. A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem*. 1988; **263**(5):2111–4.
76. Narushima Y, Unno M, Nakagawara K, et al. Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. *Gene*. 1997; **185**(2):159–68.
77. Zhang Y-W, Ding L-S, Lai M-D. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol*. 2003; **9**(12):2635–41.
78. Cummings RD, McEver RP. Chapter 31: C-type Lectins. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY); 2009.
79. Closa D, Motoo Y, Iovanna JL. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World J Gastroenterol*. 2007; **13**(2):170–4.
80. Drickamer K. Animal lectins [Internet]. 2014 [cited 2016 Nov 1]. <http://www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/ctld/mammals/domain.html>
81. Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, et al. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol*. 2000; **2**(12):906–14.
82. Gironella M, Calvo C, Fernández A, et al. Reg3 β deficiency impairs pancreatic tumor growth by skewing macrophage polarization. *Cancer Res*. 2013; **73**(18):5682–94.
83. Liu X, Wang J, Wang H, et al. REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 positive feedback loop. *Cancer Lett*. 2015; **362**(1):45–60.
84. Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, et al. Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J Immunol*. 2006; **176**(6):3774–9.
85. Cash HL, Whitham C V., Hooper L V. Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2006; **48**(1):151–9.
86. Ogawa H, Fukushima K, Naito H, et al. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm Bowel Dis*. 2003; **9**(3):162–70.
87. Gironella M, Iovanna JL, Sans M, et al. Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2005; **54**(9):1244–53.
88. Motoo Y, Satomura Y, Mouri I, et al. Serum levels of pancreatitis-associated protein in digestive diseases with special reference to gastrointestinal cancers. *Dig Dis Sci*. 1999; **44**(6):1142–7.
89. Duplan L, Michel B, Boucraut J, et al. Lithostathine and pancreatitis-associated protein are involved in the very early stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; **22**(1):79–88.

90. Duseti NJ, Ortiz EM, Mallo G V., et al. Pancreatitis-associated Protein I (PAP I), an Acute Phase Protein Induced by Cytokines: Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region. *J Biol Chem.* 1995; **270**:22417–21.
91. Luo C, Li B, Liu L, et al. Transcriptional activation of Reg2 and Reg3 β genes by glucocorticoids and interleukin-6 in pancreatic acinar and islet cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; **365**(2):187–96.
92. Zhang H, Kandil E, Lin Y-Y, et al. Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated proteins exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004; **39**(9):870–81.
93. Ferrés-Masó M, Sacilotto N, López-Rodas G, et al. PAP1 signaling involves MAPK signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2009; **66**(13):2195–204.
94. Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, et al. p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem.* 2004; **279**(8):7199–207.
95. Lepage D, Bruneau J, Brouillard G, et al. Identification of GATA-4 as a novel transcriptional regulatory component of regenerating islet-derived family members. *Biochim Biophys Acta.* 2015; **1849**(12):1411–22.
96. Iovanna J, Orelle B, Keim V, et al. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem.* 1991; **266**(36):24664–9.
97. Keilbaugh SA, Shin ME, Banchereau RF, et al. Activation of RegIII β /gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut. *Gut.* 2005; **54**(5):623–9.
98. Christa L, Carnot F, Simon MT, et al. HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. *Am J Physiol.* 1996; **271**(6):G993–1002.
99. Livesey FJ, O'Brien J a, Li M, et al. A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature.* 1997; **390**(6660):614–8.
100. Moucadel V, Soubeyran P, Vasseur S, et al. Cdx1 promotes cellular growth of epithelial intestinal cells through induction of the secretory protein PAP I. *Eur J Cell Biol.* 2001; **80**(2):156–63.
101. Lai Y, Li D, Li C, et al. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity.* 2012; **37**(1):74–84.
102. Lieu H-T, Batteux F, Simon M-T, et al. HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. *Hepatology.* 2005; **42**(3):618–26.
103. Ortiz EM, Duseti NJ, Vasseur S, et al. The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR42J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology.* 1998; **114**(4):808–16.
104. Simon M-T, Pauloin A, Normand G, et al. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *FASEB J.* 2003; **17**(11):1441–50.
105. Haldipur P, Dupuis N, Degos V, et al. HIP/PAP prevents excitotoxic neuronal death and promotes plasticity. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; **1**(10):739–54.
106. Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, et al. Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut.* 2007; **56**(8):1091–7.

107. Viterbo D, Callender GE, DiMaio T, et al. Administration of anti-Reg I and anti-PAPII antibodies worsens pancreatitis. *JOP*. 2009; **10**(1):15–23.
108. Iovanna JL, Keim V, Nordback I, et al. Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 1994; **106**(3):728–34.
109. Kempainen E, Sand J, Puolakkainen P, et al. Pancreatitis associated protein as an early marker of acute pancreatitis. *Gut*. 1996; **39**(5):675–8.
110. Loncle C, Bonjoch L, Folch-Puy E, et al. IL17 functions through the novel REG3 β -JAK2-STAT3 inflammatory pathway to promote the transition from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2015; **75**(22):4852–62.
111. Wang J, Zhou H, Han Y, et al. SOCS3 methylation in synergy with Reg3A overexpression promotes cell growth in pancreatic cancer. *J Mol Med*. 2014; **92**(12):1257–69.
112. Xu Q, Fu R, Yin G, et al. Microarray-based gene expression profiling reveals genes and pathways involved in the oncogenic function of REG3A on pancreatic cancer cells. *Gene*. 2016; **578**(2):263–73.
113. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; **200**(4):373–83.
114. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; **30**:255–89.
115. Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem J, et al. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981; **645**(1):63–70.
116. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987; **262**(19):9412–20.
117. Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996; **183**(3):1161–72.
118. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med*. 1998; **4**(5):594–600.
119. Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012; **1820**(7):940–8.
120. Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, et al. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res*. 2011; **10**(10):4624–33.
121. Liang Y, Eng WS, Colquhoun DR, et al. Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment. *J Biol Chem*. 2014; **289**(47):32526–37.
122. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell vesicles*. 2014; **3**.
123. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci*. 2016; **113**(8):E968–77.

124. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; **9**(6):654–9.
125. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood.* 2012; **119**(3):756–66.
126. Batagov AO, Kuznetsov V a, Kurochkin I V. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics.* 2011; **12**(s3):S18.
127. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; **64**(3):676–705.
128. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; **2**(8):569–79.
129. Subra C, Laulagnier K, Perret B, et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007; **89**(2):205–12.
130. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013; **1831**(7):1302–9.
131. Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Unit 3.22: Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology. John Wiley & Sons, Inc. 2006.
132. Echevarria J, Royo F, Pazos R, et al. Microarray-based identification of lectins for the purification of human urinary extracellular vesicles directly from urine samples. *ChemBioChem.* 2014; **15**(11):1621–6.
133. Kosanovic M, Jankovic M. Isolation of urinary extracellular vesicles from Tamm-Horsfall protein-depleted urine and their application in the development of a lectin-exosome-binding assay. *Biotechniques.* 2014; **57**(3):143–9.
134. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate.* 2016; **76**(1):68–79.
135. Gerlach JQ, Krüger A, Gallogly S, et al. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One.* 2013; **8**(9):e74801.
136. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; **29**(1):116–25.
137. Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci.* 2013; **126**:128868.
138. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012; **14**(7):677–85.
139. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science.* 2008; **319**(5867):1244–7.
140. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun.* 2014; **5**:3477.
141. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem.* 2013; **288**(17):11649–61.

142. Géminard C, de Gassart A, Blanc L, et al. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TfR for sorting in exosomes. *Traffic*. 2004; **5**(3):181–93.
143. Zhang HG. Emerging concepts of tumor exosome-mediated cell-cell communication. Springer Science+Business Media. New York (NY); 2013.
144. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF. Stimulating the release of exosomes increases the intercellular transfer of prions. *J Biol Chem*. 2016; **291**(10):5128–37.
145. Essandoh K, Yang L, Wang X, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 2015; **1852**(11):2362–71.
146. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: A novel function of the p53 protein. *Cancer Res*. 2006; **66**(9):4795–801.
147. McKelvey KJ, Powell KL, Ashton AW, et al. Exosomes: Mechanisms of Uptake. *J Circ Biomarkers*. 2015; **4**(7).
148. Hao S, Bai O, Li F, et al. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology*. 2007; **120**(1):90–102.
149. Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 2010; **115**(3):696–705.
150. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*. 2014; **289**(32):22258–67.
151. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem*. 2013; **288**(24):17713–24.
152. Feng D, Zhao W-L, Ye Y-Y, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010; **11**(5):675–87.
153. Fomina AF, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp Cell Res*. 2003; **291**(1):150–66.
154. Théry C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*. 2002; **3**(12):1156–62.
155. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004; **104**(10):3257–66.
156. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, et al. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol*. 2015; **4**(6):203.
157. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem*. 2005; **280**(24):23349–55.
158. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007; **110**(9):3234–44.
159. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014; **14**(3):195–208.

160. Clayton A, Mitchell JP, Court J, et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol.* 2008; **180**(11):7249–58.
161. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* 2006; **66**(18):9290–8.
162. Webber J, Steadman R, Mason MD, et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 2010; **70**(23):9621–30.
163. Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P, et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ.* 2015; **22**(1):34–45.
164. Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007; **302**(1):1–12.
165. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015; **17**(6):816–26.
166. Rana S, Malinowska K, Zöller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia.* 2013; **15**(3):281–95.
167. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1980; **15**(4):411–6.
168. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol.* 1969; **43**(3):506–20.
169. Zenilman ME, Tuchman D, Zheng Q, et al. Comparison of reg I and reg III levels during acute pancreatitis in the rat. *Ann Surg.* 2000; **232**(5):646–52.
170. Trush MA, Egnor PA, Kensler TW. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food Chem Toxicol.* 1994; **32**(2):143–7.
171. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; **72**:248–54.
172. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY); 1989.
173. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009; **6**(5):359–62.
174. Nguyen TD, Carrascal M, Vidal-Cortes O, et al. The phosphoproteome of human Jurkat T cell clones upon costimulation with 1 anti-CD3/anti-CD28 antibodies. *J Proteomics.* 2015; **131**:190–8.
175. Wu L, Candille SI, Choi Y, et al. Variation and genetic control of protein abundance in humans. *Nature.* 2013; **499**(7456):79–82.
176. Taverner T, Karpievitch Y V., Polpitiya AD, et al. DanteR: An extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics.* 2012; **28**(18):2404–6.
177. Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 2015; **43**(D1):D1049–56.
178. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**(1):27–30.

179. Wu C, Orozco C, Boyer J, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 2009; **10**(11):R130.
180. Wilson MC, Meredith D, Bunnun C, et al. Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem.* 2009; **284**(30):20011–21.
181. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, et al. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut.* 1994; **35**(5):646–50.
182. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res.* 2008; **7**(12):5157–66.
183. Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, et al. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem.* 2011; **286**(39):34426–39.
184. Bian Y, Song C, Cheng K, et al. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics.* 2014; **96**:253–62.
185. Nishimori I, Onishi S. Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Dig Liver Dis.* 2001; **33**(1):68–74.
186. Cordat E, Reithmeier RAF. Chapter One: Structure, function, and trafficking of SLC4 and SLC26 anion transporters. Current topics in membranes. Dept. of Cellular and Molecular Physiology, Yale University. Elsevier. 2014.
187. Sosale NG, Spinler KR, Alvey C, et al. Macrophage engulfment of a cell or nanoparticle is regulated by unavoidable opsonization, a species-specific “Marker of Self” CD47, and target physical properties. *Curr Opin Immunol.* 2015; **35**:107–12.
188. Deen PM, Dempster JA, Wieringa B, et al. Isolation of a cDNA for rat CHIP28 water channel: high mRNA expression in kidney cortex and inner medulla. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; **188**(3):1267–73.
189. Wang D, Lou J, Ouyang C, et al. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; **107**(31):13806–11.
190. Laursen TL, Sandahl TD, Støy S, et al. Circulating mannan-binding lectin, M-, L-, H-ficolin and collectin-liver-1 levels in patients with acute liver failure. *Liver Int.* 2015; **35**(3):756–63.
191. Hahn EL, Halestrap AP, Gamelli RL. Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock.* 2000; **13**(4):253–60.
192. Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006; **31**(1):31–9.
193. Su GL, Freeswick PD, Geller DA, et al. Molecular cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. Evidence for extrahepatic expression. *J Immunol.* 1994; **153**(2):743–52.
194. Suzuki M, Mizuno A. A novel human Cl⁻ channel family related to Drosophila flightless locus. *J Biol Chem.* 2004; **279**(21):22461–8.
195. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology.* 2007; **212**(4–5):371–9.

196. Koike A, Arai S, Yamada S, et al. Dynamic mobility of immunological cells expressing S100A8 and S100A9 in vivo: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation*. 2012; **35**(2):409–19.
197. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, et al. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res*. 1991; **32**(5):821–8.
198. De Lisle RC, Xu W, Roe BA, et al. Effects of Muclin (Dmbt1) deficiency on the gastrointestinal system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; **294**(3):G717-27.
199. De Lisle RC. Altered posttranslational processing of glycoproteins in cerulein-induced pancreatitis. *Exp Cell Res*. 2005; **308**(1):101–13.
200. Reville K, Crean JK, Vivers S, et al. Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol*. 2006; **176**(3):1878–88.
201. Brauer RB, Baldwin WM, Wang D, et al. Hepatic and extrahepatic biosynthesis of complement factor C6 in the rat. *J Immunol*. 1994; **153**(7):3168–76.
202. Huntoon KM, Wang Y, Eppolito CA, et al. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol*. 2008; **84**(1):170–81.
203. Breimer LH. Alexander the Great may have died of acute pancreatitis. *BMJ*. 1998; **316**(7149):1983.
204. Szentesi A, Tóth E, Bálint E, et al. Analysis of research activity in gastroenterology: pancreatitis is in real danger. *PLoS One*. 2016; **11**(10):e0165244.
205. Leach SD, Gorelick FS, Modlin IM. Acute pancreatitis at its centenary. The contribution of Reginald Fitz. *Ann Surg*. 1990; **212**(1):109–13.
206. Singh VP, Chari ST. Protease inhibitors in acute pancreatitis: lessons from the bench and failed clinical trials. *Gastroenterology*. 2005; **128**(7):2172–4.
207. Rau B, Paszkowski A, Esber S, et al. Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2001; **23**(1):80–8.
208. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015; **523**(7559):177–82.
209. Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, et al. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015; **13**:261.
210. Carrière J, Bretin A, Darfeuille-Michaud A, et al. Exosomes released from cells infected with Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli activate host innate immune responses and enhance bacterial intracellular replication. *Inflamm Bowel Dis*. 2016; **22**(3):516–28.
211. Gea-Sorlí S, Closa D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2010; **1**(5):107–11.
212. Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell vesicles*. 2015; **4**:26238.
213. Soni S, Wilson MR, O'Dea KP, et al. Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury. *Thorax*. 2016; **71**(11):1020–9.

214. Oksvold MP, Kullmann A, Forfang L, et al. Expression of B-Cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clin Ther.* 2014; **36**(6):847–62.
215. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2009; **100**(10):1603–7.
216. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; **347**(6220).
217. Kampf C, Mardinoglu A, Fagerberg L, et al. The human liver-specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *FASEB J.* 2014; **28**(7):2901–14.
218. Labrune P, Benattar C, Ammoury N, et al. Serum concentrations of albumin, C-reactive protein, alpha 2-macroglobulin, prealbumin, fibronectin, fibrinogen, transferrin, and retinol binding protein in 55 patients with hepatic glycogen storage diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994; **18**(1):41–4.
219. Dugernier T, Laterre PF, Reynaert MS. Ascites fluid in severe acute pancreatitis: from pathophysiology to therapy. *Acta Gastroenterol Belg.* 2000; **63**(3):264–8.
220. Sugimoto Y, Hayakawa T, Kondo T, et al. Peritoneal absorption of pancreatic enzymes in bile-induced acute pancreatitis in dogs. *J Gastroenterol Hepatol.* 1990; **5**(5):493–8.
221. Folch E, Closa D, Gelpí E, et al. Effect of peritoneal lavage and lymph ligation on systemic complications of experimental acute pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2000; **45**(5):909–14.
222. Folch-Puy E, García-Movtero A, Iovanna JL, et al. The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNF α expression in hepatocytes. *J Pathol.* 2003; **199**(3):398–408.
223. Gallagher SF, Yang J, Baksh K, et al. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res.* 2004; **122**(2):201–9.
224. Yang J, Fier A, Carter Y, et al. Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg.* 2003; **7**(2):200–207, discussion 208.
225. Royo F, Zuñiga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell vesicles.* 2016; **5**:29497.
226. Kruger S, Elmageed Z, Hawke DH, et al. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014; **14**(1):44.
227. Xiao D, Ohlendorf J, Chen Y, et al. Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. *PLoS One.* 2012; **7**(10):e46874.
228. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, et al. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 2011; **11**(1):108.
229. Tickner J a, Urquhart AJ, Stephenson S-A, et al. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol.* 2014; **4**(127).

APÈNDIX

Involvement of exosomes in lung inflammation associated with experimental acute pancreatitis

Laia Bonjoch,¹ Vanessa Casas,² Montserrat Carrascal² and Daniel Closa^{1,*}

¹ Department of Experimental Pathology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universitat Autònoma de Barcelona (CSIC/UAB) Proteomics Facility, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

*Correspondence to: Dr Daniel Closa, Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC, c/ Rosselló 161, 7^o, Barcelona 08036, Spain. E-mail: daniel.closa@iibb.csic.es

Abstract

A frequent complication of acute pancreatitis is the lung damage associated with the systemic inflammatory response. Although various pro-inflammatory mediators generated at both local and systemic levels have been identified, the pathogenic mechanisms of the disease are still poorly understood. In recent years, exosomes have emerged as a new intercellular communication system able to transfer encapsulated proteins and small RNAs and protect them from degradation. Using an experimental model of taurocholate-induced acute pancreatitis in rats, we aimed to evaluate the role of exosomes in the extent of the systemic inflammatory response. Induction of pancreatitis increased the concentration of circulating exosomes, which showed a different proteomic profile to those obtained from control animals. A series of tracking experiments using PKH26-stained exosomes revealed that circulating exosomes effectively reached the alveolar compartment and were internalized by macrophages. *In vitro* experiments revealed that exosomes obtained under inflammatory conditions activate and polarize these alveolar macrophages towards a pro-inflammatory phenotype. Interestingly, the proteomic analysis of circulating exosomes during acute pancreatitis suggested a multi-organ origin with a relevant role for the liver as a source of these vesicles. Tracking experiments also revealed that the liver retains the majority of exosomes from the peritoneal cavity. We conclude that exosomes are involved in the lung damage associated with experimental acute pancreatitis and could be relevant mediators in the systemic effects of pancreatitis.

Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: exosomes; pancreatitis; inflammation; alveolar macrophage; liver

Received 29 December 2015; Revised 21 June 2016; Accepted 7 July 2016

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disease of the pancreas characterized by oedema, leukocyte infiltration, cell necrosis, and haemorrhage. Approximately 25% of patients progress to a severe form of the disease, which is related to systemic inflammatory response (SIRS) and multi-organ failure [1,2]. Pulmonary dysfunction is the earlier and most important complication, and is responsible for up to 60% of all deaths that occur during the first week. Although the mechanism that relates pancreatic damage with pulmonary failure is still not clear, numerous pro-inflammatory cytokines, lipid derivatives, reactive oxygen species, and proteolytic enzymes have been proposed to produce systemic effects during AP [3,4]. Unfortunately, this knowledge has not led to clinically relevant improvements in AP treatment and supportive care is still the main therapy.

In recent years, a new intercellular communication system has gained interest because of its implications

for the pathology of many diseases. For a long time, extracellular vesicles, and in particular exosomes, were considered merely a mechanism for the secretion of cellular waste, until it became clear that their role was much more specific [5]. Exosomes are small extracellular vesicles that range between 30 and 100 nm in diameter and act as intercellular messengers by transferring proteins, small RNAs, and lipids to target cells. A number of studies have depicted their implication in the pathogenesis of several diseases, but cancer and inflammation are the fields in which exosome research has expanded particularly [6]. For instance, it has been reported that immune cells are modulated by exosomes from other cell types due to their ability to interfere in pathways such as NF- κ B or STAT-3 in macrophages [7,8].

The link between exosomes and macrophages is of particular interest in AP because it is known that different macrophage populations, such as peritoneal macrophages and Kupffer cells (KCs), become activated in early stages of the disease, thus contributing to SIRS

and distant organ damage [9,10]. However, the presence and role of exosomes in AP have not yet been investigated. Importantly, during pancreatitis, damaged acinar cells release significant amounts of hydrolytic enzymes that degrade cytokines and other mediators [11]. Under these conditions, a transport mechanism such as exosomes may play a decisive role because it keeps proteins and RNAs inside the vesicles, protected from degradation by proteases and ribonucleases [12,13]. This would allow the arrival of intercellular messengers to distant organs, also maintaining high concentrations of these mediators. However, in order to assign them a role in the development of lung inflammation, it is necessary to verify the release of exosomes and determine whether they can reach the alveolar cavity and be captured by inflammatory cells.

Based on this reasoning, we aimed to investigate the involvement of exosomes generated during AP in the development of the associated lung damage. Using an experimental model in rats, we found relevant changes in the amount and composition of circulating exosomes during AP. These exosomes have the ability to reach the pulmonary alveolar space and activate alveolar macrophages. We also provide evidence that other organs, rather than the pancreas, are the source of circulating exosomes during AP.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (250 g BW; Charles River, France) were housed in a controlled environment and fed a standard laboratory pelleted formula (A04; Panlab, Barcelona, Spain) and tap water *ad libitum*. This study conformed to EU legislation for the use of experimental animals and was approved by the institutional committee of animal care and research.

Animal model of acute pancreatitis

Animals ($n=6$ each group) were anaesthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg). After a midline laparotomy, the biliopancreatic duct was cannulated through the duodenum and a small bulldog clamp was used to close the hepatic duct. AP was induced by retrograde perfusion of 5% sodium taurocholate in a volume of 0.1 ml/100 g BW using a perfusion pump (Harvard Instruments, Edenbridge, UK). Control animals received saline solution (NaCl 0.9%). This is a very aggressive model for pancreatic tissue but reproduces very well the systemic effects of pancreatitis. Six hours after induction, samples of blood and pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF) were collected and processed immediately for the isolation of exosomes. This time point was selected since at shorter induction times, the inflammation process in the lung has not started. Samples of pancreas, liver, and lung were also harvested, frozen, and maintained at -80°C until assayed.

Isolation and culture of alveolar macrophages

To obtain alveolar macrophages, lung and trachea were excised *en bloc*, washed with cold phosphate buffered saline (PBS), and five bronchoalveolar lavages were performed with 10 ml of PBS. The obtained cell suspension was centrifuged at $180\times g$ for 5 min and resuspended in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$). After an attachment period of 1 h at 37°C under a gas phase of air/ CO_2 (95:5), the non-adherent cells were removed.

Lipase activity

Plasma and PAAF lipase were determined using a commercial turbidimetric assay kit from Randox (County Antrim, UK), according to the supplier's specifications.

Myeloperoxidase activity

Neutrophilic infiltration in the pancreas and lung was analysed by measuring myeloperoxidase (MPO) activity. Samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM PBS at pH 6.0. Homogenates were disrupted for 30 s using a Labsonic sonicator (Braun Biotech, Inc, Allentown, PA, USA), submitted to three cycles of freezing and thawing, and sonicated again. Samples were incubated at 60°C for 2 h, centrifuged at $15\,000\times g$ for 15 min, and supernatants were collected for MPO assay and protein assay. MPO activity was determined spectrophotometrically at 655 nm using H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as substrates.

RNA isolation, reverse transcription, and qPCR

Total RNA from cells was extracted using the TRizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). cDNA was synthesized from a 1 μg RNA sample using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Subsequent quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in a DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad) using iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Super mix and the corresponding rat primers (see supplementary material, Table S1). Reactions were performed in duplicate and threshold cycle values were normalized to *Gapdh* gene expression. The specificity of the products was determined by melting curve analysis. The relative expression of target genes to *Gapdh* was calculated by the $\Delta\text{C}(t)$ formula.

Exosome isolation

Exosomes were isolated as described in ref 14, with some modifications. Plasma samples (1 ml) were centrifuged at $2000\times g$ and $10\,000\times g$ for 10 and 30 min, respectively, at 4°C . The last supernatant was recovered,

resuspended in 8 ml of PBS, and ultracentrifuged at $120\,000 \times g$ for 70 min on a 30% sucrose cushion. This step has been reported to eliminate contaminants, such as proteins non-specifically associated with exosomes and large protein aggregates [14]. The sucrose fraction was recovered, washed with PBS, filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ filter, and ultracentrifuged again at $120\,000 \times g$ for 70 min. To isolate exosomes from PAAF, an additional step was needed, due to its high level of fibrinogen. After the first centrifugation step at $2000 \times g$, samples were pretreated with thrombin (5 U/ml) (Sigma, St Louis, MO, USA) for 10 min and centrifuged at $10\,000 \times g$ for 5 min. Then the fibrin pellet was discarded and the supernatant was used for continuing purification protocol. Isolated exosomes were quantified by measuring their protein content.

Electron microscopy

Isolated exosomes were fixed in 2% paraformaldehyde, adsorbed onto formvar-coated nickel grids, and negatively stained with 4% uranyl oxalate. Grids were air-dried and observed in a JEOL-1010 Transmission Electron Microscope.

SDS-PAGE and western blot

Exosomal proteins were extracted in RIPA buffer in the presence of protease inhibitors, separated by 12% SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 h in 3% BSA in PBS, followed by overnight incubation with antibodies against Cd63 (25682-1-AP), TSG101 (14497-1-AP), Alix (12422-1-AP) or calnexin (10427-2-AP) (Proteintech, Rosemont, IL, USA), diluted 1:500. Blots were washed and incubated for 1.5 h at room temperature with a DyLight 800-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Cell lysates were used as a negative control.

For experimental exosome degradation, control plasma exosomes were treated with PAAF diluted 1:10 for 5 min. The reaction was stopped with RIPA buffer containing protease inhibitors.

In vitro macrophage activation

Alveolar macrophages obtained from donor control animals were incubated for 16 h in the presence of exosomes obtained from 1 ml of control or AP plasma samples. In a second experiment, macrophages were exposed to the same amount of control or AP circulating exosomes ($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$) for 16 h. This concentration was chosen based on previous *in vitro* studies [15].

Exosome staining and tracking analysis

Exosomes were labelled with PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Dye (Sigma). The staining reaction was stopped with 3% BSA for 1 min, and labelled exosomes (Exo-PKH26) were washed three times with PBS

in order to remove the unbound dye, using 300 kDa Nanosep centrifugal devices (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA).

In a first tracking analysis, Exo-PKH26 obtained from AP plasma samples were perfused through the inferior vena cava of control animals at a rate of 4 ml/h for 15 min. In a second experiment, Exo-PKH26 from PAAF samples were divided into two equal parts and perfused to control animals through the hepatic portal vein or, alternatively, the inferior vena cava at a rate of 4 ml/h. After 30 min, animals were sacrificed and alveolar macrophages were isolated. Livers from portal-perfused animals were also harvested for immunofluorescence analysis. For each group, infusion of PBS stained with PKH26 was used as a control.

Immunofluorescence

Livers were cannulated through the hepatic portal vein, perfused in *ex vivo* conditions with 40 ml of 4% paraformaldehyde, washed with PBS, cut into small pieces, and cryopreserved in a sucrose gradient (from 10% to 40%). After that, tissue samples were frozen in an isopentane bath cooled at $-40\ ^\circ\text{C}$ and embedded within O.C.T. compound (No 4583; Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Sections of $10\ \mu\text{m}$ were cut using a Microm HM550 cryostat (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), placed on glass slides, and blocked (5% FCS, 1.5% BSA in PBS). KC staining was performed using a mouse anti-CD163 monoclonal antibody (BM4001; Acris Antibodies, Herford, Germany), diluted 1:100, and anti-mouse Alexa-488 secondary antibody (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Some cannulated livers were used for hepatocyte and KC isolation. After an *ex vivo* perfusion with 0.05% collagenase type IV (Sigma) in Hank's balanced salt solution, livers were harvested and cut into small pieces. Cells were dispersed with a scraper and the suspension was filtered through a $100\ \mu\text{m}$ pore cell strainer. Hepatocytes were isolated and washed by several centrifugation steps at $50 \times g$ for 3 min. The supernatant fraction was recovered each time, pooled, and centrifuged at $180 \times g$ for KC recovery. KCs were seeded in 24-well plates on coverslips and after an attachment period of 2 h, the non-adherent cells were removed. Morphological analysis of hepatocytes and anti-CD163 fluorescent staining of KCs were performed to corroborate the purity of the isolated cells.

Co-localization of PKH26 and CD163 was examined by fluorescence microscopy.

Liquid chromatography–mass spectrometry analysis

Protein extracts were digested with sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) using the FASP (filter aided sample preparation) digestion protocol [16]. Each tryptic peptide mixture was labelled with tandem mass tags (TMTs) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) based on the standard procedure.

Six labelled peptide mixtures were combined, evaporated, and desalted using a C18 SPE cartridge (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Labelled samples were analysed in triplicate by LC-MSⁿ using an LTQ-Orbitrap XL instrument equipped with a nanoESI ion source (Proxeon, Odense, Denmark) as described previously [17]. Database searching was carried out using Protein Discoverer software (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) with the following parameters: parent tolerance, 20 ppm; fragment tolerance, 0.8 Da; enzyme, trypsin; missed cleavages, 1; fixed modifications, carbamidomethyl (C), TMTsixplex (N-terminal, K); variable modifications, oxidation (M). DanteR [18] was used for relative quantification and statistical analysis of TMT-labelled peptides. All scans from unique peptides were considered for quantification.

Gene ontology (GO) [19], KEGG orthology [20], and BioGPS [21] databases were used for biological categorization of the identified proteins with significantly increased or decreased abundance in AP conditions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Graphpad Prism software. Data are presented as mean \pm SEM. Data were analysed using a two-tailed Student's *t*-test for comparison of two groups, and one-way analysis of variance (ANOVA) analysis followed by Tukey's post-test when three groups were compared. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

For mass spectrometry analysis, ion reporter intensity data were normalized using QuantileN normalization. DanteR ANOVA was performed at protein level by comparing treated versus control peptides using a linear model and the *p* values were adjusted using the Benjamini and Hochberg false discovery rate correction. Regulated peptides were determined using an adjusted *p* value cut-off of 0.05 and a fold change lower than 0.67 (down) or higher than 1.5 (up).

Results

Pulmonary inflammatory response in AP

Six hours after induction of AP, plasma and PAAF lipase activity increased significantly compared with control levels (Figure 1A). Both local and systemic inflammatory responses were corroborated by measuring MPO activity in the pancreas and lung (Figure 1B). The activation of alveolar macrophages at this stage was also confirmed by the increase in the expression of M1 pro-inflammatory mediators (Figure 1C) and the decrease of M2 markers (Figure 1D).

Exosome detection in plasma and PAAF

Extracellular vesicles collected from plasma and PAAF were observed using transmission electron microscopy

(Figure 2A), and a brief morphological analysis was performed. Vesicles ranged from 40 to 120 nm in diameter and presented a double membrane both in control and in AP plasma samples. However, in PAAF, we distinguished not only the normal-shaped exosomes but also a number of damaged exosomes which appeared to have lost their membrane integrity. To further confirm that the recovered vesicles were exosomes, CD63, Alix, TSG101, and calnexin were detected by western blot (Figure 2B). It has been recently shown that the combined expression of a tetraspanin (such as CD63) concomitant with TSG101 seems to be specific for bona fide exosomes [22]. We observed that all markers showed a similar pattern, suggesting that AP samples were enriched with exosomes. In line with the electron microscopic observations, multiple bands of lower molecular weight appeared in PAAF samples, indicating partial protein degradation possibly due to its high hydrolytic activity. This was confirmed by treating control plasma exosomes with PAAF, which resulted in protein degradation (Figure 2C). We also quantified the amount of exosomes in plasma and found a significant increase in the exosome concentration during AP (Figure 2D).

Exosomes generated during AP activate alveolar macrophages

The capability of circulating exosomes to induce changes in the phenotype of alveolar macrophages was tested *in vitro*. In a first experiment, alveolar macrophages were incubated with exosomes isolated from the same amount of plasma (1 ml) in order to approach to the *in vivo* exosome flow that potentially reaches the alveolar space in both control and AP conditions (Figure 3A, B). The results showed that AP circulating exosomes markedly increased the expression of the pro-inflammatory cytokines IL1 β and IL6 and the chemokine Ccl2. Interestingly, even control plasma exosomes had a small, but significant, effect and induced the expression of IL1 β . On the other hand, the expression of the M2 markers MRC1 and CD36 was inhibited or not significantly modified. Since it could be argued that these differences in macrophage activation were due to the higher concentration of exosomes in AP samples, in the next experiment macrophages were treated with the same concentration of control and AP exosomes (Figure 3C, D). Again, macrophages were polarized to a pro-inflammatory phenotype only in the presence of exosomes from AP.

Circulating exosomes reach the alveolar space

In order to ascertain if this situation could take place *in vivo*, exosomes from AP plasma samples were isolated, stained with PKH26, and administered to control animals through the vena cava. After 45 min, we could see that alveolar macrophages had incorporated the staining, confirming that circulating exosomes can reach the alveolar cavity of the lungs and be taken up by alveolar macrophages (Figure 4).

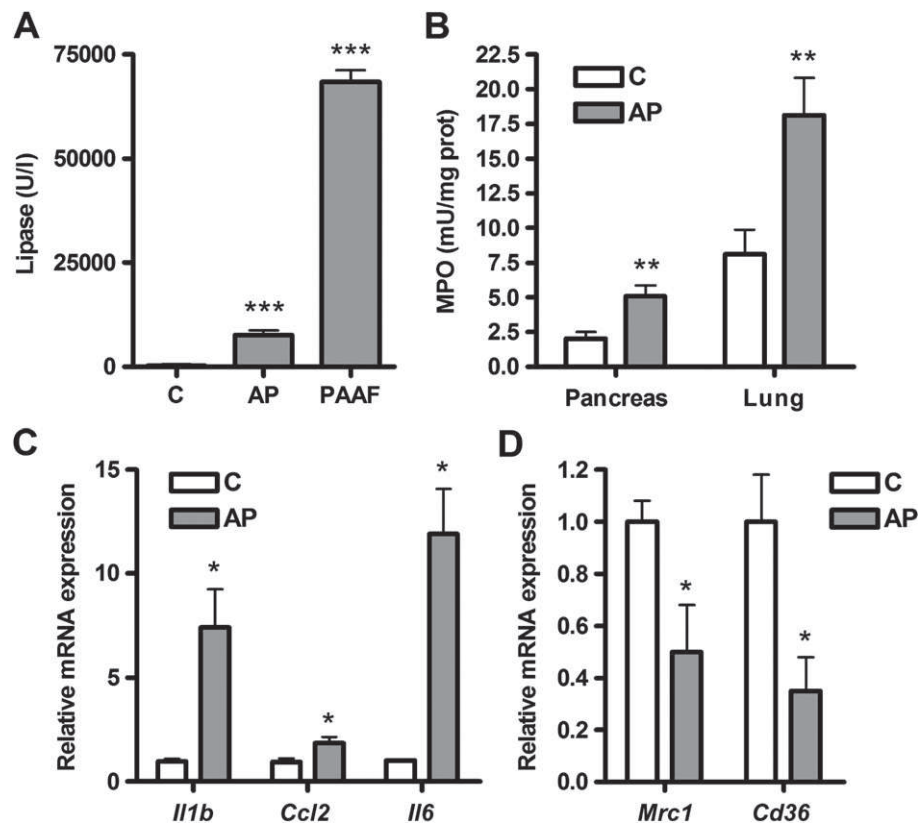


Figure 1. (A) Lipase activity in plasma and PAAF after induction of severe acute pancreatitis. (B) MPO activity in the pancreas and lung. mRNA expression of (C) M1 markers *Il1b*, *Ccl2*, and *Il6*, and (D) M2 markers *Mrc1* (CD206) and *Cd36* on isolated alveolar macrophages after 6 h of AP induction. $n = 6$. * $p < 0.05$ versus control (C); ** $p < 0.01$ versus C; *** $p < 0.001$ versus C.

Proteomic profile of circulating exosomes

In an effort to characterize the differences between circulating control and AP exosomes, mass spectrometry-driven proteomics analysis was performed. A total of 189 proteins were identified with high confidence, including up to 15 proteins commonly found in exosomes (see supplementary material, Table S2).

The comparative analysis showed that 33 proteins were differentially expressed during AP (Table 1). GO analysis revealed that AP exosomes were mostly enriched in proteins that participate in the Immune response, Oxygen transport, Lipid transport, and Ion transport. In addition, the BioGPS database was queried to identify the tissue-restricted expression of the differentially expressed proteins in order to elucidate the origin of circulating exosomes during AP. Interestingly, most of the identified proteins were mainly expressed by the liver and immune cells, but proteins typical of the kidney and gastrointestinal tract were also detected. It is noteworthy that the only protein from the list with a clear pancreatic origin was down-regulated.

Exosomes from PAAF are retained by the liver

The amount of exosomes that reached the alveolar space was different depending on whether they were administered through the vena cava or the portal vein.

The tracking analysis revealed that only 25% of alveolar macrophages were PKH26⁺ when PAAF exosomes were perfused through the portal vein, while the amount of positive macrophages was up to 70% when PAAF exosomes were administered directly through the vena cava (Figure 5A). The difference suggests a degree of exosome retention by the liver. This fact was confirmed on histological analysis of portal-perfused livers (Figure 5B). In these samples, relevant PKH26 staining was found on the liver parenchyma, revealing hepatocyte uptake of exosomes. CD163 counterstaining also revealed limited uptake of exosomes by KCs. These results were confirmed by digesting the liver and isolating hepatocytes and KCs (Figure 5C). Again, relevant PKH26 exosomes were observed in hepatocytes and in few KCs, indicating that PAAF exosomes absorbed by the portal system were retained by the liver, but not specifically by KCs.

Discussion

Although a number of soluble mediators have been identified in AP, none of the treatments tested has obtained encouraging results yet [23]. Accordingly, a vesicular communication system like exosomes could be relevant in AP due to their capacity to act as systemic carriers of inflammatory signals. In this work, we report for the first

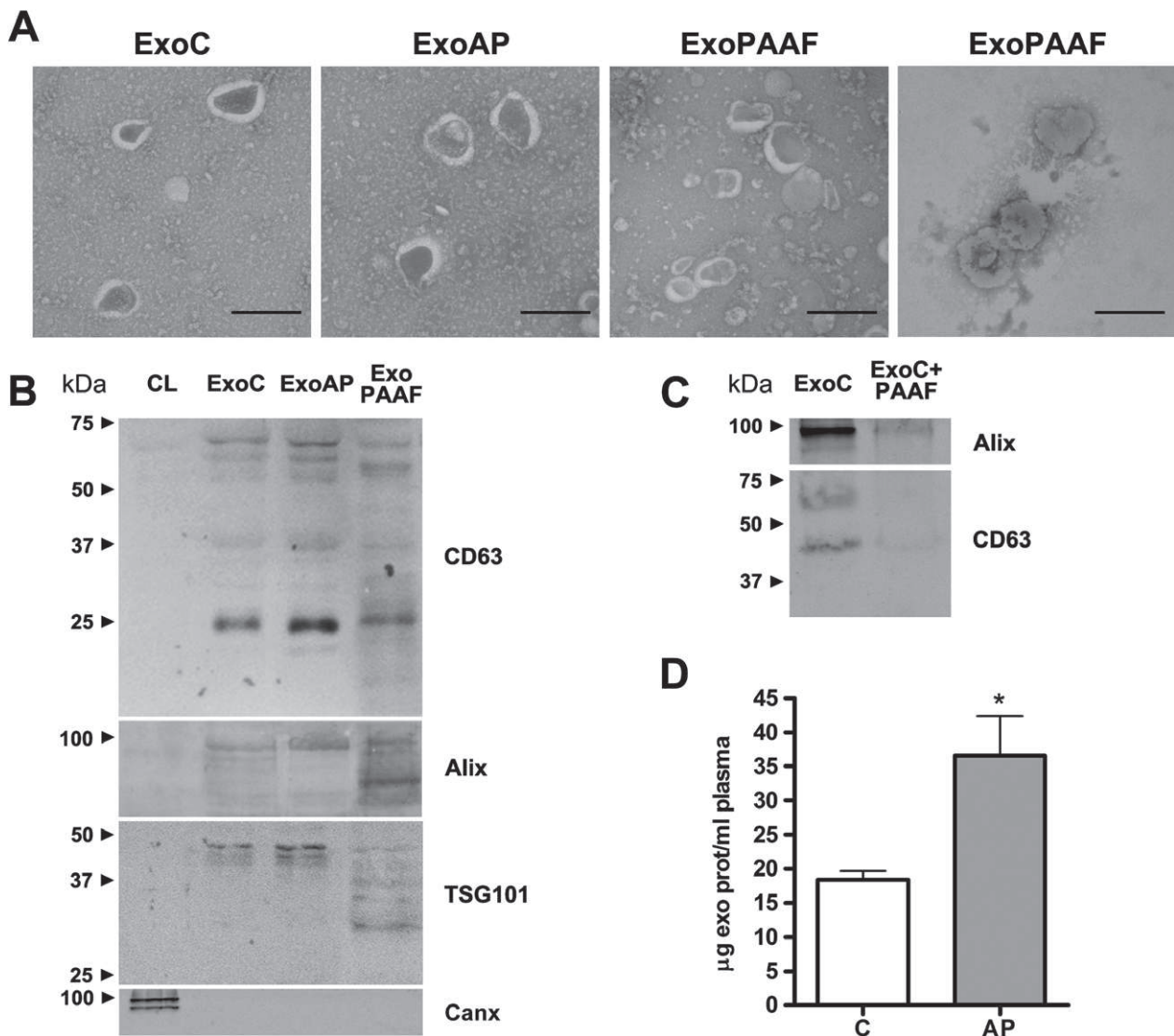


Figure 2. (A) Electron micrographs of exosomes isolated from control plasma (ExoC), AP plasma (ExoAP) and PAAF (ExoPAAF). Negative staining with 4% uranyl oxalate. Scale bars = 200 nm. (B) Western blot analysis of cell lysates (CL) and exosomal proteins extracted from plasma (ExoC, ExoAP) and PAAF (ExoPAAF). The lack of a signal for Canx (calnexin) indicates that there was no or little contamination of vesicles from other compartments. (C) Western blot of control plasma exosomes (ExoC) experimentally degraded with PAAF. (D) Quantification of the exosome concentration in plasma samples from both control and AP animals. * $p < 0.05$ versus control (C).

time that the amount of circulating exosomes increases significantly in the bloodstream during AP (Figure 2D) and that they are able to reach the alveolar cavity, thus activating alveolar macrophages.

Alveolar macrophages are one of the most important cell types involved in lung failure during AP. When activated, they release chemotactic mediators that promote the recruitment of immune cells into the alveolar capillaries [10]. Given the increase in the concentration of circulating exosomes in AP, we assessed their role in the activation of alveolar macrophages. Our results show that, *in vitro*, exosomes generated during AP activate alveolar macrophages to a pro-inflammatory M1 phenotype, reflected by the significant increase of M1 markers and the decrease of M2 markers (Figure 3). Obviously, in the *in vivo* situation, exosomes may not be the only mediators involved in triggering lung inflammation during AP. They probably act synergistically

with other mediators, such as cytokines, enzymes or lipid mediators released in the early stages of the disease, none of which would trigger the damage by themselves.

Macrophages are the most efficient phagocytic cells, and their interaction and capacity to take up exosomes have been described both *in vivo* and *in vitro* [7,8,24]. However, exosomes in plasma are not in direct contact with alveolar macrophages. To evaluate the capability of exosomes to reach the alveolar space, we designed a tracking *in vivo* experiment. Our results confirm that exosomes can pass through the alveolar epithelial barrier and be phagocytosed by alveolar macrophages (Figure 4). Consequently, it seems that exosome-encapsulated mediators could be participating in the perpetuation and worsening of lung inflammation (Figure 6). This fact points towards exosomes as a new

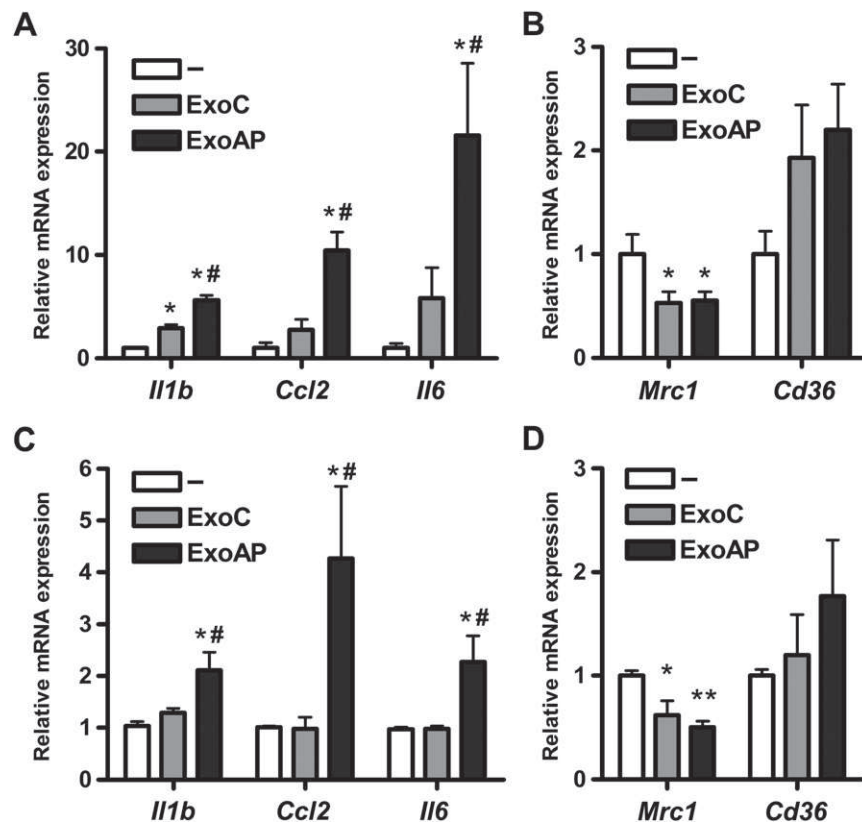


Figure 3. (A, B) mRNA expression of M1 (A) and M2 (B) markers in alveolar macrophages treated with control exosomes (ExoC) or AP exosomes (ExoAP) isolated from the same amount (1 ml) of plasma. (C, D) mRNA expression of the same markers in alveolar macrophages treated with the same ExoC or ExoAP concentration (2 µg/ml). **p* < 0.05 versus untreated (-); #*p* < 0.05 versus ExoC.

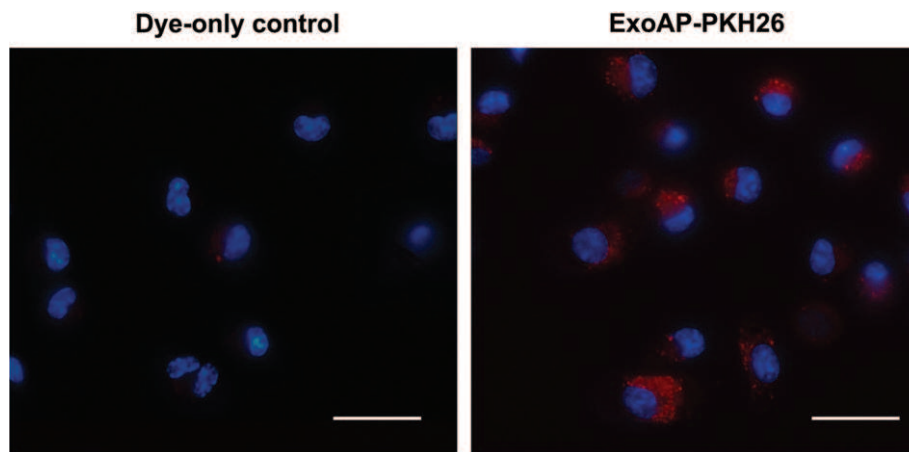


Figure 4. AP plasma exosomes stained with PKH26 (ExoAP-PKH26) were perfused through the inferior vena cava. Exosome phagocytosis can be seen in PKH26⁺ (red) alveolar macrophages. In the control group, PKH26 dye alone was diluted in PBS and processed in the absence of exosomes before perfusion via the vena cava. Scale bars = 20 µm.

therapeutic target to be explored for the control of systemic inflammation associated with AP. Moreover, this helps us to understand the failure of many promising strategies that took into consideration only the soluble mediators.

To characterize the differences between control and AP circulating exosomes, we performed a quantitative proteomic study using mass spectrometry. The identification of several differentially expressed proteins (Table 1) confirmed that the change is not limited to

the number of these particles, but that new exosomes, different from those present in normal conditions, are generated during AP. Interestingly, we did not identify proteins with a clear pancreatic origin, while most of the proteins found in AP exosomes were related to immune cells and the liver and, to a lesser extent, to the gastrointestinal tract and kidney. Although exosomes are not molecular copies of their parental cells, they can reflect the status and function of the parent cell, and their composition may be indicative of the organ where they

Table 1. Catalogue of the differentially expressed proteins found between control and AP circulating exosomes

Protein	Biological function	Origin	Ratio	p value	References
Embigin	Cell adhesion, lactate transport	Immune system	6.98	4.68E-04	27
Carbonic anhydrase 2	Ion transport	GIT, liver, kidney	5.51	1.60E-03	19, 28
Protein Hba2	Oxygen transport	Liver, bone marrow	5.27	1.44E-66	19, 29–31
Carbonic anhydrase 1	One-carbon metabolic process	GIT, liver, pancreas	5.14	1.07E-06	28, 32
Zero β -globin	Oxygen transport	Liver, bone marrow	4.87	4.26E-05	30
Haemoglobin subunit β -2	Oxygen transport	Liver, bone marrow	4.83	7.19E-15	30
Anion exchange protein	Ion transport	Kidney, bone marrow	4.45	1.02E-24	19, 33
Leukocyte surface antigen CD47	Cell migration	Immune system	4.06	2.00E-03	34
Aquaporin-1	Water transport	Kidney	3.49	8.19E-04	19, 35
Hbb-b1	Oxygen transport	Liver, bone marrow	3.00	2.01E-08	30
Protein RGD1565355	Cell adhesion		2.93	1.70E-02	19
Haemoglobin subunit β -1	Oxygen transport	Liver, bone marrow	2.88	9.65E-23	30
Mature alpha chain of MHC-I	Immune response	Immune system	2.75	1.65E-04	19
Rab-10	Protein transport	Immune system	2.65	6.70E-04	19, 36
Mannose-binding protein C	Immune response	Liver	2.51	1.34E-08	37
Monocarboxylate transporter 1	Lactate transport	Immune system, GIT	2.37	3.00E-02	19, 38, 39
Lipopolysaccharide binding protein	Immune response, lipid transport	Liver	2.35	1.32E-03	19, 40
Keratin, type II cytoskeletal 73	Regulation of mt degradation		2.23	6.98E-06	19
Protein tweety homologue	Ion transport	Kidney, saliva	2.06	1.02E-03	41
Apolipoprotein C-I	Lipid transport	Liver	1.92	2.16E-09	31
Ficolin-2	Immune response	Immune system	1.76	3.64E-02	37, 42
Protein Stom			1.75	1.39E-02	
S100-A9	Immune response, chemotaxis	Immune system, GIT	1.75	3.99E-02	43
Keratin, type II cytoskeletal 2	Keratinization	GIT, skin	1.54	3.25E-04	19
Apolipoprotein A-II	Lipid transport, immune response	Liver	1.53	1.82E-04	19, 44
S100-A8	Immune response, chemotaxis	Immune system	1.53	3.34E-04	43
Keratin, type I cytoskeletal 10	Keratinization	Skin	1.53	3.76E-10	19
Pancrin	Protein transport, regeneration	Pancreas, GIT	0.60	1.60E-03	45, 46
Myosin, heavy polypeptide 9	Endocytosis, calcium transport	Kidney, immune system	0.59	2.21E-02	19, 47
Ficolin-1	Immune response	Liver, immune system	0.54	1.81E-02	37, 42
Complement component C6	Immune response	Liver	0.49	1.28E-05	48
Lysyl oxidase-like 1 (Lox1)	Response to lipopolysaccharide		0.47	2.15E-02	
Haptoglobin	Acute phase, immune response	Liver	0.30	7.87E-46	19, 49

Proteins have been classified according to the *biological process* category defined by the GO consortium. KEGG and BioGPS databases have been used as references for the tissue expression levels of the detected proteins. GIT = gastrointestinal tract; mt = mitochondria; LPS = lipopolysaccharide.

have originated [6]. Therefore, even though it seems reasonable to assume that circulating exosomes during AP would have to be of pancreatic origin, our results suggest that the liver, instead of the pancreas, could be their main source.

Different mechanisms could explain the lack of exosomes with pancreatic markers detected in plasma during AP. Mediators released by the pancreas reach the systemic circulation through the portal system by direct transfer into veins draining the pancreas or by trans-peritoneal absorption from PAAF. We identified the presence of exosomes in PAAF, but they appeared to be partially degraded in this compartment, probably due to the activity of hydrolytic enzymes released by the pancreas (Figure 2A–C). The toxicity of PAAF has been widely described, and other treatments have failed before, due to the degradative microenvironment generated in the peritoneal cavity [11]. Although exosomes can protect their cargo from proteases and nucleases in normal conditions [12], this seems not to be enough in severe experimental AP and contributes to make unprovable the pancreatic origin of circulating exosomes.

Moreover, the anatomical situation of the pancreas must be taken into account when considering the

origin of circulating exosomes during AP. A number of studies suggest that the passage of substances released by the pancreas through the liver induces this organ to release mediators responsible for extending the inflammatory response to the lung [10,25,26]. However, the liver could also act as a filter for exosomes arriving either from the pancreas or from the PAAF, thus preventing them from reaching the systemic circulation.

To evaluate the potential hepatic retention of PAAF-derived exosomes in experimental AP, we compared the amount of exosomes reaching alveolar macrophages when administered through the portal vein with that when administered through the inferior vena cava. When administered via the portal vein, therefore passing through the liver, we noted that a much smaller amount of exosomes reached the alveolar macrophages (Figure 5A). This suggests that the liver effectively acts as a filter for exosomes coming from the pancreas via the portal system. In addition, the histological analysis of these livers (Figure 5B) and the presence of PKH26-stained exosomes in isolated hepatocytes, and to a lesser extent in KCs, confirmed the absorption of exosomes by the hepatic tissue (Figure 5C).

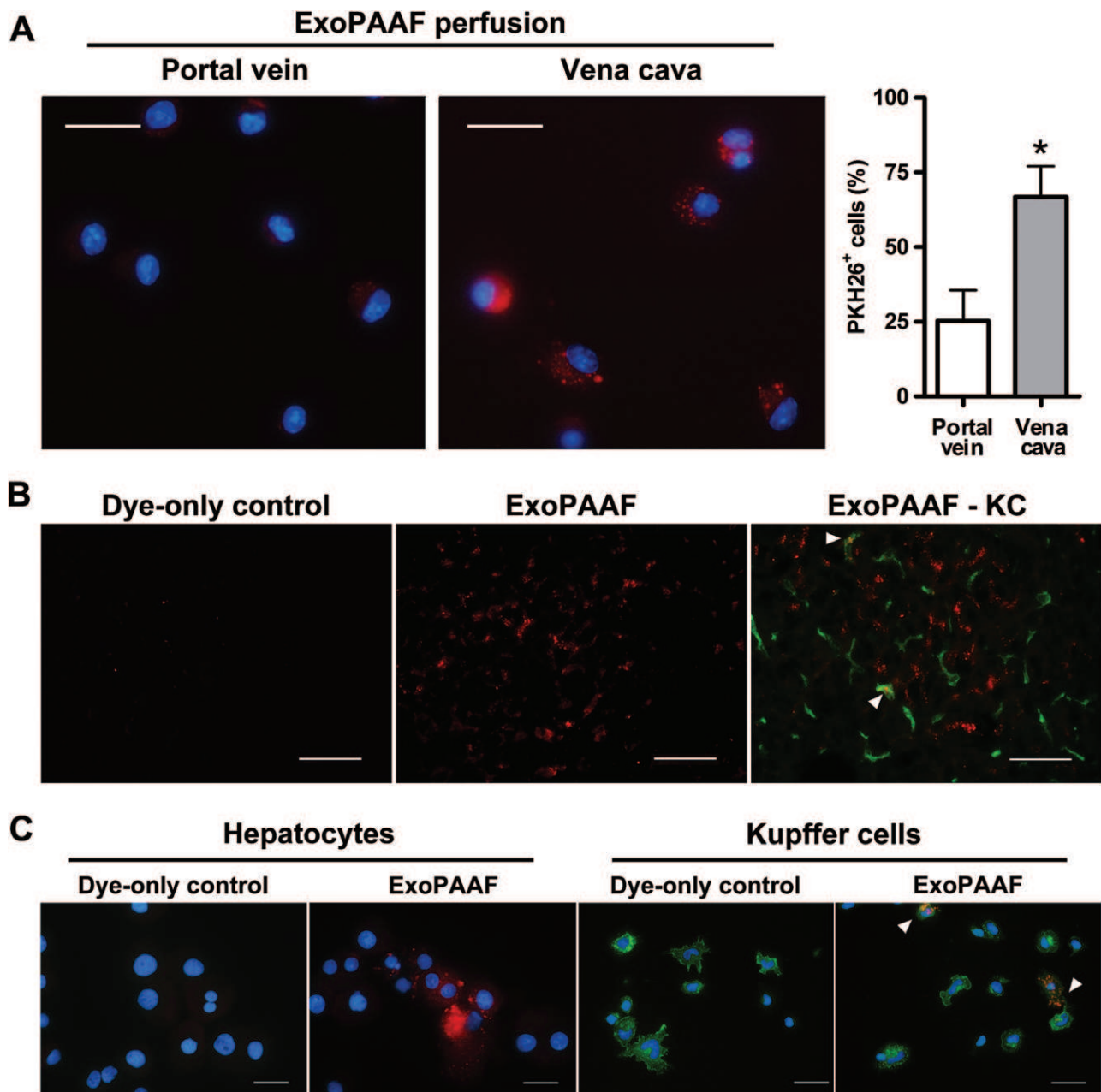


Figure 5. (A) The same amount of PAAF exosomes stained with PKH26 was perfused through the portal vein or the inferior vena cava. Exosome phagocytosis by alveolar macrophages was observed when perfusion was performed through the vena cava, but was markedly reduced when it was performed through the portal vein. Quantification of PKH26⁺ alveolar macrophages in each condition is shown on the right. The dye-only control is shown in Figure 4. Scale bars = 20 μ m. * p < 0.05 versus portal vein. (B) Sections of livers perfused through the portal vein with PKH26 dye diluted in PBS (dye-only control) or PKH26-stained PAAF exosomes (ExoPAAF, red). Counterstaining of Exo-PAAF livers with anti-CD163 to detect Kupffer cells (KC, green) was also performed. Scale bars = 50 μ m. (C) Hepatocytes and Kupffer cells isolated from livers under the same perfusion conditions and counterstained with anti-CD163. Scale bars = 20 μ m. A low degree of co-localization of PAAF exosomes and Kupffer cells was detected (arrowheads), as the majority of exosomes were located on hepatocytes.

Taken together, the exosome degradation observed in PAAF (Figure 2), the effect exerted by the liver as a filter (Figure 5), and the absence of pancreatic markers (Table 1) suggest that the pancreas is not the origin of exosomes present in blood during AP (Figure 6). Although the hepatic markers suggest that they could be released by the liver, further studies are needed to confirm this possibility.

In conclusion, in this work we have demonstrated that during AP there is an increase in new circulating

exosomes with pro-inflammatory properties. These vesicles reach the alveolar space and activate alveolar macrophages to an inflammatory phenotype. The presence of hepatic and inflammatory markers suggests a variety of sources for these exosomes, while pancreatic exosomes appear to be retained by the liver. The fact that until now exosomes had not been taken into consideration could help us to understand the failure of therapies for AP focused on controlling soluble mediators. Altogether, this points to exosomes as a promising

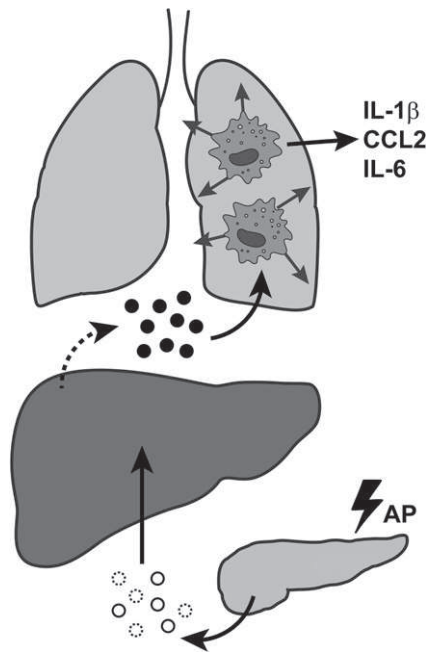


Figure 6. Exosomes released by the pancreas during AP appear to be partially degraded due to the high hydrolytic activity of PAAF (empty circles, dotted lines). These exosomes reach the liver via the portal system and are retained in hepatic tissue. The detection of proteins classically expressed by hepatic cells in circulating exosomes led us to hypothesize that the liver could be generating and releasing new exosomes during AP (full circles, dotted arrow). These exosomes are able to reach the alveolar compartment and activate alveolar macrophages to a pro-inflammatory phenotype.

potential target for the control of systemic inflammation during AP.

Acknowledgements

This work was supported by the project FIS PI13/00019 from Instituto de Salud Carlos III. The CSIC/UAB Proteomics Facility of IIBB-CSIC belongs to Proteo-Red, PRB2-ISCIII (supported by grants PT13/0001 and PT13/008). LB is supported by a pre-doctoral fellowship from Generalitat de Catalunya (AGAUR, FI DGR 2013).

Author contribution statement

LB and DC conceived the experiments and analysed data. LB carried out the experiments. VC and MC carried out the mass spectrometry analysis of exosomes. The manuscript was written by DC and LB. All authors had final approval of the submitted and published versions.

References

- Bhatia M, Wong FL, Cao Y, *et al.* Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; **5**: 132–144.
- Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: clinical course and management. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 5043–5051.

- Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, *et al.* Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002; **132**: 86–92.
- Hirota M, Nozawa F, Okabe A, *et al.* Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2000; **21**: 141–146.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature Med* 1998; **4**: 594–600.
- De Toro J, Herschlik L, Waldner C, *et al.* Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol* 2015; **6**: 203.
- Bretz NP, Ridinger J, Rupp A-K, *et al.* Body fluid exosomes promote secretion of inflammatory cytokines in monocytic cells via Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2013; **288**: 36691–36702.
- Chow A, Zhou W, Liu L, *et al.* Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF- κ B. *Sci Rep* 2014; **4**: 5750.
- Gea-Sorlí S, Closa D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2010; **1**: 107–111.
- Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, *et al.* Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999; **229**: 230–236.
- Gea-Sorlí S, Closa D. *In vitro*, but not *in vivo*, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC Immunol* 2009; **10**: 42.
- Shelke GV, Lässer C, Gho YS, *et al.* Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**: 24783.
- Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Rev Immunol* 2014; **14**: 195–208.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; **Ch 3**: Unit 3.22.
- Lee HD, Kim YH, Kim D-S. Exosomes derived from human macrophages suppress endothelial cell migration by controlling integrin trafficking. *Eur J Immunol* 2014; **44**: 1156–1169.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 2009; **6**: 359–362.
- Nguyen TD, Carrascal M, Vidal-Cortes O, *et al.* The phosphoproteome of human Jurkat T cell clones upon costimulation with anti-CD3/anti-CD28 antibodies. *J Proteomics* 2015; **131**: 190–198.
- Taverner T, Karpievitch YV, Polpitiya AD, *et al.* DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2012; **28**: 2404–2406.
- Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 2014; **43**: D1049–D1056.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 27–30.
- Siragusa L, Cross S, Baroni M, *et al.* BioGPS: navigating biological space to predict polypharmacology, off-targeting, and selectivity. *Proteins* 2015; **83**: 517–532.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: E968–E977.
- Singh VP, Chari ST. Protease inhibitors in acute pancreatitis: lessons from the bench and failed clinical trials. *Gastroenterology* 2005; **128**: 2172–2174.
- Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, *et al.* Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes

- from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles* 2015; **4**: 26238.
25. Hoyos S, Granell S, Heredia N, *et al.* Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 2005; **137**: 186–191.
 26. Closa D, Bardají M, Hotter G, *et al.* Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1996; **270**: G6–13.
 27. Wilson MC, Meredith D, Bunnun C, *et al.* Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem* 2009; **284**: 20011–20021.
 28. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, *et al.* Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut* 1994; **35**: 646–650.
 29. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, *et al.* Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 2008; **7**: 5157–5166.
 30. Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, *et al.* Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 34426–34439.
 31. Bian Y, Song C, Cheng K, *et al.* An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics* 2014; **96**: 253–262.
 32. Nishimori I, Onishi S. Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Dig Liver Dis* 2001; **33**: 68–74.
 33. Cordat E, Reithmeier RAF. Structure, function, and trafficking of SLC4 and SLC26 anion transporters. *Curr Top Membr* 2014; **73**: 1–67.
 34. Sosale NG, Spinler KR, Alvey C, *et al.* Macrophage engulfment of a cell or nanoparticle is regulated by unavoidable opsonization, a species-specific ‘Marker of Self’ CD47, and target physical properties. *Curr Opin Immunol* 2015; **35**: 107–112.
 35. Deen PM, Dempster JA, Wieringa B, *et al.* Isolation of a cDNA for rat CHIP28 water channel: high mRNA expression in kidney cortex and inner medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 1267–1273.
 36. Wang D, Lou J, Ouyang C, *et al.* Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 13806–13811.
 37. Laursen TL, Sandahl TD, Støy S, *et al.* Circulating mannan-binding lectin, M-, L-, H-ficolin and collectin-liver-1 levels in patients with acute liver failure. *Liver Int* 2015; **35**: 756–763.
 38. Hahn EL, Halestrap AP, Gamelli RL. Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock* 2000; **13**: 253–260.
 39. Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1–MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006; **31**: 31–39.
 40. Su GL, Freeswick PD, Geller DA, *et al.* Molecular cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. Evidence for extrahepatic expression. *J Immunol* 1994; **153**: 743–752.
 41. Suzuki M, Mizuno A. A novel human Cl⁻ channel family related to *Drosophila flightless* locus. *J Biol Chem* 2004; **279**: 22461–22468.
 42. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology* 2007; **212**: 371–379.
 43. Koike A, Arai S, Yamada S, *et al.* Dynamic mobility of immunological cells expressing S100A8 and S100A9 *in vivo*: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation* 2012; **35**: 409–419.
 44. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, *et al.* Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res* 1991; **32**: 821–828.
 45. De Lisle RC. Altered posttranslational processing of glycoproteins in cerulein-induced pancreatitis. *Exp Cell Res* 2005; **308**: 101–113.
 46. De Lisle RC, Xu W, Roe BA, *et al.* Effects of Muclin (Dmbt1) deficiency on the gastrointestinal system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; **294**: G717–G727.
 47. Reville K, Crean JK, Vivers S, *et al.* Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* 2006; **176**: 1878–1888.
 48. Brauer RB, Baldwin WM, Wang D, *et al.* Hepatic and extrahepatic biosynthesis of complement factor C6 in the rat. *J Immunol* 1994; **153**: 3168–3176.
 49. Huntoon KM, Wang Y, Eppolito CA, *et al.* The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol* 2008; **84**: 170–181.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Table S1. Primers used for qPCR

Table S2. Complete list of the proteins identified by LC–MS/MS with high confidence in plasma-derived exosomes

Taula suplementària I: Anàlisi quantitatiu del conjunt de proteïnes detectades amb un alt grau de confiança (pèptids únics) en exosomes circulants d'animals control i d'animals amb AP.

En fons gris, proteïnes clàssicament relacionades amb el teixit hepàtic (BioGPS i *Human Protein Atlas*).

ID de la proteïna	Nom	Aa	Ratio AP/C	P
A0A0G2JWP4	Embigin	296	6,98	4,68E-04
P27139	Anhidrasa carbònica 2	260	5,51	1,60E-03
A0A0G2JSV6	Hba2	142	5,27	1,44E-66
B0BNN3	Anhidrasa carbònica 1	261	5,14	1,07E-06
Q63011	Zero β -globina	146	4,87	4,26E-05
P11517	Hemoglobina sub β -2	147	4,83	7,19E-15
Q5U329	Prot d'intercanvi iònic	850	4,45	1,02E-24
A0A0A0MY37	CD47	295	4,06	2,00E-03
A0A0G2K3E0	Aquaporina-1	247	3,49	8,19E-04
A0A0G2JTW9	Hbb-b1	147	3,00	2,01E-08
A0A096MJJ0	Proteïna RGD1565355	418	2,93	1,70E-02
A0A0G2JSW3	Hemoglobina sub β -1	147	2,88	9,65E-23
P79599	Cadena alfa del MHC-I	345	2,75	1,65E-04
Q5RKJ9	Rab-10	200	2,65	6,70E-04
P08661	Proteïna d'unió a mannososa (MBP)	244	2,51	1,34E-08
P53987	MCT1	494	2,37	3,00E-02
Q3MID7	Prot d'unió a LPS	481	2,35	1,32E-03
A0A0G2JXH6	Queratina tipus II- 73	539	2,23	6,98E-06
D4A383	Homòleg de tweety	524	2,06	1,02E-03
P19939	Apolipoproteïna C-I	88	1,92	2,16E-09
P57756	Ficolina-2	319	1,76	3,64E-02
Q5XI04	Proteïna Stom	284	1,75	1,39E-02
P50116	S100-A9	113	1,75	3,99E-02
A0A0G2JWX4	Queratina tipus II- 2	684	1,54	3,25E-04
P04638	Apolipoproteïna A-II	102	1,53	1,82E-04
P50115	S100-A8	89	1,53	3,34E-04
Q6IFW6	Queratina tipus I- 10	526	1,53	3,76E-10
P20762	Ig gamma-2C cadena C	329	1,51	2,89E-02
Q5EBC0	Inter inhibidor de l'alfa-tripsina	933	1,50	7,64E-46
F1LZ11	Uncharacterized protein	124	1,48	2,60E-02
Q6P6Q2	Citoqueratina 5	576	1,47	6,93E-03
Q71DI1	Dermcidina	110	1,42	5,28E-03

ID de la proteïna	Nom	Aa	Ratio AP/C	P
P01015	Angiotensinogen	477	1,39	3,76E-10
A0A0G2JST3	Queratina tipus II- 1	625	1,37	3,63E-02
A0A0G2K828	Uncharacterized protein	119	1,37	4,18E-03
F1LST1	Fibronectina 1	2387	1,36	2,02E-40
Q63514	C4bp	558	1,32	1,02E-03
P63102	KCIP-1	245	1,31	1,70E-02
A0A0H2UHI5	Proteïna LOC299282	408	1,30	9,88E-08
P02770	Albúmina sèrica	608	1,28	5,04E-04
G3V679	Receptor de la transferrina 1	761	1,28	2,79E-06
P02680	Cadena gamma del fibrinogen	445	1,26	2,41E-08
M0RA79	Proteïna LOC691828	99	1,25	7,15E-03
F1M957	Factor de von Willebrand	2812	1,23	2,81E-07
P14046	Inhibidor Alpha-1-3	1477	1,22	8,64E-15
H6X2V7	Proteïna C reactiva	230	1,21	1,06E-02
P14480	Cadena beta del fibrinogen	479	1,20	1,55E-07
Q7TQ70	Cadena alfa del fibrinogen	782	1,19	2,70E-08
P02650	Apolipoproteïna E	312	1,19	2,69E-04
M0RCB1	Uncharacterized protein	641	1,18	7,12E-03
Q3KR94	Vitronectina	478	1,17	1,41E-02
A0A0G2K9Y5	Glicoproteïna rica en histidina	515	1,16	2,15E-02
G3V9R9	Afamina	608	1,16	2,74E-03
G3V7K3	Ceruloplasmina	1059	1,15	2,70E-08
A0A0G2JY31	Alfa-1-antiproteïnasa	411	1,14	3,10E-04
P05544	Serpin A3L	413	1,14	1,26E-02
G3V843	Protrombina (factor coagulant II)	617	1,12	2,06E-02
P04639	Apolipoproteïna A-I	259	1,12	3,08E-03
Q9Z294	MBP (Fragment)	224	1,10	9,07E-03
Q68FY4	Proteïna d'unió a la vitamina D	476	1,09	1,63E-02
P12346	Serotransferrina	698	1,07	1,32E-03
M0RBF1	Complement C3	1663	0,93	2,03E-16
A0A096P6L9	Complement C5	1681	0,91	3,63E-02
P06238	Alfa-2-macroglobulina	1472	0,88	1,39E-02
P02651	Apolipoproteïna A-IV	391	0,86	2,15E-02
G3V7L3	Complement C1s	694	0,85	6,69E-04
A0A0G2JVP4	Proteïna Ighm	470	0,85	1,49E-15
Q4KM75	Antigen CD5-like	346	0,81	5,41E-03
B5DEH7	Proteïna C1r	707	0,80	1,04E-10
Q63041	Alfa-1-macroglobulina	1500	0,76	0,00E+00
B0BNN4	Factor del complement properdina	465	0,75	2,61E-02

ID de la proteïna	Nom	Aa	Ratio AP/C	P
Q62930	C9	554	0,74	1,98E-10
G3V852	Proteïna Tln1	2541	0,74	9,29E-03
P60711	Actina, citoplasmàtica	375	0,73	7,15E-03
D3ZAN3	Alfa glucosidasa 2	797	0,73	5,21E-06
D3ZWD6	C8a	587	0,72	3,86E-08
G3V686	Proteïna Retnlg	111	0,71	3,18E-02
Q68FP1	Gelsolina	780	0,70	4,84E-11
A0A0G2K7X7	Proteïna resistent a oxidació	846	0,70	2,34E-11
A0A0G2K531	Glutatió peroxidasa	225	0,70	2,77E-15
Q5XIF6	Cadena alfa-4A de la tubulina	448	0,69	6,04E-03
P55314	C8b	589	0,69	8,19E-04
Q8CIZ5	Pancrina	1418	0,60	1,60E-03
G3V6P7	Miosina, heavy polip. 9	1960	0,59	2,21E-02
Q5M8B4	Ficolina-1	335	0,54	1,81E-02
Q811M5	Complement C6	934	0,49	1,28E-05
Q5FWS5	Loxl1	608	0,47	2,15E-02
A0A0H2UHM3	Haptoglobina	346	0,30	7,87E-46

Taula suplementària II: Llista total de proteïnes detectades (amb un alt grau de confiança o amb un únic pèptid) en el conjunt de totes les mostres.

En negreta, proteïnes detectades en la majoria de poblacions d'exosomes (KEGG orthology: Cellular processes/Transport and metabolism/Exosomal proteins – rno:04147, categoria “*Proteins found in most exosomes*”, base de dades de *Rattus norvegicus*). PSM, peptide spectrum matches.

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
P63102	14-3-3 protein zeta/delta	2	2	27,8
Q7TQ70	Ac1873	37	205	86,6
A0A0G2K4M6	Actin, aortic smooth muscle	2	45	41,9
P60711	Actin, cytoplasmic 1	3	47	41,7
Q08163	Adenylyl cyclase-associated protein 1	1	1	51,6
G3V9R9	Afamin	17	50	69,2
Q5D178	Alpha 2 macroglobulin cardiac isoform	2	127	68,2
D3ZAN3	Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit	5	14	90,5
B1WBU9	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	11	22	97,3
P02764	Alpha-1-acid glycoprotein	6	13	23,6
A0A0G2JY31	Alpha-1-antiproteinase	17	88	46,1
P14046	Alpha-1-inhibitor 3	13	571	163,7
Q63041	Alpha-1-macroglobulin	89	2389	167
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein	8	39	38
P06238	Alpha-2-macroglobulin	16	229	163,7
D3ZFK9	Amnionless (Predicted)	1	1	48,8
P01015	Angiotensinogen	6	27	51,9
Q5U329	Anion exchange protein	10	36	94,3
B2RYM1	Angiopoietin-like 6	1	1	50,9
P00762	Anionic trypsin-1	1	2	25,9
O70371	Annexin (Fragment)	1	1	33,9
P04639	Apolipoprotein A-I	18	99	30
P04638	Apolipoprotein A-II	3	17	11,4
P02651	Apolipoprotein A-IV	13	34	44,4
P19939	Apolipoprotein C-I	4	21	9,9
G3V8D4	Apolipoprotein C-II	3	14	10,7
P55797	Apolipoprotein C-IV	2	7	14,5
P02650	Apolipoprotein E	18	70	35,7
Q5I0M1	Apolipoprotein H	8	47	38,4
P14630	Apolipoprotein M	1	1	21,5
Q5M890	Apolipoprotein N	1	2	28,2

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
A0A0G2K3E0	Aquaporin-1	1	3	26,3
G3V6M2	Aryl hydrocarbon receptor	1	1	96,1
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	1	2	56,3
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	1	1	30,2
A0A0G2JWS9	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide, isoform	1	2	102,4
Q99J86	Attractin	1	1	158,6
Q6MG74	B-factor, properdin	13	34	85,1
Q5VLR6	BWK3	3	9	52,4
B5DEH7	C1r protein	16	50	80,4
Q63514	C4b-binding protein alpha chain	17	76	62,2
A0A5C5	C4b-binding protein beta chain	4	10	28,6
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	2	7	28,3
P27139	Carbonic anhydrase 2	1	4	29,1
P10959	Carboxylesterase 1C	12	29	60,1
Q9EQV9	Carboxypeptidase B2	2	3	48,8
Q9EQV8	Carboxypeptidase N catalytic chain	2	4	51,9
Q6IRK9	Carboxypeptidase Q	1	2	52
Q4KM75	CD5 antigen-like	10	31	37,8
P40241	CD9 antigen	3	7	25,2
P10252	CD48 antigen	1	2	27,7
O70352	CD82 antigen	1	3	29,5
G3V7K3	Ceruloplasmin	28	129	120,6
G3V836	Clusterin	12	48	51,4
D3ZTE0	Coagulation factor XII	3	3	65,8
G3V811	Coagulation factor XIII A	1	1	83
P45592	Cofilin-1	1	1	18,5
Q5BJT7	Coiled-coil domain-containing protein 93	1	1	72,6
D4A7F6	Collectin sub-family member 10	1	2	30,6
P31720	Complement C1q subcomponent subunit A	6	22	25,9
G3V7N9	Complement C1q subcomponent subunit B	5	22	26,6
G3V7L3	Complement C1s subcomponent	11	30	77,7
M0RBF1	Complement C3	98	718	186,2
P08649	Complement C4	10	139	192
A0A096P6L9	Complement C5	23	55	189
Q6MG90	Complement component 4	2	107	192
D3ZWD6	Complement component 8	7	22	66,2
D3ZPI8	Complement component 8	3	12	18,4
Q811M5	Complement component C6	3	7	105

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
P55314	Complement component C8 beta chain	6	12	66,6
Q62930	Complement component C9	14	62	62,2
Q5I0M3	Complement component factor h-like 1	1	11	30,6
Q9WUW3	Complement factor I	5	16	67,3
G3V7H3	Complement factor D	1	1	28,5
B0BNN4	Complement factor properdin	6	14	50,5
P31211	Corticosteroid-binding globulin	4	12	44,6
A0A0G2JSP8	Creatine kinase	1	2	43
H6X2V7	CRP	5	23	25,4
P51952	Cyclin-dependent kinase 7	1	1	37,1
Q8CIZ5	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	2	10	155,6
Q71DI1	Dermcidin	3	9	11,3
A0A0G2JU89	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	1	1	573,5
M0R757	Elongation factor 1-alpha	1	1	50,1
A0A0G2JWP4	Embigin	3	4	33,2
Q9QX79	Fetuin-B	8	32	41,5
P14480	Fibrinogen beta chain	32	194	54,2
P02680	Fibrinogen gamma chain	21	142	50,6
F1LST1	Fibronectin	59	256	262,6
Q5M8B4	Ficolin 1	2	8	36,6
P57756	Ficolin-2	1	4	34,7
C0JPT7	Filamin alpha	4	7	280,3
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	1	1	39,3
O70513	Galectin-3-binding protein	2	3	63,7
Q68FP1	Gelsolin	6	14	86
Q30A72	Glutamate receptor interacting isoform e4-7	1	1	77,1
Q01812	Glutamate receptor ionotropic, kainate 4	1	1	107,2
A0A0G2K531	Glutathione peroxidase	10	44	25,3
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	6	35,8
G3V8B1	GPI-specific phospholipase D1	2	3	93,6
Q68FY4	Group specific component	23	91	53,5
Q5EEY3	GTP-binding protein G-alpha-i2	1	1	19,2
Q9QX36	Guanine nucleotide binding protein beta 1	1	4	3,8
A0A0H2UHM3	Haptoglobin	16	50	38,4
A0A0G2JSW3	Hemoglobin subunit beta-1	3	148	16
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	3	126	16
P20059	Hemopexin	20	89	51,3
Q64268	Heparin cofactor 2	2	2	54,5

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
A0A0G2K9Y5	Histidine-rich glycoprotein	9	43	57,9
B5DFG2	Hnrnp1 protein (Fragment)	1	1	61,9
P20761	Ig gamma-2B chain C region	5	10	36,5
P20762	Ig gamma-2C chain C region	2	11	36,5
P01836	Ig kappa chain C region, A allele	1	33	11,7
P20767	Ig lambda-2 chain C region	4	16	11,3
G3V6G1	Immunoglobulin joining chain	3	11	17,8
Q8R2H2	Integrin beta	6	14	86,9
Q5EBC0	Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	31	128	103,7
B2RYM3	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1	11	24	100,5
D3ZBS2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	9	17	99
F1LRE2	Insulin-like growth factor binding protein	1	1	66,9
P97569	Kallistatin	7	17	48
Q6IFW6	Keratin, type I cytoskeletal 10	7	46	56,5
Q6IFU8	Keratin, type I cytoskeletal 17	2	6	48,1
Q6IFU7	Keratin, type I cytoskeletal 42	1	3	50,2
A0A0G2JST3	Keratin, type II cytoskeletal 1	3	18	64,7
A0A0G2JWX4	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	4	13	69,1
Q6P6Q2	Keratin, type II cytoskeletal 5	4	18	61,8
Q4FZU2	Keratin, type II cytoskeletal 6A	1	13	59,2
A0A0G2JXH6	Keratin, type II cytoskeletal 73	1	14	58,7
Q5PQU1	Kininogen 1	1	23	47,7
Q5M8A0	Kng2 protein	9	17	47,9
A0A0A0MY37	Leukocyte surface antigen CD47	2	4	32
Q3MID7	Lipopolysaccharide binding protein	4	8	53,5
Q5M885	LOC360919 protein	1	2	40,8
Q5BJZ2	LOC367586 protein	1	83	50,1
Q5FWS5	Lysyl oxidase-like 1	1	3	66,5
A2VCV7	Mannan-binding lectin serine peptidase 2	3	5	75,5
A0A0H2UHA1	Mannan-binding lectin serine protease 1	7	13	80,1
Q9Z294	Mannose-binding protein	7	19	23,8
P08661	Mannose-binding protein C	2	10	26
P79599	Mature alpha chain of MHC class I antigen	3	5	39,2
P53987	Monocarboxylate transporter 1	1	3	53,2
Q03626	Murinoglobulin-1	1	478	165,2
Q6IE52	Murinoglobulin-2	0	368	161,5
G3V6P7	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	1	3	226,3
A9UMW2	Ndufa3 protein	1	1	9,2
A0A0H2UHC1	Neuronal pentraxin-1	1	1	43

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
Q32Q04	Nphp4 protein	1	1	59,7
F1LSL2	Nuclear pore complex protein	1	1	106,8
Q5RJY5	Nup188 protein	1	1	23,5
A0A0G2K7X7	Oxidation resistance protein 1	13	32	93,6
A0A0G2K2E4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1	1	17,8
P14272	Plasma kallikrein	2	3	71,2
Q6P734	Plasma protease C1 inhibitor	7	28	55,6
Q01177	Plasminogen	22	91	90,5
P06765	Platelet factor 4	1	1	11,3
A0A0G2K5U5	Polymeric immunoglobulin receptor	3	9	84,6
P62963	Profilin-1	1	1	14,9
Q6P7A4	Prosaposin	1	4	61
P18420	Proteasome subunit alpha type-1	2	2	29,5
P18422	Proteasome subunit alpha type-3	3	6	28,4
P21670	Proteasome subunit alpha type-4	2	3	29,5
P34064	Proteasome subunit alpha type-5	3	8	26,4
P60901	Proteasome subunit alpha type-6	2	4	27,4
Q9JHW0	Proteasome subunit beta type-7	2	3	29,9
M0R5D4	Protein Aadacl2	1	1	45,5
E9PU17	Protein Abca17	1	1	199,7
Q64240	Protein AMBP	4	23	38,8
D4ABD5	Protein Atg9b	1	1	101,7
F1LY70	Protein Birc6	1	1	432,9
M0R9L6	Protein Ccdc7	1	1	51,8
D4A447	Protein Cd109	1	1	161,8
F1M983	Protein Cfh	21	66	139,9
F1LSS7	Protein Colec11	4	7	28,9
A0A0G2K3W2	Protein F5	1	1	190,9
A0A0G2K4I9	Protein F11	2	3	69,6
F6Q1N1	Protein F13b	2	4	74,8
Q6P7B4	Protein FAM198B	1	1	58,2
D3ZKW7	Protein Fam57	1	1	29,3
D3ZJF8	Protein Fcgbp	4	4	275
A0A0G2JSV6	Protein Hba2	8	95	15,3
A0A0G2JTW9	Protein Hbb-b1	1	58	16
F1LPR6	Protein Ighm	2	16	51,4
F1LTN6	Protein Igkc	1	69	24,9
D3ZAC0	Protein Itga2b	5	9	112,6
D3ZFH5	Protein Itih2	12	34	92,3

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
D4A0Q1	Protein Lin28b	1	1	26,9
D3ZBB2	Protein LOC100361952	2	9	13,1
A0A0G2K625	Protein LOC100911833	0	451	160,9
G3V9J1	Protein LOC297568]	2	152	97,3
A0A0H2UHI5	Protein LOC299282	12	43	45,5
M0RA79	Protein LOC691828	6	26	11
A0A0G2JWE1	Protein LOC102551071	1	2	12,5
F1LWS4	Protein LOC683745	1	5	65,8
D3ZI42	Protein Lrsam1	1	1	84
D4A3E0	Protein Mmrn1	1	2	135,5
D4A228	Protein Myom3	1	2	162
D4A5G2	Protein Nop14	1	1	72,8
D3ZGY2	Protein Otud6b	1	2	36,3
G3V686	Protein Retnlg	1	4	11,8
A0A0G2K896	Protein RGD1310507	13	48	76,7
G3V7P5	Protein RGD1564614	1	6	78,2
A0A096MJJ0	Protein RGD1565355	2	3	47
M0RCM9	Protein Rnf139	1	1	75
D3ZZ02	Protein Rttm (Fragment)	1	1	63,1
Q62628	Protein S (Fragment)	4	5	38,1
P50115	Protein S100-A8	2	7	10,2
P50116	Protein S100-A9	2	3	13,1
D3ZGX9	Protein Sema3f	1	1	88,4
Q5M7T5	Protein Serpinc1	18	48	52,2
D3ZTE1	Protein Sox7	1	1	41,7
Q5XI04	Protein Stom	1	6	31,4
D3Z9R7	Protein Stx16	1	3	16
M0R979	Protein Thbs1	1	4	127
G3V852	Protein Tln1	5	9	269,5
B4F7C2	Protein Tubb4a	1	2	49,6
D4A383	Protein tweety homolog	1	7	57,5
Q3KR94	Protein Vtn	7	38	54,7
Q62975	Protein Z-dependent protease inhibitor	1	1	50,2
G3V843	Prothrombin	11	35	70,3
Q9EPT7	Prothrombinase FGL2	1	1	40,9
B1H253	Proz protein (Fragment)	1	2	45,8
Q498M5	Putative E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF2	1	1	79,8
M0RD14	Pyruvate kinase	1	4	52,7
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1	1	50,5

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	2	7	22,5
T1SRT4	Radixin isoform	1	2	45,3
Q99P74	Ras-related protein Rab-27B	1	1	24,6
Q62636	Ras-related protein Rap-1b	4	11	20,8
Q9QWQ2	Rat (wistar) alpha-2u globulin mRNA	4	7	17,2
Q62591	Rat alpha-1 inhibitor III (Fragment)	0	84	86,7
Q63581	Rat T-kininogen (T-KG)	1	21	47,6
D3ZJW6	RCG21066	2	8	13,1
G3V8X6	RCG39455, isoform CRA_a	1	1	38,1
Q68FT8	RCG33981, isoform CRA_a	4	7	54,9
H6X319	SAP	5	14	26,1
P25236	Selenoprotein P	1	1	43,1
B2GVB4	Sept9 protein (Fragment)	1	2	62
P05545	Serine protease inhibitor A3K	12	90	46,5
P05544	Serine protease inhibitor A3L	17	92	46,2
Q63556	Serine protease inhibitor A3M	4	9	46,1
P12346	Serotransferrin	37	305	76,3
P02770	Serum albumin	2	1279	68,7
Q5M878	Serum amyloid A protein	4	7	15
Q66H98	Serum deprivation-response protein	1	1	46,4
P55159	Serum paraoxonase/arylesterase 1	3	19	39,3
Q5BJL1	Shroom3 protein (Fragment)	1	1	29,2
B1WBX5	Solute carrier family 43, member 1	1	1	67,1
A0A0G2K6Y9	Syntaxin-7	1	1	29
G3V679	Transferrin receptor protein 1	19	57	85,8
A0A0G2JSH6	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	1	1	86,7
P02767	Transthyretin	6	24	15,7
Q5XIF6	Tubulin alpha-4A chain	2	3	49,9
B1H247	Uncharacterized protein	3	5	60,3
F1LXY6	Uncharacterized protein	4	21	11,2
M0RCB1	Uncharacterized protein	5	13	70,4
A0A0G2K332	Uncharacterized protein	2	2	12,2
A0A0G2K4K2	Uncharacterized protein	1	11	10,4
F1LZ11	Uncharacterized protein	3	20	14,1
M0RC23	Uncharacterized protein	2	5	11,2
M0RDF2	Uncharacterized protein	2	7	11,2
D3ZZ08	Uncharacterized protein	2	5	13,2
F1M1R0	Uncharacterized protein	2	8	14,9

Protein ID	Description	#Unique Peptides	#PSM	MW [kDa]
M0RBK4	Uncharacterized protein	2	4	11,5
M0RD98	Uncharacterized protein	1	4	13,1
D3ZPL2	Uncharacterized protein	3	6	11,3
B2RZB2	Uncharacterized protein	1	66	25,6
A0A0G2JT70	Uncharacterized protein	1	15	10,3
A0A0G2K290	Uncharacterized protein	2	13	13,9
A0A0G2K7P6	Uncharacterized protein	2	4	10,2
A0A0G2K828	Uncharacterized protein	3	12	13,2
D4ACR1	Uncharacterized protein	1	3	13,7
Q5BK40	Uncharacterized protein	1	1	31,7
A0A0G2JXF0	Uncharacterized protein	1	6	11,8
M0R4X3	Uncharacterized protein	1	1	10,7
M0R9U2	Uncharacterized protein	1	2	10,8
D3ZC54	Uncharacterized protein	1	2	13,1
D3ZQM9	Uncharacterized protein	1	1	12,9
A0A0G2K099	Uncharacterized protein	1	1	54,3
A0A0G2K021	Uncharacterized protein	1	1	5
F1LVY6	Uncharacterized protein	1	1	10
D3ZTK7	Uncharacterized protein	1	1	41,7
P97689	Urea transporter 1	1	1	42
P85972	Vinculin	1	1	116,5
Q5J3I8	Vomeronasal V1r-type receptor V1re27	1	1	34,6
F1M957	von Willebrand factor	46	171	308,8
Q63011	Zero beta-globin (Fragment)	2	47	15,9

