

MODULACION DE ISOFORMAS DE LA MOLECULA DE ADHESION CD44 EN UN MODELO MURINO DE ISQUEMIA Y REPERFUSION INTESTINAL

PAULA V. CABRERA^{1*}, GUILLERMO BLANCO^{1***}, PABLO ARGIBAY², SILVIA E. HAJOS^{1***}

¹ Instituto de Estudios de La Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ² Unidad Médica Experimental, Hospital Italiano, Buenos Aires

Resumen La isquemia y reperfusión intestinal (I-RI) desencadena un proceso inflamatorio a nivel sistémico, en el cual los leucocitos contribuyen a los efectos deletéreos más allá de la pared intestinal. La infiltración leucocitaria de órganos de choque de I-RI como los pulmones y el hígado involucra a las moléculas de adhesión ICAM-1 y CD11/CD18. Se ha destacado la participación de la molécula de adhesión CD44 en otros procesos inflamatorios tales como artritis reumatoidea o dermatitis alérgica de contacto, sin embargo se desconoce su implicancia en la patogenia de I-RI. Con el objetivo de establecer un posible rol de CD44 en el desarrollo de inflamación sistémica por I-RI, hemos estudiado la expresión de esta molécula a nivel del ARNm en un modelo murino de isquemia y reperfusión intestinal. En el hígado y el bazo de animales sometidos a I-RI hallamos un aumento en el número de isoformas variables de CD44 expresadas con respecto a animales no tratados o sometidos a laparotomía. Este hallazgo indica que el proceso de I-RI induce específicamente la expresión de distintas isoformas de CD44. El aumento en la expresión de CD44 observado en el hígado de animales sometidos a I-RI sugiere la contribución de esta molécula de adhesión a la activación y migración de linfocitos hacia este órgano lesionado. Por otra parte, el incremento en el número de isoformas expresadas en bazo estaría inducido por el microambiente proinflamatorio que resulta de la actividad de depuración sistémica del mismo.

Abstract *Modulation of isoforms of CD44 adhesion molecule in a murine model of gut-ischemia-reperfusion.* Gut ischemia-reperfusion (G-IR) induces a systemic inflammatory response, in which leukocyte contribution to this injury in distant organs is important. ICAM-1 as well as CD11/CD18 have been involved in leukocyte infiltration in liver and lungs. CD44 adhesion molecule plays an essential role in other inflammatory processes such as rheumatoid arthritis and allergic contact dermatitis, however its implication in G-IR has not been described. In order to establish a possible role of CD44 in the development of systemic inflammation by G-IR, we have studied CD44 mRNA expression by RT-PCR in a murine model of gut ischemia reperfusion. Animals subjected to G-IR showed an increased number of CD44 variable isoforms expressed in liver and spleen compared to non-treated animals or animals subjected to laparotomy. This finding indicates that G-IR specifically induces the expression of different CD44 variable isoforms. Liver CD44 upregulation in animals subjected to G-IR suggests a contribution of this molecule to lymphocyte activation and migration to this injured organ. Moreover, increased isoform expression in spleen may be induced by the proinflammatory environment resulting from a systemic depuration activity.

Key words: gut ischemia-reperfusion, CD44 isoforms, leukocyte migration

La reperfusión intestinal luego de un período de isquemia es común en situaciones clínicas tales como el shock hemorrágico, cirugía vascular, isquemia mesentérica y trasplante de intestino delgado. La disminución del flujo sanguíneo produce la necrosis de la mucosa intestinal a nivel de los extremos de las vellosidades. La reperfusión tras un episodio isquémico libera radicales

libres del oxígeno que pueden acrecentar la extensión de la necrosis de la mucosa, comprometiendo aún más la capacidad de absorber líquido y permitiendo el pasaje hacia la luz de líquido intersticial y proteínas plasmáticas^{1, 4}. La disrupción de la membrana de la mucosa favorece la translocación bacteriana y permite la absorción de toxinas bacterianas y productos tóxicos intraluminales como consecuencia de una pérdida de la función mecánica de barrera de la mucosa intestinal⁵. En estas condiciones se ha detectado una respuesta inflamatoria descontrolada que puede desencadenar falla multiorgánica, inmunosupresión sistémica y sepsis.

Existen evidencias sobre la contribución de los leucocitos a los efectos deletéreos de la isquemia y reperfusión intestinal más allá de la pared intestinal, especialmente en el hígado y los pulmones^{6, 8}. Las altera-

Recibido: 11-V-2000

Aceptado: 30-VI-2000

*Becario de la Universidad de Buenos Aires

** Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dra. Silvia E. Hajos, Instituto de Estudios de La Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4964-0024 e-mail: shajos@huemul.ffyb.uba.ar

ciones hepáticas propias de la I-RI como alteración del estado redox mitocondrial, extravasación de albúmina y reducción del flujo biliar son significativamente reducidas en ratas neutropénicas⁹. Un evento clave en la producción del daño hepático por la I-RI es la adhesión leucocitaria al endotelio capilar. La acumulación de neutrófilos en el hígado luego de la I-RI y la producción de stress oxidativo en la proximidad de los sinusoides no perfundidos, especialmente en la región pericentral, requiere de las moléculas de adhesión ICAM-1, CD11/CD18 y P-selectina tal como lo demuestran los estudios en ratones deficientes en estas moléculas¹⁰ y el bloqueo de la leucostasis hepática y el stress hipóxico con anticuerpos monoclonales dirigidos contra ICAM-1, CD11/CD18⁶.

Se ha demostrado en el modelo de I-RI una disfunción microvascular pulmonar y un aumento de la infiltración leucocitaria, la cual es también atenuada por anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de adhesión CD11/CD18 en leucocitos o ICAM-1 en células endoteliales^{11, 12}.

CD44 es también una molécula de adhesión que es capaz de mediar la transmigración de linfocitos hacia sitios de inflamación activa^{13, 15}. Su participación en la transmigración requiere la activación celular para la expresión de isoformas variables e inducción de la capacidad de unión a su ligando principal, el ácido hialurónico (HA), como así también el aumento de la eficiencia de rolling para la mediación de la fase de adhesión primaria^{16, 20}.

La familia CD44 está codificada por 20 exones, los exones 1-5 y 16-20 se expresan en forma constante y constituyen la forma estándar de CD44 predominante en la mayoría de los tipos celulares, los exones 6-15 pueden incorporarse a la estructura constante en la porción extracelular en una o más combinaciones por un proceso regulado de *splicing* alternativo^{21, 23} formando diferentes isoformas variables con características de adhesión distintivas^{24, 25}.

Se ha descrito la participación de las isoformas de CD44 en respuestas inmunes normales y patológicas. En un trabajo anterior utilizando el modelo "air-pouch" en ratón hemos correlacionado la expresión de ARNm de isoformas variables en leucocitos del exudado inflamatorio inducido por zymosan con la transmigración hacia el sitio de injuria²⁶. Con el propósito de determinar si CD44 tiene también un rol en la patogenia del daño por la I-RI, en el presente trabajo estudiamos la expresión de isoformas variables de esta molécula de adhesión en órganos de choque. Nuestros resultados revelaron que el patrón de expresión de isoformas fue alterado en el hígado y el bazo de animales sometidos a I-RI, sugiriendo una participación importante de la expresión de formas activas de CD44 en la regulación de la respuesta leucocitaria en este modelo.

Materiales y métodos

Animales

Se trabajó con ratones BALBc (28-32 g), mantenidos con pellets Cargill y agua *ad libitum*. Los estudios se realizaron de acuerdo a la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Modelo murino de isquemia y reperfusión

Los ratones fueron distribuidos en 3 grupos de 6 animales cada uno:

Grupo experimental: Se anestesió a los animales con hidrato de cloral al 7% (1 ml/200 g de peso), y se efectuó una laparotomía, se expuso el intestino y se colocó un clamp en la arteria mesentérica superior durante 30 min (tiempo de isquemia), luego se retiró el clamp y se esperaron 15 min (tiempo de reperfusión). Se sacrificó a los animales por dislocación cervical y se removieron los órganos: timo, hígado, bazo, ganglios y pulmones.

Grupo control cirugía: Se anestesió a los animales, luego se practicó una laparotomía, movilización intestinal sin clampeo de la arteria mesentérica y remoción de los órganos a los 45 min. Este control se efectuó con el fin de diferenciar los efectos de la cirugía de los producidos por la isquemia y reperfusión intestinal.

Grupo control basal: Se anestesió a los animales, inmediatamente después se removieron los órganos.

En todos los casos los órganos se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Extracción de RNA total de los órganos y tejidos

La extracción se llevó a cabo en el timo, el hígado, el bazo, los ganglios y los pulmones de los animales de los distintos grupos con TRIzol™ Reagent (GIBCO BRL, NY, USA) según las instrucciones recomendadas por el fabricante. Luego de disgregar el tejido por métodos mecánicos, se homogeneizó en TRIzol. Se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN con isopropanol a partir de la fase acuosa.

Luego de lavar el pellet de ARN total con Etanol 75%, se resuspendió en H₂O-DEPC y se midió DO₂₆₀ y DO₂₈₀ para calcular la concentración de ARN y la relación DO₂₆₀/DO₂₈₀, verificando que esta última fuera mayor a 0.7.

Transcripción reversa

La síntesis de cDNA a partir del ARN total extraído, se llevó a cabo utilizando primers oligo(dT)₁₅. A 1 µg de RNA se agregaron dNTPs 10 mM, oligo(dT)₁₅ 2 µg/µl y agua tratada con DEPC hasta completar 15 µl. Se incubó 10 min a 70 °C para desnaturar el RNA. Se agregó RNAsin, Buffer RT y 200 unidades

TABLA 1.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR

Iniciador	Secuencia de 5' a 3'
*CD44s1	ACC CCA GAA GGC TAC ATT TTG C
**CD442a	CTC ATA GGA CCA GAA GTT GTG G
*β-Actin (A)	ATG GAT GAC GAT ATC GCT
**β-Actin (B)	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T

*: Iniciador sentido; **: iniciador antisentido

de MMLV-RT (Promega, Madison, USA). Se incubó a 37 °C durante 90 minutos y se inactivó la enzima RT a 95 °C 5 min, para evitar su actividad de exonucleasa.

Amplificación por PCR

Las muestras de cDNA obtenidas fueron sometidas a amplificación. A 5 µl de cDNA se le agregó iniciador sentido y antisentido, agua tratada con DEPC, Buffer taq 10 X, Cl₂Mg, dNTPs, Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA) y 3 gotas de aceite mineral. Los tubos de reacción fueron sometidos a diferentes ciclos de amplificación y a una extensión final a 72 °C 10 min en un termociclador Perkin Elmer 480. Las secuencias de los primers utilizados figuran en la Tabla 1. La amplificación de isoformas de CD44 se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito previamente^{27, 28}, se utilizaron los primers CD44 S1 y CD44 2A, complementarios a los exones constantes 5 y 6 respectivamente, cada ciclo consistió en 94 °C 20 seg, 55 °C 60 seg, 72 °C 120 seg, n° ciclos: 35. Para la amplificación de los controles de β-actina se utilizaron los primers β-actin A y β-actin B: 94 °C 1 min, 52 °C 1 min y 72 °C 1 min, n° ciclos: 25.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las muestras amplificadas se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% en buffer TAE (Tris, EDTA y Acetato de Na) a 75 voltios, 1.5 hs. Las bandas se visualizaron en transiluminador UV en presencia de bromuro de etidio.

Resultados

Se ha estudiado por RT-PCR el efecto de la I-RI en la expresión de ARNm de CD44 estándar y sus isoformas en los órganos extraídos a partir de cada animal. Hemos discriminado los efectos de la I-RI en la expresión de CD44, de los efectos de la cirugía y de la expresión basal, por comparación de los resultados obtenidos entre los grupos experimental, cirugía y basal.

La Fig. 1A muestra la amplificación por PCR realizada en el hígado de animales de los grupos experimen-

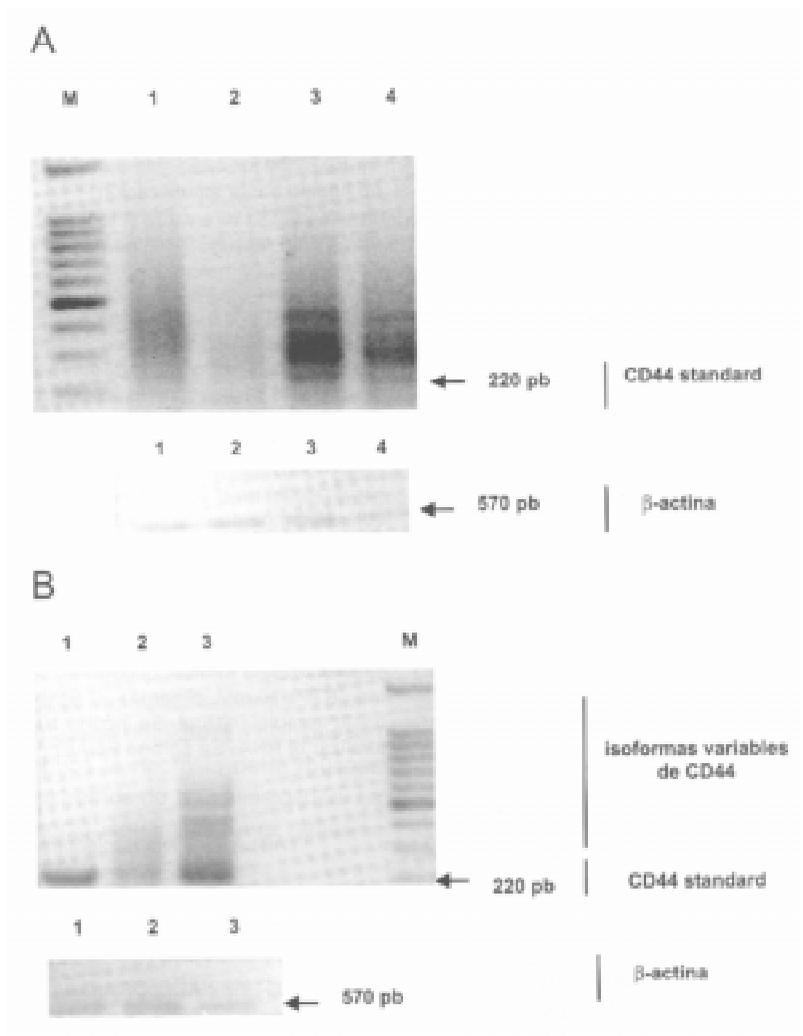


Fig. 1.— Amplificación de isoformas de CD44 en hígado (A) y bazo (B) de animales pertenecientes a los grupos control basal (1), control cirugía (2) y experimental (3 y 4). M: DNA ladder de 100 pb. Ambas figuras son representativas de 4 de 6 animales.

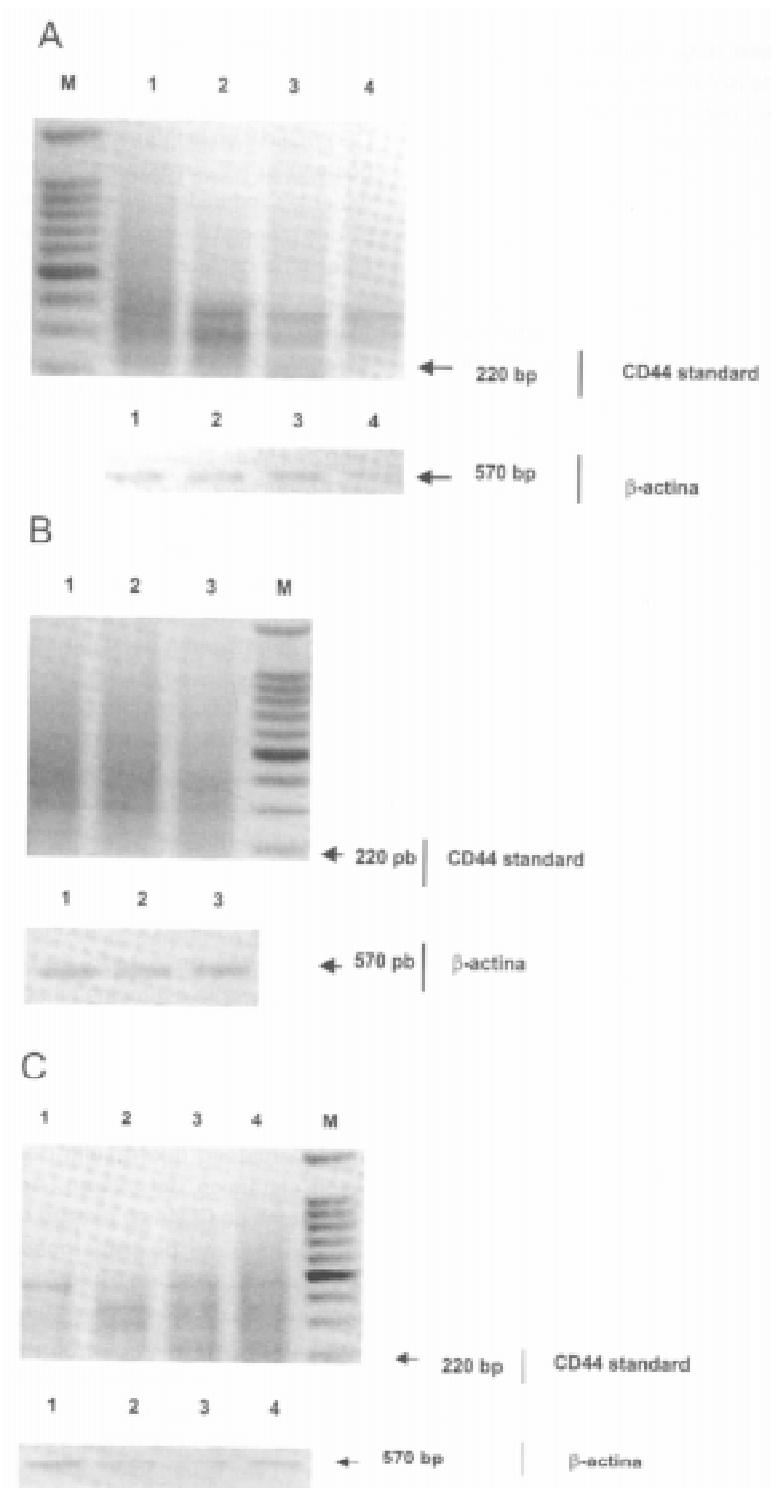


Fig. 2.- Amplificación de isoformas de CD44 en pulmones (A), ganglios mesentéricos (B) y timo (C) de animales pertenecientes a los grupos control basal (1), control cirugía (2) y experimental (3 y 4). M: DNA ladder de 100 pb. Esta figura es representativa de 6 de 6 animales.

tal, control cirugía y control basal. Puede evidenciarse la expresión de CD44 estándar (banda de 200 pb) en los 3 grupos, además en el hígado de animales sometidos a

isquemia y reperfusión se observan isoformas de mayor tamaño (bandas de 300, 400 y 500 pb), no presentes en los controles basal y cirugía; dicho hallazgo fue obser-

vado en 4 de 6 animales (Fig. 1A). Sin embargo, dicha expresión diferencial de isoformas no se reprodujo como un patrón constante en esos 4 animales, ya que en el hígado de cada animal sometido a I-RI hallamos variaciones en el número y en el tamaño de las isoformas expresadas.

Los resultados obtenidos del análisis de CD44 en el bazo fueron similares a los del hígado. Se observó la expresión de CD44 estándar en los tres grupos y la expresión de isoformas variables de CD44 (bandas de 400, 500 y 1000 pb) solamente en el grupo experimental; dicho comportamiento fue evidenciado en 4 de 6 animales (Fig. 1B). En este caso, también encontramos distintos patrones de expresión en esos 4 animales.

En los pulmones de los 6 animales analizados, así como en los ganglios mesentéricos y el timo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de formas variables de CD44 en los animales isquemiados con respecto a los grupos control (Fig. 2A, 2B y 2C respectivamente). En los tres grupos se evidencian en los pulmones isoformas de aproximadamente 300 y 350 pb (Fig. 2A), en los ganglios mesentéricos una isoforma de alrededor de 250 pb (Fig. 2B) y en el timo isoformas entre las 200 y 500 pb (Fig. 2C).

Los resultados para cada órgano son comparables entre grupos ya que los controles de β -actina no muestran diferencias.

Discusión

El daño en el hígado, principal órgano de choque en el proceso de I-RI, es mediado por el secuestro de leucocitos en los sinusoides y por el stress hipóxico sobre los hepatocitos. Se ha demostrado la influencia de las células polimorfonucleares en el daño hepático por la limitación parcial del mismo en animales neutropénicos^{3, 6, 9, 29}. Además, ha sido descrito que la llegada de estas células al hígado en procesos de I-RI involucra la participación de moléculas de adhesión, este hecho ha sido evidenciado por bloqueo de la trans migración con anticuerpos monoclonales contra CD11b/CD18 e ICAM-1 y una consecuente disminución del daño producido. Sin embargo aun en estas condiciones se detectó un infiltrado mononuclear principalmente en las zonas perilobulillar y centro lobulillar hepática⁶. Nuestros resultados demuestran la expresión de isoformas variables de CD44 en el hígado inducidas por la I-RI. Comprobamos que dicho efecto no se produjo como consecuencia de la anestesia o del proceso quirúrgico, ya que no se observó el mismo patrón de expresión en el hígado de los animales de los grupos control cirugía y basal. Se ha correlacionado la expresión de isoformas de CD44 en linfocitos, al igual que la inducción de la unión de CD44 al ácido hialurónico (HA) expresado en la membrana de

células endoteliales, con la capacidad de trans migración hacia los sitios de injuria tisular. Este mecanismo de trans migración es análogo al que se describe para ICAM-1 y CD11/CD18 en la interacción polimorfonuclear-endotelio postcapilar^{30, 33}. En este marco, la expresión de isoformas variables inducidas en el hígado por efecto de la I-RI podría asociarse con la capacidad de trans migración linfocitaria hacia este primer y principal órgano de choque en este modelo. Es importante destacar que la trans migración de linfocitos hacia los sitios de injuria no sólo depende de la expresión de CD44 en su forma activa, con capacidad de unión a HA sino de la presencia de HA en la membrana de endotelio postcapilar³⁴. Esta expresión de HA en el endotelio requiere de un microambiente de producción de citoquinas proinflamatorias como el que conformaría la población de células de Kupffer en el hígado de animales sometidos a I-RI como resultado de la actividad de depuración sobre las bacterias intestinales que translocan.

En la patogenia del daño por la I-RI, la translocación de bacterias desde el intestino hacia la circulación portal y sistémica es un evento crítico³⁵, en el cual la actividad reticuloendotelial del bazo, órgano principal en la depuración de antígenos particulados, conjuntamente con la población de células de Kupffer en el hígado conforman la principal barrera^{36, 40}. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de isoformas variables en el bazo, que no se observó en animales normales ni aun en los sometidos a laparotomía. Considerando que los linfocitos en estado de reposo expresan CD44 estándar y ante estímulos inflamatorios, como reconocimiento de antígenos específicos o citoquinas, inducen la producción de exones variables⁴¹, el aumento en la expresión de isoformas de CD44 detectada en el bazo podría ser una consecuencia del microambiente proinflamatorio que resulta de la actividad de depuración sistémica del mismo. Además, la inducción de isoformas de CD44 en el bazo reflejaría la rapidez con la cual el evento de translocación bacteriana masiva impacta en la función esplénica. Destacamos también la importancia de los eventos que hemos detectado a nivel esplénico por cuanto es conocida la susceptibilidad al shock séptico y coagulación intravascular diseminada de los pacientes aesplénicos^{42, 44} aun cuando no se conocen las bases fisiopatológicas de esta susceptibilidad.

A su vez la variación en la composición de isoformas expresadas tanto en el hígado como en el bazo, puede adjudicarse a la variabilidad individual de la flora microbiana que alcanza la circulación portal y sistémica y a la consecuente variación en la especificidad del estímulo inflamatorio agudo.

La importancia de la actividad de depuración esplénica es más evidente en cuanto no hemos detectado la presencia de isoformas variables en los pulmones, ni aun en los ganglios mesentéricos o el timo. La ausencia de

isoformas en los pulmones, importantes órganos de choque, podría adjudicarse a que para los tiempos de isquemia aplicados en nuestro modelo, las barreras reticuloendoteliales hepática y esplénica impiden la localización de antígenos particulados a nivel pulmonar, y demoran el inicio de la disfunción microvascular pulmonar y la infiltración leucocitaria. Superado un umbral de inflamación local, podría observarse un patrón de expresión de isoformas de CD44 similar al hepático. En cambio, la ausencia de inducción de isoformas variables por la I-RI que hemos detectado en los ganglios mesentéricos reflejaría una insuficiencia de la función ganglionar resultante de la perturbación de la circulación linfática como producto mismo de la oclusión de la arteria mesentérica y posterior reperfusión, y de los cambios que resultan del pasaje y acumulación de líquido intersticial y proteínas plasmáticas en la luz intestinal^{45, 47}. Estos hallazgos sugieren que los principales eventos agudos inducidos por la I-RI como la translocación bacteriana ocurren por vía hemática más que linfática y el impacto se refleja a nivel hepático, esplénico y sistémico. Por otra parte, la ausencia en el timo de isoformas variables inducidas por la I-RI, en comparación con la alta inducción observada en el bazo, sería reflejo del stress agudo de este órgano linfoide en el cuadro de I-RI, como resultado de la translocación bacteriana masiva. Se ha demostrado que los timocitos comienzan un proceso de apoptosis generalizado detectable a las 4 horas de iniciada una sepsis polimicrobiana. Este proceso es dependiente de TNF- α , de la liberación de esteroides endógenos y en parte de la inhibición de la expresión del gen de IL-2 y conduce a una involución tímica post-séptica^{48, 51}. También se ha observado inducción de apoptosis en el timo de animales sometidos a isquemia de la arteria mesentérica superior seguida de reperfusión intestinal⁵².

En resumen, hemos utilizado la expresión de isoformas variables como un marcador de los eventos inflamatorios agudos que ocurren en los principales órganos de choque de la I-RI y relacionamos estos hallazgos con los mecanismos de *homing* linfocitario hacia los sitios de injuria mediados por CD44. Como resultado de la correlación podemos inferir que la expresión de isoformas CD44 podría tener un papel importante en la patogenia del daño por la I-RI fundamentalmente a nivel de activación, liberación y *homing* de linfocitos hacia los órganos de choque en una forma regulada.

Agradecimientos: Este trabajo fue llevado a cabo mediante subsidios de la Universidad de Buenos Aires y del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Bibliografía

1. Mc Cord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
2. Kanwar S, Kubers P. Mast cells contribute to I-R-induced

- granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol* 1994; 267: 316-21.
3. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, et al. Role of neutrophils in I-R-induced microvascular injury. *AM J Physiol* 1987; 253: 699-703.
4. Wilmore DS, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DD, Ziegler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* 1998; 104: 917-23.
5. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-4.
6. Horie Y, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 666-73.
7. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-8.
8. Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Koeike K, Banerjee A. Gut ischemia/reperfusion-induced liver dysfunction occurs despite sustained oxygen consumption. *J Surg Res* 1992; 52: 436-42.
9. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg* 1992; 127: 2, 175-9.
10. Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN. Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule-deficient mice after gut ischemia reperfusion. *J Clin Invest* 1997; 99: 781-8.
11. Hill J, Lindsay T, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. A CD18 antibody prevents lung injury but not hypotension after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74: 659-64.
12. Xiao F, Eppihimier MJ, Willis BH, Carden DL. Complement-mediated lung injury and neutrophil retention after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 1997; 82: 51459-65.
13. Mikecz K, Brennan FR, Kim JH, Glant TT. Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis. *Nature Med* 1995; 1: 558-63.
14. De Grendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997; 278: 672-5.
15. Lesley J, Hyman R, English N, Catterall JB, Turner GA. CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconj J* 1997; 14: 611-22.
16. Stauder R, Günthert U. CD44 isoforms. Impact on lymphocyte activation and differentiation. *The Immunol* 1995; 3: 78-83.
17. Clark RA, Alon R, Springer TA. CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J Cell Biol* 1996; 134: 1075-87.
18. DeGrendele HC, Estess P, Pcker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 1996; 183: 1119-30.
19. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-13.
20. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990; 172: 69-75.
21. Screaton G, Bell M, Jackson D, Cornelis F, Gerth U, Bell J. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Prot Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
22. Jackson D, Buckley J, Bell J. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by

- insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 4732-9.
23. Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucl Acids Res* 1993; 21: 1225-9.
 24. Van der Voort R, Mantenhorst E, Smit L, Ostermann E, van de Berg F, Pals ST. Binding of cell-surface expressed CD44 to hyaluronate is dependent on splicing and cell type. *Biochem. Biophys Res Commun* 1995; 214: 137-44.
 25. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* 1996; 135: 1139-50.
 26. Cabrera PV, Blanco G, Gravisaco MJ, Alvarez E, Hajos SE. Zymosan modulates CD44 isoforms expression in a murine model of inflammation that resembles the synovitis of rheumatoid arthritis. *J Rheum* (Enviado para publicación).
 27. Sánchez Lockhart M, Gravisaco MJ, Mongini C, Waldner C, Alvarez E, Hajos S. Alternative exon-specific PCR method for the analysis of human CD44 isoform expression. *Oncol Rep* 1999; 6: 219-24.
 28. Sánchez Lockhart M, Cabrera P, Diament M, Alvarez E, Kleen D, Hajos S. Expression of CD44 splice variants in spontaneous murine tumors. *Cancer letters* (Enviado para publicación).
 29. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4: 3355-9.
 30. Jones DA, McIntire LV, Smith CW, Picker LJ. A two-step adhesion cascade for T cell endothelial cell interactions under flow conditions. *J Clin Invest* 1994; 94: 2443-50.
 31. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1997; 159: 2549-53.
 32. Maroko PR, Hillis LD, Muller JE, et al. Favorable effects of hyaluronidase on electrocardiographic evidence of necrosis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1977; 296: 898-903.
 33. Mohamadzadeh M, DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 1998; 101: 97-108.
 34. Siegelman MH, DeGrendele HC, Estess P. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 315-21.
 35. Zhi Yong S, Dong YL, Wang XH. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. *J Trauma* 1992; 32: 148-53.
 36. Hardonk MJ, Dijkhuis FWJ, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium-chloride induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 296-302.
 37. Husztic E, Lazar G, Parducz A. Electron microscopic study of Kupffer cell phagocytosis blockade induced by gadolinium-chloride. *Br J Exp Pathol* 1980; 61: 624-30.
 38. Shiratori Y, Kiriyaama H, Fukushi Y, et al. Modulation of ischemia-reperfusion induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1265-72.
 39. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-61.
 40. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodrigues F, Lopez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994; 42: 204-9.
 41. Weiss JM, Renkl AC, Ahrens T, et al. Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronate-avidity by human monocytes. *Soc Invest Dermatol* 1998; 111: 227-32.
 42. Styr B. Infection associated with asplenia: risks, mechanism and prevention. *Am J Med* 1990; 88: 33N-42N.
 43. Dickerman JD. Bacterial infection and the asplenic host: a review. *J Trauma* 1976; 16: 662-8.
 44. Waldman JD, Rosenthal A, Smith AL, Shurin S, Nadas AS. Sepsis and congenital asplenia. *J Pediatr* 1977; 90: 555-9.
 45. Granger DN, Taylor AE. Effects of solute-coupled transport on lymph flow and oncotic pressures in cat ileum. *Am J Physiol* 1978; 235: E429-36.
 46. Kvetys PR, Wilborn WH, Granger DN. Effects of net transmucosal volume flux on lymph flow in the canine colon. Structural-functional relationship. *Gastroenterology* 1981; 81: 1080-90.
 47. Granger DN, Perry MA, Kvetys PR, Taylor AE. Interstitium-to-blood movement of macromolecules in the absorbing small intestine. *Am J Physiol* 1981; 241: G31-6.
 48. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, DeMaso CM, Ayala CA, Chaudry IH. The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock* 1995; 3: 259-67.
 49. Barke RA, Roy S, Chapin RB, Charboneau R. The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. *Arch Surg* 1994; 129: 1256-61.
 50. Ayala A, Xu YX, Chung CS, Chaudry IH. Does Fas ligand or endotoxin contribute to thymic apoptosis during polymicrobial sepsis? *Shock* 1999; 11: 211-7.
 51. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-21.
 52. Mangini C, Ruybal P, Garcia Viello H, et al. Apoptosis in gut-associated lymphoid tissue: a response to injury or a physiologic mechanism? *Transplant Proc* 1998; 30: 2763-6.

- - -

I never think of the future. It comes soon enough.

Nunca pienso en el futuro. Llega demasiado pronto.

Albert Einstein (1879-1955)