

**MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR EL
ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO:
EFECTO SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA**

FERNANDO ZAPATA GONZÁLEZ



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR EL ÁCIDO
DOCOSAHEXAENOICO:
EFECTO SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA**

Memoria presentada por el licenciado en Ciencias Químicas

Fernando Zapata González

para optar al título de Doctor en Química.

Directores: Drs. J.C. Domingo Pedrol y Félix Rueda Palacio

Barcelona, Abril de 2005

Los Drs. Joan Carles Domingo Pedrol, Profesor Agregado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y Félix Rueda Palacio, Investigador Senior del Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica,

CERTIFICAN:

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de biotecnología, bienio 2000-2002, de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria, que lleva por título ***Modulación del sistema inmune por el ácido docosahexaenoico: efecto sobre la célula dendrítica*** han sido realizados por Fernando Zapata González en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona, bajo nuestra dirección, para aspirar al grado de Doctor en Química.

Lo cual hacemos constar mediante la firma del presente documento en Barcelona, a 14 de Abril de 2005.

Dr. Joan Carles Domingo Pedrol

Dr. Félix Rueda Palacio

A Montse

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Cuando me otorgaron la beca que me ha permitido realizar esta tesis doctoral no era consciente del largo camino que iniciaba. Ahora, volviendo la vista atrás, me doy cuenta de todo lo que se ha avanzado, de los cambios que se han sucedido y del esfuerzo realizado.

Sin embargo, poco se hubiese conseguido si este camino se hubiese recorrido en solitario. Por ello me gustaría agradecer a las siguientes personas el apoyo y la ayuda que me han prestado:

Al Dr JC Domingo, mi director de tesis, por haberme otorgado la beca que me ha permitido realizar esta tesis, por su constante apoyo e ideas, su incansable búsqueda de fuentes de financiación, su paciencia y su celo corrector.

Al Dr Félix Rueda, mi codirector, por su infinita paciencia, su constante esfuerzo en el aportar nuevas ideas, su celo corrector, su desinteresada colaboración en la resolución de los problemas y sus amenas conversaciones sobre variopintos temas científicos.

A Montse, por su entusiasmo y alegría constantes, que han minimizado cualquier dificultad que se hubiese presentado, por formidable que pareciese al principio.

A la Dra Madariaga, por su apoyo y preocupación por la resolución de los problemas que han surgido en ciertos momentos.

Al Dr Jordi Pétriz, por sus enseñanzas en materias de citometría, por haberme permitido compartir con él su visión de la ciencia, por sus inestimables consejos en materia de Biología Celular y por su ameno y agudo sentido de la ironía.

A Fernando Postigo, que supo meterme en cintura al principio e inculcarme la disciplina del laboratorio y que, con el tiempo, se ha convertido en un inestimable compañero y amigo que me ha brindado su ayuda en múltiples ocasiones.

A Joan Josep Bech, antiguo compañero de laboratorio y amigo, por sus consejos de valor incalculable sobre el buen hacer en ciencia y el método científico; consejos sin los cuales probablemente esta tesis no habría llegado a buen término.

A Begoña, por su ayuda desinteresada y constante que ha permitido en gran medida acelerar la parte experimental de esta tesis.

Al resto de mis compañeros de grupo: Jaume, Carlos, Toni y Ana, por su compañerismo y amistad. También porque siempre han colaborado conmigo y han

creado un clima alegre y acogedor en el laboratorio que me ha permitido trabajar a gusto.

A mis compañeros doctorandos del resto del departamento: a los que he conocido por su compañerismo y al resto por haberme permitido concentrarme en la realización de esta tesis sin demasiadas distracciones.

A Marta, Vanesa e Irene, que me han acogido como uno más en su laboratorio de criobiología. Gracias por la instrucción en materias científicas, su sincera preocupación por el estado de mi tesis doctoral y por los muchos cafés compartidos.

A los compañeros doctorandos del departamento de genética del Institut de Recerca Oncològica, que me acogieron como un miembro más del departamento y compartieron en pie de igualdad todos sus recursos (incluidas sus solicitadas campanas de cultivos).

Al Dr Estanis Navarro, por sus consejos en materias científicas y sobre científicos.

A las Dras Mora i Sagristà, por su extraordinaria constancia en el trabajo y buen ánimo en todo momento.

A Catalina, al señor Joan y al señor Manolo, por su interés a lo largo de estos cuatro años por la evolución de mi tesis y por la ayuda prestada en todo momento.

Sinceramente, gracias a todos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	- 1 -
CAPÍTULO I: LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3: DHA	- 3 -
1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS GRASOS	- 5 -
1.2 LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS	- 9 -
1.3 LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3	- 11 -
1.4 EL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO	- 12 -
1.4.1 DHA como complemento alimentario	- 12 -
1.4.2 DHA como agente terapéutico	- 15 -
1.4.3 Mecanismos de actuación del DHA	- 20 -
CAPÍTULO II: RECEPTORES NUCLEARES DE HORMONAS: PPAR Y RXR	- 31 -
2.1 RECEPTORES PPARs	- 33 -
2.2 LOS LIGANDOS DE PPARs	- 34 -
2.3 ACTIVACIÓN DE LOS PPARs	- 35 -
2.3.1 Formas alternativas de activación de PPAR	- 36 -
2.4 INTERACCIÓN DE LOS PPARs CON LOS COACTIVADORES	- 37 -
2.5 EXPRESIÓN Y FUNCIONES PRINCIPALES DEL PPAR γ	- 38 -
2.5.1 Regulador de la adipogénesis	- 39 -
2.5.2 Sensibilidad a la insulina	- 39 -
2.5.3 Aterosclerosis	- 39 -
2.5.4 Cáncer	- 40 -
2.6 LOS RETINOIDES Y SUS RECEPTORES NUCLEARES	- 40 -
CAPÍTULO III: EL SISTEMA INMUNE	- 43 -
3.1 FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNE	- 45 -
3.1.1 Componentes celulares del sistema inmune	- 45 -
3.1.2 La inmunidad innata	- 45 -
3.1.3 La inmunidad adquirida	- 46 -
3.1.4 Las citocinas: mensajeros inter e intracelulares	- 47 -
3.1.5 Las células T helper: productoras de citocinas	- 47 -
3.1.6 La inflamación	- 48 -
3.2 LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	- 49 -
3.2.1 Células dendríticas inmaduras	- 49 -
3.2.2 Células dendríticas maduras	- 49 -
3.2.3 Características especiales de las células dendríticas	- 50 -
3.2.4 Tipos y subtipos de células dendríticas humanas	- 51 -
3.2.5 Células dendríticas y respuesta T	- 54 -
3.2.6 Tolerancia	- 57 -
3.2.7 Marcadores de expresión	- 59 -

Índice

3.3 DHA Y SISTEMA INMUNE	- 65 -
3.4 PPAR γ Y SISTEMA INMUNE	- 67 -
3.5 RETINOIDES Y SISTEMA INMUNE	- 68 -
OBJETIVOS	- 71 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 75 -
CAPÍTULO IV: MATERIALES	- 77 -
CAPÍTULO V: MÉTODOS	- 81 -
5.1 ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR: PROTOCOLO DEL MTT	- 83 -
5.2 ESTUDIOS DE APOPTOSIS	- 84 -
5.2.1 Análisis del ciclo celular	- 84 -
5.2.2 Detección de Anexina V	- 86 -
5.2.3 Determinación de la actividad caspasa	- 87 -
5.3. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	- 88 -
5.3.1 Obtención de células mononucleadas	- 88 -
5.3.2 Separación de monocitos y linfocitos	- 90 -
5.3.3 Diferenciación de monocitos en DCs	- 92 -
5.3.4 Adición de metabolitos	- 92 -
5.3.5 Carga de la célula dendrítica con antígeno	- 93 -
5.4 PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS	- 93 -
5.4.1 Congelación de CMNs	- 93 -
5.4.2 Descongelación de CMNs	- 94 -
5.4.3 Marcaje intracelular con CFDA/CFSE	- 94 -
5.4.4 Enfrentamiento linfocito-dendrítica	- 97 -
5.5 MEDICIÓN DE CITOCINAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR	- 98 -
RESULTADOS	- 101 -
CAPÍTULO VI: EFECTOS DE LOS PUFAS SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA	- 103 -
6.1 TOXIDAD CELULAR DE LOS PUFAs	- 105 -
6.1.1 Límite de viabilidad celular con DHA	- 105 -
6.1.2 Citotoxicidad del DHA en el sistema inmune: células dendríticas y linfocitos	- 109 -
6.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE MONOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS	- 112 -
6.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DHA	- 115 -
6.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y OTROS PUFAs	- 120 -
6.5 ALTERACIONES FUNCIONALES: PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS	- 125 -
6.5.1 Caracterización de la proliferación linfocitaria autóloga inducida por la estimulación con células dendríticas	- 125 -
6.5.2 Proliferación linfocitaria autóloga inducida con células dendríticas transformadas en presencia de DHA	-
	130 -

6.5.3 Proliferación linfocitaria autóloga inducida con células dendríticas transformadas en presencia de otros PUFAs	- 133 -
6.6 ALTERACIONES FUNCIONALES: SECRECIÓN DE CITOCINAS	- 135 -
CAPÍTULO VII: IMPLICACIONES DE LOS RECEPTORES NUCLEARES PPAR GAMMA Y RXR EN LOS EFECTOS DEL DHA EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	- 139 -
7.1 RELEVANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ	- 141 -
7.2 RELEVANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR RXR	- 147 -
7.3 ACTIVACIÓN DEL HETERODÍMERO PPAR γ :RXR: EFECTOS COMPLEMENTARIOS	- 156 -
7.4 EFECTO DEL INHIBIDOR DE PPAR γ , GW9662	- 164 -
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	- 173 -
CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL	- 175 -
8.1 TOXICIDAD CELULAR DEL DHA COMO LIMITACIÓN DE SU EFECTO TERAPÉUTICO	- 178 -
8.2 EFECTOS DEL DHA, COMO MODELO DE PUFA, SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA	- 180 -
8.2.1 Significados funcionales de las alteraciones fenotípicas	- 183 -
8.3 EVIDENCIAS SOBRE EL MECANISMO DE ACTUACIÓN DEL DHA SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA	- 186 -
8.3.1 Activación del heterodímero PPAR γ :RXR a través de RXR	- 189 -
8.3.2 Efecto de la inhibición irreversible de PPAR γ	- 195 -
8.4 MODELO DE REGULACIÓN DE LA CÉLULA DENDRÍTICA POR EL COMPLEJO PPAR γ :RXR	- 198 -
CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES	- 203 -
BIBLIOGRAFÍA	- 207 -

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%DC	Porcentaje de células divididas
9cRA	9-cis-ácido retinoico
AA ARA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ALA	Ácido α -linoleico
APC	Célula presentadora de antígeno
CAM	Calmodulina
c-AMP	AMP cíclico
CARLA	Estudio de ligando a receptor coactivador dependiente
CD	Cluster de diferenciación
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMN	Células mononucleadas
CMP	Progenitores mieloides comunes
CTLA-4	Antígeno de célula T citotóxica 4
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión a ADN
DC	Célula dendrítica
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHGLA	Ácido dihomo- ω -linoleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Ácido docosapentaenoico
dsDNA	ADN de doble hebra
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FCS HI	Suero fetal bovino inactivado
GLA	Ácido γ -linoleico
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófago y granulocito
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HNF-4	Factor nuclear hepático 4
HREs	Elemento de respuesta a hormonas

Abreviaturas

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
iDC	DC intersticiales
IFN γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
imDCs	DC mielóide inmadura
IP ₃	Inositol trifosfato
LBD	Dominio de unión a ligando
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LIN	Ácido linoleico
LPS	Lipopolisacárido
LXRs	Receptor X de hígado
MFI	Mediana de intensidad de fluorescencia
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MMP	Metaloproteinasas
MPC	Concentrador de partículas magnéticas
MSR1	Receptor scavenger de macrófago
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
N-CoR	Receptor nuclear correpresor
NF κ B	Factor nuclear kappa beta
NK	Asesina natural
NO sintasa	Sintasa de óxido nítrico
OLE	Ácido oleico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Prostaglandina
PGHS	Prostaglandina endoperóxido sintasa
PI	Ioduro de propidio
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLasa A ₂	Fosfolipasa A2

PLasa C	Fosfolipasa C
PP1	Proteínfosfatasa 1
PP2B	Proteínfosfatasa 2B
PPARs	Receptores activadores de la producción de peroxisomas
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR
P-Proteins	Proteínas fosforiladas
PS	Fosfatidil serina
PUFAS	Ácidos grasos poliinsaturados
RA	Ácido retinoico
RAR	Receptor de ácido retinoico
RNAsa A	Ribonucleasa A
ROS	Bastones del segmento externo
ROSI	Rosiglitazona
RXR	Receptor X de retinoides
SEB	Superantígeno bacteriano enterotoxina B de Staphylococcus
SMRT	Mediador silenciador para la hormona retinoide y tiroidea
SRC1	Coactivador de receptor de esteroides 1
SREBPs	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	T Helper
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Tr	Células T reguladoras
TZD	Thiazolidionas
VCAM-1	Molécula de adhesión a células de los vasos sanguíneos 1
VSCM	Célula de músculo liso de los vasos sanguíneos
ω	Omega

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3: DHA

1.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos de cadena larga que poseen generalmente hasta 24 átomos de carbono, tienen un solo grupo carboxilo y una cadena hidrocarbonada apolar, la cual les confiere su naturaleza de insolubles en agua [12]. Casi todos los ácidos grasos poseen un número par de átomos de carbono; ello se debe a que su síntesis biológica tiene lugar mediante la adición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. Sin embargo, también existen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par. Los ácidos grasos que poseen 16 y 18 átomos de carbono son los más abundantes [2].

El grupo carboxílico de la molécula convierte al ácido graso en un ácido débil (con un pK_a en torno a 4,8). El grupo COOH es capaz de formar puentes de hidrógeno, de forma que los puntos de fusión de los ácidos grasos son mayores que los de sus hidrocarburos correspondientes [2].

Las propiedades químicas de los ácidos grasos derivan, por una parte, de la presencia de un grupo carboxilo y, por otra, de la existencia de una cadena hidrocarbonada. La coexistencia de ambos componentes en la misma molécula convierte a los ácidos grasos en moléculas débilmente anfipáticas (el grupo COOH es hidrofílico y la cadena hidrocarbonada es hidrofóbica). El carácter anfipático es tanto mayor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada. La solubilidad en agua decrece a medida que aumenta la longitud de la cadena [2].

La cadena hidrocarbonada puede hallarse completamente saturada, es decir, contener únicamente enlaces simples (C-C) o poseer insaturaciones, dobles enlaces, en cantidad de uno o más. En la mayoría de los ácidos grasos insaturados, el doble enlace se encuentra entre los átomos 9 y 10. Si existen más dobles enlaces, aparecen normalmente entre el enlace doble en posición 9 y el grupo metilo terminal. Si el ácido graso contiene más de un doble enlace, éstos no se hallarán nunca conjugados (-CH=CH-CH=CH-) sino que se encontrarán separados por un grupo metileno (-CH=CH-CH₂-CH=CH-).

Los ácidos grasos saturados más abundantes son el palmítico (hexadecanoico) y el esteárico (octadecanoico). Los ácidos grasos saturados de menos de 10 átomos de C son líquidos a temperatura ambiente y parcialmente solubles en agua. A partir de 12 C, son sólidos y prácticamente insolubles en agua. Los ácidos grasos saturados, desde el punto de vista químico, son muy poco reactivos. En la Tabla 1.1 se exponen algunos de los ácidos grasos saturados más comunes.

Introducción

Cuando únicamente existe una insaturación en la cadena se habla de ácidos grasos monoinsaturados. En la Tabla 1.2 se muestran las estructuras moleculares de dos de los ácidos grasos monoinsaturados más comunes. En caso de haber más de una insaturación, serían ácidos grasos poliinsaturados (Tablas 1.3 y 1.4).

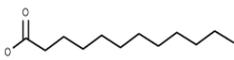
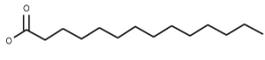
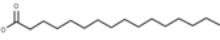
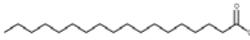
Algunos ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico y araquidónico) no pueden ser sintetizados por los animales superiores (incluido el hombre) y, como su función biológica es fundamental, deben ser obtenidos a través de la dieta. Por este motivo reciben el nombre de ácidos grasos esenciales.

El sistema de nomenclatura que más frecuentemente se utiliza para enumerar los diferentes ácidos grasos es el de la nomenclatura abreviada. Este sistema es muy útil para nombrarlos.

Consiste en una C, seguida de dos números, separados por dos puntos. El primer número indica el número total de C de la cadena hidrocarbonada, mientras que el segundo indica el número de dobles enlaces que contiene. La posición de los dobles enlaces se indica como un superíndice en el segundo número. Así, el ácido oleico (9-octadecaenoico) se representa como C18:1⁹, el linoleico (9,12-octadecadienoico) como C18:2^{9,12} y el linolénico (9,12,15-octadecatrienoico) como C18:3^{9,12,15}.

Por lo general, detrás del átomo de carbono que indica el doble enlace se añade la letra Z (18:1^Z) que indica que la conformación del doble enlace es de tipo cis.

Tabla 1.1. Principales ácidos grasos saturados

<p>Ácido Láurico 12:0 Sinónimos: Ácido dodecanoico Fórmula Molecular: C₁₂H₂₄O₂ Peso Molecular: 200.32</p>  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	<p>Ácido Mirístico 14:0 Sinónimos: Ácido tetradecanoico Fórmula Molecular: C₁₄H₂₈O₂ Peso Molecular: 228.37</p>  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
<p>Ácido Palmítico 16:0 Sinónimos: Ácido hexadecanoico Fórmula Molecular: C₁₆H₃₂O₂ Peso Molecular: 256.42</p>  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	<p>Ácido Estearico 18:0 Sinónimos: Acidum stearicum; Ácido octadecanoico Fórmula Molecular: C₁₈H₃₆O₂ Peso Molecular: 284.48</p>  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$

Fuente: [1]

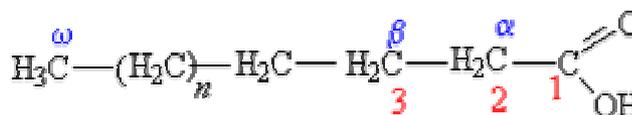


Figura 1.1 Numeración de los átomos de carbono de un ácido graso [2].

Se usa, además, en la literatura científica una nomenclatura adicional relacionada con la posición del último doble enlace al final de la cadena hidrocarbonada. Como se puede apreciar en la Figura 1.1 las cadenas de ácidos grasos se numeran a partir del grupo carboxílico, donde se considera que se encuentra el inicio de la cadena alifática. Al carbono 2 se le denomina α porque es el primer carbono tras el grupo carboxilo. El carbono 3 se denomina beta y es el carbono que inicialmente se oxida en la degradación de los ácidos grasos (beta oxidación). Como el alfabeto griego comienza por la letra α y termina por la letra ω, el último carbono de la cadena es denominado carbono omega (ω). Los términos ω-3, ω-6 hacen referencia a la distancia entre el último carbono de la cadena, el ω, y el carbono más cercano a éste que forma parte de un doble enlace. Así, un ácido graso ω-3 tendría el último doble enlace a tres átomos de carbono de distancia del carbono ω, un ω-6 lo tendría a seis carbonos y, finalmente, un ω-9 lo tendría a nueve carbonos de distancia. A lo largo de la tesis se utilizarán ambos términos omega y ω poseyendo en todos los casos el mismo significado de forma indistinta.

Tabla 1.2. Ácidos grasos monoinsaturados

Como se podrá observar los dos ácidos grasos representados en la Tabla 1.2 son ácidos grasos ω-9. En la página siguiente se exponen los ácidos grasos ω-3 y ω-6 más importantes (Tablas 1.3 y 1.4) y sus características fisicoquímicas.

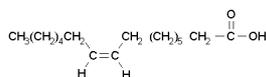
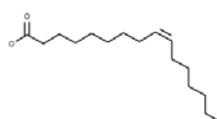
Ácido Palmitoleico

16:1Δ⁹

Sinónimos: Ácido *cis*-9-hexadecanoico

Fórmula Molecular: C₁₆H₃₀O₂

Peso Molecular: 254.41



Ácido Oleico (OLE)

18:1Δ⁹

Sinónimos: Acidum oleicum ;

Ácido *cis*-9-Octadecanoico ; Ácido Elainico

Fórmula Molecular: C₁₈H₃₄O₂

Peso Molecular: 282.46

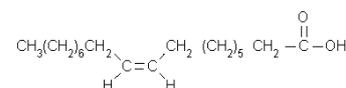
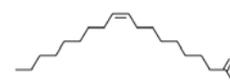
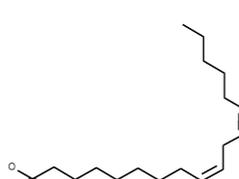
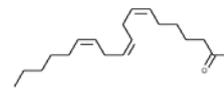


Tabla 1.3. Principales ácidos grasos poliinsaturados ω -6

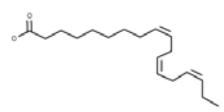
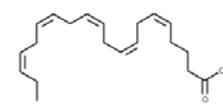
<p>Ácido Linoleico (LA) 18:2Δ^{9, 12}</p> <p>Sinónimos: Ácido cis,cis-9,12-Octadecadienoico</p> <p>Fórmula Molecular: C₁₈H₃₂O₂</p> <p>Peso Molecular: 280.45</p>	<p>Ácido γ-Linoleico (GLA) 18:3Δ^{6,9, 12}</p> <p>Sinónimos: Ácido cis,cis,cis-6,9,12-Octadecatrienoico</p> <p>Fórmula Molecular: C₁₈H₃₀O₂</p> <p>Peso Molecular: 278.43</p>
---	---

$$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} \quad \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

Tabla 1.4. Principales ácidos grasos poliinsaturados ω -3

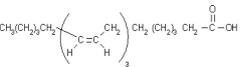
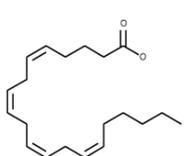
<p>Ácido α-Linolénico (ALA) 18:3Δ^{9, 12,15}</p> <p>Sinónimos: ácido cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoico; α-Lnn</p> <p>Formula Molecular: C₁₈H₃₀O₂</p> <p>Peso Molecular: 278.43</p>	<p>Ácido Eicosapentaenoico (EPA) 20:5Δ^{5, 8, 11, 14, 17}</p> <p>Sinónimos: ácido cis-5,8,11,14,17-Timnodónico</p> <p>Formula Molecular: C₂₀H₃₀O₂</p> <p>Peso Molecular: 302.45</p>
---	--

$$\text{CH}_3\left(\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C}=\text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}\right)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

$$\text{CH}_3\text{CH}\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}=\text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}\right)_5\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

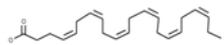
<p>Ácido homo-γ-linolénico (DHGLA) 18:3Δ^{6,9, 12}</p> <p>Sinónimos: Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienoico</p> <p>Fórmula Molecular: C₂₀H₃₄O₂</p> <p>Peso Molecular: 306.48</p>	<p>Ácido Araquidónico (AA) 20:4Δ^{5,8,11,14}</p> <p>Sinónimos: Ácido cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoico; Ácido Eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico</p> <p>Fórmula Molecular: C₂₀H₃₂O₂</p> <p>Peso Molecular: 304.47</p>
--	--

$$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}=\text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}\right)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

$$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

<p>Ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6Δ^{4,7, 10, 13, 16, 19}</p> <p>Sinónimos: ácido cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico</p> <p>Formula Molecular: C₂₂H₃₂O₂</p> <p>Peso Molecular: 328.49</p>	<p>Ácido docosapentaenoico (DPA) 22:5Δ^{7, 10, 13, 16, 19}</p> <p>Sinónimos: ácido all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico</p> <p>Formula Molecular: C₂₂H₃₄O₂</p> <p>Peso Molecular: 330.50</p>
--	--




$$\text{CH}_3\text{CH}_2\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}=\text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array}\right)_6\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$$

1.2 LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se caracterizan por ser ácidos grasos de cadena larga que contienen en su estructura dos o más dobles enlaces. En los últimos años se han ido clarificando sus funciones biológicas así como sus capacidades preventivas y paliativas de diversas enfermedades [13, 14]. Entre estos ácidos destacan sobretodo los ácidos grasos ω -6 y ω -3. Los ω -6 se encuentran representados principalmente por el ácido graso linoleico (LA) y derivados suyos como el γ -linoleico (GLA), el dihomo- ω -linoleico (DHGLA) y el araquidónico (AA o ARA). Los ω -3 están compuestos por α -linolénico (ALA) y sus derivados, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA), el docosapentaenoico (DPA) y el docosahexaenoico (DHA). La estructura, nomenclatura abreviada, sinónimos así como las fórmulas y pesos moleculares de todos estos ácidos grasos se pueden encontrar en las Tablas 1.3 y 1.4. En la Figura 1.2 se presenta una clasificación de los ácidos grasos insaturados más importantes en función de la nomenclatura omega.

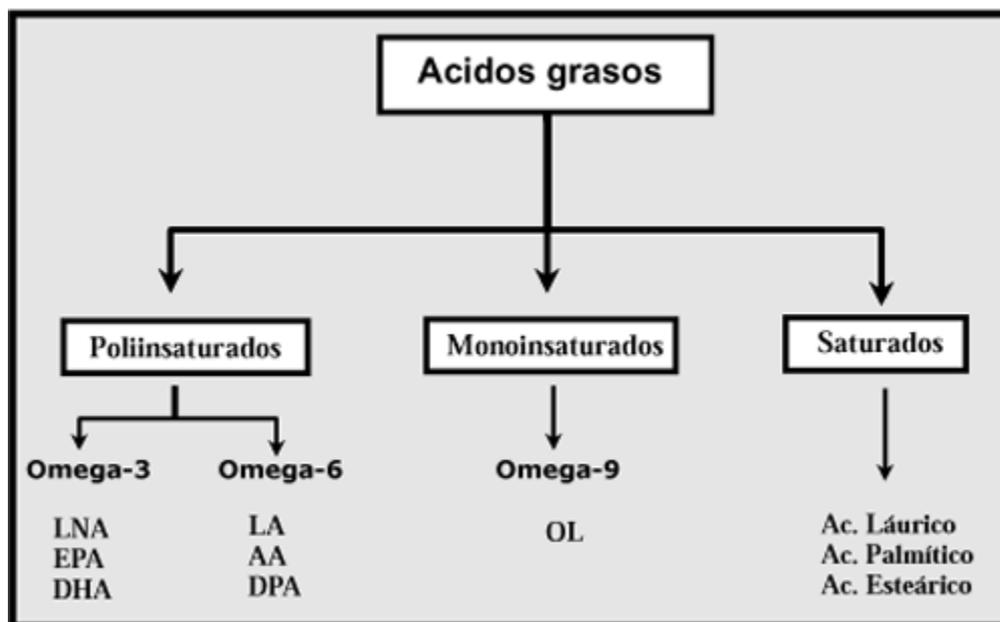


Figura 1.2. Distribución de las familias de ácidos grasos omega-3, omega-6 y omega-9 [8].

Los PUFAs se hallan formando parte de una amplísima variedad de seres vivos tanto del reino animal como del reino vegetal. Sin embargo, se encuentran sobre todo en los microorganismos (especialmente las algas, los hongos y las bacterias) y también en los insectos. Son estos últimos cuatro grupos los que poseen las baterías de desaturasas y elongasas requeridas para la producción *de novo* de todos estos ácidos [14-16]. Por otra parte, las plantas superiores rara vez contienen ácidos grasos de cadena superior a 18 carbonos debido a la falta de las enzimas necesarias para producirlos. Los animales

Introducción

superiores, al igual que las plantas superiores, no pueden sintetizar ácidos grasos de longitudes superiores a 18 carbonos. Por ello no son capaces de sintetizar *de novo* LA, ALA o PUFAs de mayor longitud. Sin embargo, una vez obtenidos, sí son capaces de transformarlos en otros PUFAs [17]. La consecuencia es que estos ácidos grasos son esenciales para los animales superiores, incluidos los mamíferos, que se aprovisionan de ellos a través de fuentes tales como microorganismos o plantas. Estos ácidos se encuentran formando parte de aceites y lípidos de membrana como glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos, sulfolípidos o lipoproteínas en donde desempeñan funciones estructurales y funcionales [14]. No tienen parangón entre los demás ácidos grasos respecto al amplio espectro de procesos biológicos en los cuales están involucrados. Primero, los PUFAs son componentes esenciales tanto de las membranas celulares como de las orgánulas, donde se encuentran principalmente formando parte de fosfolípidos en la posición sn-2 [14, 18]. Son importantes para la regulación de la arquitectura y la dinámica de estas membranas y también para el control de muchos procesos asociados. Regulan proteínas de membrana tales como la ATPasa, proteínas de transporte y complejos de histocompatibilidad y modulan las interacciones con componentes extracelulares como las proteínas de unión a ácidos grasos [14, 19, 20]. Así mismo, son capaces de regular la expresión de ciertos genes, incluyendo la ácido graso sintasa, la óxido nítrico sintasa, los canales de sodio o la colesterol-7- α -hidrolasa con lo que afectan a diversos procesos que incluyen la biosíntesis de ácidos grasos, la inducción del cáncer y la regulación del colesterol [21-29]. Además los PUFAs desarrollan importantes funciones sobre la expresión genética de cuatro familias de factores de transcripción, como son los receptores activadores de la producción de peroxisomas (PPAR), receptores X de hígado (LXRs), factor nuclear hepático 4 (HNF-4) y proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) [26].

También tienen un impacto importante en actividades bioquímicas de las células, tales como los procesos de transporte y los procesos estímulo-respuesta celulares. Se encuentran implicados en procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo lipídico, las respuestas inmunes, la adaptación al frío y cumplen un papel en ciertas condiciones patológicas tales como la carcinogénesis y enfermedades cardiovasculares [14, 19-29].

La segunda y más importante, función de los PUFAs es la provisión de una clase única de precursores para la conversión en metabolitos que regulan funciones biológicas críticas: los eicosanoides y las prostaglandinas [14, 30-32]. La ingestión relativa y absoluta de PUFAs puede tener consecuencias fundamentales para la biosíntesis eicosanoide y también para las funciones celulares y tisulares en el organismo [14].

Durante los últimos 20 años se ha puesto de manifiesto que los PUFAs actúan como precursores de una gran variedad de metabolitos bioactivos con diferentes funciones fisiológicas. Aunque todavía se están empezando a conocer muchas de estas funciones, su impacto en las enfermedades y las

consecuencias de sus modificaciones en la dieta, lo que sí está claro es que son nutrientes críticos para el organismo [14, 33].

1.3 LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3

Los ácidos grasos omega-3, sobretodo el EPA y el DHA, se conocen tanto por el gran número de actividades biológicas en las que se ven involucrados como por su participación como componentes esenciales de las membranas de multitud de tipos celulares de los organismos. Son el componente principal de los aceites de pescado, que tantos beneficios aportan a la salud humana cuando se incluyen en la dieta. El presente trabajo versa sobre ambos ácidos grasos pero se centrará mucho más en el DHA que en el EPA debido a la creciente importancia que va adquiriendo este ácido graso en la literatura científica, a su destacado papel en muchos tejidos tales como el tejido adiposo, el sistema inmunológico, el sistema nervioso y la retina y, por último, a que el DHA y el EPA son parcialmente interconvertibles el uno en el otro. Primero el DHA es biosintetizado a partir del EPA en los organismos, es decir, es un derivado del EPA a través de su elongación y desaturación [5, 14]. Pero en caso de ausencia de EPA, el DHA puede retroconvertirse parcialmente en EPA [34, 35].

Los diferentes ácidos grasos son transformados mediante una batería de desaturasas y elongasas (Figura 1.3) en EPA. En este punto se produce una bifurcación en las vías seguidas por microorganismos y animales superiores. En microorganismos se ha podido determinar la conversión directa de EPA en DHA mediante la elongasa de ácidos grasos y la desaturasa $\Delta 4$. Sin embargo, en mamíferos se demostró que esta desaturasa

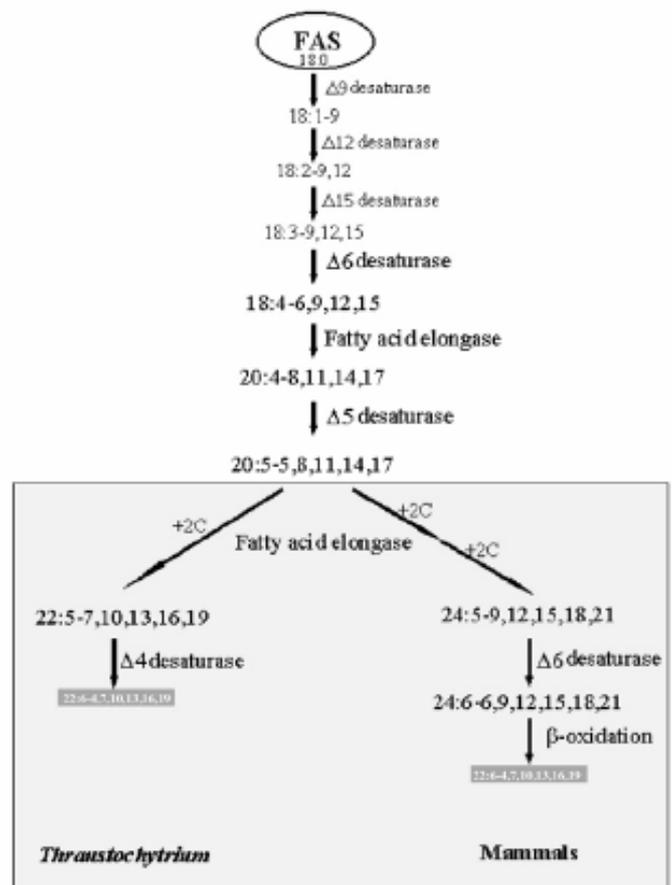


Figura 1.3. La vía aeróbica (desaturación y elongación) para la síntesis de DHA. Los mamíferos carecen de las desaturasas de ácidos grasos $\Delta 12$ y $\Delta 15$ y, por lo tanto, requieren el suministro externo de ácido α -linolénico, un precursor en la biosíntesis del DHA. La vía que se sigue es la vía independiente de desaturasa $\Delta 4$ [5].

no realizaba la biotransformación [36]. En animales superiores la conversión se realiza mediante la conversión de 20:5-5,8,11,14,17 (EPA) en 24:5-9,12,15,18,21 a través de dos procesos de elongación consecutivos. Después actúa la desaturasa $\Delta 6$ produciéndose 24:6-6-9,12,15,18,21 el cual es posteriormente sometido a una betaoxidación que produciría 22:6-4-7-10-13-16-19 (DHA).

1.4 EL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO

El ácido docosahexaenoico es el ácido graso de cadena más larga y el más insaturado que se encuentra en los sistemas biológicos. A través de estudios dietéticos, este ácido graso ha sido relacionado con una enorme variedad de patologías humanas que incluyen cáncer, enfermedades coronarias, artritis reumatoide, asma, lupus, alcoholismo, agudeza visual, enfermedades del riñón, enfermedades respiratorias, desórdenes peroxisomales, dermatitis, psoriasis, fibrosis quística, esquizofrenia, depresión, incorrecto desarrollo neurológico y cerebral, malaria, esclerosis múltiple e incluso migrañas [5, 37].

El DHA es pues un ácido graso esencial para el correcto funcionamiento del organismo. Para ilustrar la importancia de este ácido graso así como su potencial como fuente de señales intracelulares se mencionarán algunas de las principales funciones que el DHA es capaz de ejercer en el organismo.

1.4.1 DHA como complemento alimentario

Los lípidos son un componente esencial de la dieta [38]. Con una dieta completamente libre de lípidos, las ratas no son capaces de crecer ni reproducirse. Los ácidos grasos esenciales son los componentes críticos de los lípidos. Entre estos se encuentran el ácido linoleico y su derivado ω -6, el araquidónico. Se sabe que el ALA y su derivado omega-3, el DHA, son también ácidos grasos esenciales [39-42], como ya se ha comentado anteriormente. Los componentes activos en ambas series de ácidos grasos son los ácidos grasos con cadenas alifáticas más largas, el AA y el DHA. Estos se obtienen o bien por desaturación y elongación de precursores suyos (aunque no en las cantidades necesarias), o bien a través de la dieta.

Una relación elevada de LA frente a ALA fuerza a un descenso de ácidos grasos ω -3 en el organismo, incluyendo el DHA, al no poder competir eficazmente por las enzimas necesarias para la desaturación y la elongación [37] puesto que ambos ácidos grasos son metabolizados por las mismas enzimas.

Los humanos ancestralmente consumían dietas ricas en ácidos grasos ω -3 y bajas en ácidos grasos insaturados ya que las comidas procedentes de animales silvestres poseen contenidos ω -3 mucho

más altos que la que proporcionan los animales de granja que, actualmente, sostienen la mayor parte la alimentación cárnica humana. En aquellos tiempos se calcula que el suplemento dietético de los ácidos grasos se encontraba en una relación 1:1 entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 [43]. Estos coeficientes no se dan hoy en día en los países occidentales. Por ejemplo, en Estados Unidos actualmente se considera que la relación es mayor de 10:1 a favor de los ácidos grasos omega-6 lo cual está causando una deficiencia en ácidos grasos omega-3 entre la población. Las consecuencias son un desequilibrio en la producción de eicosanoides y mayor exposición a diversas enfermedades tales como la artritis [44]. Basándose en estas evidencias, la Sociedad Japonesa de Nutrición Lipídica recomienda que el coeficiente entre ácidos grasos omega-6 y omega-3 sea menor que 4:1 para adultos sanos y menor de 2:1 para la prevención de enfermedades crónicas en la vejez. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud recomienda una relación de ácidos grasos omega-6 y omega-3 de entre 3:1 y 4:1 [45].

Por otro lado, el DHA es un ácido de una importancia crucial para el correcto desarrollo neuronal y visual en los mamíferos así como para el mantenimiento de la función retinal y neural en la etapa adulta [37, 39, 46-48]. El ácido docosahexaenoico se encuentra en altas concentraciones en la retina [49, 50], la cual posee un eficiente mecanismo de conservación y reciclado del mismo que le ayuda a preservar las concentraciones de DHA incluso en periodos en los que la entrada del ácido graso a través de la dieta es baja [47, 51-54].

Diversos estudios en animales y humanos han demostrado que la adición de DHA en la dieta mejora notablemente la capacidad visual de los sujetos [55]. Así mismo se observa un incremento del desarrollo visual en niños alimentados con suplementos de DHA frente a niños que carecían de estos suplementos [56]. Además, una reducción del nivel de DHA en la retina se puede asociar con una función retinal alterada [47]. Estudios realizados eliminando el aporte de DHA del organismo durante el desarrollo de la retina han revelado la existencia de un periodo de desarrollo crítico en el que es necesario el suplemento de DHA. Si este no se encuentra presente en ese periodo crítico se produce una disfunción en el organismo en desarrollo que no puede normalizarse posteriormente incluso cuando los niveles de DHA en la retina vuelven a ser normales [37, 47, 57-60]. Además, el DHA proporciona a la membrana propiedades que permiten a las proteínas fototransductoras difundir rápidamente a través de la bicapa lipídica de las membranas [47].

Múltiples estudios también demuestran que el DHA es esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso [37, 46, 60, 61]. Prácticamente todas las células que componen el organismo de los mamíferos contienen DHA pero en el sistema nervioso su contenido es más alto [57]. El DHA es absorbido en este tejido con preferencia a otros ácidos grasos. El recambio de DHA en el cerebro es muy rápido y, sin embargo, en caso de descenso en la entrada de DHA a través de la dieta, este es tenazmente retenido [46].

Introducción

De nuevo, como en el caso de la función retinal, estudios en animales [62-74] han demostrado que si la entrada de DHA es inadecuada durante el desarrollo neural temprano, los niveles de DHA disminuyen en el tejido nervioso. Existe también aquí una etapa crítica del desarrollo en la que el DHA debe estar presente. Esto se ha podido constatar mediante autopsias realizadas a infantes vegetarianos alimentados con dietas bajas en ácidos grasos ω -3 [37]. Numerosos estudios realizados con niños nacidos prematuramente y no prematuros sometidos a dietas ricas o pobres en DHA o alimentados con leche materna llevaron a la conclusión de que los niños prematuros alimentados con leche materna o con una dieta suplementada con DHA alcanzaban posteriormente coeficientes de inteligencia medios más altos que aquellos niños que habían recibido una alimentación deficiente en DHA [37, 75]. Las autopsias de niños nacidos prematuramente alimentados con dietas de bajo contenido en DHA indicaban contenidos en DHA en cerebro más bajos que los de aquellos que habían sido alimentados con DHA [37, 46, 76-81].

Puesto que el DHA ha de encontrarse disponible durante el desarrollo temprano infantil, el niño debe recibir las cantidades necesarias del mismo. El DHA es obtenido por el lactante a través de la madre, la cual se provee a sí misma a través de la dieta y, dependiendo de la composición de ácidos grasos que componen dicha dieta, el lactante recibe más o menos cantidad de ácidos grasos omega-3 esenciales para su desarrollo neuronal y visual [82]. Se han encontrado correlaciones significativas entre los contenidos de DHA del plasma materno así como de la leche materna y el contenido de DHA en el plasma del niño [83].

Los análisis de contenido en DHA de la leche materna se correlacionan bastante bien con la ingestión de DHA en la dieta de la madre. Se encuentran niveles bajos de DHA en poblaciones occidentales como la de Estados Unidos [84] y niveles muy altos en madres que se alimentan con dietas a base de pescado marino en China [85]. La dieta materna es pues un factor de una importancia crucial en la composición de ácidos grasos de la leche materna. Las diferencias observadas entre diferentes leches maternas de diferentes países se deben principalmente a los alimentos que se ingieren en cada país [82]. Los vegetarianos, que ingieren grandes cantidades de LA y ALA, presentan niveles altos de estos dos ácidos grasos en leches maternas [82]. En cambio mujeres Inuit y Chinas que consumen grandes cantidades de comida marina [82, 85] presentan niveles aumentados de EPA y DHA [86] en su leche.

La velocidad con que la dieta influye en la composición de la leche materna varía con los diferentes ácidos grasos. Para el ALA los máximos se alcanzan a las 10 h de la ingestión mientras que para el EPA tardan 14 h en alcanzarse dichos máximos y para el DHA 24 h [82, 87].

El DHA también es necesario para mantener la función cerebral en adultos. La inclusión de DHA en la dieta incrementa la capacidad de aprendizaje, mientras que deficiencias en el mismo se han asociado a problemas cognitivos [37].

A pesar de todos estos datos el mecanismo por el que se producen estas mejoras no se conoce. Se ha propuesto que el DHA podría tener un efecto antiapoptótico en las neuronas [46]. Se sabe que los

fosfolípidos de las membranas neuronales retienen el DHA [88-90]. En cambio, las células astrogliales, que contribuyen a la supervivencia neuronal, liberan ácidos grasos fácilmente [89-93]. Esto sugiere que el DHA podría estar actuando de alguna manera como un factor trófico que posibilitase la supervivencia de las neuronas. Otra posibilidad se basaría en el hecho de que el DHA se encuentra altamente enriquecido en los aminofosfolípidos, especialmente la fosfatidil serina (PS) [94-97]. El enriquecimiento en DHA de las membranas aumenta la síntesis de PS. La PS es el principal fosfolípido cargado negativamente en las membranas celulares de muchos mamíferos y muchas de las proteínas señalizadoras, tales como proteína quinasas, son dependientes de PS [98-100]. La alteración del contenido de PS producida por el DHA podría tener consecuencias importantes para la función celular [46].

1.4.2 DHA como agente terapéutico

En la anterior exposición se ha puesto de relieve que el DHA es realmente un complemento alimenticio necesario e indispensable para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. En esta segunda parte de la exposición sobre el DHA se explicarán numerosos casos de patologías en las que el DHA se encuentra implicado de alguna forma, ya sea porque administrándolo se suple una deficiencia del mismo o por las actividades singulares que este ácido graso es capaz de llevar a cabo. Este apartado no pretende englobar todas estas alteraciones; ni tampoco proporcionar una detallada, exhaustiva y minuciosa relación de todas ellas, pues no es ese el objetivo principal de esta tesis. La finalidad de este apartado es nuevamente resaltar la importancia que este ácido graso tiene para el organismo.

El DHA es capaz de aliviar los síntomas de un gran número de enfermedades por lo que se relaciona a muchas de ellas parcial o totalmente con deficiencias en este ácido graso. Algunas de estas enfermedades son:

- **Síndrome fetal alcohólico.** Se trata de un deterioro severo e irreversible en el desarrollo y funcionalidad neurológicos causado por el consumo de alcohol de forma crónica durante el embarazo por parte de la madre. Un consumo moderado de alcohol por parte de la madre se asocia a descensos en la inteligencia en niños de 4 años [101-103]. En cambio el consumo de grandes cantidades de alcohol durante el periodo de gestación se asocia a retraso mental, hiperactividad, baja capacidad de concentración y función motora anormal [104-107]. Modelos animales muestran contenidos de DHA en cerebro reducidos con respecto a los controles. Al suplementar con DHA a dichos animales a través de la dieta, los niveles de DHA retornan a niveles normales [37, 108, 109].

- **Desorden hiperactivo con déficit de atención.** Los contenidos de ARA, EPA y DHA en los fosfolípidos en estos pacientes se encuentran reducidos con respecto a las controles

[37]. Muchos niños que padecen este desorden tienen también el metabolismo de los ácidos grasos alterado [110].

- **Desórdenes peroxisomales.** Los desórdenes peroxisomales, tales como la adrenoleucodistrofia, muestran defectos en los peroxisomas que causan la síntesis alterada de eterglicerofosfolípidos. Estos incluyen plasmalógenos de etanolamina que son componentes importantes de la mielina. La mielinización se encuentra severamente alterada en estos niños [111]. Se dieron a cinco pacientes dosis orales diarias de entre 100-600 mg de etil éster de DHA. Los niveles de DHA en sangre volvieron a ser normales en pocas semanas. En tres de los más jóvenes la mielinización volvió a niveles normales y en los otros dos claramente mejoró. La síntesis de DHA se encontraba impedida por causa del defecto peroxisomal y por ello era necesario introducir dosis más altas de DHA a través de la dieta. De alguna manera el DHA es necesario para la síntesis de plasmalógenos [37].

- **Fibrosis cística:** Una de las teorías que intentan explicar los síntomas de esta enfermedad se basa en un desequilibrio entre el ARA y el DHA en páncreas, pulmón y tracto intestinal [37]. Estos pacientes presentan niveles deficientes de DHA y de otros ácidos grasos esenciales [112].

- **Fenilcetonuria:** Sus niveles de DHA en fosfolípido son menos de un tercio de los de una persona sana [37]. De nuevo es necesario incrementar la dosis de DHA presente en el organismo a través de aumentos del mismo en la dieta [113].

- **Depresión unipolar y hostilidad agresiva:** Existe una correlación entre la aparición de la depresión y la deficiencia en ácidos grasos omega-3. Un estudio de cinco años de duración demostró que pacientes depresivos y con hostilidad agresiva sometidos a una dieta rica en pescado reducían la frecuencia de sus depresiones significativamente. El porcentaje de depresión en las sociedades donde se consume grandes cantidades de pescado es más bajo. En Japón es de un 0.12% mientras que en USA es de un 3%. El consumo de pescado es 67 y 22 kg por persona y año respectivamente. Un caso extremo es Nueva Zelanda, con menos de 18 kg de pescado por persona y año y un 5.8% de la población con depresión severa [37, 114, 115].

- **Los descensos en DHA en el cerebro están asociados a un declive cognitivo durante la vejez.** Se encontró que los niveles de DHA en un grupo de personas de entre 69-89 años estaban inversamente relacionados con el declive cognitivo. Una relación omega-6/omega-3 alto favorecía el declive mientras que dietas ricas en pescado eran buenas para el mantenimiento de las funciones cognitivas del cerebro [37, 116].
- **Alzheimer:** La incidencia de la enfermedad de Alzheimer correlaciona positivamente con consumos de contenido calórico alto y mucha grasa y negativamente con el consumo de pescado [37, 117].
- **Enfermedades cardiovasculares.** La principal causa de muerte en las naciones occidentales son las enfermedades cardiovasculares [118]. Los estudios epidemiológicos muestran una fuerte correlación entre el consumo de pescado y la reducción de muertes repentinas por causa de infarto de miocardio [119]. La reducción es aproximadamente de un 50% para una dosis de 200 mg/día de DHA proveniente de pescado. El DHA junto con el EPA es el componente activo del pescado. El aceite de pescado no solo reduce el número de triglicéridos en sangre y hace descender el riesgo de una trombosis sino que también reduce la aparición de arritmias cardíacas. La asociación de deficiencias de DHA con la depresión es la razón por la que existe una fuerte correlación entre depresión e infarto de miocardio. A los pacientes con enfermedades cardiovasculares o diabetes tipo II a menudo se les aconseja una dieta baja en grasas y rica en carbohidratos. Un estudio realizado con mujeres demuestra que este tipo de dieta incrementa los triglicéridos en plasma y la severidad de la diabetes tipo II así como el riesgo de enfermedad coronaria.

Actualmente se encuentran en el mercado una serie de fármacos cuya función es reducir los triglicéridos en suero, la LDL-Colesterol (Lipoproteína de baja densidad) e incrementar las HDL-colesterol (Lipoproteína de alta densidad). Sin embargo estos fármacos tienen una serie de efectos secundarios bastante importantes. Los suplementos de DHA son capaces de incrementar la relación HDL/LDL y disminuir los niveles totales de Colesterol/HDL. El DHA podría usarse en lugar de estos fármacos reduciendo así en parte los efectos secundarios [37].

- **Aterosclerosis:** En la patogénesis de la aterosclerosis, el crecimiento de las células de músculo liso de los vasos sanguíneos es un componente importante. Estas células tienen la capacidad de proliferar y acumular lípidos. Las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas controlan la progresión a través del ciclo celular eucariótico y, en consecuencia, la proliferación de las células. Tanto el DHA como el EPA inhiben la síntesis de ADN a través de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de dichas quinasas y son capaces de parar la progresión de fase G1 a S [120]. Ni el ácido oleico ni el linoleico son capaces de realizar este efecto. Este mismo mecanismo tal vez sea el que opera efectos beneficiosos en el tratamiento de ciertos tumores con DHA y EPA.

Estos dos PUFAs omega-3 activan canales de K^{+}_{ATP} e inhiben ciertos tipos de canales de Ca^{2+} . También alteran favorablemente la producción de eicosanoides y regulan la expresión de la sintasa de óxido nítrico (NO sintasa) y de la ciclooxigenasa-2. EPA y DHA también inhiben la proliferación, migración y apoptosis de las células de músculo liso de los vasos sanguíneos (VSMC). Es esta capacidad de modulación la que explicaría los efectos beneficiosos de estos compuestos en las enfermedades coronarias. Así se podría explicar el efecto antiaterosclerótico de los aceites de pescado. Puestos a elegir entre el EPA y el DHA parece ser más potente y beneficioso el DHA que el EPA [37, 121].

- **Trombosis.** La función plaquetaria y la coagulación de la sangre juegan un importante papel en las enfermedades coronarias. Varios estudios han demostrado que suplementos de aceites de pescado producen descensos en los niveles de agregación plaquetaria, en la producción de tromboxanos y prolongan el tiempo de sangrado. No se observaron diferencias entre el EPA y el DHA. En este caso parecían ser equivalentes [37, 122, 123].
- **Cáncer:** La proliferación de algunos tipos de tumores es estimulada por el ácido araquidónico, un ácido graso ω -6 precursor de las prostaglandinas y de las lipoxigenasas [124]. Lo contrario ocurre con los ácidos grasos ω -3. La aparición y severidad de las metástasis se ve reducida en grupos de pacientes de cáncer tratados con EPA o DHA [125]. En el mecanismo parece estar involucrado algún tipo de inhibición de la síntesis de eicosanoides provenientes del araquidónico. La apoptosis es un mecanismo normal de supresión de células tumorales. El araquidónico puede suprimir esta entrada en apoptosis mientras que esto no se ha observado con DHA o con EPA [37]. El suplemento con DHA ya sea como ácido graso puro o proveniente de aceites de pescado incrementa la apoptosis en células tumorales de colon de rata [126-128]; en células cancerígenas HT-29

[129, 130]; en células CaCo-2 de cáncer de colon [131]; en el hepatocarcinoma transplantable de rata 3924a [132]; es capaz de suprimir la progresión de células cancerígenas de mama, MDA-MB-231 en ratones nude atímicos [133-135]; incrementa el tiempo de supervivencia de los perros frente al linfoma [136]; reduce el riesgo de cáncer de próstata en humanos [137] y reduce significativamente la inducción de tumor por dimetilbenzantraceno en ratas [138]. Además la adición de DHA induce la apoptosis en cultivos de carcinoma de pulmón A427 [139], células tumorales de laringe Hep2 humanas [140], células pancreáticas Mia-Pa-Ca-2 [141] y células de carcinoma Tera-2 [142]. También se ha visto un efecto muy positivo en la supresión de melanoma [143] y en la entrada en apoptosis de células tumorales Jurkat [144-146].

- **Artritis reumatoide:** Una de las enfermedades inflamatorias más extendidas en el primer mundo es la artritis reumatoide. El tratamiento suele consistir en drogas antiinflamatorias no esteroides tales como compuestos auríferos, penicilamina o metotrexato. Todas estas drogas tienen efectos secundarios importantes. Se ha demostrado que un incremento de los niveles de DHA y EPA en la dieta de las personas enfermas de artritis alivia el dolor en las articulaciones [147, 148]. El EPA y el DHA tienen propiedades antiinflamatorias y son capaces de alterar la función de los linfocitos, macrófagos y monocitos [37, 149, 150].

- **Asma:** El asma es una enfermedad crónica del pulmón caracterizada por obstrucción, inflamación e hiperrespuesta. Niños sometidos a dietas ricas en pescado tienen menos incidencia de asma. Los leukotrienos derivados del ácido araquidónico se encuentran implicados en el proceso asmático a través de la vasoconstricción y de la secreción de moco. La síntesis de leukotrienos es inhibida por los ácidos grasos ω -3. Tras estudios con pacientes asmáticos sometidos a dietas ricas y pobres en ácidos grasos omega-3 se ha demostrado que este tipo de ácidos es beneficioso para mejorar los síntomas de asma en muchos de los pacientes asmáticos aunque no en todos [22, 37, 149].

- **Posibles efectos adversos:** Hasta aquí se han comentado los efectos beneficiosos que el DHA produce en individuos afectados por diferentes enfermedades. Sin embargo, es preciso insertar en este punto una advertencia. La importancia que se está dando a los ácidos grasos ω -3 de cadena larga ha llevado a que cada vez salgan al mercado más y más productos suplementados con aceite de pescado. Esto puede llevar a algunos

consumidores a abusar de la dosis de estos productos. Una toma excesiva de DHA puede alterar la permeabilidad de la membrana y también algunas de las actividades enzimáticas de las células. Por otro lado, sin los antioxidantes adecuados, puede incrementarse la acumulación de peróxidos lipídicos. La relación de ácidos ω -3/ ω -6 en ratas por ejemplo se sitúa entre 5:1 y 1.8:1. A relaciones de 0.06 o menores se observan efectos negativos para la salud en estos animales [37, 151]. Un consumo excesivo de ácidos grasos omega 3 puede causar resultados adversos en individuos sanos o en aquellos cuyo sistema inmune está deprimido. Esto ocurre porque se produce una reducción excesiva en la producción de citocinas y eicosanoides que puede alterar la normal homeostasis o defensa contra antígenos [152]. Las poblaciones que normalmente consumen grandes cantidades de aceites de pescado también muestran otros efectos adversos. Los indígenas nativos de Alaska padecen una mayor incidencia de tuberculosis [153]. También se ha observado en los Inuits canadienses una infección recurrente en el tracto respiratorio que se ha asociado a inmunidad celular debilitada [154, 155]. En estudios experimentales se ha observado que los suplementos de aceite de pescado alteran la resistencia a la infección por *Salmonella* [156] y por *Listeria* [157, 158]. Además, estos suplementos provocan en animales afectados por el virus *Influenza* una eliminación de virus, respuesta de anticuerpos y producción de IFN γ retardadas [159].

1.4.3 Mecanismos de actuación del DHA

El DHA influye poderosamente en muchos aspectos del desarrollo del organismo; sobretodo en lo que se refiere al sistema nervioso; y también es un potente agente terapéutico contra muchas patologías. En la mayoría de estos casos no se ha conseguido delimitar claramente el mecanismo por el que el DHA está ejerciendo sus efectos beneficiosos. Se han atribuido muchas de estas enfermedades a alteraciones del sistema eicosanoide. Sin embargo, muchas veces los efectos que se producen no consiguen ser satisfactoriamente explicados utilizando una óptica que englobe únicamente al sistema eicosanoide. Los ácidos grasos ejercen sus efectos por medio de la alteración de los niveles relativos de eicosanoides pero también mediante mecanismos alternativos independientes del sistema eicosanoide [160-162].

Se cree que el DHA es capaz de actuar mediante diferentes mecanismos los cuales, además, no son mutuamente excluyentes entre sí, por lo que en algunos momentos podrían actuar varios de ellos al mismo tiempo. Todo esto dificulta su esclarecimiento. También es posible que no se conozcan todas las formas a través de las cuales actúa el DHA. Por ello el presente apartado se va a centrar en explicar los mecanismos principales establecidos hasta la fecha mediante los cuales el DHA consigue influir en el organismo, sin descartar que en un futuro próximo nuevos descubrimientos clarifiquen esta laguna definitivamente.

Los mecanismos principales a través de los cuales el DHA actúa sobre el organismo son tres:

- Modificando directamente las propiedades de las membranas celulares de los tejidos.
- Mediante la producción de segundos mensajeros sean o no eicosanoides.
- Actuando directa o indirectamente sobre factores de transcripción que a su vez modulan los procesos relacionados con el genoma.

1.4.3.1 Efectos del DHA en las membranas celulares

El DHA modifica muchas de las propiedades físicas de las membranas afectando a la composición y funcionalidad de las mismas y a las proteínas de membrana que se encuentran en ellas.

El DHA actúa a nivel celular incorporándose a los fosfolípidos de las membranas plasmáticas [163] y de las mitocondrias [164, 165] de forma muy rápida (sobretudo en las primeras dos h [166]). Sin embargo, se ha observado que no se distribuye por igual entre todas las clases de fosfolípidos. Se incorpora prioritariamente a fosfatidiletanolamina (PE) y después a fosfatidilcolina (PC) [4, 18]. Las estimaciones indican que una molécula recién llegada de DHA tiene una afinidad 5.7 veces mayor por una PE que por una PC en células leucémicas T27A [163]. La fosfatidiletanolamina parece ser, pues, el principal reservorio para el DHA en muchas membranas. Está demostrado que los fosfolípidos DHA-PE se acumulan preferentemente en la monocapa interna, rica en PE, de las membranas [4]. En los eritrocitos, los ácidos grasos ω -3, incluyendo el DHA, se acumulan en los fosfolípidos de etanolamina (PE) y serina (PS) de la monocapa interna de la membrana celular [167]. Basándose en todas estas evidencias se ha propuesto que los fosfolípidos con DHA se distribuirían en las membranas de forma heterogénea, lo cual implica la existencia de dominios ricos y pobres en este ácido graso. La razón por la que la naturaleza emplea un ácido graso tan costoso de producir (debido a sus seis dobles enlaces), tan susceptible a la oxidación y que además se distribuye de forma desigual entre los fosfolípidos de las membranas celulares es desconocida. Pero todo parece indicar que el DHA debe cumplir un papel especial en dichas membranas [4].

El DHA se encuentra en grandes concentraciones únicamente en determinados tejidos tales como los sinaptosomas [168], el esperma [169] y en los bastones del segmento externo de la retina [170]. El DHA puede llegar a estar en las membranas de estos tejidos a una concentración cercana al 50% molar del total de cadenas acilo de los fosfolípidos [171]. La concentración es tan alta que incluso se encuentran especies fosfolipídicas con dos moléculas de DHA [172, 173]. Es interesante destacar que las ya altas cantidades de DHA presentes en estas membranas no aumentan con la dieta. Es decir, parece que la dependencia de la dieta en estos tejidos donde el DHA es tan abundante es mínima. Es más, una vez incorporado, las moléculas de DHA son tenazmente retenidas incluso a expensas de otros ácidos grasos [171]. La función principal que cumple el DHA en estos tejidos no se conoce todavía con precisión.

Introducción

En cambio, en muchos otros tejidos la concentración de DHA se encuentra por debajo del 5% molar del total de cadenas de acilo fosfolípídicas. Es en estos tejidos donde la dieta permite el aumento de la concentración de DHA de 2 a 10 veces. Por esta razón se cree que es en estos tejidos sensibles a la entrada del ácido graso a través de la dieta donde se producen la mayor parte de los beneficios que se atribuyen al DHA [171, 174, 175]. En ellos el DHA se encuentra principalmente en la posición sn-2 estando la posición sn-1 de la cadena ocupada por ácidos grasos saturados (palmítico o esteárico) [4].

Con el objetivo de ver más de cerca los efectos que el DHA realiza en las membranas celulares se va a estudiar ahora un tejido concreto extraordinariamente rico en DHA para, de esta forma, yendo de más a menos, extrapolar lo que puede ocurrir con este ácido graso en los tejidos en los que no es tan abundante.

De los tejidos en los cuales el DHA es más abundante se escogerá la retina para ilustrar los efectos del DHA. En la retina, el DHA se incorpora principalmente en glicerofosfolípidos estructurales de la bicapa lipídica de la membrana celular. Se encuentra concentrado sobretodo en los discos de los bastones del segmento externo (ROS) donde llega al 30% de los ácidos grasos y hasta el 54% de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina. La retina contiene dipolienos o fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados en las dos posiciones sn-1 y sn-2 [47, 53, 176, 177].

La vía de transducción visual se inicia por la absorción de un fotón por la rodopsina, que se transforma en su forma activada. La composición de ácidos grasos de la membrana, en particular DHA, permite una mayor movilidad de la forma activada de la rodopsina [178]. Esta gran movilidad de la rodopsina dentro del micro ambiente lipídico explica el cambio en la activación de la proteína G y la correspondiente mejora en la señal y transmisión del estímulo. El resultado fisiológico es un incremento de la sensibilidad de la retina hacia la luz, efecto que se observa como ya se ha comentado al aumentar el DHA en la dieta de un niño [179]. El efecto se produce sobretodo por un aumento del volumen libre de membrana provocado por el DHA.

Este aumento del volumen libre de la membrana es uno de los principales efectos que el DHA ejerce en las membranas celulares [18, 180]. Debido a sus múltiples insaturaciones el DHA se coloca en los fosfolípidos en conformaciones que ocupan mucho más espacio que los ácidos grasos saturados con lo cual el volumen libre de la membrana aumenta [180-182]. Los resultados de muchos estudios dietéticos informan de aumentos en la fluidez de la membrana celular en animales a los que se les ha administrado una dieta rica en aceite de pescado enriquecido con DHA [183]. En cambio, al administrar una dieta deficiente en DHA se producían descensos en la fluidez de las membranas [184]. Estos estudios no han dado los mismos resultados en todas los tipos celulares del organismo ni en todos los casos. Se cree que esto puede estar relacionado con la composición de la membrana previa a la adición del DHA. Así, el

incremento en la fluidez de la membrana provocado por el DHA sería menor en aquellas bicapas ya ricas en insaturaciones y mayor en las que no tuviesen tantas [4, 185].

Otra de las consecuencias del aumento del volumen libre de empaquetamiento es un incremento de la permeabilidad de la membrana celular. El DHA es capaz de incrementar la permeabilidad celular de dos a tres veces más que el ácido oleico [186].

Las membranas naturalmente enriquecidas en DHA (ROS, sinaptosomas y esperma) tienen predisposición a formar vesículas de membrana y a la fusión [171]. Diferentes experimentos [187, 188] indican que los PUFAs son capaces de promover la fusión entre membranas naturales. Además, el DHA es capaz de aumentar la frecuencia de movimientos *Flip Flop* que tienen lugar entre los fosfolípidos de la membrana celular [4, 189].

Además de modificar las propiedades de la membrana la incorporación de DHA a los fosfolípidos también produce efectos sobre las proteínas de membrana y su funcionalidad. Los mecanismos por lo que esto sucede no están claros todavía. Algunos ejemplos se exponen a continuación: el cambio conformacional de rodopsina MI a MII depende de la presencia de lípidos como el DHA [190, 191]; la actividad de la proteína quinasa C (una proteína anfipática) se ve aumentada en presencia de DHA [4, 192]; también afecta al transporte y la comunicación intercelular; el DHA es capaz de modular el transporte a través de canales de sodio, potasio, magnesio... [193-200]

En cuanto al MHC I los estudios indican que el DHA es capaz también de modificar la expresión del mismo alterando la conformación de la proteína [4, 201-203].

Por el último, varios estudios han demostrado que el DHA de los fosfolípidos de las membranas altera la distribución del colesterol en ellas. Una de las funciones principales del colesterol en las membranas es regular las propiedades físicas de estas. El colesterol en las membranas tiene mayor afinidad por las zonas ricas en cadenas saturadas que en insaturadas [186]. El DHA fuerza a que existan zonas ricas en colesterol y zonas pobres en función de su abundancia relativa. Esta diferente afinidad por el colesterol proporciona la base para la teoría de que existen diferentes microdominios en las membranas: unos ricos en colesterol y pobres en DHA; otros ricos en DHA y pobres en colesterol. Diferentes trabajos apoyan la hipótesis de que el DHA se incorpora en la monocapa interna de la membrana celular forzando a más colesterol a ir a la monocapa externa. Desde ahí se iría perdiendo el mismo por la interacción con el exterior [4, 186, 204]. La diferente distribución del colesterol y el DHA en una membrana se puede observar en la Figura 1.4.

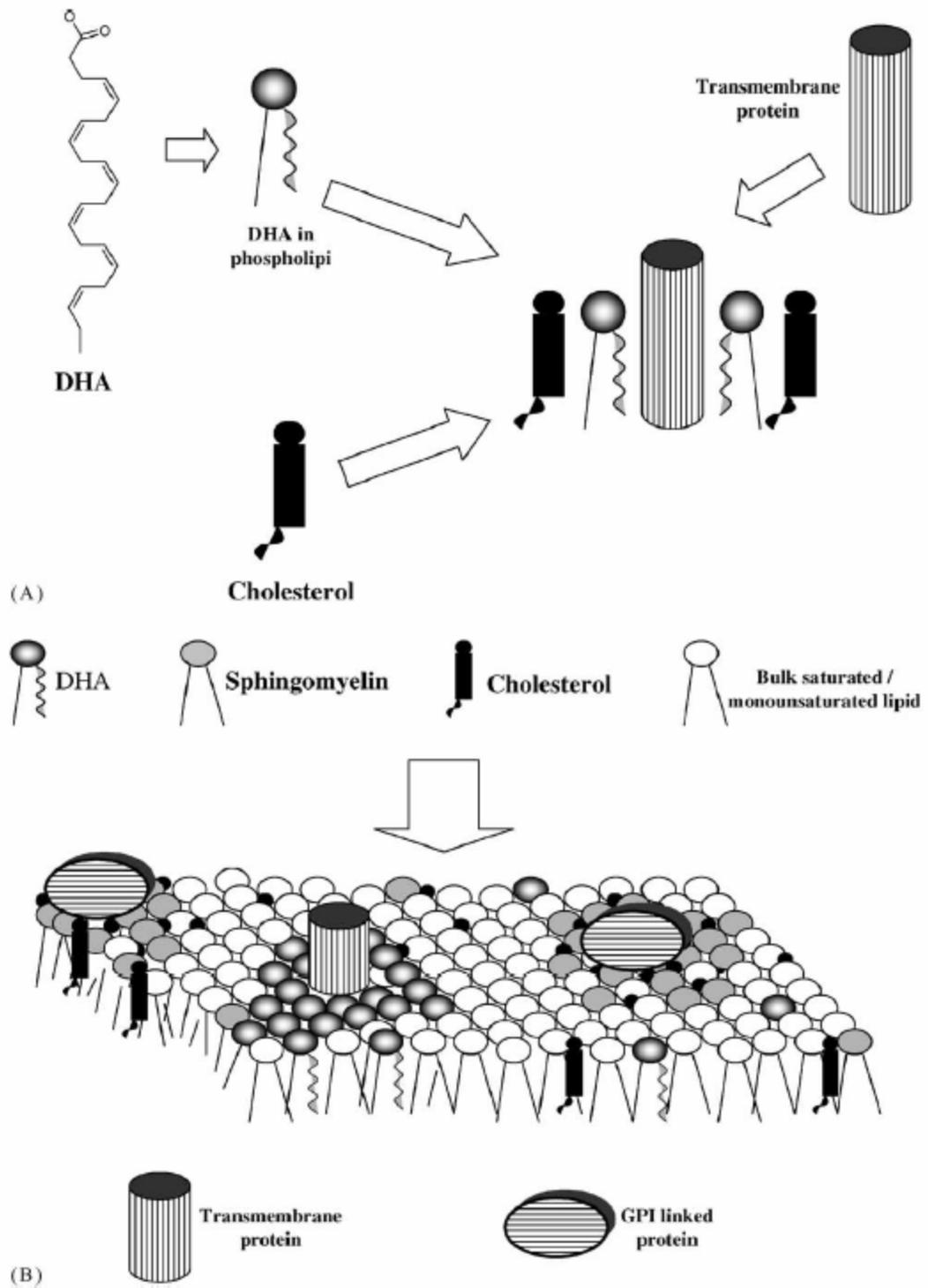


Figura 1.4. Intervención del DHA en la formación de microdominios de membrana. En el cuadro A se muestra la incorporación del DHA en la cadena Sn-2 de los fosfolípidos y la asociación de este fosfolípido con el colesterol. También se incluye una proteína transmembrana con gran afinidad por el DHA. En el cuadro B se observa una separación de dominios en zonas ricas en DHA y pobres en colesterol y zonas pobres en DHA y ricas en colesterol. Proteínas de estructura diferente se colocan en cada dominio [4].

1.4.3.2 Precursor de eicosanoides y otros segundos mensajeros

El segundo mecanismo por el cual el DHA afectaría a las células es al actuar como sustrato para la producción de segundos mensajeros que a su vez actuarían como señalizadores intracelulares.

Las señales intracelulares, tales como los diacilgliceroles (DAG), el inositol fosfato y las ceramidas se producen a partir de fosfolípidos de membrana en respuesta a un estímulo determinado. Los tipos y cantidades de ácidos grasos incorporados a las membranas plasmáticas vienen determinados en gran

cantidad por la ingestión dietética y regulan la fluidez de la membrana y la habilidad de los receptores para moverse dentro de ella [6]. Los ácidos grasos que componen estos fosfolípidos, actúan ellos mismos como segundos mensajeros en el citoplasma, influyendo sobretodo en la formación de Proteína quinasa C (PKC) y de DAG [205], en los flujos de calcio y, en las vías que controlan la formación de citocinas y otras proteínas celulares que pueden verse

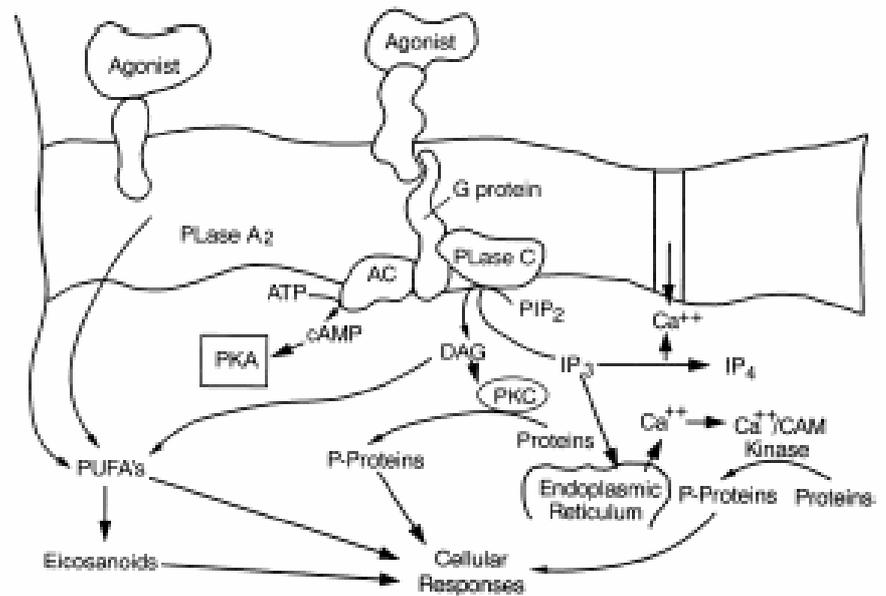


Figura 1.5 Algunas vías de señalización importantes mediadas por lípidos. AC, adenilato ciclasa; PLase A₂, fosfolipasa A₂; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; DAG, diacilglicerol; IP₃ Inositol trifosfato; PIP₂ fosfatidil inositol 4,5-bifosfato; P-Proteins, proteínas fosforiladas; CAM, calmodulina; c-AMP, AMP cíclico; PLase C, fosfolipasa C específica de fosfoinositida. [6]

involucradas tanto en procesos de inflamación como de desarrollo celular, crecimiento y diferenciación [6]. La habilidad de las fosfolipasas para generar estos segundos mensajeros se ve modificada por la composición de los fosfolípidos de las membranas celulares que le sirven de sustrato [206, 207].

La Figura 1.5 presenta los mecanismos activados por los segundos mensajeros derivados de lípidos de membrana. Los receptores tienen normalmente dominios intracelulares, intramembrana y extracelulares, pero los complejos proteicos G a menudo sirven como agentes complementarios que trasladan la información desde el receptor unido a la membrana o desde enzimas intracelulares, a menudo adenilato ciclasa y fosfolipasa C. La adenilato ciclasa, a su vez promueve la síntesis de AMP cíclico y activa la Proteína quinasa A (PKA). La fosfolipasa C transforma fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP₂) a Inositol

Introducción

trifosfato (IP_3) y DAG. IP_3 va al retículo endoplasmático donde causa la liberación de Ca^{2+} . DAG y Ca^{2+} a su vez activan PKC. PKA y PKC fosforilan muchas enzimas y receptores, alterando sus actividades. PKC es crítico para el control de los ciclos celulares y la expresión génica. También modula algunos receptores, modula canales de iones y libera hormonas. Participa en respuestas inmunes y procesos inflamatorios y es esencial para la activación de numerosas células especializadas tales como neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Los DAG incrementan la afinidad de PKC por el calcio y esto permite la completa activación de la enzima. Existen muchas isoformas diferentes de PKC lo cual explica los diferentes efectos de diferentes ácidos grasos insaturados de cadena larga. Todas estas interacciones son extraordinariamente complejas y todavía no han sido completamente dilucidadas [6]. La estimulación agonística de las fosfolipasas también libera ácidos grasos. La fosfolipasa A_2 es particularmente importante ya que libera la mayoría de los ácidos grasos que se encuentran en posición sn-2 en los fosfolípidos. Por último, los ácidos grasos pueden entrar también libremente en las células desde el plasma. Esto constituye una fuente importante de estos ácidos [6].

Otro grupo de mediadores, los eicosanoides, son generados a partir de ácidos grasos liberados de los fosfolípidos de membrana. La capacidad para producir estos mediadores se encuentra fuertemente influenciada por la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana [207].

Los ácidos grasos de cadena larga más importantes que se incorporan a las membranas celulares humanas son el EPA y el DHA (ω -3), el ARA (ω -6) y el ácido oleico (ω -9). El ácido graso precursor para la síntesis de eicosanoides es liberado de los fosfolípidos de la membrana celular, normalmente por acción de la fosfolipasa A_2 activada en respuesta a un estímulo celular [160, 208]. Así pues, la vía de los eicosanoides en los mamíferos comienza con la liberación mediada por fosfolipasas de PUFAS de los fosfolípidos de membrana. Es seguida de reacciones mediadas por ciclooxigenasas y lipooxigenasas que acaban dando lugar a dos grandes clases de metabolitos: los prostanoides (prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina) y las lipoxinas y leukotrienos. Todos estos metabolitos se conocen globalmente como eicosanoides, los cuales son mediadores derivados de lípidos de vida media muy corta. El ácido araquidónico es el precursor eicosanoide más importante. Produce diferentes 1y 2-prostanoides y 4-leukotrienos [160]. La administración de ALA consigue bajar los niveles tisulares de ácido araquidónico y de los eicosanoides derivados de él, pero, a diferencia de otros PUFAS, no es un sustrato para la biosíntesis de leukotrienos. El ácido oleico, en cambio, aunque no es un sustrato para la formación de prostaglandinas, puede formar leukotrienos. El DHA es un potente inhibidor de la ciclooxigenasa pero no de la lipooxigenasa *in vitro*. Tanto EPA como DHA son también importantes sustratos para la formación de eicosanoides [6]. Los ácidos grasos ω -3 se convierten en 3-prostanoides y 5-leukotrienos[209]. Los eicosanoides derivados de ácidos grasos omega-3 se oponen generalmente a aquellos derivados de ácidos grasos omega-6. Tanto el EPA como el AA son convertidos a prostaglandinas (PGs) y a leukotrienos (LTs) por la enzima Ciclooxigenasa (COX) y las lipooxigenasas, respectivamente. Los PUFA ω -3 son capaces de inhibir la activación de la expresión genética de citocinas

mediadas por COX y 5-lipooxigenasa (5-LOX) [209]. En la Figura 1.6 se muestran las diferentes vías de producción de eicosanoides que parten del ácido araquidónico y del EPA.

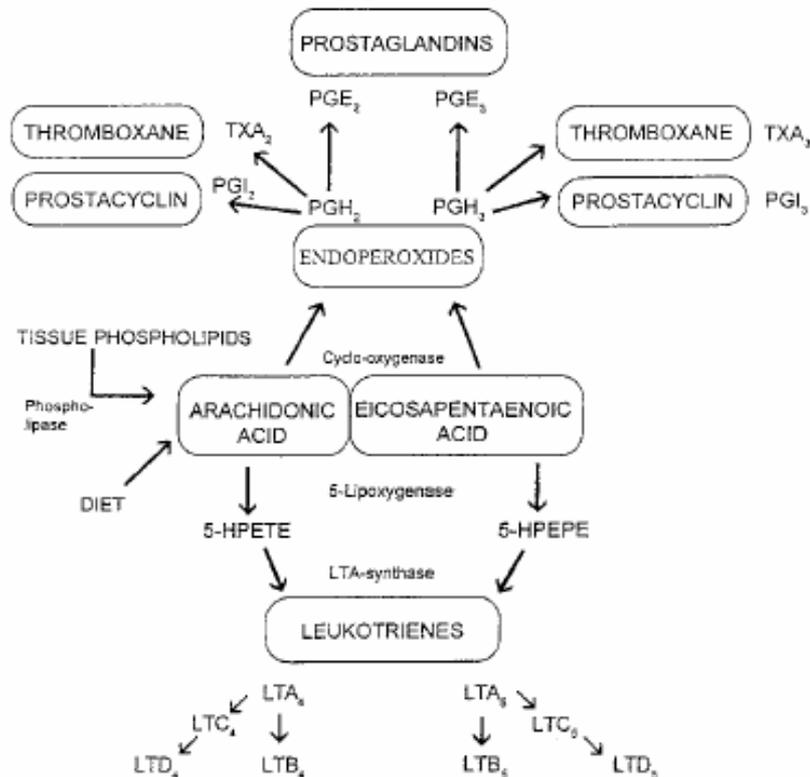


Figura 1.6. Descripción simplificada de las vías de producción de eicosanoides y prostaglandinas a partir de ácido araquidónico y EPA [6].

La COX es un enzima clave en la formación de prostaglandinas. También es conocido como prostaglandina endoperóxido sintasa (pghs) o prostaglandina g/h sintasa. Se trata de una ciclooxigenasa. Se han identificado dos formas de COX: COX-1 y COX-2. La enzima COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y células controlando la síntesis de aquellas prostaglandinas principalmente involucradas en la regulación de la función homeostática en el cuerpo (importante para la integridad gastrointestinal y la homeostasis vascular) [207, 209]. Permanece constante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por el contrario, la COX-2 no está expresada en la mayoría de las células pero es altamente inducible en ciertas células en respuesta a estímulos inflamatorios produciendo así la liberación de prostaglandinas. Las PGs formadas por la COX-2 intervienen sobretodo en el control del dolor y la inflamación. También esta enzima es inducida por una gran variedad de factores tales como promotores de tumores, citocinas, factores de crecimiento e hipoxia y se encuentra sobreexpresada en la artritis reumatoide y los cánceres colorrectales y de mama [207, 209].

Introducción

Los ácidos poliinsaturados ω -3 provenientes de la dieta influyen en la producción de los eicosanoides de diferentes formas:

- ✓ Por competición entre los ω -6 y los ω -3 por la regulación de desaturasas y oxigenasas que posibilitan su síntesis. Tanto EPA como DHA son potentes inhibidores competitivos de las lipooxigenasas y las ciclooxigenasas. Esto explica la potencia de los aceites de pescado a la hora de inhibir la producción de eicosanoides ω -6 al mismo tiempo que se incrementa la producción de metabolitos ω -3 [149].
- ✓ Por competición de ambas clases de PUFAS por su introducción en los lípidos de membrana donde podrán actuar como componentes estructurales y como fuente de segundos mensajeros. Un consumo aumentado de PUFAS ω -3 de cadena larga hace aumentar el nivel de estos en los fosfolípidos de membrana y descender los niveles de AA. En consecuencia, las COX y las lipoxigenasas no tienen tanto AA como sustrato disponible para la síntesis de eicosanoides inflamatorios.
- ✓ Por regulación de las fosfolipasas A₂ y C. Como los sustratos ω -3 compiten por las mismas enzimas que el AA también compiten por sus fosfolipasas.

Como el ácido araquidónico es el PUFA más abundante en el hombre, los eicosanoides derivados de estos ácidos normalmente predominan en los tejidos humanos [160]. Se sabe que los eicosanoides ω -3 suelen tener menos (a menudo entre 10 y 100 veces menos) potencia biológica para inducir respuestas celulares que aquellos derivados de ácido araquidónico. Suelen ser agonistas débiles o, lo cual es más frecuente, fuertes antagonistas de los potentes metabolitos ω -6, y sus niveles relativos e interacciones con estos compuestos determinan la función homeostática [6]. Los eicosanoides derivados de AA generalmente tienen efectos proinflamatorios. En cambio los eicosanoides provenientes de PUFAS omega-3 tienen efectos antiinflamatorios.

Gracias a los trabajos sobre la baja incidencia de enfermedades coronarias entre los esquimales de Groenlandia [210] se ha podido demostrar que las disfunciones en los eicosanoides pueden llevar a enfermedades y desórdenes que incluyen problemas cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales, de desarrollo ocular y cerebral así como carcinogénesis [211-215]. En muchos casos se han atribuido estos problemas a un desequilibrio en la ingestión de PUFAS, a menudo identificada como una deficiencia en ácidos grasos ω -3, que acaba resultando en una excesiva producción de eicosanoides ω -6 y/o una síntesis insuficiente de metabolitos ω -3. Además, la edad, el estrés y las enfermedades tienen efectos deletéreos sobre la biosíntesis de ω -3 y pueden exacerbar las deficiencias nutricionales. Estos problemas pueden llegar a distorsionar las funciones celulares y la incapacidad para restaurar la homeostasis puede llevar a un estado de enfermedad si no existen suficientes moduladores ω -3 presentes en el organismo.

1.4.3.3 Efectos del DHA sobre el genoma

Existen numerosos ejemplos de estudios en los que se demuestran regulaciones del genoma realizadas por el DHA. Algunos miembros de la superfamilia esteroide/tiroide de receptores nucleares son regulados por ácidos grasos o sus metabolitos. Estos incluyen la familia de los PPAR α , β , γ , de los LXR, de RXR α y de HNF-4 α [28].

Los PUFAs ejercen sus efectos en el metabolismo lipídico y la termogénesis regulando la proteína-3 mitocondrial e induciendo la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos al mismo tiempo que inhiben la expresión de genes que codifican para la síntesis de lípidos [21].

En cuanto al sistema inmune, los PUFAs son ligandos naturales de los PPARs, los cuales se encuentran expresados en células inflamatorias. Los PPARs actúan a través de la heterodimerización con RXR como factores de transcripción y activan la subsiguiente regulación de la expresión génica [207, 208, 216, 217].

Otros ejemplos de regulación génica en el sistema inmune es el descenso en la expresión de la Molécula de adhesión a vasos sanguíneos 1 (VCAM-1) en la superficie de células endoteliales causada por DHA. Se ejerce a un nivel de expresión del gen VCAM y de forma independiente de la vía de los eicosanoides. El DHA y el EPA en cultivos osteoartroíticos de cartílago son capaces de hacer descender el incremento mediado por citocinas de genes tales como COX-2, interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina 1 β (IL-1 β), Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), 5-LOX al mismo tiempo que no afectan a la expresión de COX-1, 12-LOX y 15-LOX la cual no está mediada por citocinas [131].

También se ha demostrado que los PUFAs ω -3 son capaces de inhibir la expresión del gen Factor Nuclear κ Beta (NF κ B), el cual es un factor de transcripción involucrado en la inducción de numerosos genes inflamatorios tales como la COX-2, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), VCAM-1, E-selectina, TNF- α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico sintasa, proteínas de fase aguda y Metaloproteinasas (MMP) en respuesta a estímulos inflamatorios [207, 208, 216, 217].

CAPÍTULO II: RECEPTORES NUCLEARES DE HORMONAS: PPAR y RXR

Los receptores nucleares son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de genes en respuesta a pequeños compuestos lipofílicos, ideales por su habilidad para difundir a través de la membrana. Su ubicación intracelular permite la unión directa al ADN, aunque también pueden regular la transcripción de un gen impidiendo la unión a sus factores de transcripción. Dentro de la familia de los receptores nucleares se encuentran incluidos los receptores de PPAR, los cuales juegan un papel clave en el catabolismo y almacenamiento de las grasas de la dieta. Los estudios filogenéticos muestran que los PPARs forman una subfamilia de la superfamilia de receptores nucleares, junto con los receptores para la hormona tiroidea, ácido retinoico, vitamina D, ecdysone, y los receptores huérfanos Rev-Erb A α y E75, los dos últimos parientes muy cercanos de los PPARs [218, 219]. Los genes ancestrales de esta subfamilia aparecieron hace más de 500 millones de años [219, 220].

2.1 RECEPTORES PPARs

Se han identificado hasta la fecha tres tipos de PPAR: PPAR α , PPAR γ y PPAR δ (β). De los tres, el más estudiado durante los últimos años ha sido el PPAR γ , el cual a su vez se subdivide en dos subtipos: PPAR γ 1 y PPAR γ 2. Los tres tipos de PPARs se unen a ácidos grasos y a genes implicados en el transporte y metabolismo de estos ligandos en las células. Cada uno de estos tres subtipos de PPAR exhibe un patrón de expresión único en los diferentes tejidos.

Los tres isotipos de PPAR han sido identificados en vertebrados, incluyendo *Xenopus* (donde originalmente fue identificada la proteína), ratón, rata, hamster y humano [219, 221-232]. El gen del PPAR γ en humanos y ratones se extiende sobre más de 100 Kb de ADN genómico y da lugar a tres mRNAs, PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3. De los tres mRNAs finalmente se generan únicamente dos isoformas proteicas. En concreto, el gen PPAR γ humano se encuentra ubicado en el cromosoma 3, en la posición 3p25 [219, 231].

Los receptores nucleares poseen tres dominios funcionales que consisten en N-Terminal, Dominio de unión a ADN (DBD) y dominio de unión a ligando (LBD). Los dominios DBD son los más conservados de la familia de los receptores nucleares. Este dominio está formado por dos dedos de zinc plegados en una estructura globular que permite el reconocimiento de una diana de ADN compuesta por 6 nucleótidos. Normalmente, los receptores de hormonas nucleares se unen como dímeros a dos copias de este motivo. Los miembros de la subfamilia TR/RAR a la cual pertenecen los PPARs reconocen preferentemente el hexanucleótido AGGTCA y también se caracterizan por su habilidad para formar heterodímeros con RXR. Los PPAR no se unen como homodímeros ni como monómeros sino dependiendo siempre de RXR para su heterodimerización. La secuencia que reconocen, elementos de respuesta a PPAR (PPRE), esta

Introducción

compuesta por dos motivos AGGTCA separados por un único nucleótido, también conocida como DR1 [219, 233].

Los dominios LBD se han conservado mucho menos entre los diferentes receptores nucleares. Los análisis estructurales de este dominio revelan un pliegue tridimensional común, el cual consiste en un *sandwich helical- α* formado por doce hélices organizadas en tres capas con un bolsillo hidrofóbico central. La cavidad de unión a ligando es particularmente grande, de unos 1300 Å³, de los cuales el ligando ocupa únicamente un 30-40%. Así, esta cavidad es más grande y más accesible que en otros LBDs de la misma familia [234]. La parte hidrófila de los ligandos puede desarrollar con la gran cavidad toda una serie de interacciones no específicas relativamente libres lo cual explica la alta capacidad para interactuar con diferentes ligandos que poseen los PPAR. Esta sería la principal razón que hace que los PPAR hayan evolucionado como un receptor nuclear capaz de unirse a un número múltiple de ligandos naturales con baja afinidad relativa por ellos [219, 235].

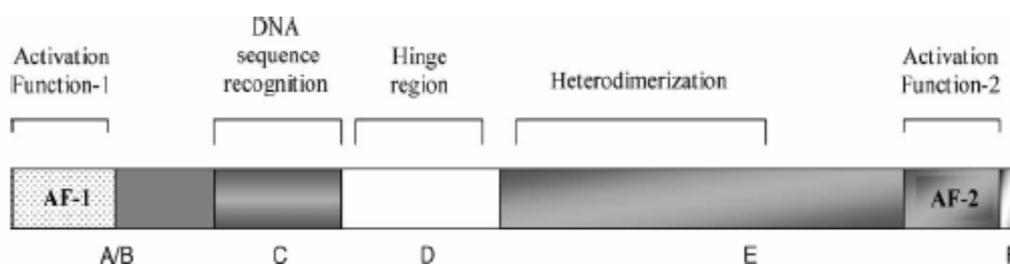


Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura de los PPARs. De manera similar a otros receptores de hormonas nucleares, los PPARs contienen cinco regiones distintas. Las dos más conservadas son C y E, que consisten en un dominio de unión a ADN altamente conservado (DBD) y un dominio de unión a ligando moderadamente conservado (LBD), respectivamente. El dominio amino terminal A/B contiene el dominio AF1 de activación independiente de ligando y el dominio AF2 dependiente de ligando se localiza en la región E y está implicado en procesos de heterodimerización con RXR. Para la región F no se ha encontrado ninguna función hasta ahora. El dominio D consiste en una región bisagra. Extraído de [9].

2.2 LOS LIGANDOS DE PPARs

Los PPARs han pasado de ser considerados receptores huérfanos a ser receptores capaces de interactuar específicamente con más de un ligando, incluyendo algunos compuestos muy importantes como los ácidos grasos. Muchos estudios han intentado identificar las sustancias capaces de unirse a PPAR con diferente fortuna. Los métodos utilizados han sido muy diversos, desde radioligandos, actividades enzimáticas asociadas a la unión al receptor, activación de genes reporter....

Uno de los métodos más novedosos se basa en la hipótesis de que la unión del ligando al PPAR induciría la interacción del receptor con activadores transcripcionales. Este método se denominó estudio de

Ligando de Receptor Coactivador Dependiente (CARLA). Mide la habilidad de un compuesto para inducir la interacción de PPAR-SRC1 (SRC1 Coactivador de Receptor de Esteroides 1) [10]. Gracias a estos estudios se han descubierto las siguientes características sobre los PPARs: la primera, es que, a diferencia de otros receptores nucleares, los PPAR pueden interaccionar con varios tipos diferentes de ligando, y muchos de estos ligandos son también activadores de PPAR [236]. La segunda característica es que, también, a diferencia de otros receptores de hormonas clásicas, los ligandos de PPAR se unen con bajas afinidades a sus receptores. Tercero y último, existe cierto solapamiento en el reconocimiento por parte de los diferentes isotipos de PPAR de algunos ligandos uniéndose estos a más de un isotipo con diferentes afinidades [219].

La identificación de los ácidos grasos insaturados como ligandos de PPAR ha proporcionado una firme evidencia de que al menos parte de la actividad transcripcional de los ácidos grasos se realiza gracias a una interacción directa entre los receptores nucleares de PPAR y estas moléculas. Estos ácidos grasos se unen a los tres PPARs, de los cuales el PPAR α es el que presenta mayores afinidades, a concentraciones que se corresponden con los niveles circulantes en sangre [237]. En cambio, en comparación con los ácidos grasos insaturados, los saturados son ligandos bastante pobres de los PPAR en general [10, 238, 239]. El hecho de que algunos ácidos grasos pueden actuar como hormonas que controlan los factores de transcripción ha mudado la percepción que se tenía de ellos en el sentido de que los ácidos grasos no son simplemente moléculas proveedoras de energía sino también reguladores metabólicos [219].

Los eicosanoides son una clase de ácidos grasos principalmente derivados del ácido araquidónico, ya mediante la vía de la lipooxigenasa llevando a la formación de leukotrienos (LTs) y ácidos hidroxieicosatrenoicos (HETES) o mediante la vía de las ciclooxigenasas produciendo las prostaglandinas (PGs). Algunos de estos eicosanoides son activadores de diferentes PPARs y algunos incluso son ligandos de los mismos. Para los eicosanoides las afinidades de unión a PPAR α están por debajo del rango micromolar. Para los ácidos grasos, estas afinidades se encuentran en el rango micromolar [219].

Las thiazolidionas (TZDs), las cuales incluyen troglitazona, pioglitazona y Rosiglitazona, son una clase de fármacos antidiabéticos que estructuralmente derivan del ácido cofibrico y que se unen selectivamente a PPAR γ [219, 240, 241].

2.3 ACTIVACIÓN DE LOS PPARs

La forma más frecuente de activación sería por unión al ligando. Los heterodímeros de PPAR y Retinoid X Receptor (RXR) reconocen las secuencias de ADN que contienen repeticiones directas de la secuencia hexanucleótida AGGTCA presente en las regiones promotoras de los genes diana. Tras la unión de agonistas de PPAR o RXR, se producen incrementos en los niveles de expresión de mRNAs de dichos

genes. Los dos miembros del complejo PPAR:RXR pueden desencadenar una respuesta en presencia de sus respectivos ligandos. Es más, el cotratamiento de las células con ligandos específicos para cada uno de los miembros del heterodímero se traduce en un efecto aditivo. Entre los diferentes genes PPAR se observa que los dominios DBDs se encuentran altamente conservados mientras que los LBD presentan mayor variabilidad entre los diferentes subtipos [219].

2.3.1 Formas alternativas de activación de PPAR

Existen también formas alternativas de activación del PPAR. Tanto PPAR α como PPAR γ son fosfoproteínas. Algunos receptores nucleares, entre los que se cuentan los PPARs, son regulados por fosforilación además de por activación dependiente de ligando. En el PPAR γ , el extremo N-Terminal del receptor, en concreto la serina 112, juega un papel en la conformación del receptor sin ligando regulando así la afinidad del PPAR γ por sus ligandos [242].

Los heterodímeros PPAR:RXR también se pueden activar mediante agonistas de RXR. Esta es una vía alternativa de activación mediante la unión a ligando de RXR. En el heterodímero PPAR:RXR ya sea un ligando de PPAR, uno de RXR o ambos, se consigue el efecto de activar transcripcionalmente el complejo unido a ADN. Estudios de cotransfección han mostrado que ambos miembros del complejo PPAR:RXR pueden mediar respuesta en presencia de sus respectivos ligandos. Es más, el cotratamiento de las células con ambos ligandos produce un efecto aditivo [219]. Como ejemplos basta observar que el tratamiento con agonistas RXR-selectivos producen actividades antidiabéticas comparables a las obtenidas con TZD que específicamente se unen a PPAR γ [243].

Sin embargo, cuando se emplea únicamente un ligando de RXR, no se puede asegurar que la vía que está produciendo el efecto sea mediada por PPAR γ :RXR ya que además se pueden producir dos procesos más:

- RXR puede unirse también a otros factores de transcripción, tales como NGFIB:RXR, LXR:RXR o PPAR β :RXR [244-246].
- En ausencia de ligando RXR forma sobretodo tetrámeros inactivos de RXR y la adición del ligando específico de RXR favorece la formación de homodímeros de RXR en lugar de heterodímeros [247]. Es decir, la formación de heterodímeros y su subsiguiente señalización, necesita también la presencia de ligandos para el monómero acompañante de RXR en la formación del heterodímero [248]. Estos homodímeros de RXR, cuya formación es favorecida por 9cRA, se unen y transactivan a través de elementos de respuesta DR1 (que también utiliza PPAR) [249, 250]. Por ello, no se conoce exactamente qué cantidad de la respuesta de 9CRA es dependiente de PPAR y qué cantidad es dependiente de homodímero RXR.

2.4 INTERACCIÓN DE LOS PPARs CON LOS COACTIVADORES

Los cambios conformacionales activados en el PPAR por la unión del ligando o por otros procesos de activación, tales como la fosforilación, generan cambios conformacionales con nuevas superficies de interacción proteína-proteína que permiten establecer contactos específicos con coactivadores.

En la Figura 2.2 se muestran las interacciones que se producen entre los PPAR y sus coactivadores a la hora de determinar su funcionalidad.

Estas moléculas ayudarían a modular la respuesta genética de los PPAR ejerciendo sobre ellos efectos de activación o de represión. El receptor nuclear correpressor (N-CoR) y mediador silenciador para la hormona retinoide y tiroidea (SMRT) son proteínas correpressoras que interaccionan con los receptores nucleares no unidos a ligando, enviando una señal represora al promotor donde el complejo debería unirse. Pues bien, PPAR interacciona fuertemente con N-CoR y SMRT en solución *in vitro*, pero no lo hace cuando se encuentra unido a PPRE como complejo PPAR:RXR [251].

coactivador descrito, SRC1[252], puede interaccionar con el dominio LBD de los PPAR en solución. Esta interacción es dependiente de ligando. En presencia del ligando Rosiglitazona, una única molécula de SRC-1 interacciona con dos

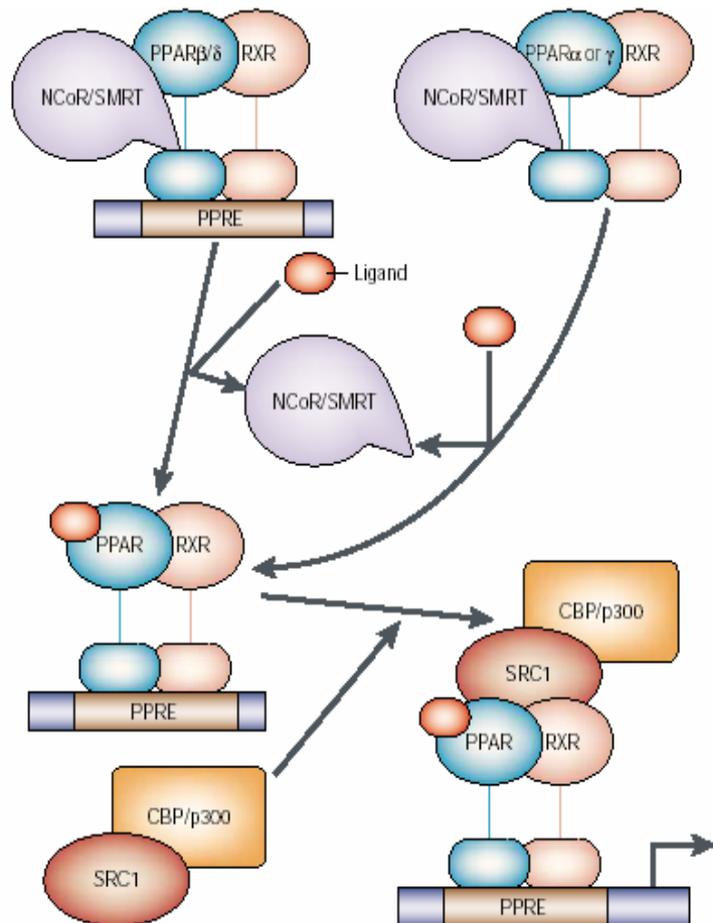


Figura 2.2. Interacción de PPAR con sus correpresores y coactivadores. La activación del receptor generalmente ocurre tras la unión del agonista al LBD. Entonces los PPARs se liberan de los complejos correpresores (NCoR/SMRT), los cuales reprimían la transcripción génica. A diferencia de la isoforma PPAR β/δ , PPAR α y PPAR γ no se pueden unir a ADN cuando están unidos al complejo correpressor. Tras disociarse del complejo correpressor, PPAR α y PPAR γ se unen al ADN a través de un elemento de respuesta a PPAR (PPRE). Los PPARs se pueden entonces unir a ciertos complejos coactivadores como el receptor coactivador de esteroides (SRC1) y CBP/p300. Estos complejos coactivadores, a través de su actividad histona-aciltransferasa, reorganizan el empaquetamiento de la cromatina para permitir el acceso de la maquinaria transcripcional a la región promotora. Extraído de [11].

Introducción

heterodímeros PPAR:RXR por PPAR formando un complejo ternario estable: dos heterodímeros PPAR:RXR y una molécula SRC1 [253].

También existen estudios que indican que el PPAR ligado puede interactuar preferentemente con CBP o la proteína P300. Estas proteínas son esenciales para la función de transactivación de muchos factores de transcripción. Se están clonando más proteínas capaces de interactuar con los PPAR [219].

Además de los cofactores, los PPARs interaccionan funcionalmente con al menos otro factor de transcripción. Este sería SP1, el cual actuaría sinérgicamente con PPAR para la regulación del promotor de la acyl-CoA oxidasa [254].

Todos estos hechos subrayan que la acción del PPAR en un momento determinado en la célula dependerá tanto de la disponibilidad de una serie de factores de transcripción y cofactores como del estímulo que puede afectar a los niveles o la actividad de estos componentes transcripcionales [219]. Diferentes ligandos de PPAR γ permitirían reclutar diferentes coactivadores, lo cual proporcionaría especificidad a la actividad biológica del PPAR γ [255].

2.5 EXPRESIÓN Y FUNCIONES PRINCIPALES DEL PPAR γ

En humanos es en el tejido adiposo donde se encuentran los niveles más altos de PPAR γ . Pero este receptor también se expresa en muchos otros tejidos y tipos celulares de todo el cuerpo que incluyen monocitos, macrófagos, hígado, músculo esquelético, tejido mamario, próstata, colon y pneumocitos alveolares de tipo 2 [255]. Además, este receptor es muy importante en el tejido linfoide. PPAR γ junto con PPAR α son expresados en macrófagos y células dendríticas y también en linfocitos B y T [11]. Las DCs expresan predominantemente la isoforma PPAR γ [256]. El gen del PPAR γ da lugar a dos isoformas de mRNA diferentes por splicing alternativo: PPAR γ 1 y PPAR γ 2. La mayor parte de los tejidos expresan PPAR γ 1 mientras que PPAR γ 2 es específica de los adipocitos [255].

La mayor parte de los genes que son activados transcripcionalmente por PPAR γ pertenecen a la vía del metabolismo y transporte de los lípidos con casos como la lipoproteína lipasa, adiposina, proteína de unión a ácidos grasos, Acil-CoA sintasa, y proteína de transporte de ácidos grasos. PPAR γ media la diferenciación de preadipocitos a adipocitos [257-259]. Los ligandos de PPAR γ también pueden reprimir la transcripción. Por ejemplo, en monocitos y macrófagos, pueden disminuir la expresión de citocinas tales como IL-4 y productos inflamatorios que incluyen TNF, IL-1, y la sintetasa de óxido nítrico [260-264]. Los factores de transcripción proinflamatorios tales como AP1, Stat y NF- κ B también pueden ser inhibidos por ligandos de PPAR γ [265].

2.5.1 Regulador de la adipogénesis

EL PPAR γ es el primer y, hasta la fecha principal, regulador de la adipogénesis [266, 267]. Se encuentra altamente expresado en el tejido adiposo [268, 269] y la exposición de tejidos primarios de preadipocitos humanos a activadores de PPAR γ induce su diferenciación [270, 271]. El tratamiento con TZD produce ganancia de peso en humanos. Esto se cree que es debido a una mejora de la sensibilidad a la insulina promoviendo la adipogénesis y al almacenamiento postprandial de ácidos grasos y triglicéridos. Ambos efectos contribuirían a aumentar la masa adiposa. De las dos isoformas de PPAR γ , la isoforma 2 es la candidata a ser la reguladora de la adipogénesis según se desprende de estudios de *Knock out* y también del hecho de que individuos con obesidad mórbida tengan niveles de PPAR γ 2 incrementados y PPAR γ 1 disminuidos. Por otro lado, la lipodistrofia se ha asociado con la existencia de mutaciones que producen pérdida de función en PPAR γ . Mientras que en el caso de mutaciones con resultado de ganancia de función los individuos afectados padecían obesidad mórbida [272].

2.5.2 Sensibilidad a la insulina

Dadas las asociaciones existentes entre la obesidad y la lipodistrofia con la resistencia a la insulina, no debería haber sido sorprendente que el PPAR γ , que está tan estrechamente relacionado con la determinación de la masa adiposa, también estuviese implicado en la regulación de la sensibilidad a la insulina. Las troglitazonas, originalmente sintetizadas como derivados hipolipidémicos del clofibrato, mostraron sorprendentemente la capacidad de disminuir la glucosa circulante en sangre vía sensibilización a la insulina. Estos compuestos son potentes activadores de PPAR γ . A parte de estos estudios también existen otros que apuntan en la misma dirección. La pérdida de función de PPAR γ por mutación produce una resistencia severa a la insulina [272].

2.5.3 Aterosclerosis

Dejando a un lado el efecto sensibilizador sobre la insulina que tienen los activadores de PPAR γ y que ya por sí solo contribuye a atenuar esta enfermedad, los activadores de PPAR γ tienen también otros efectos que inhiben la aterosclerosis: mejora de la función endotelial, atenuación del crecimiento vascular y su migración, inhibición de las principales vías transcripcionales que median la inflamación vascular e incremento del transporte reverso de colesterol [273].

La actividad de los ligandos de PPAR γ modula el *cross-talk* que se produce entre el músculo esquelético y el tejido adiposo y, por consiguiente, entre el tejido adiposo y la vasculatura. La administración de ligandos de PPAR γ a humanos y animales hace descender los niveles circulantes de ácidos grasos, suprime la secreción de TNF α en adipocitos y macrófagos e incrementa la producción en tejido adiposo de adiponectina. También se producen descensos en los niveles de leptina [273]. Por consiguiente, estos

Introducción

ligandos tienden a disminuir la producción de factores en tejido adiposo que promueven la resistencia a la insulina y la inflamación vascular e incrementan la producción de factores que inhiben estos cambios patológicos [272, 273].

2.5.4 Cáncer

Los ligandos de PPAR γ poseen efectos antiproliferativos, prodiferenciadores y proapoptóticos en células cancerígenas. En combinación con retinoides estos efectos se incrementan. Aunque es difícil que esta clase de ligandos llegue a desempeñar un gran papel en la lucha contra el cáncer, sus bajas toxicidades les hacen potenciales candidatos para tratamientos anticancerígenos como adyuvantes junto a otros anticancerígenos más potentes. Algunos de los cánceres cuya progresión se ve disminuida por los ligandos de PPAR γ son: liposarcoma, cáncer de colon, tumor mamario, cáncer de próstata, leucemia mieloide, neuroblastoma, glioblastoma, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer cervical, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, coriocarcinoma...

En algunos casos los efectos anticancerígenos que provocan estos ligandos pueden no ser mediados por PPAR γ sino por algún mecanismo desconocido hasta la fecha [255].

2.6 LOS RETINOIDES Y SUS RECEPTORES NUCLEARES

Los retinoides son capaces de regular un amplio espectro de sistemas biológicos. Se trata de una serie de pequeños lípidos capaces de contener y comunicar una extensa y dispar cantidad de información a las células. Los retinoides, incluyendo la vitamina A y sus análogos, regulan la morfogénesis, desarrollo, crecimiento y diferenciación de las células [274]. Regulando la expresión génica, los retinoides hormonales controlan los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis desde el momento de la concepción de los vertebrados hasta su muerte. La reproducción (espermatogénesis, concepción, formación placentaria), embriogénesis, la formación de los huesos, la diferenciación epitelial y el sistema inmune están programados de algún modo por los retinoides [274]. Para conseguir todos estos efectos los retinoides utilizan diversos mecanismos: interacción con hormonas, multiplicidad a la hora de unirse a muchas proteínas de unión, enzimas biosintéticas y catabólicas, unión a receptores (actuando solos o combinados con otros receptores de hormonas lipofílicas) y elementos de respuesta a receptores. Toda esta sinfonía es conducida en todos los vertebrados siguiendo deliberados patrones espaciales y temporales.

La principal fuente de retinoides es la dieta. Es a partir del metabolismo de β -carotenos o a partir de la hidrólisis de esteres retinil procedentes de la dieta como el organismo se provee de la mayor cantidad del principal retinoide natural: el retinol. El retinol no posee ninguna actividad biológica por sí mismo, pero sirve

de sustrato para la biosíntesis de muchos retinoides funcionales [274]. Estos se pueden dividir en dos categorías:

- Los cofactores, tales como 11-cis-retinal, un lípido unido covalentemente a la molécula de opsina para formar rodopsina.
- Los agentes humorales que regulan la expresión génica. En este grupo se incluyen el ácido retinoico (RA); el ácido 9-cis-retinoico (9cRA); 3,4-ddRA o vitamina A₂, de la cual se deriva del 3-4-didehidro-retinol, y posiblemente 14-hidroxi-retro-retinol.

Tanto RA como 9cRA se unen específicamente a los factores de transcripción activados por ligando, el receptor de ácido retinoico (RAR) y el RXR, respectivamente, regulando de esta manera muchos genes involucrados en procesos dependientes de retinoides. Tanto RAR como RXR se encuentran ampliamente extendidos por todos los tejidos, entre las células de cada tejido y se pueden encontrar en toda las fases del ciclo de la vida de un vertebrado. Por esta razón, RA y 9cRA se encuentran ampliamente distribuidos y son importantes metabolitos del retinol [274]. *In vivo* 9cRA se convierte rápidamente, pero reversiblemente en 9,13cRA. El 9,13cRA es un compuesto con mucha menor afinidad por RXR que 9cRA. Esto podría ser un mecanismo para eliminar 9cRA o tal vez, una forma de que el 9cRA circule por el organismo en una conformación mucho menos tóxica para su posterior uso [275].

Tanto RA como 9cRA activan los factores de transcripción dependientes de ligando RAR y RXR [276-278]. Ambas subfamilias de receptores pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales Steroid/thyroid/vitamin D/ retinoid. En esta superfamilia, como ya se ha comentado con anterioridad, se encuentran incluidos los PPARs. La estructura común de la superfamilia incluye una región A/B N-terminal, importante para la activación de la transcripción, una región C involucrada en la unión a ADN y la formación de dímeros, una región D que contiene una señal de translocación nuclear y una región E C terminal o área de unión al ligando, que se une a la hormona y también actúa como zona de transactivación o represión, dimerización y, para aquellos receptores que no estén todavía en el núcleo, de localización nuclear.

Cada subfamilia de receptores retinoides esta formada a su vez por tres receptores diferentes α , β , y γ , codificados por genes separados en un total de seis cromosomas diferentes. La zona de unión al ADN se encuentra muy conservada entre los tres integrantes de cada subfamilia, pero mucho menos entre ambas subfamilias. Lo mismo ocurre con la zona de unión al ligando. RAR α se expresa ubicuamente en los tejidos en adultos y tiene una amplia distribución en el embrión. La expresión de RAR β se encuentra más limitada en adultos, expresándose en riñón, glándula adrenal, médula espinal, músculo y próstata, con bajos

Introducción

niveles de expresión en otros tejidos. Su distribución durante el desarrollo sigue patrones espaciales y temporales de expresión compatibles con la ontogénesis del sistema inmune. RXR α tiene una diseminación limitada en el adulto y en el embrión (hígado, piel, riñón y pulmón) mientras que RXR β , como RAR α , es ubicuo tanto en adulto como en embrión. RXR es más análogo a RAR β en su distribución tisular. Prácticamente todos los tejidos expresan al menos un RAR y un RXR [274, 279].

Los RARs generalmente reconocen tanto al RA como al 9cRA con afinidades similares, $k_{dS} \sim 1$ nM, y discriminan contra 13cRA; los RXRs reconocen el 9cRA con una $k_{dS} \sim 15$ nM y discriminan contra RA, 13cRA y 9,13cRA. Las concentraciones de 9cRA *in vivo* son más bajas que las de RA a causa de que, como ya se ha mencionado, el 9cRA se convierte rápidamente, aunque no irreversiblemente, en su versión inactiva 9,13cRA [275]. Estas diferencias de afinidades y concentraciones influyen en la función del RAR y del RXR, porque la función de RAR como heterodímero con RXR y la formación de dicho heterodímero depende solo de RA, la unión de ligando a RXR no parece ser esencial para la formación del heterodímero RAR:RXR. Por el contrario, la función homodimérica del RXR requiere del 9cRA para formarse. En condiciones normales de menores concentraciones de 9cRA que RA, los heterodímeros RAR:RXR serán los funcionales. A altas concentraciones de 9cRA se activaría la homodimerización de RXR pero esto también tendría un impacto sobre la función de los heterodímeros RAR:RXR a causa de cambios en el estatus de los ligandos [274]. Además de la formación de heterodímeros con RAR, RXR también heterodimeriza con VDR, TR, COUP-TF y PPAR, extendiendo el rango de señales retinoidales y el impacto de las concentraciones moduladoras de 9cRA [274].

Tanto los heterodímeros de RXR-RAR como los homodímeros RXR reconocen un amplio abanico de elementos de respuesta a hormonas (HREs) las más comunes de las cuales consisten en repeticiones directas de las secuencias PuGGTCA espaciadas por 1,2 o 5 bp (elementos DR1, DR2 y DR5 respectivamente), siendo DR5 la secuencia activadora más potente y común mientras que DR1 suprime la transcripción. Los RXRs más comunes son elementos DR1 [274, 276, 277].

Al contrario de lo que ocurre con PPAR:RXR, RXR solo puede trabajar subordinadamente cuando heterodimeriza con RAR. Es decir, el ligando RXR solo es transcripcionalmente activo cuando RAR también se ha unido a su propio ligando [280-282]. Ocurre una situación similar para los heterodímeros que se forman entre RXR y TR o VDR. Esto impide que los retinoides activen las vías TR y VDR, lo opuesto de lo que ocurre con el PPAR [219].

CAPÍTULO III: EL SISTEMA INMUNE

La célula dendrítica (DC) pertenece al grupo de células presentadoras de antígeno (APC). Se diferencia del resto de APCs en que posee la capacidad de inducir respuestas inmunes primarias. Las DCs capturan y transfieren la información del mundo exterior a las células que componen el sistema inmune adaptativo. No solamente son críticas para la inducción de respuestas inmunes primarias, sino que también podrían ser importantes para la adopción de la tolerancia inmunológica, así como para la regulación de las respuestas inmunes mediadas por células T.

3.1 FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune actúa protegiendo al huésped de las infecciones de agentes presentes en el ambiente (bacterias, hongos, virus, parásitos) y también de otros agentes nocivos [208].

3.1.1 Componentes celulares del sistema inmune

Clásicamente, el sistema inmune se ha subdividido en dos divisiones funcionales: la inmunidad innata (o natural) y la inmunidad adquirida (también llamada adaptativa). Las células que componen el sistema inmune se denominan genéricamente leucocitos o células blancas. Los leucocitos se subdividen en dos categorías principales: los linfocitos y los fagocitos. Estos últimos incluyen granulocitos (neutrófilos, basófilos o eosinófilos), monocitos, macrófagos y DCs. Los linfocitos se subdividen a su vez en tres ramas: los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK (natural killer). Los linfocitos T también se encuentran subdivididos en dos subtipos, las células T CD4 o Th (T helper) y las células T CD8 o células T citotóxicas. Todas las células del sistema inmune se originan en la médula ósea. Se encuentran circulando por el torrente sanguíneo, organizadas en órganos linfoides tales como el timo, el bazo y los nódulos linfáticos o dispersas en otras localizaciones por todo el cuerpo [208].

3.1.2 La inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos. Se encuentra presente en su forma preactiva antes de la entrada de patógenos en el organismo. Su objetivo es impedir la entrada de agentes infecciosos y, cuando entran, proceder a su rápida eliminación. El proceso de eliminación puede suceder de las siguientes maneras:

- Por la destrucción directa de los patógenos mediante el sistema del complemento, toxinas químicas (tales como radicales superóxido o peróxido de hidrógeno) liberados por los fagocitos o proteínas tóxicas liberadas por las células NK.

- Por la fagocitación y posterior destrucción de los patógenos, que se ve mejorada al unirse a los patógenos invasores proteínas del huésped tales como anticuerpos o el sistema del complemento [208].

3.1.3 La inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida implica el reconocimiento específico de moléculas (antígenos) de los patógenos invasores, que pueden ser diferenciadas de las del propio huésped. El reconocimiento de los antígenos se produce mediante anticuerpos (producidos por las células B) y mediante los linfocitos T. A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T únicamente son capaces de reconocer antígenos en la superficie celular de las células infectadas o de las APCs. Estos antígenos son presentados en la superficie de las células infectadas en conjunción con unas proteínas denominadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). La combinación de los antígenos y del MHC es lo que reconoce el linfocito T. Hay dos clases de MHC: MHC I y MHC II. MHC I se une a péptidos originarios de proteínas patógenas sintetizadas en el citosol de la célula huésped infectada. Suelen ser de virus o bacterias. Los péptidos unidos al MHC II derivan de patógenos que han sido fagocitados por macrófagos o endocitados por células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B). El complejo péptido-MHC es reconocido por el receptor de célula T (TCR) de los linfocitos T. Los linfocitos T CD8 reconocen MHC I mientras que los linfocitos T CD4 reconocen MHC II. Así, los patógenos intracelulares estimulan a los linfocitos T citotóxicos a destruir las células infectadas, mientras que los patógenos extracelulares estimulan respuestas mediadas por T Helper.

El sistema de inmunidad adquirida incluye un componente de memoria de forma que, si el antígeno vuelve a ser encontrado en el futuro, la respuesta sea más rápida y fuerte que la que hubo inicialmente. El sistema inmune como un todo puede llegar a reconocer docenas de miles de antígenos. Sin embargo, como cada linfocito reconoce un solo tipo de antígeno, el número de linfocitos capaces de reconocer un antígeno concreto en un momento dado es muy bajo. A pesar de todo esto, cuando un linfocito reconoce un antígeno, se activa y comienza a dividirse para aumentar el número de células que son capaces de responder al antígeno. A este proceso se le denomina expansión o proliferación linfocitaria. Los linfocitos B proliferan y maduran hacia células productoras de anticuerpos denominadas células plasmáticas. Los linfocitos T proliferan y son capaces de destruir directamente las células infectadas (Linfocitos T citotóxicos) o controlan la actividad de otras células implicadas en la respuesta (Linfocitos T helper). La respuesta del linfocito B a un antígeno es denominada inmunidad humoral y la respuesta de la célula T se denomina inmunidad mediada por células.

3.1.4 Las citocinas: mensajeros inter e intracelulares

La comunicación dentro del sistema inmune adquirido y también entre el sistema innato y el adquirido se lleva a cabo mediante contacto célula a célula lo cual implica moléculas de adhesión y también producción de mensajeros químicos. De estos últimos, los más importantes son las citocinas, las cuales pueden regular la actividad de la célula que la produce (forma autocrina) o la actividad de otras células (forma paracrina). Cada citocina tiene múltiples actividades en diferentes tipos celulares. Las citocinas actúan uniéndose a receptores específicos de la superficie celular e induciendo cambios en el crecimiento, desarrollo o actividad de la célula.

TNF- α , IL-1 e IL-6, son tres de las citocinas más importantes producidas por monocitos y macrófagos: activan neutrófilos, monocitos y macrófagos e inician respuestas bactericidas y tumoricidas; incrementan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de neutrófilos y células endoteliales; estimulan la proliferación de linfocitos B y T; incrementan la expresión de MHC e inician la producción de otras citocinas; median entre la inmunidad natural y la adquirida y son un importante nexo de unión entre ellas. Las acciones de estas citocinas son antagonizadas por otro grupo de citocinas IL-4, IL-10, Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y por inhibidores de las citocinas tales como IL-1 receptor o receptores solubles de TNF.

3.1.5 Las células T helper: productoras de citocinas

Las células T helper son linfocitos T que se caracterizan por su mediación en las respuestas linfocitarias mediante, sobretodo, la producción de citocinas. Se subdividen funcionalmente de acuerdo al patrón de citocinas que producen. Las células T helper que nunca han encontrado un antígeno anteriormente producen principalmente IL-2 tras entrar en contacto con el antígeno. Estas células pueden diferenciarse a una población denominada TH0 que a su vez diferencia hacia células TH1 o TH2. La diferenciación a un subtipo u otro es regulada por las citocinas IL-12 e interferón gamma (IFN γ), los cuales promueven el desarrollo de respuestas TH1; mientras que IL-4 promueve el desarrollo de respuestas TH2. Tanto las TH1 como las TH2 tienen a su vez un perfil de producción de citocinas propio. Las células TH1 producen IL-2 e IFN γ que activan macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos los cuales son los principales efectores de la inmunidad mediada por células. Las interacciones con bacterias, virus y hongos tienden a producir respuestas TH1. Las células TH2 producen IL-4 que a su vez estimula la producción de IgE por parte linfocitos B, IL-5, factor activador de eosinófilos e IL-10. Esta última, junto con IL-4, suprime la inmunidad mediada por células. Las respuestas TH2 son responsables de la defensa frente a parásitos helmínticos, lo cual se lleva a cabo mediante la activación mediada por anticuerpos IgE de células mastocíticas y basófilas. Un desequilibrio o mala regulación entre las respuestas TH1 y las respuestas TH2 caracterizan a muchas enfermedades humanas [208, 283].

3.1.6 La inflamación

La inflamación es una respuesta inmediata del cuerpo a una infección o una herida. Se caracteriza por enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. Esto ocurre como resultado de un incremento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Esto último es necesario para permitir a grandes moléculas (como complemento, anticuerpo o citocinas) dejar el torrente sanguíneo, cruzar la barrera endotelial e incrementar el movimiento de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos adyacentes. Por ello, la inflamación es una parte más de la respuesta inmune innata normal.

Tanto la respuesta inmune innata como la adquirida interactúan mediante contactos directos célula a célula y mediante las citocinas que se producen a partir de un determinado estímulo. La respuesta innata, incluyendo su componente inflamatorio, reacciona inicialmente frente al estímulo, actuando directamente para eliminarlo mediante las actividades del complemento y de la fagocitosis. Las citocinas producidas por las células involucradas en la respuesta innata, especialmente por los monocitos y los macrófagos regularán esta respuesta y también actuarán sistémicamente en el hígado promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda. En el músculo esquelético y tejido adiposo inducirán la proteólisis y la lipólisis, respectivamente. Se cree que este es el modo en que el cuerpo proporciona “combustible” al sistema inmune para que actúe. En cerebro reducirán el apetito e inducirán fiebre.

Los antígenos además de ser fagocitados para su eliminación, también lo serán para su posterior presentación a otras células del sistema inmune. Este proceso lo realizan las células presentadoras de antígeno (APCs) entre las cuales destacan las células dendríticas. Estas células, una vez cargadas con el antígeno, migrarán a los órganos linfoides donde mediante estímulos célula a célula y secreción de citocinas interactuarán con grandes cantidades de linfocitos T *naïve* activándolos lo que, en consecuencia, provocará una activación de la respuesta inmune adquirida contra ese determinado antígeno. Es ahora cuando habrá una respuesta inmune mediada por células contra el antígeno. Los linfocitos T producirán citocinas que regularán la actividad de las células involucradas en la respuesta innata (monocitos, macrófagos y células NK), promoverán la proliferación de linfocitos B y T, y la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Mediante la actuación integrada de las respuestas innata y adquirida, la fuente del antígeno será eliminada y un componente inmunológico de memoria permanecerá. Las células presentadoras de antígeno en general, pero sobretodo las DCs, son pues el nexo de unión entre ambas respuestas innata y adaptativa.

3.2 LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes que posee el sistema inmune. Estas células son capaces de activarse frente a estímulos provocados por la respuesta inmune innata, producir grandes cantidades de citocinas inflamatorias y activar a los linfocitos T. Es por ello que se afirma que las células dendríticas son un eslabón indispensable entre la inmunidad innata y la adquirida. Las células dendríticas pueden existir en cultivo en dos formas funcional y fenotípicamente diferentes: en forma inmadura y en forma madura.

3.2.1 Células dendríticas inmaduras

Las DCs inmaduras presentan niveles altos de endocitosis y expresan niveles bajos en superficie de MHC de clase I y II, así como de moléculas coestimuladoras. En ellas se sintetiza de forma abundante MHC II, pero gran parte es secuestrado intracelularmente en los compartimentos endocíticos tardíos (lisosomas). La mayoría del MHC II es dirigido directamente a los endosomas y a los lisosomas tras su salida del complejo Trans-Golgi [284]. Una pequeña parte del MHC II es capaz de llegar a los lisosomas a través de la endocitosis de la membrana plasmática, sobretudo en las DCs derivadas de monocito [285].

De esta forma los antígenos pueden ser ávidamente capturados por estas células y dirigidos a los lisosomas donde se unen a MHC II. Sin embargo, no son utilizados de forma eficiente para la formación de complejos péptido-MHC II sino retenidos para su uso como péptidos inmunogénicos días después [286, 287]. Como consecuencia de esto, las células inmaduras en cultivo pueden capturar eficientemente grandes cantidades de antígeno pero no son capaces de presentarlo eficientemente a las células T. La mayoría de las DCs que circulan por los tejidos son DCs inmaduras [284].

Para internalizar el antígeno las DCs inmaduras poseen diferentes mecanismos. La mayoría de las bacterias son internalizadas vía fagocitosis convencional y enviadas a los fagosomas. Sin embargo, las DCs no son tan eficientes como los macrófagos en el proceso de fagocitosis [288]. Las DC inmaduras utilizan otras vías para la internalización tales como macropinocitosis (en cultivo entra por macropinocitosis la mayor cantidad de fluido internalizado). Otro mecanismo es la endocitosis mediada por receptor a través de receptores tipo C lectina (receptores de manosa o DEC-205) endocitosis mediada por receptor Fc FcγRI, -II y -III y el receptor del complemento CR3 [289-292].

3.2.2 Células dendríticas maduras

Tras detectar productos microbianos o entrar en contacto con citocinas proinflamatorias, las DCs inmaduras se transforman en DCs maduras reduciendo a mínimos su capacidad de captura de antígeno

Introducción

pero aumentando excepcionalmente su capacidad de estimulación de células T. Esta transición es acompañada de una gran reorganización plasmática patente sobretodo por la redistribución del MHC II desde los compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. Para maximizar su capacidad presentadora de antígeno, las DCs maduras incrementan la biosíntesis de MHC II. Tras esto, los MHC II salen de los lisosomas y residen en unas estructuras citoplasmáticas no lisosomales (vesículas de clase II o CIIV), y finalmente, se acumulan masivamente en la superficie celular (su presencia en la superficie aumenta de 5 a 20 veces) donde su vida media se prolonga a causa del descenso en los niveles de endocitosis. Al mismo tiempo, se incrementa la expresión en la superficie de la célula de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), MHC de clase I y moléculas de adhesión a células T (CD48 y CD58). También aumenta la capacidad de generar complejos funcionales péptido-MHC II ya sea a partir de antígeno recién capturado o a partir de antígeno internalizado antes de empezar el proceso de maduración [286, 287]. Las células extienden largas prolongaciones o dendritas (realmente, repliegues de membrana) que permiten incrementar las oportunidades de entrar en contacto con células T y su interacción con ellas. En la superficie celular estas moléculas pueden permanecer estables durante días y estar disponibles para su reconocimiento por parte de células T CD4. También reorganizan su patrón de receptores de quimiocinas para facilitar su migración a los órganos linfoides [291, 292].

La activación del proceso de maduración *in vitro* comienza típicamente con productos de patógenos microbianos o virales, tales como LPS, CpG ADN o dsRNA. En muchos de estos casos o en todos ellos, los receptores tipo Toll juegan un papel crucial [293]. Este es otro mecanismo que enlaza la inmunidad adquirida y la natural.

Las citocinas proinflamatorias, tales como el TNF- α y la IL-1 β , también son capaces de activar la maduración. Asimismo es capaz de hacerlo la unión a CD40, un receptor de la familia del TNF Receptor que abunda en DCs. TLRs, IL-1R y los receptores de TNF, todos llevan a la activación del gen NF- κ B, un sello de marca de la activación de DCs maduras. La maduración de DCs también puede iniciarse por una variedad de estímulos no inflamatorios o no relacionados con ningún patógeno. Es posible que diferentes estímulos sean capaces de activar diferentes estados de maduración, ya fuese vía TLRs o por otros receptores, las DCs decodificarían señales de su entorno, permitiendo así el desarrollo de DCs maduras capaces de polarizar respuestas T o inducir tolerancia. Se sabe que ciertos antígenos provocan respuestas TH1 y otros TH2 [284, 291, 292].

3.2.3 Características especiales de las células dendríticas

3.2.3.1 Presentación cruzada MHC I y MHC II

Para activar células T citotóxicas CD8⁺, las DCs presentan péptidos antigénicos en moléculas MHC I, los cuales pueden ser cargados tanto vía endógena como exógena. Las DCs han desarrollado una vía de

transporte única que les permite unir el endosoma con el citosol. En consecuencia, el antígeno internalizado vía endocitosis puede alcanzar la maquinaria de procesamiento de antígeno citosólica y llegar así a ser presentado por la vía MHC I. Las únicas APCs que presentan esta característica son las DCs. A este fenómeno se le denomina presentación cruzada o *Cross Presentation* [291, 292, 294, 295].

3.2.3.2 Sistema complementario de presentación de antígeno: CD1

El sistema clásico de presentación de antígeno a las células T vía moléculas MHC I y MHC II es complementado mediante moléculas CD1. Las moléculas CD1, familia de las glicoproteínas asociadas a microglobulinas β -2, constituyen la tercera línea de presentación de antígeno. Esta vía permite presentar antígeno lipídico a las células T. Las células T humanas capaces de reconocer glicolípidos de micobacterias en conjunción con CD1 producen interferón gamma, matan las células infectadas y también son capaces de matar directamente a la micobacteria [296-298]. La molécula CD1 se desarrollará exhaustivamente más adelante al tratar los marcadores de las DCs.

3.2.4 Tipos y subtipos de células dendríticas humanas

Las células dendríticas son capaces de interactuar con muchos tipos celulares diferentes: células T, células B, linfocitos NK, etc. Pueden llevar a cabo su función tanto en los nódulos linfáticos como en los tejidos afectados por la inflamación. Son capaces de inducir una respuesta aguda contra un patógeno y también de controlar que los linfocitos T no actúen contra antígenos propios. Es decir, regulan tanto la tolerancia como la defensa.

Tantas funciones distintas y a menudo opuestas difícilmente pueden llevarse a cabo al mismo tiempo por la misma clase de célula. Por ello parece necesaria la existencia de diferentes subtipos de DCs que sean capaces de llevar a cabo diferentes funciones. Estos subtipos especializados de dendrítica, ya sean debido a diferentes estados de activación o bien a diferentes líneas de DCs, ponen de manifiesto el enorme grado de plasticidad funcional de que son capaces estas células.

Esta breve exposición sobre los subtipos celulares de DCs se centrará en las líneas humanas dejando a un lado los subtipos murinos por no haberse empleado DCs murinas en la realización de esta tesis.

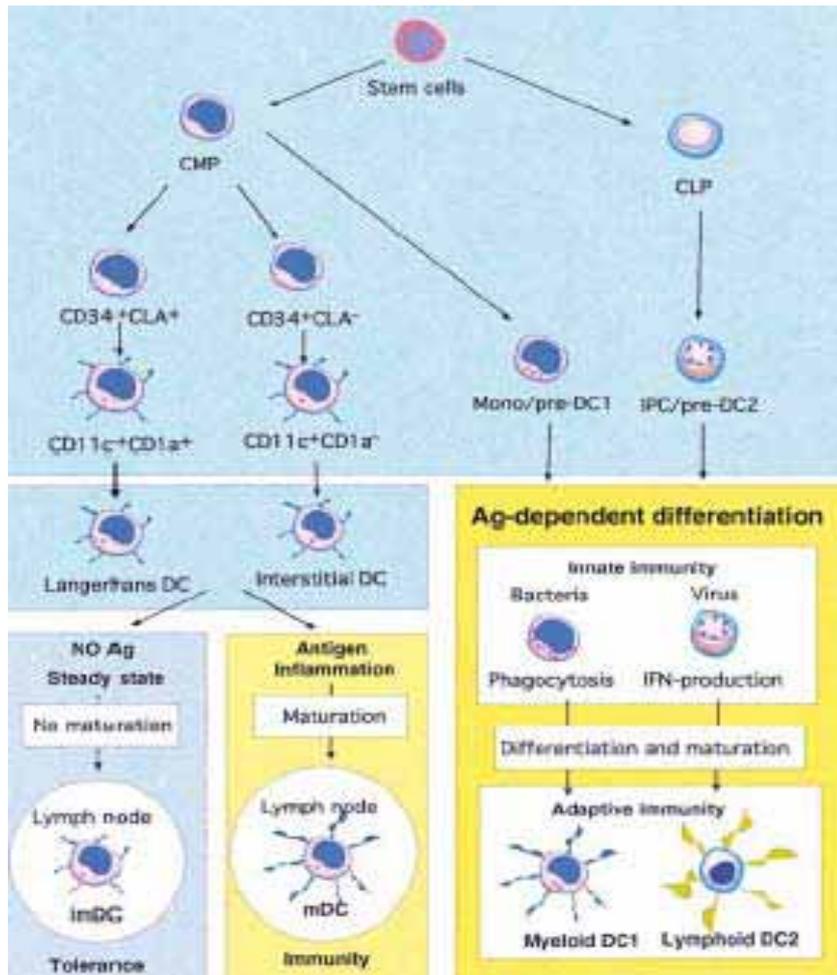


Figura 3.1. Árbol de diferenciación Stem Cell-Dendrítica. Desarrollo, diversificación, maduración y función a partir de células madre hematopoyéticas CD34⁺ de diferentes tipos de células dendríticas [7].

En la Figura 3.1 se pueden apreciar los diferentes tipos de células dendríticas y su desarrollo a partir de sus progenitores. Las células dendríticas humanas se subdividen en dos grandes subtipos según provengan directamente de células madre de la médula ósea (iDCs) o de células precursoras que se encuentran en el torrente sanguíneo (pDCs). Las primeras son producidas continuamente a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas (Stem Cells) se diferencian a Progenitores linfoides Comunes (CLP) y a Progenitores Mieloides Comunes (CMP). Las CMPs se diferencian a su vez en CD34⁺CLA⁻ y CD34⁺CLA⁺ y estos a su vez en CD11c⁺CD1a⁺ y CD11c⁺CD1a⁻, respectivamente [299]. Las primeras migran a la epidermis de la piel donde se transforman en células de Langerhans. Las segundas, CD11c⁺CD1a⁻, migran a la dermis de la piel y a otros tejidos y se transforman en DCs intersticiales inmaduras (iDCs) [300].

Tanto las DCs de Langerhans como las DCs intersticiales poseen diferentes fenotipos y funciones. Las células de Langerhans expresan CD1a, Antígeno-Lag, E-cadherina y gránulos de Birbeck (se pueden visualizar únicamente por microscopía electrónica y se cree que son un componente del sistema de procesamiento de antígeno de estas células). Las DCs intersticiales expresan CD2, CD9, CD68 y el Factor XIIIa. Además estas últimas, a diferencia de las DCs de Langerhans, poseen la habilidad de procesar grandes cantidades de antígeno a través de receptores de manosa y de producir IL-10, lo cual puede contribuir a la activación de células B *naïve* y a la producción de IgM en presencia de CD40L e IL-2 [301].

Además de estos dos tipos celulares, las células madre generan durante la hematopoyesis dos tipos de precursores de DCs (preDCs): los monocitos (de línea mieloide) denominados pre-DC1 y las células plasmacitoides (de línea linfoide) o pre-DC2 [302]. Aunque tanto las pre-DCs como las imDCs parecen compartir progenitores celulares bastante cercanos existen diferencias entre ambos tipos celulares [7]. Las células dendríticas mieloides inmaduras (imDCs) se diferencian de los pre-DCs en que:

- Solo las imDCs poseen dendritas.
- Las imDCs expresan cantidades moderadas de moléculas coestimuladoras e inducen una moderada activación de células T *in vitro*. Las células pre-DCs expresan niveles muy bajos de moléculas coestimuladoras y no son capaces de producir respuestas significativas con linfocitos T *naïve*.
- Las imDCs pero no las pre-DCs tienen una gran movilidad en cultivo y colonizan tejidos no linfoides en ausencia de estimulación.
- Funcionalmente, las pre-DCs se encuentran más directamente involucradas en la inmunidad innata contra microbios, en comparación con las imDCs.

Las pre-DC1 y las pre-DC2 presentan también diferentes propiedades. Mientras que las pre-DC1 expresan antígenos mieloides CD11b, CD11c, CD13, CD14 y CD33 [302], las pre-DC2 expresan mRNA específico de linfocitos como por ejemplo: pre-T α , Igy-like 14.1 y Spi-B [303, 304]. Las pre-DC1 y las Pre-DC2 expresan diferentes patrones de reconocimiento. Pre-DC1 pero no Pre-DC2 expresa receptores de manosa. Además pre-DC1 pero no pre-DC2 expresa CD1a,b,c, y d. Pre-DC1 se diferencia a Dendrítica mieloide inmadura (im-DC1) en cultivo con GM-CSF e IL-4 o tras la fagocitosis de bacterias. Las pre-DC2 son capaces de diferenciarse a imDC2 en cultivo con IL-3 o siguiendo una respuesta inmune innata a una estimulación viral. ImDC1 e imDC2 presentan diferentes propiedades tras su activación por CD40L. Las primeras son capaces de producir grandes cantidades de IL-12 e inducir fuertes respuestas de linfocito T citotóxicas (CTL), mientras que las segundas, DC2, no producen grandes cantidades de IL-12 e inducen respuestas TH2 o la generación de células CD8 T supresoras, productoras de IL-10 [300, 305]. La respuesta inducida por virus en DC2 activa la producción de IFN- γ e IL-10 en célula T-Helper.

Introducción

La mayor parte de las recién generadas imDCs migran por el cuerpo siguiendo la siguiente ruta: médula ósea, sangre, tejidos no linfoides, linfoides y nódulos linfáticos. Algunas imDCs parecen ser capaces de migrar a los nódulos linfáticos en condiciones normales sin haber madurado. Estas DCs tienen un tiempo de vida media corto de 3-4 días [306].

Tras producirse una infección estas células maduran rápidamente. Ciertos receptores, tales como los TLRs, les permiten reconocer antígenos microbianos y madurar activando una respuesta inmunogénica [293].

A diferencia de las imDCs, las cuales parecen haber evolucionado para procesar y presentar antígenos a las células T, las pre-DCs parecen haber evolucionado originariamente para servir como células efectoras en la inmunidad innata antimicrobiana. Los monocitos (pre-DC1) ingieren y matan varios tipos de bacterias y hongos. Las Pre-DC2 representan un factor clave en la respuesta inmune temprana antiviral al producir grandes cantidades de IFN- α/β tras la infección viral [302]. A diferencia de otras células efectoras de la inmunidad natural, que mueren tras realizar su función efectora, tanto pre-DC1 como pre-DC2 tienen el potencial de diferenciarse a DCs [302]. La diferenciación de pre-DC2 a DC2 durante la infección viral ocurre espontáneamente en ausencia de citocinas exógenas. Esta diferenciación es mediada por IFN tipo 1, que mantiene la supervivencia celular, y por TNF- α , que induce la diferenciación de la célula de forma autocrina. Las pre-DC1 se transforman en DC1 en presencia de GM-CSF e IL-4. Las DC1 son 10 veces más eficientes en la captura de antígeno que las imDCs y son las únicas con capacidad para activar linfocitos B naive y diferenciarlos a células secretoras de IgMs. En su estado inmaduro presentan niveles de actividad endocítica mayores que los de las imDCs.

Así, los dos tipos de precursores de DC, pre-DC1 (monocitos) y pre-DC2 (células plasmacitoides) son capaces de ejercer funciones tanto en inmunidad innata como adaptativa y son el enlace físico entre las dos ramas de la inmunidad [7, 307].

3.2.5 Células dendríticas y respuesta T

Las respuestas inmunes se inician en las áreas de células T de los órganos linfoides secundarios, donde linfocitos T *naive* interactúan con células dendríticas que les presentan antígenos tomados de los tejidos periféricos o localmente. Los antígenos que no tienen acceso a las DCs son ignorados por los linfocitos T, mientras que los que sí tienen acceso pueden estimular las células T *naive*, dirigiendo su proliferación y diferenciación y, en algunas circunstancias, su delección. Las células dendríticas son un enlace entre el universo de antígenos específicos de tejidos propios y extraños y los componentes clave de la regulación de la inmunidad mediada por células [308].

Para reconocer el antígeno, las células T necesitan establecer contacto con las células presentadoras de antígeno, formando una sinapsis inmunológica, en la cual los receptores de células T

(TCR) y moléculas coestimuladoras se congregan en un área central rodeada por un anillo de moléculas de adhesión [309]. En la sinapsis, el TCR, activado por el complejo MHC-Péptido, inicia una cascada de señales cuya magnitud y duración determinan la entrada de la célula T en el ciclo celular. Las sinapsis se forman en cuestión de minutos tras la activación del TCR y son estables en ausencia de eventos ajenos. Pero pueden romperse a causa de la división celular, muerte de la APC o por influencias externas tales como el colágeno. Es importante considerar que las células T tratan continuamente de mejorar sus sinapsis y pueden saltar rápidamente de una APC a otra, aumentando así su nivel de estimulación y especificidad por el antígeno. La cantidad de señal que la célula T recibe depende de tres factores: el nivel en los complejos MHC-péptido que inician la señal de transducción; el nivel de moléculas coestimuladoras que amplifican el proceso de señalización; la estabilidad de la sinapsis que determina por cuanto tiempo se sostendrá el proceso de señalización [310].

La eficiencia de la sinapsis varía en función de la naturaleza de la APC y del estado de desarrollo de la célula T. En linfocitos T activados, efectores o de memoria, la activación del TCR ajusta eficientemente la vía de transducción de señales de manera que estas células rápidamente responden a dosis bajas de antígeno incluso en ausencia de coestimulación. Por el contrario, en los linfocitos T *naïve* el ajuste es ineficiente.

La unión de las moléculas B7 expresadas en las APCs al CD28 de los linfocitos T puede llegar a amplificar hasta 100 veces el proceso de señal iniciado por el TCR. Por ello, en ausencia de coestimulación, las células T *naïve* únicamente pueden ser activadas por dosis muy altas de antígeno y requieren tiempos mucho más largos de estimulación del TCR para activarse (6-30 h), mientras que la estimulación del TCR en células T efectoras o de memoria se produce entre 0.5 y 2 h [308].

Una vez se ha alcanzado la primera división, las células T proliferan rápidamente en respuesta a la IL-2, la cual producen los mismos linfocitos T activados. La IL-2 actúa de forma paracrina y autocrina. La duración de la estimulación del TCR junto con las citocinas polarizadoras determinarán la progresiva diferenciación de las células T CD4⁺, dirigiendo la diferenciación hacia células efectoras terminales o intermedias [311]. Si el estímulo es de corta duración y la IL-12 se encuentra ausente, las células T proliferarán pero no se diferenciarán. *In vivo*, migrarán a los nódulos linfáticos y, siguiendo una segunda estimulación, se transformarán en células efectoras. Las células T que reciben una estimulación TCR prolongada en presencia de IL-12 o IL-4 se diferencian directamente a TH1 o TH2 respectivamente produciendo IFN- γ (TH1) o IL-4, IL-5 e IL-13 (TH2). Como parte de su proceso de maduración, las células TH1 y TH2 pierden los receptores de anclaje en los nódulos linfáticos y adquieren la capacidad de migrar a los tejidos no linfoides inflamados para ejecutar allí sus funciones efectoras [308].

Introducción

Las DCs que migran desde los tejidos a los nódulos linfáticos tienen unas expectativas de vida de 2 ó 3 días. La maduración de la DC regula la captura, procesado y presentación de antígeno, la expresión de moléculas coestimuladoras, la producción de citocinas y la duración media de su vida [308].

Los estímulos madurativos incrementan la expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), que son transportadas junto con los complejos MHC II a la superficie celular donde permanecen formando parte de microdominios de membrana [287]. El incremento simultáneo de moléculas B7 y MHC lleva a un aumento sinérgico de la capacidad estimuladora de las células dendríticas sobre los linfocitos T. El incremento en la expresión de MHC asegura una alta capacidad de presentación de antígeno mientras que el incremento de B7 permite una amplificación de la señal necesaria para una activación efectiva de las células T naive.

La producción de citocinas por parte de las DCs también está sujeta a una estricta regulación que queda claramente patente en el caso de la IL-12. La producción de IL-12 es activada por la mayoría de los patógenos y las células T pueden activarla también a través de CD40L [312]. Sin embargo, la IL-12 no se induce por TNF- α , IL-1, toxina colérica o FasL. La producción de IL-12 puede ser modulada por citocinas y mediadores presentes durante la maduración [313]. IFN- γ e incluso IL-4 incrementan la secreción de IL-12 que se produce tras recibir un estímulo madurativo, mientras que la prostaglandina E2 y la IL-10 ejercen un efecto inhibitor. Además, la producción de IL-12 por las DCs se restringe a un estrecho rango temporal (8-24h) [314]. Todo esto lleva a la conclusión de que la capacidad de las DCs de producir una respuesta TH1 está restringida por una serie de variables que incluyen el microambiente, el tipo de estímulo madurativo y la cinética de la maduración [308].

En condiciones normales, una pequeña fracción de DCs cargadas con antígenos propios y cuerpos apoptóticos de la periferia madura espontáneamente y migra a los nódulos linfáticos. Se cree que el estímulo que producen estas DCs es de poca magnitud lo que lleva a la muerte de los linfocitos T que entran en contacto con ellas por falta de la suficiente estimulación [315-317]. En cambio, cuando son patógenos (o adyuvantes) los que se encuentran presentes en los tejidos periféricos, las DCs residentes se activan en masa y migran a los nódulos linfáticos. Al mismo tiempo, en los tejidos inflamados son reclutados monocitos del torrente sanguíneo periférico. Una vez ahí, rápidamente se diferencian a DCs captadoras de antígeno que, tras madurar, migrarán también a los nódulos linfáticos sosteniendo la presentación de antígeno en ellos tanto en el ámbito espacial como temporal. Las DCs maduras producen grandes cantidades de citocinas y quimiocinas que promueven el reclutamiento sostenido de monocitos y, al mismo tiempo, incrementan la expresión de CCR7, el cual es necesario para su migración hacia los nódulos linfáticos y la localización de estos en las áreas de células T [308, 318, 319].

En condiciones inflamatorias, las áreas de células T de los nódulos linfáticos cercanos reciben grandes cantidades de DCs con alta capacidad de estimulación durante un periodo de tiempo largo. La alta

densidad de DCs y los altos niveles de expresión de antígeno y de moléculas B7 desencadenan una fuerte y sostenida estimulación hacia determinados clones de células T que llevan a una veloz diferenciación y proliferación de los mismos. En estas condiciones, se liberan grandes cantidades de IL-2, la cual también dirige la expansión clonal de las células T, que en el caso de las células T efectoras puede ser independiente de si las células están recibiendo o no estimulación vía TCR. Las interacciones DC-LT producen una estimulación recíproca. Las células T activadas activan a su vez a las DC vía CD40L o TRANCE, aumentando la capacidad de estas últimas de activar células T, incrementando la liberación de IL-12 y prolongando su tiempo de vida media. En cambio, células T anérgicas o reguladoras pueden llegar a suprimir la presentación de antígeno de las DCs produciendo citocinas inhibitoras o por contacto directo [308].

3.2.6 Tolerancia

Tolerancia es un estado en el cual el sistema inmune como un todo fracasa al activar una respuesta inmune contra un antígeno determinado [320]. Existen diversos tipos y clasificaciones de tolerancia, la primera de las cuales es la diferenciación entre tolerancia central y tolerancia periférica. La tolerancia central se produce en el timo donde, aquellas células T capaces de reaccionar con complejos MHC propios, son delecionadas [321]. Sin embargo, se sabe por muchos estudios que no todas las células capaces de reaccionar con antígenos propios consiguen ser purgadas en este proceso. Algunas consiguen escapar a la deleción por un número de razones, entre las cuales la más importante es su baja afinidad por los antígenos propios [322]. De esta manera, las células T autoreactivas periféricas podrían ser aquellas que tienen poca afinidad por los antígenos propios habiendo sido sus contrapartidas de alta afinidad delecionadas en el timo [320].

Una vez se ha aclarado la razón principal por la que serían necesarios mecanismos de tolerancia alternativos a los del timo se procede a dar una explicación detallada de los mismos. Estos mecanismos se han clasificado en tres categorías principales:

- Los que producen un fracaso al responder al antígeno. En este caso los linfocitos permanecen en estado *naive* y el animal sería funcionalmente pero no inmunológicamente tolerante. Esto puede ser debido a dos causas:
 - Una baja afinidad o avidez del TCR autoespecífico que impide que la célula proliferare y se diferencie en respuesta al autoantígeno periférico [323].
 - La permanencia del antígeno fuera de los tejidos linfoides secundarios donde los linfocitos *naive* recirculan. En este caso incluso células T de alta afinidad permanecen sin reaccionar en su estado *naive*. Un ejemplo sería la expresión de un Ag transgénico por las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos de Langerhans

que es ignorado por las células T de alta afinidad hasta que se produce una presentación del antígeno en los nódulos linfáticos, hasta que un estado de inflamación mejora el acceso al antígeno, o hasta que se administra este antígeno a las células T para que reaccionen [324].

- Los que producen una rápida muerte de la célula T específica para el antígeno. Se denomina deleción periférica y es mediada por las células dendríticas. Se produciría de un modo análogo a como ocurre en el timo. No se conoce con certeza el mecanismo ni qué tipos de DCs median en el proceso.

- Aquellos en los que se produce un estado autoreactivo en las células T tras reconocer el antígeno, pero donde el animal permanece sin cambios (es decir, tolerante) sin evidencia de enfermedad autoinmune alguna. Las células T exhibirían un fenotipo y un comportamiento activado o de memoria pero sin efectos aparentes [320]. Este es el mecanismo menos entendido de los tres. Se presentarán cuatro ejemplos:
 - La tolerancia mucosal, un estado en que se asocia un descenso de la respuesta en un lugar con un incremento de la misma en otro. Por ejemplo, células que secretan IL-10, la cual suprime las respuestas T vía DCs, al mismo tiempo es un potente activador del crecimiento y diferenciación en células B humanas [325].
 - La desviación inmune, consiste en un cambio de respuesta TH1 a TH2. Aunque no es un estado de tolerancia estricta, a menudo se le considera un mecanismo de tolerancia porque reduce las consecuencias de respuestas TH1 en enfermedades autoinmunes.
 - Células T de memoria autotolerantes. Se han dado casos de antígenos para los que se han desarrollado células de memoria que después proliferaban muy poco *in vitro* y cuyo defecto en la proliferación no podía ser revertido por la adición de IL-2 [326, 327].
 - El estado de anergia, definida para células B como un estado de parálisis prolongado en el tiempo inducido por el reconocimiento del antígeno. Este término también se extendió a las células T pero se pudo determinar que era reversible en estas células al añadir IL-2 al medio. Este efecto en estas células se limitaba a una baja producción de IL-2 [328].

Las células que participan en los procesos de tolerancia son principalmente células dendríticas y algunos subtipos de células T. La tolerancia periférica sería mediada por DCs inmaduras o semimaduras [329] en las cuales, probablemente, la falta de moléculas coestimuladoras cumpliría un papel relevante, mientras que la activación de las células T se produciría por DCs estimuladas [320]. De hecho, ciertas subpoblaciones de DCs tales como DCs derivadas de hígado o DCs moduladas con IL-10 [330, 331] serían capaces de disminuir la respuesta inmune. Todas estas DCs presentarían un fenotipo más o menos inmaduro [332, 333]. Sin embargo, también existen trabajos de DC fenotípicamente maduras capaces de inducir tolerancia [334-337].

Además de las DCs se ha podido demostrar que ciertos subtipos de células T reguladoras (las más estudiadas son CD4⁺CD25⁺) son capaces de suprimir respuestas de células dendríticas vía Antígeno de Célula T Citotóxica 4 (CTLA-4) [334, 338-340]. La interacción se daría en ambas direcciones. Las DCs inducirían tolerancia en los linfocitos pero también ciertos tipos de linfocitos T reguladores (T-reg) serían capaces de inducir tolerancia en DCs [341-344]. En estos casos los linfocitos T-reg suprimirían la activación de las células T respondedoras cuando estas reciben señales de baja afinidad por TCR mientras que no suprimirían las respuestas producidas por señales TCR potentes [343].

Por último, estudios recientes están asignando a CTLA-4 un papel mucho más importante en la activación de la tolerancia periférica del que se creía hasta ahora a través de la activación del enzima Indoleamina 2,3-Dioxygenasa (IDO), un enzima implicado en el catabolismo del triptófano, que se expresa en ciertos órganos y tejidos, particularmente en los órganos linfoides y en la placenta. Se ha demostrado que IDO impide el rechazo del feto durante el embarazo, probablemente inhibiendo células T aloreactivas, y también se ha sugerido que la expresión de IDO controlaría las respuestas inmunes autoreactivas de las APCs. El mecanismo propuesto para suprimir la activación de las células T sería a través de la degradación del triptófano, un aminoácido esencial que se requiere para la proliferación celular [345-347]. IDO también intervendría en la regulación de la síntesis de prostaglandinas [348].

3.2.7 Marcadores de expresión

3.2.7.1. CD36

La molécula CD36 es un receptor *scavenger* de superficie celular de clase B con un peso de 88 KDa. Tiene dos dominios cortos intracelulares y un enorme dominio extracelular que se encuentra fuertemente N-glicosilado. Entre los residuos 184 y 204 se encuentra la región hidrofóbica, la cual podría encontrarse en contacto con la membrana o formar un *pocket* hidrofóbico. La expresión de CD36 se encuentra controlada principalmente por la transcripción del heterodímero PPAR γ :RXR. El gen CD36 contiene una secuencia consenso entre -273 y -260 que comparte homología con los elementos de respuesta normalmente reconocidos por el complejo PPAR γ :RXR [349].

Introducción

El CD36 se encuentra implicado en muchos procesos tales como angiogénesis, fagocitosis, inflamación y el metabolismo lipídico y de la glucosa. Se encuentra preferentemente en microdominios lipídicos (*lipid rafts*) donde puede asociarse fácilmente con receptores y moléculas adaptadoras y señalizadoras. Es un receptor y transportador de lípidos oxidados y ácidos grasos de cadena larga. También es un receptor fagocítico para células apoptóticas. El CD36 es capaz de interactuar con muchos ligandos diferentes lo cual sugiere que tal vez reconozca algún tipo de dominio basado en la estructura en lugar de tener afinidad específica por ciertos residuos [350].

El CD36 se expresa principalmente en tejidos con un alto metabolismo de ácidos grasos tales como el músculo, en células de almacenaje y secretoras de triglicéridos tales como adipocitos diferenciados, células epiteliales mamarias secretoras y células endoteliales microdermales de la piel. CD36 también se expresa en órganos tales como el hígado o el bazo y, finalmente, en las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial [350].

En macrófagos se han demostrado aumentos de expresión de CD36 en respuesta a ácidos grasos insaturados siendo los inductores de CD36 más potentes el EPA y el DHA seguidos de los ácidos oleico y Linoleico [351].

El CD36 cumple un papel relevante en la supervivencia tanto del huésped como del parásito *Plasmodium Falciparum* en casos de malaria. Esta enfermedad, que infecta anualmente entre 300 y 500 millones de personas, únicamente se convierte en severa y fatal para un 1-2% de los infectados. Las causas del agravamiento severo de la enfermedad se han identificado como excesiva carga parasitaria que puede acabar afectando órganos vitales como el cerebro (malaria cerebral) y respuesta por citocinas a la infección masiva que también produce la muerte del individuo. Los eritrocitos infectados por este parásito serían fagocitados vía CD36 por monocitos, macrófagos y neutrófilos. A diferencia de la fagocitosis mediada por Fc, la mediada por CD36 ocurre de una forma no inflamatoria similar a la captura de células apoptóticas, en la cual CD36 se encuentra implicado solo o en colaboración con otras integrinas como $\alpha_v\beta_3$ y trombospondina en macrófagos o $\alpha_v\beta_5$ en células dendríticas [350]. De esta manera, a través de CD36, se consigue controlar la carga parasitaria y evitar la respuesta por citocinas que son las dos causas de muerte por malaria. No se ha podido demostrar claramente que la fagocitosis mediada por CD36 en macrófagos lleve también a disfunción en macrófagos pero sí se sabe que eritrocitos infectados con *Plasmodium Falciparum* que se unen a células dendríticas vía CD36 son capaces de modular la maduración de estas células *in vitro*. Estas células, comparadas con células dendríticas expuestas a eritrocitos infectados con la unión a CD36 bloqueada, eran incapaces de madurar tras ser estimuladas con LPS o TNF- α . La producción de MHC de clase II y la expresión de moléculas coestimuladoras se encontraba inhibida, la secreción de IL-12 e IFN γ estaba disminuida y la secreción de IL-10 aumentada [352]. Las células dendríticas fagocitan células apoptóticas vía CD36 y $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ en un proceso no inflamatorio que no activa células T CD4⁺.

CD36 se encuentra bajo control transcripcional del receptor nuclear PPAR γ :RXR. Los agonistas de PPAR γ :RXR así como 9cRA, el metabolito activo de la vitamina A, son capaces de incrementar la captura de eritrocitos infectados con Plasmodium y también de inhibir la secreción de citocinas inflamatorias tanto en monocitos como en macrófagos mejorando la sintomatología general del paciente [350]. Ya se sabe que agonistas de PPAR γ son capaces de incrementar la expresión de CD36 así como de inducir propiedades antiinflamatorias y reguladoras de la función de la célula dendrítica [256, 353-355].

3.2.7.2 CD80/CD86

El CD80 (también llamado B7-1) fue identificado en 1982 como un antígeno de células B [356]. En 1987 se descubrió que era un ligando de CD28 [357]. CD28 es un receptor de linfocitos cuya señalización es esencial a la hora de producir IL-2 y activar la proliferación linfocitaria. También es ligando de CTLA-4 (CD152), el cual es otro miembro de la familia de CD28 que se expresa tras la activación linfocitaria e induce una señal negativa en el linfocito T activado, oponiéndose así directamente a la acción de CD28. CD28 es un coestimulador en linfocito T mientras que CD152 actúa como un inhibidor. En 1993 se identificó otro ligando de CD28, B7-2 (CD86) [358]. Tanto CD80 como CD86 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Exhiben un 25% de identidad en su dominio extracelular Ig-variable (V) y constante (C). A pesar de esto existen grandes diferencias entre ambos receptores. El CD80 se une con gran afinidad ($k_d= 0.2 \mu\text{M}$) a CD28, CD86 se une a CTLA-4 con la menor afinidad de ambos ($k_d= 20-40 \mu\text{M}$). Las uniones de CD80-CD28 y de CD86-CTLA-4 se realizan con afinidades intermedias entre estas dos [359]. Estos dos receptores celulares se expresan en muchos tipos celulares entre los que se incluyen las células B, macrófagos y células dendríticas.

La cinética de los dos receptores también es diferente. Tras la activación celular la expresión de CD86 es modulada rápidamente llegando a niveles máximos en 48 h mientras que la activación de CD80 es mucho más lenta tardando en alcanzar niveles máximos de 4 a 5 días [360].

El CD28 y el CTLA-4 (CD152) desempeñan papeles cruciales pero opuestos en la estimulación de las células T. Ambos comparten dos ligandos: CD80 y CD86, pero hasta la fecha no existe una idea muy clara de qué ligando se une prioritariamente a cada uno de ellos. Se cree que CD86 sería el receptor que produce la señal coestimuladora inicial basándose en su mayor abundancia y su cinética de expresión más rápida. Por lo tanto, CD80 cumpliría un papel posterior a la activación linfocitaria controlando la respuesta a través de CD152. Una alternativa a este modelo indicaría que CD80 sería el responsable de una señal inicial no estimulativa sino, al contrario, que se encontraría presente normalmente en estado no activado, la cual controlaría la tolerancia inmune, mientras que la activación celular eliminaría esta represión permitiendo la estimulación linfocitaria al aumentar la expresión de CD86 [361].

Introducción

Además CD80 y CD86 aportan una importante señal de supervivencia a los linfocitos T reguladores que se encuentran presentes en el subtipo CD25⁺ de las células T CD4⁺. La coestimulación B7/CD28 es esencial para la supervivencia y homeostasis de la población linfocito T reguladora CD4⁺CD25⁺ que controla la proliferación celular ya que ratones NOD deficientes en CD80/CD86 o CD28 presentaban casos de diabetes espontánea más frecuentes con cuadros de la enfermedad más graves. Esto se producía como consecuencia de la ausencia de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ [362, 363].

3.2.7.3. CD1a

Durante muchos años se creyó que los péptidos proteicos eran los únicos blancos contra los que podían actuar los linfocitos T. Sin embargo, el descubrimiento de las vías de presentación de antígeno CD1 a través de las cuales, las células T pueden reconocer todo un abanico de lípidos y glicolípidos (pertenecientes tanto a membranas celulares de mamífero como a patógenos microbianos) ha alterado esta percepción. Se sabe que, de un modo similar a como lo hacen las moléculas de MHC I y II, las proteínas CD1 son capaces de presentar antígeno lipídico formando un complejo con él y presentándolo a linfocitos T a través del TCR [364].

Entre las clases de lípido que es capaz de presentar el CD1 se encuentran: micolatos micobacteriales, fosfatidilinosítoles, esfingolípidos y lípidos polyisoprenoides y estructuras glicosiladas relacionadas con todos estos antígenos. Todos ellos permiten la formación de una gran cantidad de estructuras contra las cuales pueden reaccionar las células T restringidas por CD1.

La estructura proteica del complejo de CD1 es parecida a la del MHC: una cadena pesada asociada con la cadena ligera de la β_2 -microglobulina. Las estructuras cristalizadas de estas proteínas muestran una estructura general del mismo tipo que el MHC.

Los humanos expresan cuatro isoformas de CD1: CD1a, CD1b, CD1c y CD1d, que son capaces de presentar lípido a los linfocitos T. Por homología CD1a, CD1b y CD1c se encuentran más cercanos entre sí mientras que CD1d se encuentra más alejado formando un subgrupo aparte.

Las moléculas CD1 son expresadas mayoritariamente por las células presentadoras de antígeno APCs tales como células dendríticas o linfocitos B. CD1d se expresa más ampliamente ya que se encuentra en estas células y en monocitos, macrófagos y células no hematopoyéticas. Todas las especies de mamíferos examinadas hasta la fecha poseen múltiples isoformas de CD1 excepto los ratones y ratas que únicamente expresan la isoforma CD1d [365].

Las diferentes isoformas de CD1 siguen diferentes rutas de tráfico intracelular. Esto parece sugerir que la presencia de la multiplicidad de genes CD1 sería una adaptación evolutiva con el objetivo de maximizar el acceso a muchos antígenos diferentes en distintos lugares de la célula. Las moléculas CD1

son capaces de acceder a muchos compartimentos intracelulares que contienen lípidos tanto exógenos como endógenos.

Los linfocitos T capaces de reaccionar con el CD1 de las APCs lo consiguen de dos formas. La primera es por presentación de antígeno lipídico-complejo CD1 al TCR de las células T restringidas de un modo similar a como lo hace MHC. La segunda manera es mediante una reacción directa con el complejo CD1 en ausencia de antígeno lipídico externo. Estas últimas se activarían nada más reconocer una APC CD1⁺ unida a algún tipo de autoantígeno todavía no identificado. El fenotipo activado de estas células T se correlaciona con funciones efectoras tales como producción de citocinas y citólisis. Es decir, muchos linfocitos T restringidos para CD1, a diferencia de aquellos que reconocen el MHC, son autoreactivos. Esta autoreactividad también es mediada por el TCR. Muchas células T que son autoreactivas para CD1a, CD1b, CD1c o CD1d reconocen autolípidos hasta la fecha sin identificar.

Muchas de las células T restringidas por CD1a, CD1b y CD1c expresan varias cadenas TCR α y TCR β , o en algunos casos TCR γ o TCR δ lo que hace que sea difícil distinguirlas de las restringidas para MHC I y II. En cambio, las células T restringidas para CD1d poseen una cadena TCR α invariante con diversas cadenas TCR β . La mayoría de estas células T restringidas para CD1d reconocen un compuesto llamado α -galactosilceramida. Este compuesto es el que se utiliza para su visualización en sangre tanto en humanos como en ratones.

Funcionalmente los linfocitos T restringidos para CD1 se dividen en aquellos capaces de desarrollar una respuesta T helper 1 (TH1) mediante la producción de citocinas específicas y aquellos que secretan un patrón de citocinas de ambos tipos TH1 y TH2. Las células T restringidas para CD1a, CD1b y CD1c en humanos producen patrones de citocinas TH1 y son citolíticas. Estas células pueden ser importantes en respuestas antimicrobianas y pueden contribuir significativamente a respuestas antitumorales. En cambio, las células T restringidas para CD1d son muy potentes produciendo respuesta tanto TH1 como TH2 e incrementan la expresión de FAS ligando tras su estimulación. Estas células probablemente sean importantes en la prevención de la autoinmunidad.

La presentación de antígeno restringida por CD1 es capaz de presentar antígenos lipídicos tanto en estadio inmaduro como maduro. Esto ha llevado a la conclusión de que las células T restringidas por CD1 son capaces de reaccionar contra los antígenos mucho antes de los que lo hacen las restringidas por MHC en el curso de una infección y que la estimulación con las células restringidas por CD1 puede ocurrir tanto en los lugares periféricos donde está ocurriendo la infección como en los tejidos linfoides.

Diferentes experimentos sugieren que los linfocitos T restringidos por CD1 autoreactivos pueden contribuir de una forma crucial a la función inmune *in vivo* induciendo y regulando la maduración de la célula dendrítica. Estudios *in vitro* sugieren que los antígenos extraños presentados por CD1 pueden ser reconocidos más eficientemente en DCs inmaduras, lo cual implica que la activación de linfocitos T

Introducción

restringidos para CD1 ocurre tempranamente en la respuesta adaptativa. También puede ocurrir autoreactividad la cual estará regulada por la fuerza de la señal TCR y el entorno de citocinas y la coestimulación presente. Los linfocitos CD1 autoefectores pueden estimular la diferenciación de las DCs y dirigir la maduración hacia DCs productoras de IL-12. También pueden activar células NK, otros linfocitos B y T y amplificar al mismo tiempo las respuesta adaptativa e innata a la infección.

Por otro lado, las células T restringidas por CD1d pueden mediar el rechazo tumoral vía producción de IL-12, activación de NK o célula T, o por citólisis directa. Al mismo tiempo, también pueden ayudar a la supresión del rechazo tumoral, prevenir la autoinmunidad o generar tolerancia. Todo esto ocurriría en función del diferente patrón de citocinas que produjesen estas células [365, 366].

Las células dendríticas derivadas de monocitos expresan CD1a, CD1b y CD1c mientras que las de Langerhans expresan sobretodo CD1a, no CD1b y únicamente niveles moderados de CD1c [367].

Por último, se ha demostrado que el parásito *Leishmania Donovanii* es capaz de inducir el descenso de CD1 en las células dendríticas del huésped previniendo así la activación de las células T restringidas por CD1. El conseguir evadir la presentación de CD1 podría ser una estrategia de *Leishmania* para evitar el reconocimiento de sus abundantes glicolípidos parasitarios e impedir reacciones inmunes contra él [368].

3.2.7.4 IL-10

La molécula de interleucina 10 (IL-10) fue identificada originalmente como un producto de células de ratón TH2 estimuladas. En cambio, no se expresaba en células activadas TH1 [369]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la IL-10 no es una típica citocina TH2 ya que se sabe que es producida también por clones CD4 TH0 y TH1 [370]. En humanos, además de su producción por las células T, también es producida por monocitos [371] y células B [372, 373].

La interleucina 10 es una citocina homodimérica que interacciona con su receptor heterodimérico para modular las actividades biológicas de las células inmunes, los queratinocitos y las células endoteliales. La IL-10 es capaz de producir una fuerte inhibición de la activación de las células mieloides que incluyen a los monocitos, las células dendríticas y los macrófagos. Esta inhibición implica una menor producción de mediadores proinflamatorios que incluyen citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión y accesorias, y lleva a una estimulación de células T disminuida. De todo esto se deduce que la IL-10 tiene poderosos efectos antiinflamatorios e inmunosupresores. También produce efectos inhibidores sobre los granulocitos, las células T helper 1, las células NK y las células endoteliales [369].

Estas funciones antiinflamatorias han llevado a realizar numerosos estudios que han sido capaces de demostrar efectos beneficiosos de la IL-10 en modelos de sepsis, endotoxemia, pancreatitis, uveitis, keratitis, hepatitis y daño pulmonar, cerebral o de la médula ósea. La administración de la interleucina redujo la inflamación en modelos animales de artritis reumatoide y en la enfermedad inflamatoria intestinal.

A pesar de todos estos efectos antiinflamatorios, se ha demostrado *in vitro* que también ejerce efectos inmunoestimuladores sobre algunos tipos celulares [369]. Estos incluyen el incremento de la expresión de MHC de clase II en células B. En célula B activadas, la IL-10 favorece la síntesis de ADN y la expansión de las células B activadas, y también induce su diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos que secretan grandes cantidades de IgM, IgG e IgA [325, 374].

Además de sus efectos sobre las células B, la IL-10 es un estimulante de otros tipos celulares. Aumenta la respuesta proliferativa *in vitro* de timocitos murinos. También es capaz de estimular a los linfocitos T CD8⁺ humanos [375]. Estudios recientes han encontrado que la IL-10 contribuye al desarrollo de la patología de la diabetes vía T CD8⁺ ya que el tratamiento con IL-10 tras una depleción de CD8 inhibía la formación de diabetes sin atenuar la insulinitis la cual es otro efecto producido por la IL-10 [376].

Por último la IL-10 induce la diferenciación de las células T reguladoras (Tr1) [377]. Se ha encontrado un subtipo de células T que expresa un patrón de citocinas diferente del que se expresa en TH1, TH2 o TH0. Estas células se denominan Tr1 y producen IL-10 y algo de IL-5 e IFN γ , con o sin TGF- β , pero con una muy débil producción de IL-2 y de IL-4. Proliferan pobremente tras una activación policlonal mediada por TCR. Estas células Tr1 tienen propiedades inmunosupresoras y son capaces de impedir el desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por TH1 [377-379]. Se ha demostrado que las células Tr1 y otras poblaciones Tr son capaces de suprimir respuestas inmunes a patógenos, tumores y aloantígenos. En algunos de estos casos, los efectos inmunosupresores de las poblaciones Tr pueden ser revertidos mediante neutralización de IL-10, sugiriendo que, al margen de las especificidades antigénicas que puedan tener, gran parte de su efecto se produce por mediación de la IL-10 [369].

3.3 DHA Y SISTEMA INMUNE

Al comentar las posibilidades terapéuticas del DHA se han enumerado toda una serie de enfermedades autoinmunes para las cuales el DHA parece tener un efecto positivo. Estudios epidemiológicos, clínicos y bioquímicos han demostrado efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 al reducir los riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares e inflamatorias [13, 121]. Fueron los resultados obtenidos en estas enfermedades además de otras patologías autoinmunes, tanto de humanos como de animales, los que impulsaron el estudio de los ácidos grasos esenciales y sus efectos en el sistema inmune. La conclusión a la que se llegó es que estos ácidos grasos, entre los cuales se encuentra el DHA, modulan las respuestas inmunes [160, 161, 206-208, 216, 217, 380-382]. Como ya se ha explicado anteriormente, los cambios en las concentraciones relativas de eicosanoides no consiguen explicar todos los efectos que se producen. Otros mecanismos alternativos han de intervenir forzosamente.

Introducción

El consumo de ácidos grasos omega-3 se ha relacionado con descensos en la proliferación [205, 383, 384], prolongación de la supervivencia [160, 385], caídas de la expresión del receptor de IL-2, de moléculas de adhesión, de la producción de IL-2 [205, 386, 387] y de IFN γ [159, 387] en linfocitos [160, 388-393] y descensos en la actividad de células NK [394]. Al alimentar ratones con dietas ricas en DHA se produjeron descensos en la expresión de CD4 y CD8 en superficie de linfocitos T [395, 396], supresión de la función coestimuladora del receptor de membrana CD28 en células de ratón primarias y en células Jurkat [397, 398]. El DHA interviene en la regulación de los canales de señalización por calcio que se produce en linfocitos T humanos [399].

Se han observado otros efectos en macrófagos y monocitos. Estudios *in vitro* con EPA y DHA inhiben la expresión en superficie de MHC II en macrófagos y monocitos [160, 400, 401] y disminuyen la capacidad de los monocitos humanos para presentar antígeno (Tetanus toxoide) a linfocitos autólogos [160, 402, 403]. Al alimentar a roedores con aceite de pescado también se producen descensos en la expresión de MHC II y una disminución de la presentación de antígeno *ex vivo* [160, 389, 392, 393, 404]. Se produce un descenso en la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos y monocitos inflamatorios de ratones [389, 391, 404]. El cultivo de macrófagos murinos con PUFAS ω -3 provoca un decremento en la habilidad de estos para unirse a varias superficies [405]. EL DHA es capaz de producir descensos en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos humanos y murinos [406]. Células endoteliales cultivadas con EPA o DHA sufren una pérdida de la capacidad de expresar E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 [407] inducida por LPS o por citocinas y disminuye la adhesión de monocitos a las mismas [407, 408]. Lo mismo ocurre con la expresión de ICAM-1 en la superficie de monocitos estimulados con interferón γ [401] y con macrófagos [409], tanto en animales como en humanos, sometidos a dietas ricas en EPA y DHA [410].

Tanto EPA como DHA puros o en forma de aceite de pescado son capaces de inhibir la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en monocitos en cultivo [391], macrófagos de roedor [411-413], en células mononucleadas humanas [155, 414-416], provocan descensos en las concentraciones circulantes de estas citocinas en ratones tratados con LPS [417] y la producción de IL-6 e IL-8 también desciende en células endoteliales [407, 418]. Todos estos efectos no se pueden explicar únicamente vía inhibición de la producción de PGE $_2$. El mecanismo ha de ser la inhibición de otros eicosanoides o mecanismos independientes de eicosanoides [209, 419].

La expresión de genes tempranos de respuesta (citocinas, factores de crecimiento, etc.) inducidos por mitógenos no requiere la intervención de la síntesis de proteínas [420]. Esto sugiere que la supresión de la producción de citocinas mediada por los ácidos grasos omega-3 ocurre a través de la modulación de vías de señalización que llevan a la expresión de genes de citocinas [161].

3.4 PPAR γ Y SISTEMA INMUNE

Las tres isoformas de PPAR participan en la regulación de las respuestas inflamatorias. Dependiendo del tejido afectado y de qué isoforma PPAR se encuentre implicada, estos receptores de hormonas nucleares pueden modular la intensidad, la duración y las consecuencias de los procesos inflamatorios. Aunque también se han encontrado funciones inmunes que desempeña PPAR β/δ en los queratinocitos [421], la mayoría de los procesos inmunes que se han descubierto están mediados por PPAR α o PPAR γ . La mayor parte de los estudios que se han llevado a cabo coinciden en que la activación de PPAR, ya sea específica para PPAR α o PPAR γ , regula negativamente la inducción de las respuestas inflamatorias [11].

En cuanto a PPAR γ , se acumulan más y más trabajos que clarifican su papel en la regulación de las respuestas inflamatorias [261, 264, 422-424]. Ligandos específicos de PPAR inhiben la producción de muchas citocinas inflamatorias (tales como TNF α , IL- β e IL-6), la producción inducible de óxido nítrico y la expresión de la metaloproteinasa 9 (MMP9) y el Receptor Scavenger de Macrófago 1 (MSR1) en varios tipos celulares que incluyen monocitos, macrófagos y células epiteliales [425, 426].

La mutación deletérea PPAR $\gamma^{-/-}$ es letal a nivel embrionario por lo que no existen ratones PPAR $\gamma^{-/-}$. Sin embargo, ratones PPAR $\gamma^{+/-}$ son más susceptibles a la artritis reumatoide inducida experimentalmente y a la enfermedad inflamatoria intestinal. Estos dos hechos apoyan la hipótesis de que la isoforma PPAR γ desempeña funciones antiinflamatorias.

Matizando estos resultados positivos se encuentra un estudio realizado con células madre embrionarias con una mutación doble negativa del gen PPAR γ y que fueron transformadas posteriormente en macrófagos [260]. Se desprendió de dicho estudio que PPAR γ es un regulador esencial de la expresión inducible de CD36. También que PPAR γ no es esencial para desencadenar efectos antiinflamatorios tras tratamientos con activadores de PPAR γ .

A través de su habilidad para incrementar la expresión de CD36 en macrófagos, PPAR γ es capaz de mejorar la fagocitosis de parásitos de malaria [350, 427]. El incremento de expresión de CD36 también podría ayudar a mejorar la limpieza de células apoptóticas ya que estas son fagocitadas a través de CD36 reduciendo así la posibilidad de una progresión no deseada hacia necrosis y una activación no regulada de una respuesta inflamatoria a través de señalización Receptor tipo Toll 2 (TLR 2) [428].

Los linfocitos T en estado no activado expresan PPAR α con una expresión de PPAR γ muy baja pero, al activarse los linfocitos por causa de un estímulo, la expresión de PPAR α disminuye rápidamente y aumenta la de PPAR γ . Ambas isoformas deben funcionar en diferentes aspectos de la fisiología de las células T.

Introducción

PPAR γ es capaz de inhibir la expresión de IL-2 tras la activación de células T y, de esta manera, tiene un efecto supresor en el desarrollo de la respuesta inmune. Una posible explicación a este descenso puede deberse a un incremento de apoptosis que se produce al activarse los linfocitos T en presencia de ligandos de PPAR γ [429-431]. Además de esta citocina, PPAR γ también afecta a la expresión de otras citocinas TH1 propias de linfocitos T tales como IFN γ . Este hecho junto con el efecto inhibitorio que tiene sobre la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas sugiere una posible función en la diferenciación de células T *naïve* a células T reactivas. En cambio, PPAR γ se expresa con fuerza en linfocitos T TH2 [432]. La mayor parte de estos efectos parecen suceder mediante una transrepresión del gen NF- κ B.

En linfocitos B se han hecho menos estudios pero al parecer los ligandos de PPAR γ tienen un efecto antiproliferativo y citotóxico tanto en linfocitos B normales como malignos. Los linfocitos B de ratones PPAR $\gamma^{+/-}$ son hiperproliferativos y presentan viabilidad incrementada tras su exposición a LPS con respecto a linfocitos B normales. Al investigar el mecanismo por el cual ocurrían estos efectos se descubrió que el gen NF- κ B se expresaba constitutivamente en los linfocitos B procedentes de ratones PPAR $\gamma^{+/-}$ [433].

En cuanto a las células dendríticas, los últimos estudios muestran que estas células expresan predominantemente la isoforma PPAR γ y que la activación inducida por ligando agonista de PPAR γ afecta a la maduración de estas células [256]. La presencia del ligando de PPAR γ Rosiglitazona durante la maduración de la dendrítica por ligando CD40 o por LPS altera el fenotipo de la membrana de estas células. Se incrementa CD36 y CD86 mientras que disminuye CD80. También se ha visto que se inhiben la expresión de quimiocinas tales como la proteína 10 inducible por IFN (IP10), Rantes o CCL5, MIP1 α y la citocina IL-12 [256, 355]. En otro estudio en el que los activadores de PPAR γ estuvieron presentes desde el estadio de monocito hasta el de dendrítica se obtuvieron DCs menos inmunoestimuladoras con cambios en los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras y una caída de la expresión de CD1a [353]. Otro estudio indica que la activación de PPAR γ en DCs es capaz de inhibir la capacidad migratoria de estas células [354].

3.5 RETINOIDES Y SISTEMA INMUNE

Tanto el RA como el 9cRA cumplen funciones críticas en el sistema inmune. Las células B expresan receptores tanto para RA como para 9cRA [434]. Las células T expresan receptores de 9cRA, los cuales controlan el desarrollo del timocito inhibiendo su entrada en apoptosis [435].

En cuanto a las células dendríticas, se sabe que los retinoides inducen apoptosis en las células dendríticas en ausencia de señales inflamatorias a través de heterodímeros RAR α :RXR. Sin embargo, al

añadir citocinas inflamatorias en cantidades que por sí mismas no producen efectos, los retinoides incrementan la actividad de unión a ADN de NF κ B en DCs, activan MHC II y la expresión de moléculas coestimuladoras, inducen la diferenciación de DCs inmaduras a maduras y mejoran la respuesta antígeno específica de linfocitos T. La maduración de las DCs se produce por una vía RXR dependiente/RAR independiente y una vía RAR α /RXR distinta de las que son responsables de la apoptosis [436].

OBJETIVOS

El DHA y otros ácidos grasos omega 3 (sobretudo el EPA) ejercen poderosos efectos en múltiples tejidos y tipos celulares entre los cuales se encuentra el sistema inmune. Muchas enfermedades autoinmunes presentan cuadros de menor gravedad al suplementar con DHA u otros ácidos grasos omega-3 la dieta de los pacientes [37, 148-150]. Se han asociado estos efectos paliativos a la capacidad que poseen estos ácidos grasos de regular la respuesta inmunológica atenuándola. En consecuencia, se han realizado muchos estudios a nivel celular para encontrar los mecanismos que permiten a estos ácidos grasos actuar de la forma en que lo hacen. En el sistema inmune se han estudiado bastante exhaustivamente casi todos los tipos celulares que lo integran: linfocitos, células natural killer, macrófagos, monocitos... Sin embargo la literatura científica hasta la fecha es escasa a la hora de presentar trabajos que aborden los efectos que los ácidos grasos omega-3 y, en concreto, el DHA ejerce sobre las células dendríticas, las cuales son, con diferencia, uno de los tipos celulares más importantes que integran el sistema inmune.

Teniendo en cuenta estas premisas, el principal objetivo del presente trabajo es el de evaluar al DHA como regulador de las células dendríticas. Para ello se presentan los siguientes objetivos principales de la tesis:

1. Determinar si el DHA ejerce algún tipo de efecto sobre el fenotipo, la inmunogenicidad y la supervivencia de las células dendríticas.
2. Determinar en qué medida estos efectos sobre las células dendríticas son también producidos por otros PUFAs tanto si son omega 3 como si no lo son.
3. Determinar los posibles mecanismos por los que el DHA y los otros ácidos grasos ejercen sus efectos en las células dendríticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO IV: MATERIALES

Para los estudios de toxicidad del DHA se han utilizado las líneas celulares KG-1a y Jurkat que fueron adquiridas de la ATCC y mantenidas en medio RPMI 10% FCS de Gibco (Paisley, Scotland, UK) con antibiótico de Biological Industries (Kibbutz beit Haemek, Israel).

De Sigma Aldrich (St Louis, MO) son el MTT, el inhibidor de PPAR γ GW9662, el 9cRA y las sales sódicas del DHA, del EPA, del ácido linoleico y del ácido Oleico. El Lipopolisacárido (LPS) (EC 055:B5) y la IL-4 también fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO).

La Rosiglitazona es de GlaxoSmithKline (Mississauga, Notario, US). De Molecular Probes, el *kit* de detección de apoptosis Anexina V. El *kit* de detección de activación de caspasa 3 es de Calbiochem. El diacetato/succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFDA-SE) se obtuvo de Molecular Probes (Leiden Netherlands).

El *kit* de purificación de monocitos ha sido el *Monocyte Negative Isolation Kit* de Dynal (ref 113.09) al igual que el concentrador magnético de partículas (MPC).

Los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC): anti-CD1a, anti-CD83, Anti-HLADR, anti-CD36 son de Pharmingen (Beckton&Dickinson, San Diego, Ca). Los anticuerpos monoclonales de ratón conjugados con ficoeritrina (PE) CD14, CCR7, CD80, CD86 también son de Pharmingen.

El *Factor estimulador de colonias de macrófago y granulocito* (GM-CSF), es del producto Leucomax 400 que fue adquirirlo de Novartis (Barcelona, Spain).

Los *kits* de medición de citocinas secretadas en medio celular para IL-12 y para IL-10 son ambos de Beckton&Dickinson Biosciences (Human IL-12 (p70) BD OptEIA ELISA Set y Human IL-10 BD OptEIA ELISA Set).

Los programas de citometría utilizados para el análisis de los datos han sido CellQuest (Beckton&Dickinson Biosciences, Mountain View, CA), *FlowJo* (Tree Star, Inc; Ashland; USA) y WinMDI software (Joseph Trotter).

CAPÍTULO V: MÉTODOS

5.1 ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR: PROTOCOLO DEL MTT

Introducción

Para medir los cambios en la viabilidad celular provocados por la presencia del DHA en el cultivo se escogió el método del MTT. Permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. La metabolización solo es realizada por parte de células viables mientras que no consiguen metabolizarlo aquellas cuya maquinaria celular se encuentra parada o aquellas que han muerto. La viabilidad celular se determina midiendo la reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial a partir del reactivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) que genera un producto medible colorimétricamente, denominado sal de formazán. Esta sal es un compuesto cromogénico insoluble en medio acuoso, pero soluble en DMSO y que se puede utilizar como medida de la viabilidad celular [437].

Procedimientos

Se han realizado curvas de viabilidad celular en placas de 96 pocillos sembrando 2×10^4 células por pocillo (tras un análisis del número de células idóneo en función de su tasa de crecimiento) con un volumen aproximado de 200 μl de medio por pocillo. Las células, contadas previamente, se distribuyen entre los diferentes pocillos de la placa de 96. Se añaden 20 μl por pocillo de una disolución de MTT de 7.5 mg/ml. Se incuban las células con el MTT durante una hora a 37 °C en el incubador celular de forma que las células viables metabolizan el compuesto y producen la sal formazán mientras que las no viables no consiguen metabolizarlo. Tras una hora se centrifugan las placas a 2000 rpms 5 min para que las células se sitúen en el fondo de los pocillos. Se extraen cuidadosamente los sobrenadantes procurando no tocar la parte plana de los pocillos donde se encuentran las células. Se añaden 100 μl de DMSO para disolver la sal formazán. Se dejan las placas en agitación durante 10 min para completar el proceso de disolución. Por último se mide la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad. Los resultados experimentales se han ajustado a la ecuación de Hill mediante el programa SigmaPlot 8.0 para determinar la IC_{50} .

5.2 ESTUDIOS DE APOPTOSIS

Durante el proceso de desarrollo embrionario de un organismo o durante los procesos encaminados a mantener la homeostasis de éste, es necesario eliminar células no deseadas. Este proceso se denomina muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis puede ser activada por diferentes estímulos tales como daño al ADN, citocinas, pérdida de matriz extracelular, etc... [438] Dentro del rango de procesos comúnmente utilizados en la detección de la apoptosis está la detección de degradación del ADN, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas. Para la evaluación de toxicidades celulares las mediciones con *Tripán Blue* no son suficientes ya que no permiten descartar a las células apoptóticas (que siguen siendo impermeables al *Tripán Blue* en los primeros estadios de apoptosis) de las necróticas [439, 440]. Por ello primeramente se ha estudiado el número de células que son todavía activas o viables. Se ha de tener en cuenta que, aunque el proceso apoptótico puede durar desde unas pocas h hasta unos días, una vez generado, las células apoptóticas tienen un tiempo de vida finito antes de desintegrarse [438].

Para evaluar si el DHA afectaba a la viabilidad celular a través de la apoptosis se utilizaron tres métodos que estudian distintas fases de la apoptosis: ciclo celular (apoptosis tardía), detección por anexina V (apoptosis temprana) y detección por activación de caspasas (activación del proceso molecular irreversible de apoptosis) [441].

5.2.1 Análisis del ciclo celular

Introducción

Este es un estudio de apoptosis tardía. Uno de los últimos pasos que se producen en el proceso de apoptosis es la fragmentación del ADN. Durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas, los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases. Las células apoptóticas tardías pueden ser reconocidas mediante citometría porque al tener el ADN fragmentado disminuye su grado de tinción por parte de fluorocromos específicos tales como el yoduro de propidio (PI) entre otros. El yoduro de propidio se intercala entre las bases del ADN de forma que se puede medir el tamaño de la cadena de ADN al ser esta proporcional al marcaje del fluorocromo. Se pueden utilizar también otros intercaladores de ADN que se puedan visualizar a través de un citómetro tales como 7-amino-actinomicina D, Bromuro de Etidio, Naranja de Acridina o Daunomicina. Puesto que lo que se mide es el tamaño del ADN de la célula también es posible medir el ADN en procesos de mitosis (en los cuales el tamaño del ADN aumentará). El tamaño del ADN es mayor si la célula se encuentra en fase G2 o M ya que entonces la célula contiene el doble de ADN,

baja en fase G1 o S y por último en caso de que la célula haya entrado ya en las fases finales de la apoptosis el ADN se encontrará fragmentado con lo que se detectarán en el citómetro fragmentos pequeños de ADN [442, 443].

Procedimientos

FIJACIÓN o PERMEABILIZACIÓN: Las células se lavan dos veces para eliminar los restos de medio con PBS y se resuspenden en etanol al 70% atemperado previamente a -20 °C durante 30 minutos como mínimo.

TINCIÓN: Antes de la tinción, las células son centrifugadas y se extrae la máxima cantidad de etanol posible. Tras esto se lavan las células con PBS. Se incuban las células con el reactivo de tinción (1 ml de PBS con 10 µg/ml PI, 100 µg/ml de Ribonucleasa A (RNAsa A) a -20°C). La RNAsa A ha de estar libre de proteasas y de DNAsas. Después de una noche a 4 °C, se resuspenden en PBS azida y se analizan en el citómetro de flujo. La finalidad de la ribonucleasa es eliminar los fragmentos de RNA que pueda haber en la muestra y que podrían alterar la tinción con PI. No se deben lavar las muestras antes de medir en el citómetro ya que la agregación del PI al ADN forma parte de un proceso de equilibrio y no es covalente.

ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO: Tras la debida localización de la población apoptótica se han de descartar de la medida citométrica los dobletes. Estos son conjuntos de dos o más células que el citómetro lee como un único evento. En consecuencia aparecen, si no se descartan previamente, poblaciones tetraploides o poliploides, además de falsas poblaciones diploides que desvirtuarían el experimento creando artefactos al alterarse las proporciones reales entre las distintas fases del ciclo celular así como las proporciones de células apoptóticas o necróticas. Para descartar los dobletes de la medida citométrica se utilizan dos parámetros del pulso de fluorescencia que emite el láser del citómetro. Se realiza un citograma enfrentando el Área del pulso Fluorescencia integrada (FL3-A para el PI) con la Señal de Anchura del pulso de la Fluorescencia (FL3-W para el PI) (Figura 5.1) [3, 442]. La fluorescencia del ADN de una sola célula se incrementará linealmente en el área de fluorescencia sin incrementos significativos en la anchura de fluorescencia. En cambio, los dobletes celulares y los agregados celulares causarán incrementos en la anchura de la señal en cada fase del ciclo celular. Por esta razón, excluyendo las señales que presentan estos incrementos se excluyen los dobletes y tripletes de las medidas citométricas.

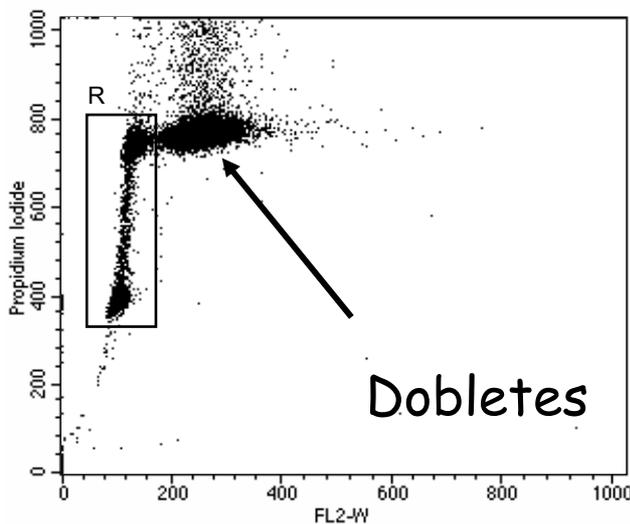
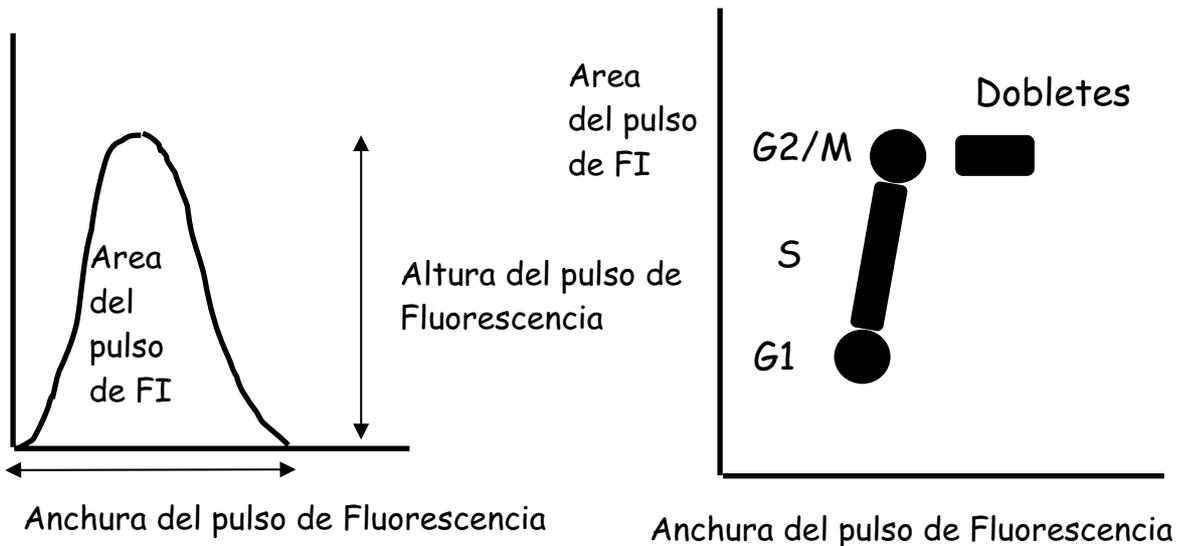


Figura 5.1. Diagramas explicativos del sistema de exclusión de dobletes de una medida de ciclo celular. Puesto que el área se mantiene constante y no ocurre lo mismo con la anchura del pulso de fluorescencia, se utiliza esta última para descartar los dobletes. Adaptado de [3]

5.2.2 Detección de Anexina V

Introducción

Es un estudio de apoptosis temprana. En los primeros estadios de la apoptosis se produce la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. En la apoptosis la integridad de la membrana se mantiene, es decir, la semipermeabilidad se encuentra presente. Sin embargo, se producen cambios en la simetría de la membrana. Uno de esos cambios es la distribución de la fosfatidil serina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, y que, al activarse el proceso de apoptosis, se transloca a la membrana externa.

Uno de los métodos que permiten detectar la presencia o ausencia de fosfatidilserina en el exterior de la membrana celular es el que utiliza Anexina V. Esta es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana celular. Tiene afinidad por la fosfatidil serina por lo que quedan marcadas con Anexina V aquellas células que se encuentren en apoptosis. La detección de Anexina V se debe acompañar

de una tinción con Ioduro de propidio (PI), para asegurar que la integridad de la membrana celular se mantiene intacta. En caso contrario, se obtendría un marcaje positivo para Anexina V pero sería debido a que la membrana celular, al estar deteriorada, perdería su condición de impermeable a muchas sustancias permitiendo la entrada en el interior de la Anexina V y, en consecuencia, el marcaje de la fosfatidilserina desde el interior de la misma. La combinación de PI y de Anexina V en la misma medida citométrica nos permite diferenciar células en apoptosis temprana de células en apoptosis tardía o en necrosis [444].

Procedimientos

Se mide el grado de translocación de la fosfatidilserina en la membrana celular con marcaje mediante Anexina V (Molecular Probes) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se resuspenden las células en *Anexin buffer* a una concentración de 10^6 células/ml. Se toman 100 μ l de *Anexin buffer* (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 ; pH 7.4) previamente atemperado a temperatura ambiente durante 15 min. Se añaden 5 μ l de Anexina V a cada suspensión celular. Se incuba en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min. Tras incubar se añaden 400 μ l de *Anexin buffer*. Se mantienen las muestras en hielo procurando realizar el análisis en el citómetro de flujo lo antes posible. No es necesario lavar en este último paso.

5.2.3 Determinación de la actividad caspasa

Introducción

La determinación de la activación de las moléculas que activan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de la misma. Tal es el caso de las caspasas (**cysteine-aspartic-acid-proteases**), que son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células. La activación de la caspasa-3 se utiliza como marcador temprano de apoptosis. Este tipo de marcador es de gran importancia a causa de que la detección *in vivo* de marcadores de la degradación del ADN no siempre es exitosa pues estas células suelen ser fagocitadas y eliminadas incluso antes de que tal degradación se encuentre presente. La detección de la activación por caspasa-3 presenta la ventaja de que es un evento que presenta una alta correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre presente en otros marcadores en los que su presencia o ausencia no son determinantes en el proceso de muerte celular programada [438, 441, 445].

La activación de caspasa-3 (sinónimos: CPP32, YAMA, Apopain) juega un papel clave durante el proceso de apoptosis. Una vez la caspasa-3 se ha activado, no hay posibilidad de volver a un estado de viabilidad normal; el programa de muerte celular se desarrollará de forma irreversible. El resultado de dicha activación es la degradación de las proteínas celulares, condensación apoptótica de la cromatina y fragmentación del ADN [438, 441, 445].

Materiales y Métodos

El sistema utilizado para medir la activación de caspasa-3 es mediante *Phiphilux*, un sustrato peptídico de la caspasa-3 conjugado a dos fluoróforos (G₁D₂). El sustrato contiene la secuencia GDEVDGI donde se ha subrayado el lugar de corte de la caspasa. El sustrato que surge de la activación tiene una fluorescencia verde con un pico de excitación a 505 nm y uno de emisión a 530 nm.

Procedimientos

El proceso de medición de la apoptosis se realizó tal y como describe el fabricante (Calbiochem). Brevemente:

Se alicuotan las células en tubos de 1.5 o 2 ml, se centrifugan y se elimina el medio celular para minimizar la dilución del sustrato. A cada uno de los pellets se les añade unos 50 µl de solución de sustrato. El número de células en estas soluciones debe estar entre 0.5 y 1 millón por muestra. Se mezclan bien la suspensión con las células de la forma más suave posible. No se debe utilizar un vórtex pues las células apoptóticas pueden ser bastante frágiles.

Se incuban los **tubos abiertos** en un incubador al 5% CO₂, 37 °C durante 60 minutos. No se debe exponer la solución sustrato a la luz directa o pHs extremos. La adición del buffer HEPES, pH 7.4 a una concentración final de 20 mM mantendrá el sustrato a pH fisiológico durante el experimento.

Una vez haya transcurrido la hora, se lavan las células añadiendo 1 ml de tampón de dilución de citometría que haya estado en hielo previamente; se centrifuga y se extrae todo el tampón. Se resuspenden suavemente los pellets sin vortearlos. Se mantiene la solución en hielo hasta el análisis en el citómetro de flujo. Todas las muestras deberían ser analizadas en un tiempo comprendido entre 60 y 90 min desde el final de la incubación a 37 °C.

Se recomienda la adición de PI para discriminar las células que sean Ioduro de propidio positivas.

5.3. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

5.3.1 Obtención de células mononucleadas

Introducción

La transfusión de hemoderivados forma parte de la práctica clínica diaria de múltiples especialidades en la medicina actual. A pesar de los avances en inmunohematología y de la rigurosa normativa en materia de seguridad transfusional, persiste el riesgo, aunque sea muy bajo, de transmisión de infecciones mediante la transfusión o de que se originen otros efectos adversos.

Además, la sangre no está exenta de riesgos, por lo que sólo debe ser utilizada cuando sea estrictamente necesaria. Por otro lado, se trata de un bien escaso por el bajo número de donantes, por el aumento de las necesidades a causa de la complejidad de la medicina actual y por no disponerse de productos alternativos comerciales.

Implica riesgos, porque a pesar de excluir a los donantes de riesgo, ser la donación un acto no retribuido, y la mejora de las técnicas en la detección de la infectividad de los productos potencialmente contagiosos, existe aún la posibilidad de transmitir infecciones y producir efectos indeseables mediante las transfusiones, que en algunos casos tienen consecuencias fatales.

Estas características, la escasez y el riesgo, son las razones que han motivado el desarrollo de metodologías de fraccionamiento de la sangre total que permiten reducir en parte el riesgo patológico y optimizar el uso de la sangre al máximo. De una donación de sangre total, con la tecnología disponible en un Banco de Sangre, se pueden obtener los siguientes componentes: concentrado de hematíes, concentrado de plaquetas, plasma fresco y crioprecipitado.

Uno de los productos de deshecho que se obtienen en la producción de algunos de estos componentes es la capa leucoplaquetaria, también conocida como *Buffy Coat*. En esta fracción sanguínea se encuentran grandes cantidades de plaquetas, eritrocitos y leucocitos. Este producto de deshecho, convenientemente tratado, puede utilizarse para la obtención de grandes cantidades de células dendríticas a partir de los monocitos que se encuentran en el mismo. Para que esto pueda realizarse con garantías de éxito, el proceso de purificación y cultivo de los monocitos ha de hacerse antes de las 24 h siguientes a la extracción sanguínea.

Procedimientos

En un *Buffy Coat* se encuentran grandes cantidades de leucocitos, eritrocitos y plaquetas. El primer paso a realizar es aislar la fracción de células mononucleadas (principalmente linfocitos, monocitos y células *Natural Killer*) presente en el *Buffy Coat* y separarla de las plaquetas, de los eritrocitos y de los polimorfonucleares (granulocitos). Para conseguirlo se procede como sigue:

Una vez distribuidos los aproximadamente 50 ml de sangre presentes en el *Buffy Coat* en tres tubos de 50 ml, se llenan los tubos con PBS y se centrifuga a 1500 rpms durante 10 min. Este paso tiene como objeto purificar la fracción celular al máximo y eliminar el plasma. Si se realiza bien y la sangre se encuentra en condiciones, al acabar la centrifugación se obtendrán dos fases: una superior de un color amarillento (fase plasmática) y otra inferior de color rojo (fase celular). En caso contrario ambas fases serán rojizas debido a la lisis de eritrocitos en la fase plasmática.

Se extrae el plasma. Se enrasan todos los tubos a 35 ml con PBS. En otros tres tubos se ponen 15 ml de Ficoll Paque™. Se dejan caer lentamente las células sobre el Ficoll (la sangre no debe caer

Materiales y Métodos

directamente sobre él sino sobre el tubo e ir resbalando de forma que se deposite suavemente sobre el mismo manteniéndose las dos fases). En caso contrario la fracción sanguínea penetraría en el Ficoll contaminando con eritrocitos la purificación mononuclear. A continuación se centrifuga a 2000 rpms al menos 20 min.

Tras esto obtendremos tres tubos cuyo interior se encontrará dividido en dos fases: una fase superior donde se encuentran grandes cantidades de plaquetas y una fase inferior rojiza donde habrán ido a parar la mayoría de los eritrocitos. En la zona donde se tocan ambas fases debería haber una capa blanca de células. Estas son las células mononucleadas mezcladas con plaquetas. Se toma la banda de Células Mononucleadas (CMN) por encima de la misma hasta tener un volumen aproximado de 10 ml finales.

Se añade PBS a las CMNs hasta llenar los tubos de 50 ml. Se centrifuga de nuevo a 2000 rpms 10 min para eliminar los restos de Ficoll que puedan haber quedado al realizar la extracción de la capa. Para eliminar el máximo número de plaquetas posibles se centrifuga varias veces cada tubo a una velocidad de 1350 rpms durante 10 minutos.

Tras la última centrifugación se unen los contenidos de los tres tubos y se realiza un conteo en un hemocitómetro Coulter.

Se suelen obtener entre 10^9 i $0,5 \cdot 10^9$ CMN por *Buffy Coat* compuestas por linfocitos en un 90% y monocitos en un 10% aproximadamente.

5.3.2 Separación de monocitos y linfocitos

5.3.2.1 Separación por adherencia

Introducción

La banda mononucleada está compuesta principalmente por linfocitos y monocitos una vez la separación de las plaquetas se ha hecho efectiva. Normalmente habrá un 90% de linfocitos y alrededor de un 10% de monocitos. Los monocitos presentan una capacidad de adherencia al plástico mucho mayor que los linfocitos por lo que se puede utilizar este parámetro para conseguir su purificación parcial. Normalmente con este sistema se puede llegar a obtener una purificación de monocitos que oscila entre el 35% y el 70% dependiendo de diversos factores tales como los lavados, la calidad del *Buffy Coat* o la variabilidad de las fuentes. La principal ventaja de este método es que los linfocitos lavados pueden ser aprovechados para ulteriores experimentos. Su inconveniente es un rendimiento en ocasiones muy inferior al de las bolas magnéticas.

Procedimientos

Se incuban durante dos h en placas Costar de 6 pocillos alrededor de 15 millones de mononucleadas por pocillo en un volumen de unos 3 ml de medio RPMI 10% Fetal Calf Serum Heat Inactivated atemperado previamente a 37° C.

Tras la incubación se lavan las células con medio atemperado varias veces de forma suave para eliminar el máximo número de linfocitos de los pocillos. Después se añaden 2 ml de medio fresco.

5.3.2.2 Separación mediante bolas magnéticas

Introducción

La purificación con bolas magnéticas se ha realizado utilizando el *kit Monocyte Negative Isolation Kit* de Dynal (ref 113.09) siguiendo las instrucciones del protocolo del *kit*. El aislamiento de los monocitos ha de ser negativo, es decir, marcando todas las células que no son monocitos sin tocar a los mismos monocitos. El marcaje se realiza de esta forma porque los monocitos marcados con bolas magnéticas se activan lo cual impediría su diferenciación en células dendríticas. Al marcar todas las células mononucleadas exceptuando los monocitos, las bolas magnéticas permiten extraer todas estas células quedando la suspensión celular enriquecida únicamente en monocitos. Con este método se obtienen purificaciones del 80% o más en monocitos y el número de células totales es también muy elevado. Su principal inconveniente es el coste económico y la imposibilidad de reutilizar los linfocitos marcados con bolas magnéticas para posteriores experimentos.

Procedimientos

Previamente a cualquier paso se lavan las bolas magnéticas con PBS 0.1% BSA para eliminar la azida presente en la disolución. El volumen de PBS 0.1% BSA ha de ser igual al que se tomó inicialmente.

Se resuspenden las células mononucleadas a razón de $5-10 \times 10^7$ /ml en 0.1% de BSA. Se añaden 20 μ l de reactivo de bloqueo por cada 10^7 MNC. Se añaden también 20 μ l de la suspensión de anticuerpos por cada 10^7 MNC. Se incuban 10 minutos a 2-8 °C. Se lavan las células añadiendo 1 ml de PBS 0.1% BSA por cada $1-5 \times 10^7$ MNC y se centrifuga 8 min a 500 g. Se descarta el sobrenadante con una pipeta.

Se resuspenden las células a razón de 0.9 ml por cada 10^7 MNC. Se añaden las bolas magnéticas lavadas a razón de 100 μ l por cada 10^7 MNC. El volumen final debería ser de 1 ml por cada 10^7 MNC. Se incuba con agitación suave 15 min a 2-8 °C. Se resuspende la mezcla pipeteando cinco o seis veces antes de aumentar el volumen añadiendo 1-2 ml de PBS 0.1% BSA por cada 10^7 MNC.

Finalmente se coloca en el MPC Dynal 2 minutos y se traslada el sobrenadante (que contendrá los monocitos) a un tubo nuevo.

5.3.3 Diferenciación de monocitos en DCs

Procedimientos

Una vez obtenidos los monocitos y sembrados en los pocillos de las placas de 6 se añaden unas 500 U/ml de IL-4 (Sigma) y 500 U/ml de GM-CSF (Leucomax 400 Novartis). A los tres días se añaden de nuevo 300 U/ml de IL-4 y 500 U/ml de GM-CSF. A los seis días los monocitos se habrán convertido en DCs inmaduras. Se les añade el estímulo de maduración (LPS, TNF- α , Poly (I:C) etc...) que las transformará en DCs maduras en 48 h.

5.3.4 Adición de metabolitos

Introducción

El DHA se ha añadido en tres momentos de la diferenciación monocito-dendrítica diferentes: desde el inicio del experimento hasta la maduración inclusive; únicamente hasta el proceso de maduración cambiando el medio por medio fresco sin DHA previamente a la adición del estímulo madurativo y, finalmente, realizando el proceso de diferenciación monocito-dendrítica en ausencia de DHA y añadiéndolo al comenzar el proceso de maduración. El DHA estuvo siempre a concentraciones no citotóxicas. Todos los compuestos ácidos que se han utilizado se añadieron al medio en forma de sal para evitar alteraciones del pH en el medio celular.

Procedimientos

El inhibidor específico de PPAR y GW9662 se ha añadido siempre a concentración 10 μ M los días 1, 3 y 6.

El ácido eicosapentaenoico, el ácido α -Linoleico, el ácido oleico, el activador de PPAR γ Rosiglitazona y el activador de RXR 9CRA se añadieron siempre al principio de la diferenciación en concentraciones que no provocasen apoptosis.

Los estímulos de maduración utilizados fueron LPS y superantígeno SEB.

Citometría

Las células son extraídas de las placas de 6 pocillos. Inmediatamente se las somete a un pulso de centrifugación y se resuspenden en tampón FACS. Este tampón contiene Azida la cual paraliza a la célula impidiéndole endocitar los anticuerpos de marcaje. Una vez se ha añadido el tampón FACS a las células, la medida citométrica se ha de realizar durante las 24 h siguientes a la adición. Pasado ese tiempo las células comienzan a degradarse.

Se realizan dos lavados con tampón FACS. Los pellets se resuspenden en 50 µl de tampón FACS cada uno. Se añaden los anticuerpos. Se incuba durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras esto se añaden 300 µl de tampón FACS y se mide en el citómetro.

En las ocasiones en que las células hayan recibido algún tipo de tratamiento inductor de apoptosis es conveniente filtrar las células antes de medir en el citómetro. De lo contrario pueden producirse agregados celulares que podrían llegar a impedir el paso del flujo por el citómetro atascándolo. El procedimiento de filtrado es muy sencillo. Consiste en hacer pasar la disolución con las células a través de una malla de nylon acoplada a una jeringa de un mililitro.

5.3.5 Carga de la célula dendrítica con antígeno

Introducción

Previamente al enfrentamiento de la dendrítica con los linfocitos esta ha de ser cargada con antígeno. Se han probado dos tipos de antígeno: SEB y LPS. Ambos se añadieron como mínimo 4 h antes del enfrentamiento.

Procedimientos

Se añade el antígeno en las cantidades determinadas al medio celular de las DCs. Tras 4 h de espera se centrifugan las células, se elimina el sobrenadante y se añade medio nuevo. Estos lavados se realizan dos veces como mínimo para eliminar restos de antígeno no cargado por las DCs.

5.4 PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS

5.4.1 Congelación de CMNs

Introducción

Al mismo tiempo que se purifican monocitos por adhesión al plástico, la fracción que no se adhiere se enriquece en linfocitos. Las células mononucleadas no adherentes que resultan de una purificación por adherencia al plástico son principalmente linfocitos en más de un 90%.

Procedimientos

Los linfocitos purificados por no adhesión al plástico se congelan en plasma autólogo utilizando DMSO al 10% como solución de criopreservación. No se añade ni medio ni FCS inactivado, únicamente plasma autólogo. A este plasma se le hace el siguiente tratamiento previo: añadir cloruro cálcico con el objetivo de extraer la fibrina presente en el plasma mediante coagulación del fibrinógeno. Tras una hora de incubación a 37 ° C en presencia de calcio se forma un coágulo por agregación de las proteínas del plasma.

Materiales y Métodos

Tras la extracción de este coágulo, el plasma se pasa por filtros de 45 µm para eliminar restos celulares, plaquetas, agregados proteicos y también para esterilizarlo.

5.4.2 Descongelación de CMNs

Introducción

La descongelación es más laboriosa. No todas las células son viables tras la descongelación. Aproximadamente se pierden entre un tercio y la mitad de las células que fueron congeladas. La adición de la DNAsa tiene como finalidad eliminar las hebras de ADN que quedan en disolución provenientes de células no viables. Este ADN es capaz de formar redes y arrastrar grandes cantidades de células por lo que es importante su degradación preventiva.

Procedimientos

El primer paso consiste en descongelar lo más rápidamente posible los viales criopreservados. No se debe usar para ello ni la mano, ni el medio ambiente. Se utiliza una disolución atemperada a 37 °C. Este paso es muy importante porque los linfocitos son células muy frágiles. Tras la descongelación se disuelve el contenido de los viales en 40 ml de PBS y se centrifuga a 1500 rpm 5 minutos para que el contenido de DMSO quede por debajo del 1% (concentración no tóxica). Una vez finalizada la centrifugación se añaden 100 U de DNAsa/ml y 24 µl de MgCl₂ 0.5 M para degradar el ADN liberado por las células no viables. Después se incuban las células 15 min a 2-8° C.

5.4.3 Marcaje intracelular con CFDA/CFSE

Introducción

La mayoría de los científicos que trabajan con proliferaciones linfocitarias utilizan dos métodos para evaluarlas: el marcaje con timidina tritiada y el marcaje con CFSE u otro fluorocromo de características similares. Los partidarios de uno u otro método aportan argumentos contundentes para defender sus posturas y también para invalidar el método contrario. El marcaje radiactivo es mucho más rápido de llevar a cabo y aporta parámetros cuantitativos que permiten evaluar las proliferaciones fácilmente. Sin embargo, nada dicen sobre lo que ocurre en el cultivo. No permitirían distinguir por ejemplo una proliferación de 5000 linfocitos durante dos generaciones de una proliferación de 350 que hubiese durado 5 generaciones (en el supuesto hipotético de que no se activase la apoptosis durante la proliferación y que todas las células se dividiesen). Únicamente se obtiene dos datos: punto inicial y punto final. Todo lo que ha ocurrido durante el proceso es una incógnita.

En cambio, el marcaje con CFSE permite una aproximación mucho mayor a lo que está pasando realmente en el cultivo. Permite saber si las células están proliferando o no y con qué intensidad lo están haciendo. Una contaminación del cultivo sería rápidamente detectada porque es difícil que el contaminante

se encuentre ubicado en la misma zona del citograma que los linfocitos. Además permite descartar los linfocitos no viables que continuamente mueren al proliferar las células y que el método de la timidina tritiada cuenta como válidos si todavía no han sido degradados por completo del cultivo. La desventaja del método citométrico es que el análisis no es cuantitativo como en el método radiactivo por lo que se hace necesario un análisis más exhaustivo de los datos obtenidos para conseguir resultados objetivos.

Por ello se ha realizado un gran esfuerzo para proporcionar datos estadísticos que permitan evaluar objetivamente las proliferaciones medidas con CFSE. Hace pocos años se han desarrollado programas como el *FlowJo* (Tree Star, Inc; Ashland; USA) que, de una manera totalmente automatizada, evalúa y calcula las diferentes generaciones presentes en el histograma y también muchos otros parámetros estadísticos, entre los cuales se encuentra el porcentaje de células iniciales que se dividieron (*Porcentaje de Células Divididas; %DC*). Este parámetro trata de calcular mediante cálculos de crecimientos poblacionales reversos la proporción de linfocitos presentes en la población primigenia que se activaron y dieron lugar a la distribución de poblaciones generacionales que muestra el citómetro. Este parámetro no coincide en absoluto con el número real de linfocitos que se activaron puesto que la activación linfocitaria provoca la entrada en apoptosis de gran cantidad de linfocitos en cada duplicación, los cuales son descartados al realizar los estudios. Sin embargo, sí es un análisis objetivo de los resultados desde el punto de vista comparativo.

No obstante, a pesar de estos avances, el método radiactivo sigue contando con una ventaja inapreciable con respecto al método citométrico: es más sencillo de llevar a cabo y consume menos tiempo.

En esta tesis se utilizarán tres parámetros para evaluar la proliferación linfocitaria producida por las DCs. El primero de los parámetros se centrará en evaluar el estado de las DCs exclusivamente, de manera que la proliferación únicamente será estudiada en relación al estado de la dendrítica. Los otros dos parámetros servirán para intentar caracterizar las proliferaciones que la dendrítica está provocando. Se aportarán los histogramas de las DCs tratadas con los diferentes compuestos y se intentará comparar las proliferaciones tratadas con las proliferaciones control (tanto las de relación 1:10 como inferiores). De esta manera, si un enfrentamiento linfocito dendrítica (tratada previamente con un producto determinado) sufre una disminución en su capacidad de activación de la proliferación celular hasta un punto tal que una relación 1:10 de dendrítica(tratada)-Linfocito es similar a una proliferación 1:40 del control (dendrítica sin tratar), se podrá afirmar que la funcionalidad de la dendrítica tratada es de un 25% o que su capacidad de estimulación proliferativa linfocitaria se encuentra disminuida en un 75% ya que se necesitan 4 DCs tratadas para realizar el mismo trabajo que las DCs control realizan con una. Con este parámetro se compararán exclusivamente DCs entre sí, aunque sirviéndose de su efecto funcional sobre las proliferaciones. También se aportarán los parámetros de porcentajes de generaciones y el porcentaje de

Materiales y Métodos

células iniciales que se han dividido (%DC). Estos dos últimos parámetros servirán para comparar las proliferaciones linfocitarias.

El CFDA/CFSE es un compuesto capaz de difundir pasivamente a través de las membranas celulares. El CFSE consiste en una molécula de fluoresceína con dos grupos acetato y un grupo funcional éster succinimida. En este estado, es permeable, incoloro y no fluorescente. Tras entrar en la célula, esterases intracelulares eliminan los grupos acetato, transformando el compuesto en Carboxifluoresceína Succinimidil Ester, el cual es altamente fluorescente y no permeable a la membrana celular. Además el Succinimidil éster reacciona con grupos amino de proteínas intracelulares, formando grupos conjugados fluorescentes que son bien retenidos en la célula. Las proteínas que tienen una vida larga, incluyendo algunos componentes del citoesqueleto, son los que se cree que confieren al CFSE la larga duración de su tinción. El exceso de compuesto sin conjugar y los productos colaterales difunden pasivamente al medio extracelular, donde pueden ser lavados y eliminados.

Los aductos proteína-CFSE que se forman en las células marcadas son retenidos por las células a través de su desarrollo, meiosis e incluso pueden usarse *in vivo*. El marcaje es heredado por las células hijas tras la división celular, o por fusión celular y no es transferida a otras células adyacentes de la población. Linfocitos teñidos con CFDA-SE pueden ser detectados hasta ocho semanas después de la inyección en ratones en estudios de migración linfocitaria; hepatocitos viables teñidos de forma similar fueron localizados fácilmente mediante microscopía de fluorescencia incluso 20 días después del trasplante intrahepático.

Los picos aproximados de excitación y emisión de este producto tras la hidrólisis son 492 nm y 517 nm respectivamente. Las células marcadas con CFDA-SE pueden ser visualizadas con microscopía de fluorescencia. Se recomienda que para tinciones a largo plazo (más de tres días) o para células con tiempos de división muy rápidos la concentración no baje de 5-10 μM . En experimentos más cortos tales como ensayos de viabilidad la concentración ideal oscila entre 0.5-5 μM . Para mantener la fisiología celular normal y reducir al máximo los potenciales artefactos producidos por una sobrecarga se recomienda mantener siempre la concentración de tinción lo más baja posible. El marcaje con CFDA-SE puede llegar a ser tóxico y puede inducir parada en el crecimiento celular así como apoptosis en algunos tipos celulares si se encuentra en concentraciones excesivas.

En el tratamiento con linfocitos, el marcaje con CFSE permite diferenciar hasta 8 ó 10 divisiones celulares. Esto viene determinado por la autofluorescencia de los linfocitos no teñidos. El tiempo que suelen emplear los linfocitos en realizar 6-7 divisiones suele ser de 96 h o 4 días.

Procedimientos

El marcaje se ha realizado disolviendo el CFDA-SE en estado sólido en DMSO hasta tener una concentración de 35 µg/µl. Se diluye después el compuesto en PBS hasta tener una concentración de 10 µM. Todos los lavados tras el marcaje se han realizado con RPMI 10% FCS Heat Inactivated. La alta concentración de proteína ayuda a inactivar el CFDA-SE que no ha reaccionado.

Se resuspenden las células en PBS a una concentración que puede oscilar entre 10⁶ células/ml y 50 x 10⁷ células/ml. Las células deben estar en una sola suspensión. Si es necesario deben ser filtradas a través de una red de nylon justo antes del marcaje para evitar la formación de agregados celulares. Los volúmenes totales de reacción no deberían exceder los 4 ml en un tubo de 15 ml por lo que las suspensiones celulares no deben ser superiores a 2 ml cada una.

Se prepara la solución de CFDA-SE del stock de DMSO a una concentración doble que la concentración final de marcaje. El marcaje de los linfocitos se realiza a 5 µM por lo que preparamos una solución de 10 µM en CFDA-SE. El volumen de CFDA-SE será el mismo que el de la disolución que contiene la suspensión celular: 2ml. Se mezclan ambas soluciones, se agitan suavemente y se incuban de 5 a 10 min a 37 °C.

Una vez realizado el marcaje se llenan los tubos con medio de cultivo (RPMI 10% FCS HI) hasta el máximo posible y se centrifuga. Se lavan las células con medio de cultivo tres veces a temperatura ambiente. Para reducir la cantidad de CFDA-SE sin unir presente en las células, se incuban las células 5 min a 37 °C tras el segundo lavado y previamente al tercero. Esto permite que el CFDA SE que no ha reaccionado difunda fuera de las células y pueda ser eliminado en el lavado final.

5.4.4 Enfrentamiento linfocito-dendrítica

Introducción

Las DCs cargadas con un determinado antígeno pueden activar la proliferación linfocitaria en poblaciones de linfocitos no activados previamente. Estas proliferaciones suelen ser óptimas cuando la relación dendrítica:Linfocito es de 1:10. Con relaciones menores tales como 1:20 o 1:40 las proliferaciones también se producen aunque con menor intensidad. En cambio, las proliferaciones sufren descensos acusados al pasar de 1:40 a 1:80 o 1:160. En este punto se produce un salto cualitativo importante en la capacidad de activar proliferaciones linfocitarias por parte de la célula dendrítica.

Procedimientos

Las células dendríticas y los linfocitos se cultivaron conjuntamente a razón de 10⁵ linfocitos por pocillo y concentraciones de DCs que oscila entre 10⁴ y 0.5 x 10² en un volumen final de 200 µl de medio RPMI 10% FCS Heat Inactivated. Previamente al cocultivo las células dendríticas habían sido irradiadas con

Materiales y Métodos

una fuente de rayos gamma en el caso de purificación de monocitos por adherencia. En el caso de purificación de monocitos por bolas magnéticas no se creyó necesario ningún tipo de irradiación. Los linfocitos habían sido teñidos con CFSE a una concentración final de 5 μ M.

Tras ser cultivadas 96 h el contenido en CFSE de las células fue medido mediante citometría. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Los controles que se realizaron fueron los siguientes: Fracción celular dendrítica cultivada sola para comprobar la capacidad proliferativa de los linfocitos blancos (no cargados con CFSE) sin marcar y linfocitos marcados para evaluar la posible toxicidad del CFDA SE.

Citometría

Los linfocitos marcados con CFSE no necesitan ningún marcaje adicional. El propio CFSE es un compuesto cromogénico medible citométricamente por lo que se resuspenden en tampón FACS tras dos lavados y se pasan las células directamente por el citómetro.

Se hizo un estudio previo para evaluar la incidencia de dobletes entre los linfocitos proliferativos que falseasen la distribución de la población entre las diferentes generaciones. El resultado fue que las medidas de dobletes no eran significativas en absoluto y por lo tanto pudieron ser despreciadas.

5.5 MEDICIÓN DE CITOCINAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR

Introducción

En respuesta a la detección por parte de las células dendríticas del antígeno extracelular se produce la activación de mecanismos de secreción de citocinas entre las cuales se encuentran IL-10 e IL-12. Estas dos citocinas se encuentran en concentraciones máximas en los medios extracelulares a las 24 h de haber entrado en contacto la dendrítica con el estímulo.

Procedimientos

Todas las células dendríticas que se utilizaron para la medición de secreciones de citocinas fueron obtenidas de *Buffy Coats* y purificadas mediante el uso del *Negative Monocyte Isolation Kit II de Dynal*. Tras 6 días de cultivo con IL-4 y GM-CSF se les añadió a las mismas LPS a una concentración de 500 ng/ml. Los máximos de IL-12 e IL-10 se presentan a las 24 h de adicionar LPS.

A las 24 h de adicionar LPS se aspira el medio, se centrifugan los viales y se recogen los sobrenadantes. Estos se congelan inmediatamente a -80° C para su uso posterior.

Se utilizó los kits Human IL-10 Elisa Set y Human IL-12 Elisa Set. Estos kits permiten la reconstitución de hasta 20 placas de Elisa cada uno. Cada placa de Elisa se ha de preparar 24 h antes de su utilización. Brevemente:

Preparación de la placa de Elisa. La placa de Elisa se prepara añadiendo 100 µl por pocillo de anticuerpo de captura diluido en el *coating buffer*. Se sella la placa y se incuba *overnight* a 4 °C. Al día siguiente se aspiran los pocillos y se lavan con volúmenes de buffer de lavado superiores a 300 µl al menos tres veces. Tras el último lavado se invierte la placa y se presiona sobre papel absorbente para eliminar cualquier buffer residual.

Bloqueo de la Placa de Elisa. Las placas se bloquean con 200 µl de *Assay Diluent*. Se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras esto se lava de nuevo con 300 µl de buffer de lavado tres veces. Tras cada lavado se invierte la placa y se golpea sobre papel absorbente para eliminar cualquier buffer residual.

Reconstitución de los Estándars. Tras atemperar el liofilizado, se abre el vial y se reconstituye el liofilizado con 1 ml de agua desionizada. Esto será la solución estándar madre. Se deja que el estándar se homogeneice durante 15 min antes de realizar diluciones posteriores. Vortear suavemente para mezclar los componentes. A partir de la solución estándar reconstituida se preparan soluciones estándar de 500 pg/ml a 7.8 pg/ml diluyendo un 50% cada vez.

Preparación de la placa. Se pipetea 100 µl de cada estándar, muestra y control en los pocillos apropiados. A continuación se sella la placa y se incuba 2 h a temperatura ambiente.

Revelado de la placa. Se aspiran los pocillos y se lava de nuevo con 300 µl de buffer de lavado pero esta vez cinco veces. Los lavados se realizan de la misma forma que los anteriores. Se añaden 100 µl de Working Detector (Anticuerpo de detección junto con reactivo Avidin-HRP) a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras esto se lava la placa de nuevo pero esta vez siete veces. Además esta vez antes de comenzar un nuevo lavado se mantienen los pocillos sumergidos en la disolución de lavado entre 30 segundos y 1 minuto.

Se añade la solución de sustrato a cada pocillo. Se incuban las placas (sin haberlas sellado esta vez) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Se adicionan 50 µl de la solución stop a cada pocillo. Se ha de leer la placa a 450 nm dentro de los 30 minutos siguientes a la adición de la solución stop. Si la corrección de la longitud de onda es posible, se sustraen la absorbancia de 570 nm de la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro.

RESULTADOS

**CAPÍTULO VI: EFECTOS DE LOS PUFAs SOBRE LA
CÉLULA DENDRÍTICA**

6.1 TOXIDIDAD CELULAR DE LOS PUFAs

6.1.1 Límite de viabilidad celular con DHA

Uno de los resultados más frecuentemente observados y publicados al tratar células con DHA es la entrada en apoptosis de las mismas. Como ya se ha comentado en la introducción, el DHA afecta a la supervivencia de numerosas líneas celulares [126-138, 140-146]. Por ello, y con ánimo de determinar el umbral de concentraciones letales de DHA para las células del sistema inmune, se procedió a realizar estudios de viabilidad celular (MTT) y determinación de apoptosis celular (Anexina V y Caspasa 3) a concentraciones crecientes de este ácido graso.

Se han estudiado dos tipos celulares del sistema mieloide-Linfoide: las células Jurkat y las KG-1a. Las células Jurkat pertenecen al sistema linfoide mientras que las KG-1a al sistema mieloide. Ambas presentan pérdida de viabilidad celular a concentraciones crecientes de DHA según los resultados obtenidos. En la Figura 6.1 se muestra la viabilidad celular de ambos tipos celulares a las 72 h de incubación a concentraciones crecientes de DHA. La IC_{50} para las KG-1a se sitúa en $88 \pm 2.3 \mu M$ y para las Jurkat en torno a $70 \pm 5.32 \mu M$.

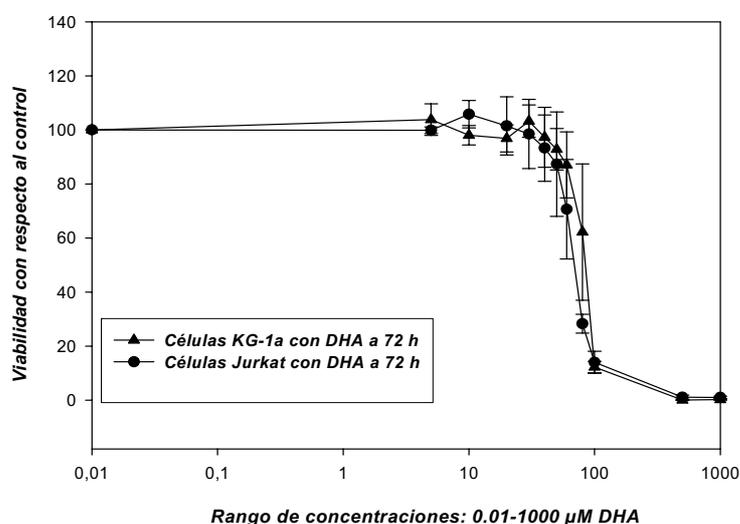


Figura 6.1. Viabilidad celular en función de la concentración de DHA. Dicha viabilidad fue medida por metabolización de MTT de 2×10^4 células Jurkat o KG-1a en presencia de concentraciones crecientes de DHA durante 72 h. Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad. Cada resultado corresponde a una media de al menos cuatro experimentos independientes. La IC_{50} para las KG-1a se situó en $88 \pm 2.3 \mu M$ y para las Jurkat en torno a $70 \pm 5.32 \mu M$.

Para saber si el decremento en la viabilidad celular era debido a la inducción de apoptosis celular se realizaron experimentos adicionales de medida de apoptosis por Anexina V. Este método de detección obliga a determinar estrictamente el momento de la entrada en apoptosis de las células puesto que las células Anexina V⁺PI⁻ solo se encuentran presentes en estadios iniciales de dicho proceso. Se realizaron experimentos de medición de Anexina V a las 24, 36, 42 y 48 h de la incubación con DHA.

Resultados

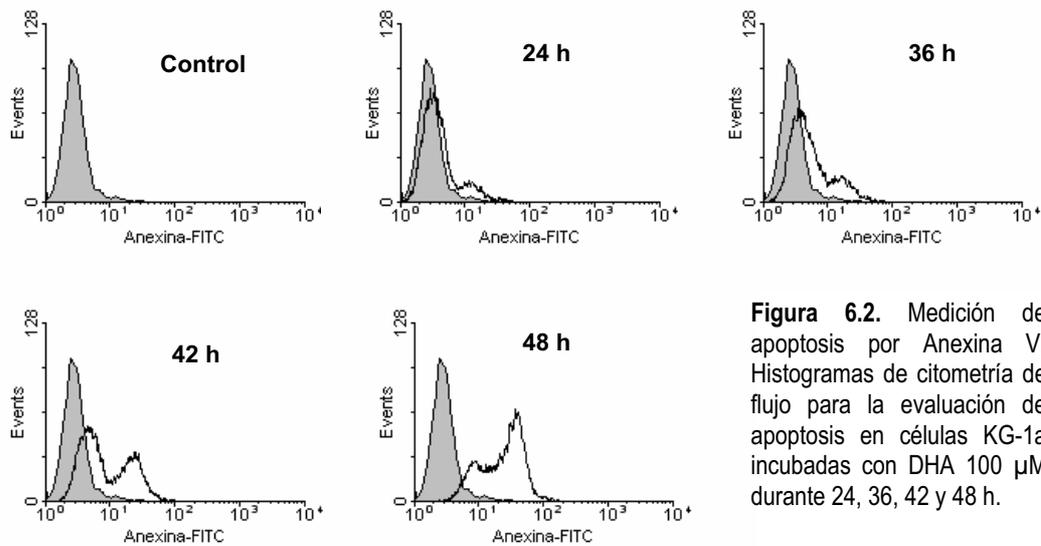


Figura 6.2. Medición de apoptosis por Anexina V. Histogramas de citometría de flujo para la evaluación de apoptosis en células KG-1a incubadas con DHA 100 μ M durante 24, 36, 42 y 48 h.

En la Figura 6.2 se muestran aumentos de expresión de Anexina V en función del tiempo para una concentración de 100 μ M de DHA. Como se observa, se produce un claro aumento de detección de Anexina V a partir de las 36 h con un máximo a las 48 h.

Este aumento de Anexina V no se corresponde con un patrón de entrada en necrosis ya que los experimentos con Anexina V e Ioduro de propidio muestran la aparición de una población apoptótica Anexina V⁺PI⁻ previa a la población necrótica Anexina V⁺PI⁺ (Figura 6.3).

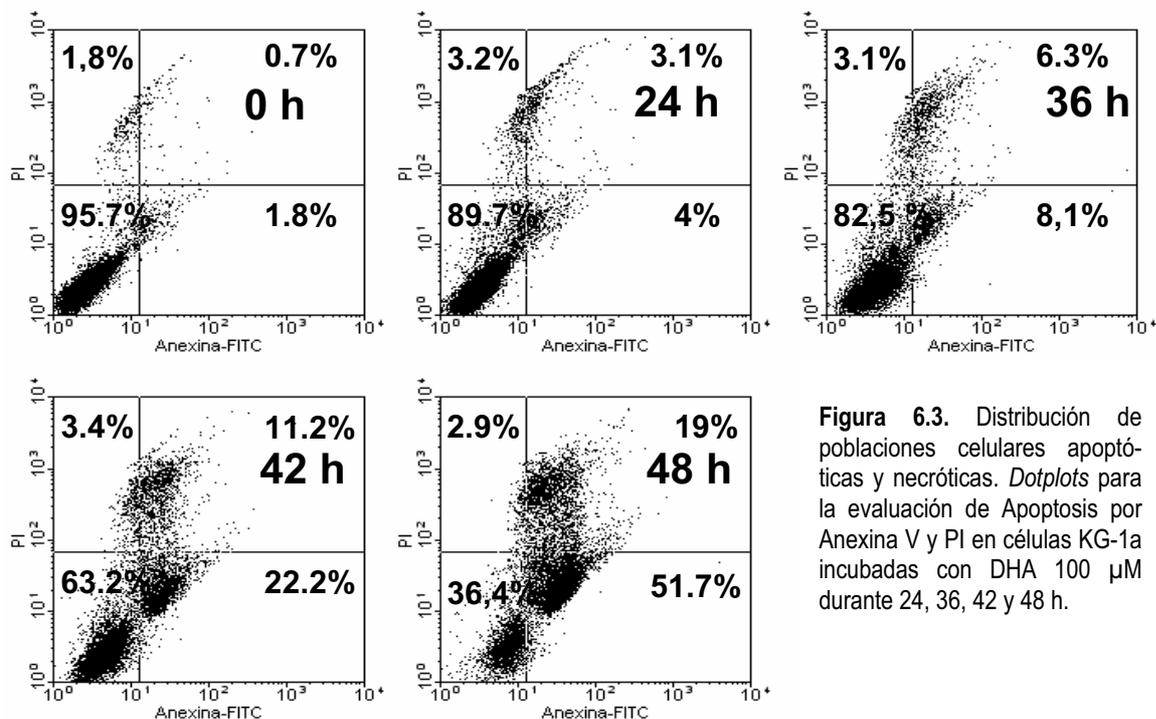


Figura 6.3. Distribución de poblaciones celulares apoptóticas y necróticas. Dotplots para la evaluación de Apoptosis por Anexina V y PI en células KG-1a incubadas con DHA 100 μ M durante 24, 36, 42 y 48 h.

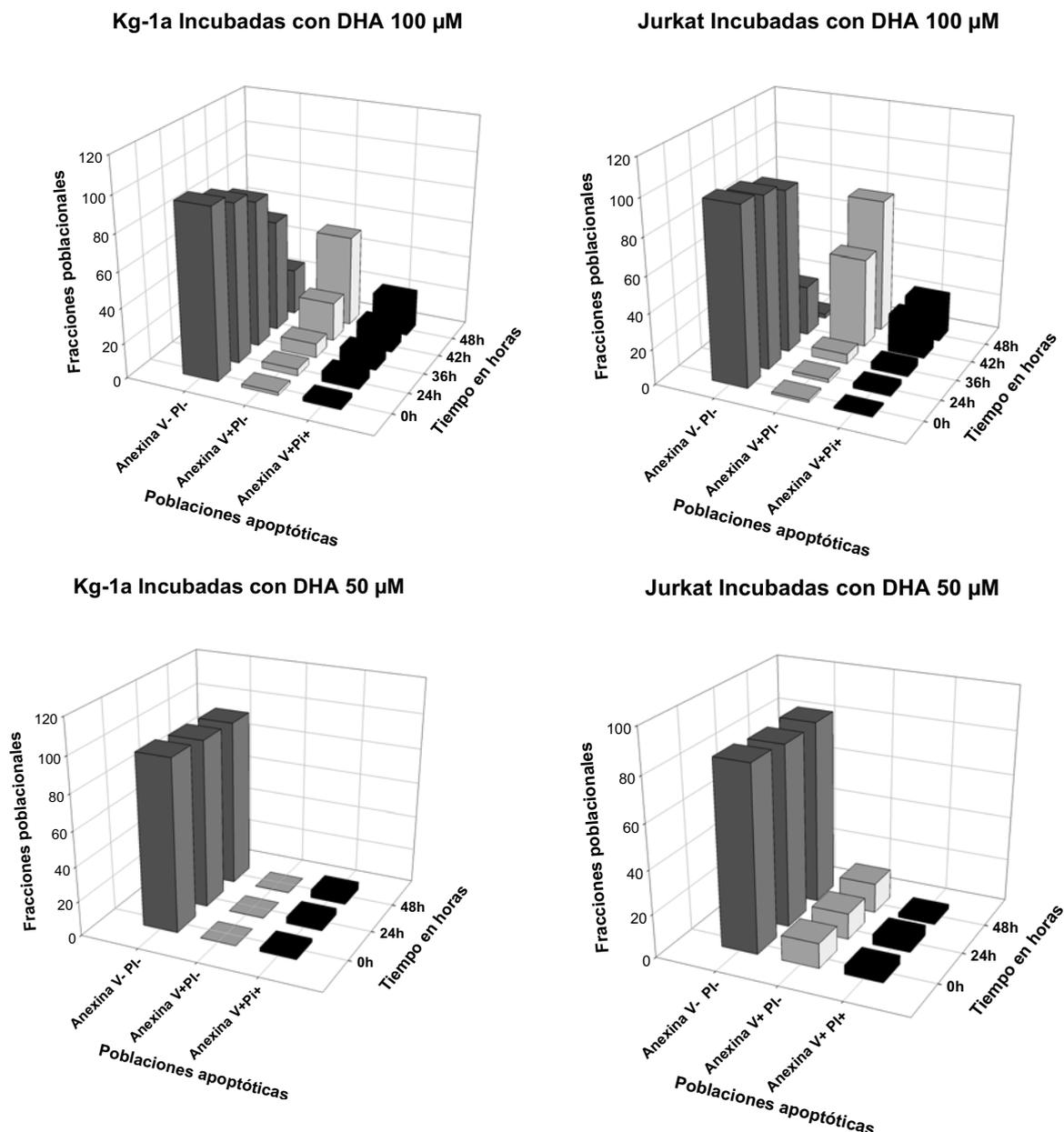


Figura 6.4. Efecto de la concentración de DHA en la inducción de apoptosis y necrosis celular. Representación de las variaciones porcentuales en las poblaciones no apoptótica (Anexina V-PI⁻), apoptótica (Anexina V⁺PI⁻), y necrótica (Anexina V⁺PI⁺) de células Jurkat y KG-1a incubadas a concentraciones de 100 µM y 50 µM de DHA en función del tiempo de incubación.

Se obtuvieron resultados similares al tratar las células Jurkat con DHA 100 µM. Los resultados indican, en primer lugar, que a partir de las 36 h se comienza a producir un significativo aumento de marcaje con Anexina V tanto en Jurkat como en KG-1a; que el incremento de la Anexina V se debe a la presencia de dos poblaciones de células Anexina V⁺: una apoptótica, Anexina V⁺ PI⁻ y otra necrótica, Anexina V⁺ PI⁺ ninguna de las cuales se daba en los controles a esos niveles. De manera que las células estaban entrando en apoptosis por causa del DHA. En la Figura 6.4 se muestran cuatro gráficos de barras donde es posible

Resultados

apreciar la variación en los porcentajes de las poblaciones no apoptótica (Anexina V-PI⁻), apoptótica (Anexina V⁺PI⁻) y necrótica (Anexina V⁺PI⁺) en función del tiempo de incubación. Esta variación se evaluó a dos concentraciones de DHA: 100 μ M y 50 μ M en ambos tipos celulares Jurkat y KG-1a. Las concentraciones de incubación se escogieron en base a los resultados obtenidos en la Figura 6.1 donde se puede apreciar que a una concentración de 50 μ M de DHA la toxicidad es mínima mientras que a concentración 100 μ M la viabilidad celular se encuentra muy disminuida. Se puede observar claramente como aumentan las poblaciones apoptóticas y necróticas en ambos tipos celulares a una concentración de 100 μ M mientras que no se produce ninguna variación importante en ninguno de los dos tipos celulares cuando la concentración de DHA es de 50 μ M (Figura 6.4). Este comportamiento coincide con los resultados ya presentados de proliferación celular (Figura 6.1).

El componente central de la maquinaria apoptótica es un sistema proteolítico en el que se encuentran involucradas una serie de proteasas denominadas caspasas. Estas enzimas participan en una cascada que se activa en respuesta a señales proapoptóticas. Uno de los eslabones más importantes de esta cascada es la activación de la Caspasa-3 a partir de la cual se activan la degradación de proteínas celulares, la condensación apoptótica de la cromatina y la fragmentación del ADN [445].

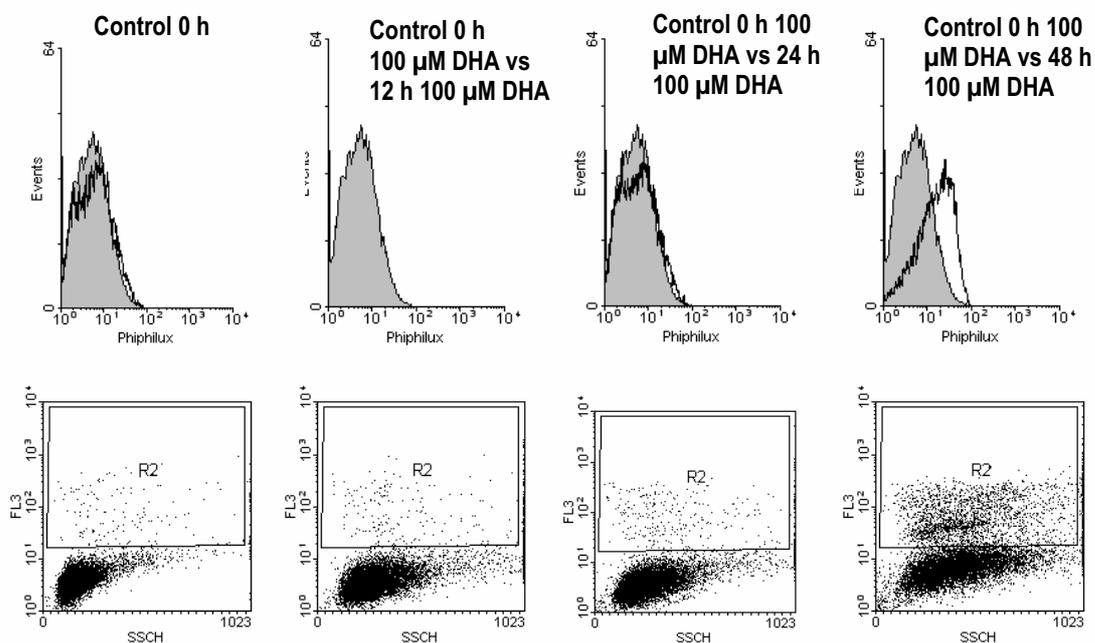


Figura 6.5. Detección de activación de caspasas en presencia de DHA. Histogramas correspondientes a células KG-1a detectando incrementos de Caspasa 3 activada a lo largo del tiempo: 0, 12, 24 y 48 h. En los *dotplots* inferiores se muestran las poblaciones marcadas con Actinomicina D. Las células no viables (población R2) son células Actinomicina D⁺ que han sido excluidas de las medidas mostradas en los histogramas superiores. Es entre las 24 y las 48 h de adición del DHA cuando se produce la activación de la Caspasa 3 que provoca la entrada irreversible en apoptosis.

Para tratar de precisar mejor la vía metabólica que utilizaban estas células en su entrada en apoptosis se realizaron experimentos adicionales utilizando para ello un compuesto denominado *Phiphilux* (Métodos Apartado 5.2.3), que permite detectar por citometría de flujo la activación de la Caspasa 3 (Figura 6.5).

Se puede observar un incremento de la actividad de la Caspasa 3 a las 48 h de incubación con 100 μM de DHA, lo cual indica que la muerte celular se produce a través de la vía de la Caspasa 3.

6.1.2 Citotoxicidad del DHA en el sistema inmune: células dendríticas y linfocitos

Una vez obtenida una concentración umbral de toxicidad celular del DHA se procedió a evaluar esta circunstancia en células dendríticas. Al estar las células en cultivo durante más de ocho días, tiempo necesario para la diferenciación de monocitos en células dendríticas maduras, cabe la posibilidad de que procesos de muerte celular que ocurran los primeros días del experimento no sean detectables al octavo día. Por ello, se analizó por citometría de flujo la presencia o ausencia de ADN degradado en las células dendríticas con yoduro de propidio durante todo el proceso de diferenciación de monocito a DC y también durante la maduración de la misma.

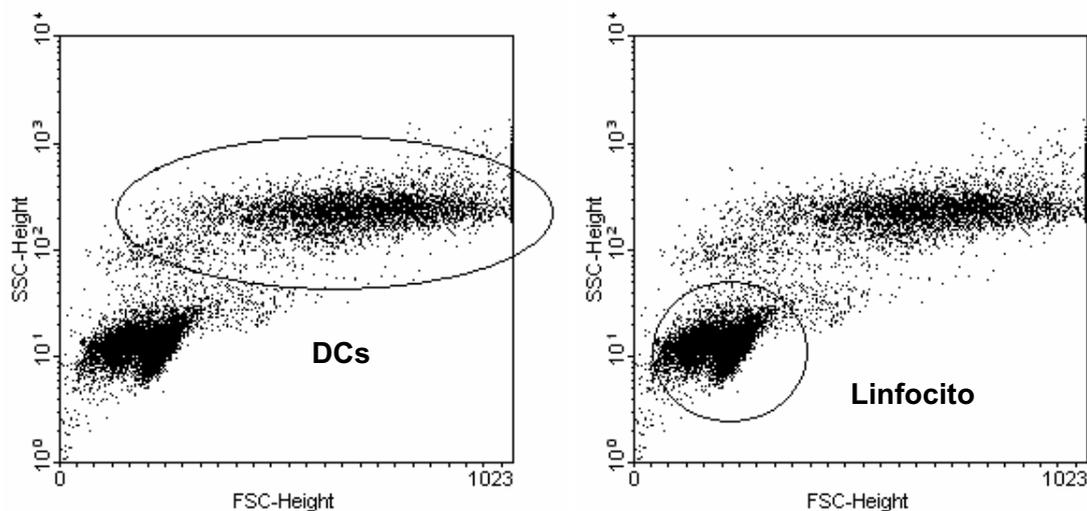


Figura 6.6. Dotplots correspondientes a las dos poblaciones mayoritarias presentes en los cultivos. En el dotplot de la izquierda la población señalada corresponde a células dendríticas mientras que en el de la derecha son linfocitos.

Resultados

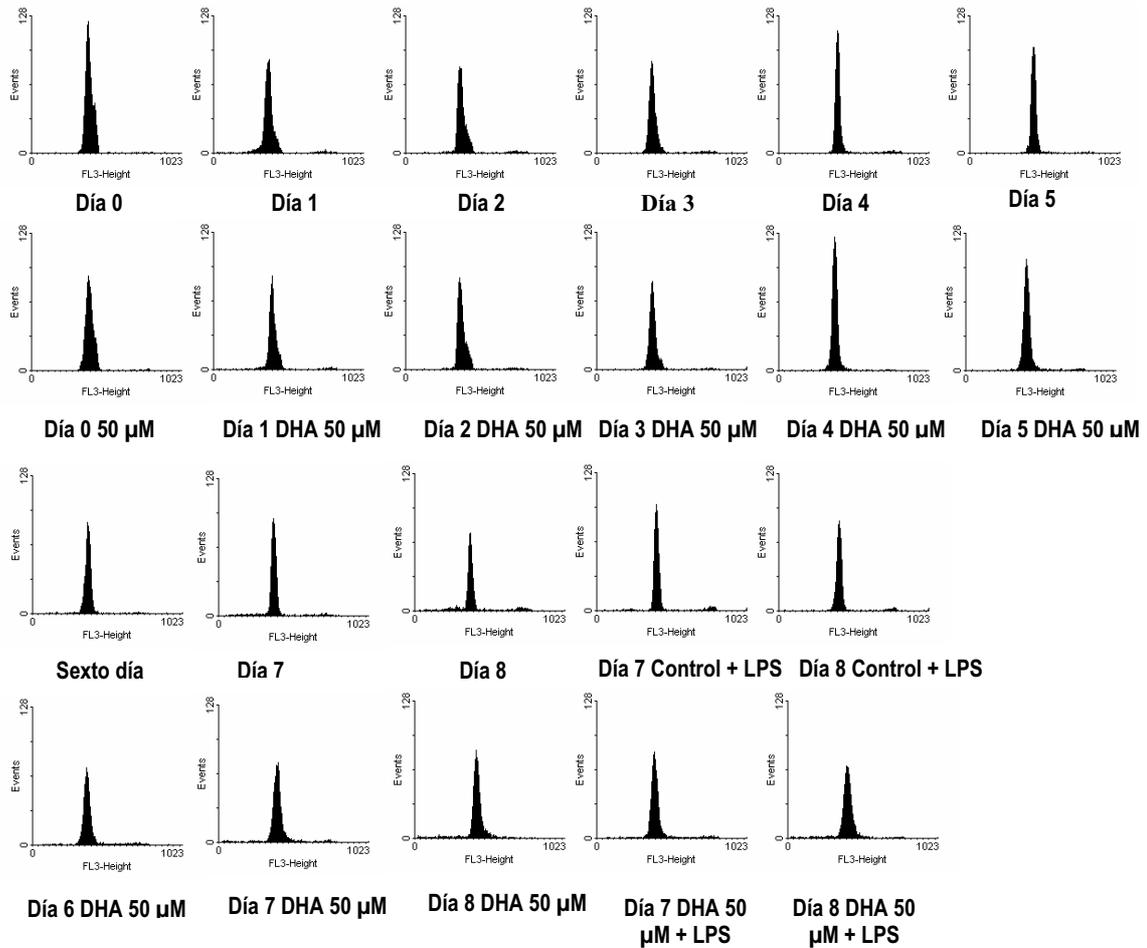


Figura 6.7. Detección de apoptosis por fragmentación del ADN en DCs. Medición de ADN por intercalación de yoduro de propidio en células dendríticas a intervalos de 24 h durante la diferenciación de monocitos a células dendríticas y su posterior maduración tras añadir LPS.

Las medidas de ciclo celular se espaciaron a intervalos de 24 h desde el primer día hasta el octavo día (DCs inmaduras) y también durante los días 7 y 8 tras añadir LPS a los cultivos (DCs maduras). Como control positivo se usaron los linfocitos presentes en los cultivos, ya que frente al DHA sí presentan citotoxicidad. En la Figura 6.6 se han señalado las dos poblaciones que se obtienen en citometría de flujo tras la purificación por adherencia al plástico de las células mononucleadas obtenidas de un *Buffy Coat*. La población con menor *Side Scatter* y *Forward Scatter* es de linfocitos. La población en forma de elipse de la derecha está compuesta por células dendríticas.

Es posible apreciar en la población de linfocitos de la Figura 6.6 dos subpoblaciones. Una de las subpoblaciones, la de la izquierda, presenta una caída por *Forward Scatter* con respecto a la otra. Se considera que la subpoblación de la izquierda pertenece a linfocitos que están entrando en apoptosis y la de la derecha son linfocitos viables [442].

A continuación en la Figura 6.7 se muestran los histogramas que evalúan la fragmentación del ADN cada 24 h desde el primer día de incubación hasta el octavo en presencia y en ausencia de DHA. Se utilizó una concentración de DHA de 50 μM considerada en base al apartado anterior como no tóxica. En los histogramas de células dendríticas no es posible apreciar las poblaciones S y G₂-M ya que estas células apenas se dividen. Por ello únicamente se aprecia un gran pico de ADN que corresponde a la fase G₀-G₁.

Tal y como se puede apreciar en la Figura 6.7 en ningún momento se ha producido la aparición de degradación del ADN ni en el caso de los controles de DCs ni en las incubaciones en presencia de DHA. De esto se deduce que las células dendríticas no presentan citotoxicidad a concentraciones de DHA de 50 μM o inferiores. Ello posibilita el estudio de las posibles alteraciones que el DHA pueda producir en el fenotipo y funcionalidad de las células dendríticas.

Como se ha comentado anteriormente, como control positivo de apoptosis se han utilizado los linfocitos presentes en los cultivos de células dendríticas ya que estos sí presentan una entrada en apoptosis de parte de la población a partir del cuarto día. En la Figura 6.8 se muestran los resultados obtenidos.

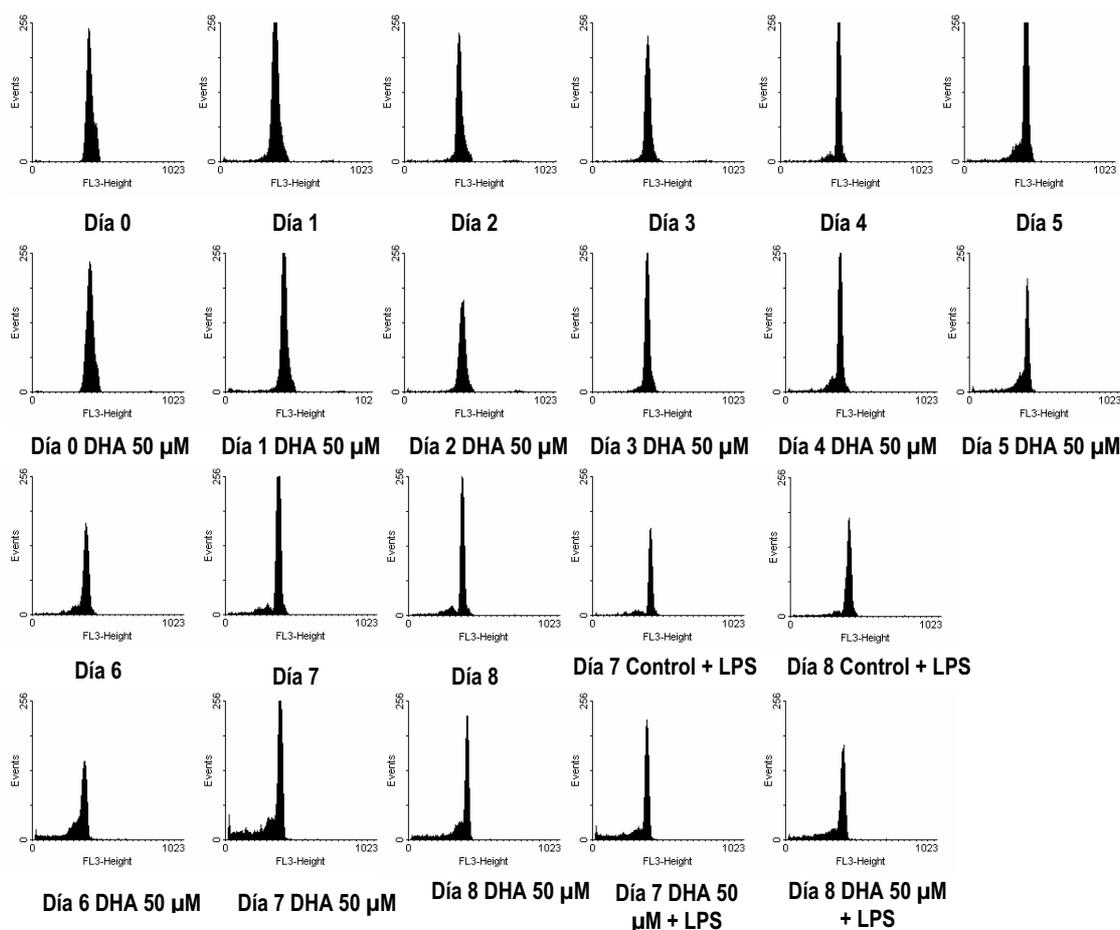


Figura 6.8. Detección de apoptosis por fragmentación del ADN en linfocitos. Medición de ADN por intercalación de yoduro de propidio en linfocitos a intervalos de 24 h cocultivados junto a monocitos durante la diferenciación de estos últimos a células dendríticas y su posterior maduración tras añadir LPS.

Resultados

La muerte celular de una parte de los linfocitos comienza a partir del cuarto día tanto en los controles como en los cultivos en los que el DHA se encuentra presente. Sin embargo, en los cultivos con DHA, la muerte celular se acentúa. Aquí el DHA parece estar incrementando un proceso natural que ya se produce en los linfocitos que están en contacto con DCs independientemente de la presencia del ácido graso.

Tabla 6.1 Distribución de poblaciones linfocito/DC en función del DHA.

Relaciones entre las poblaciones linfocitaria y dendrítica en los *dotplots* en presencia y ausencia de DHA (Promedio de 8 experimentos).

	Control (%)	DHA 50 μ M (%)
% linfocito/DC Inmadura	130.2 \pm 103	77.8 \pm 58
% linfocito/DC Madura	173.7 \pm 100.5	94.3 \pm 78.5

Esto comportamiento proporciona una explicación para el hecho de que los pocillos incubados con DHA presenten una mayor concentración de células dendríticas con respecto a la población linfocitaria presente en los mismos. Este hecho se pone de manifiesto en la Tabla 6.1 donde se muestran las relaciones entre las poblaciones de linfocito:célula dendrítica con y sin DHA a los ocho días de cultivo para ocho *Buffy Coats* diferentes en base al análisis de las poblaciones representadas en cada *Dotplot*. Tal y como se puede apreciar, la presencia de DHA provoca una disminución de un 50-70% en la proporción de linfocitos con respecto a las DCs. La mayor sensibilidad de los linfocitos al DHA con respecto a las DCs permite los incrementos en las concentraciones relativas de estas en los cultivos y da una explicación consistente a los descensos que muestra la Tabla 6.1.

En cualquier caso, puesto que la citotoxicidad en las células dendríticas era mínima, se escogió 50 μ M de DHA como la concentración máxima de trabajo.

6.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE MONOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Tras la purificación de las células mononucleadas de un *Buffy Coat* por adherencia al plástico se obtiene una población que suele oscilar entre un 30-70% de monocitos y entre un 30-60% de linfocitos. Tras seis días de diferenciación con IL-4 y GM-CSF se obtienen células dendríticas inmaduras y, finalmente, al provocar la maduración de las DCs mediante la adición de un estímulo madurativo (LPS, TNF α , CD40L...) se obtienen DCs maduras (Métodos, Apartado 5.3)

Estos tres estadios celulares se caracterizan por mostrar profundas diferencias fenotípicas entre sí. En la Figura 6.9 se muestran dichas diferencias mediante análisis de marcadores celulares de superficie por citometría de flujo. Los marcadores estudiados han sido CD80, CD86, CD83, CCR7, HLA-DR, CD36, CD1a y CD14. HLA-DR se escogió porque es un importante marcador de la capacidad de la dendrítica para presentar antígeno. Por la misma razón se escogieron CD80 y CD86, moléculas coestimuladoras de la actividad linfocitaria que colaboran en la acción del MHC.

El CD83 es un marcador específico de DCs también implicado en la coestimulación (aunque se desconoce el mecanismo). CCR7 es un indicador de la capacidad de migración de la dendrítica. CD14 es un marcador diferenciador entre dendrítica y monocito/macrófago. CD1a es también un importante marcador de dendrítica derivada de monocito y al mismo tiempo permite estudiar el comportamiento del sistema CD1.

Como se puede observar en los histogramas, la expresión de CD86 y CD83 es baja o negativa tanto en monocitos como en DCs inmaduras, aumentando durante la maduración. El CD80 pasa de expresarse poco en monocito a expresarse en inmadura y finalmente, presenta una expresión muy aumentada en dendrítica madura. El HLA-DR se expresa en todos los casos pero su expresión aumenta considerablemente al madurar la dendrítica. El CD1a no se expresa en monocitos pero sí en ambos estadios madurativos de las DCs. La expresión de CD1a durante el proceso de maduración de células dendríticas derivadas de monocito presenta un patrón diferenciado del de los subtipos CD1b, CD1c y CD1d. Al madurar la dendrítica, la expresión de CD1b y CD1c aumenta ligeramente, la de CD1d permanece inalterada pero CD1a desciende en sus niveles de expresión durante este proceso [446]. Por este motivo en las DCs maduras de la Figura 6.9 el CD1a se encuentra disminuido con respecto al nivel de expresión que se observa en las inmaduras. El CD36 se expresa en DCs inmaduras aunque en menor medida que en monocitos. Sin embargo, los niveles de CD36 descienden bastante al madurar la dendrítica. El CD14 se encuentra presente en los monocitos pero es negativo en ambos tipos de DCs. Por último, el CCR7, no se expresa en monocito y presenta niveles de expresión muy bajos en dendrítica, destacando un ligero incremento de la expresión durante la maduración.

Resultados

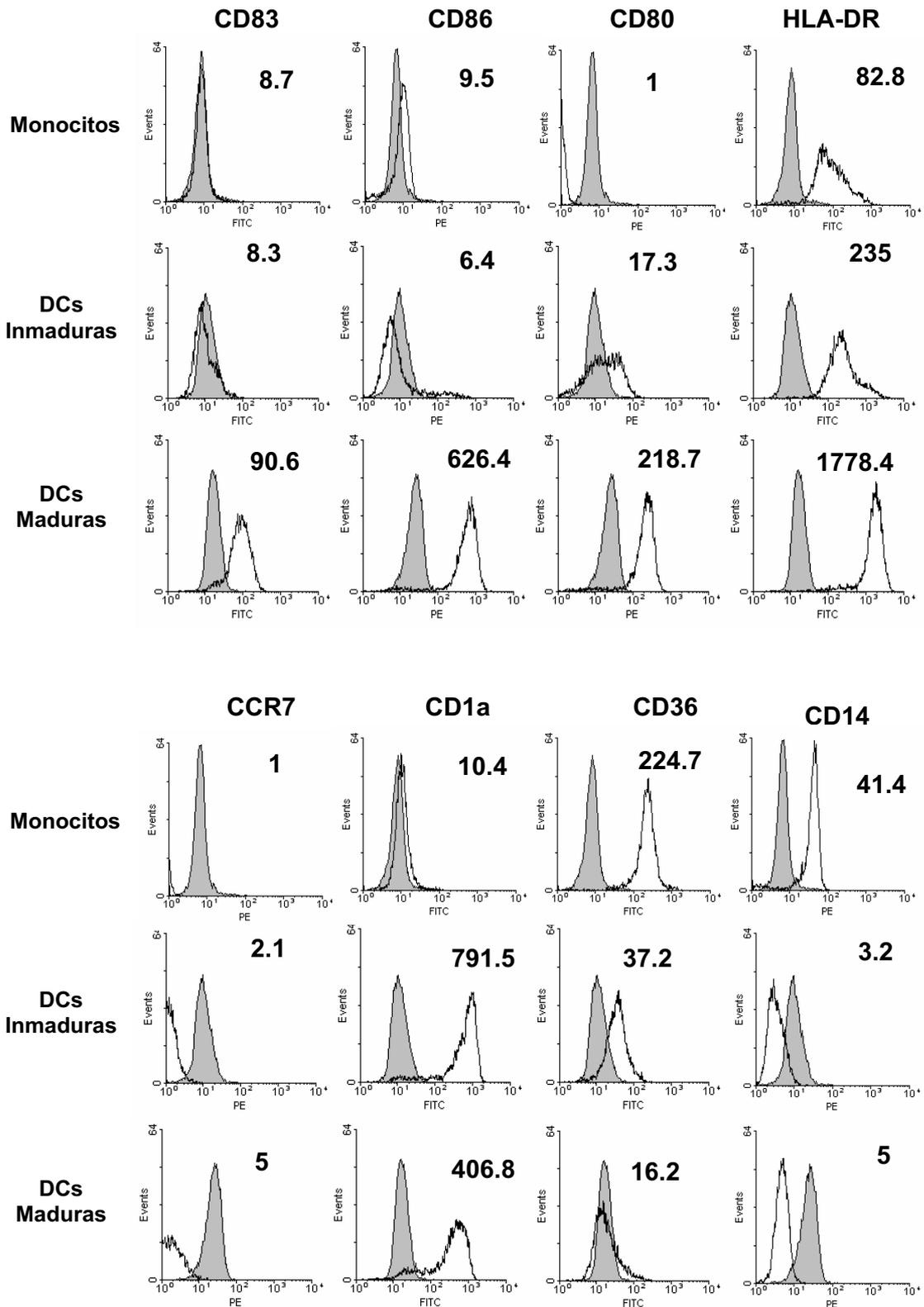


Figura 6.9. Fenotipaje de monocitos, células dendríticas inmaduras y maduras. Los marcadores de expresión estudiados se muestran junto a controles isotópicos y han sido CD86, CD80, CD83, HLA-DR, CD1a, CD36, CD14 y CCR7. Los monocitos fueron fenotipados el mismo día en que se purificaron a partir de células mononucleadas. En el caso de las DCs inmaduras, el sexto día de diferenciación se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores. En el caso de las DCs maduras, los estudios se hicieron el octavo día tras 48 h de cultivo con LPS. Los niveles de expresión celular se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia. Resaltar que los monocitos y las DCs no pertenecen al mismo *Buffy Coat*. En cambio, las DCs maduras e inmaduras fueron extraídas a partir del mismo *Buffy Coat*.

6.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DHA

Una vez determinada la concentración subletal máxima en cultivo de PUFAs con respecto a las células dendríticas se ha procedido a evaluar la actividad sobre su fenotipo en los estadios de madurez e inmadurez utilizando DHA como modelo de PUFA. El DHA se encontró presente en los cultivos desde el primer día de diferenciación de monocito a dendrítica y en ningún caso se realizó una adición posterior.

Al transformar monocitos en células dendríticas en presencia de DHA se observaron diferencias fenotípicas respecto al control que se pueden apreciar claramente en la Figura 6.10. Se analizó el fenotipo el sexto día (dendrítica inmadura) y otra vez el octavo día tras adicionar el sexto día LPS (dendrítica madura, Figura 6.11). Las concentraciones de DHA utilizadas fueron de 5, 25 y 50 μM . En ningún caso se apreció mortalidad o toxicidad entre las células dendríticas a ninguna de estas concentraciones según el análisis de las variaciones entre las diferentes poblaciones celulares y el debris que mostraban los citogramas y el análisis de viabilidad celular por ioduro de propidio que se realizó preventivamente en algunos casos.

Tal y como se puede observar en los histogramas de la Figura 6.10, los cuales pertenecen a un mismo *Buffy Coat*, muchos de los marcadores estudiados presentan variaciones en su expresión que son dependientes de la concentración de DHA presente en el medio de incubación. No se muestra la expresión de CD14 ya que este marcador no se expresaba en las DCs independientemente de la presencia o ausencia de DHA, lo cual además confirmaba la ausencia de macrófagos contaminantes. En la Tabla 6.2 se han reunido los promedios y las desviaciones estándar de las medianas de intensidad de fluorescencia (MFI) de seis *Buffy Coats* independientes para todos los marcadores mostrados en la Figura 6.10.

Tanto en la figura como en la tabla se observan diferencias de expresión de los principales marcadores de células dendríticas en función de la concentración de DHA en el medio de incubación. La expresión de CD86 va incrementándose con la concentración de DHA hasta situarse en un rango de entre el 300 y el 600% con respecto a los controles a una concentración de 50 μM . Este incremento de la expresión es mucho menor, sin embargo, que el que se produce durante el proceso de maduración de la dendrítica. Otros marcadores que aumentan su expresión en función de la concentración de DHA son el CD83, HLA-DR, CCR7 y CD36 aunque sus variaciones son mucho menores que las que presenta el CD86; no llegando a superar en la mayoría de los casos el 200% de incremento de expresión. En cambio, el CD80 y el CD1a presentan un descenso dependiente de la concentración de DHA. CD80 baja su mediana de intensidad de fluorescencia entre un 33% y un 50%. El CD1a presenta una inhibición creciente de su expresión en función de la concentración de DHA hasta hacerse prácticamente total a 50 μM de DHA.

Resultados

Tabla 6.2 Expresión de marcadores de DC inmadura en función de la concentración de DHA.
Promedio estadístico de MFIs de células dendríticas inmaduras correspondientes a 6 *Buffy Coats* diferentes incubados con DHA.

DC inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLADR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	14±5	10±4	26±10	349±211	3±1	432±251	43±12
DHA 5 µM	20±7	29±22	31±6	422±223	4±2	154±203	53±11
DHA 25 µM	23±7	36±16	23±7	458±134	4±2	52±42	47±23
DHA 50 µM	25±7	49±16	17±5	558±239	5±3	32±4	53±19

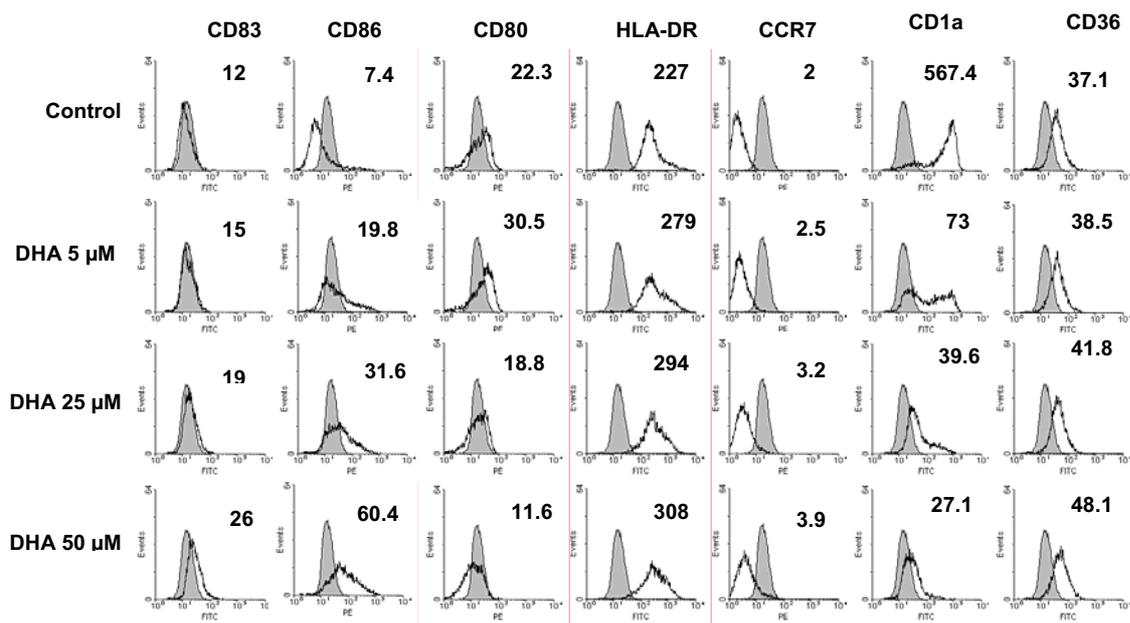


Figura 6.10. Caracterización fenotípica de DCs inmaduras en función de la concentración de DHA. El ácido graso fue adicionado al medio el primer día de diferenciación. Las concentraciones utilizadas han sido de 5, 25 y 50 µM de DHA. El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Este mismo estudio también se realizó en DCs maduras a las que también se les había añadido el DHA el primer día de diferenciación. El sexto día se inició el proceso de maduración por la adición de LPS durante 48 h y sus marcadores se analizaron el octavo día. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.11. También se adjuntan los promedios de MFIs de 6 *Buffy Coats* para todos los marcadores estudiados en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 Expresión de marcadores de DC madura en función de la concentración de DHA.

Promedio estadístico de MFIs de células dendríticas maduras de 6 *Buffy Coats* diferentes incubados con DHA.

Maduras	CD83	CD86	CD80	HLADR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	90±12	702±62	267±94	1756±439	4±2	228±124	19±3
DHA 5 µM	81±16	670±234	224±87	1484±443	5±3	95±100	26±1
DHA 25 µM	79±14	546±143	159±60	1369±376	6±3	40±14	27±8
DHA 50 µM	65±5	390±40	98±43	1140±325	7±3	36±7	37±13

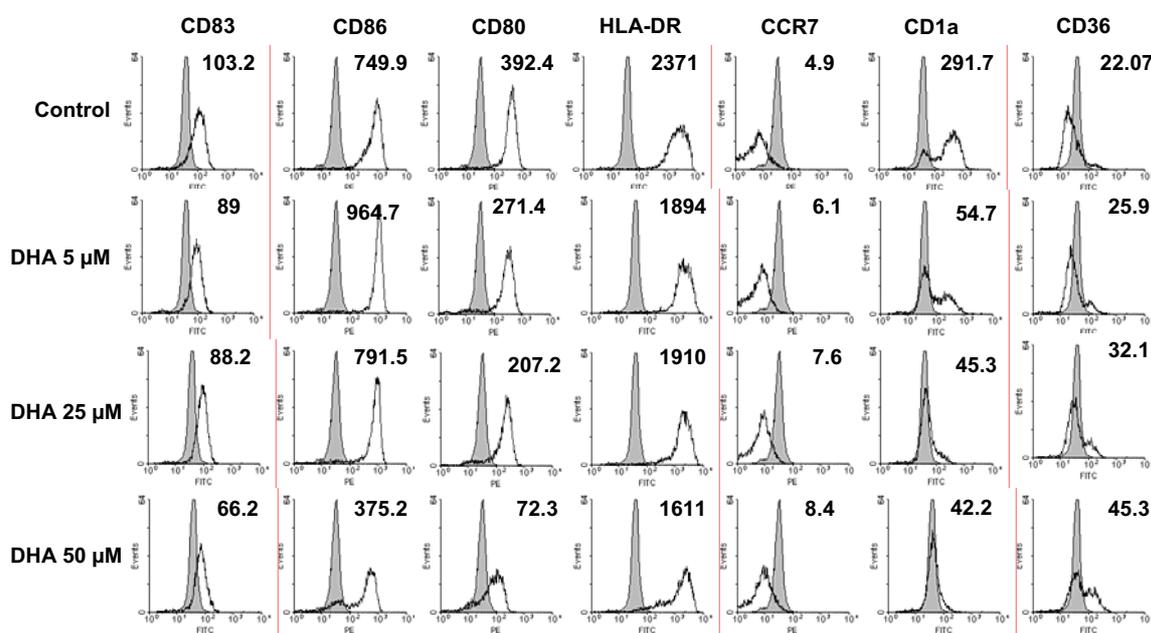


Figura 6.11. Fenotipo de DCs maduras en función de la concentración de DHA. El ácido graso fue adicionado al medio el primer día de diferenciación. Las concentraciones utilizadas han sido de 5, 25 y 50 µM. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo día se analizó la expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Tal y como ocurría con las células dendríticas inmaduras, el DHA afecta a la expresión fenotípica de la célula dendrítica madura pero en algunos casos se producen cambios en la dirección contraria a la seguida por la inmadura. Por ejemplo, ahora el DHA provoca que la expresión de CD86 descienda hasta casi la mitad a la concentración de 50 µM. CD83 desciende un 30%. A diferencia de lo que ocurría con las DCs inmaduras, ahora sí se ve con claridad el descenso de expresión de CD80 que disminuye un 65-80% de la expresión en el control. El aumento de expresión de CCR7 en función de la concentración de DHA se conserva. Sorprende lo que ocurre con HLA-DR; en lugar de aumentar su expresión como ocurría con las DC inmaduras, esta desciende hasta un tercio con respecto a la del control. Los resultados de CD1a se conservan tanto en inmaduras como en maduras. Se produce una inhibición total de la expresión de dicho

Resultados

marcador a 50 μ M de DHA. Por último, un porcentaje de las DCs maduras es capaz de expresar CD36 y este porcentaje se incrementa con la concentración de DHA en el medio.

Debido a los diferentes efectos que se observan en las DCs maduras e inmaduras se planteó el objetivo de averiguar si el DHA era capaz de influir en el proceso de maduración de la célula dendrítica independientemente del de diferenciación desde monocito y también si la acción del DHA requería su presencia constante en el medio de cultivo. Para ello se añadió el DHA a las células dendríticas inmaduras el sexto día de diferenciación (en lugar del primer día) junto con el LPS. Se analizó la expresión de los marcadores 48 h después. Para asegurar que los cambios fenotípicos que se producían eran exclusivos del proceso de maduración se realizaron controles que incluyeron DCs tratadas con DHA desde el primer día hasta el octavo, DCs sin tratamiento alguno de DHA en ningún momento y DCs tratadas con DHA desde el primer día hasta el sexto pero a las cuales se les cambió el medio el sexto día por otro medio celular sin DHA. Las diferencias en la expresión de los marcadores que se observaron no son tan acusadas como en presencia constante del ácido graso. Los resultados obtenidos se han reunido en la Tabla 6.4 (controles sin adición de LPS, DC inmaduras) y la Tabla 6.5 (con adición de LPS el día sexto, DC maduras).

Tabla 6.4 Variación del fenotipo de DC inmadura en función de la presencia de DHA en la diferenciación.

Promedio estadístico de MFIs de células dendríticas inmaduras de dos *Buffy Coats* diferentes incubados con DHA.

DC inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	15,7 \pm 0,3	12,3 \pm 4,3	34 \pm 9	323,1 \pm 103	2,9 \pm 0,4	403,2 \pm 331,8	38,1 \pm 1,6
DHA (desde primer hasta octavo día)	31,7 \pm 2,8	41,2 \pm 19,2	21,9 \pm 5,8	417,2 \pm 362,1	7 \pm 0,2	53,1 \pm 4,4	46,2 \pm 1,8
DHA (desde primer hasta sexto día; sin DHA días 7-8)	22 \pm 5,9	23,8 \pm 12	19,1 \pm 5,2	238,5 \pm 57,1	4,7 \pm 0,2	43,5 \pm 5,5	45,6 \pm 0,7
DHA (sin DHA hasta el sexto día; con DHA días 7-8)	25,3 \pm 13,6	11,9 \pm 0,8	21,6 \pm 5,2	389,7 \pm 34,6	4 \pm 0,6	196,3 \pm 161,6	40,9 \pm 0,8

En las tablas, en todos los casos la concentración utilizada de DHA fue de 30 μ M. La fila 2 (DHA desde primer día al octavo) se refiere a una incubación continua de DHA durante ocho días. En la fila 3 (DHA desde primer día al sexto) se mantuvo el DHA en el cocultivo hasta el sexto día, después se cambió el medio y se lavaron las células dejándolas 48 h en medio fresco. En la fila 4 (DHA desde el día sexto al octavo) se añadió al medio celular DHA el sexto día en lugar del primer día. En este experimento se ha analizado el efecto que el DHA ejerce sobre la dendrítica inmadura puesto que en ningún caso se añadió estímulo madurativo. El experimento es un análisis de lo que le ocurre a la dendrítica inmadura al quitar o adicionar DHA en el medio. También sirve de control negativo para el experimento de la Tabla 6.5 donde sí

se añadieron estímulos madurativos y sí se estudió el efecto que el DHA ejerce sobre el paso de DC inmadura a DC madura.

En presencia continua de DHA las células se comportan según el patrón ya explicado. Si el DHA se retira del medio, en 48 h comienza a revertir dicho patrón en algunos marcadores: se producen descensos en CD86, CD83, CCR7 y HLA-DR; pero CD1a, CD80 y CD36 permanecen inalterables. Si el DHA se añade durante las últimas 48 h varían algunos marcadores aunque no con la intensidad de aquellas células que se encontraban en presencia continua de DHA. Se producen aumentos en CD83, HLA-DR y descensos en CD1a. El resto de los marcadores permanecen inalterados.

Al añadir LPS el sexto día además de realizar todos estos cambios, se producen los siguientes resultados mostrados en la Tabla 6.5. De nuevo, el DHA presenta el patrón de cambio en DCs maduras ya descrito. Si el DHA no se encuentra presente durante el proceso de maduración los marcadores de la dendrítica evolucionan de forma similar al control. Se producen incrementos normales en CD83, CD86, CCR7 y descensos en CD36 que evidencian que la dendrítica es capaz de madurar. CD80 y HLA-DR suben, aunque no tanto como lo hacen en los controles y CD1a continua con su baja expresión. Es necesaria la presencia continua de DHA en el medio para conseguir el fenotipo alterado de dendrítica madura. Si añadimos el DHA al medio junto con el estímulo madurativo, habiendo estado las DCs durante el proceso de diferenciación de monocito a dendrítica libres del ácido graso, el fenotipo que se obtiene corresponde al de una dendrítica madura normal en todos los marcadores excepto algún mínimo descenso en CD1a y una subida menor de HLA-DR.

Tabla 6.5 Variación del fenotipo de DC madura en función de la presencia de DHA en la diferenciación y maduración.

Promedio estadístico de MFIs de DCs maduras de dos *Buffy Coats* diferentes incubados con DHA.

DC Maduras	CD83	CD80	CD86	HLADR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	60,5±0,8	117,7±17,2	316,7±24,2	1453,1±575,7	4,7±2,3	191,6±152,8	22,2±2,8
DHA (desde primer hasta octavo día)	47±2,4	28,5±6,5	142,1±3,6	764,3±398,4	9,2±0,6	47,8±5,8	30,2±1,5
DHA (desde primer hasta sexto día; sin DHA días 7-8)	67,2±6,4	96,2±6,7	373,7±16,6	1137,1±753,4	6±0,4	49±2,2	27±0,4
DHA (sin DHA hasta el sexto día; con DHA días 7-8)	68,6±10	126,5±25,6	332,1±75,4	1119,2±639,4	5,7±1,1	163,4±142,6	21,7±0,5

6.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y OTROS PUFAs

A la vista de los resultados obtenidos se creyó conveniente estudiar el efecto que otros ácidos grasos poliinsaturados podrían ejercer sobre la diferenciación de las células dendríticas. Se escogió otro PUFA ω -3, el ácido eicosapentaenoico, ya que es el PUFA más abundante en aceite de pescado y precursor del DHA [5]. También se han estudiado el PUFA ω -6 más abundante en nuestra dieta, el ácido linoleico (LA) y, finalmente, el ácido graso ω -9 más abundante en nuestra dieta mediterránea, el ácido oleico (OLE).

Para el EPA se realizó un estudio similar al del DHA analizando la expresión de los marcadores celulares en función de la concentración añadida al medio de incubación el primer día de diferenciación. Las concentraciones estudiadas fueron 1 μ M, 10 μ M y 50 μ M. Los análisis se realizaron con DCs inmaduras y maduras (Figuras 6.12 y 6.13, respectivamente). También se adjuntan los promedios de MFIs de tres *Buffy Coats* tratados con EPA tanto en estadio de dendrítica inmadura como de madura (Tablas 6.6 y 6.7, respectivamente).

En DCs inmaduras, los resultados son similares en algunos marcadores a los obtenidos con DHA pero se observan diferencias en otros. Para CD86, HLA-DR y CD1a, el EPA parece inducir en la célula dendrítica el mismo patrón de cambio que se producía con el DHA. Por el contrario CD36, CD83 y CCR7 no son sensibles a la presencia de EPA en el medio. CD36 presenta un descenso a medida que aumenta EPA y, de hecho, a 50 μ M de EPA apenas hay expresión de CD36. Por último, aunque CD80 en los histogramas de la Figura 6.12 no se modifica en función de la concentración de EPA, sí que lo hace al promediarse los tres *Buffy Coats* en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6 Fenotipo DC inmadura en función de la concentración de EPA
Promedio estadístico de MFIs de células dendríticas inmaduras incubadas con EPA.

DC INMADURA	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	10 \pm 1.8	8 \pm 2.2	20.1 \pm 4	270.6 \pm 22.9	1.1 \pm 0.1	676 \pm 162	33 \pm 5,9
EPA 1 μ M	10 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	20,9 \pm 2	350.8 \pm 138	1.2 \pm 0.1	574,6 \pm 31	34,9 \pm 0,4
EPA 10 μ M	11 \pm 0.7	20 \pm 1.5	23,8 \pm 6	493,1 \pm 246	1.4 \pm 0	122 \pm 9,3	20,3 \pm 0,8
EPA 50 μ M	11 \pm 1.3	36.3 \pm 4	15,8 \pm 2	608,1 \pm 290	1.3 \pm 0.1	18,1 \pm 3,7	22,3 \pm 4,5

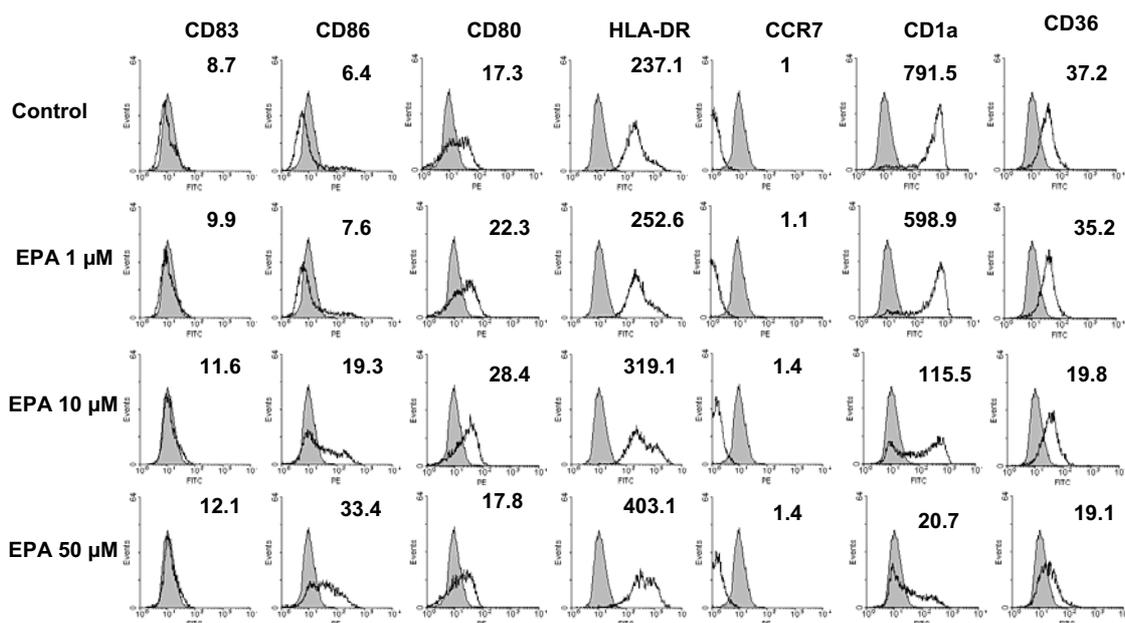


Figura 6.12. Fenotipo de DCs inmaduras en función de la concentración de EPA. El ácido graso fue adicionado al medio el primer día de diferenciación. Las concentraciones utilizadas han sido de 1, 10 y 50 μM . El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

En la Figura 6.13 y en la Tabla 6.7 se muestra el mismo estudio pero realizado con células dendríticas maduras. Los resultados para las DCs maduras son de nuevo similares a los obtenidos con DHA para algunos marcadores. Se constata un descenso de CD86, HLA-DR, CD80 y CD1a. No se observan cambios significativos en función de la concentración en CD83, CCR7 y CD36. En la Tabla 6.7 se muestran los promedios de MFIs de DCs maduras pertenecientes a tres *Buffy Coats* diferentes. Los patrones de cambio de las DCs maduras son los mismos que con el DHA exceptuando CD83, CCR7 y CD36. Se obtienen descensos en CD86, HLA-DR y CD80. El CD36, al tratarse de DCs maduras, presenta niveles bajos de expresión pero EPA hace que estos descensos sean todavía más acentuados.

Tabla 6.7 Fenotipo DC madura en función de la concentración de EPA.

Promedio estadístico de MFIs de células dendríticas maduras incubadas a concentraciones crecientes de EPA.

DC Madura	CD83	CD86	CD80	HLADR	CCR7	CD1a	CD36
CONTROL	71±20	698±102	263±63	1779±90	1.5±0.5	325±115	16±0.1
EPA 1 μM	92±10	729±48	242±41	1436±128	2±0.5	305±133	16±1
EPA 10 μM	99±4	554±119	234±59	1132±108	3±0.6	72±25	12±1
EPA 50 μM	76±18	422±67	142	1115±162	1.7±0.1	20±5	10.6±2

Resultados

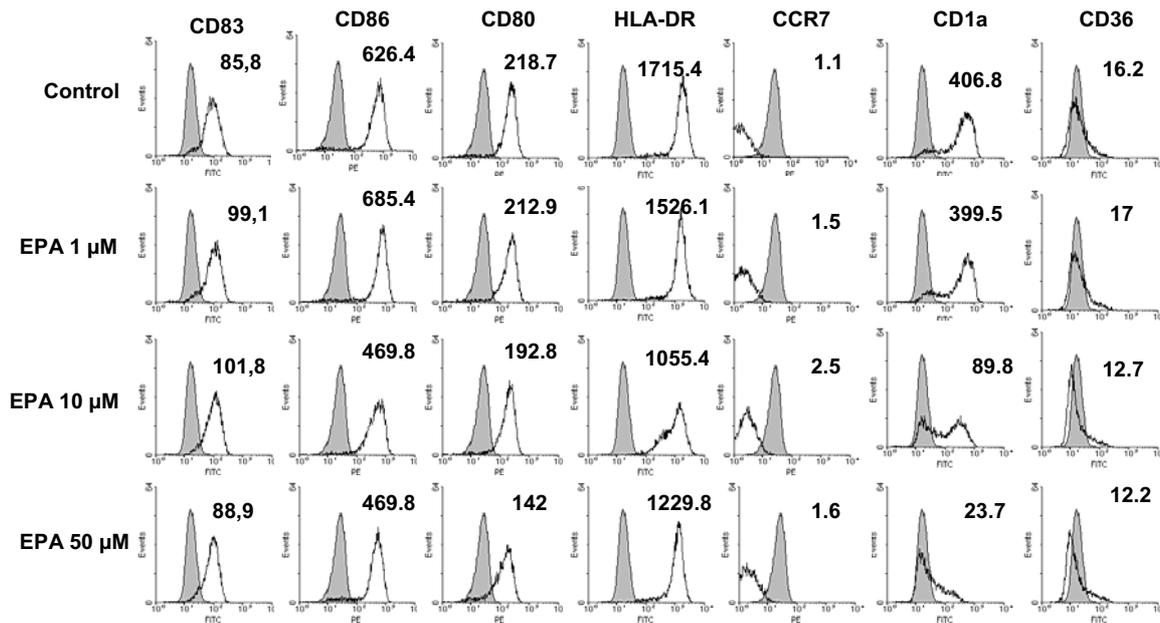


Figura 6.13. Fenotipo de DCs maduras en función de la concentración de EPA. El ácido graso fue adicionado al medio el primer día de diferenciación. Las concentraciones utilizadas han sido de 1, 10 y 50 μM . El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Un estudio similar se ha realizado con los ácidos grasos oleico y linoleico. El rango de concentraciones se amplió en estos ácidos grasos hasta 100 μM dada su menor toxicidad y con el objetivo de conseguir una respuesta dependiente de la concentración. Los resultados se muestran en las Tablas 6.8 a 6.11.

El ácido linoleico, a pesar de ser un ácido graso omega 6, actúa siguiendo el mismo patrón que el EPA (que es omega 3) pero con menor intensidad puesto que es necesaria una concentración de 100 μM para que se perciban cambios similares en el fenotipo de la dendrítica. El ácido oleico posee muy poca o casi nula capacidad para modificar el fenotipo de la dendrítica en casi todos los marcadores excepto en CD1a. Incluso si uno se centra en este marcador, a grandes concentraciones de oleico no se alcanzan los descensos que se consiguen con EPA o DHA a concentraciones muy inferiores.

Finalmente, para evitar posibles artefactos producidos a causa de la variabilidad intrínseca en cada experimento por el hecho de tratarse de sangre de individuos distintos se realizó un estudio comparativo mediante el procesamiento de células dendríticas de un mismo individuo las cuales se trataron con cada uno de los ácidos grasos examinados a la concentración de 50 μM . Los resultados se muestran en las Figuras 6.14 y 6.15 para DCs inmaduras y maduras, respectivamente.

Efectos de los PUFAs en las células dendríticas

Tabla 6.8 Fenotipo DC inmadura en función de la concentración de LA.

Promedio estadístico de MFIs de DCs inmaduras de cuatro *Buffy Coats* diferentes incubados con ácido linoleico a concentraciones crecientes.

DC Inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
CONTROL	11.3±2	7.5±1.5	20.7±4	450.5±204	1.2±0.3	489±239	28.9±7.7
LA 1 µM	12.5±3	6.5±1.1	20.5±1	391.6±37.3	1.3±0.1	362±44	30.8±6.2
LA 25 µM	19.3±10	10.7±4	22.5±7	482.7±112.6	1.3±0.1	273±99	26.1±8.3
LA 50 µM	13.3±2	18.4±14	21.5±5	569.3±168.1	1.4±0.1	137±66	28.6±8.6
LA 100 µM	15.4±4	37.6±31	13.8±2	601.1±188.6	1.4±0.1	34±24	24.9±10.6

Tabla 6.9 Fenotipo DC madura en función de la concentración de LA

Promedio estadístico de MFIs de DCs maduras de cuatro *Buffy Coats* diferentes incubados con ácido linoleico a concentraciones crecientes.

DC Maduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
CONTROL	67±13	628±89	252±45	2337±682	2.2±1	242±115	14±3
LA 1 µM	61±6	547±14	247±14	2319±775	1.7±1	173±11	11±3
LA 25 µM	63±1	599±80	247±34	2448±891	2.8±0.1	133±59	12±3
LA 50 µM	75±12	558±89	220±18	2315±1180	2.4±0.4	60±23	11±1
LA 100 µM	67±22	432±78	158±30	1725±804	2.3±0.3	27±13	11±1

Tabla 6.10 Fenotipo DC inmadura en función de la concentración de OLE

Promedio estadístico de MFIs de DCs inmaduras de cuatro *Buffy Coats* diferentes incubados con ácido oleico a concentraciones crecientes.

DC Inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
CONTROL	11.3±2	7.5±1.5	20.7±4	450.5±204	1.2±0.3	489±239	28.9±7.7
OLE 1 µM	13±3	9.5±3.2	23.5±6	373.6±2.4	1.3±0.3	480±218	26.5±6.2
OLE 25 µM	14±3	8.1±2	21±5	376±246	1.5±0.2	437±204	25.0±3.0
OLE 50 µM	12±2	10±2	29±9	398±150	1.4±0.1	387±79	25.7±3.2
OLE 100 µM	12.6±2	19±11	27.8±8	520.1±237	1.4±0.1	141±81	25.2±10.9

Tabla 6.11 Fenotipo DC madura en función de la concentración de OLE.

Promedio estadístico de MFIs de DCs maduras de cuatro *Buffy Coats* diferentes incubados con ácido oleico a concentraciones crecientes.

DC Maduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
CONTROL	66±13	615±103	252±45	2291±621	2.2±1	238±120	14±3
OLE 1 µM	56±7	524±90	241±46	2393±61	2.6±1	141±47	12±3
OLE 25 µM	54±9	541±120	234±49	2481±470	2.1±0.4	119±81	11±2
OLE 50 µM	75±23	631±140	253±57	2027±842	2.2±0.7	178±95	13±4
OLE 100 µM	68±16	572±84	206±38	1799±838	2±0.8	60±26	11±2

Resultados

Los resultados mostrados en la Figura 6.15 correspondientes a DCs maduras ponen de manifiesto que, de todos los ácidos grasos estudiados, solo el EPA y el DHA producen un acusado descenso de la expresión de CD86 y CD80. Los demás ácidos grasos modifican con menor intensidad los niveles de expresión en madurez de estos marcadores. HLA-DR se encuentra ligeramente disminuido por igual en todos los ácidos grasos, aunque con más extensión en EPA. El CD1a se inhibe en todos los casos, excepto al tratar las células con ácido oleico, siendo el más activo el EPA. Por último, los niveles de CD36 se encuentran muy disminuidos en todos los casos, tal y como corresponde a DCs maduras, aunque el DHA es el que consigue sostener un nivel más alto de CD36, incluso superior al control; siendo una pequeña parte de las DCs tratadas con DHA CD36 positivas.

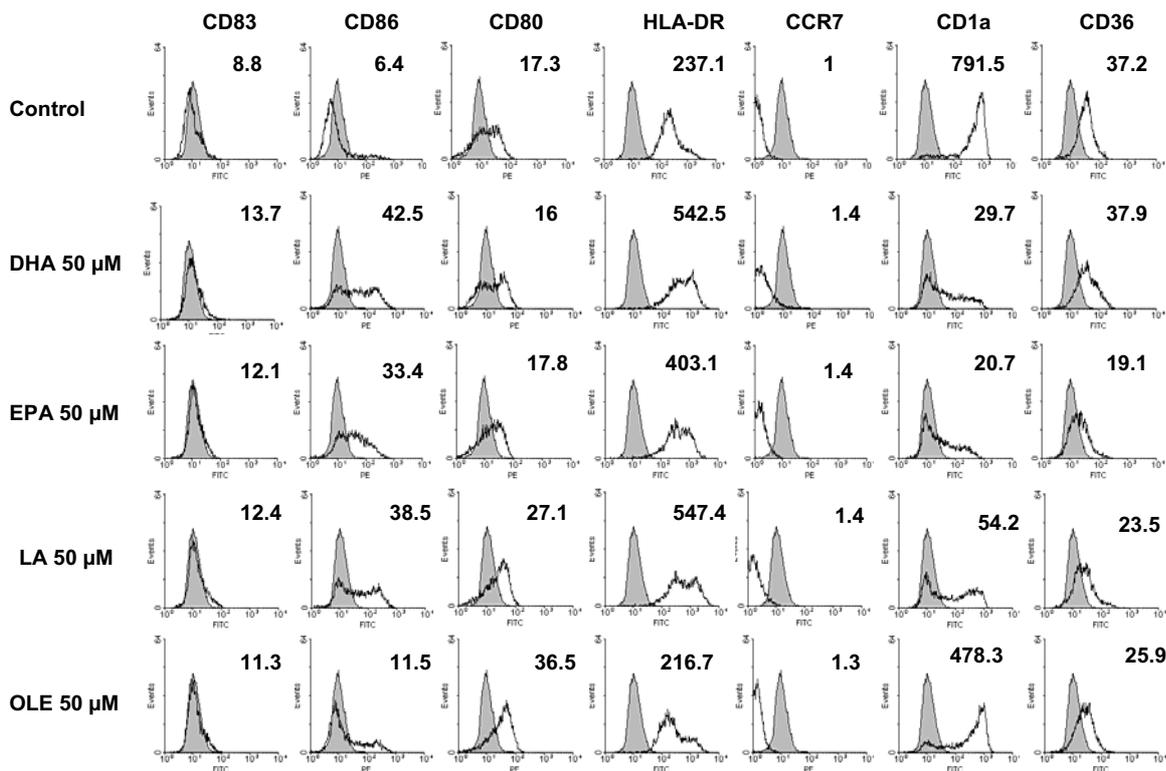


Figura 6.14 Fenotipo de DCs inmaduras tratadas con diferentes ácidos grasos. La concentración fue de 50 µM para DHA, EPA, oleico y linoleico, adicionadas al medio el primer día de diferenciación. El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

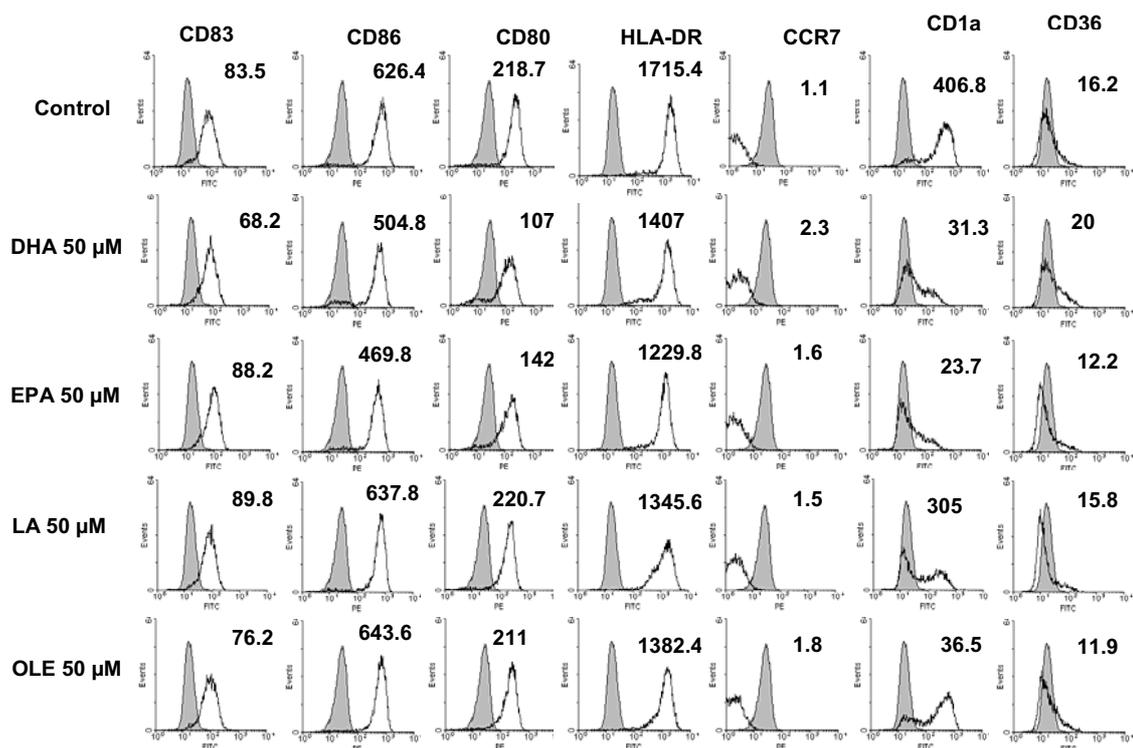


Figura 6.15. Fenotipo de DCs maduras tratadas con diferentes ácidos grasos. La concentración fue de 50 µM para DHA, EPA, oleico y linoleico, adicionadas al medio el primer día de diferenciación. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

6.5 ALTERACIONES FUNCIONALES: PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS

6.5.1 Caracterización de la proliferación linfocitaria autóloga inducida por la estimulación con células dendríticas

Tras examinar las variaciones observadas en el fenotipo de las DCs debido a la presencia de ácidos grasos, se procedió a determinar si su capacidad para estimular la proliferación linfocitaria autóloga también se encontraba alterada. Para ello se enfrentaron linfocitos autólogos con sus DCs en presencia de los ácidos grasos. Diferentes estudios han demostrado que estos ácidos grasos ejercen efectos inhibidores en la proliferación al ser capaces de actuar directamente sobre los linfocitos [160, 205, 383, 384, 386-393] por lo que un estudio directo sobre la proliferación linfocitaria en presencia de los ácidos grasos no habría permitido conocer completamente sus efectos sobre la capacidad estimuladora de la célula dendrítica sino el conjunto de los efectos sobre el linfocito y la misma. Por esta razón las DCs fueron las únicas células cultivadas en presencia de los ácidos grasos. La adición de estos se realizó desde el primer día de

Resultados

transformación de monocito hasta el sexto día en que las células ya eran DCs inmaduras. Antes de enfrentar las DCs con los linfocitos se retiró el DHA no procesado del medio de incubación.

El sexto día, tras una carga con antígeno de 4 h, las DCs fueron lavadas e irradiadas para impedir la proliferación de los linfocitos cocultivados junto a las DCs durante los seis días anteriores y para eliminar los restos de DHA que pudiesen quedar en el medio. Estos linfocitos no estaban marcados y además habían estado en contacto con el DHA por lo que no interesaba que desvirtuaran las proliferaciones de linfocitos marcados. Después se incubaron estas DCs con linfocitos marcados libres de DHA a relaciones linfocito:dendrítica que oscilaban entre 1:10 y 1:160. La mayoría de las proliferaciones se midieron a las 96 h de comienzo del cocultivo. Los datos obtenidos fueron analizados con la plataforma de proliferación celular del programa *FlowJo* para obtener promedios estadísticos de las generaciones así como el número inicial de células que se activaron (%DC) (Métodos Apartado 5.4).

En la Figura 6.16 se muestran linfocitos marcados y sin marcar con CFSE en ausencia de células dendríticas incubados durante 96 h. No se observa ningún tipo de proliferación celular. También se muestran DCs irradiadas incubadas en ausencia de linfocitos, donde tampoco se aprecia proliferación linfocitaria. Estos resultados confirman que el proceso de irradiación ha impedido la proliferación celular de los linfocitos contaminantes del cultivo de células dendríticas.

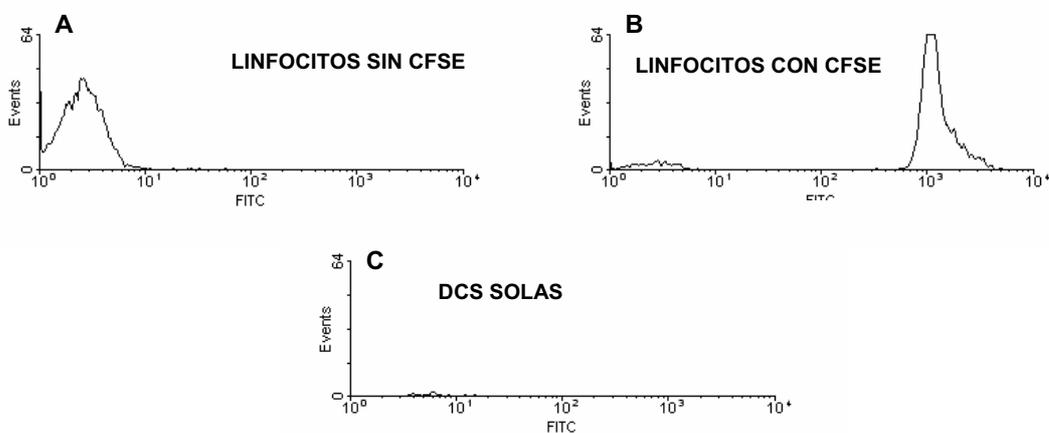


Figura 6.16. Histogramas correspondientes a proliferaciones control de linfocitos. En el histograma A los linfocitos no han sido cargados con CFSE por lo que no son FITC⁺. En el histograma B los linfocitos han sido cargados con CFSE marcando para FITC pero sin DCs en el medio de cultivo. En el histograma C se muestran DCs irradiadas cultivadas sin linfocitos. En ningún caso hay proliferación.

Los linfocitos marcados (cargados con CFSE) en ausencia de DCs no son capaces de proliferar por sí mismos. La viabilidad a las 96 h de incubación era de un 52% para los incubados con CFSE y de un 60%

para los linfocitos blancos. Tampoco son capaces de proliferar una vez irradiados los linfocitos coincubados con las DCs durante los seis días de diferenciación de monocito a dendrítica.

En la Figura 6.17 se muestran coincubaciones de linfocitos marcados con CFSE y DCs previamente cargadas o no con el superantígeno SEB. Ambas muestras no se cultivaron en la misma placa en ningún momento para evitar posibles contaminaciones del superantígeno; a las cuales las DCs son extremadamente sensibles. En cada histograma se encuentran superpuestas dos proliferaciones con diferentes relaciones dendrítica: linfocito. Antes del cocultivo las DCs fueron lavadas para evitar que restos de SEB no internalizados pudiesen activar monocitos u otras células que se encuentran en el medio junto a los linfocitos marcados con CFSE y desvirtuar así el experimento.

Se puede observar que los linfocitos enfrentados a DCs cargadas con SEB proliferan y lo hacen con una intensidad proporcional al número de DCs presentes en el cocultivo. A medida que desciende el número de DCs, la proliferación también disminuye lo que demuestra claramente que son las células dendríticas presentes en el cocultivo las que están provocando la proliferación linfocitaria. En cambio, si las DCs no han sido cargadas con SEB y son inmaduras, dicha proliferación no se produce, tal y como se puede constatar en los histogramas de la derecha de la figura.

Se utilizó el programa informático *FlowJo* para calcular las generaciones alcanzadas y las relaciones entre ellas. Además también se calculó el porcentaje de células iniciales que se activaron.

Al medir en el citómetro de flujo las poblaciones, se analizaron siempre 5000 linfocitos viables para cada histograma por lo que a medida que las proliferaciones van descendiendo en intensidad, la generación inicial aumenta en proporción a las demás. Esto se puede observar fácilmente en la Figura 6.17 donde comparando proliferaciones control SEB⁺ 1:10 con 1:160 se puede apreciar el incremento que se produce en la generación inicial en esta última. Se considerará a partir de ahora el incremento de esta generación como un indicador de inhibición de la proliferación linfocitaria (Tabla 6.12).

Tabla 6.12 Efecto de la relación dendrítica:Linfocito en la proliferación linfocitaria.

Cálculo de generaciones de la proliferación linfocitaria y porcentaje inicial de células que se han dividido (%DC).

	Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	% DC
CONTROL+ 1-10	35,1%	13,8%	24,9%	19,9%	4,7%	1,0%	0,6%	31,5%
CONTROL+ 1-20	43,7%	15,1%	22,6%	14,9%	2,8%	0,7%	0,3%	28,0%
CONTROL+ 1-40	57,6%	14,2%	16,4%	9,3%	1,8%	0,5%	0,2%	19,2%
CONTROL+ 1-80	67,8%	11,3%	11,8%	7,1%	1,4%	0,3%	0,3%	13,7%
CONTROL+ 1-160	75,7%	10,5%	8,5%	4,2%	0,8%	0,2%	0,1%	Invalid

Resultados

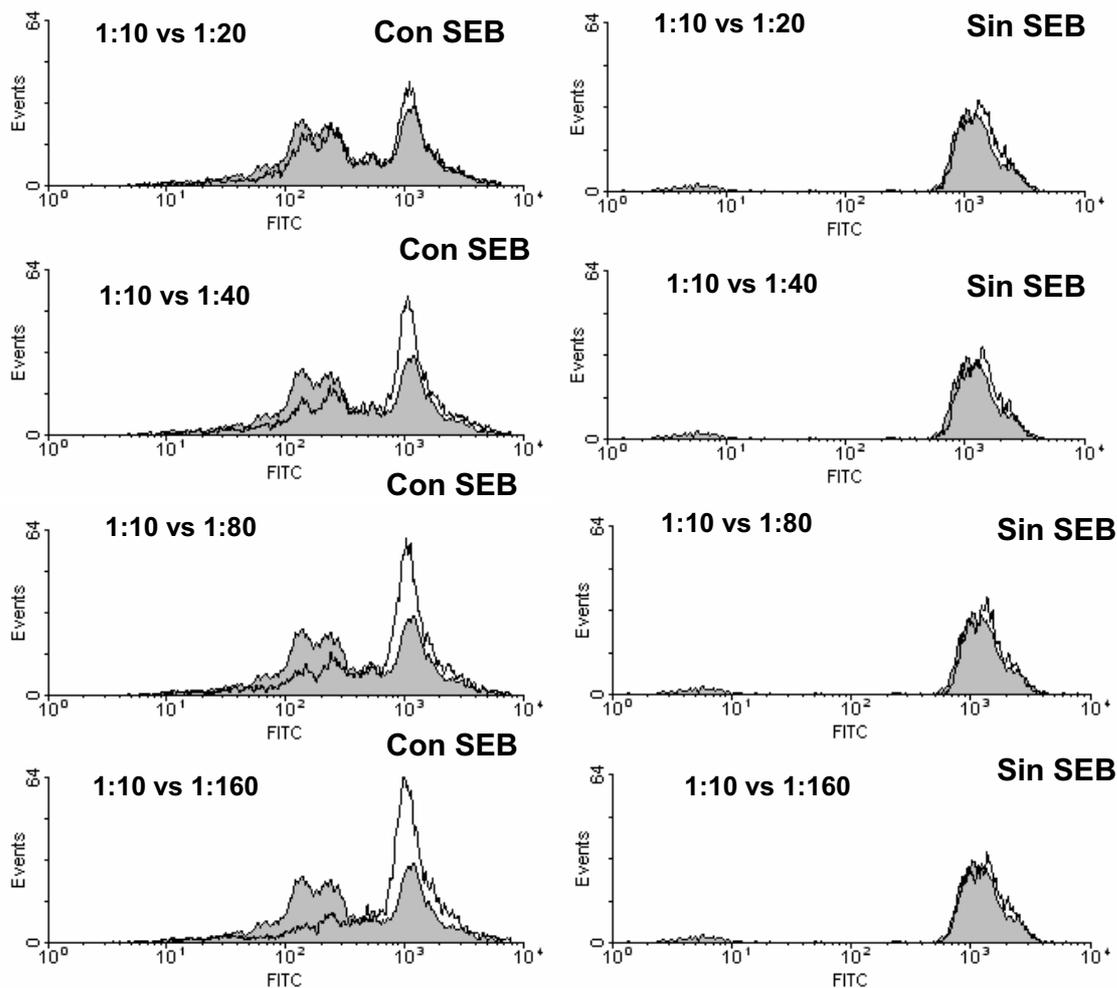


Figura 6.17. Histogramas donde se muestran proliferaciones de linfocitos. A la izquierda se muestran proliferaciones para las cuales las DCs fueron previamente cargadas con SEB, irradiadas tras 4 h de incubación, lavadas y coincubadas con los linfocitos CFSE⁺. A la derecha se muestran proliferaciones negativas en las cuales se siguieron todos los pasos anteriores excepto la carga de las células con SEB. Se enfrentan dos proliferaciones en cada histograma. La de color negro siempre es la relación dendrítica:Linfocito 1:10. La de color gris es variable y su relación se encuentra anotada en los recuadros de texto de la izquierda de los histogramas.

El término CONTROL + (Control positivo) mencionado en la Tabla 6.12 hace referencia a enfrentamientos linfocito/DC a los cuales no se les ha adicionado ni durante el enfrentamiento ni durante la diferenciación de monocito a dendrítica ningún producto exceptuando el superantígeno SEB 4 h antes del enfrentamiento. La primera generación es la población inicial por lo que los aumentos en la misma implican descensos en la proliferación linfocitaria. A partir de la segunda generación se considera que se produce proliferación linfocitaria. De acuerdo con los histogramas de la Figura 6.17, los resultados de la Tabla 6.12 muestran que a medida que disminuye la cantidad de DCs presentes en el cocultivo se incrementa el porcentaje de linfocitos pertenecientes a la primera generación y disminuyen los porcentajes pertenecientes al resto de las generaciones. El parámetro %DC es un cálculo aproximado del número de linfocitos iniciales que han llegado a activarse (Métodos, Apartado 5.4.3). El porcentaje desciende desde el 30% hasta el

Efectos de los PUFAs en las células dendríticas

13%. De nuevo conviene remarcar que las disminuciones en las proliferaciones linfocitarias control dependen de un único parámetro: la cantidad de células dendríticas presentes en el cocultivo y su capacidad estimuladora. Por ello este método es apropiado para medir los efectos que el DHA puede ejercer sobre la función estimuladora de las células dendríticas.

La Tabla 6.12 muestra el análisis generacional de la proliferación concreta que se muestra en la Figura 6.17. En la Tabla 6.13 se muestran los promedios estadísticos de generaciones de controles positivos (con SEB) y negativos (sin SEB) de proliferaciones linfocitarias de 96 h de duración. El promedio estadístico de %DC, que evalúa el porcentaje de linfocitos iniciales que se activaron, indica que un 26,4% de las células suelen activarse para el control positivo mientras que en ausencia de SEB (control negativo) únicamente se activa un 4%. Por último en la Tabla 6.14 se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las generaciones de los controles en función de la relación linfocito:DC.

Tabla 6.13 El antígeno cargado como causa de la estimulación de la proliferación linfocitaria.

Promedio de Generaciones y %DC de 15 proliferaciones linfocitarias diferentes.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control + (Con SEB)	Promedio	39,5%	11,8%	16,2%	14,7%	8,9%	4,8%	4,0%	26,4%
	Des Est (n=15)	10%	1,9%	4,7%	3,5%	3,7%	3,2%	3,3%	11,1%
Control – (Sin SEB)	Promedio	83,4%	5,9%	5,3%	3,2%	1,4%	0,6%	0,3%	4,0%
	Des Est (n=5)	11,4%	3,0%	4,1%	2,8%	1,1%	0,5%	0,3%	2,5%

Tabla 6.14 Promedio de proliferaciones linfocitarias activadas por diferentes relaciones DC:Linfocito.

Promedio de Generaciones y %DC de 15 proliferaciones linfocitarias diferentes activadas por diferentes relaciones DCs:Linfocito.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
CTRL + 1-10	Promedio	39,5%	11,8%	16,2%	14,7%	8,9%	4,8%	4,0%	26,4%
	Des Est	10%	1,9%	4,7%	3,5%	3,7%	3,2%	3,3%	11,1%
CTRL + 1-20	Promedio	46,28%	10,8%	15,0%	12,8%	7,8%	4,0%	3,4%	20,9%
	Des Est	15,41%	3,0%	5,4%	4,8%	3,7%	2,5%	2,7%	9,4%
CTRL+ 1-40	Promedio	52,80%	10,5%	12,5%	10,7%	6,8%	3,7%	3,0%	20,0%
	Des Est	17,12%	3,1%	3,8%	4,6%	4,4%	3,1%	2,8%	9,4%
CTRL+ 1-80	Promedio	58,78%	10,0%	11,4%	9,0%	5,5%	3,0%	2,4%	13,8%
	Des Est	19,77%	4,2%	5,4%	5,1%	3,8%	2,5%	2,4%	7,0%
CTRL + 1-160	Promedio	64,42%	9,0%	9,1%	7,3%	5,0%	2,8%	2,3%	12,1%
	Des Est	17,12%	3,5%	3,7%	4,2%	3,9%	2,9%	2,7%	6,0%

Resultados

En principio puede resultar sorprendente que a pesar de diluir las DCs una y otra vez la respuesta linfocitaria que se produce disminuya proporcionalmente poco. Lo lógico sería esperar que la respuesta descendiese proporcionalmente a las diluciones que se producen en el número de DCs presentes. Esto no es así a causa de la extraordinaria potencia estimuladora y presentadora de las células dendríticas. Se han realizado estimaciones que afirman que una sola dendrítica es capaz de activar entre 200 y 3000 linfocitos. Así, al bajar el número de DCs presentes en el cultivo, estas pueden suplir dicha falta incrementando su potencia estimuladora con lo cual, la respuesta inmune se produce con una intensidad parecida. Esto es cierto sobretodo para las relaciones 1:10, 1:20 y 1:40 en que las disminuciones en la proliferación son débiles. Cuando se analizan las relaciones 1:80 y 1:160, se observa un salto cuantitativo importante donde, aun produciéndose igualmente una proliferación, esta se encuentra muy mermada en comparación con los controles.

6.5.2 Proliferación linfocitaria autóloga inducida con células dendríticas transformadas en presencia de DHA

Examinando los cambios fenotípicos que tienen lugar durante la diferenciación del monocito a dendrítica inmadura y su posterior maduración en presencia de DHA se puede inferir que lo más probable es que estas DCs no sean capaces de producir activaciones linfocitarias tan intensas como las que producen las DCs normales. Si la dendrítica no expresa CD1a no puede activar a los linfocitos restringidos para CD1a. Si CD80, HLA-DR, CD83 y CD86 se encuentran disminuidos, todas ellas moléculas coestimuladoras que intervienen en y maximizan la proliferación, la DC no podrá activar la proliferación linfocitaria con la misma eficacia que una dendrítica normal. Los resultados indican que la proliferación linfocitaria se encuentra disminuida si la dendrítica ha sido transformada en presencia de DHA. Este comportamiento encajaría perfectamente con los datos que la literatura aporta sobre los efectos que el DHA ejerce sobre el sistema inmune (Introducción, Apartados 1.4.2 y 3.4)

En la Figura 6.18 se muestran proliferaciones linfocitarias de tres individuos sanos diferentes. El DHA en todos los casos ha producido una inhibición de la capacidad de la dendrítica para activar la proliferación. Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, se intentó evaluar la capacidad de la DC para activar la proliferación linfocitaria comparándola con controles más diluidos. Se hizo una comparativa de los histogramas control para sucesivas diluciones con el histograma de las células tratadas con DHA. El DHA provocaba un descenso de la capacidad de las DCs como inductoras de la proliferación linfocitaria que se correspondía con un número de DCs ocho veces inferior al control.

También se determinaron otros parámetros mediante el programa *FlowJo*. Se calcularon los promedios de las diferentes generaciones y también el %DC. Todos estos datos se muestran en la Tabla 6.15 junto con los controles positivos y negativos para una relación dendrítica linfocito de 1:10. Para mejorar

la comprensión intuitiva de los datos también se incluyen los resultados de la Tabla 6.13. Los resultados para el DHA y para el control positivo se muestran también en forma de gráfico de barras en la Figura 6.19.

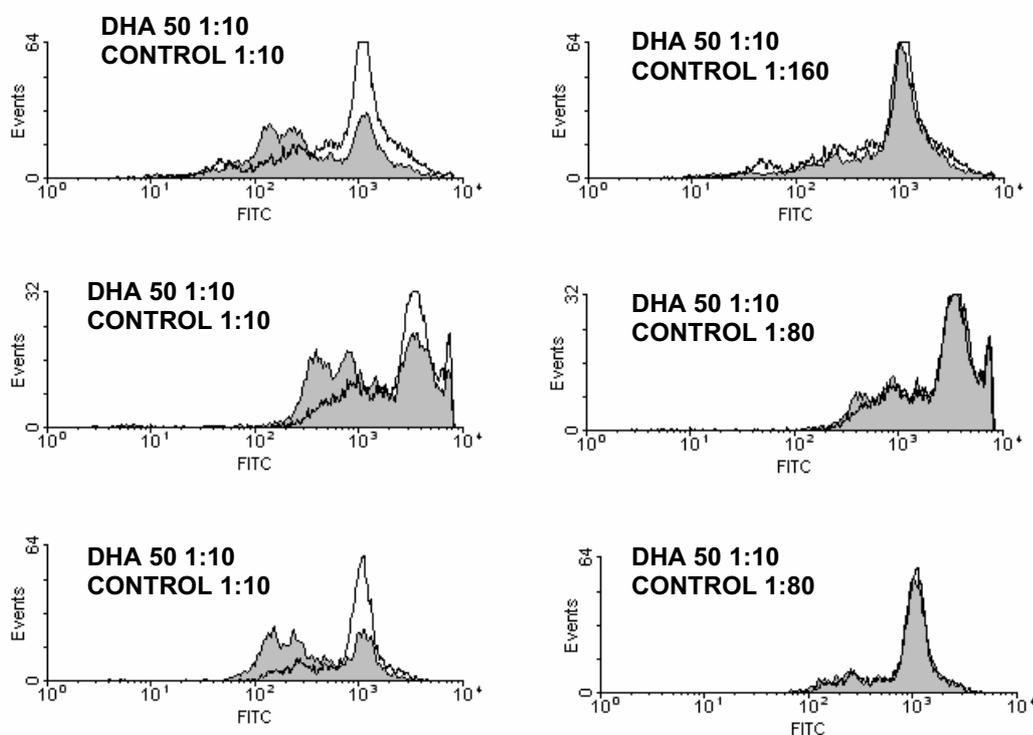


Figura 6.18. Histogramas detallando las proliferaciones linfocitarias provocadas por células dendríticas. En negro, por DCs DHA, en gris, por DCs control. La relación dendrítica-Linfocito se ha anotado en todos los casos seguidamente del nombre de la proliferación. En los histogramas de la derecha se ha buscado a qué dilución de las células dendríticas control correspondería el efecto inhibitor del tratamiento de estas mismas células con DHA.

Tabla 6.15 Efecto del DHA en la estimulación de la proliferación linfocitaria.

Promedio de Generaciones y %DC de 14 proliferaciones linfocitarias diferentes con DCs tratadas con DHA.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control +	Promedio	39,48%	11,8%	16,2%	14,7%	8,9%	4,8%	4,0%	26,4%
	Des Est (n=15)	10,02%	1,9%	4,7%	3,5%	3,7%	3,2%	3,3%	11,1%
Control -	Promedio	83,35%	5,9%	5,3%	3,2%	1,4%	0,6%	0,3%	4,0%
	Des Est (n=5)	11,40%	3,0%	4,1%	2,8%	1,1%	0,5%	0,3%	2,5%
DHA	Promedio	60,10%	9,5%	10,9%	8,5%	5,5%	3,0%	2,4%	16,3%
50 µM	Des Est (n=14)	18,96%	3,0%	5,2%	5,3%	4,0%	2,5%	2,3%	6,8%

Tanto en la Figura 6.19 como en la Tabla 6.15 se observa que la generación inicial cuyas DCs han sido tratadas con DHA aumenta con respecto al control positivo desde un 40% para el control a un 60%

Resultados

para el DHA. En consecuencia las siguientes generaciones (2-7) se encuentran disminuidas para las DCs tratadas con DHA al ser el número total de linfocitos viables analizados el mismo para todos los casos (5000 unidades). Por otro lado, la Tabla 6.15 muestra en su última columna que el porcentaje de células iniciales que se estimularon ha disminuido para el caso del DHA en un 40% desde 26,4% hasta un 16,3%.

Los linfocitos coincubados con DCs tratadas con DHA son capaces de alcanzar las mismas generaciones que los controles pero en menor número. La causa podría atribuirse a una menor estimulación linfocitaria por parte de las células dendríticas, que no son capaces de activar inicialmente el mismo número de linfocitos que el control. Es decir, la funcionalidad estimuladora de la dendrítica se encontraría disminuida.

Distribución de poblaciones

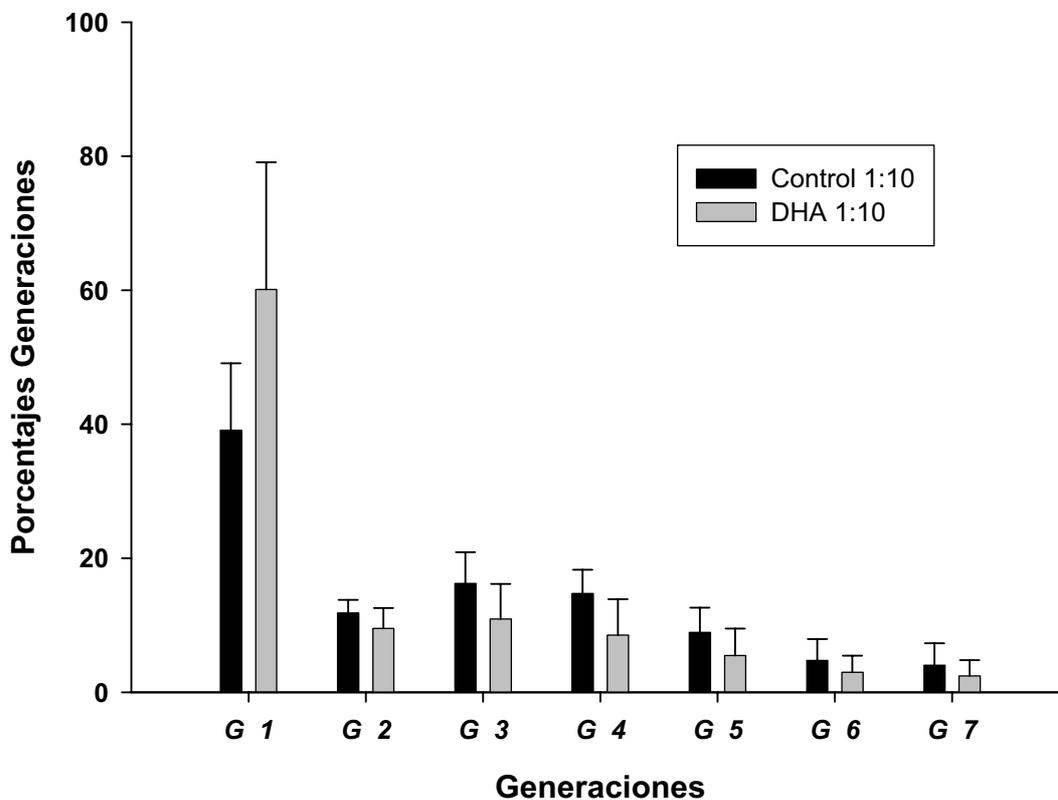


Figura 6.19. Distribución generacional linfocitaria en función del tratamiento de la dendrítica. Gráficos de barras donde se muestra la distribución poblacional de los linfocitos en función de si las DCs estimuladoras fueron cultivadas con DHA o con controles. Las barras de color gris son de DHA, las de negro del control. Las G del eje de las X sirven para enumerar cada una de las 7 generaciones estudiadas.

Al evaluar el porcentaje de linfocitos iniciales que se activaron (%DC) y compararlo con los diferentes controles sucesivamente diluidos se observa que este parámetro se sitúa para las DCs tratadas con DHA entre la relación DC/linfocito 1:40 y 1:80 de los controles. Es decir, que el DHA provoca una inhibición de la respuesta linfocitaria tal que la capacidad estimuladora de la dendrítica queda reducida a un

10-20% de la capacidad de las DCs control y esto provoca un descenso en la activación inicial de los linfocitos de un 40%.

6.5.3 Proliferación linfocitaria autóloga inducida con células dendríticas transformadas en presencia de otros PUFAs

También se han estudiado las proliferaciones linfocitarias que son capaces de inducir DCs tratadas con otros ácidos grasos. A efectos comparativos, en todos los casos se ha trabajado a concentraciones de 50 μM del ácido graso; por lo que no se puede descartar que a concentraciones superiores, el ácido linoleico y el oleico produzcan disminuciones significativas de la respuesta proliferativa.

Tabla 6.16 Promedio de proliferaciones linfocitarias activadas por DCs tratadas con EPA, linoleico y oleico.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control + (n=15)	Promedio	39,48%	11,8%	16,2%	14,7%	8,9%	4,8%	4,0%	26,4%
	Des Est	10,02%	1,9%	4,7%	3,5%	3,7%	3,2%	3,3%	11,1%
Control - (n=5)	Promedio	83,35%	5,9%	5,3%	3,2%	1,4%	0,6%	0,3%	4,9%
	Des Est	11,40%	3,0%	4,1%	2,8%	1,1%	0,5%	0,3%	2,5%
EPA 50 μM (n=3)	Promedio	50,97%	11,0%	13,0%	10,5%	7,9%	3,9%	2,8%	22,9%
	Des Est	5,71%	2,5%	1,5%	1,7%	3,3%	2,1%	2,1%	4,5%
LA 50 μM (n=4)	Promedio	44,09%	12,0%	15,7%	13,5%	7,8%	4,1%	2,7%	25,3%
	Des Est	5,83%	4,3%	3,8%	2,2%	1,8%	1,2%	1,5%	9,2%
OLE 50 μM (n=3)	Promedio	39,48%	9,9%	14,8%	14,6%	9,5%	5,2%	4,3%	31,2%
	Des Est	10,02%	1,2%	4,1%	2,1%	0,9%	1,1%	1,2%	9,2%

El EPA, al igual que sucedía con el fenotipo, presenta un comportamiento similar al DHA en cuanto a disminución de la capacidad activadora de la proliferación linfocitaria. El ácido linoleico presenta alguna capacidad inhibidora, pero es pequeña y, finalmente, el ácido oleico no presenta ninguna y, de hecho, parece incrementar la activación porque las proliferaciones producidas por DCs tratadas con ácido oleico son ligeramente superiores a aquellas desencadenadas por los controles. De cualquier modo, lo que se desprende de los resultados expuestos en la Tabla 6.16 es que el ácido linoleico, el EPA y el ácido oleico son inhibidores menos potentes de la respuesta inmune que el DHA a la concentración de 50 μM . De nuevo, basándose en las %DC y en los gráficos de las Figuras 6.20 y 6.21 se puede establecer un porcentaje de funcionalidad entre las DCs tratadas con EPA, ácido oleico y ácido linoleico y las DCs control.

Resultados

En la Figura 6.20 se exponen en forma de gráfico de barras los mismos resultados presentados en la tabla anterior. También se ha incluido en la figura un recuadro donde se comparan las generaciones obtenidas por el DHA y las obtenidas por el EPA (recuadro B). Se puede apreciar así que el DHA tiene una capacidad mayor para alterar la proliferación linfocitaria que el EPA.

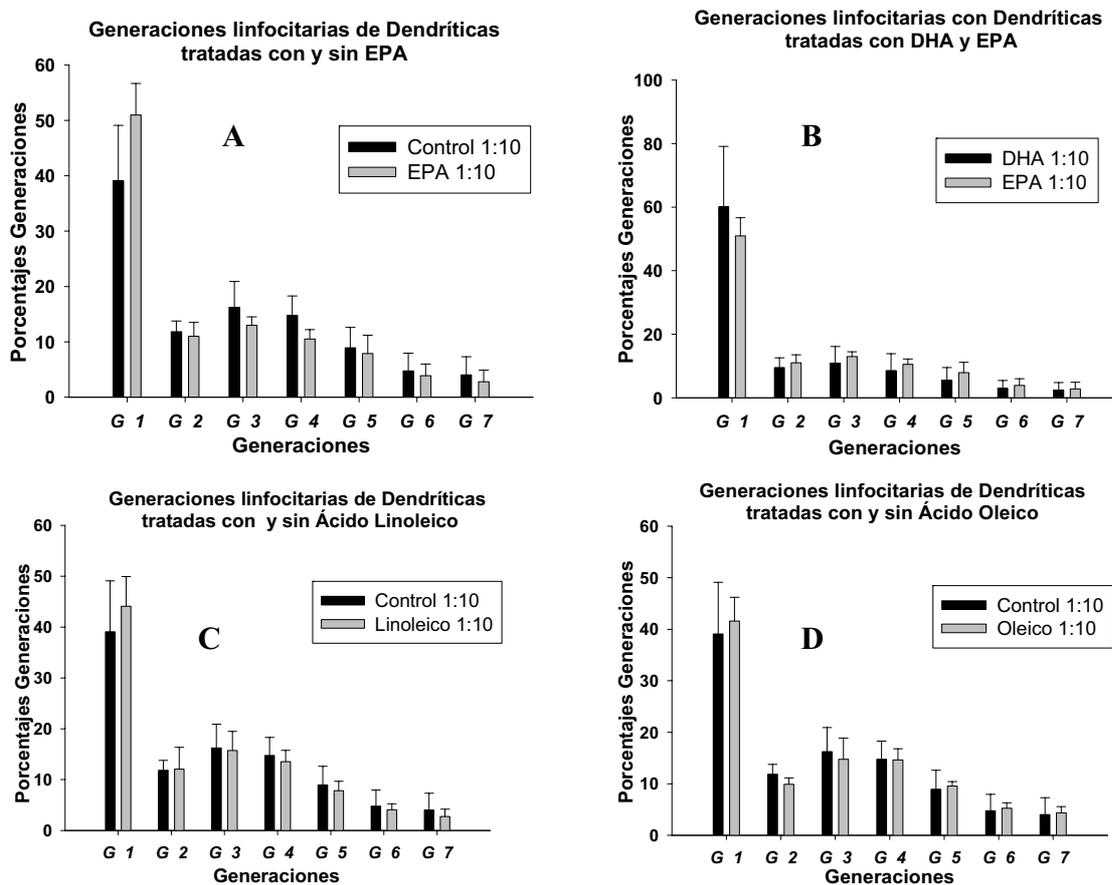


Figura 6.20. Distribución generacional linfocitaria en función del tratamiento de la dendrítica diferentes ácidos grasos. En los gráficos de barras se muestra la distribución poblacional de los linfocitos en función de si las DCs estimuladoras fueron cultivadas con: A, Control (negro) o EPA (Gris); B, DHA (negro) o EPA (gris); C, Control (negro) o Linoleico (Gris); D, Control (negro) u Oleico (Gris). Las G del eje de las X enumeran cada una de las 7 generaciones.

En la Figura 6.21 se muestran los histogramas comparativos control-ácido graso. De nuevo para el DHA la dilución equivalente es la 1:80; mientras que el resto de los ácidos grasos es la 1:20 o sin diluir.

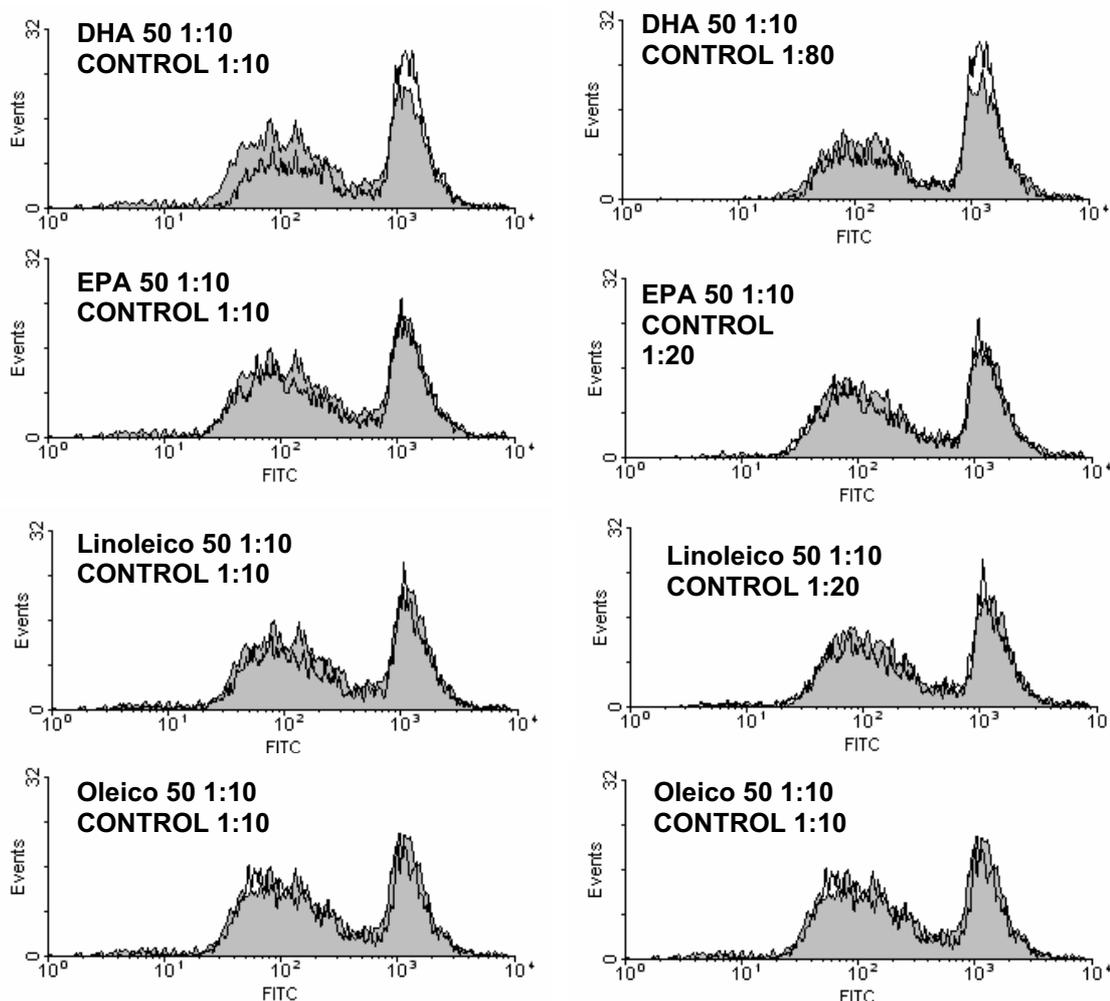


Figura 6.21. Histogramas detallando las proliferaciones linfocitarias provocadas por células dendríticas tratadas con diferentes ácidos grasos. En negro, por DCs DHA, EPA, linoleico y oleico, en gris, por DCs control. La relación dendrítica-Linfocito se ha anotado en todos los casos seguidamente del nombre de la proliferación.

6.6 ALTERACIONES FUNCIONALES: SECRECIÓN DE CITOCINAS

La secreción de citocinas es el último apartado dedicado al estudio de la funcionalidad de las DCs en presencia de DHA u otros ácidos grasos. Se han publicado muchos estudios que analizan los efectos del DHA sobre la secreción de citocinas [159, 205, 386, 387, 389, 391, 404]. Una de las células secretoras de citocinas más importantes del sistema inmune es la célula dendrítica. Nada hay publicado, sin embargo,

Resultados

sobre los efectos del DHA sobre la secreción de citocinas por parte de células dendríticas. Dos de las citocinas que más influyen en la respuesta inmune de la célula dendrítica son la IL-12 y la IL-10; cuyos efectos son muchas veces antagónicos. Por ello se ha realizado un estudio de la secreción de estas citocinas por parte de la célula dendrítica en función de la concentración de DHA presente en su diferenciación. En la Figura 6.22 se muestran los resultados.

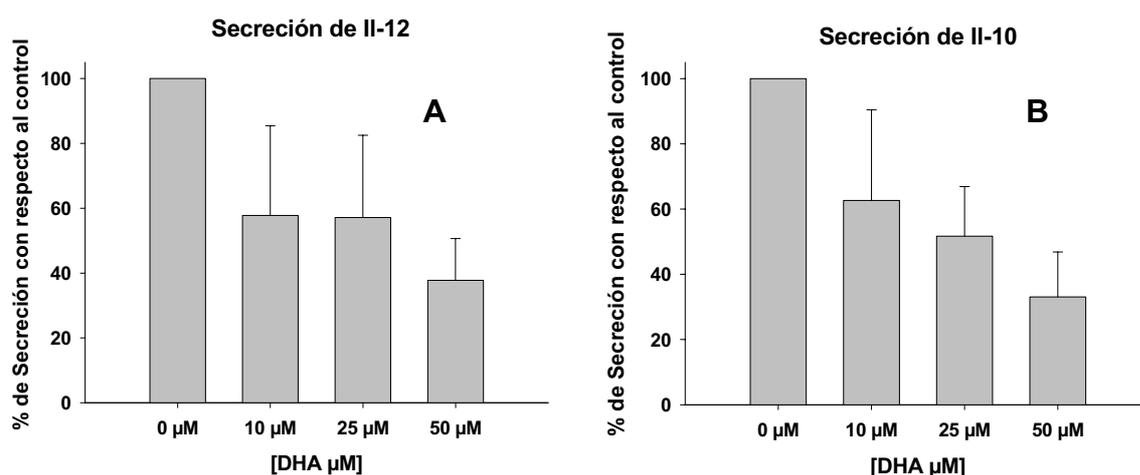


Figura 6.22. Secreción de citocinas en función de la concentración de DHA. Elisa mostrando la secreción de IL-12 (A) e IL-10 (B) en función de la concentración de DHA presente en el medio desde el primer día de diferenciación de monocito a dendrítica. El sexto día se añadió al medio LPS y a las 24 h se extrajo el medio y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser medido mediante ELISA. La media de secreciones de los controles fueron de $902 \pm 697,5$ pg/ml para la IL-12 y de 1272 ± 882 pg/ml de IL-10.

Tal y como se puede observar, el DHA inhibe la secreción de ambas citocinas de una manera dosis dependiente, provocando una disminución de hasta el 60% respecto al control a concentraciones máximas de $50\text{ }\mu\text{M}$. También se estudiaron los niveles de secreción de dichas citocinas en los otros ácidos grasos (Figura 6.23). En todos los casos se producen inhibiciones de la secreción de IL-10 e IL-12. Al comparar las inhibiciones entre sí se constató que ninguna era superior a la inducida por el DHA, siendo el oleico el que menos inhibición presentaba.

Efectos de los PUFAs en las células dendríticas

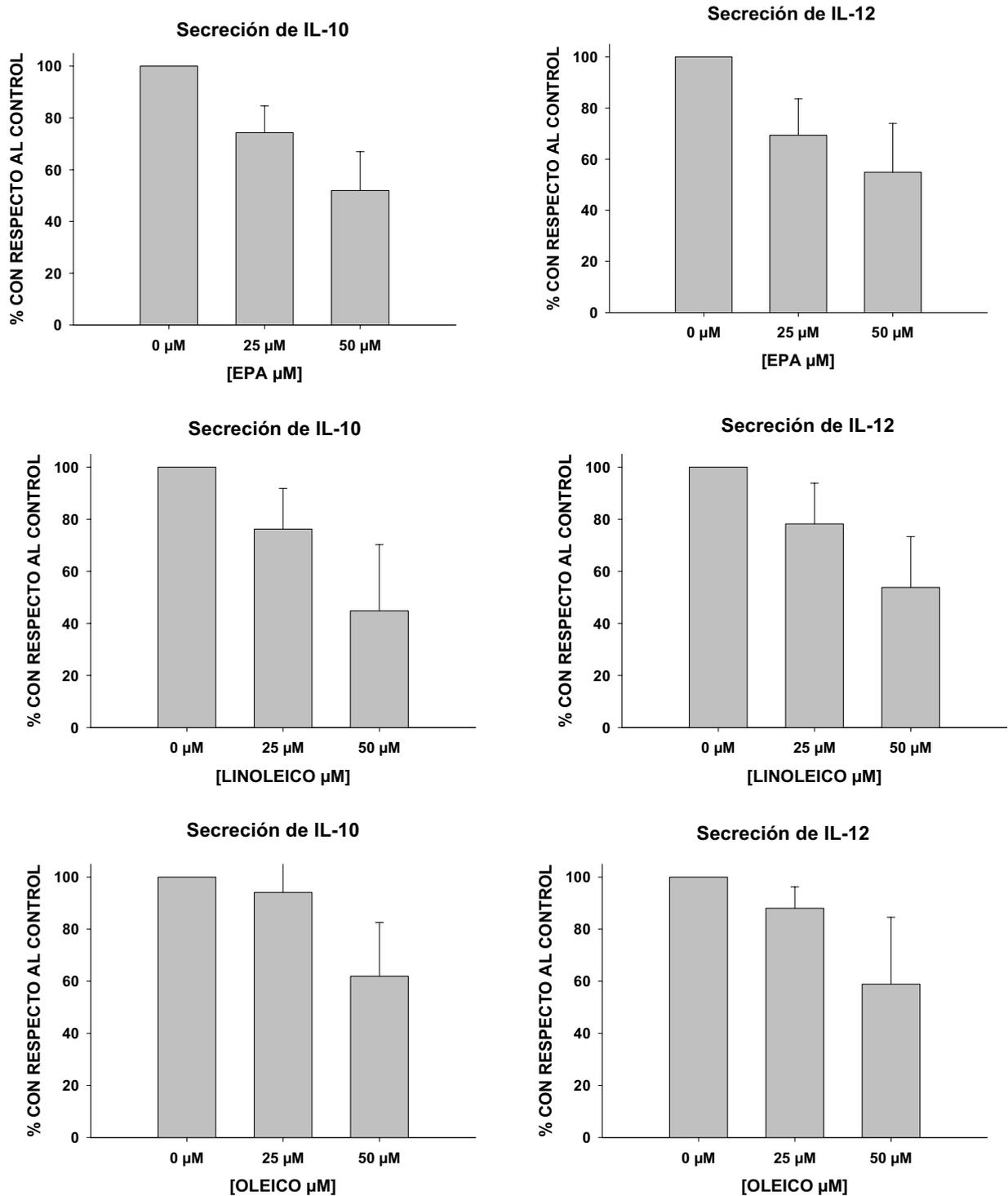


Figura 6.23. Secreción de citocinas en función de la concentración de EPA, LA y OLE. Elisa mostrando la secreción de IL-12 e IL-10 en función de la concentración de EPA, LA y OLE presentes en el medio desde el primer día de transformación de monocito a dendrítica. El sexto día se añadió al medio LPS y a las 24 h se extrajo el medio y se congeló a -80 °C para ser medido mediante ELISA.

**CAPÍTULO VII: IMPLICACIONES DE LOS
RECEPTORES NUCLEARES PPAR GAMMA Y RXR EN
LOS EFECTOS DEL DHA EN LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

7.1 RELEVANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ

El primer objetivo de este trabajo ha sido alcanzado al poner de manifiesto los efectos que el DHA realiza sobre la dendrítica. Estos efectos también los pueden reproducir en cierta medida, el resto de los ácidos grasos estudiados, aunque son cualitativamente diferentes y cuantitativamente inferiores. Cabe ahora preguntarse a través de qué mecanismo ejerce sus efectos el DHA. El DHA incrementa la expresión de algunos marcadores y disminuye la de otros. Además, dependiendo del estado madurativo de la célula dendrítica, algunos marcadores pueden llegar incluso a invertir el sentido de cambio en su expresión. Todo este comportamiento sugiere un mecanismo sujeto a una regulación muy estricta con *feed backs* positivos y negativos. Es decir, no parece tratarse de un efecto derivado de la variación de las características de la membrana celular tales como la fluidez o la permeabilidad. Si la explicación se encontrase en estos cambios, los efectos sobre los marcadores no cambiarían radicalmente de inmadurez a madurez.

Los cambios parecen deberse más bien a algún sistema perfectamente regulado y controlado. No debe olvidarse que la DC, a la par que cumple una función de importancia capital en la defensa del organismo contra los patógenos, también parece ser responsable del mantenimiento de la tolerancia y, por tanto, en los casos en que esta tolerancia no puede mantenerse, de la aparición de enfermedades autoinmunes o incluso, en casos concretos, parcialmente responsable de la muerte del individuo contribuyendo al llamado choque séptico. Por ello, la célula dendrítica es una célula que se encuentra extraordinariamente bien regulada y controlada [291]. A medida que se realizan nuevos estudios esta premisa se afianza más y más. Algunas muestras de regulación de la dendrítica por parte del sistema inmune son: la existencia de diferentes tipos de células dendríticas que desempeñan distintas funciones en el organismo (por ejemplo Langerhans, DCs plasmacitoides ...) [7, 307]; la diversidad de marcadores CD1 que permiten reaccionar contra diferentes antígenos en función de su ubicación concreta, se cree que provocando respuestas específicas contra cada tipo de patógeno dependiendo de su localización [364, 447, 448]; los niveles de expresión de CD80 y CD86, los cuales determinan cambios poblacionales de linfocitos T reguladores que, a su vez, además de regular la estimulación del resto de los linfocitos, también modulan el grado de estimulación de la propia dendrítica [359-361, 363, 449].

Un mecanismo probable que encajaría en los resultados sería un efecto sobre segundos mensajeros, sobre el sistema eicosanoide o, directamente, la activación o represión de la expresión de genes. Uno de los factores de transcripción potencialmente implicados, del que ya se ha hablado en la introducción (Capítulo 2), es el PPAR γ . Se sabe que este factor se expresa en la célula dendrítica y que su activación produce cambios importantes en el fenotipo de la misma [256, 353, 355], siendo además el DHA un ligando natural de PPAR γ [10]. De hecho, los efectos que los ácidos grasos producen en la dendrítica,

Resultados

presentados en las páginas anteriores, son muy similares a los que produce un agonista de PPAR γ como la Rosiglitazona [353]. Por ello se hizo un estudio del efecto de la Rosiglitazona tanto en DC inmadura como en madura analizando los mismos marcadores examinados ya para el DHA.

Con el objetivo de contrastar y comparar los estudios realizados por Nencioni y col. [353] con los del presente trabajo se incubaron células dendríticas desde el primer día de transformación de monocito a dendrítica con Rosiglitazona a concentraciones crecientes desde 100 nM hasta 10 μ M. A continuación se muestran en la Figura 7.1 los resultados de un experimento representativo. En la Tabla 7.1 se muestran los promedios de medianas de intensidad de fluorescencia de al menos seis individuos diferentes.

Se producen incrementos dosis dependientes en el CD86 y en el CD36; también decrementos en CD1a y CD80. El HLA-DR parece experimentar ligeros aumentos. Por último, CD83 no se ve alterado. Aunque existen muchas coincidencias con el DHA, también se observan diferencias como la expresión de CD83, que permanece invariable, o los menores incrementos en HLA-DR. Además, los aumentos de CD36 no se observaban con tanta intensidad con DHA. Todos estos resultados coinciden en cuanto a la Rosiglitazona con los ya mencionados y expuestos por Nencioni y col. [353]. Estas variaciones son muy similares a las que ejerce el DHA y los otros ácidos grasos objeto de estudio (aunque estos últimos con menor intensidad) en estas mismas circunstancias.

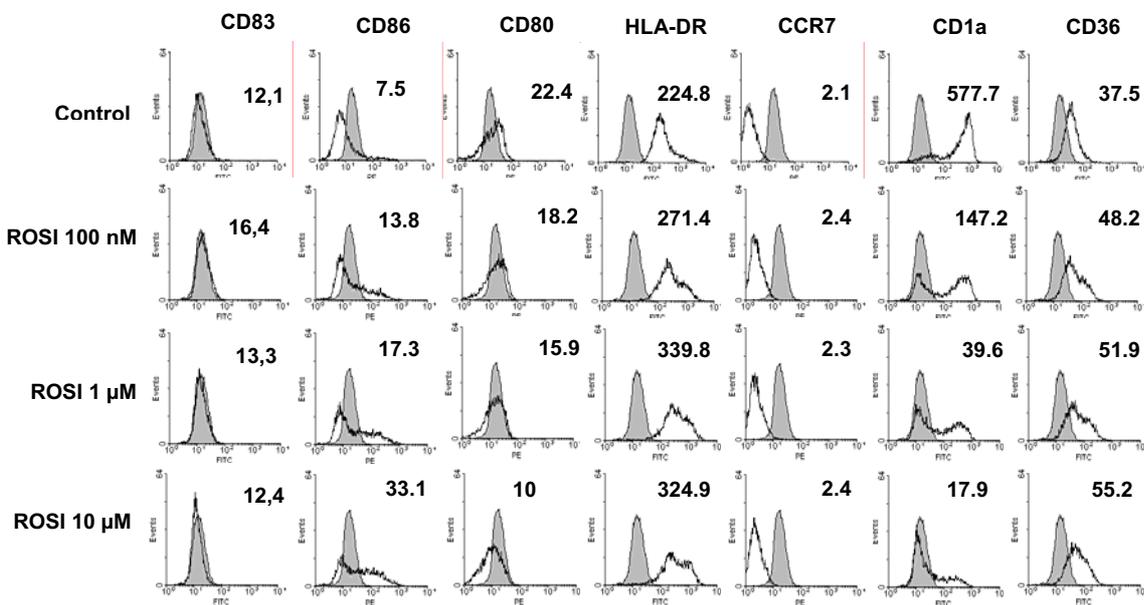


Figura 7.1. Fenotipo de DCs inmaduras tratadas con diferentes concentraciones de Rosiglitazona. Fenotipo de DCs inmaduras a concentraciones crecientes de Rosi (100 nM-10 μ M) adicionadas al medio desde el primer día de diferenciación. El sexto día se recogieron las células y se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Tabla 7.1 Fenotipo DC inmadura en función de la concentración de ROSI.

Promedio estadístico de MFIs de DCs Inmaduras de seis *Buffy Coats* diferentes incubados con Rosiglitazona a concentraciones crecientes.

	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	14,5 \pm 6,2	11,5 \pm 6,9	24,3 \pm 8,7	350,8 \pm 177,8	2,3 \pm 1,2	300,6 \pm 226,7	42,1 \pm 13,6
ROSI 100 nM	10,5 \pm 3,3	12,7 \pm 7,8	13,7 \pm 5,3	415,4 \pm 198,9	2,6 \pm 0,7	95,5 \pm 67,5	57,7 \pm 12
ROSI 1 μM	16,2 \pm 2,8	29,0 \pm 11,6	15,8 \pm 3,5	426,6 \pm 97,6	1,9 \pm 1,1	37,6 \pm 24,5	61,8 \pm 24,7
ROSI 10 μM	15,7 \pm 2,2	35,3 \pm 16	12,4 \pm 2,3	482,2 \pm 89,6	2,1 \pm 0,5	22,3 \pm 6,4	71,3 \pm 28,4

Si ahora se examina la maduración de las DCs en presencia de Rosiglitazona los resultados (Figura 7.2 y Tabla 7.2) coinciden de nuevo con los publicados por Nencioni. CD83 desciende y también lo hacen CD1a y CD80. Pero CD86 se mantiene cerca de niveles máximos, igual que HLA-DR. CCR7 se mantiene a los mismos niveles que el control. Por último, CD36 aumenta pero su incremento no parece ser dependiente de la concentración de Rosiglitazona añadida al medio.

Aunque los resultados siguen el mismo comportamiento que los ya presentados para el DHA, también aquí afloran pequeñas diferencias. El HLA-DR disminuye muy poco en madurez mientras que en DHA el descenso, que era concentración dependiente, sí era importante. El CD86 no se reduce mientras que con DHA se producían caídas en madurez. Por lo demás los efectos son idénticos, incluso la contracción de CD83 coincide.

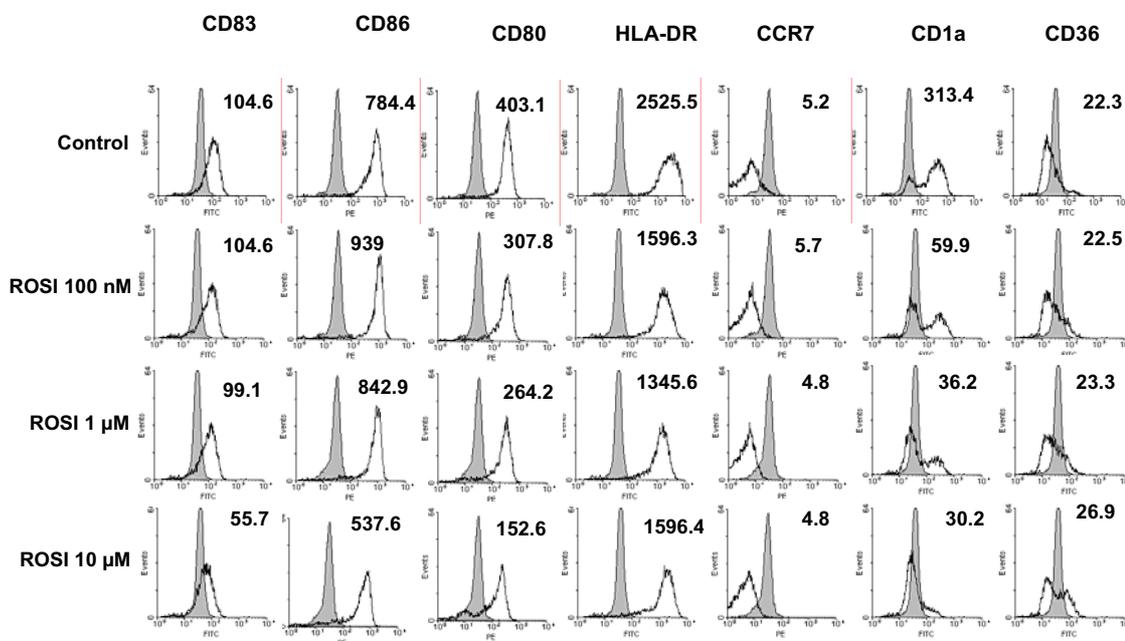


Figura 7.2. Fenotipo de DCs maduras tratadas con diferentes concentraciones de Rosiglitazona. Fenotipo de DCs maduras a concentraciones crecientes de Rosi (100 nM-10 μ M) adicionadas al medio desde el primer día de diferenciación. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Resultados

Tabla 7.2 Fenotipo DC madura en función de la concentración de ROSI.

Promedio estadístico de MFIs de DCs maduras de seis *Buffy Coats* diferentes incubados con Rosiglitazona a concentraciones crecientes.

	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	61,3±19	446,5±201,1	178,2±90,5	1565,7±538,6	2,5±1,8	225,2±169,1	23,9±7,8
ROSI 100 nM	52±21,9	467,1±214,4	180,9±79,8	1270,7±746,1	2,1±1,6	68,7±81,7	30,9±11,6
ROSI 1 µM	56,6±19,1	396,1±182,9	118,7±69,8	1256,8±279,6	2,9±1,9	41,1±32,2	42,4±17,7
ROSI 10 µM	48,2±10,6	405,7±109,6	106±46,3	1369,3±457,5	2,5±1,2	25,9±8,1	32,4±7,3

Se han analizado también las proliferaciones linfocitarias en presencia de Rosiglitazona. En el estudio de Nencioni y col. [353] se trabajaba a concentraciones tres veces superiores a las utilizadas en el presente estudio por lo que las inhibiciones de las proliferaciones presentadas aquí son también menores. Estas proliferaciones muestran el mismo comportamiento que con DHA aunque en el caso de la Rosiglitazona la inhibición de la proliferación es menor (posiblemente a causa de la menor concentración mencionada). La razón por la que no se trabajó a concentraciones superiores de Rosiglitazona es que a estas concentraciones de 1 y 10 µM ya se producían todos los cambios fenotípicos que se observaban en los tratamientos con DHA, por lo cual no se creyó necesario incrementar la concentración. En la Figura 7.3 se muestra dos histogramas donde se compara una proliferación de DCs tratadas con Rosiglitazona y poblaciones control con la misma relación que las DCs tratadas 1:10 y con una relación 1:80 cuya proliferación se ajusta perfectamente a la del tratamiento con Rosiglitazona.

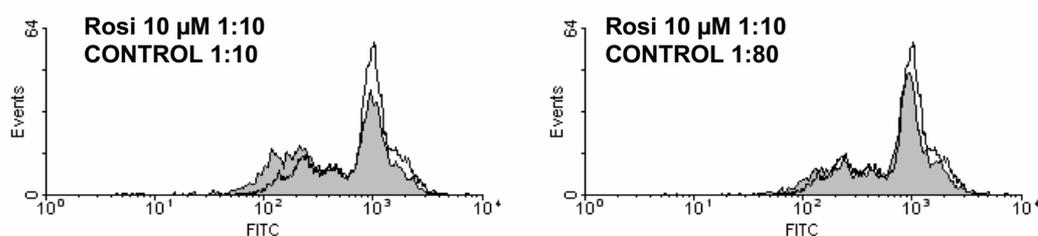


Figura 7.3. Histogramas detallando las proliferaciones linfocitarias provocadas por células dendríticas tratadas con rosiglitazona. En negro, por DCs con Rosiglitazona 10 µM, en gris, por DCs control. La relación dendrítica-Linfocito se ha anotado en todos los casos seguidamente del nombre de la proliferación.

La inhibición de la proliferación es similar a la que se obtenía al tratar las DCs con DHA. En la Tabla 7.3 se muestran una media de cinco proliferaciones para concentraciones de 1 y 10 µM de Rosiglitazona.

Tabla 7.3 Proliferaciones linfocitarias de DCs en función de la concentración de ROSI.

Promedio de Generaciones y %DC de 5 proliferaciones linfocitarias diferentes con DCs tratadas con Rosiglitazona.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control + (n=15)	Promedio	39,5	11,8	16,2	14,7	8,9	4,8	4,0	26,4
	Des Est	10,0	1,9	4,7	3,5	3,7	3,2	3,3	11,1
Rosi 1 μM (n=5)	Promedio	39,7	10,9	16,3	14,6	10,1	4,8	3,6	24,2
	Des Est	23,9	2,3	7,4	7,3	3,4	2,0	1,7	6,6
Rosi 10 μM (n=5)	Promedio	44,8	10,9	13,0	10,8	6,9	3,8	3,8	19,7
	Des Est	14,6	1,6	2,8	4,8	4,1	2,9	3,6	5,8

El porcentaje de %DC desciende desde 24,6 hasta 19,7 para Rosiglitazona situándose en un lugar intermedio entre el DHA (16%) y los controles (24,6%). Aunque en la Figura 7.3 se ha mostrado una inhibición cercana al 85%, en realidad los promedios de las diferentes proliferaciones sitúan la inhibición de la capacidad estimuladora de la dendrítica en torno a un 75% (1:40). Esto no quiere decir en absoluto que la proliferación de los linfocitos, medida en función del parámetro %DC, haya disminuido en un 75% pues fácilmente se puede observar que tan sólo lo ha hecho en un 20 %. El dato se refiere a que este tipo de proliferación es el que producirían DCs control que estuviesen en un número cuatro veces inferior a los controles 1:10 que se han utilizado inicialmente. De ahí la denominación de inhibición de la capacidad estimuladora de la dendrítica y no la inhibición de la proliferación linfocitaria (Métodos, Apartado 5.4.3).

Finalmente, para acabar de caracterizar los cambios que produce la Rosiglitazona en la célula dendrítica, se estudió la secreción de citocinas en presencia del activador de PPAR γ . En el mismo estudio se observa una inhibición en la secreción de citocinas por parte de DCs tratadas con activadores de PPAR γ entre las cuales se encuentran IL-6, TNF- α , IL-15 e IL-12 [353]. Como se recordará los resultados obtenidos al realizar incubaciones con DHA también mostraban dicha inhibición en la secreción de citocinas para IL-12 y para IL-10. En la Figura 7.4 se muestran los resultados obtenidos para IL-10 y IL-12. Los resultados confirman lo ya demostrado en el estudio de Nencioni y col. [353], es decir, que la Rosiglitazona produce una inhibición de la secreción de citocinas por parte de las células dendríticas. A concentraciones máximas la inhibición es superior al 60% para ambas citocinas. Estos resultados son muy similares a los obtenidos al tratar DCs con DHA.

Cabría pues suponer que el DHA, que actúa en la proliferación linfocitaria, en la inhibición de la secreción de citocinas y en la modificación del fenotipo de una manera muy similar a la Rosiglitazona, ejerce sus efectos a través de la activación del PPAR γ . Ya se conoce que los ácidos grasos insaturados son capaces de activar el PPAR γ en muchos tipos celulares [10, 219, 236, 238]. Sobre todo esto se ha estudiado en los adipocitos donde se activa su diferenciación de preadipocitos a adipocitos [257-259].

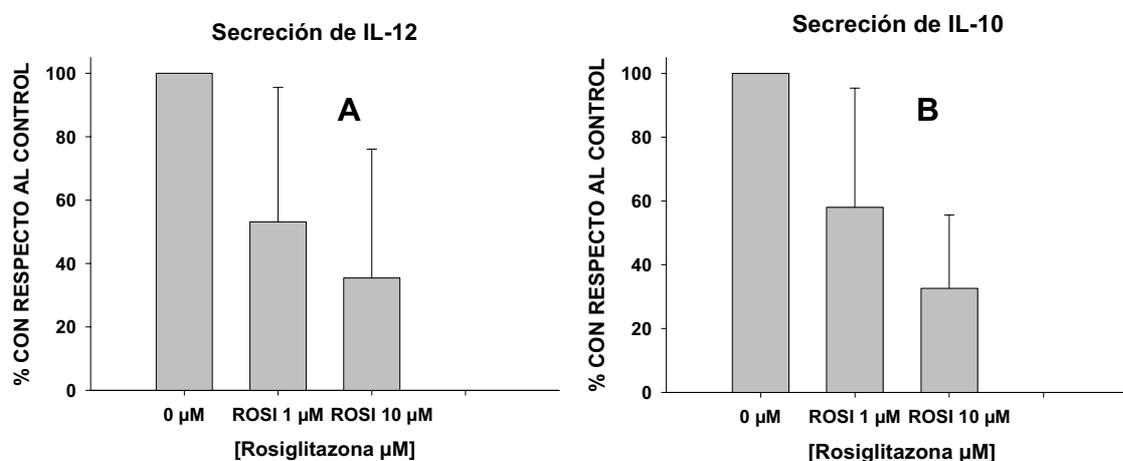


Figura 7.4. Secreción de citocinas en función de la concentración de ROSI. Elisa mostrando la secreción de IL-12 (A) e IL-10 (B) en función de la concentración de Rosiglitazona presente en el medio desde el primer día de diferenciación de monocito a dendrítica. El sexto día se añadió al medio LPS y a las 24 h se extrajo el medio y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser medido mediante ELISA. La media de secreciones de los controles fueron de $902 \pm 697,5\text{ pg/ml}$ para la IL-12 y de $1272 \pm 882\text{ pg/ml}$ de IL-10.

Sin embargo, es aquí donde se plantea una disyuntiva ya que hay un dato que no encaja en el esquema general. Los estudios de activación de PPAR γ [10] (Figura 7.5) otorgan al DHA una pobre capacidad activadora de PPAR γ ; por debajo del EPA y del LA. En cambio, el DHA es uno de los ácidos grasos más potentes al modificar el fenotipo de la DC y sus proliferaciones linfocitarias, superior al EPA y, desde luego, muy superior al LA, según los resultados ya mostrados anteriormente. El estudio se hizo en *Xenopus* por lo que no se descarta que en humanos la afinidad de los ácidos grasos varíe. Se trata del único estudio encontrado que evalúa estos parámetros. Si se ordenan en base a este estudio los ácidos grasos de mayor a menor según su capacidad activadora de PPAR γ el resultado sería el siguiente: EPA > LA > DHA > OLE. Es decir, el DHA se situaría en tercer lugar por detrás de EPA y LA siendo el ácido graso que mayores efectos produce en la célula dendrítica. Aunque los resultados mostrados en la Figura 7.5 son de *Xenopus* y no se pueden correlacionar los datos de estas actividades con actividades reales de PPAR γ en dendrítica humana se decidió ampliar las investigaciones y evaluar si el DHA actuaba sólo sobre PPAR γ o también podía afectar a RXR en el heterodímero PPAR γ :RXR.

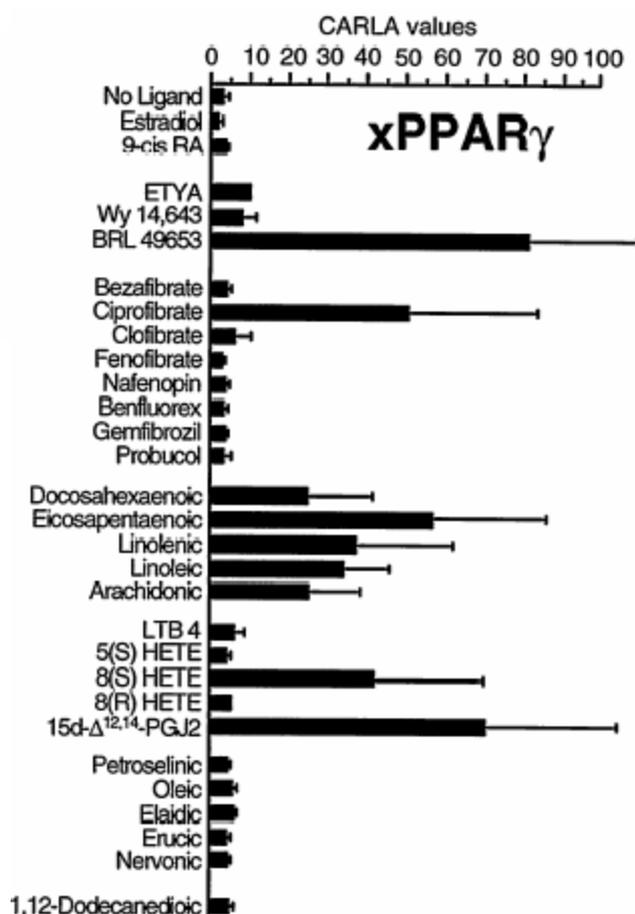


Figura 7.5. Identificación de los ligandos para PPAR γ en *Xenopus laevis*. La concentración de todos los compuestos testados fue de 100 μ M. El valor relativo de Carla 100 corresponde a la cantidad de SRC-1 retenida por los correspondientes ligandos en presencia de 10 μ M ETYA. Se muestra la media de tres experimentos independientes, no triplicados, razón por la cual se explican las altas desviaciones estándar. Extraído de [10].

7.2 RELEVANCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR RXR

Para intentar encontrar una explicación a los hechos diferenciales que se observan entre el comportamiento del DHA y el de la Rosiglitazona, así como para intentar explicar mejor el potente cambio en el fenotipo que es capaz de producir este ácido graso, se procedió a trabajar con compuestos que pudiesen actuar a través de mecanismos similares a aquellos que utilizan los activadores de PPAR γ .

Como ya se ha comentado en la introducción, PPAR γ no actúa en solitario sino que se ve forzado a asociarse y formar un heterodímero compuesto por un monómero de PPAR γ y otro de RXR. En otros tipos celulares diferentes de las DCs tales como los adipocitos se ha caracterizado que los compuestos activadores de RXR, tales como el 9cRA o Retinol, provocan en muchos casos efectos similares a los que producen los activadores de PPAR γ [219, 450]. Se cree que esto sucede al activar el mismo heterodímero pero siguiendo un camino diferente: a través del monómero RXR del heterodímero. También se sabe que si se aplican simultáneamente ambos activadores los efectos que se producen son sumatorios [219, 451, 452]. Se justifica este comportamiento por una activación simultánea de las dos partes del heterodímero. Por otro lado, se han realizado estudios que afirman que los homodímeros de RXR son capaces en

Resultados

ocasiones de emular la actividad del heterodímero PPAR γ :RXR [453]. Por todo ello se han realizado estudios con 9cRA, un activador de RXR, para estudiar sus efectos en la DC.

Además, a pesar de que se conocen los efectos de los retinoides sobre multitud de tipos celulares, se han realizado pocos estudios sobre los efectos que los mismos ejercen sobre las células dendríticas. En uno de ellos se determina la expresión de receptores de retinoides durante la diferenciación de monocito a dendrítica [454]. En otro, se analiza el efecto sobre la inducción de apoptosis de las DCs inmaduras pero no en las maduras [436]. También se demuestran efectos cooperativos entre los retinoides y algunas citocinas madurativas como el TNF α que incrementan la expresión de CD86 y HLA-DR. El principal problema que se encuentra en este último estudio es que se utilizan concentraciones muy elevadas de retinoides (alrededor de 1 μ M), lo que probablemente active otras vías distintas de diferenciación. Los RXRs reconocen el 9cRA con una $k_{0.5} \sim 15$ nM [275], con lo cual se deduce que 9cRA podría ejercer efectos a concentraciones bajas del orden de 10-15 nM, mucho más próximas a sus constantes de afinidad. Estos estudios permiten sugerir que concentraciones muy bajas de 9cRA del orden de 1 a 10 nM podrían producir efectos significativos en la diferenciación en las células dendríticas mientras que concentraciones superiores provocarían la entrada en apoptosis de las mismas.

En primer lugar, se confirmó la inducción de apoptosis por el 9cRA (Figura 7.6), mediante un análisis de la distribución de poblaciones tratadas con diferentes concentraciones de 9cRA en estado maduro e inmaduro.

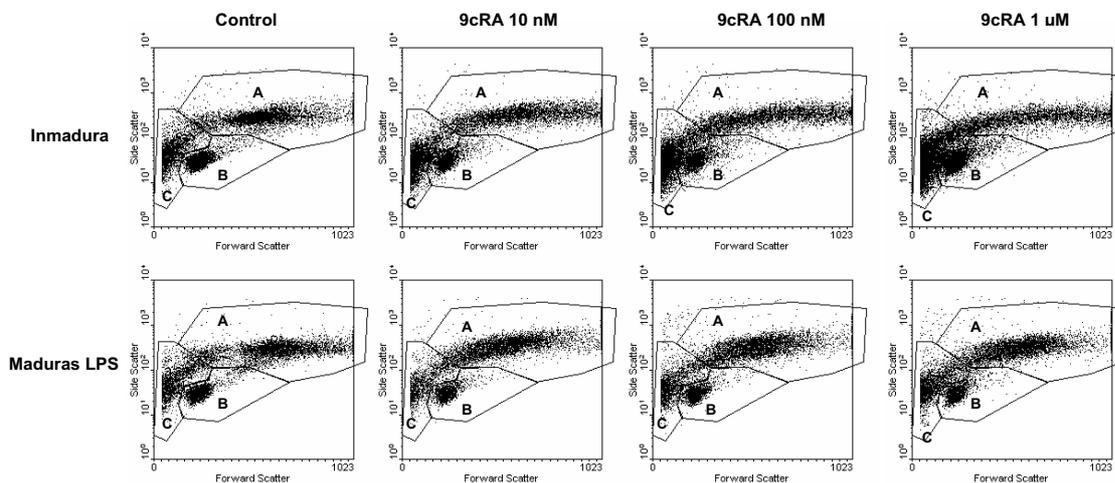


Figura 7.6. Mortalidad causada por 9cRA en DCs y linfocitos en función de la concentración. *Dotplots* donde se exponen las diferentes poblaciones: DCs (A), linfocitos (B) y debris (C) y su variación en función de incrementos de concentración de 9cRA y en función del estado maduro o inmaduro de las células. Todas las células, inmaduras y maduras, estuvieron desde el sexto al octavo día en incubación con o sin LPS respectivamente.

Se observa como las DCs inmaduras presentan una mayor mortalidad cuando son incubadas a concentraciones crecientes de 9cRA. Esto no ocurre con las DCs maduras, las cuales conservan intactos

sus porcentajes poblacionales. En la Tabla 7.4 se muestran los porcentajes de las tres poblaciones correspondientes a los *dotplots*: DCs, linfocitos y desechos celulares (debris) de la Figura 7.6. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente por Geissman y col.[436].

Al tratar las DCs inmaduras con 9cRA la toxicidad ya es apreciable a partir de 100 nM y a concentraciones de 1 μ M la población de células muertas presentes se ha doblado. Los linfocitos no parecen verse afectados por el 9cRA y sus porcentajes se mantienen constantes independientemente de las concentraciones de 9cRA con que se hayan tratado las células al añadir el estímulo madurativo LPS al medio de incubación. El inicio de la maduración evita la toxicidad del 9cRA, de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente [436]] .

Tabla 7.4 Mortalidad causada por 9cRA en DCs y linfocitos en función de la concentración.

Porcentajes linfocito-dendrítica-debris a concentraciones crecientes de 9cRA en presencia y ausencia de LPS.

	Control	9cRA 10 nM	9cRA 100 nM	9cRA 1 μ M
DCI				
DCs	44,7%	45,9%	37,6%	25,7%
Linfocitos	32,1%	21,3%	20,8%	27,5%
Debris	23,1%	32,4%	41,3%	46,5%
LPS				
DCs	51,4%	61,5%	55,1%	50,4%
Linfocitos	24,9%	19,1%	21,5%	22,5%
Debris	23,7%	19,2%	22,6%	26,7%

Como consecuencia de estos estudios, los experimentos en que participe el 9cRA se realizarán a concentraciones de 100 nM o inferiores (principalmente a 10 nM) para evitar en lo posible la muerte de las células.

El estudio de fenotipaje de las células dendríticas tratadas con concentraciones crecientes de 9cRA se muestra a continuación en la Figura 7.7. Se aprecian diferencias en el fenotipo que son dependientes de la concentración de 9cRA presente en el medio. CD86 y HLA-DR aumentan significativamente al aumentar la concentración de 9cRA. No es necesaria la presencia de TNF α para que estos aumentos se produzcan [436]. También aumentan CCR7 y CD83. Disminuyen, en cambio, CD1a, CD80 y CD36. El patrón de cambio del fenotipo celular de nuevo coincide con el que se producía al tratar las células con DHA o

Resultados

Rosiglitazona. Se muestran en la Tabla 7.5 los promedios de MFIs de DCs inmaduras a concentraciones crecientes de 9cRA.

Estos promedios confirman los resultados mostrados en el gráfico. Se producen incrementos de CD86, CCR7, CD83 y HLA-DR. CCR7 y CD83 como se recordará también aumentaban al tratar las células con DHA pero no con Rosiglitazona. Se producen descensos en CD80, CD1a y, esta vez, en CD36. CD36 disminuye a concentraciones crecientes de 9cRA cosa que no hacía el DHA. Si no se tuviera en cuenta las caídas de CD80 y de CD1a se podría decir que el 9cRA está activando la maduración de la dendrítica pero a niveles muy débiles. Este fenotipaje es idéntico al que se obtiene con DHA si excluimos los efectos que se producen en CD36.

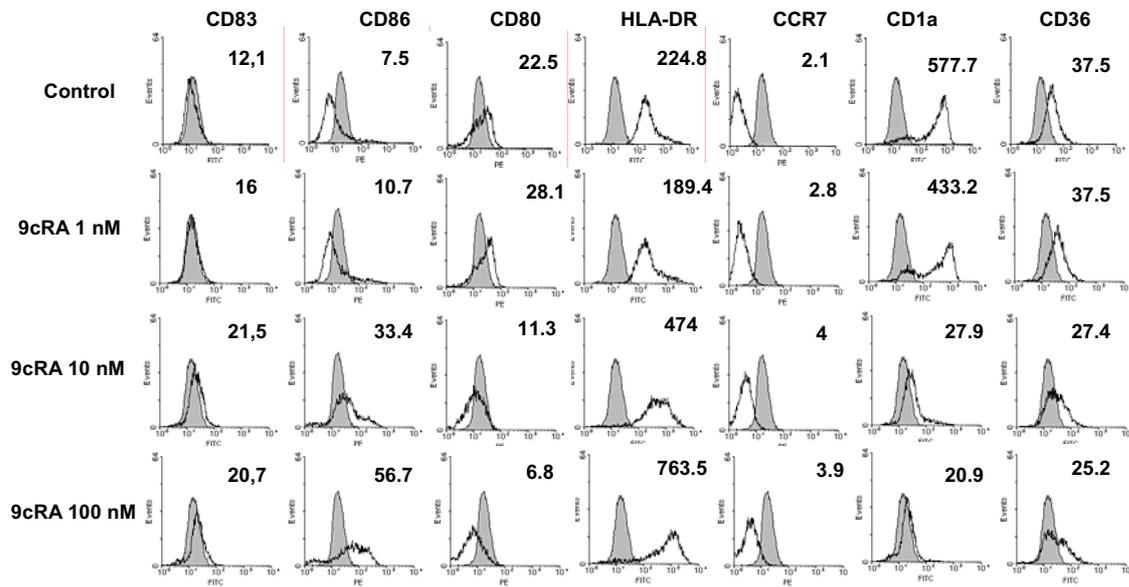


Figura 7.7. Fenotipo de DCs inmaduras tratadas con diferentes concentraciones de 9cRA. Las concentraciones han sido crecientes desde 1 hasta 100 nM, adicionadas al medio desde el primer día de diferenciación. El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Tabla 7.5 Fenotipo DC inmadura en función de la concentración de 9cRA.

Promedio estadístico de MFIs de DCs Inmaduras de 5 *Buffy Coats* diferentes incubados con 9cRA a concentraciones crecientes.

DC inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
CONTROL	11,6±3,0	7,9±3,3	23,6±9,1	329,9±162,8	1,9±0,9	464,2±173,9	40,1±12,4
9cRA 1 nM	12,9±2,5	12,1±3,1	29,4±3,4	292,0±167,8	2,1±0,7	432,5±193,1	35,6±5,7
9cRA 10 nM	17,8±3,4	27,0±6,6	9,3±2,4	349,7±131,3	3,3±1	29,1±9,3	27±5,7
9cRA 100 nM	22,4±8,1	41,1±15,3	8,0±2,6	587,0±266,9	3,3±1,1	24,1±7,3	26,0±0,6

En la Figura 7.8 se muestra el fenotipo de las células dendríticas maduras tras ser incubadas durante 48 h con LPS en presencia de 9cRA y en la Tabla 7.6 se recogen los promedios de MFIs de marcadores de DCs maduras de cinco individuos diferentes.

Los efectos son más intensos que los que producía el DHA para algunos marcadores. En maduración se observa un efecto contrario al que se producía en inmadurez. Donde antes aumentaba claramente la expresión (CD83, CD86 y HLA-DR), ahora disminuye o, más bien, no permite que el proceso de maduración avance hasta los niveles de expresión que consiguen los controles. Esto ocurría con el DHA pero no con Rosiglitazona. Lo mismo ocurre con CCR7, este aumenta emulando al DHA y diferenciándose de la Rosiglitazona. El CD36 aumenta en función de la concentración hasta niveles casi iguales a los que presentaban las DCs control inmaduras. También se produce una clara inhibición de la expresión de CD80 o, mejor dicho, no se alcanzan los mismos niveles de activación de CD80 que en el control. En cuanto a CD1a se produce una inhibición completa de su expresión.

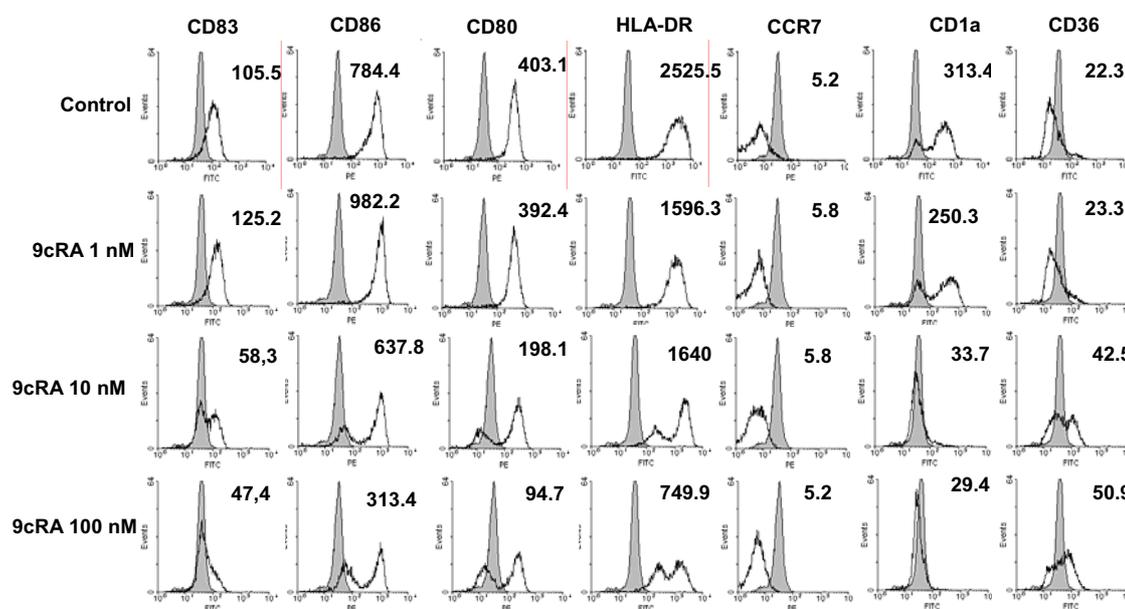


Figura 7.8. Fenotipo de DCs maduras tratadas con diferentes concentraciones de 9cRA. Las concentraciones han sido crecientes desde 1 hasta 100 nM, adicionadas al medio desde el primer día de diferenciación. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Tabla 7.6 Fenotipo DC madura en función de la concentración de 9cRA.

Promedio estadístico de MFIs de DCs Maduras de 5 Buffy Coats diferentes incubados con 9cRA.

DC Maduras	CD86	CD83	CCR7	HLA-DR	CD80	CD1A	CD36
CONTROL	463,0±187,9	60,6±15,5	2,6±1,7	1824,4±548,1	204,1±96	226,9±150,9	24,6±8,1
9cRA 1 nM	556,7±248,2	65,9±26,4	3,4±1,9	1519,5±339,1	222,4±118,2	152,2±154	25,5±7,4
9cRA 10 nM	387,7±145,7	53,3±17,4	3,8±1,6	1476,8±891,4	119,5±52,6	28,2±7,4	35,6±16,2
9cRA 100 nM	234,9±121,7	46,0±17,5	3,9±1,2	1273,9±671	68,6±36,3	26,4±6,6	41,2±19,2

Resultados

Estos resultados parecen sugerir una vía de activación del DHA más similar al 9cRA que a la Rosiglitazona. Aunque tanto la Rosiglitazona como el 9cRA actúan de una forma muy análoga, las pequeñas diferencias que hay entre ellos hacen que el patrón de cambio que provoca el DHA se asemeje más al que produce el 9cRA, un activador de RXR, que al que produce la Rosiglitazona, un activador de PPAR γ .

También se han estudiado qué efectos produce el 9cRA sobre la proliferación linfocitaria. Los datos de proliferaciones linfocitarias de DCs tratadas con 9cRA son los siguientes:

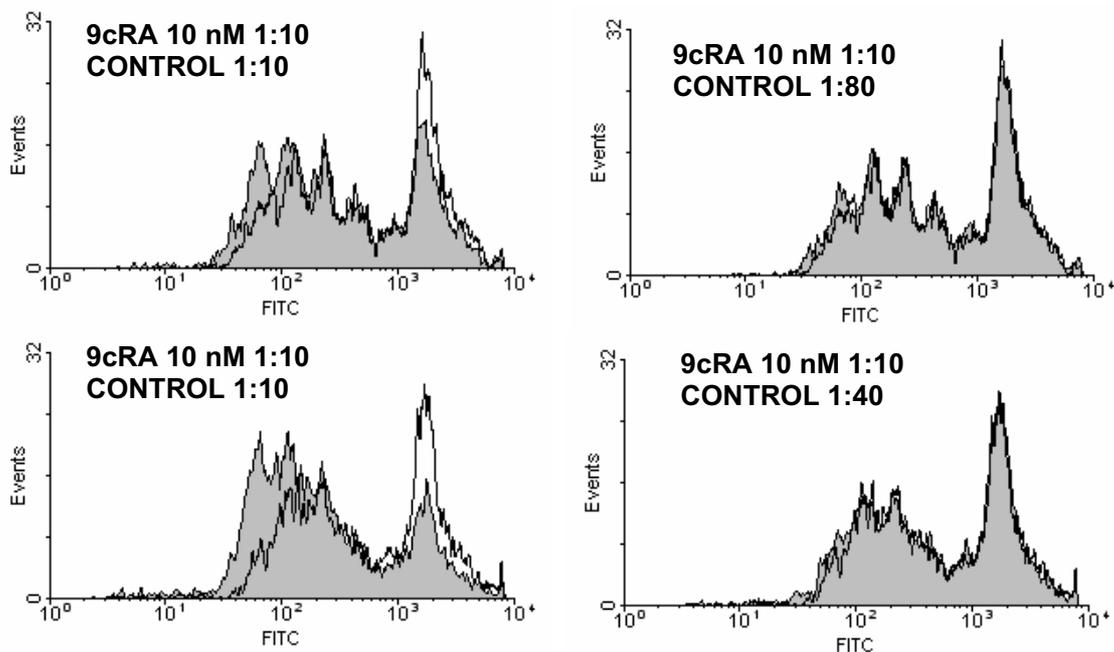


Figura 7.9. Histogramas que detallan las proliferaciones linfocitarias provocadas por células dendríticas tratadas con 9cRA. En negro, por DCs con 10 nM 9cRA, en gris, por DCs control. La relación dendrítica-Linfocito se ha anotado en todos los casos seguidamente del nombre de la proliferación.

Las inhibiciones que provoca 10 nM 9cRA son similares a las que provocaba el DHA. Los datos de las generaciones y de las células iniciales activadas expuestos a continuación muestran un grado de inhibición similar al producido por el DHA para una concentración de 9cRA de 10 nM situado entre un 25-12% de los controles la capacidad estimuladora de la DC. El número de linfocitos iniciales que se activan es de un 17% el cual es muy similar al que presentaba el DHA.

También se examinó la secreción de citocinas que presentaban las DCs al ser tratadas con este compuesto. En la Figura 7.10 se muestran los valores de secreción de citocinas, IL-12 e IL-10 al medio celular a las 24 h de haber adicionado el estímulo madurativo, LPS.

Tabla 7.7 Proliferaciones linfocitarias de DCs en función de 9cRA.

Promedio de Generaciones y %DC de cinco proliferaciones linfocitarias diferentes con DCs tratadas con 9cRA 10 nM.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control +	Promedio	39,5	11,8	16,2	14,7	8,9	4,8	4,0	26,4
	Des Est	10,0	1,9	4,7	3,5	3,7	3,2	3,3	11,1
9cRA 10 nM	Promedio	49,4	10,6	14,5	12,0	7,5	3,5	2,5	17,3
	Des Est	13,1	2,3	2,6	3,8	3,4	1,9	1,3	8,5

Se puede observar en la Figura 7.10 que la expresión de IL-12 se encuentra muy disminuida con respecto a los controles mientras que la expresión de IL-10 se encuentra aumentada. Es decir, las DCs incubadas con 9cRA cambian su patrón de expresión de IL-12 e IL-10. Sin embargo, a concentraciones de 100 nM se observa una caída de expresión de IL-10 con respecto a las concentraciones inferiores.

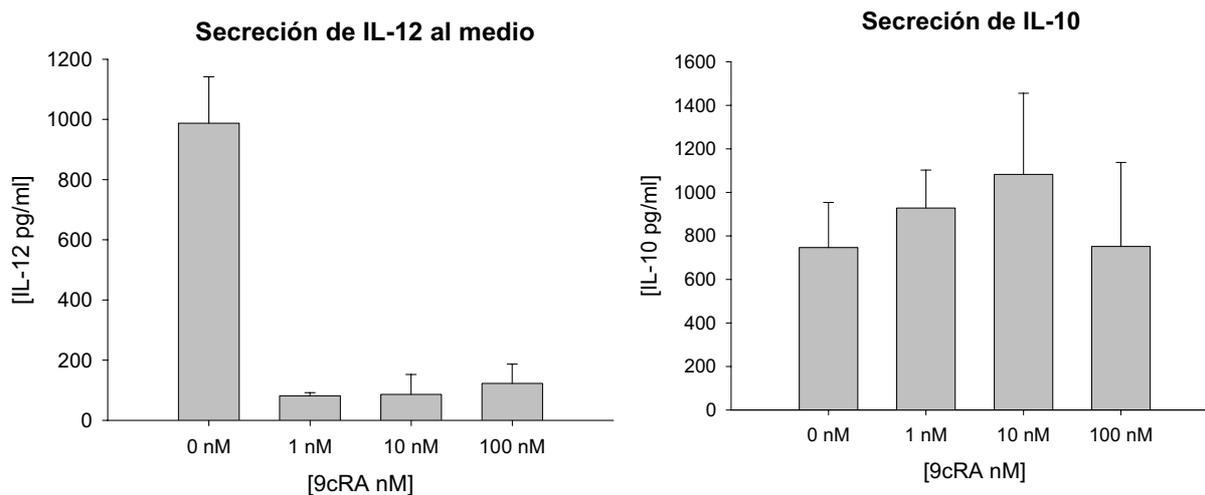
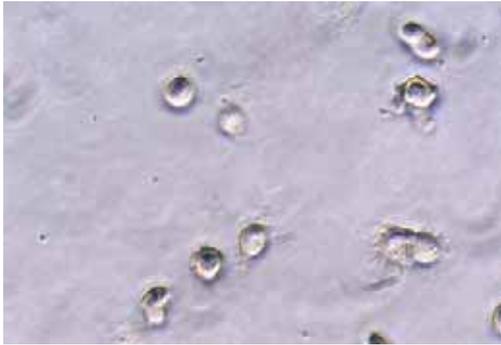


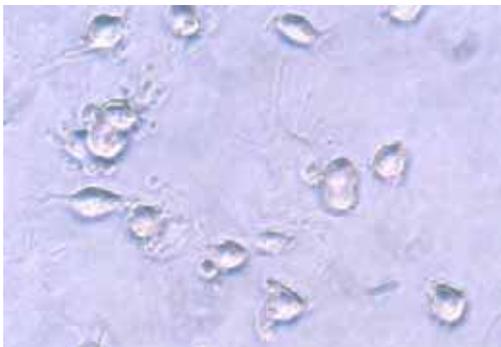
Figura 7.10. Secreción de citocinas en función de la concentración de 9cRA. Elisa mostrando la secreción de IL-12 e IL-10 en función de la concentración de 9cRA presente en el medio desde el primer día de transformación de monocito a dendrítica. El sexto día se añadió al medio LPS y a las 24 h se extrajo el medio y se congeló a -80 °C para ser medido mediante ELISA. Los resultados son un promedio de 4 individuos diferentes.

Estos últimos datos de la secreción de citocinas inducidas por el 9cRA discrepan totalmente de los que produce el DHA. En el caso de los ácidos grasos se producían descensos en ambas citocinas y no en una sola. Además, la caída de IL-12 no era tan intensa como con 9cRA.

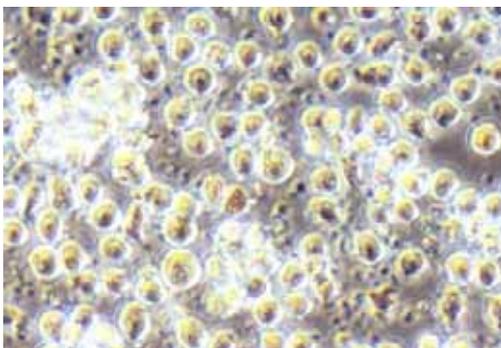
DCs Inmaduras



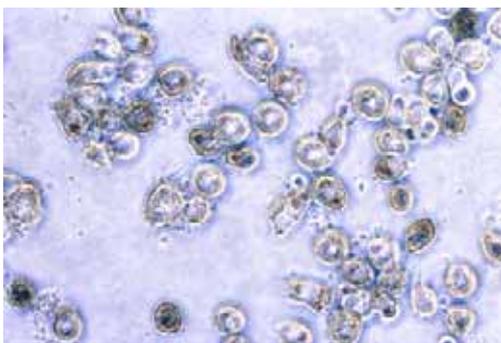
DCs inmaduras tratadas con 9cRA.



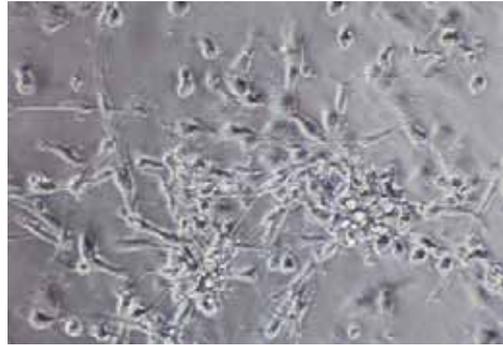
DCs inmaduras tratadas con Rosiglitazona



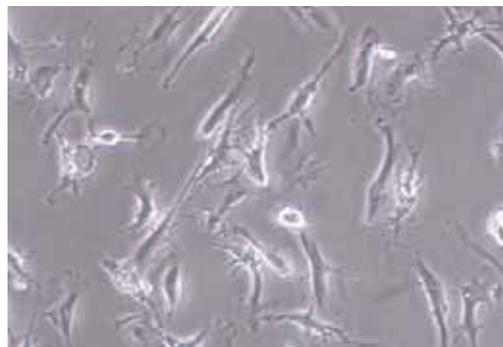
DCs inmaduras tratadas con DHA



DCs Maduras



DCs Maduras tratadas con 9cRA



DCs Maduras tratadas con Rosiglitazona.



DCs maduras tratadas con DHA

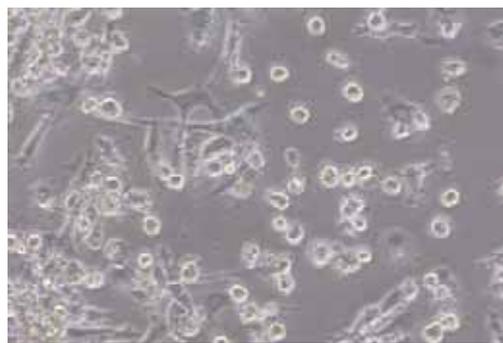


Figura 7.11. Fotografías de células dendríticas maduras e inmaduras tratadas con 50 μ M DHA, 100 nM 9cRA o 1 μ M Rosiglitazona. Las fotografías se realizaron los días sexto (inmaduras) y octavo (maduras).

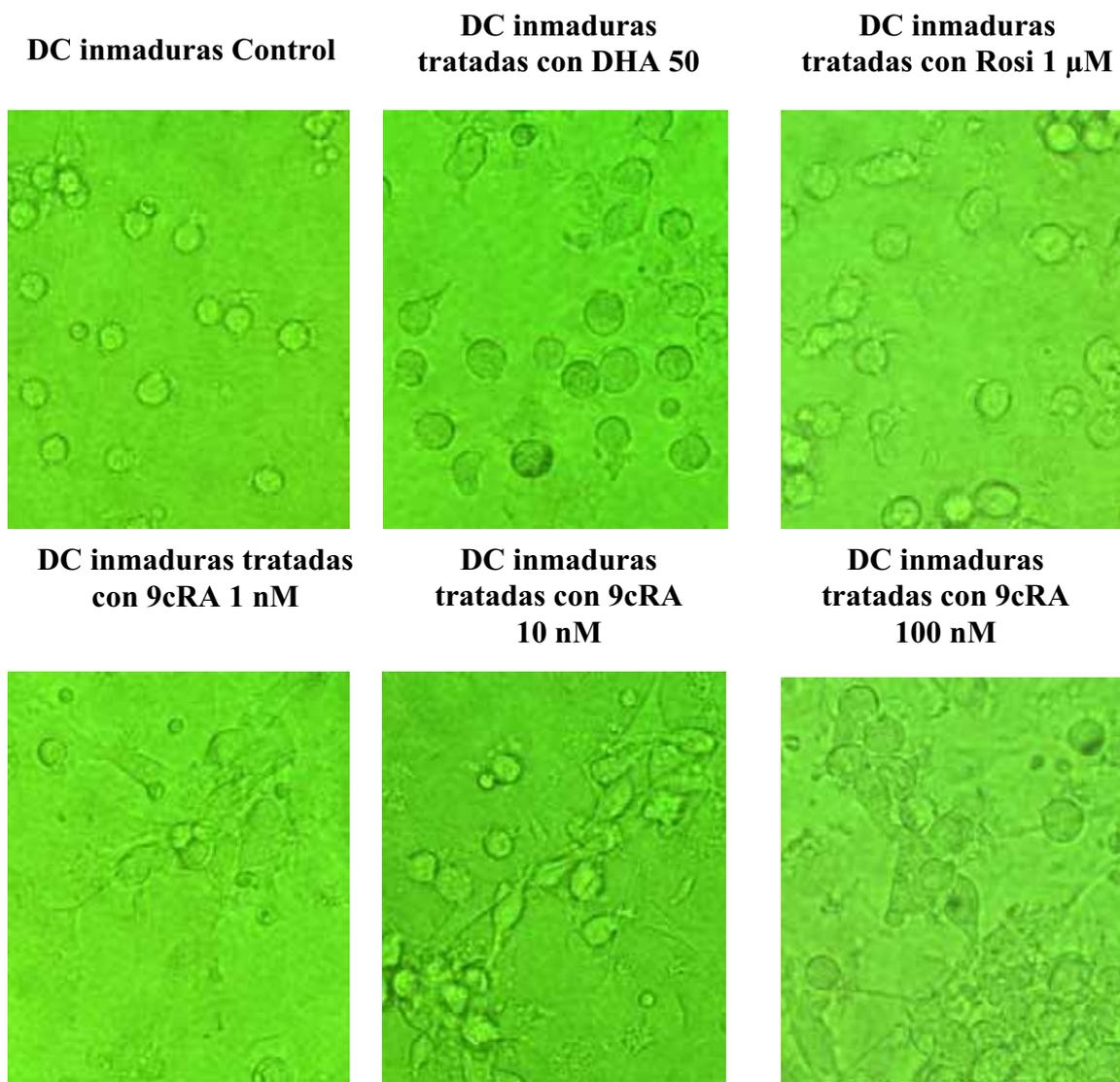


Figura 7.12. Fotografías de células dendríticas inmaduras tratadas con 50 μ M DHA, 1 μ M Rosiglitazona y 1, 10 o 100 nM de 9cRA. Destacar que muchas de las células dendríticas tratadas con 9cRA han desarrollado dendritas y formas alargadas propias de DCs maduras. Las fotografías se realizaron el día sexto de transformación de monocito a dendrítica.

Por último, se observó que las células dendríticas inmaduras tratadas con 9cRA poseían una morfología diferenciada de las de los controles inmaduros, desarrollando dendritas y una forma más alargada, ambas características más propias de DC maduras que de inmaduras. Estos resultados se muestran en una serie de fotografías en las Figuras 7.11 y 7.12.

En los casos de DCs inmaduras sin tratar o tratadas con DHA o Rosiglitazona, se puede observar que la morfología celular es redondeada habiendo muy pocas dendritas o ninguna. En cambio, al madurar las células estas desarrollan una forma más alargada y aparecen con mayor profusión las dendritas (Figura 7.11 columna derecha).

Resultados

Al tratar las células con 9cRA, tanto en estadio inmaduro como maduro, aparecen dendritas y la morfología es parecida a la de una DC madura. Esto se da más frecuentemente a concentraciones altas de 9cRA como 100 nM pero también se pudieron observar a concentraciones tan bajas de 9cRA como 1 nM o 10 nM. Al madurar las células tratadas con 9cRA aumenta notablemente el número de dendritas e incluso aparecen vacuolas en estas células.

7.3 ACTIVACIÓN DEL HETERODÍMERO PPAR γ :RXR: EFECTOS COMPLEMENTARIOS

Los resultados presentados hasta ahora muestran que el DHA provoca cambios en las DCs muy parecidos a los que produce la Rosiglitazona y el 9cRA; siendo más el comportamiento del DHA más parecido al que provoca el 9cRA excepto en los cambios morfológicos celulares y en la secreción de citocinas. Como se ha comentado anteriormente la Rosiglitazona es un activador específico de PPAR γ mientras que el 9cRA lo es de RXR. Para activarse, PPAR γ y RXR necesitan formar un heterodímero PPAR γ :RXR [219, 233]. Tanto si el ligando se une a PPAR γ como a RXR, se puede formar igualmente el heterodímero puesto que RXR en PPAR γ :RXR no se encuentra subordinado a PPAR γ . Por eso no es de extrañar que la Rosiglitazona y el 9cRA actúen sobre la célula dendrítica de una forma muy similar. Existen ciertos matices a este razonamiento ya que RXR también puede formar homodímeros RXR:RXR y heterodímeros RAR:RXR, con efectos celulares similares al heterodímero PPAR γ :RXR en algunos casos [453].

Varios estudios han demostrado en adipocitos y otros tipos celulares que la adición simultánea de compuestos activadores de PPAR γ y retinoides produce efectos aditivos sobre las células [219, 451, 452]. Con el objetivo de analizar si este comportamiento es también aplicable a las células dendríticas, se diseñaron experimentos de coincubación de Rosiglitazona y de 9cRA. Se utilizaron primero concentraciones muy bajas de estos compuestos de tal forma que por sí mismas no produzcan ningún o muy poco efecto y concentraciones más altas posteriormente. En la Figura 7.13 se muestran los resultados obtenidos y se incluyen los fenotipajes control de los dos compuestos estudiados. En la Tabla 7.8 se muestran los promedios de ocho individuos diferentes para concentraciones bajas y cinco para concentraciones más altas y en la Figura 7.14 se exponen los datos de la Tabla 7.8 de forma gráfica.

Se observan sinergias o, al menos, efectos aditivos para algunos de los marcadores tales como CD86, HLA-DR, CD80, CD1a y CD36 a ambas concentraciones. Estos efectos aditivos cambian en el mismo sentido que siguen los dos compuestos por separado. En cambio, no se observan estos efectos ni

en CD83 ni en CCR7. Estos dos últimos son marcadores que la Rosiglitazona por sí misma no era capaz de alterar por lo que en cierta medida es lógico que ahora los efectos aditivos en estos marcadores no aparezcan.

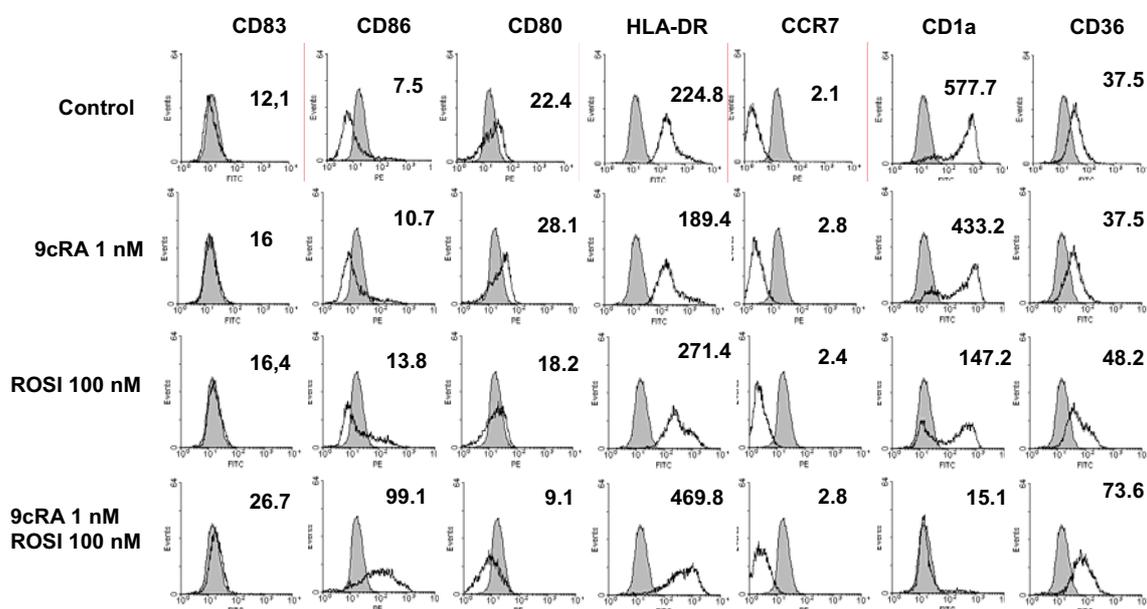


Figura 7.13. Fenotipo de DCs inmaduras control y también a concentraciones de 1 nM 9cRA y/o 100 nM Rosi. Los compuestos fueron adicionados al medio desde el primer día de transformación. El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Tabla 7.8 Fenotipo DC inmadura en función de la combinación de 9cRA y ROSI.

Promedio estadístico de MFIs de DCs inmaduras de 8 individuos diferentes incubados con 1nM 9cRA y/o 100 nM Rosiglitazona y 10 nM 9cRA y/o 1 μ M Rosiglitazona.

Inmaduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
Control	12,4 \pm 2,9	10,3 \pm 8,4	23,1 \pm 4,1	404,0 \pm 159,3	1,7 \pm 0,7	463,7 \pm 189,4	36,0 \pm 15,1
Rosi 100 nM	15,0 \pm 2,7	15,7 \pm 7,3	17,2 \pm 4,1	410,3 \pm 195,6	1,8 \pm 0,8	225,4 \pm 214,3	48,0 \pm 13
9CRA 1 nM	16,7 \pm 4,5	23,9 \pm 35,2	27,6 \pm 4,1	476,7 \pm 280,9	1,9 \pm 0,6	248,4 \pm 177,5	35,3 \pm 14,4
ROSI 100nM 9cRA 1 nM	15,3 \pm 4,9	70,4 \pm 42,2	9,2 \pm 2,1	654,0 \pm 272,6	1,7 \pm 0,7	16,9 \pm 3,5	67,4 \pm 16,2
Control	12,1 \pm 0,5	8,6 \pm 2,2	22,0 \pm 4,1	315,6 \pm 68,9	2,0 \pm 0,8	427,9 \pm 90,2	43,9 \pm 20,8
Rosi 1 μ M	13,8 \pm 2,1	19,8 \pm 10,8	18,1 \pm 5	354,1 \pm 80,3	2,1 \pm 0,6	136,8 \pm 91,2	54,7 \pm 21,1
9CRA 10 nM	19,9 \pm 4,5	35,8 \pm 4,1	9,2 \pm 2,2	437,7 \pm 65,5	3,2 \pm 1,1	28,6 \pm 10,1	40,8 \pm 13,9
ROSI 1 μ M 9cRA 10 nM	18,4 \pm 6,2	89,4 \pm 46,5	5,4 \pm 1	513,6 \pm 113,2	3,0 \pm 0,7	32,9 \pm 30,2	54,8 \pm 31,3

El mismo estudio se ha realizado para DCs maduras y se muestra en las Figuras 7.15, 7.16, y en la Tabla 7.9.

Resultados

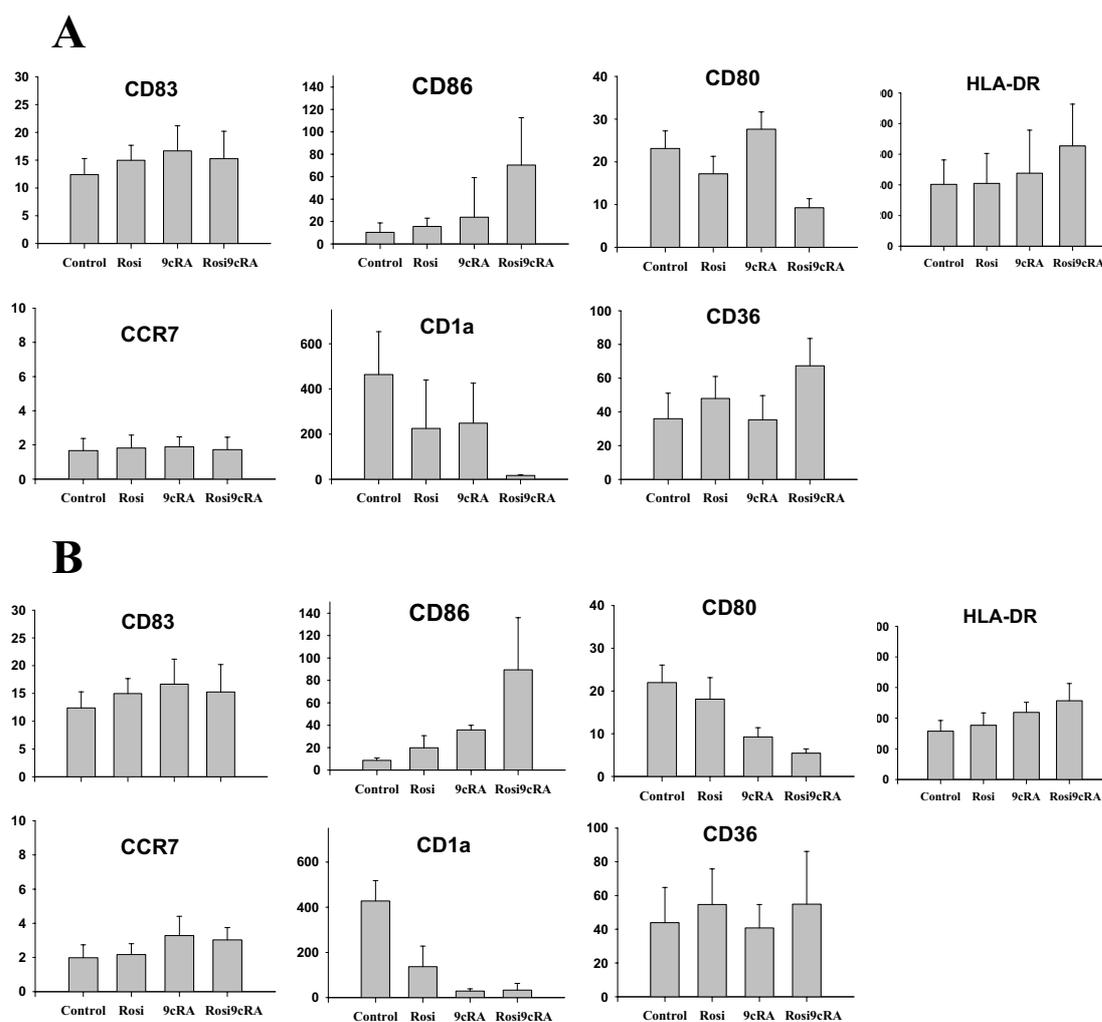


Figura 7.14. Gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs inmaduras. Para 8 individuos diferentes las incubaciones fueron de 1 nM 9cRA y/o 100 nM Rosiglitazona en A y para cinco individuos diferentes incubaciones de 10 nM 9cRA y/o 1 μ M Rosiglitazona en B.

Tabla 7.9 Fenotipo DC madura en función de la combinación de 9cRA y ROSI.

Promedio estadístico de MFIs de DCs maduras de ocho individuos diferentes incubados con 1nM 9cRA y/o 100 nM Rosiglitazona y 10 nM 9cRA y/o 1 μ Rosiglitazona.

Maduras	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1A	CD36
Control	70,5 \pm 15,4	564,2 \pm 172,3	241,5 \pm 90,3	2255,7 \pm 612,2	2,5 \pm 1,2	211,0 \pm 115,2	18,1 \pm 4,1
Rosi 100 nM	65,9 \pm 18,6	529,6 \pm 201,9	192,9 \pm 87,8	1775,2 \pm 610	2,6 \pm 1,2	70,6 \pm 61	27,6 \pm 15,3
9CRA 1 nM	76,0 \pm 25,1	577,6 \pm 225,1	226,3 \pm 105,2	1668,1 \pm 699	3,0 \pm 1,2	178,1 \pm 154,7	20,3 \pm 6,7
ROSI 100nM 9cRA 1 nM	52,3 \pm 14	438,7 \pm 155,9	107,9 \pm 59,5	1306,5 \pm 322,9	3,0 \pm 1,4	21,8 \pm 5,1	35,6 \pm 13,4
Control	75,7 \pm 22	601 \pm 128	285,8 \pm 81,8	2150,3 \pm 652,8	4,4 \pm 1,3	247,6 \pm 51,9	31,3 \pm 14,6
Rosi 1 μ M	74,6 \pm 21,9	562,6 \pm 178,8	203,4 \pm 57,8	1934,6 \pm 908	4,4 \pm 1,8	83,3 \pm 46,6	34,1 \pm 19,9
9CRA 10 nM	69,1 \pm 12,6	521,6 \pm 88,3	181,6 \pm 51,5	1671,6 \pm 920	5,2 \pm 2,1	69 \pm 60,1	39,5 \pm 17,6
ROSI 1 μ M 9cRA 10 nM	44 \pm 5,8	249,4 \pm 112,8	60,1 \pm 39,6	974,6 \pm 780,2	3,1 \pm 1,0	24,8 \pm 4,3	54 \pm 20,6

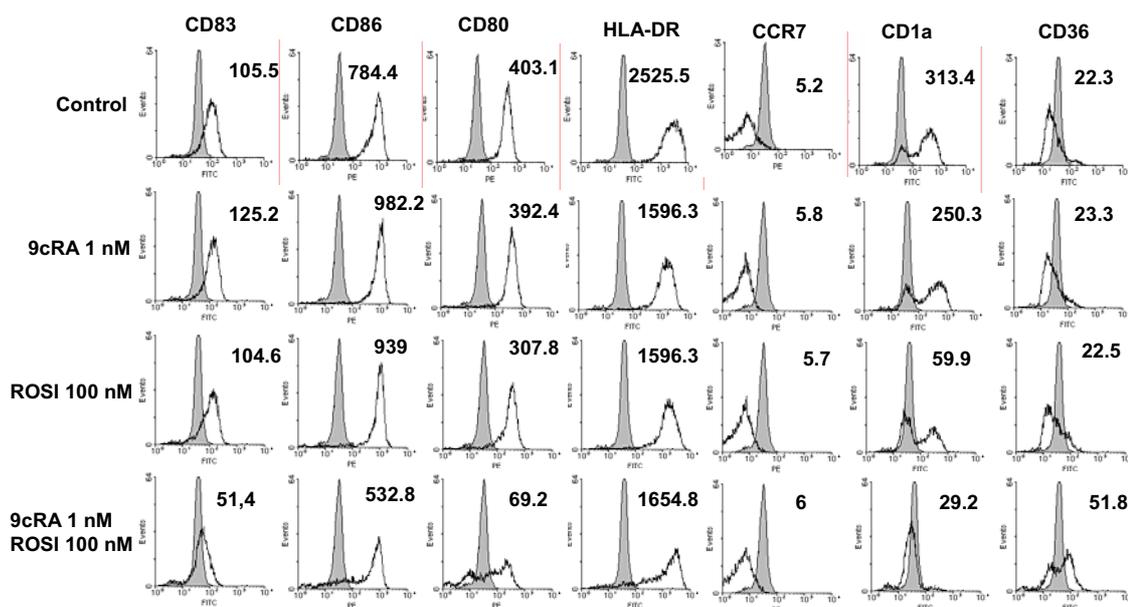


Figura 7.15. Fenotipo de DCs maduras incubadas con 1 nM 9cRA y/o 100 nM Rosiglitazona. Los compuestos fueron adicionados al medio desde el primer día de transformación. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Al combinar los dos compuestos se obtienen efectos aditivos en células dendríticas en muchos de los marcadores a ambas rangos de concentraciones. Se producen descensos de CD86, CD83, CD80, HLA-DR, CD1a e incrementos en CD36. En todos los casos los descensos y los incrementos obtenidos al combinar los dos compuestos son mayores que cada uno por separado. Los resultados son los mismos que se obtendrían al añadir Rosiglitazona o 9cRA a mayores concentraciones en solitario.

Una vez demostrado que la combinación de 9cRA y Rosiglitazona consigue magnificar la modulación del fenotipo de la dendrítica incluso a bajas concentraciones de ambos compuestos se va a intentar deducir el mecanismo de actuación del DHA. El 9cRA es un pobre activador de PPAR γ (Figura 7.5) y se supone que la Rosiglitazona es un activador específico de PPAR γ de forma que no es capaz de activar RXR. Se sabe que el DHA es capaz de activar PPAR γ ([254]y la Figura 7.5) y también RXR este último incluso de una forma más potente de lo que en un principio se había supuesto [455, 456]. El planteamiento es el siguiente: si el DHA es un activador del PPAR γ producirá efectos aditivos con 9cRA y competirá con la Rosiglitazona por el PPAR γ , con lo cual, no se producirán efectos aditivos al coincubar con Rosiglitazona. Si fuese un activador de RXR debería ocurrir al revés y provocar mayores efectos al coincubarse con Rosiglitazona que al coincubarse con 9cRA. Por lo tanto en función de las sinergias o efectos aditivos que se produzcan se puede realizar una aproximación al mecanismo a través del cual actúa el DHA. La

Resultados

concentración de DHA que se ha utilizado es de 5 μ M, 100 nM para Rosiglitazona y 1 nM para 9cRA; o concentraciones superiores de 25 μ M de DHA, 1 μ M de Rosiglitazona y 10 nM de 9cRA.

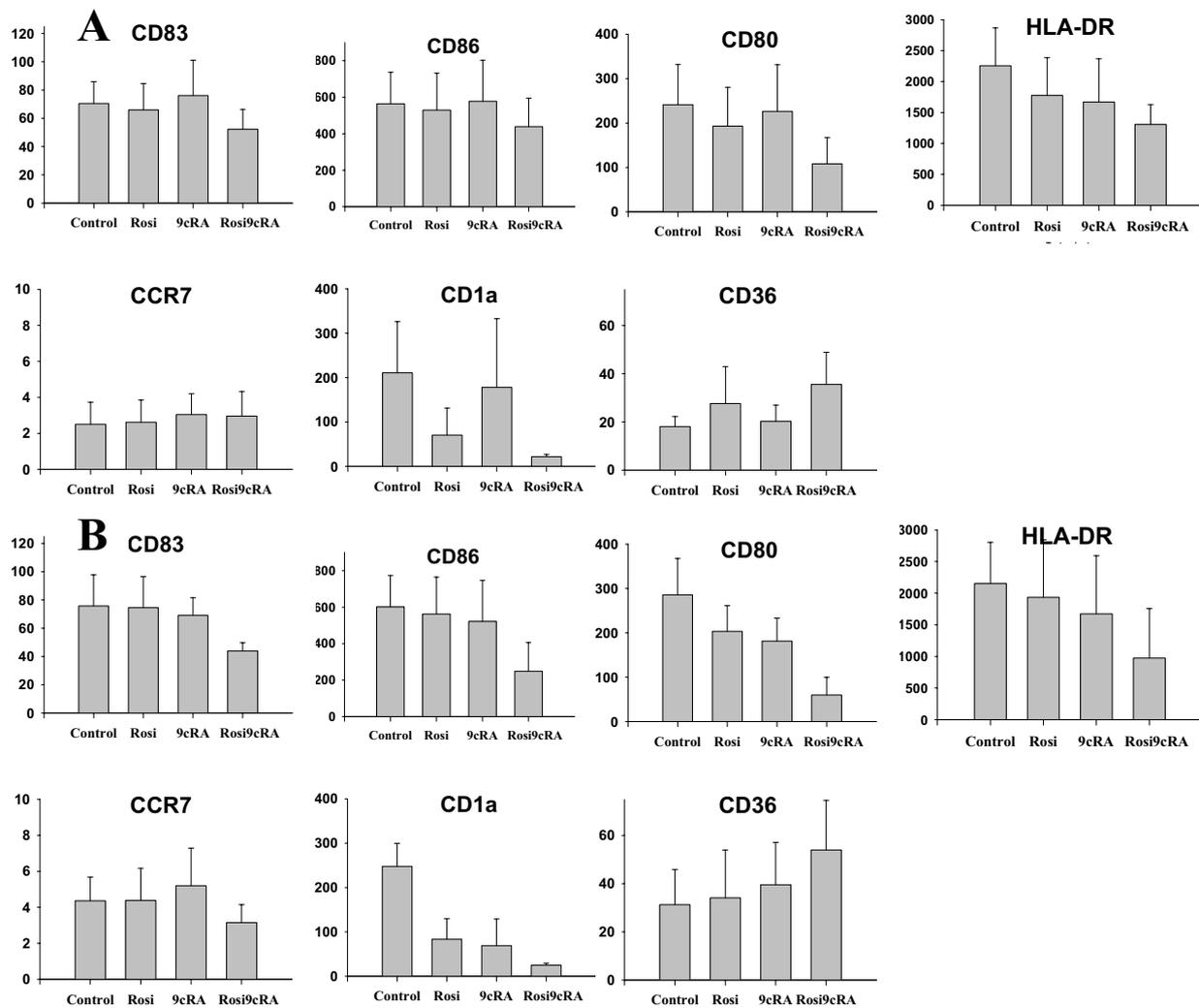
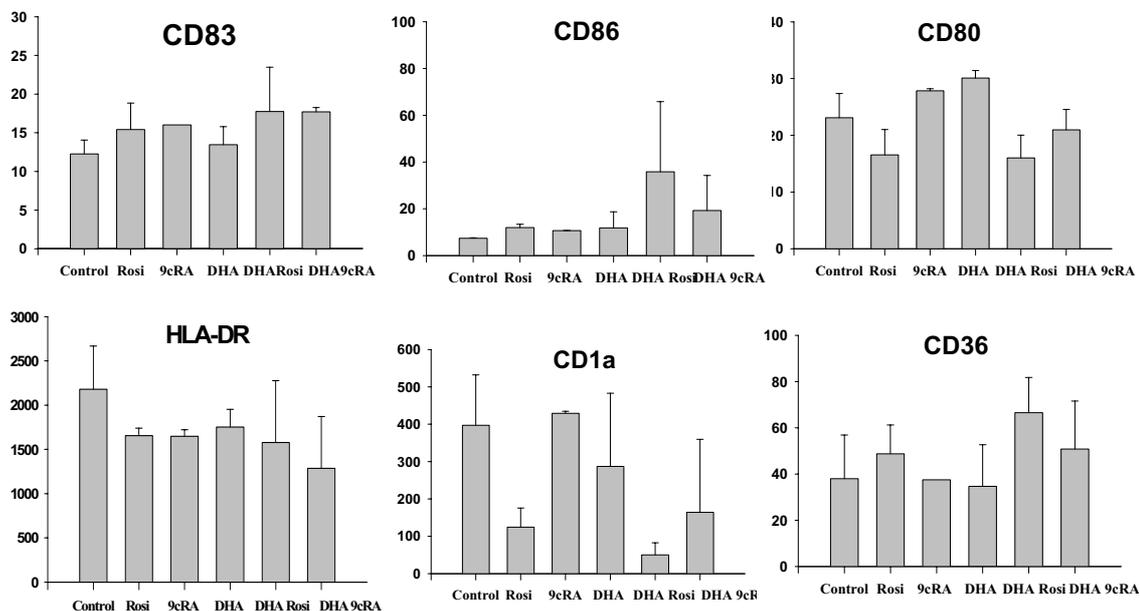


Figura 7.16. Gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs maduras. Para 8 individuos diferentes las incubaciones fueron de 1 nM 9cRA y/o 100 nM Rosiglitazona en A y para cinco individuos diferentes incubaciones de 10 nM 9cRA y/o 1 μ M Rosiglitazona en B.

A



B

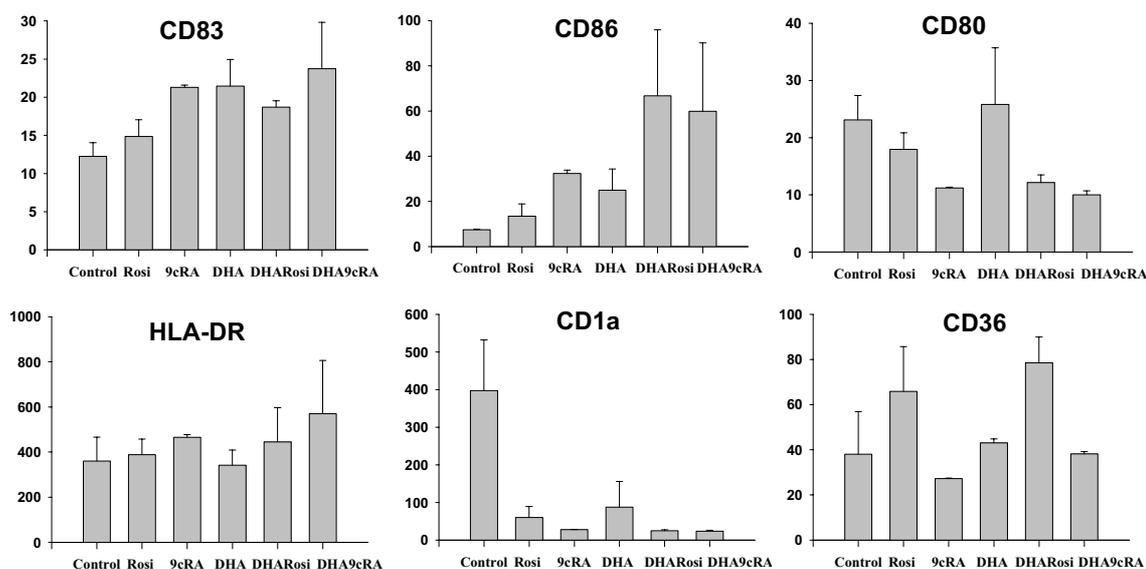


Figura 7.17. Cambios fenotípicos en función de las combinaciones de 9cRA, ROSI y DHA en DCs inmaduras. En A gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs inmaduras de 4 individuos diferentes incubados con 5 μ M DHA y 100 nM Rosiglitazona o 1 nM 9cRA. En B promedios estadísticos de MFIs de DCs inmaduras de 3 individuos diferentes incubados con 25 μ M DHA y 1 μ M Rosiglitazona o 10 nM 9cRa.

Resultados

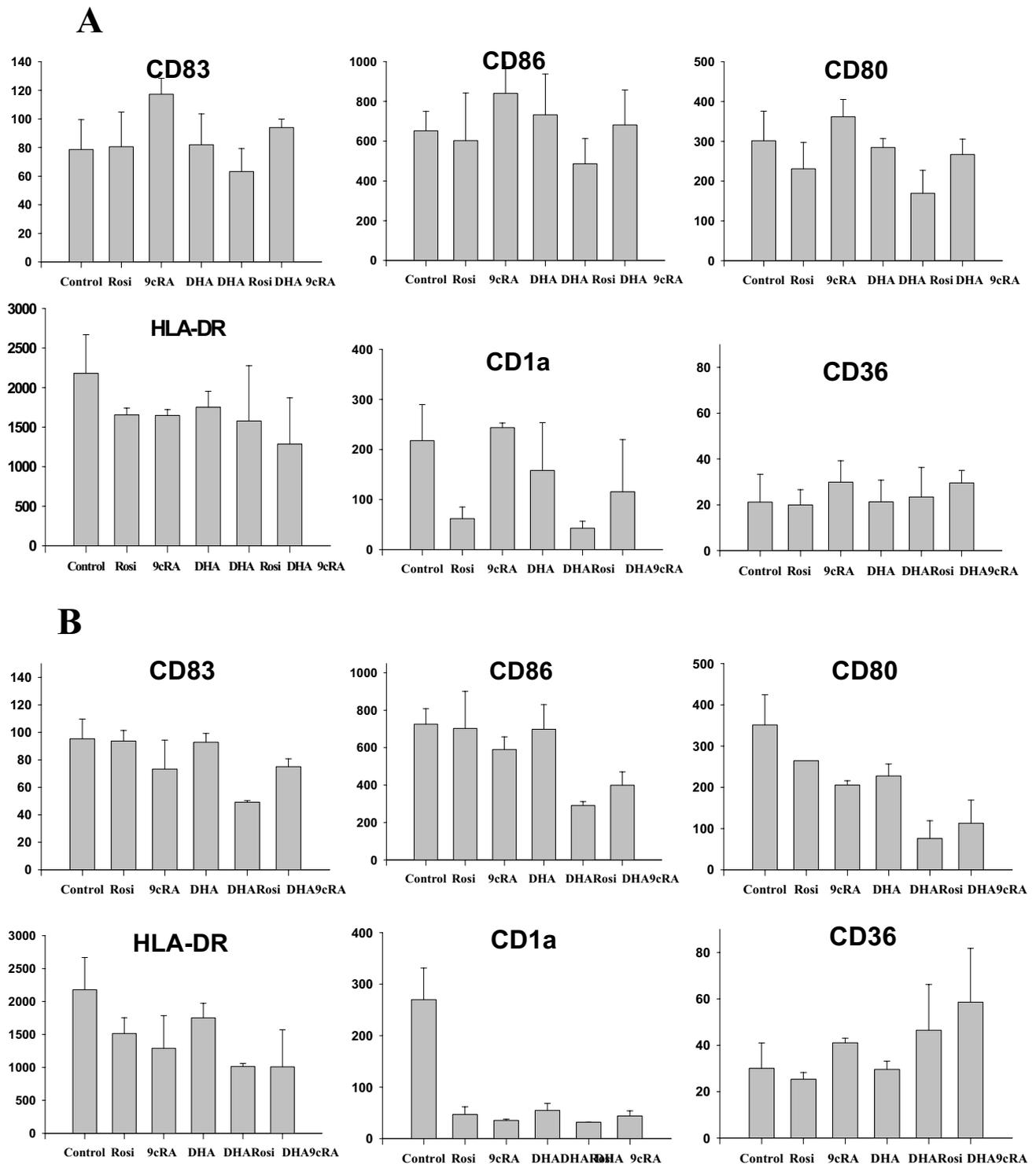


Figura 7.18. Cambios fenotípicos en función de las combinaciones de 9cRA, ROSI y DHA en DCs maduras. En A gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs maduras de 4 individuos diferentes incubados con 5 μ M DHA y 100 nM Rosiglitazona o 1 nM 9cRA. En B promedios estadísticos de MFIs de DCs maduras de 3 individuos diferentes incubados con 25 μ M DHA y 1 μ M Rosiglitazona o 10 nM 9cRA.

En las Figuras 7.17 y 7.18 se muestran los promedios de medianas de intensidad de fluorescencia de todos los marcadores estudiados para diferentes combinaciones y concentraciones de los compuestos ya mencionados. En cada figura en la parte A se muestra la combinación DHA 5 μ M y Rosiglitazona 100 nM o 9cRA 1nM. Y en la parte B se muestra la combinación DHA 25 μ M y Rosiglitazona 1 μ M o 9cRA 10 nM. En la Figura 7.17 se muestran los datos de células dendríticas inmaduras y en la Figura 7.18 de las células maduras.

Los resultados revelan que el DHA es capaz de producir efectos aditivos tanto si se coincide con Rosiglitazona como si se coincide con 9cRA, aunque los cocultivos con Rosiglitazona parecen dar efectos más intensos. La expresión de CD86 presenta adiciones para ambos tipos de cocultivos tanto en DCs maduras como en inmaduras. Sin embargo son más intensos en los cocultivos de DHA con Rosiglitazona que en los de 9cRA. En el caso del CD80 ocurre algo parecido a lo que ocurre con CD86. En ambos tipos de combinaciones se producen caídas de CD80 tanto en inmaduras como en maduras, pero estas caídas son más intensas en la combinación DHA-Rosiglitazona.

En el caso del CD83 solo se observan efectos ligeramente acumulativos en DCs inmaduras. Si se examinan las DCs maduras se detectan caídas de CD83 en las combinaciones DHA-Rosiglitazona mientras que en las combinaciones DHA-9cRA estas caídas no se producen.

La expresión de HLA-DR presenta efectos acumulativos en ambos tipos de combinaciones que parecen ser de una intensidad similar. HLA-DR sube en inmaduras y baja en maduras. Mientras que la de CD1a presenta sinergias en ambas coincidencias. Este marcador es extraordinariamente sensible a los tres compuestos y se inhibe su expresión con gran intensidad. El CD36 presenta incrementos en su expresión para ambas combinaciones subiendo con mayor intensidad con la combinación DHA-Rosiglitazona.

Un análisis global de todos estos resultados confirma que el DHA presenta un comportamiento ambivalente, siendo capaz de actuar tanto por la vía de RXR como por la vía de PPAR γ . Sin embargo, en combinación con Rosiglitazona los cambios fenotípicos son más intensos por lo cual es muy probable que sea más potente como activador de RXR que como activador de PPAR γ . Esto estaría de acuerdo con estudios publicados anteriormente que demuestran que el DHA como activador de PPAR γ no parece ser especialmente potente [10], y en cambio, cada día surgen nuevas evidencias de que puede ser un importante activador de RXR [455, 456].

7.4 EFECTO DEL INHIBIDOR DE PPAR γ , GW9662

Hasta ahora se ha demostrado que el 9cRA, la Rosiglitazona y el DHA producen efectos similares en las células dendríticas y que, combinados, son capaces de producir sinergias o efectos aditivos en la expresión de muchos de sus marcadores. Sin embargo, para acabar de demostrar que estos compuestos actúan en la dendrítica a través de la activación del heterodímero PPAR γ :RXR es necesario inhibir la proteína y comprobar que los efectos de los activadores de PPAR γ :RXR también se encuentran inhibidos. Por esta razón se incubaron células dendríticas con un inhibidor específico de PPAR γ , el GW9662 [457].

Este inhibidor por sí mismo es capaz de modificar el fenotipo de la dendrítica como se verá a continuación. El inhibidor se une covalentemente en el aa Cys²⁸⁵ de la molécula de PPAR [457]. A concentraciones de 10 μ M permite inhibir específicamente PPAR γ sin afectar a ninguno de los demás PPARs. El tratamiento con el inhibidor provoca la pérdida irreversible del lugar de unión al ligando y además, no se produce la formación del heterodímero PPAR γ : RXR [457].

Previamente al inicio de su diferenciación en célula dendrítica, los cultivos de monocitos fueron incubados durante una hora con el inhibidor GW9662 a una concentración de 10 μ M. La viabilidad de las DCs no disminuyó como consecuencia de la introducción en el cultivo del inhibidor. Sí descendió la viabilidad de los linfocitos, los cuales presentaban poblaciones muy disminuidas en los *dotplots* obtenidos en citometría de flujo con respecto a los controles.

En la Figura 7.19, pero más claramente en la Figura 7.20 se observa que el inhibidor por sí mismo en ausencia de activadores de PPAR γ :RXR produce efectos en la dendrítica inmadura: disminuye la expresión de todos los marcadores excepto CD36, el cual experimenta un gran incremento. Las caídas son muy leves en la mayoría de ellos a causa de que muchos se expresan débilmente en dendrítica inmadura.

Los efectos que normalmente producían los compuestos activadores de PPAR γ :RXR se hallan bloqueados en presencia del inhibidor. El CD86, que incrementa su expresión con Rosiglitazona, DHA y 9cRA, queda inalterado en presencia de GW9662. Al CD83 le ocurre lo mismo con DHA y 9cRA. La expresión del CCR7 también se encuentra bloqueada. Con el CD1a se produce una disminución de su expresión menor que al añadir los activadores y, por el contrario, el CD36 aumenta, y lo hace de forma aditiva con la Rosiglitazona o el DHA.

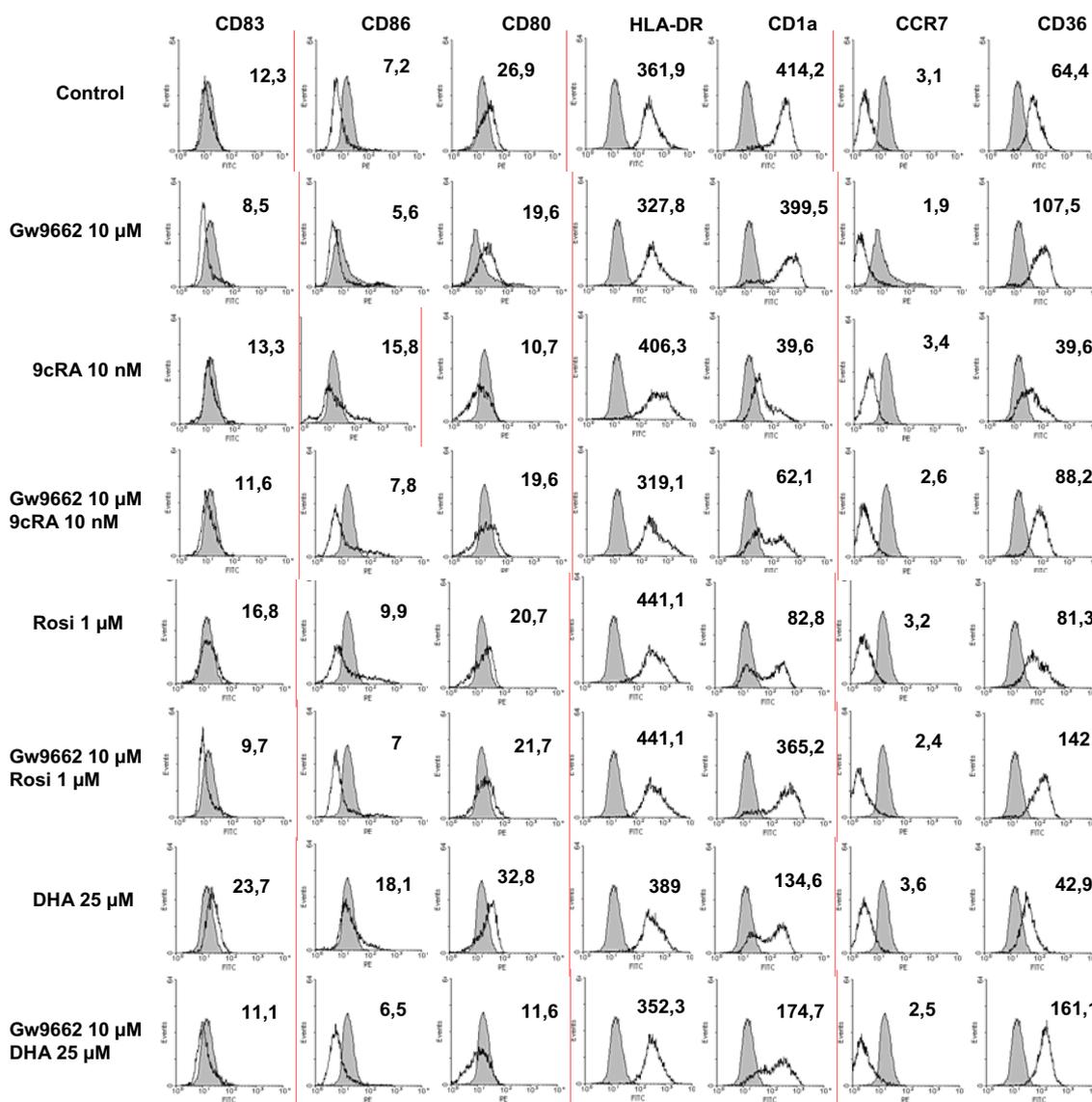


Figura 7.19. Efecto del inhibidor GW9662 sobre el fenotipo de DCs inmaduras en presencia de 10 nM 9cRA, 1 μ M Rosi y 25 μ M DHA. Combinaciones de compuestos adicionadas al medio el primer día de transformación. El día 3 se añadió una nueva dosis de 10 μ M GW9662. El sexto día se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

En las Figuras 7.21 y 7.22 se muestra un estudio análogo, pero tras el proceso de maduración al añadir LPS el sexto día y durante 48 h.

Resultados

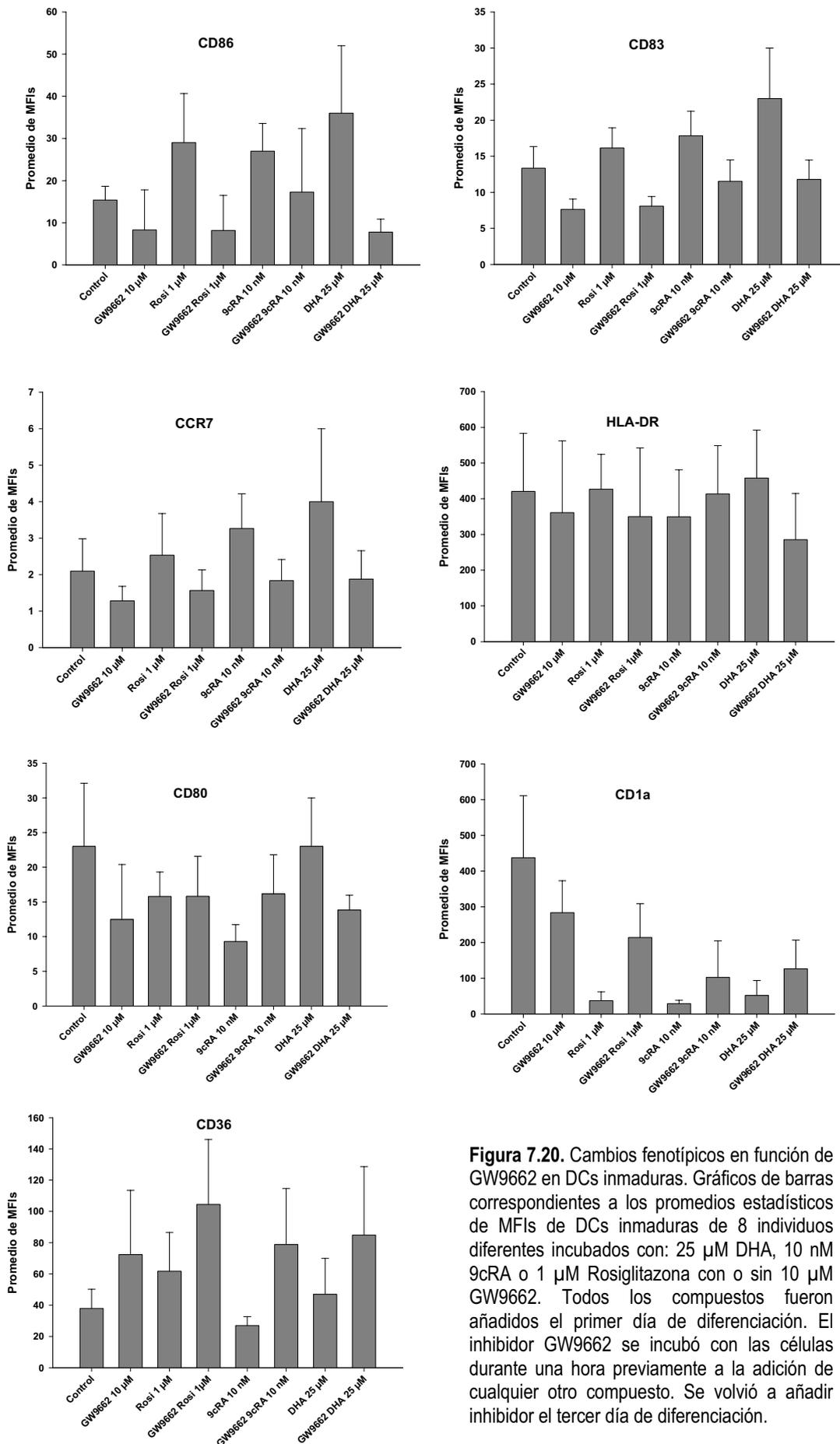


Figura 7.20. Cambios fenotípicos en función de GW9662 en DCs inmaduras. Gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs inmaduras de 8 individuos diferentes incubados con: 25 μM DHA, 10 nM 9cRA o 1 μM Rosiglitazona con o sin 10 μM GW9662. Todos los compuestos fueron añadidos el primer día de diferenciación. El inhibidor GW9662 se incubó con las células durante una hora previamente a la adición de cualquier otro compuesto. Se volvió a añadir inhibidor el tercer día de diferenciación.

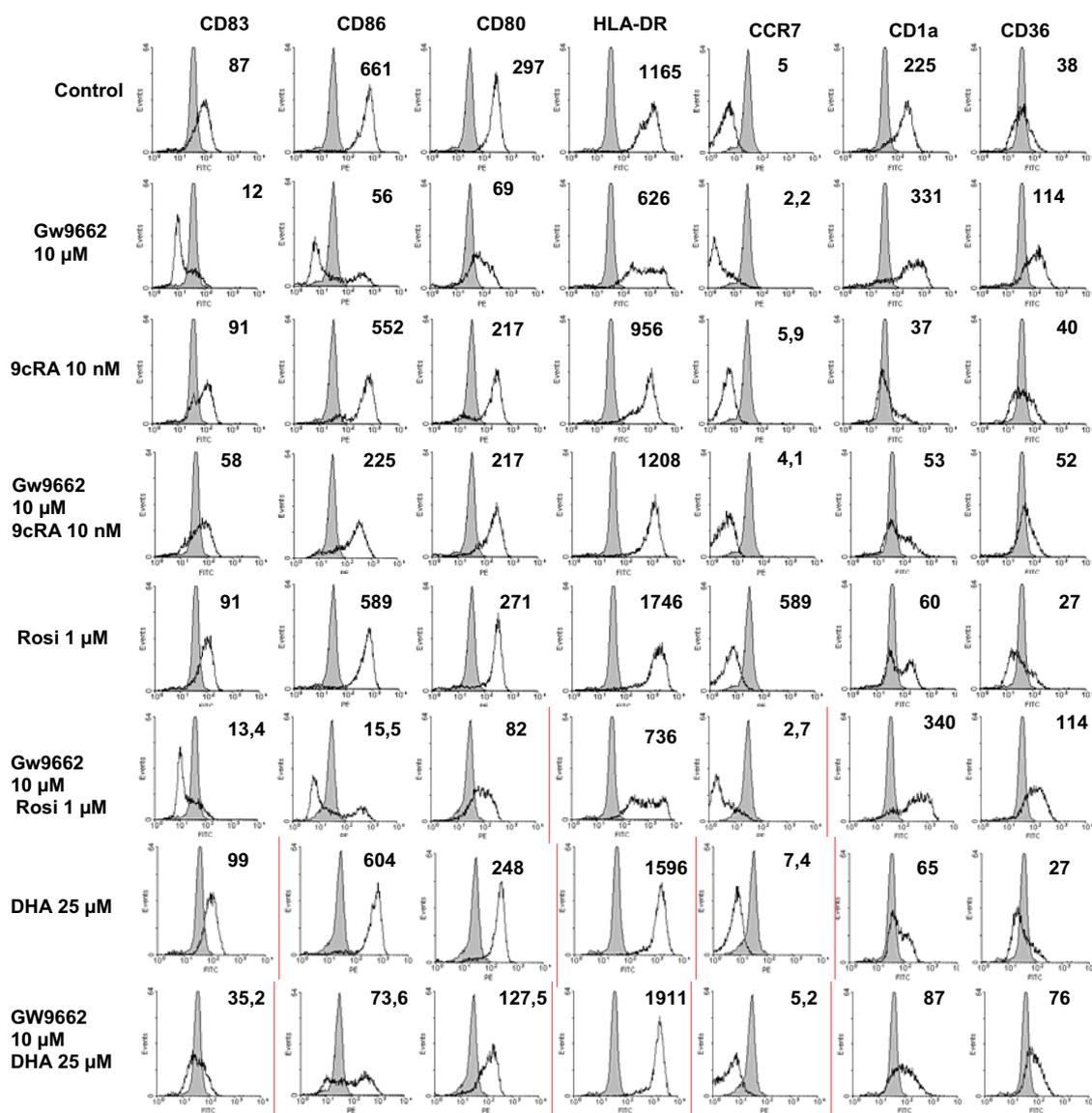


Figura 7.21. Efecto del inhibidor GW9662 sobre el fenotipo de DCs maduras en coincubación con 10 nM 9cRA, 1 μ M Rosi y 25 μ M DHA con y sin 10 μ M GW9662. Combinaciones adicionadas al medio el primer día de transformación. El día 3 se añadió una nueva dosis de 10 μ M GW9662. El sexto día se añadió LPS al medio y el octavo se hicieron análisis de expresión con un citómetro de flujo para cada uno de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión celular en superficie se indican en cada histograma como mediana de intensidad de fluorescencia.

Se observa que el inhibidor por sí mismo es capaz de detener casi por completo el proceso de maduración de la DC. Los antígenos CD86, CD83, CCR7 y HLA-DR continúan expresándose a niveles de dendrítica inmadura. Incluso el CD1a se expresa a niveles superiores a los controles, o lo que viene a ser lo mismo, no ha experimentado la disminución a causa del proceso de maduración. El CD80 muestra un incremento en su expresión con respecto a inmadurez, pero sin llegar al nivel de las DCs maduras control. Por último, el CD36 presenta incrementos de expresión similares a los que ya se producían al tratar la dendrítica inmadura con el inhibidor. En la Figura 7.22 se representan los resultados en forma de gráficos de barras para las coincubaciones en presencia y ausencia de GW9662 así como de los diferentes activadores del heterodímero en DCs maduras.

Resultados

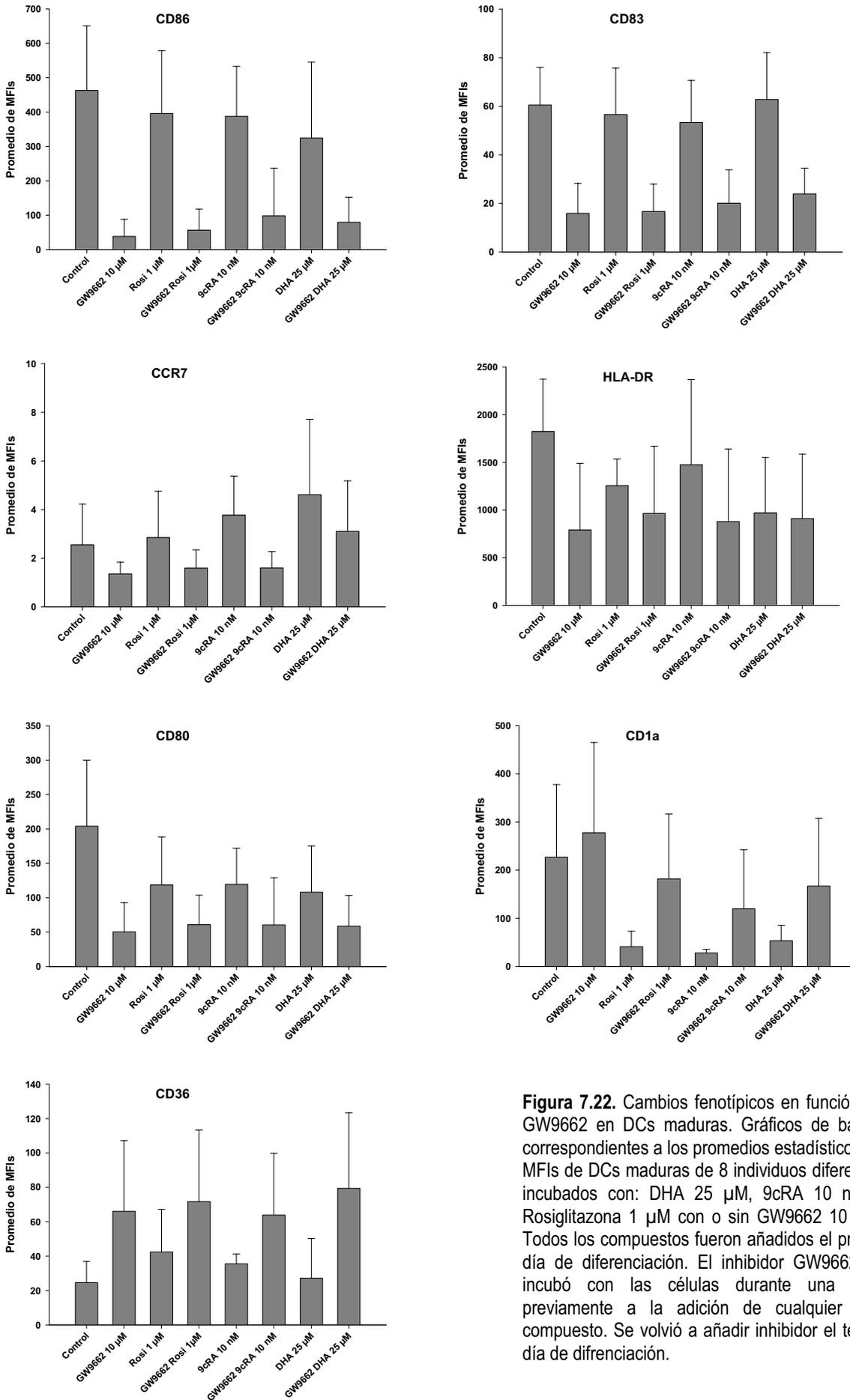


Figura 7.22. Cambios fenotípicos en función de GW9662 en DCs maduras. Gráficos de barras correspondientes a los promedios estadísticos de MFIs de DCs maduras de 8 individuos diferentes incubados con: DHA 25 μM, 9cRA 10 nM o Rosiglitazona 1 μM con o sin GW9662 10 μM. Todos los compuestos fueron añadidos el primer día de diferenciación. El inhibidor GW9662 se incubó con las células durante una hora previamente a la adición de cualquier otro compuesto. Se volvió a añadir inhibidor el tercer día de diferenciación.

En la coincubación de los diferentes ligandos (Rosi, 9cRA y DHA) con el inhibidor no se producen las variaciones de CD86, CD83, HLA-DR, CD80 y CD1a obtenidas normalmente al cultivar DCs con 9cRA, Rosiglitazona o DHA. Los efectos de los activadores de PPAR γ :RXR se hallan bloqueados parcialmente. Esto queda bien demostrado en el caso del CD1a. Este marcador, tanto si se trataba con Rosiglitazona, con 9cRA o con DHA presentaba una inhibición total de su expresión. Sin embargo, en presencia del inhibidor GW9662, los decrementos en su expresión, aunque también se producen, son muy inferiores cuantitativamente.

De los tres ligandos del heterodímero PPAR γ :RXR, el que amortigua mejor la inhibición producida por el GW9662 es el 9cRA, seguido del DHA y finalmente de la Rosiglitazona, cuya actividad suele quedar totalmente bloqueada en presencia del inhibidor en la mayoría de los casos. El 9cRA actúa a través de RXR y el DHA, según los resultados obtenidos anteriormente, sería capaz de hacerlo tanto por RXR como PPAR γ . Aunque la inhibición se produce en los tres casos, los agonistas del monómero RXR presentan una inhibición inferior a los agonistas de PPAR γ . Se desconoce la razón para este comportamiento, tal vez ante la inactividad del heterodímero PPAR γ :RXR se activa una vía alternativa como, por ejemplo, la del RXR:RXR.

A pesar de que las DCs tratadas con GW9662 presentan un fenotipo idéntico al de una dendrítica inmadura, no ocurre esto funcionalmente. En la Figura 7.23 se muestran seis ejemplos de proliferaciones linfocitarias en las cuales no existen diferencias entre las DCs tratadas y sin tratar con GW9662. Sorprendentemente, estas células son capaces de activar la proliferación linfocitaria con la misma intensidad que los controles maduros. Se comportan funcionalmente como DCs maduras a pesar de no expresar CD86 ni CD83. Las proliferaciones linfocitarias no se ven afectadas por el inhibidor. El porcentaje de linfocitos iniciales que se activaron en la Tabla 7.10 es casi idéntico con y sin inhibidor.

Resultados

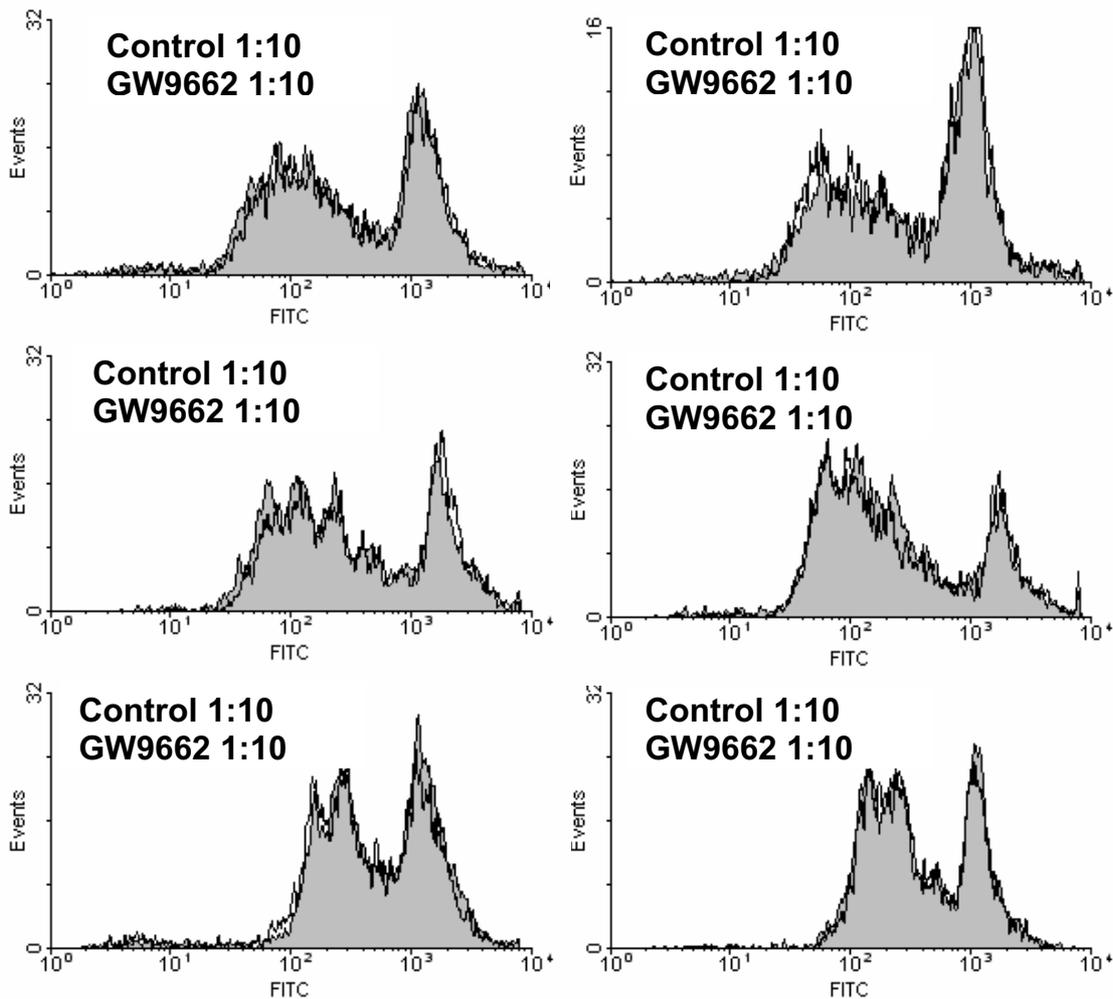
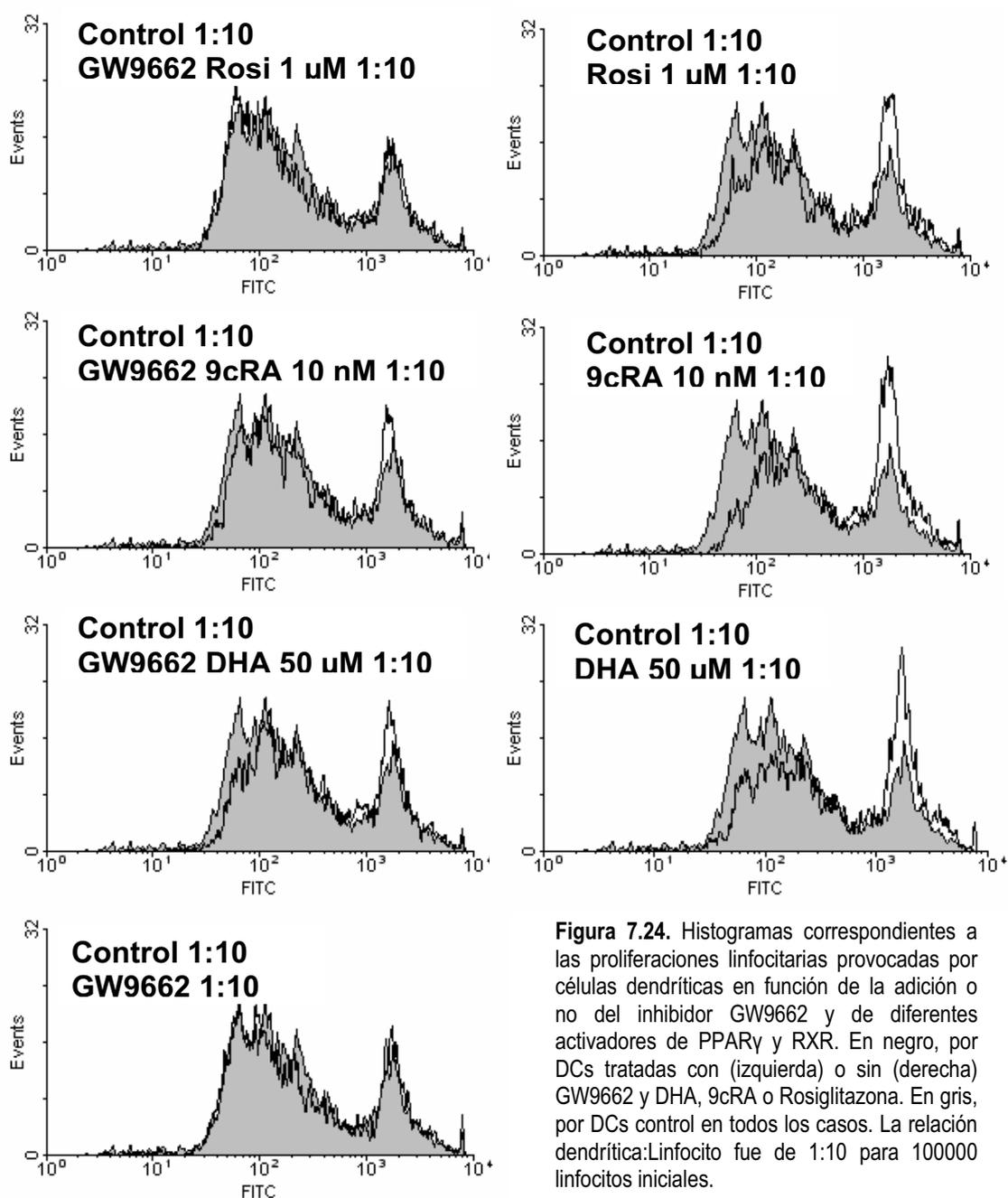


Figura 7.23. Histogramas que detallan las proliferaciones linfocitarias provocadas por células dendríticas en presencia de GW9662. Se muestran 6 casos pertenecientes a individuos diferentes. En negro, por DCs tratadas con GW9662, en gris, por DCs control. La relación dendrítica:Linfocito fue de 1:10 para 100000 linfocitos iniciales.

Tabla 7.10 Proliferaciones linfocitarias de DCs en función de GW9662.

Promedio de Generaciones y %DC de 9 proliferaciones linfocitarias diferentes con DCs tratadas con GW9662 10 μ M.

		Gen. 1	Gen. 2	Gen. 3	Gen. 4	Gen. 5	Gen. 6	Gen. 7	%DC
Control +	Promedio	39,5	11,8	16,2	14,7	8,9	4,8	4,0	26,4
(n=15)	Des Est	10,0	1,9	4,7	3,5	3,7	3,2	3,3	11,1
GW9662	Promedio	40,6	11,6	16,9	14,1	8,7	4,5	3,6	25,6
(n=9)	Des Est	7,5	2,5	4,6	2,8	3,9	3,0	3,1	12,5



Al evaluar proliferaciones linfocitarias desencadenadas por DCs tratadas simultáneamente con el inhibidor GW9662 y Rosiglitazona, DHA o 9cRA, se observó que el inhibidor era capaz de revertir las inhibiciones proliferativas que producían los activadores de PPAR γ :RXR. En la Figura 7.24 se puede apreciar como GW9662 detiene por completo la inhibición de la proliferación linfocitaria en el tratamiento con Rosiglitazona mientras que en 9cRA y DHA provoca una inhibición de menor intensidad.

Resultados

Se realizaron experimentos de secreción de citocinas para caracterizar con más exactitud las transformaciones que provocaba el inhibidor de PPAR γ . Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en presencia del inhibidor, la secreción de IL-10 se encuentra inhibida mientras que la de IL-12 se mantiene a niveles normales (Figura 7.25).

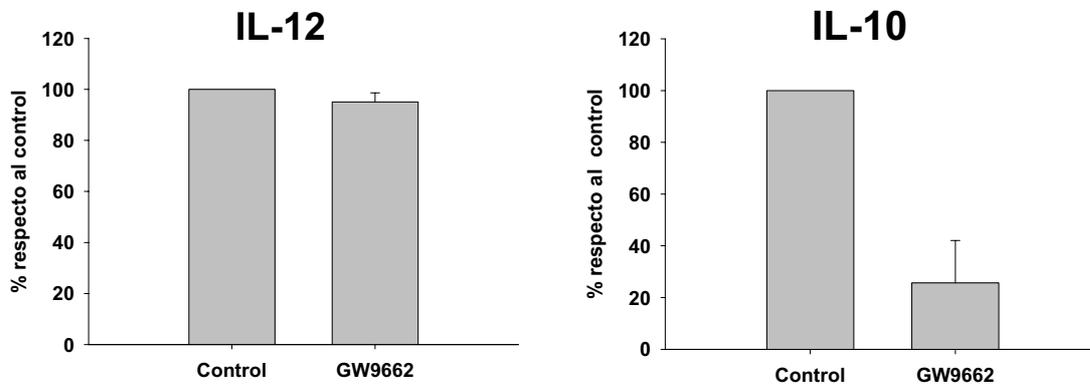


Figura 7.25. Secreción de citocinas en función de la concentración de GW9662. Elisa mostrando la secreción de IL-12 e IL-10 en función de la adición o no de 10 μ M GW9662. El inhibidor se encontró presente en los cultivos desde el primer día de transformación de monocito a dendrítica. El sexto día se añadió al medio LPS y a las 24 h se extrajo el medio y se congeló a -80 °C para ser analizado mediante ELISA.

Puesto que la IL-10 es la encargada de controlar e inhibir en gran medida la actividad de la IL-12, esto implica que el mecanismo de control de la actividad de IL-12 se encuentra inhibido. En consecuencia, las proliferaciones deberían ser mucho más potentes de lo que son en presencia de activadores de PPAR γ . Es posible que este descenso en la secreción de IL-10 sea suficiente para compensar las caídas de marcadores coestimuladores que se producen en las células tratadas con GW9662.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL

Los ácidos grasos omega-3 y, en concreto, el DHA y el EPA, están siendo objeto de un exhaustivo estudio en los últimos años. La razón de este interés radica en que se han encontrado muchas aplicaciones clínicas para estos compuestos que van desde la mitigación de los síntomas de muchas patologías, su inclusión en la dieta como suplemento alimenticio esencial para un correcto desarrollo, hasta incluso terapias anticáncer, las cuales utilizan la capacidad de estos compuestos para inducir apoptosis en células tumorales con el fin de potenciar la eficacia de la quimioterapia en combinación con fármacos antitumorales [125, 129-146].

A pesar de que fisiológicamente se han demostrado muchos de estos efectos, los mecanismos a través de los cuales estos ácidos grasos participan en dichos procesos no se han esclarecido todavía completamente. Existen muchos estudios que consiguen obtener explicaciones parciales sobre el modo de actuar del DHA. Así, se ha demostrado que: es capaz de inducir la expresión de numerosos genes [21-29]; su incorporación modifica las propiedades de las membranas celulares [4, 6, 18, 179]; altera el estado oxidativo de las células; es un sustrato que permite la obtención de segundos mensajeros (eicosanoides u otros) [6], etc....

No obstante, aunque en casos concretos la participación del DHA en estos mecanismos ha sido demostrada, sigue sin conocerse el mecanismo de actuación en muchos otros. Esto ha llevado a la suposición de que el DHA actúa en diferentes circunstancias de diferentes formas y, en algunas ocasiones, mediante varios mecanismos simultáneamente.

En concreto, una de las aplicaciones para las que no se ha podido esclarecer totalmente el mecanismo de actuación es la capacidad que tiene el DHA, además de otros ácidos grasos, para modular las respuestas inmunes [160, 161, 206-208, 216, 217, 380-382]. Estudios epidemiológicos, clínicos y bioquímicos han demostrado efectos beneficiosos de los ácidos grasos omega-3 en enfermedades inflamatorias [13, 121]. Los ácidos grasos omega-3 desarrollan un efecto inmunosupresor mientras que los ácidos grasos omega-6 exacerbaban las respuestas inmunes.

El DHA es capaz de activar en las células del sistema inmune numerosos procesos, alterando las propiedades de todos los tipos celulares estudiados hasta la fecha y, normalmente, atenuando su inmunogenicidad. En la mayor parte de estos casos se desconoce parcialmente o por completo el mecanismo de actuación.

Al ser el DHA un agente inmunomodulador general, es lógico suponer que debería afectar a la funcionalidad de las células dendríticas, las cuales, hasta cierto punto, son las células que dirigen gran cantidad de las respuestas inmunes que se producen en los organismos [458, 459]. A pesar de esta evidencia no se ha estudiado en profundidad los efectos del DHA sobre ellas.

Por otro lado, las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno que posee el sistema inmune, capaces de activarse frente a estímulos provocados por la respuesta inmune innata, producir grandes cantidades de citocinas inflamatorias y activar a los linfocitos T, iniciando de esta forma potentes respuestas inmunogénicas [308]. Las células dendríticas, además, desarrollan un papel central en el control de la inmunidad ya que, según estudios recientes, no solo se encargan de activar las reacciones inmunogénicas sino que también son capaces, en ciertas circunstancias, de inhibir la aparición de estas respuestas, es decir, que también participan en los procesos de tolerancia inmunológica [320, 329-333].

En el presente trabajo, se ha planteado en primer lugar valorar el efecto del DHA y de otros ácidos grasos sobre la célula dendrítica y, en segundo lugar, intentar averiguar cual es el mecanismo que utiliza el DHA para modificar dicha funcionalidad si es que esta se produce.

8.1 TOXICIDAD CELULAR DEL DHA COMO LIMITACIÓN DE SU EFECTO TERAPÉUTICO

Como se ha comentado anteriormente, en muchos tipos celulares, incluidos los linfocitos, el DHA provoca apoptosis celular a partir de determinadas concentraciones. Por ello era necesario averiguar la concentración umbral de DHA no citotóxica. El número de células necesarias para realizar estudios de apoptosis (mediante la metodología de la Anexina V o la activación de la Caspasa 3) era excesivo para la metodología de producción de células dendríticas, por lo que se decidió realizar estudios previos en otros tipos celulares del sistema inmune (Jurkat y KG-1a) y después extrapolar las conclusiones obtenidas a las células dendríticas. Estas dos líneas celulares fueron escogidas por pertenecer a la línea mieloide y linfoide del sistema inmune, respectivamente; lo cual permitía realizar una aproximación más segura a los posibles efectos que el DHA ejercería sobre los linfocitos y sobre los monocitos.

De los estudios de proliferación celular realizados con DHA sobre las dos líneas celulares, KG-1a y Jurkat, se dedujo que a una concentración de 50 μM de DHA no existía ninguna alteración significativa de la proliferación celular mientras que a 100 μM dicha proliferación se encontraba seriamente afectada (Figuras 6.1 y 6.4). Estudios posteriores, de Anexina V y activación de Caspasa 3 (Figuras 6.2, 6.3 y 6.5), indicaron que el descenso proliferativo a 100 μM de DHA que se producía tanto en células KG-1a como en Jurkat era debido a la inducción de apoptosis celular. El proceso apoptótico, sin embargo, no era inmediato, sino que se iniciaba a las 36-48 h de la adición del DHA.

Se sabe que la incorporación del DHA es muy rápida y se produce mayoritariamente durante las dos primeras horas; tras este tiempo los niveles de DHA en membrana continúan aumentando hasta las 72h [166]. Por lo tanto, una de las posibles causas podría ser que no se hubiese alcanzado hasta las 36 h un umbral de concentración en membrana que activase mecanismos de apoptosis. Por otro lado, al menos en células Jurkat, hay un estudio publicado que consigue frenar la entrada en apoptosis de estas células en presencia de DHA mediante la adición a los medios de cultivo de tautomicina y cipermetrina, inhibidores de la proteína fosfatasa 1 (PP1) y de la proteína fosfatasa 2B (PP2B), sugiriendo que estas dos fosfatasas se encuentran implicadas en el mecanismo de entrada en apoptosis de las células [144]. Este es un mecanismo común a la entrada en apoptosis de muchos tipos celulares donde se producen cambios que precisan la activación de fosfatasas [460]. En cualquier caso, a 50 μ M, ambas cepas celulares no presentan ninguna toxicidad frente al DHA en las 48-72 h siguientes a la administración del mismo. Parece ser esta la concentración umbral a partir de la cual se activaría el proceso de apoptosis.

El material celular de partida correspondía a enriquecimientos celulares de monocitos compuestos principalmente por monocitos y linfocitos provenientes de la fracción mononucleada de *Buffy Coats* con menos de 24 h desde el momento de la extracción de la sangre hasta el momento de su manipulación. Estos experimentos eran a tiempos mucho más largos (7-9 días) que los realizados con Jurkat o KG-1a, por lo que existía el peligro de que una inducción de apoptosis de una fracción de la población celular no pudiese ser detectada al cabo de este tiempo. Esto implicaría que se estarían midiendo subpoblaciones de células dendríticas pero no la población completa. Los estudios temporales del ciclo celular a una concentración de 50 μ M de DHA indicaron que, aunque una parte de los linfocitos entraban en apoptosis a partir del cuarto día, las células dendríticas no se habían visto afectadas (Figuras 6.6, 6.7 y 6.8; Tabla 6.1).

La mayor sensibilidad de los linfocitos al DHA con respecto a las DCs aporta una explicación al enriquecimiento observado en la población de estas últimas en los cultivos tratados con el ácido graso. Aunque las causas que explican este comportamiento linfocitario no son conocidas ni han sido objeto de estudio en esta tesis se puede sugerir un mecanismo para este comportamiento. El DHA es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos mediante la inhibición de la secreción de IL-2 y por sensibilización hacia la apoptosis celular [160, 388-393]. La aparición de apoptosis en los linfocitos, tanto en presencia como en ausencia de DHA, ocurre a partir del cuarto día (Figura 6.8). El cuarto día parece ser importante en la diferenciación de monocito a dendrítica. En trabajos con DCs y retinoides se ha demostrado que en la diferenciación de monocitos a DCs en presencia de retinoides, la viabilidad celular está garantizada los cuatro primeros días, pero a partir de este tiempo comienzan a entrar en apoptosis sugiriendo que la misma diferenciación de monocito a dendrítica ha provocado la sensibilización de las DCs hacia los retinoides [436]. Es curioso que la aparición de apoptosis en los linfocitos ocurra precisamente en el cuarto día también. Estos resultados parecen apuntar a algún tipo de citocina/quimiocina secretada por las células dendríticas que afecta a la viabilidad de los linfocitos. Como argumento favorable a esta hipótesis basta

Discusión general y conclusiones

observar en la Figura 6.7 como la entrada de linfocitos en apoptosis va incrementándose en la fase final de diferenciación de la DC. Además, al añadir LPS al cultivo para madurar la dendrítica aumenta mucho más la entrada en apoptosis en los linfocitos que contienen DHA.

Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que el DHA es capaz de activar la expresión de determinados genes entre los que se encuentran los PPAR. Recientemente se ha demostrado que los linfocitos son capaces de expresar varias isoformas de PPAR, en concreto PPAR α y PPAR γ [11]. Los linfocitos T en estado no activado expresan PPAR α con una expresión de PPAR γ residual pero, al activarse los linfocitos por causa de un estímulo, la expresión de PPAR α disminuye rápidamente y aumenta la de PPAR γ [461-463]. A medida que se va activando PPAR γ se va produciendo un descenso de la proliferación linfocitaria. La causa a la cual se puede atribuir el descenso del número de linfocitos es que PPAR γ es capaz de inhibir la expresión de IL-2 tras la activación de células T y, de esta manera, tiene un efecto supresor en el desarrollo de la respuesta inmune. Otra posible explicación a este descenso proliferativo puede deberse a un incremento de apoptosis que se produce al activarse los linfocitos T en presencia de ligandos de PPAR γ pero no de PPAR α [429-431]. Así pues, podría argumentarse que el DHA puede estar activando el PPAR γ de los linfocitos de forma que estos dejan de expresar IL-2 y se sensibilizan hacia la apoptosis. La consecuencia es una mayor mortalidad linfocitaria a medida que la célula dendrítica envía señales de activación celular.

8.2 EFECTOS DEL DHA, COMO MODELO DE PUFA, SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA

A partir de este momento se escogió 50 μ M de DHA como la concentración máxima de trabajo y en seguida se pudo comprobar que la presencia de DHA en el medio de cultivo alteraba de una forma dosis dependiente el fenotipo, la capacidad de activación linfocitaria y la capacidad secretora de citocinas de las células dendríticas. Al transformar monocitos en células dendríticas en presencia de DHA las DCs resultantes presentaban un fenotipo alterado en su estadio inmaduro y, además, al añadir LPS y provocar la maduración, la dendrítica madura que se obtenía poseía una capacidad coestimuladora linfocitaria disminuida encontrándose la expresión de muchos de sus marcadores parcial o totalmente inhibida.

Para que esto sucediese era necesaria una presencia continua de DHA en los medios de incubación. Se realizaron experimentos de incubaciones parciales de las DCs con DHA, ya fuese solamente durante el periodo de diferenciación de monocito a dendrítica inmadura (Tabla 6.4) o únicamente durante el periodo de maduración (Tabla 6.5); en presencia y en ausencia del estímulo de maduración. El DHA parecía

ser necesario para mantener el fenotipo alterado de la dendrítica inmadura en algunos marcadores mientras que en otros, el efecto sería irreversible. Se observó también que el DHA parecía alterar el fenotipo de la dendrítica madura (de forma parcialmente reversible), pero para que esto sucediese debía estar presente en el medio antes de que la dendrítica iniciase la maduración y durante todo este proceso. Si el ácido graso era añadido únicamente durante el proceso de maduración (últimas 48 h) entonces los efectos sobre el fenotipo eran mínimos. Por esta razón, todos los experimentos posteriores se han realizado en presencia continua de ácido graso.

La alteración del fenotipo y la capacidad de estimulación linfocitaria también se estudiaron con otros ácidos grasos: EPA, LA y OLE. Los resultados indicaron que con EPA y LA se producían alteraciones cualitativamente similares a las que producía el DHA, aunque cuantitativamente menores. Con OLE apenas se producían cambios. El DHA también era capaz de modificar otros marcadores de manera específica. Las conclusiones se resumen en las Tablas 8.1, 8.2 y 8.3 siendo la Tabla 8.1 un resumen de los efectos fenotípicos sobre DCs maduras e inmaduras tratadas con diferentes concentraciones de DHA, la Tabla 8.2 un resumen de los cuatro ácidos grasos a 50 μM sobre DCs maduras e inmaduras y la Tabla 8.3 un resumen de proliferaciones linfocitarias y secreciones de citocinas inducidas por DCs sometidas a esos tratamientos.

En DCs inmaduras el DHA, el EPA y el LA funcionaban de manera análoga en todos los marcadores excepto en CD36, CCR7 y CD83. Exceptuando el DHA, todos los demás ácidos grasos provocaban descensos en CD36 y no afectaban a CCR7 ni a CD83 en estas células.

Como se ha dicho, el DHA era el ácido graso más potente junto con el EPA a la hora de aumentar la expresión de CD86 y HLA-DR, disminuir CD80 e inhibir la expresión de CD1a. El ácido linoleico se situaba en un intermedio entre estos ácidos grasos y el ácido oleico. En cuanto al ácido oleico, apenas conseguía producir cambios fenotípicos. Aumentaban los niveles de expresión de CD80 pero no modificaba la expresión de HLA-DR ni del CD86 e inhibía de una forma mucho más pobre el CD1a.

Por otra parte, se observó que al aumentar las concentraciones de los ácidos oleico y linoleico (hasta 100 μM) se producía un incremento en las alteraciones fenotípicas producidas sobre las células dendríticas demostrando que existía una dependencia de la concentración incluso en estos compuestos (Tablas 6.2, 6.3, 6.6-6.11).

Todos los ácidos grasos estudiados, con independencia de si son ácidos grasos omega 3 (DHA y EPA), omega 6 (LA) u omega 9 (OLE) parecen ser capaces de ejercer efectos muy parecidos sobre el fenotipo de la dendrítica si se les suministran a suficiente concentración. Es posible que estos ácidos grasos compartan una misma vía metabólica de actuación y que el DHA además sea capaz de alterar el fenotipo a través de un camino adicional ya que modifica otros marcadores de manera específica.

Discusión general y conclusiones

Tabla 8.1.- Análisis de las variaciones fenotípicas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con DHA a diferentes concentraciones.

	DHA	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CD1a	CCR7	CD36
DC inmadura	5 μ M	↑ *	↑ ***	↑*	↑ *	↓ ***	↑ *	↑ *
	25 μ M	↑ **	↑ ***	-	↑ *	↓ ****	↑ *	-
	50 μ M	↑ ***	↑ ****	↓ *	↑ **	↓ ****	↑ **	↑ *
DC madura	5 μ M	-	-	↓ *	-	↓ **	↑ *	↑ **
	25 μ M	-	↓ *	↓ **	↓ *	↓ ***	↑ **	↑ **
	50 μ M	↓ *	↓ **	↓ ***	↓ **	↓ ****	↑ ***	↑ ****

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Tabla 8.2.- Análisis de las variaciones fenotípicas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con diferentes ácidos grasos a una concentración de 50 μ M.

		CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CD1a	CCR7	CD36
DC inmadura	DHA	↑ ***	↑ ****	↓ *	↑ **	↓ ****	↑ ***	↑ *
	EPA	-	↑ ****	-	↑ ***	↓ ****	-	-
	LA	-	↑ **	-	↑ *	↓ ***	-	-
	OLE	-	-	-	-	↓ *	-	-
DC madura	DHA	↓ *	↓ **	↓ ***	↓ *	↓ ****	↑ ***	↑ ****
	EPA	-	↓ **	↓ **	↓ *	↓ ****	-	↓ *
	LA	-	↓ *	-	-	↓ ***	-	-
	OLE	-	-	-	-	↓ *	-	-

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Tabla 8.3.- Análisis de las variaciones de la secreción de citocinas y de la proliferación linfocitaria en DCs maduras tratadas con diferentes ácidos grasos a una concentración de 50 μ M.

	Proliferación linfocitaria	Secreción de IL-10	Secreción de IL-12
DHA	↓ ***	↓ ***	↓ ***
EPA	↓ **	↓ **	↓ **
LA	↓ **	↓ **	↓ **
OLE	-	↓ *	↓ *

* Cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25% con respecto al control.

La inhibición de la proliferación linfocitaria provocada por las DCs tratadas con DHA es mayor que la que provocan DCs tratadas con otros ácidos grasos como EPA (Tabla 8.3) al igual que ocurría con el

fenotipo. Se puede por lo tanto afirmar que la alteración fenotípica que estos ácidos grasos están produciendo en la dendrítica es funcional, extrapolándose esta directamente a su capacidad para activar la proliferación linfocitaria.

Ya era conocido que el DHA era capaz de provocar inhibición de la proliferación linfocitaria [205, 383, 384]. Se sabía también que el DHA era capaz de ejercer efectos directos sobre monocitos, macrófagos y linfocitos [160, 389, 392, 393, 400-404]. Pero no se había estudiado qué efectos se producían sobre la dendrítica. Los resultados de estos experimentos demuestran que el DHA, el ácido graso omega-3 más largo e insaturado, es capaz de actuar sobre la DC modificando su fenotipo e inhibiendo la capacidad estimuladora de los linfocitos que esta célula posee. Ningún otro de los ácidos grasos estudiados le iguala ni en potencial para cambiar el fenotipo ni en capacidad de inhibición de la respuesta proliferativa.

8.2.1 Significados funcionales de las alteraciones fenotípicas

En este apartado de la discusión general se intentará relacionar de la mejor manera posible las alteraciones fenotípicas que se han observado en presencia de DHA u otros ácidos grasos con el resultado obtenido de inhibición de la capacidad estimuladora de las células dendríticas tratadas con estos sobre los linfocitos. Se comentarán exclusivamente los cambios fenotípicos que se han producido sobre células dendríticas maduras ya que son las únicas que pueden relacionarse con las proliferaciones linfocitarias.

8.2.1.1 CD80/CD86

Tanto el antígeno CD80 como el CD86 son ligandos de CD28 y también de CTLA-4 (CD152) [356-358]. CD28 es un receptor de linfocitos cuya señalización es esencial a la hora de producir IL-2 y activar la proliferación linfocitaria. CTLA-4 (CD152) es otro miembro de la familia del CD28 que se expresa tras la activación linfocitaria e induce una señal negativa en el linfocito T activado oponiéndose así directamente a la acción de CD28. Los antígenos CD28 y CTLA-4 desempeñan papeles cruciales pero opuestos en la estimulación de las células T. Ambos comparten dos ligandos, CD80 y CD86, que son expresados por las células presentadoras de antígeno. Hasta hace poco no se conocía con exactitud cual era el papel que cada uno de estos ligandos ejercía sobre la respuesta linfocitaria. Se sabe que ambos son capaces de activar CD28 aunque CD86 se une a CD28 con mayor afinidad que CD80. También se sabe que en ausencia de uno de ellos, el otro es capaz de activar la respuesta. Así pues, son complementarios pero al mismo tiempo y, paradójicamente, los dos ligandos han sido identificados como los responsables de la unión a CTLA-4 y, por tanto, también de la regulación negativa de la respuesta inmune.

Trabajos muy recientes han conseguido clarificar, parcialmente al menos, esta paradoja. En las poblaciones linfocitarias existen una serie de poblaciones minoritarias (5-15%) compuestas por linfocitos reguladores. En concreto, se sabe ahora que la población reguladora CD25⁺ T CD4 es capaz de frenar la respuesta linfocitaria gracias a su unión a CD80/CD86. En esta población reguladora los dos ligandos B7

Discusión general y conclusiones

desarrollan papeles diferenciados. CD80 se une a CTLA-4, lo cual incrementa la capacidad supresora del linfocito regulador. Por otro lado CD86 se une a CD28, inhibiendo la capacidad supresora del linfocito y, al mismo tiempo, enviando al mismo una señal de proliferación o de supervivencia [464]. De esta forma, en presencia de células dendríticas inmaduras, las cuales no expresan CD86 pero sí un poco de CD80, la actividad que prevalecería sería la supresora. Esto explicaría el papel de estas células en procesos de tolerancia y su incapacidad para desencadenar respuestas inmunes. Por otro lado, en presencia de células dendríticas maduras, las cuales expresarían grandes cantidades de CD86, la actividad supresora de los linfocitos reguladores se encontraría detenida y su número se estaría incrementando bien por que proliferan o bien porque aumenta su tiempo de supervivencia.

DHA, EPA y el ácido linoleico fuerzan descensos en los niveles de CD86 en las células dendríticas maduras. Este descenso podría disminuir la capacidad de las células dendríticas a la hora de inhibir la actividad supresora de los linfocitos T reguladores con lo cual se obtendrían respuestas inmunes menos intensas a causa de que estos linfocitos se encontrarían más activos. Al mismo tiempo, los descensos en CD86 también actuarían sobre los linfocitos activadores disminuyendo su grado de coestimulación y contribuyendo a producir respuestas inmunes menos intensas.

8.2.1.2 CD83

CD83 es un claro marcador de maduración en célula dendrítica. Es necesario para que este proceso se desarrolle correctamente y, aunque su función no ha sido completamente elucidada, sí se sabe que CD83 también es necesario para la activación de la proliferación de células T [465-467]. Por lo tanto una menor expresión de CD83 implica la obtención de DCs menos maduras y con menor capacidad de coestimulación linfocitaria por lo que, lógicamente, las proliferaciones linfocitarias deberían ser menos intensas.

8.2.1.3 MHC II

Para reconocer al antígeno las células tienen que establecer contacto con las células presentadoras de antígeno mediante la formación de las llamadas sinapsis inmunológicas donde se unen receptores TCR y moléculas coestimuladoras con moléculas MHC [309]. La duración y magnitud de la unión sináptica (siempre sustituible por otra más afín) determina la intensidad de la estimulación que se producirá. La maduración de la DC implica básicamente una transformación de célula capturadora de antígeno a célula presentadora del mismo [468]. Para conseguirlo, son necesarias grandes cantidades de MHC II en superficie de forma que se aseguren así procesos sinápticos lo suficientemente intensos. El DHA provoca en la DC madura un descenso de MHC II en superficie que a su vez provocará, potencialmente, un empeoramiento automático de la capacidad sináptica de la célula. Esto tendría que disminuir el número o la

afinidad de las uniones MHC-II:TCR; lo cual llevaría evidentemente a una menor estimulación linfocitaria [308].

8.2.1.4 CD1a

Las fuertes caídas en CD1a que se producen en presencia de DHA impiden en principio la activación de la población de linfocitos T restringidos para CD1a que, a diferencia de aquellos que reconocen el MHC, son autoreactivos. Las células T restringidas para CD1a, CD1b y CD1c en humanos producen patrones de citocinas TH1 y son citolíticas. Estas células pueden ser importantes en respuestas antimicrobianas y pueden contribuir significativamente a respuestas antitumorales. El resultado de la adición de DHA a los cultivos es que una parte de la población linfocitaria, que contribuye activamente mediante la secreción de citocinas, no se activará y la respuesta inmunitaria entonces perderá intensidad. Conviene resaltar aquí que este mecanismo, la inhibición de CD1, es utilizado con éxito por un parásito, *Leishmania Donaban*, el cual es capaz de inducir el descenso de CD1 en las células dendríticas del huésped previniendo así la activación de las células T restringidas por CD1. El conseguir evadir la presentación de CD1 podría ser una estrategia de *Leishmania* para evitar el reconocimiento de sus abundantes glicolípidos parasitarios e impedir reacciones inmunes contra él [368].

8.2.1.5 CD36

La expresión de CD36 se encuentra controlada principalmente por la transcripción del heterodímero PPAR γ :RXR del cual, en principio, el DHA es ligando. CD36 se encuentra implicado en muchos procesos diferentes tales como angiogénesis, fagocitosis, inflamación, el metabolismo lipídico y el de la glucosa. En macrófagos se han demostrado aumentos de expresión de CD36 en respuesta a ácidos grasos insaturados, siendo los inductores de CD36 más potentes el EPA y el DHA, seguidos de los ácidos oleico y linoleico [351]. A diferencia de la fagocitosis mediada por Fc, la mediada por CD36 ocurre de una forma no inflamatoria similar a la captura de células apoptóticas (en la cual CD36 se encuentra implicado). Se sabe que eritrocitos infectados con *Plasmodium Falciparum* que se unen a células dendríticas vía CD36 son capaces de modular la maduración de estas células *in vitro*. Estas células, comparadas con células dendríticas expuestas a eritrocitos infectados con la unión a CD36 bloqueada, eran incapaces de madurar tras ser estimuladas con LPS o TNF α . La producción de MHC de clase II y la expresión de moléculas coestimuladoras se encontraba inhibida, la secreción de IL-12 e IFN γ estaba disminuida y la secreción de IL-10 aumentada [352]. Así pues, los incrementos de CD36 en DCs que provoca DHA producen descensos en la respuesta inflamatoria de estas células y modifican su maduración disminuyendo MHC II, la secreción de citocinas y la proliferación linfocitaria.

8.2.1.6 Células dendríticas inmaduras

Hasta ahora se han comentado únicamente los cambios fenotípicos observados en células dendríticas maduras. Ha sido imposible estudiar la funcionalidad de las alteraciones fenotípicas en DCs inmaduras. Para evaluar esta funcionalidad, se deberían haber realizado estudios de tolerancia en células dendríticas inmaduras tratadas con ácidos grasos en lugar de estudios de activación de la respuesta linfocitaria. Pero basándose en los efectos que desarrolla este ácido graso en algunas enfermedades autoinmunes [22, 37, 147-149, 160, 161, 206-208, 216, 217, 380-382] y en los resultados obtenidos en DCs maduras en el presente trabajo, donde parece atenuar las respuestas inmunes, es posible que su actuación en DCs inmaduras favorezca de alguna manera la aparición de procesos de tolerancia.

Se va a intentar esbozar un posible mecanismo para esta posible actuación sobre las DCs inmaduras por parte del DHA. El CD80 prácticamente desaparece al tratar las células dendríticas inmaduras con DHA. En cambio el CD86 sufre incrementos en su expresión (pero sin llegar a los niveles de maduración en ningún caso). Se ha demostrado que la activación de CD80 y CD86 están relacionadas [449]. Los incrementos de CD86 permiten bloquear eficazmente los linfocitos T reguladores y, al mismo tiempo, el CD80, al no estar presente, no activa a esta subpoblación linfocitaria. Además, con DHA también se dan incrementos de CD83 y HLA-DR los cuales contribuyen a aumentar la estimulación linfocitaria. Todos estos cambios en el fenotipo proporcionarían, siempre hipotéticamente, un cuadro de la dendrítica inmadura en el que esta podría ser capaz de proporcionar estimulaciones débiles a los linfocitos. Si estas estimulaciones fuesen lo suficientemente bajas se produciría una entrada en anergia del linfocito estimulado por falta de suficiente intensidad en la estimulación, contribuyendo a la tolerancia.

8.3 EVIDENCIAS SOBRE EL MECANISMO DE ACTUACIÓN DEL DHA SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA

Se ha demostrado que los PUFAs, pero de manera especial el DHA, son capaces de modular la inmunogenicidad de la célula dendrítica. Para determinar el mecanismo de actuación del DHA, la primera evidencia se obtuvo al constatar en la bibliografía que el DHA podía actuar en ocasiones como un ligando de PPAR γ [10, 235, 238, 469], incluso en procesos inflamatorios [470]. Por otro lado, al comparar el comportamiento del DHA en células dendríticas con el observado con activadores de PPAR γ [256, 353] se observó que los fenotipos, tanto en un estadio inmaduro como en el maduro, eran similares [353] (Figuras 7.1 y 7.2; Tablas 7.1 y 7.2). En las Tablas 8.4 y 8.5 se muestra un análisis comparativo de los cambios que,

tanto el DHA como activadores de PPAR γ (la Rosiglitazona), son capaces de producir en la diferenciación de monocito a célula dendrítica.

Tabla 8.4.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con DHA o Rosiglitazona.

	Ligando	CD86	CD80	CD83	HLA-DR	CD1a	CCR7	CD36
DC inmaduras	DHA	↑****	↓*	↑***	↑**	↓****	↑***	↑*
	Rosiglitazona	↑**	↓*	-	↑*	↓****	-	↑***
DC maduras	DHA	↓**	↓*	↓*	↓*	↓****	↑***	↑***
	Rosiglitazona	-	↓*	↓*	-	↓****	-	↑**

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Tabla 8.5.- Secreción de citocinas y proliferación linfocitaria en DCs maduras tratadas con DHA o Rosiglitazona.

	Proliferación linfocitaria	Secreción de IL-10	Secreción de IL-12
DHA	↓***	↓***	↓***
Rosiglitazona	↓***	↓***	↓***

* Cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25% con respecto al control.

A pesar de las similitudes en el comportamiento de ambos inductores, existen pequeñas diferencias en algunos marcadores: en células dendríticas inmaduras se dan incrementos de expresión de CCR7, CD83 y HLA-DR con DHA que no se dan al tratar las células con Rosiglitazona; en células dendríticas maduras tratadas con DHA, el CD86 y el HLA-DR descienden y, sin embargo, apenas lo hacen si el tratamiento se hace con Rosiglitazona. Por lo demás los cambios fenotípicos son parecidos: descensos acusados de CD1a en DCs maduras y en inmaduras para ambos compuestos con respecto a sus controles, incrementos de CD86 en inmaduras en ambos casos, aumentos de expresión de CD36 tanto en inmaduras como en maduras con respecto a los controles y descensos en la expresión de CD83 y CD80 en el estado de madurez. También en ambos casos además se producían descensos en la capacidad estimuladora linfocitaria de la célula dendrítica (85% en DHA; 75% para la Rosiglitazona) y descensos en la secreción de las citocinas IL-10 e IL-12 (~60% para ambos compuestos para ambas citocinas).

Debido a estas similitudes, la hipótesis de trabajo que se planteó fue que el mecanismo por el cual el DHA estaba actuando sobre la DC precisaba de la activación del heterodímero PPAR γ :RXR. Esta hipótesis se apoyaba en las siguientes evidencias:

Discusión general y conclusiones

○ Como ya se ha comentado el DHA es un ligando de PPAR γ [10, 235, 238, 469, 470].

○ Numerosos estudios han demostrado que tanto los PUFAs provenientes de aceite de pescado, como el DHA o el EPA, como los activadores sintéticos de PPAR γ (Rosiglitazona, Troglitazona,...) son capaces de modular las respuestas del sistema inmune (Introducción, Capítulo 3 Apartados 3.3 y 3.4). Muchos de los efectos que producen ambos tipos de compuestos sobre las células del sistema inmune son similares. Se ha elaborado aquí un pequeño resumen de los mismos:

➔ Tanto el EPA como el DHA actúan sobre los linfocitos provocando descensos en su proliferación y en la expresión de citocinas (IL-2 e IFN- γ), de moléculas de adhesión y de receptores de IL-2 [159, 160, 205, 383-394]. Además, actúan sobre monocitos y macrófagos tanto humanos como murinos inhibiendo la expresión en superficie de MHC II, afectando a su capacidad de presentación de antígeno [160, 389, 392, 393, 400-404], disminuyendo la producción de óxido nítrico en macrófagos [406] e inhibiendo la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α [155, 391, 411-417]. Suplementos en la dieta con aceite de pescado alivian los síntomas provocados por la artritis reumatoide [147, 148].

➔ Si ahora nos referimos a los ligandos específicos de PPAR γ se producen efectos muy similares: se inhibe la producción de muchas citocinas proinflamatorias (tales como el TNF α , la IL- β y la IL-6) y la producción inducible de óxido nítrico en varios tipos celulares que incluyen monocitos, macrófagos y células epiteliales [425, 426]. Los ratones PPAR $\gamma^{+/-}$ son más susceptibles a la artritis reumatoide inducida experimentalmente y a la enfermedad inflamatoria intestinal. La activación del PPAR γ es capaz de inhibir la expresión de IL-2 tras la activación de células T y, de esta manera, tiene un efecto supresor en el desarrollo de la respuesta inmune [429-431]. Además de esta citocina, el PPAR γ también regula la expresión de otras citocinas TH1 propias de linfocitos T tales como IFN- γ [432].

Parece improbable que este paralelismo tan sistemático en diferentes patologías y en diferentes tipos celulares se deba únicamente a la casualidad.

Como se ha demostrado en el apartado de resultados, en presencia de DHA, los linfocitos son más susceptibles a la entrada en apoptosis (Figura 6.8). Este comportamiento se podría explicar por una activación del heterodímero PPAR γ :RXR. En presencia de activadores de PPAR γ pero no de PPAR α se

produce en los linfocitos una sensibilización hacia la apoptosis [429-431]. PPAR γ es también capaz de inhibir la expresión de IL-2 tras la activación de células T actuando de forma supresora sobre el desarrollo de la respuesta inmune. Si el DHA estuviese activando el heterodímero PPAR γ :RXR en linfocitos entonces el resultado que debería observarse es precisamente un incremento del proceso apoptótico linfocitario.

Todos estos resultados expuestos y demostrados en células del sistema inmune, diferentes de las DCs, sugieren que la hipótesis de trabajo planteada, es decir, que el mecanismo a través del cual el DHA actúa sobre la célula dendrítica es el de la activación del heterodímero PPAR γ :RXR sea plausible. Sin embargo, también hay argumentos en contra de esta hipótesis. Los resultados experimentales presentados en esta tesis indican que de todos los ácidos grasos estudiados es precisamente el DHA el que con más fuerza altera el fenotipo, la capacidad de estimulación linfocitaria y la secreción de citocinas en las células dendríticas. Sin embargo, este comportamiento está en directa contradicción con el hecho de que sea un activador de PPAR γ mucho menos potente que EPA o LA [10].

8.3.1 Activación del heterodímero PPAR γ :RXR a través de RXR

Con el objetivo de esclarecer qué vía mecanística era más importante en la actividad del DHA, se diseñó un estudio para comprobar si el heterodímero PPAR γ :RXR podía ser activado por unión de ligando a RXR independientemente de cualquier activación a través de PPAR γ . Dicha activación del heterodímero a través de RXR era teóricamente posible ya que el DHA es un ligando de RXR [455, 456].

Un compuesto capaz de activar selectivamente RXR es el 9cRA, el cual es un retinoide capaz de activar los factores de transcripción dependientes de ligando RAR y RXR [276-278]. Los RARs generalmente reconocen tanto al RA como al 9cRA mientras que los RXRs solo reconocen al 9cRA. Las concentraciones de 9cRA *in vivo* son más bajas que las de RA, a causa de que el 9cRA se convierte rápidamente, aunque no irreversiblemente, en su versión inactiva 9,13cRA [275]. Las diferencias de afinidad y concentración influyen en la función del RAR y del RXR, porque la función de RAR como heterodímero con RXR y la formación de dicho heterodímero dependen sólo de RA. La unión de ligando a RXR no parece ser esencial para la formación del heterodímero RAR:RXR. Contrariamente a esto, la función homodimérica del RXR requiere del 9cRA para formarse. En condiciones normales de menores concentraciones de 9cRA que RA, los heterodímeros RAR-RXR serán los funcionales. A altas concentraciones de 9cRA se activaría el homodímero de RXR [274].

RXR es un factor de transcripción capaz de heterodimerizar con muchos otros factores de transcripción tales como PPAR, VDR o TR de forma que se extiende el rango de señales retinoidales y el impacto de las concentraciones moduladoras de los activadores de RXR [274]. Sin embargo, RXR solo puede trabajar subordinadamente cuando heterodimeriza con RAR, TR o VDR. Es decir, el ligando RXR solo es transcripcionalmente activo cuando RAR, TR o VDR también se han unido a su propio ligando [219, 280-282]. Esto impide que los retinoides activen las vías TR y VDR.

Discusión general y conclusiones

Es aquí donde radica la diferencia fundamental entre estos receptores nucleares y el heterodímero PPAR:RXR. En el caso de PPAR:RXR el heterodímero puede activarse tanto a través de ligandos de RXR como de ligandos de PPAR. Por lo tanto, en teoría, podría producirse una activación del complejo PPAR γ :RXR a través de un activador de RXR como el 9cRA. En consecuencia, la adición de 9cRA a las células dendríticas podría derivar tanto en la activación del heterodímero PPAR γ :RXR como de RAR:RXR o RXR:RXR.

Existe un estudio que advierte que se induce apoptosis en las células dendríticas inmaduras a concentraciones de 1 μ M de 9cRA (confirmado en el presente trabajo, Figura 7.6 y Tabla 7.3), y que este proceso se inhibe en presencia de estímulos madurativos de las DCs [436]. Se atribuye la entrada en apoptosis de las DCs a la activación de la vía RAR α :RXR. Si a las células dendríticas se les añade algún estímulo madurativo entonces los retinoides inducen la activación de la dendrítica a través de un mecanismo dependiente de RXR e independiente de RAR (probablemente PPAR:RXR) y otro mecanismo RAR α :RXR diferente del que producía la apoptosis en DCs inmaduras [436]. Sin embargo, la concentración 1 μ M parece *a priori* muy alta para 9cRA teniendo en cuenta que los RXRs reconocen al 9cRA con una $K_{dS} \sim 15$ nM [275]. En consecuencia, debería ser posible obtener efectos significativos sobre las células dendríticas a concentraciones mucho más bajas que 1 μ M de 9cRA.

Siguiendo todos estos razonamientos se decidió estudiar los rangos desde 1 nM hasta 100 nM de 9cRA en la diferenciación de monocito a célula dendrítica. Los resultados demostraron que el 9cRA modificaba el fenotipo de la célula dendrítica de una forma concentración dependiente y similar, aunque con mayor intensidad, a como lo hacía el 50 μ M de DHA (Figuras 7.7 y 7.8; Tablas 7.5 y 7.6). En la Tabla 8.6 se muestra un análisis comparativo de los cambios que, tanto el DHA como el 9cRA, son capaces de producir en la diferenciación de monocito a célula dendrítica y en la maduración. HLA-DR, CD86, CD83 y CCR7 se incrementaban en células dendríticas inmaduras. CD86, CD83 y HLA-DR disminuían su expresión con respecto a los controles en DCs maduras. CD80 descendía tanto en madura como en inmadura en ambos casos con respecto a sus respectivos controles. En cambio, CD36 se incrementaba con respecto a los controles en ambos casos. Finalmente, CD1a desaparecía como marcador de superficie tanto en dendrítica inmadura como en madura. Se estudiaron las proliferaciones linfocitarias activadas por células dendríticas tratadas con DHA, 9cRA o sin tratar encontrándose que estas también se encontraban disminuidas si las DCs habían sido tratadas previamente con 9cRA o DHA.

Tabla 8.6.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con DHA o 9cRA.

		CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
DC inmaduras	DHA	↑ ***	↑ ****	↓ *	↑ **	↑ ***	↓ ****	↑ *
	9cRA	↑ ****	↑ ****	↓ ***	↑ ***	↑ ***	↓ ****	↓ *
DC maduras	DHA	↓ *	↓ **	↓ *	↓ *	↑ ***	↓ ****	↑ ***
	9cRA	↓ *	↓ **	↓ ***	↓ *	↑ **	↓ ****	↑ ***

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Tabla 8.7.- Análisis de la secreción de citocinas y proliferación linfocitaria en DCs maduras tratadas con DHA o 9cRA.

	Proliferación linfocitaria	Secreción de IL-10	Secreción de IL-12
DHA	↓ ***	↓ ***	↓ ***
9cRA	↓ ***	↑ **	↓ ***

* Cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25% con respecto al control.

Sin embargo, también se produjeron resultados divergentes respecto a los obtenidos con el DHA. Las DCs tratadas con 9cRA, a diferencia de las tratadas con DHA, sufrían un incremento de expresión de IL-10 y un descenso en la expresión de IL-12 (Tabla 8.7). Se sabe que la adición de 9cRA a macrófagos de ratón produce una inhibición de la secreción de IL-12 en los mismos [471]; resultado coincidente con el que se ha obtenido en DCs humanas en este trabajo (Figura 7.10). Además, la adición de 9cRA a células T desplaza la respuesta de TH1 a TH2 con ligeros incrementos en la secreción de IL-10 a través de una vía dependiente de RAR [472]. Es posible que 9cRA inhiba la producción de IL-12 por activación de PPARγ:RXR y mantenga una producción estable de IL-10 a través de PPARγ:RXR, RXR:RXR o, más probablemente, alguna vía RAR:RXR.

Además, las células dendríticas tratadas con 9cRA eran morfológicamente diferentes de las tratadas con DHA o con Rosiglitazona. Las células tratadas con 9cRA en estadio inmaduro mostraban formas más propias de DCs maduras que de inmaduras, a diferencia de las de DHA, Rosiglitazona o los controles inmaduros (Figuras 7.11 y 7.12). Se sabe que los retinoides, y en concreto, el 9cRa, son factores de diferenciación en muchos tipos celulares. En concreto, en DCs al menos existe un caso demostrado en que un retinoide, el ATRA, permite la obtención de células con una morfología y un fenotipo muy parecido al de las DCs inmaduras a partir de monocitos en combinación con GM-CSF y en ausencia de IL-4 [473]. Estas células poseían la particularidad de poder secretar IL-12 en ausencia de estímulos madurativos al mismo tiempo que no perdían su capacidad para capturar antígeno.

Discusión general y conclusiones

Estas discrepancias con respecto al comportamiento con DHA podrían atribuirse a otras vías de diferenciación. Ya se ha comentado anteriormente que la presencia de 9cRA *in vitro* en los cultivos favorece la formación de homodímeros RXR:RXR y heterodímeros RAR:RXR. Se ha demostrado que 9cRA puede actuar a través de los homodímeros en algunos casos [453].

Tabla 8.8.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas inmaduras tratadas con Rosiglitazona y/o 9cRA.

	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
9cRA 1 nM	-	↑**	↓*	↑*	-	↓**	-
Rosi 100 nM	-	↑*	-	-	-	↓**	↑*
9cRA & Rosi	-	↑*****	↓***	↑***	-	↓****	↑****
9cRA 10 nM	↑**	↑****	↓**	↑*	↑**	↓****	-
Rosi 1 μM	-	↑**	↓*	-	-	↓***	↑*
9cRA & Rosi	↑**	↑ ¹⁰ *	↓***	↑**	↑**	↓****	↑*

* Excepto para CD86 donde cada estrella representa un incremento del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Para averiguar realmente qué vías se estaban activando en la célula dendrítica en presencia de DHA se realizaron experimentos de coincubación con ligandos de PPAR γ y RXR. La adición de compuestos activadores de PPAR γ y de RXR produce efectos complementarios en muchos tipos celulares [451] a causa de que se activan simultáneamente las dos partes del heterodímero PPAR γ :RXR [219]. Por ello se realizaron coincubaciones de DCs con 9cRA y Rosiglitazona a concentraciones muy bajas. Se escogieron estas bajas concentraciones con el objetivo de que los compuestos adicionados por separado apenas produjesen alteraciones en el fenotipo celular. También se trabajó a concentraciones superiores posteriormente. Un resumen de los resultados obtenidos se encuentra en las Tablas 8.8 y 8.9.

Los resultados demostraban que, cuando 9cRA y Rosiglitazona se encontraban presentes en el cultivo conjuntamente, actuaban efectivamente de modo aditivo en dendrítica inmadura. El caso más llamativo en inmadurez era CD86, el cual incrementaba su expresión en un 600% a bajas concentraciones de compuestos mientras que solo con Rosiglitazona se producían aumentos del 50% y solo con 9cRA incrementos del 140%. A altas concentraciones el incremento era de un 200% para la Rosiglitazona y de un 400% para el 9cRA, dando la conjunción de ambos un incremento del 1000%. Estos efectos aditivos mantienen el mismo sentido que siguen los dos ligandos por separado. En cambio, no se observan estos efectos ni en CD83 ni en CCR7. Estos dos últimos son marcadores que la Rosiglitazona por sí misma no era capaz de alterar por lo que en cierta medida es lógico que ahora los efectos aditivos en estos marcadores no aparezcan. HLA-DR presentaba incrementos en su expresión que no se daban cuando cada uno de los activadores era adicionado por separado. CD80 descendía en presencia de ambos compuestos

pero no lo hacía si estos eran adicionados por separado (a bajas concentraciones pero sí a altas). CD1a presentaba descensos parciales en su expresión al ser incubadas las células dendríticas con Rosiglitazona o 9cRA por separado. Al adicionar ambos compuestos a la vez CD1a prácticamente dejaba de expresarse. CD36 también presentaba incrementos aditivos en su expresión que no se daban cuando los compuestos eran adicionados por separado.

Tabla 8.9.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas maduras tratadas con Rosiglitazona y/o 9cRA.

	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
9cRA 1 nM	-	-	-	↓*	-	↓*	-
Rosi 100 nM	-	-	↓*	↓*	-	↓**	↑**
9cRA & Rosi	↓*	↓*	↓**	↓**	-	↓****	↑****
9cRA 10 nM	-	-	↓*	↓*	↑*	↓***	↑*
Rosi 1 μM	-	-	↓*	-	-	↓***	-
9cRA & Rosi	↓*	↓**	↓***	↓**	-	↓****	↑***

*Cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25% con respecto al control.

Si ahora se observan los efectos sobre DCs maduras (Tabla 8.9) también aquí se producían efectos aditivos. CD86 presentaba descensos importantes cuando ambos compuestos actuaban conjuntamente tanto a altas como a bajas concentraciones. Los descensos de CD83, CD80 y HLA-DR también eran aditivos y lo mismo parecía suceder con los incrementos de CD36. En cambio, CCR7 no mostraba ningún incremento. En cuanto a CD1a, a bajas concentraciones se producían descensos aditivos, mientras que a altas nada se puede concluir pues su expresión ya se encontraba completamente inhibida al actuar cada compuesto en solitario.

Estos resultados permiten sugerir que el 9cRA, en presencia de Rosiglitazona, actúa sobre el fenotipo de la célula dendrítica a través de PPARγ:RXR, concretamente uniéndose y activando el receptor nuclear RXR del heterodímero. De esta manera se activarían ambos monómeros al mismo tiempo y se generaría un efecto aditivo. Se ha demostrado en diversos estudios que la adición simultánea de compuestos activadores de PPARγ y retinoides produce efectos aditivos sobre las células por activación de las dos partes del heterodímero PPARγ:RXR [219, 451, 452].

Teniendo en cuenta estas premisas, se abordó el problema de averiguar qué vía metabólica usa el DHA para alterar el fenotipo de la DC. Como los resultados obtenidos demostraron que la adición de un activador de RXR y un activador de PPARγ producía efectos aditivos sobre la alteración del fenotipo de la célula dendrítica, se planteó el estudio del comportamiento conjunto del DHA y efectores de PPARγ o de RXR. Si el DHA actuase principalmente como activador de PPARγ debería desarrollar efectos complementarios en conjunción con 9cRA. Si lo hiciese a través de RXR estos efectos deberían

Discusión general y conclusiones

desarrollarse en conjunción con la Rosiglitazona. Por lo tanto, se coincubaron DHA con Rosiglitazona por un lado y DHA con 9cRA por otro para determinar de qué modo actuaba el DHA (Figuras 7.17 y 7.18). Se procedió a analizar las alteraciones fenotípicas que se producían en ambos casos (Tablas 8.10 y 8.11).

Tabla 8.10.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con DHA y/o Rosiglitazona.

		CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
DC inmadura	Rosi 100 nM	-	↑ *	↓ *	-	-	↓ ***	↑ *
	DHA 5 μM	-	↑ *	↑ *	-	-	↓ *	-
	DHA & Rosi	-	↑ ***	↓ *	↑ **	-	↓ ****	↑ ***
DC madura	Rosi 100 nM	-	-	↓ *	↓ *	-	↓ ***	-
	DHA 5 μM	-	-	-	↓ *	-	↓ *	-
	DHA & Rosi	↓ *	↓ *	↓ ***	↓ *	-	↓ ****	-

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Tabla 8.11.- Análisis de las variaciones fenotípicas observadas en células dendríticas inmaduras y maduras tratadas con DHA y/o 9cRA.

		CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CCR7	CD1a	CD36
DC inmaduras	9cRA 1 nM	↑ *	-	-	-	-	↓ **	-
	DHA 5 μM	↑ *	↑ *	-	-	-	-	-
	DHA & 9cRA	↑ **	↑ **	-	-	↑ *	↓ ***	-
DC maduras	9cRa 1 nM	↑ *	↑ *	-	↓ *	↑ *	-	-
	DHA 5 μM	-	-	↓ *	↓ *	↑ *	↓ **	-
	DHA & 9cRA	-	-	↓ *	↓ **	↑ *	↓ ***	-

* Excepto para CD86 en inmaduras donde cada estrella representa una variación del 100% con respecto al control, para el resto de los marcadores cada estrella implica un incremento o decremento de cerca de un 25%.

Los resultados demostraron que, aunque se producían efectos aditivos en las coincubaciones de 9cRA y DHA, estos eran mucho más claros y concluyentes en las coincubaciones de DHA con Rosiglitazona sugiriendo que el DHA actuaba activando prioritariamente el receptor nuclear RXR del heterodímero PPARγ:RXR, aunque también activase el monómero PPARγ. Es decir, el DHA presentaría un comportamiento multifactorial activando simultáneamente los dos monómeros del heterodímero. Si la afinidad por ambos receptores fuese la misma, frente a potentes activadores selectivos para cada uno de los monómeros como son la Rosiglitazona para PPARγ y el 9cRA para RXR, los efectos aditivos deberían haber sido altos en ambas coincubaciones con DHA; al desplazarse este hacia el monómero libre. Sin embargo, este efecto solo se observaba de forma eficaz en el caso de la coincubación con Rosiglitazona, lo

que sugiere que la vía de activación a través de RXR se encuentra potenciada con respecto a la de PPAR γ . Este resultado está de acuerdo con los estudios que indican que el DHA es un activador de RXR en tejido cerebral de ratón [456] y que el DHA junto con otros PUFAs (como el AA) son activadores de RXR [455]. Según estos estudios el DHA se une exclusivamente a RXR discriminando para RAR, VDR o TR [456]. Además, este comportamiento explicaría porqué el DHA produce en las DCs cuantitativamente cambios muy superiores a los otros ácidos grasos estudiados ya que estaría provocando efectos aditivos al actuar como una molécula ambivalente capaz de activar las dos partes del heterodímero.

Así, la activación del heterodímero PPAR γ :RXR no se produciría exclusivamente a través de la activación de PPAR γ sino mayoritariamente a través de la activación del receptor nuclear RXR y secundariamente a través de PPAR γ . Esto también implica que los efectos de la Rosiglitazona y del DHA son complementarios o, lo que es lo mismo, que en teoría podrían reducirse las dosis de Rosiglitazona u otros activadores sintéticos de PPAR γ en las aplicaciones clínicas [255, 266-273], coadministrando DHA para reducir de esta manera muchos efectos secundarios provocados por los activadores sintéticos de PPAR γ .

8.3.2 Efecto de la inhibición irreversible de PPAR γ

Finalmente, para reforzar la hipótesis de que el DHA actúa sobre la célula dendrítica a través de la unión al monómero RXR y al monómero PPAR γ del heterodímero PPAR γ :RXR, se realizaron experimentos de inhibición de la formación del heterodímero mediante la adición del inhibidor selectivo para PPAR γ GW9662 [457]. Esta molécula se une covalentemente a la Cys²⁸⁵ de la molécula de PPAR. A concentraciones de 10 μ M permite inhibir específicamente PPAR γ sin afectar a ninguno de los demás PPARs. El tratamiento con el inhibidor provoca la pérdida irreversible del lugar de unión al ligando y no se produce la formación del heterodímero PPAR γ :RXR [457]. Por lo tanto, el tratamiento con GW9662 no solo debería impedir la activación de PPAR γ :RXR por adición de Rosiglitazona sino también por adición de DHA y 9cRA a no ser que otras vías alternativas tales como RXR:RXR o RAR:RXR pudiesen en este caso suplir la falta del heterodímero PPAR γ :RXR [453].

Los resultados obtenidos en presencia del inhibidor GW9662 confirmaron que ni el 9cRA ni el DHA ni la Rosiglitazona eran capaces de alterar el fenotipo de la célula dendrítica con respecto a los controles (Figuras 7.20, 7.21 y 7.22). 9cRA y DHA presentaban, sin embargo, una mayor resistencia a la inhibición por GW9662. Esta inhibición tan clara de la actividad de estos compuestos en ausencia de PPAR γ :RXR permite descartar también que el DHA o el 9cRA actúen a través de vías alternativas de forma efectiva tales como los complejos RXR:RXR o RAR:RXR puesto que el inhibidor no impide la formación de estos complejos de transcripción.

Discusión general y conclusiones

Además, sorprendentemente, el inhibidor por sí mismo provocaba importantes cambios en el fenotipo de la célula dendrítica sin necesidad de añadir ningún otro compuesto. En DCs inmaduras disminuía la expresión de todos los marcadores excepto el CD36 que experimentaba un gran incremento. Pero lo más sorprendente se produjo al añadir estímulos de maduración a la dendrítica. En este caso, el inhibidor por sí mismo era capaz de detener casi por completo el proceso de maduración, al menos en cuanto al fenotipo se refiere. Los antígenos CD86, CD83, CCR7 y HLA-DR continuaban expresándose a niveles de célula dendrítica inmadura. El CD1a se expresaba a niveles superiores a los controles maduros y el CD80, aunque se expresaba bastante más que en DCs inmaduras normales, presentaba una expresión muy reducida con respecto a la de las DCs maduras. Por último, el CD36 presentaba también aquí incrementos de expresión similares a los que ya se producían al tratar la dendrítica inmadura con el inhibidor. El hecho de que al bloquear el PPAR γ también se produjese la inhibición del proceso de maduración implicaba que el heterodímero PPAR γ :RXR es un factor de transcripción fundamental para la consecución del proceso madurativo en la célula dendrítica. De esto se deduce que la dendrítica utiliza el PPAR γ para regular su diferenciación de dendrítica inmadura a madura de forma que si se bloquea esta proteína, la célula no es capaz de alcanzar un fenotipo maduro de forma eficaz. Ha de existir forzosamente algún proceso endógeno, propio de la célula, que active el PPAR γ al desencadenarse el proceso de maduración de la dendrítica. El PPAR γ intervendría en los incrementos de CD86, CD83, CCR7, HLA-DR, CD80 y en los decrementos de CD1a que se producen durante el proceso de maduración.

Por otro lado, en presencia del inhibidor, la activación de las proliferaciones linfocitarias era similar a la de los controles y no se producía ningún tipo de inhibición de la respuesta linfocitaria. Este resultado, aunque sorprendente debido a las bajas expresiones de los antígenos coestimuladores como el CD86 y el CD80, está de acuerdo en principio con el hecho de que los activadores del heterodímero PPAR γ :RXR actúen como atenuadores de la respuesta inmunogénica de modo que al inhibirse PPAR γ , e impedirse así su efecto regulador, la capacidad de estimulación linfocitaria vuelva a niveles normales por no poder actuar sobre ella el heterodímero.

Las altas proliferaciones linfocitarias inducidas por las células dendríticas tratadas con GW9662 también tienen una posible explicación en base a la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80/CD86. La comunidad científica parece estar de acuerdo en que el cociente CD80/CD86 es muy importante para la estimulación linfocitaria [361-363]. Las células dendríticas tratadas con GW9662 no presentan CD86 pero presentan cierta cantidad de CD80 (a un nivel superior a la que presentaría una célula dendrítica inmadura). CD86 posee mayor afinidad para la unión a CD28 en el linfocito y por ello se considera que CD86 actúa como coestimulador principal. Pero en ausencia de CD86, el CD80 puede ocupar su lugar uniéndose a CD28 y actuar como coestimulador en linfocitos inmunogénicos. Además la unión de CD86 aporta una importante señal de supervivencia a los linfocitos T reguladores que se encuentran presentes en el subtipo CD25⁺ de las células T CD4⁺ [362, 363]. La coestimulación B7/CD28 es

esencial para la supervivencia y la homeostasis de la población linfocito T reguladora CD4⁺CD25⁺ que controla la proliferación celular ya que ratones NOD deficientes en CD80/CD86 o CD28 presentan casos de Diabetes espontánea exacerbada con cuadros de la enfermedad más graves. Esto se producía como consecuencia de la ausencia de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺, los cuales no podían sobrevivir en ausencia de estimulación CD86-CD28 [362, 363]. Al desaparecer CD86, la dendrítica deja de enviar señales de supervivencia a los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺. En consecuencia estos irían desapareciendo de la población linfocitaria a medida que se sucediesen las generaciones de linfocitos T inmunogénicos con lo cual el equilibrio linfocito estimulador-Linfocito regulador escoraría hacia el lado de los linfocitos estimuladores y la proliferación linfocitaria no podría ser inhibida. A través de la unión de un antígeno fuerte al MHC y su contacto con el TCR de los linfocitos T estimuladores así como la unión coestimuladora CD28:CD80 estos sí estarían proliferando, con lo que en pocas generaciones la proporción de linfocitos reguladores habría descendido lo suficiente como para no ser capaces de influir en la respuesta.

Por último, otro dato que explica las altas proliferaciones linfocitarias producidas por células dendríticas tratadas con GW9662 son los patrones de citocinas secretados por estas células (Figura 7.24). Al contrario que con 9cRA, donde se secretaban niveles incrementados con respecto a los controles de IL-10 y muy disminuidos de IL-12, en este caso se secretan niveles iguales a los controles de IL-12 y muy bajos de IL-10. La IL-10 actúa como supresora de la respuesta inmune y permite el control de las respuestas proliferativas linfocitarias. En ausencia de esta citocina es lógico que las respuestas linfocitarias sean más intensas. También aquí hay cierta lógica en los resultados pues se sabe que PPAR γ inhibe la secreción de IL-12 [256, 355] con lo cual, al quedar inhibida a su vez por GW9662, no se consiguen bajar los niveles de secreción de esta citocina.

Así pues, aunque sorprendente en principio, las altas proliferaciones en presencia de células dendríticas tratadas con el inhibidor de PPAR γ GW9662 pueden explicarse con los resultados obtenidos y con los estudios publicados sobre CD80/CD86 e IL-12 ya comentados.

El inhibidor de PPAR γ GW9662 se ha revelado como una herramienta muy útil a la hora de esclarecer los efectos que PPAR γ :RXR realiza sobre las células dendríticas. Su elevada selectividad así como su unión covalente a PPAR γ permiten un estudio continuado en el tiempo del comportamiento de las células dendríticas en ausencia de PPAR γ :RXR. De esta forma se pueden esclarecer muchos de los papeles que este heterodímero juega en estas células.

Por último se ha demostrado que el antígeno CD36 puede incrementarse en células dendríticas de forma independiente de PPAR γ , probablemente a través de los heterodímeros RXR:RAR, como se ha demostrado anteriormente en monocitos y macrófagos [474].

8.4 MODELO DE REGULACIÓN DE LA CÉLULA DENDRÍTICA POR EL COMPLEJO PPAR γ :RXR

Con los datos obtenidos en esta tesis doctoral y con los datos publicados sobre los mecanismos moleculares de actuación del DHA y otros ácidos grasos, se intentará diseñar un modelo que explique a grandes rasgos los fenómenos descritos a lo largo de la presente memoria. Para ello, además de los resultados obtenidos, se utilizarán también algunos trabajos básicos realizados con activadores de los receptores nucleares PPAR γ y RXR en los que se han estudiado los mecanismos moleculares de dichos receptores y su relación con diferentes factores de transcripción de señal y moléculas coactivadoras. Este modelo, por supuesto, no pretende sentar cátedra, sino ayudar a una mejor comprensión global de la descripción fenomenológica. El modelo se expondrá mediante tres figuras donde se representará lo que se cree que ocurre en la diferenciación desde monocito a célula dendrítica inmadura, en la transformación hasta célula dendrítica madura y en presencia del inhibidor de PPAR γ GW9662.

Estudios previos sugieren que el PPAR γ no es un mero inhibidor de las respuestas inmunes, sino que podría actuar como un regulador de la misma [262, 353, 425, 436, 470, 475-482]. De esta forma, en procesos inflamatorios, un exceso de activación de PPAR γ provocaría la atenuación de la inmunogenicidad mientras que en procesos de preactivación de la inflamación intervendría de alguna forma activando o colaborando de manera indispensable en el complejo proceso de desarrollo de la respuesta celular inmunológica. No se descarta que otros receptores nucleares dependientes de RXR, tales como RXR:RXR puedan también intervenir.

Aunque recientemente se ha descrito que el tratamiento con ácidos grasos omega 3 no interfiere con la unión de NF κ B al DNA, ni con su actividad [483], existen muchos trabajos que indican que la activación de PPAR γ o RXR interfiere con NF κ B (una proteína implicada en el desarrollo de los procesos inflamatorios), NFAT y otros factores de transcripción, tanto en su unión a DNA, como en su actividad [262, 353, 425, 470, 475-482]. Este trabajo corrobora estos resultados al obtener inhibiciones funcionales en células dendríticas tratadas con los activadores de PPAR γ :RXR como DHA, EPA, LIN, Rosiglitazona y 9cRA.

Sin embargo, también se ha demostrado la existencia de interacciones constitutivas entre PPAR γ y NF κ B *in vivo* en ausencia de activadores de PPAR γ . Se cree que PPAR γ y NF κ B *in vivo* podrían interactuar de forma que se posibilitaría el desarrollo de procesos inflamatorios [475]. Además, en otro estudio, al adicionar retinoides a células dendríticas inmaduras se refuerza la unión de NF κ B al ADN a través de un mecanismo independiente de RAR:RXR y dependiente de RXR (como posibilidad nombran a PPAR:RXR o RXR:RXR) [436]. El estudio que se presenta en esta tesis también refuerza esta teoría, al impedirse el

desarrollo de un fenotipo normal de dendrítica madura en presencia de LPS si PPAR γ está inhibido y al obtenerse resultados ligeramente estimuladores en DCs inmaduras en presencia de activadores de PPAR γ :RXR; resultados que también se obtenían si se trataban DCs inmaduras con Rosiglitazona [353]. Así, según estos resultados, si bien es cierto que PPAR γ actuaría inhibiendo NF κ B en procesos inflamatorios, también parece haber pruebas de que normalmente se encontraría asociado de alguna forma a NF κ B y, probablemente, se encontraría implicado en el desarrollo de dichos procesos. De esta forma, al sobrepasarse un determinado nivel de activación de PPAR γ , tal vez por causa de un cambio conformacional en el complejo, o por la unión de un coactivador o la supresión de un correpresor, PPAR γ comenzaría a actuar reprimiendo a NF κ B. PPAR γ sería indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune y, al mismo tiempo, estaría interviniendo en la represión de la misma.

En algunos trabajos [349, 484] ya se han descrito muy bajos niveles de expresión de PPAR γ en monocitos, lo que implica que en presencia de DHA, muy posiblemente el mecanismo que se inicia no es a través de este receptor. Así, al comienzo de la diferenciación de monocito a célula dendrítica (Figura 8.1) se cree que se darían principalmente procesos celulares en los que estarían involucrados receptores RXR y RAR. Se sabe que durante la diferenciación de monocito a DC se expresan receptores de retinoides en los monocitos [454]. En concreto, a partir del día 1 de cultivo se detectaban niveles altos de mRNA de RAR α que no se correspondían con altas cantidades de la proteína RAR α . En cambio, para RXR α se detectaban altos niveles de expresión de mRNA que se mantenían durante todo el proceso de diferenciación de monocito a DC pero no a macrófago y que, de nuevo, no se correspondían con los niveles de proteína. En cualquier caso, parece que al principio de la diferenciación intervendrían los receptores de retinoides. En presencia de IL-4 y GM-CSF, los monocitos comenzarían a expresar PPAR γ a medida que avanzase el proceso de diferenciación a DC. Ya como DC inmadura, los activadores de PPAR γ :RXR como 9cRA, DHA, EPA, LA y Rosiglitazona probablemente reforzarían ligeramente NF κ B a través de PPAR γ de forma que se producirían incrementos de CD86, HLA-DR y CD83 aunque descendería CD80. Tampoco se descarta la posibilidad de que procesos en los que esté implicado RXR e independientes de PPAR γ sean los que produzcan los efectos del DHA y así se señala en el modelo presentado, y más teniendo en cuenta que es conocida la afinidad de DHA por RXR [455].

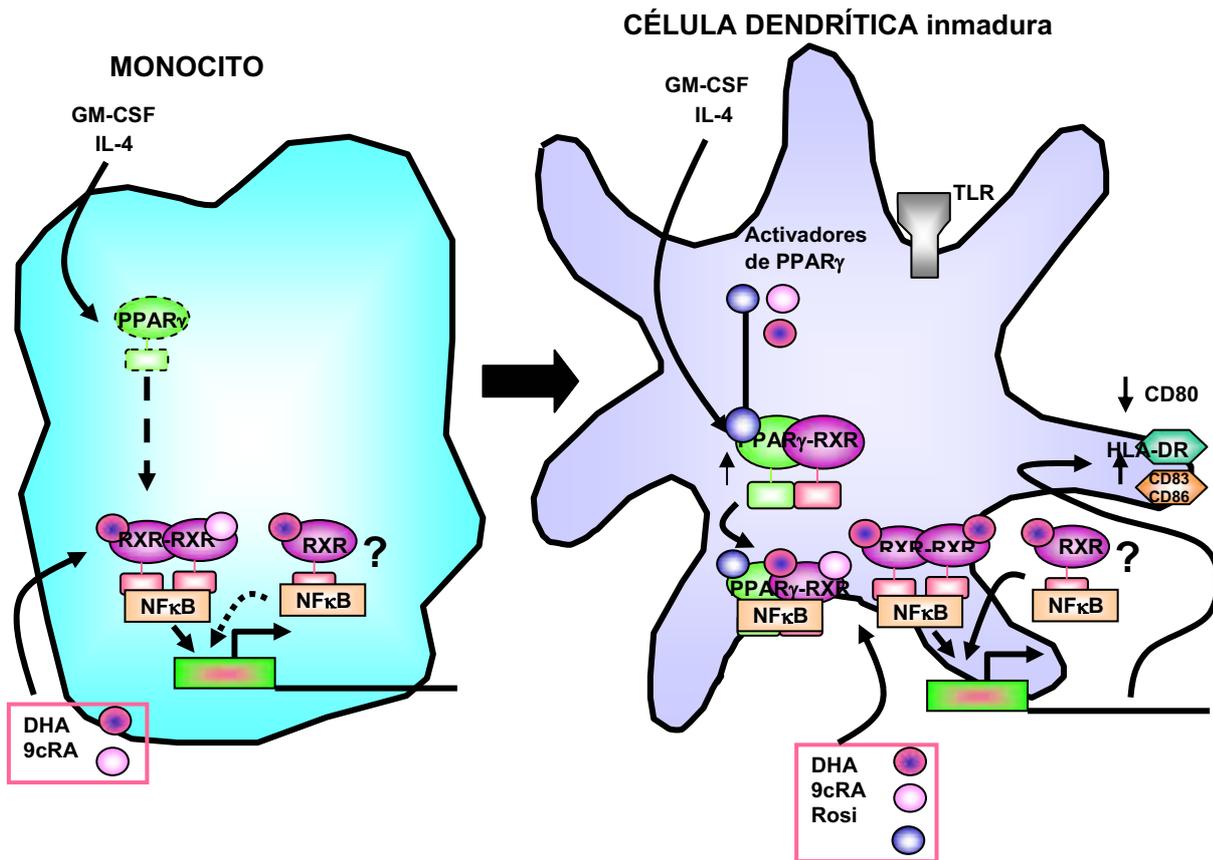


Figura 8.1. Modelo de regulación del proceso madurativo por parte de PPAR γ y RXR. A la izquierda, monocito. Al comienzo del proceso de diferenciación de monocito a DC los receptores involucrados serían principalmente RXR dependientes. La IL-4 activaría la expresión de PPAR γ en la célula durante el proceso de diferenciación. A la derecha, ya como DC inmadura, los activadores de PPAR γ :RXR (9cRA, DHA, EPA, LA y Rosiglitazona) reforzarían ligeramente NF κ B a través de PPAR γ de forma que se producirían incrementos en HLA-DR, CD86 y CD83 (con 9cRA y DHA este último) y descensos en CD1a y CD80.

Al añadir un estímulo madurativo al medio, como LPS (Figura 8.2), se activaría TLR que a su vez activaría fuertemente NF κ B. En este caso, superado un cierto nivel de activación, ya fuese mediante un cambio conformacional en una de las dos proteínas, la unión de un coactivador a PPAR γ o la supresión de un represor, PPAR γ pasaría a actuar inhibiendo a NF κ B (probablemente para mantener bajo ciertos niveles la respuesta inmune de la DC). El resultado sería una respuesta inmune normal controlada. En cambio, en presencia de DHA, 9cRA o Rosiglitazona, la capacidad activadora de estos compuestos se añadiría a la producida por el estímulo madurativo sobre PPAR γ con lo cual el nivel de activación requerido para la iniciación de la represión de NF κ B se alcanzaría antes, deteniéndose la maduración de la DC inmadura previamente a la finalización normal del proceso. La consecuencia sería una inmunogenicidad atenuada al detener PPAR γ el proceso cuando los niveles de maduración todavía no se hubiesen completado. Para apoyar esta hipótesis se apunta que a bajas concentraciones de 9cRA del orden de 1 nM, se observa una mejora de la inmunogenicidad de la célula dendrítica madura a juzgar por la expresión de CD86, CD83 o CD80 mientras que a 10 nM, el 9cRA provoca ya una respuesta atenuada (Figura 7.8; Tabla 7.6).

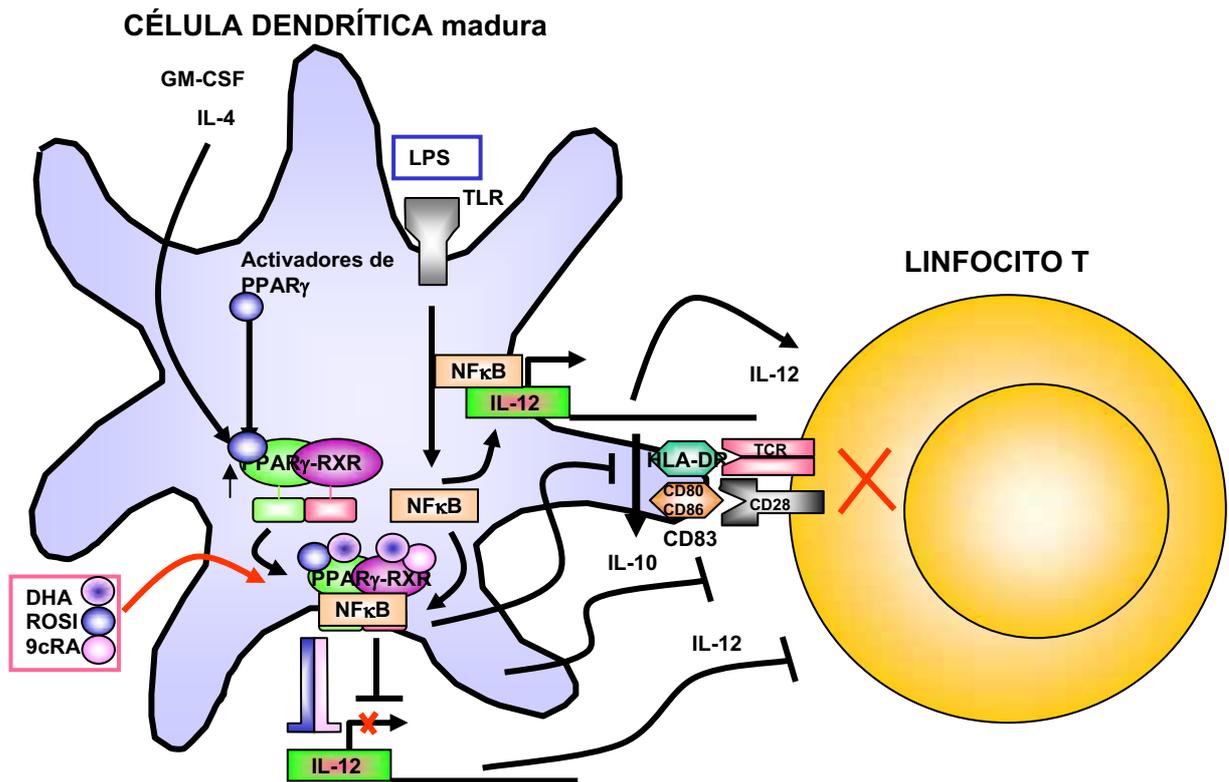


Figura 8.2. Modelo de regulación del proceso madurativo por parte de PPAR γ . LPS, mediante TLR, enviaría una señal fuerte de activación a NF κ B que activaría el proceso de maduración en la DC. Al mismo tiempo la interacción entre NF κ B y PPAR γ activaría a esta última proteína, la cual a partir de ciertos niveles comenzaría a reprimir a su vez a NF κ B hasta conseguir detener el proceso de maduración. En presencia de activadores adicionales de PPAR γ , tales como Rosi, 9cRA o DHA el nivel de activación a partir del cual se produciría la represión de la maduración se daría antes y, por lo tanto, a niveles menores de maduración. Como consecuencia, la expresión de HLA-DR, CD86, CD83 y CD80, la proliferación linfocitaria y la secreción de citocinas tales como IL-12 e IL-10 se encontrarían disminuidas con respecto a los niveles normales de DC madura.

Finalmente, el comportamiento más difícil de explicar en el modelo propuesto y el que plantea más incógnitas, es el del inhibidor covalente específico de PPAR γ GW9662. En presencia de este inhibidor (Figura 8.3) el complejo PPAR γ :RXR no sería activo, por lo que no solo no podría controlar el desarrollo de la respuesta inmune sino que tampoco podría unirse a NF κ B. Esta proteína entonces no sería capaz de llevar a cabo muchos de los procesos de diferenciación necesarios para conseguir la maduración celular. Esto explicaría porque la mayor parte de los cambios que deberían producirse en el fenotipo de la dendrítica al añadir un estímulo madurativo no se producen en presencia del inhibidor GW9662. Al mismo tiempo, otros procesos de maduración celular tales como la secreción de citocinas (IL-12) o procesos desconocidos en los que no interviniese PPAR γ y NF κ B sí tendría lugar y, además, sin posibilidad alguna de quedar sometidos al control de la respuesta inmune por parte de PPAR γ de tal forma que las DCs obtenidas, aunque fenotípicamente inmaduras en apariencia, serían capaces de producir respuestas inmunes potentes. El papel del PPAR γ como regulador natural, ya ha sido observado también por nuestro grupo en la producción de IL-2 y por Robyn Cunard et al. [485] en la de IFN γ en linfocitos, en los que al inhibir PPAR γ con dicho agente la producción de ambas citocinas se eleva por encima de los controles.

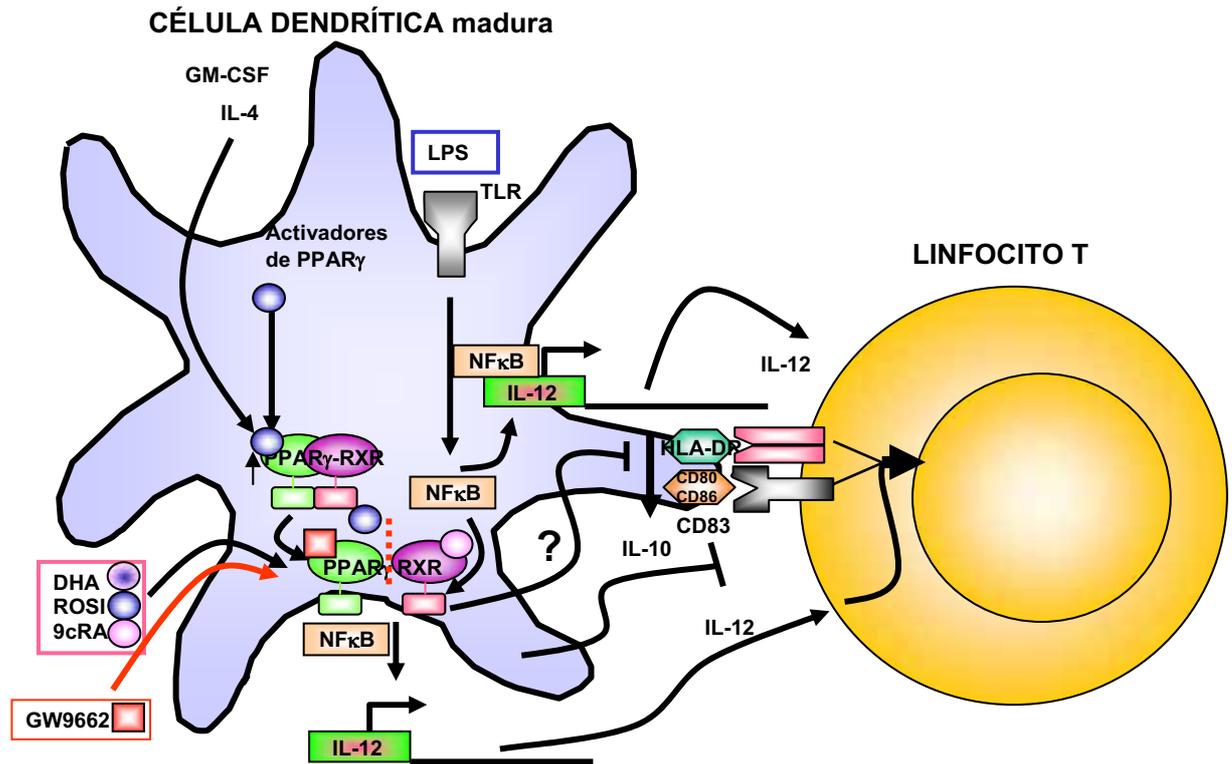


Figura 8.3. Modelo de regulación del proceso madurativo por parte de PPAR γ en presencia de su inhibidor GW9662. En este caso, LPS de nuevo enviaría una fuerte señal de maduración a NF κ B, pero esta vez, al encontrarse inhibida PPAR γ , NF κ B ya no podría activarse con lo cual muchos pasos del proceso de maduración de la DC se encontrarían inhibidos. Otros procesos, bien por ser independientes de NF κ B o porque no dependiesen de la interacción de PPAR γ y NF κ B sí se producirían con lo cual, la respuesta inmune se daría y no podría ser controlada por PPAR γ . Uno de estos procesos sería la secreción de IL-12.

CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en la presente memoria se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. El DHA, el ácido graso omega-3 más largo y más insaturado, es citotóxico e induce apoptosis a las células del sistema inmune a una concentración superior a 50 μ M. Los linfocitos han mostrado más sensibilidad al DHA que las células dendríticas.
2. La presencia de DHA durante el proceso de transformación de monocito a célula dendrítica inmadura induce un fenotipo celular ligeramente más maduro (excepto CD80), mientras que en el proceso madurativo se observa una inhibición del mismo. Otros ácidos grasos insaturados presentan un comportamiento similar, pero cuantitativamente inferior.
3. Las alteraciones fenotípicas provocadas por los PUFAs sobre las células dendríticas tienen como traducción funcional una inhibición de la producción de citocinas por las células dendríticas maduras y de la proliferación linfocitaria autóloga que estas células inducen.
4. Los agonistas de PPAR γ y de RXR ejercen sobre las DCs efectos similares pero no idénticos a los del DHA. Las discrepancias más significativas que se han obtenido con los agonistas de RXR podrían atribuirse a la activación de otras vías de diferenciación. Se obtienen efectos aditivos sobre las DCs mediante la coincubación de ambos agonistas, probablemente por una activación más eficiente del heterodímero PPAR γ :RXR.
5. El DHA actúa sobre las DCs cooperativamente mejor con agonistas de PPAR γ que de RXR, lo que implica que actúa principalmente activando el receptor nuclear RXR del heterodímero PPAR γ :RXR y de forma minoritaria, también es capaz de actuar a través de PPAR γ , ya que el DHA es ligando de PPAR γ y de RXR.
6. La inhibición de la maduración fenotípica y la alteración de la producción de citocinas de la célula dendrítica producida por el inhibidor selectivo de PPAR γ , GW9662, permite afirmar que PPAR γ :RXR juega un papel crucial e indispensable en el desarrollo y regulación del proceso de maduración de la célula dendrítica. Además, posibles mecanismos compensatorios mantienen la capacidad de proliferación linfocitaria inducida por las DCs tratadas.
7. El inhibidor covalente específico de PPAR γ , GW9662, inhibe la actividad de los agonistas tanto de PPAR γ como de RXR y la del DHA, lo que implica que para desarrollar su actividad, estos compuestos necesitan un heterodímero PPAR γ :RXR funcional. En principio, también sugiere en el mecanismo de actuación del DHA una participación muy limitada del homodímero RXR:RXR u otros heterodímeros de RXR independientes de PPAR γ .

BIBLIOGRAFÍA

1. Sigma, www.sigmaaldrich.com. Sigma Aldrich Química, 2004.
2. www.ehu.es/biomoleculas/LIP/LIPID31.htm, Los ácidos grasos y sus derivados, Universidad del País Vasco.
3. Derek, D., *Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry*, Cancer Research UK.
4. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. Chem Phys Lipids, 2003. **126**(1): p. 1-27.
5. Qiu, X., *Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **68**(2): p. 181-6.
6. Alexander, J.W., *Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids*. Nutrition, 1998. **14**(7-8): p. 627-33.
7. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.
8. Valenzuela, A. and M.S. Nieto, *[Docosahexaenoic acid (DHA) in fetal development and in infant nutrition]*. Rev Med Chil, 2001. **129**(10): p. 1203-11.
9. Blanquart, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 267-73.
10. Krey, G., et al., *Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(6): p. 779-91.
11. Daynes, R.A. and D.C. Jones, *Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 748-59.
12. Lehninger, A.L., *Principios de Bioquímica*. 2ª Reimpresión ed. Vol. 1. 1988, Barcelona: Ediciones Omega. 303-310.
13. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development*. Am J Clin Nutr, 1991. **54**(3): p. 438-63.
14. Gill, I. and R. Valivety, *Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(10): p. 401-9.
15. Yongmanitchai, W. and O.P. Ward, *Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(2): p. 419-25.
16. Rattedge, C., *Single cell oils--have they a biotechnological future?* Trends Biotechnol, 1993. **11**(7): p. 278-84.
17. Grammatikos, S.I., et al., *Diversity in the ability of cultured cells to elongate and desaturate essential (n-6 and n-3) fatty acids*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **745**: p. 92-105.
18. Gawrisch, K., N.V. Eldho, and L.L. Holte, *The structure of DHA in phospholipid membranes*. Lipids, 2003. **38**(4): p. 445-52.
19. Grammatikos, S.I., et al., *Diverse effects of essential (n-6 and n-3) fatty acids on cultured cells*. Cytotechnology, 1994. **15**(1-3): p. 31-50.
20. Suchner, U. and U. Senthleben, *[Effect of polyunsaturated fatty acids on immune status: importance as structural and mediator building blocks]*. Infusionsther Transfusionsmed, 1994. **21**(1): p. 59-70.
21. Clarke, S.D., *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance*. Br J Nutr, 2000. **83 Suppl 1**: p. S59-66.
22. Clarke, S.D., *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome*. J Nutr, 2001. **131**(4): p. 1129-32.
23. Clarke, S.D., et al., *Fatty acid regulation of gene expression. Its role in fuel partitioning and insulin resistance*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **827**: p. 178-87.
24. Clarke, S.D. and D.B. Jump, *Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription*. Lipids, 1996. **31 Suppl**: p. S7-11.
25. Baillie, R.A., D.B. Jump, and S.D. Clarke, *Specific effects of polyunsaturated fatty acids on gene expression*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(1): p. 53-5.
26. Jump, D.B., *Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(2): p. 155-64.
27. Jump, D.B. and S.D. Clarke, *Regulation of gene expression by dietary fat*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 63-90.
28. Jump, D.B., et al., *Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription*. Prog Lipid Res, 1996. **35**(3): p. 227-41.

Bibliografía

29. Jump, D.B., et al., *Dietary fat, genes, and human health*. Adv Exp Med Biol, 1997. **422**: p. 167-76.
30. Suchner, U. and U. Senftleben, *Immune modulation by polyunsaturated fatty acids during nutritional therapy: interactions with synthesis and effects of eicosanoids*. Infusionsther Transfusionsmed, 1994. **21**(3): p. 167-82.
31. Hamberg, M., *Pathways in the biosynthesis of oxylipins in plants*. J Lipid Mediat, 1993. **6**(1-3): p. 375-84.
32. Rosahl, S., *Lipoxygenases in plants--their role in development and stress response*. Z Naturforsch [C], 1996. **51**(3-4): p. 123-38.
33. Gill, I. and R. Valivety, *Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(11): p. 470-8.
34. Hansen, J.B., et al., *Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on fatty acid absorption, incorporation into serum phospholipids and postprandial triglyceridemia*. Lipids, 1998. **33**(2): p. 131-8.
35. Conquer, J.A. and B.J. Holub, *Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores*. Lipids, 1997. **32**(3): p. 341-5.
36. Sprecher, H., et al., *Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids*. J Lipid Res, 1995. **36**(12): p. 2471-7.
37. Horrocks, L.A. and Y.K. Yeo, *Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA)*. Pharmacol Res, 1999. **40**(3): p. 211-25.
38. Burr, G.O. and M.M. Burr, *Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet*. Nutr Rev, 1973. **31**(8): p. 248-9.
39. Neuringer, M., G.J. Anderson, and W.E. Connor, *The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain*. Annu Rev Nutr, 1988. **8**: p. 517-41.
40. Connor, W.E., M. Neuringer, and S. Reisbick, *Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain*. Nutr Rev, 1992. **50**(4 (Pt 2)): p. 21-9.
41. Holman, R.T., S.B. Johnson, and T.F. Hatch, *A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities*. Am J Clin Nutr, 1982. **35**(3): p. 617-23.
42. Holman, R.T. and S.B. Johnson, *Linolenic acid deficiency in man*. Nutr Rev, 1982. **40**(5): p. 144-7.
43. Raper, N.R., F.J. Cronin, and J. Exler, *Omega-3 fatty acid content of the US food supply*. J Am Coll Nutr, 1992. **11**(3): p. 304-8.
44. Okuyama, H. *Recommended LNA/LA ratio for the prevention of chronic, elderly diseases*. in *88th AOCs Annual Meeting and Expo*. 1997.
45. FAO/WHO, *Report, fats and oils in human nutrition*. 1993, Food and Agricultural Organization of the United Nations: Rome. p. 49-55.
46. Salem, N., Jr., et al., *Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 945-59.
47. Jeffrey, B.G., et al., *The role of docosahexaenoic acid in retinal function*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 859-71.
48. Neuringer, M. and W.E. Connor, *n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality*. Nutr Rev, 1986. **44**(9): p. 285-94.
49. Fliesler, S.J. and R.E. Anderson, *Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina*. Prog Lipid Res, 1983. **22**(2): p. 79-131.
50. Daemen, F.J., *Vertebrate rod outer segment membranes*. Biochim Biophys Acta, 1973. **300**(3): p. 255-88.
51. Anderson, R.E., et al., *Conservation of docosahexaenoic acid in the retina*. Adv Exp Med Biol, 1992. **318**: p. 285-94.
52. Bazan, N.G., W.C. Gordon, and E.B. Rodriguez de Turco, *Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process*. Adv Exp Med Biol, 1992. **318**: p. 295-306.
53. Wiegand, R.D., et al., *Conservation of docosahexaenoic acid in rod outer segments of rat retina during n-3 and n-6 fatty acid deficiency*. J Neurochem, 1991. **57**(5): p. 1690-9.
54. Stinson, A.M., R.D. Wiegand, and R.E. Anderson, *Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency*. J Lipid Res, 1991. **32**(12): p. 2009-17.
55. Anderson, G.J., W.E. Connor, and J.D. Corliss, *Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina*. Pediatr Res, 1990. **27**(1): p. 89-97.

56. Makrides, M., et al., *Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy, term infants*. *Pediatr Res*, 1993. **33**(4 Pt 1): p. 425-7.
57. Connor, W.E., M. Neuringer, and D.S. Lin, *Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys*. *J Lipid Res*, 1990. **31**(2): p. 237-47.
58. Dorn, E.M., L. Hendrickson, and A.E. Hendrickson, *The appearance of rod opsin during monkey retinal development*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. **36**(13): p. 2634-51.
59. Weisinger, H.S., et al., *Retinal sensitivity loss in third-generation n-3 PUFA-deficient rats*. *Lipids*, 2002. **37**(8): p. 759-65.
60. Neuringer, M., *Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(1 Suppl): p. 256S-67S.
61. Tinoco, J., *Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals*. *Prog Lipid Res*, 1982. **21**(1): p. 1-45.
62. Neuringer, M., et al., *Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(11): p. 4021-5.
63. Connor, W.E. and M. Neuringer, *The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina*. *Prog Clin Biol Res*, 1988. **282**: p. 275-94.
64. Pawlosky, R.J., et al., *Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing felines: the effects of corn oil-based maternal diets*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **65**(2): p. 465-72.
65. Moriguchi, T., R.S. Greiner, and N. Salem, Jr., *Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration*. *J Neurochem*, 2000. **75**(6): p. 2563-73.
66. Greiner, R.S., et al., *Rats with low levels of brain docosahexaenoic acid show impaired performance in olfactory-based and spatial learning tasks*. *Lipids*, 1999. **34 Suppl**: p. S239-43.
67. Weisinger, H.S., A.J. Vingrys, and A.J. Sinclair, *The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig*. *Lipids*, 1996. **31**(1): p. 65-70.
68. Weisinger, H.S., A.J. Vingrys, and A.J. Sinclair, *Effect of dietary n-3 deficiency on the electroretinogram in the guinea pig*. *Ann Nutr Metab*, 1996. **40**(2): p. 91-8.
69. Wainwright, P.E., et al., *The role of n-3 essential fatty acids in brain and behavioral development: a cross-fostering study in the mouse*. *Lipids*, 1991. **26**(1): p. 37-45.
70. Nakashima, Y., et al., *Effect of a high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice*. *J Lipid Res*, 1993. **34**(2): p. 239-47.
71. Enslin, M., H. Milon, and A. Malnoe, *Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats*. *Lipids*, 1991. **26**(3): p. 203-8.
72. Bourre, J.M., et al., *The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats*. *J Nutr*, 1989. **119**(12): p. 1880-92.
73. Yamamoto, N., et al., *Effects of a high-linoleate and a high-alpha-linolenate diet on the learning ability of aged rats. Evidence against an autoxidation-related lipid peroxide theory of aging*. *J Gerontol*, 1991. **46**(1): p. B17-22.
74. Wheeler, T.G., R.M. Benolken, and R.E. Anderson, *Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination*. *Science*, 1975. **188**(4195): p. 1312-4.
75. Gibson, R.A., M.A. Neumann, and M. Makrides, *Effect of dietary docosahexaenoic acid on brain composition and neural function in term infants*. *Lipids*, 1996. **31 Suppl**: p. S177-81.
76. Jamieson, E.C., et al., *Infant cerebellar gray and white matter fatty acids in relation to age and diet*. *Lipids*, 1999. **34**(10): p. 1065-71.
77. Makrides, M., et al., *Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants*. *Am J Clin Nutr*, 1994. **60**(2): p. 189-94.
78. Farquharson, J., et al., *Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet*. *Lancet*, 1992. **340**(8823): p. 810-3.
79. Heinonen, E.H., et al., *Effects of monoamine oxidase inhibition by selegiline on concentrations of noradrenaline and monoamine metabolites in CSF of patients with Alzheimer's disease*. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 1993. **5**(3): p. 193-202.
80. Farquharson, J., et al., *Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex*. *Arch Dis Child*, 1995. **72**(3): p. 198-203.

Bibliografía

81. Makrides, M., R.A. Gibson, and K. Simmer, *The effect of dietary fat on the developing brain*. J Paediatr Child Health, 1993. **29**(6): p. 409-10.
82. Sauerwald, T.U., H. Demmelair, and B. Koletzko, *Polyunsaturated fatty acid supply with human milk*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 991-6.
83. Jensen, C.L., et al., *Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 292S-9S.
84. Putnam, J.C., et al., *The effect of variations in dietary fatty acids on the fatty acid composition of erythrocyte phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human infants*. Am J Clin Nutr, 1982. **36**(1): p. 106-14.
85. Ruan, C., et al., *Milk composition in women from five different regions of China: the great diversity of milk fatty acids*. J Nutr, 1995. **125**(12): p. 2993-8.
86. Innis, S.M. and H.V. Kuhnlein, *Long-chain n-3 fatty acids in breast milk of Inuit women consuming traditional foods*. Early Hum Dev, 1988. **18**(2-3): p. 185-9.
87. Francois, C.A., et al., *Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(2): p. 301-8.
88. Kim, H.Y., L. Edsall, and Y.C. Ma, *Specificity of polyunsaturated fatty acid release from rat brain synaptosomes*. Lipids, 1996. **31** Suppl: p. S229-33.
89. Kim, H.Y. and L. Edsall, *The role of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in neuronal signaling*. Lipids, 1999. **34** Suppl: p. S249-50.
90. Kim, H.Y., et al., *The release of polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenation in the brain*. Adv Exp Med Biol, 1999. **447**: p. 75-85.
91. Garcia, M.C. and H.Y. Kim, *Mobilization of arachidonate and docosahexaenoate by stimulation of the 5-HT_{2A} receptor in rat C6 glioma cells*. Brain Res, 1997. **768**(1-2): p. 43-8.
92. Delton-Vandenbroucke, I., P. Grammas, and R.E. Anderson, *Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells*. J Lipid Res, 1997. **38**(1): p. 147-59.
93. Moore, S.A., *Cerebral endothelium and astrocytes cooperate in supplying docosahexaenoic acid to neurons*. Adv Exp Med Biol, 1993. **331**: p. 229-33.
94. O'Brien, J.S. and E.L. Sampson, *Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin*. J Lipid Res, 1965. **6**(4): p. 545-51.
95. Svennerholm, L., *Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain*. J Lipid Res, 1968. **9**(5): p. 570-9.
96. Yabuuchi, H. and J.S. O'Brien, *Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter*. J Lipid Res, 1968. **9**(1): p. 65-7.
97. Hitzemann, R., *Developmental changes in the fatty acids of synaptic membrane phospholipids: effect of protein malnutrition*. Neurochem Res, 1981. **6**(9): p. 935-47.
98. Mosior, M. and A.C. Newton, *Mechanism of the apparent cooperativity in the interaction of protein kinase C with phosphatidylserine*. Biochemistry, 1998. **37**(49): p. 17271-9.
99. Ghosh, S., et al., *Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 8472-80.
100. Leever, S.J., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane*. Nature, 1994. **369**(6479): p. 411-4.
101. Sampson, P.D., et al., *Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: Part II. Partial least squares analysis*. Neurotoxicol Teratol, 1989. **11**(5): p. 477-91.
102. Streissguth, A.P., et al., *Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: Part I. Research strategy*. Neurotoxicol Teratol, 1989. **11**(5): p. 461-76.
103. Streissguth, A.P., et al., *Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: Part III. PLS analyses of neuropsychologic tests*. Neurotoxicol Teratol, 1989. **11**(5): p. 493-507.
104. Jones, K.L. and D.W. Smith, *Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy*. Lancet, 1973. **2**(7836): p. 999-1001.
105. Jones, K.L., et al., *Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers*. Lancet, 1973. **1**(7815): p. 1267-71.
106. Henderson, G.I., et al., *Fetal alcohol syndrome: overview of pathogenesis*. Neurobehav Toxicol Teratol, 1981. **3**(2): p. 73-80.

107. Flores-Huerta, S., et al., *Effects of ethanol consumption during pregnancy and lactation on the outcome and postnatal growth of the offspring*. *Ann Nutr Metab*, 1992. **36**(3): p. 121-8.
108. Burdge, G.C., *The role of docosahexaenoic acid in brain development and fetal alcohol syndrome*. *Biochem Soc Trans*, 1998. **26**(2): p. 246-52.
109. Burdge, G.C. and A.D. Postle, *Effect of maternal ethanol consumption during pregnancy on the phospholipid molecular species composition of fetal guinea-pig brain, liver and plasma*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1256**(3): p. 346-52.
110. Stevens, L.J., et al., *Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hyperactivity disorder*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(4): p. 761-8.
111. Martinez, M. and E. Vazquez, *MRI evidence that docosahexaenoic acid ethyl ester improves myelination in generalized peroxisomal disorders*. *Neurology*, 1998. **51**(1): p. 26-32.
112. Roulet, M., et al., *Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients*. *Eur J Pediatr*, 1997. **156**(12): p. 952-6.
113. Sanjurjo, P., J.I. Ruiz, and M. Montejo, *Inborn errors of metabolism with a protein-restricted diet: effect on polyunsaturated fatty acids*. *J Inher Metab Dis*, 1997. **20**(6): p. 783-9.
114. Hamazaki, T., et al., *Anti-stress effects of DHA*. *Biofactors*, 2000. **13**(1-4): p. 41-5.
115. Hamazaki, T., et al., *Effect of docosahexaenoic acid on hostility*. *World Rev Nutr Diet*, 2001. **88**: p. 47-52.
116. Kalmijn, S., et al., *Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men*. *Am J Epidemiol*, 1997. **145**(1): p. 33-41.
117. Grant, W.B., *Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update*. *J Alzheimers Dis*, 1999. **1**(4-5): p. 197-201.
118. Nair, S.S., et al., *Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action*. *J Nutr*, 1997. **127**(3): p. 383-93.
119. Grimsgaard, S., et al., *Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hemodynamics in humans*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(1): p. 52-9.
120. Terano, T., et al., *Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit DNA synthesis through inhibiting cdk2 kinase in vascular smooth muscle cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **811**: p. 369-77.
121. Hirafuji, M., et al., *Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid*. *J Pharmacol Sci*, 2003. **92**(4): p. 308-16.
122. Nieuwenhuys, C.M. and G. Hornstra, *The effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on arterial thrombosis tendency and platelet function in rats*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1390**(3): p. 313-22.
123. Freese, R. and M. Mutanen, *Alpha-linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(3): p. 591-8.
124. Ghosh, J. and C.E. Myers, *Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **235**(2): p. 418-23.
125. Rose, D.P., et al., *Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(8): p. 587-92.
126. Calviello, G., et al., *Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids dietary supplementation on cell proliferation and apoptosis in rat colonic mucosa*. *Lipids*, 1999. **34** **Suppl**: p. S111.
127. Calviello, G., et al., *Cell proliferation, differentiation, and apoptosis are modified by n-3 polyunsaturated fatty acids in normal colonic mucosa*. *Lipids*, 1999. **34**(6): p. 599-604.
128. Latham, P., E.K. Lund, and I.T. Johnson, *Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(4): p. 645-50.
129. Chen, Z.Y. and N.W. Istan, *Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000. **63**(5): p. 301-8.
130. Chen, Z.Y. and N.W. Istan, *Docosahexaenoic acid, a major constituent of fish oil diets, prevents activation of cyclin-dependent kinases and S-phase entry by serum stimulation in HT-29 cells*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2001. **64**(1): p. 67-73.
131. Narayanan, B.A., N.K. Narayanan, and B.S. Reddy, *Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells*. *Int J Oncol*, 2001. **19**(6): p. 1255-62.

Bibliografía

132. Calviello, G., et al., *Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(5): p. 699-705.
133. Connolly, J.M., E.M. Gilhooly, and D.P. Rose, *Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid, on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice*. *Nutr Cancer*, 1999. **35**(1): p. 44-9.
134. Hardman, W.E., et al., *Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(7): p. 2041-9.
135. Germain, E., et al., *Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(4): p. 578-83.
136. Ogilvie, G.K., et al., *Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study*. *Cancer*, 2000. **88**(8): p. 1916-28.
137. Norrish, A.E., et al., *Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based case-control study*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(7): p. 1238-42.
138. Noguchi, M., et al., *Chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats by low-dose EPA and DHA*. *Br J Cancer*, 1997. **75**(3): p. 348-53.
139. Rudra, P.K. and H.E. Krokan, *Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid sensitive- and resistant human tumor cells*. *Anticancer Res*, 1999. **19**(1A): p. 461-9.
140. Colquhoun, A., *Induction of apoptosis by polyunsaturated fatty acids and its relationship to fatty acid inhibition of carnitine palmitoyltransferase I activity in Hep2 cells*. *Biochem Mol Biol Int*, 1998. **45**(2): p. 331-6.
141. Hawkins, R.A., K. Sangster, and M.J. Arends, *Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism*. *J Pathol*, 1998. **185**(1): p. 61-70.
142. Timmer-Bosscha, H., et al., *Differential effects of all-trans-retinoic acid, docosahexaenoic acid, and hexadecylphosphocholine on cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in a cisplatin-sensitive and resistant human embryonal carcinoma cell line*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998. **41**(6): p. 469-76.
143. Albino, A.P., et al., *Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4139-45.
144. Siddiqui, R.A., et al., *Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1499**(3): p. 265-75.
145. Siddiqui, R.A., et al., *Prevention of docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity by phosphatidic acid in Jurkat leukemic cells: the role of protein phosphatase-1*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1541**(3): p. 188-200.
146. Lima, T.M., et al., *Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis*. *Toxicol In Vitro*, 2002. **16**(6): p. 741-7.
147. Nakamura, N., et al., *The effect of oral administration of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on acute inflammation and fatty acid composition in rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1994. **40**(2): p. 161-70.
148. Ernst, E., G.L. Nielsen, and E.B. Schmidt, *[Fish oils and rheumatoid arthritis]*. *Ugeskr Laeger*, 1994. **156**(23): p. 3490-5.
149. Ergas, D., et al., *n-3 fatty acids and the immune system in autoimmunity*. *Isr Med Assoc J*, 2002. **4**(1): p. 34-8.
150. Faarvang, K.L., et al., *[Fish oils and rheumatoid arthritis. A randomized and double-blind study]*. *Ugeskr Laeger*, 1994. **156**(23): p. 3495-8.
151. Yamada, N., et al., *Changes in blood coagulation, platelet aggregation, and lipid metabolism in rats given lipids containing docosahexaenoic acid*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997. **61**(9): p. 1454-8.
152. Wu, D. and S.N. Meydani, *n-3 polyunsaturated fatty acids and immune function*. *Proc Nutr Soc*, 1998. **57**(4): p. 503-9.
153. Comstock, G.W., S.H. Ferebee, and L.M. Hammes, *A controlled trial of community-wide isoniazid prophylaxis in Alaska*. *Am Rev Respir Dis*, 1967. **95**(6): p. 935-43.
154. Hildes, J.A. and O. Schaefer, *The changing picture of neoplastic disease in the western and central Canadian Arctic (1950-1980)*. *Can Med Assoc J*, 1984. **130**(1): p. 25-32.

155. Meydani, S.N., et al., *Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 105-13.
156. Chang, H.R., et al., *Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with Salmonella typhimurium*. Metabolism, 1992. **41**(1): p. 1-2.
157. Fritsche, K.L., C. Feng, and J.N. Berg, *Dietary fish oil enhances circulating interferon-gamma in mice during listeriosis without altering in vitro production of this cytokine*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(5): p. 271-7.
158. Fritsche, K.L., et al., *Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/Hen mice challenged with Listeria monocytogenes*. Clin Sci (Lond), 1997. **92**(1): p. 95-101.
159. Byleveld, P.M., et al., *Fish oil feeding delays influenza virus clearance and impairs production of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin A in the lungs of mice*. J Nutr, 1999. **129**(2): p. 328-35.
160. Calder, P.C., et al., *Fatty acids and lymphocyte functions*. Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 1**: p. S31-48.
161. Hwang, D., *Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 431-56.
162. Calder, P.C., et al., *Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes*. Int J Biochem, 1991. **23**(5-6): p. 579-88.
163. Zerouga, M., et al., *Phospholipid class as a determinant in docosahexaenoic acid's effect on tumor cell viability*. Anticancer Res, 1996. **16**(5A): p. 2863-8.
164. Stillwell, W., et al., *Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties*. Lipids, 1997. **32**(5): p. 497-506.
165. Tahin, Q.S., M. Blum, and E. Carafoli, *The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications*. Eur J Biochem, 1981. **121**(1): p. 5-13.
166. Obermeier, H., N. Hrboticky, and A. Sellmayer, *Differential effects of polyunsaturated fatty acids on cell growth and differentiation of premonocytic U937 cells*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1266**(2): p. 179-85.
167. Knapp, H.R., F. Hullin, and N. Salem, Jr., *Asymmetric incorporation of dietary n-3 fatty acids into membrane aminophospholipids of human erythrocytes*. J Lipid Res, 1994. **35**(7): p. 1283-91.
168. Breckenridge, W.C., G. Gombos, and I.G. Morgan, *The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes*. Biochim Biophys Acta, 1972. **266**(3): p. 695-707.
169. Neill, A.R. and C.J. Masters, *Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa*. J Reprod Fertil, 1973. **34**(2): p. 279-87.
170. Wiegand, R.D. and R.E. Anderson, *Phospholipid molecular species of frog rod outer segment membranes*. Exp Eye Res, 1983. **37**(2): p. 159-73.
171. Salem, N., Jr., *Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism*. 1986, New York: Academic Press. 319-351.
172. Miljanich, G.P., et al., *Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane*. Biochim Biophys Acta, 1979. **552**(2): p. 294-306.
173. Bell, M.V., J.R. Dick, and C. Buda, *Molecular speciation of fish sperm phospholipids: large amounts of dipolyunsaturated phosphatidylserine*. Lipids, 1997. **32**(10): p. 1085-91.
174. VanMeter, A.R., et al., *Aged lymphocyte proliferation following incorporation and retention of dietary omega-3 fatty acids*. Mech Ageing Dev, 1994. **75**(2): p. 95-114.
175. Robinson, D.R., et al., *Modification of spleen phospholipid fatty acid composition by dietary fish oil and by n-3 fatty acid ethyl esters*. J Lipid Res, 1993. **34**(8): p. 1423-34.
176. Benolken, R.M., R.E. Anderson, and T.G. Wheeler, *Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation*. Science, 1973. **182**(118): p. 1253-4.
177. Bazan, H.E., et al., *Lipids in human lipofuscin-enriched subcellular fractions of two age populations. Comparison with rod outer segments and neural retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(8): p. 1433-43.
178. Mitchell, D.C., M. Straume, and B.J. Litman, *Role of sn-1-saturated,sn-2-polyunsaturated phospholipids in control of membrane receptor conformational equilibrium: effects of cholesterol and acyl chain unsaturation on the metarhodopsin I in equilibrium with metarhodopsin II equilibrium*. Biochemistry, 1992. **31**(3): p. 662-70.
179. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 885-95.
180. Petrache, H.I., A. Salmon, and M.F. Brown, *Structural properties of docosahexaenoyl phospholipid bilayers investigated by solid-state 2H NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(50): p. 12611-22.

Bibliografía

181. Huber, T., et al., *Structure of docosahexaenoic acid-containing phospholipid bilayers as studied by (2)H NMR and molecular dynamics simulations*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(2): p. 298-309.
182. Saiz, L. and M.L. Klein, *Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations*. Biophys J, 2001. **81**(1): p. 204-16.
183. Kamada, T., et al., *Dietary sardine oil increases erythrocyte membrane fluidity in diabetic patients*. Diabetes, 1986. **35**(5): p. 604-11.
184. Daveloose, D., et al., *Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1166**(2-3): p. 229-37.
185. Ehringer, W., et al., *A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers*. Chem Phys Lipids, 1990. **54**(2): p. 79-88.
186. Huster, D., K. Arnold, and K. Gawrisch, *Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures*. Biochemistry, 1998. **37**(49): p. 17299-308.
187. Ahkong, Q.F., et al., *The fusion of erythrocytes by fatty acids, esters, retinol and alpha-tocopherol*. Biochem J, 1973. **136**(1): p. 147-55.
188. Meers, P., K. Hong, and D. Papahadjopoulos, *Free fatty acid enhancement of cation-induced fusion of liposomes: synergism with synexin and other promoters of vesicle aggregation*. Biochemistry, 1988. **27**(18): p. 6784-94.
189. Armstrong, V.T., et al., *Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes*. Arch Biochem Biophys, 2003. **414**(1): p. 74-82.
190. Mitchell, D.C., S.L. Niu, and B.J. Litman, *Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 42801-6.
191. Niu, S.L., D.C. Mitchell, and B.J. Litman, *Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition II: formation of metarhodopsin II-transducin complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 42807-11.
192. Slater, S.J., et al., *The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4866-71.
193. Poling, J.S., et al., *Time- and voltage-dependent block of delayed rectifier potassium channels by docosahexaenoic acid*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(2): p. 381-90.
194. Honore, E., et al., *External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1937-41.
195. Xiao, Y.F., et al., *Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11000-4.
196. Xiao, Y.F., et al., *Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4182-7.
197. Hasler, C.M., M.R. Bennink, and J.E. Trosko, *Inhibition of gap junction-mediated intercellular communication by alpha-linolenate*. Am J Physiol, 1991. **261**(1 Pt 1): p. C161-8.
198. Pepe, S., et al., *Omega 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca²⁺ channels, cytosolic Ca²⁺, and contraction in adult rat cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8832-6.
199. Lundbaek, J.A., A.M. Maer, and O.S. Andersen, *Lipid bilayer electrostatic energy, curvature stress, and assembly of gramicidin channels*. Biochemistry, 1997. **36**(19): p. 5695-701.
200. Martin, D. and K.A. Meckling-Gill, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase purine but not pyrimidine transport in L1210 leukaemia cells*. Biochem J, 1996. **315** (Pt 1): p. 329-33.
201. Jenski, L.J., et al., *Omega-3 fatty acid modification of membrane structure and function. I. Dietary manipulation of tumor cell susceptibility to cell- and complement-mediated lysis*. Nutr Cancer, 1993. **19**(2): p. 135-46.
202. Pascale, A.W., et al., *Omega-3 fatty acid modification of membrane structure and function. II. Alteration by docosahexaenoic acid of tumor cell sensitivity to immune cytotoxicity*. Nutr Cancer, 1993. **19**(2): p. 147-57.
203. Jenski, L.J., et al., *Docosahexaenoic acid-induced alteration of Thy-1 and CD8 expression on murine splenocytes*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1236**(1): p. 39-50.
204. Hamazaki, K., et al., *n-3 long-chain FA decrease serum levels of TG and remnant-like particle-cholesterol in humans*. Lipids, 2003. **38**(4): p. 353-8.

205. Arrington, J.L., et al., *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(3): p. 499-507.
206. Miles, E.A. and P.C. Calder, *Modulation of immune function by dietary fatty acids*. Proc Nutr Soc, 1998. **57**(2): p. 277-92.
207. Calder, P.C., *N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic*. Lipids, 2003. **38**(4): p. 343-52.
208. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 1007-24.
209. Tapiero, H., et al., *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(5): p. 215-22.
210. Kromann, N. and A. Green, *Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974*. Acta Med Scand, 1980. **208**(5): p. 401-6.
211. Chen, H.W., et al., *Blood pressure-lowering effect of fish oil is independent of thromboxane A2 level in spontaneously hypertensive rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996. **54**(2): p. 147-54.
212. Mori, T.A., et al., *Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans*. Hypertension, 1999. **34**(2): p. 253-60.
213. Prisco, D., et al., *Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients*. Thromb Res, 1998. **91**(3): p. 105-12.
214. Frenoux, J.M., et al., *A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats*. J Nutr, 2001. **131**(1): p. 39-45.
215. Furst, P. and K.S. Kuhn, *Fish oil emulsions: what benefits can they bring?* Clin Nutr, 2000. **19**(1): p. 7-14.
216. Calder, P.C. and R.F. Grimble, *Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity*. Eur J Clin Nutr, 2002. **56 Suppl 3**: p. S14-9.
217. Calder, P.C., *omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity*. World Rev Nutr Diet, 2001. **88**: p. 109-16.
218. Laudet, V., et al., *Evolution of the nuclear receptor gene superfamily*. Embo J, 1992. **11**(3): p. 1003-13.
219. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 649-88.
220. Knoll, A.H., *The early evolution of eukaryotes: a geological perspective*. Science, 1992. **256**(5057): p. 622-7.
221. Xing, G., et al., *Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(3): p. 1015-25.
222. Issemann, I. and S. Green, *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*. Nature, 1990. **347**(6294): p. 645-50.
223. Chen, F., S.W. Law, and B.W. O'Malley, *Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(2): p. 671-7.
224. Zhu, Y., et al., *Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 26817-20.
225. Kliewer, S.A., et al., *Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7355-9.
226. Amri, E.Z., et al., *Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors*. J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2367-71.
227. Gottlicher, M., et al., *Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4653-7.
228. Aperlo, C., et al., *cDNA cloning and characterization of the transcriptional activities of the hamster peroxisome proliferator-activated receptor haPPAR gamma*. Gene, 1995. **162**(2): p. 297-302.
229. Schmidt, A., et al., *Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(10): p. 1634-41.
230. Sher, T., et al., *cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor*. Biochemistry, 1993. **32**(21): p. 5598-604.
231. Greene, M.E., et al., *Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping*. Gene Expr, 1995. **4**(4-5): p. 281-99.
232. Dreyer, C., et al., *Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors*. Cell, 1992. **68**(5): p. 879-87.

Bibliografía

233. Kliewer, S.A., et al., *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors*. Nature, 1992. **358**(6389): p. 771-4.
234. Wagner, R.L., et al., *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 690-7.
235. Xu, H.E., et al., *Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 397-403.
236. Willson, T.M. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptor agonists*. Curr Opin Chem Biol, 1997. **1**(2): p. 235-41.
237. Johnson, T.E., et al., *Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **63**(1-3): p. 1-8.
238. Kliewer, S.A., et al., *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4318-23.
239. Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans, *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4312-7.
240. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
241. Berger, J., et al., *Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice*. Endocrinology, 1996. **137**(10): p. 4189-95.
242. Shao, D., et al., *Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma*. Nature, 1998. **396**(6709): p. 377-80.
243. Mukherjee, R., et al., *Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists*. Nature, 1997. **386**(6623): p. 407-10.
244. Forman, B.M., et al., *Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors*. Cell, 1995. **81**(4): p. 541-50.
245. Perlmann, T. and L. Jansson, *A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1*. Genes Dev, 1995. **9**(7): p. 769-82.
246. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
247. Kersten, S., et al., *Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8645-9.
248. Dong, D. and N. Noy, *Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties*. Biochemistry, 1998. **37**(30): p. 10691-700.
249. Mangelsdorf, D.J., et al., *A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR*. Cell, 1991. **66**(3): p. 555-61.
250. Nakshatri, H. and P. Chambon, *The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 890-902.
251. Zamir, I., J. Zhang, and M.A. Lazar, *Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors*. Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 835-46.
252. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1354-7.
253. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
254. Krey, G., A. Mahfoudi, and W. Wahli, *Functional interactions of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and Sp1 in the transcriptional regulation of the acyl-coenzyme-A oxidase promoter*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(2): p. 219-31.
255. Koeffler, H.P., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 1-9.
256. Gosset, P., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 2857-65.
257. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.

258. Tontonoz, P., et al., *mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer*. Genes Dev, 1994. **8**(10): p. 1224-34.
259. Schoonjans, K., et al., *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene*. Embo J, 1996. **15**(19): p. 5336-48.
260. Chawla, A., et al., *PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 48-52.
261. Jiang, C., A.T. Ting, and B. Seed, *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 82-6.
262. Li, M., G. Pascual, and C.K. Glass, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4699-707.
263. Marx, N., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6503-8.
264. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
265. Gurnell, M., et al., *A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5754-9.
266. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37731-4.
267. Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
268. Braissant, O., et al., *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat*. Endocrinology, 1996. **137**(1): p. 354-66.
269. Vidal-Puig, A.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2416-22.
270. Saladin, R., et al., *Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(1): p. 43-8.
271. Adams, M., et al., *Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3149-53.
272. Gurnell, M., et al., *The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2412-21.
273. Hsueh, W.A. and R. Law, *The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2003. **92**(4A): p. 3J-9J.
274. Napoli, J.L., *Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(3 Pt 2): p. S52-62.
275. Horst, R.L., et al., *Identification of 9-cis,13-cis-retinoic acid as a major circulating retinoid in plasma*. Biochemistry, 1995. **34**(4): p. 1203-9.
276. Giguere, V., *Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling*. Endocr Rev, 1994. **15**(1): p. 61-79.
277. Mangelsdorf, D.J., *Vitamin A receptors*. Nutr Rev, 1994. **52**(2 Pt 2): p. S32-44.
278. Chambon, P., *The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway*. Gene, 1993. **135**(1-2): p. 223-8.
279. Zhang, X.K., et al., *Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 441-6.
280. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. FASEB J, 1996. **10**(9): p. 940-54.
281. Minucci, S., et al., *Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 644-55.
282. Vivat, V., et al., *A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers*. Embo J, 1997. **16**(18): p. 5697-709.
283. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.

Bibliografía

284. Pierre, P., et al., *Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 787-92.
285. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
286. Inaba, K., et al., *The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli*. J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 927-36.
287. Turley, S.J., et al., *Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells*. Science, 2000. **288**(5465): p. 522-7.
288. Fortsch, D., M. Rollinghoff, and S. Stenger, *IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 978-87.
289. Rescigno, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells*. J Clin Immunol, 2000. **20**(3): p. 161-6.
290. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
291. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
292. Cutler, C.W., R. Jotwani, and B. Pulendran, *Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel?* Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4703-8.
293. Kaisho, T. and S. Akira, *Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 78-83.
294. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
295. Rodriguez, A., et al., *Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 362-8.
296. Stenger, S., et al., *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science, 1998. **282**(5386): p. 121-5.
297. Stenger, S., et al., *Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1684-7.
298. Jullien, D., et al., *CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells*. J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2071-4.
299. Strunk, D., et al., *A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1131-6.
300. Ito, T., et al., *A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1409-19.
301. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1458-70.
302. Liu, Y.J., et al., *Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 585-9.
303. Spits, H., et al., *Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1775-84.
304. Bendriss-Vermare, N., et al., *Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 835-44.
305. Risoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
306. Shortman, K., *Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(2): p. 161-5.
307. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
308. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Regulation of T cell immunity by dendritic cells*. Cell, 2001. **106**(3): p. 263-6.
309. Dustin, M.L. and J.A. Cooper, *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 23-9.

310. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 487-92.
311. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
312. Schulz, O., et al., *CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 453-62.
313. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
314. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
315. Huang, F.P., et al., *A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 435-44.
316. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 47-64.
317. Inaba, K., et al., *Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2163-73.
318. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.
319. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 305-10.
320. Fazekas de St Groth, B., *DCs and peripheral T cell tolerance*. Semin Immunol, 2001. **13**(5): p. 311-22.
321. Ashton-Rickardt, P.G., et al., *Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus*. Cell, 1994. **76**(4): p. 651-63.
322. Liu, G.Y., et al., *Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 407-15.
323. Girgis, L., M.M. Davis, and B. Fazakas de St Groth, *The avidity spectrum of T cell receptor interactions accounts for T cell anergy in a double transgenic model*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 265-78.
324. Ohashi, P.S., et al., *Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice*. Cell, 1991. **65**(2): p. 305-17.
325. Rousset, F., et al., *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1890-3.
326. Akkaraju, S., et al., *A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 255-71.
327. Lanoue, A., et al., *Conditions that induce tolerance in mature CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 405-14.
328. Schwartz, R.H., *Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?* J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 1-8.
329. Nouri-Shirazi, M. and E. Guinet, *Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage*. Transplantation, 2002. **74**(7): p. 1035-44.
330. Zheng, Z., et al., *Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(2): p. 93-103.
331. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
332. Chieppa, M., et al., *Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4552-60.
333. Jonuleit, H., et al., *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells*. Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 394-400.
334. Chan, C., R.I. Lechler, and A.J. George, *Tolerance mechanisms and recent progress*. Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 561S-569S.
335. Albert, M.L., M. Jegathesan, and R.B. Darnell, *Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1010-7.
336. Akbari, O., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 725-31.
337. Menges, M., et al., *Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 15-21.

Bibliografía

338. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
339. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
340. Gleeson, P.A., B.H. Toh, and I.R. van Driel, *Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia*. Immunol Rev, 1996. **149**: p. 97-125.
341. Mittrucker, H.W. and S.H. Kaufmann, *Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 306-12.
342. Stassen, M., E. Schmitt, and H. Jonuleit, *Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S23-5.
343. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 89-98.
344. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
345. Frumento, G., et al., *Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 459-68.
346. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
347. Terness, P., et al., *Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 447-57.
348. Marshall, B., D.B. Keskin, and A.L. Mellor, *Regulation of prostaglandin synthesis and cell adhesion by a tryptophan catabolizing enzyme*. BMC Biochem, 2001. **2**(1): p. 5.
349. Tontonoz, P., et al., *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell, 1998. **93**(2): p. 241-52.
350. Serghides, L., et al., *CD36 and malaria: friends or foes?* Trends Parasitol, 2003. **19**(10): p. 461-9.
351. Vallve, J.C., et al., *Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages*. Atherosclerosis, 2002. **164**(1): p. 45-56.
352. Urban, B.C., N. Willcox, and D.J. Roberts, *A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8750-5.
353. Nencioni, A., et al., *Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1228-35.
354. Angeli, V., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5295-301.
355. Faveeuw, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells*. FEBS Lett, 2000. **486**(3): p. 261-6.
356. Yokochi, T., R.D. Holly, and E.A. Clark, *B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas*. J Immunol, 1982. **128**(2): p. 823-7.
357. Freedman, A.S., et al., *B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells*. J Immunol, 1987. **139**(10): p. 3260-7.
358. Freeman, G.J., et al., *Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice*. Science, 1993. **262**(5135): p. 907-9.
359. Coyle, A.J. and J.C. Gutierrez-Ramos, *The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 203-9.
360. Chambers, C.A., *The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 217-23.
361. Sansom, D.M., C.N. Manzotti, and Y. Zheng, *What's the difference between CD80 and CD86?* Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 314-9.
362. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.
363. Zheng, Y., et al., *CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2778-84.
364. Moody, D.B. and S.A. Porcelli, *Intracellular pathways of CD1 antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 11-22.

365. Vincent, M.S., J.E. Gumperz, and M.B. Brenner, *Understanding the function of CD1-restricted T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 517-23.
366. Sugita, M. and M.B. Brenner, *T lymphocyte recognition of human group 1 CD1 molecules: implications for innate and acquired immunity*. Semin Immunol, 2000. **12**(6): p. 511-6.
367. Pena-Cruz, V., et al., *Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(3): p. 517-21.
368. Amprey, J.L., G.F. Spath, and S.A. Porcelli, *Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with Leishmania donovani*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 589-92.
369. Groux, H. and F. Cottrez, *The complex role of interleukin-10 in autoimmunity*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 281-5.
370. Yssel, H., et al., *IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2378-84.
371. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
372. Benjamin, D., T.J. Knobloch, and M.A. Dayton, *Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10*. Blood, 1992. **80**(5): p. 1289-98.
373. Burdin, N., et al., *Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 295-304.
374. Defrance, T., et al., *Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 671-82.
375. Groux, H., et al., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3188-93.
376. Balasa, B., et al., *IL-10 impacts autoimmune diabetes via a CD8+ T cell pathway circumventing the requirement for CD4+ T and B lymphocytes*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4420-7.
377. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
378. McGuirk, P., C. McCann, and K.H. Mills, *Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 221-31.
379. Cottrez, F., et al., *T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4848-53.
380. Hwang, D., *Essential fatty acids and immune response*. Faseb J, 1989. **3**(9): p. 2052-61.
381. Endres, S., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acids: update 1995*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(9): p. 629-38.
382. Calder, P.C., *N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function*. Adv Enzyme Regul, 1997. **37**: p. 197-237.
383. Wang, Y.W., C.J. Field, and J.S. Sim, *Dietary polyunsaturated fatty acids alter lymphocyte subset proportion and proliferation, serum immunoglobulin G concentration, and immune tissue development in chicks*. Poult Sci, 2000. **79**(12): p. 1741-8.
384. Calder, P.C. and E.A. Newsholme, *Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production*. Clin Sci (Lond), 1992. **82**(6): p. 695-700.
385. Scherer, J.M., W. Stillwell, and L.J. Jenki, *Spleen cell survival and proliferation are differentially altered by docosahexaenoic acid*. Cell Immunol, 1997. **180**(2): p. 153-61.
386. Jolly, C.A., et al., *Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide*. J Nutr, 1997. **127**(1): p. 37-43.
387. Wallace, F.A., et al., *Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 449-57.
388. Calder, P.C., *Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions*. Biochem Soc Trans, 1995. **23**(2): p. 302-9.
389. Calder, P.C., *Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system*. Proc Nutr Soc, 1996. **55**(1B): p. 127-50.
390. Calder, P.C., *Can n-3 polyunsaturated fatty acids be used as immunomodulatory agents?* Biochem Soc Trans, 1996. **24**(1): p. 211-20.

Bibliografía

391. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease*. *Ann Nutr Metab*, 1997. **41**(4): p. 203-34.
392. Calder, P.C., *Dietary fatty acids and the immune system*. *Nutr Rev*, 1998. **56**(1 Pt 2): p. S70-83.
393. Calder, P.C., *Dietary fatty acids and lymphocyte functions*. *Proc Nutr Soc*, 1998. **57**(4): p. 487-502.
394. Kelley, D.S., et al., *Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men*. *Lipids*, 1999. **34**(4): p. 317-24.
395. Sasaki, T., et al., *Dietary docosahexaenoic acid can alter the surface expression of CD4 and CD8 on T cells in peripheral blood*. *J Agric Food Chem*, 2000. **48**(4): p. 1047-9.
396. Sasaki, T., et al., *Effects of dietary docosahexaenoic acid on surface molecules involved in T cell proliferation*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1436**(3): p. 519-30.
397. Arrington, J.L., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses function of the CD28 costimulatory membrane receptor in primary murine and Jurkat T cells*. *J Nutr*, 2001. **131**(4): p. 1147-53.
398. Chapkin, R.S., et al., *Dietary n-3 PUFA affect TcR-mediated activation of purified murine T cells and accessory cell function in co-cultures*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(1): p. 12-8.
399. Bonin, A. and N.A. Khan, *Regulation of calcium signalling by docosahexaenoic acid in human T-cells. Implication of CRAC channels*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(2): p. 277-84.
400. Khair-el-Din, T.A., et al., *Docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal serum and fish oil diets, inhibits IFN gamma-induced Ia-expression by murine macrophages in vitro*. *J Immunol*, 1995. **154**(3): p. 1296-306.
401. Hughes, D.A., S. Southon, and A.C. Pinder, *(n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro*. *J Nutr*, 1996. **126**(3): p. 603-10.
402. Hughes, D.A. and A.C. Pinder, *N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **110**(3): p. 516-23.
403. Hughes, D.A. and A.C. Pinder, *n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(1 Suppl): p. 357S-60S.
404. Calder, P.C., *Sir David Cuthbertson Medal Lecture. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Proc Nutr Soc*, 1996. **55**(2): p. 737-74.
405. Calder, P.C., et al., *Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis*. *Biochem J*, 1990. **269**(3): p. 807-14.
406. Komatsu, W., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 1006-16.
407. De Caterina, R., et al., *The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(11): p. 1829-36.
408. De Caterina, R. and P. Libby, *Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids*. *Lipids*, 1996. **31 Suppl**: p. S57-63.
409. Miles, E.A., F.A. Wallace, and P.C. Calder, *Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages*. *Atherosclerosis*, 2000. **152**(1): p. 43-50.
410. Hughes, D.A., et al., *Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(2): p. 267-72.
411. Billiar, T.R., et al., *Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation*. *Surgery*, 1988. **104**(2): p. 343-9.
412. Renier, G., et al., *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(10): p. 1515-24.
413. Yaqoob, P. and P. Calder, *Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages*. *Cell Immunol*, 1995. **163**(1): p. 120-8.
414. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. *J Nutr*, 1991. **121**(4): p. 547-55.
415. Caughey, G.E., et al., *The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(1): p. 116-22.

416. Gallai, V., et al., *Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Neuroimmunol, 1995. **56**(2): p. 143-53.
417. Sadeghi, S., F.A. Wallace, and P.C. Calder, *Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice*. Immunology, 1999. **96**(3): p. 404-10.
418. Khalfoun, B., et al., *Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6*. Adv Exp Med Biol, 1997. **400B**: p. 589-97.
419. Blok, W.L., M.B. Katan, and J.W. van der Meer, *Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids*. J Nutr, 1996. **126**(6): p. 1515-33.
420. Herschman, H.R., *Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 281-319.
421. Tan, N.S., et al., *Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3263-77.
422. Kippenberger, S., et al., *Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(6): p. 1430-6.
423. Combs, C.K., et al., *Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Neurochem Int, 2001. **39**(5-6): p. 449-57.
424. Gupta, R.A., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by Helicobacter pylori in gastric epithelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31059-66.
425. Delerive, P., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control*. J Endocrinol, 2001. **169**(3): p. 453-9.
426. Willson, T.M., et al., *The PPARs: from orphan receptors to drug discovery*. J Med Chem, 2000. **43**(4): p. 527-50.
427. Serghides, L. and K.C. Kain, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6742-8.
428. Li, M., et al., *An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7128-35.
429. Harris, S.G. and R.P. Phipps, *The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1098-105.
430. Tautenhahn, A., B. Brune, and A. von Knethen, *Activation-induced PPARgamma expression sensitizes primary human T cells toward apoptosis*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(5): p. 665-72.
431. Na, H.K. and Y.J. Surh, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1381-91.
432. Chtanova, T., et al., *Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3057-63.
433. Setoguchi, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1667-75.
434. Buck, J., et al., *Differences in the action and metabolism between retinol and retinoic acid in B lymphocytes*. J Cell Biol, 1991. **115**(3): p. 851-9.
435. Yang, Y., M.S. Vacchio, and J.D. Ashwell, *9-cis-retinoic acid inhibits activation-driven T-cell apoptosis: implications for retinoid X receptor involvement in thymocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6170-4.
436. Geissmann, F., et al., *Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 623-34.
437. Scudiero, D.A., et al., *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4827-33.
438. Hetts, S.W., *To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease*. Jama, 1998. **279**(4): p. 300-7.
439. Telford, W.G., L.E. King, and P.J. Fraker, *Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry*. Cell Prolif, 1991. **24**(5): p. 447-59.

Bibliografía

440. Darzynkiewicz, Z., et al., *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(8): p. 795-808.
441. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
442. Fraker, P.J., et al., *Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer*. Methods Cell Biol, 1995. **46**: p. 57-76.
443. Telford, W.G., L.E. King, and P.J. Fraker, *Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **172**(1): p. 1-16.
444. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
445. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
446. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 817-90.
447. Sugita, M., P.J. Peters, and M.B. Brenner, *Pathways for lipid antigen presentation by CD1 molecules: nowhere for intracellular pathogens to hide*. Traffic, 2000. **1**(4): p. 295-300.
448. Shamshiev, A., et al., *Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules*. J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1013-21.
449. Balkhi, M.Y., et al., *Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from Mycobacterium tuberculosis secretory antigen-activated dendritic cell subsets*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(5): p. 874-83.
450. Keller, H., et al., *Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2160-4.
451. Cha, B.S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle*. Diabetologia, 2001. **44**(4): p. 444-52.
452. Yamauchi, T., et al., *Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 1001-13.
453. A, I.J., et al., *In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers*. Embo J, 2004. **23**(10): p. 2083-91.
454. Fritsche, J., et al., *Expression of retinoid receptors during human monocyte differentiation in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(1): p. 17-22.
455. Lengqvist, J., et al., *Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(7): p. 692-703.
456. de Urquiza, A.M., et al., *Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2140-4.
457. Leesnitzer, L.M., et al., *Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662*. Biochemistry, 2002. **41**(21): p. 6640-50.
458. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
459. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
460. Mills, J.C., V.M. Lee, and R.N. Pittman, *Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 5): p. 625-36.
461. Cunard, R., et al., *Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2795-802.
462. Clark, R.B., et al., *The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1364-71.
463. Jones, D.C., X. Ding, and R.A. Daynes, *Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 6838-45.
464. Manzotti, C.N., et al., *Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2888-96.
465. Lechmann, M., et al., *CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 273-5.

466. Fujimoto, Y., et al., *CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus*. Cell, 2002. **108**(6): p. 755-67.
467. Scholler, N., et al., *Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2599-602.
468. Flores-Romo, L., *In vivo maturation and migration of dendritic cells*. Immunology, 2001. **102**(3): p. 255-62.
469. Vanden Heuvel, J.P., *Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis*. J Nutr, 1999. **129**(2S Suppl): p. 575S-580S.
470. Li, H., et al., *EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism*. Kidney Int, 2005. **67**(3): p. 867-74.
471. Kang, B.Y., et al., *Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4(+) T cells*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(3): p. 581-6.
472. Iwata, M., Y. Eshima, and H. Kagechika, *Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors*. Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 1017-25.
473. Mohty, M., et al., *All-trans retinoic acid skews monocyte differentiation into interleukin-12-secreting dendritic-like cells*. Br J Haematol, 2003. **122**(5): p. 829-36.
474. Han, S. and N. Sidell, *Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPARgamma) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid*. Immunology, 2002. **106**(1): p. 53-9.
475. Chung, S.W., et al., *Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32681-7.
476. Chinetti, G., et al., *Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25573-80.
477. Straus, D.S., et al., *15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4844-9.
478. Bendixen, A.C., et al., *IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2443-8.
479. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm Res, 2000. **49**(10): p. 497-505.
480. Chung, S.W., B.Y. Kang, and T.S. Kim, *Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1169-79.
481. Tanaka, T., et al., *Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2424-8.
482. Yang, X.Y., et al., *Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3973-8.
483. Zeyda, M., et al., *Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-B activation*. J Biol Chem, 2005.
484. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 733-9.
485. Cunard, R., et al., *Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7530-6.