

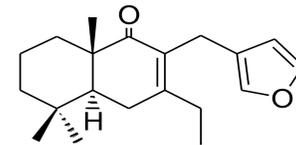
INTRODUCCIÓN

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPIDs) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan a las vías respiratorias, principalmente a las estructuras alveolo-intersticiales y que presentan manifestaciones clínicas comunes⁽¹⁾. Algunas de estas patologías manifiestan una relación entre la inflamación del tejido pulmonar y cambios en el metabolismo⁽²⁾, como es el caso de la proteinosis alveolar pulmonar, en la que se ha caracterizado una alteración del metabolismo lipídico de los macrófagos alveolares⁽³⁻⁵⁾. Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos que conducen a estas alteraciones y buscar nuevos agentes terapéuticos hemos puesto a punto un modelo *in vitro* consistente en el cultivo de macrófagos alveolares en presencia de ácido oleico. El ácido oleico induce la acumulación de lípidos en estructuras conocidas como gotas lipídicas o "lipid droplets" similares a las que se observan en estas patologías⁽⁶⁾. Utilizaremos este modelo para identificar nuevos agentes terapéuticos con capacidad para inhibir la formación de los "lipid droplets". Así, estudiaremos la actividad de diferentes compuestos derivados de terpenos, cuya actividad antiinflamatoria ha sido ampliamente descrita, por lo que son candidatos muy interesantes como nuevos agentes terapéuticos en estas patologías⁽⁷⁾.

MATERIAL

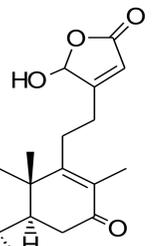
- Cultivos celulares → MH-S CRL-2019™ (Macrófagos alveolares de ratón).
- Ácido oleico → BSA-Oleate Monounsaturated Fatty Acid Complex.
- Compuestos terpénicos derivados de hispanolona → T4 y T11.

T4



Dehydroisohispanolone

T11



8,9-Dehydroispanolone
-15,16-lactol

OBJETIVOS

1. Evaluar la toxicidad del ácido oleico.
2. Analizar si la acumulación de lípidos inducida por el ácido oleico corresponde con "lipid droplets (LDs)" y no con otras estructuras celulares.
3. Establecer la dosis mínima de ácido oleico que induce un aumento significativo de "lipid droplets".
4. Determinar la toxicidad de los derivados de hispanolona, para establecer la dosis máxima a la cual el compuesto no es tóxico para las células.

RESULTADOS

El ácido oleico no induce toxicidad

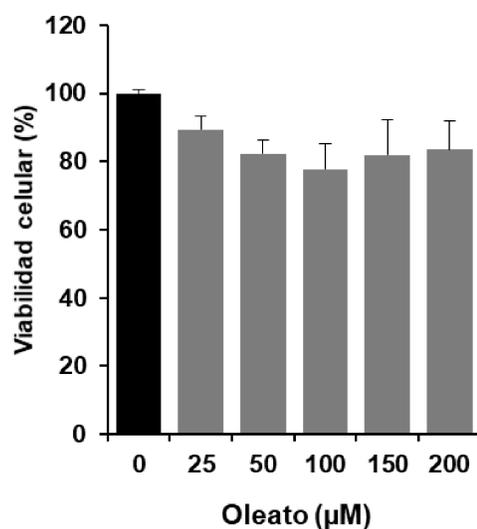


Figura 1. Citotoxicidad del ácido oleico. La viabilidad de las células MH-S tras el tratamiento o/n con ácido oleico (0-200μM) se determinó por el ensayo de MTT. Los datos se muestran como la media ± DE.

El ácido oleico induce la formación de LDs

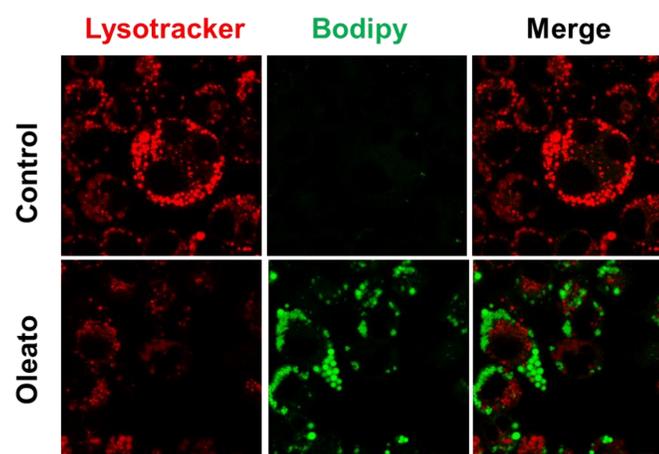


Figura 2. Visualización de la acumulación de LDs. Células MH-S se incubaron o/n en presencia de ácido oleico (200μM). La presencia de LDs se verificó por marcaje con BODIPY 493/503 (verde) específico de lípidos neutros y los lisosomas con marcaje con LysoTracker Red DND-99 (rojo).

El ácido oleico induce la formación de LDs a partir de 100 μM

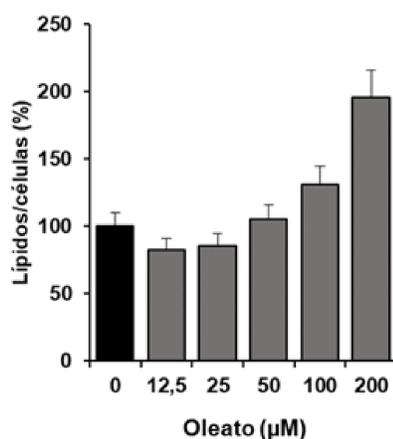


Figura 3. Dosis respuesta del ácido oleico para la formación de LDs. Células MH-S se incubaron o/n en presencia de ácido oleico. Los datos se muestran como la media ± DE.

Citotoxicidad de los terpenos

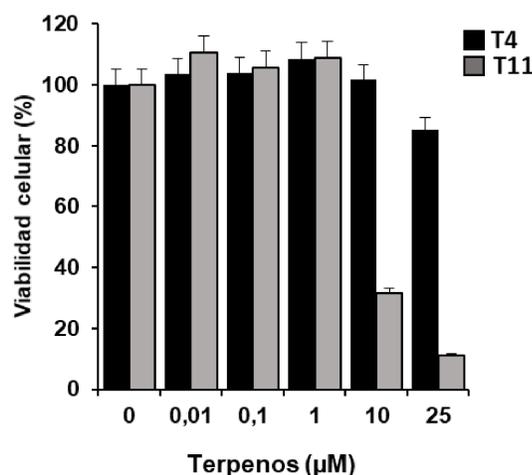


Figura 4. Ensayo de viabilidad de las células MH-S después del tratamiento con los terpenos T4 y T11. Células MH-S se incubaron o/n en presencia de T4 y T11 a diferentes concentraciones. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. Los datos se muestran como la media ± DE.

CONCLUSIONES

1. El ácido oleico no afecta a la viabilidad celular en el rango de concentraciones testadas (25-200 μM).
2. La acumulación de lípidos que se observa tras el tratamiento con ácido oleico corresponde con "lipid droplets" y no con otras estructuras celulares, ya que sólo son positivas para la tinción con Bodipy.
3. Establecemos la concentración de 100 μM como dosis óptima de ácido oleico para inducir la formación de "lipid droplets" sin comprometer la viabilidad celular.
4. Los derivados de hispanolona inducen toxicidad en las células MH-S a partir de una concentración de 25 μM en el caso del T4 y de 10 μM para el T11. Para los estudios de inhibición de la formación de "lipid droplets" utilizaremos dosis inferiores a estas concentraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ancochea Bermudez, J, and de Miguel Díez, J. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. Monografías Neumomadrid vol. XII/2008.
2. Papaioannou O, et al.. Metabolic Disorders in Chronic Lung Diseases. Front Med (Lausanne). 2018 Jan 18;4:246. doi: 10.3389/fmed.2017.00246.
3. Trapnell BC, et al., Pulmonary alveolar proteinosis. Nat Rev Dis Primers. 2019 Mar 7;5(1):16. doi: 10.1038/s41572-019-0066-3.
4. Remmerie A and Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. Cell Immunol. 2018 Aug;330:27-42. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.020.
5. Rossi G et al., The role of macrophages in interstitial lung diseases. Eur Respir Rev. 2017 Jul 19;26(145):170009. doi: 10.1183/16000617.0009-2017.
6. Jarc E and Petan T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. Biochimie. 2020 Feb;169:69-87. doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.016.
7. de las Heras B and Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Mar;8(1):28-39. doi: 10.2174/187152809787582534.