

Inmunosupresión de las emulsiones lipídicas parenterales en un modelo de inmunoestimulación definida

Helmut Grimm, Ulrich, Bohnet, Eva Malats Brang, Georg Friese, Georg Schmidbauer, Reinhard Schüick

Departamento de Cirugía General y Torácica de la Universidad Giessen. Klinikstrasse 29. D-35392, Giessen

RESUMEN. En el modelo del alotransplante de corazón en ratas se investigó el efecto inmunosupresivo de emulsiones grasas i.v. con una combinación diferente de ácidos grasos n-3 y n-6.

Emulsiones de un 20% de aceite de cardo (n-3/n-6= 1/370), de pescado (7,6/1), de soja (1/6,5), y una mezcla 1:1 de aceite de cardo y de pescado (1/2,1; como grupo control de aceite) fueron infundidos continuamente después del trasplante hasta el rechazo (9 g de grasa/Kg peso corporal diario; n=10 por grupo). Fueron analizados el tiempo de supervivencia del trasplante, las subpoblaciones del infiltrado de células inmunocompetentes o circulantes y la secreción de interleuquina-6 de células mononucleares circulantes.

En el grupo de aceite de cardo, de pescado y de soja, el tiempo de supervivencia del trasplante fue alargado hasta 13,3; 12,3 y 10,4 días en comparación a los 6,7 días en el grupo control de aceite respectivamente y de 7,8 días en el grupo control de NaCl ($p<0,01$). En los dos grupos con la prolongación de supervivencia más alta se redujo el número de células en el infiltrado hasta un 50% y la producción de interleuquina-6 de células mononucleares hasta un 45%. Además se observó una disminución de las células-T circulantes en el grupo aceite de pescado.

Las emulsiones grasas i.v. provocan, dependiendo de la relación de ácidos grasos de n-3/n-6, diferentes reacciones inmunomodulantes. Tanto los ácidos grasos n-6 como los n-3 causan su efecto inmunosupresor mediante la reducción de la infiltración, la movilización y la producción de citoquinas de células inmunocompetentes. El aceite de soja, con la relación de ácidos grasos n-3/n-6 más ponderada que el aceite de cardo, es significativamente menos inmunosupresivo, y las emulsiones grasas con una relación n-3/n-6 1:2 son inmunológicamente neutrales.

Palabras claves: Grasa parenteral, ácidos grasos n-3, ácidos grasos n-6, relación de ácidos grasos n-3/n-6, modulación inmunológica.

INTRODUCCION

La inmunosupresión de emulsiones grasas parenterales está desde hace tiempo cuestionada (1). Los efectos potenciales se atribuyen a los ácidos grasos n-3 y n-6 poli-insaturados los cuales influyen independientemente en la función de las células inmunocompetentes in vitro (2), o después del metabolismo a eicosanoides desarrollan propiedades inmunomoduladoras como mediadores lipídicos (3,4). Hasta ahora se ha investigado sólo la influencia sobre componentes aislados del sistema inmune. Transmitimos por eso el modelo de alotransplante de corazón en ratas, -que compromete, en una reacción de rechazo aguda, al sistema inmune en su totalidad así como mecanismos de rechazo no específicos,- a la investigación del efecto inmunosupresor de emulsiones grasas parenterales. Inyectamos, continuamente, durante la fase post-trasplantante emulsiones grasas con diferentes cocientes de ácidos grasos n-3/n-6 e investigamos el efecto sobre el tiempo de supervivencia del alotransplante que es valorada como medida biológica de modulación inmune. Este

SUMMARY. Immunosuppression by parenteral lipid emulsions in a model of defined immunostimulation. The immunosuppressive effect of intravenous fat emulsions with different n-3/n-6 fatty acid ratio was studied in the heterotopic rat heart allotransplant model. Twenty percent emulsions of safflower oil (n-3/n-6= 1/370), fish oil (7.6/1), soybean oil (1/6.5) and a 1:1 mixture of safflower and fish oil (1/2,1; oil control group) were continuously infused (9 g fat/Kg b.w./day; n=10 each group) after transplantation until rejection. Graft survival time, subpopulations of infiltrating and circulating immunocompetent cells and Interleukin-6 release of circulating monocytes were analyzed.

In the safflower oil, fish oil and soybean oil groups graft survival was prolonged to 13.3, 12.3 and 10.4 days vs. 6.7 days in the oil control group and 7.8 days in the saline control group ($p<0.01$). In the two groups with the highest prolongation of graft survival the number of infiltrating cells was reduced by up to 50 percent and the peripheral blood monocyte Interleukin-6 release by up to 45 percent. Beyond that, circulating T-cells were reduced in the fish oil group.

Intravenous fat emulsions show a varying immunomodulatory effect in dependence of the n-3/n-6 fatty acid ratio. Both n-6 and n-3 fatty acids, if applied as main fatty acid source, exert immunosuppressive effects by a diminished infiltration, mobilisation and cytokine release of immunocompetent cells. Soybean oil with a more balanced n-3/n-6 fatty acid ratio than safflower is significantly less immunosuppressive than safflower oil and fat emulsions with a n-3/n-6 fatty acid ratio of 1/2 are immunologically neutral.

Key words: Parenteral fat, n-3 fatty acids, n-6 fatty acids, n-3/n-6 fatty acid ratio, immunomodulation.

parámetro clínico-fisiológico fue correlacionado con variables inmunohistológicas.

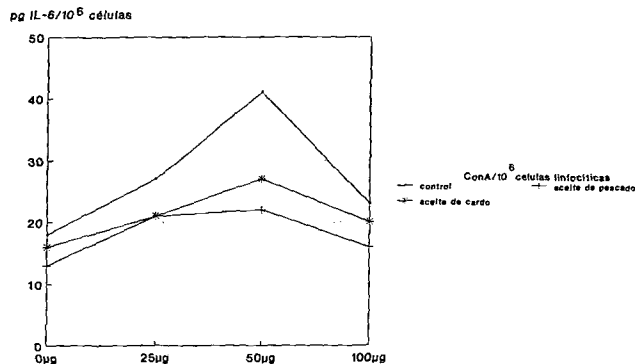
En una segunda fase experimental se confrontó el perfil de células circulantes inmunocompetentes y la secreción de citoquina de células mononucleares de sangre periférica de los animales controles con los dos grupos con el tiempo más largo de supervivencia del trasplante.

MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación: Los experimentos realizados con animales estaban autorizados y cumplían las exigencias de la ley de protección del animal alemana. Las ratas machos entrecruzadas sirvieron como donantes (PVG, RT 1^c, 100-150 g) y receptoras (Wistar/Kyoto, RT1¹, 200-250 g, Møllegaard Breeding Center, Skensved, Dinamarca). Los animales fueron mantenidos en jaulas de plástico con pisos enrejados de acero inoxidable con una temperatura controlada (20 °C), humedad atmosférica (50%) y un ciclo de 12

horas día/noche. Se respetó una fase de adaptación con un mínimo de una semana antes del trasplante. Los animales de experimentación tenían acceso libre al agua y a la comida de cultivo R3-EWOS-ALAB (ALAB, Sollentuna, Suecia). La composición en grasa de la comida está representada en la Figura 1.

FIGURA 1
Potencial secretorio para IL-6 de los linfocitos en la sangre periférica estimulados por Con A



Catéter venoso central: Un trozo de catéter PE 10 (polietileno) (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) de 5 cm de largo y forma espiral fue unido a un tubo de silicón (Silastic R 0,012 inch x 0,025 inch, N° 602-105 HH 061999, Dow Corning Corp., Midland, Mich. USA). El final del PE 10 se fundió con un trozo de catéter de PE 20 de 30 cm de largo. El trozo de silicón fue implantado directamente antes del trasplante en la vena yugular izquierda del receptor (5) y el final del PE 20 fue dirigido hacia fuera y conectado a la bomba-SAGE, para la infusión continua.

Técnica operatoria: Los receptores fueron anestesiados con 0,315 mg de citrato fentanílico/Kg peso corporal i.m. (Hypnorm R, Janssen, Bélgica). Después de la laparotomía media se extirpó el riñón izquierdo y se prepararon los vasos renales con la técnica CUFF (6). Los donantes fueron anestesiados con 60 mg pentobarbital/Kg peso corporal i.p. (Mebumal vet. R, Nord Vacc, Suecia). Se inyectaron 300 IU antes de la extracción del órgano. Los trasplantes de corazón fueron irrigados con una solución fría de Ringer lactato que fue complementada con 50 IU de heparina/ml. Justo después de la extracción se realizó una anastomosis entre los trasplantes y los vasos renales del receptor. El tiempo de isquemia fue menos de 5 minutos.

Emulsiones grasas: Se prepararon emulsiones con un 20% de aceite de cardo, de pescado, de soja o de una mezcla 1:1 de aceite de cardo y de pescado. La composición de ácidos grasos de estas emulsiones se representa en la Tabla 2. La fase isotónica acuosa contenía agua destilada, fosfolípido de huevos purificados y glicerol. Esta fue calentada hasta 60-70 °C y la fase lipídica se vació en una batidora de alta velocidad. Se hizo una emulsión fina bajo alta presión en un homogenizador. La emulsión se distribuyó en partes alícuotas en botellas de vidrio y se esterilizó calentándola.

TABLA 1
Composición de ácidos grasos del alimento de cultivo (R3-EWOS-ALAB) de ratas

Acido graso	
16:0	21
16:1	2
18:0	4
18:1	22
18:2	42
18:3	7
Otros	2

TABLA 2
Composición en ácidos grasos del aceite de cardo, de pescado, de soja y de una mezcla de 1:1 de aceite de cardo y de pescado (% de los ácidos grasos en total)

Acido graso	Acido de cardo	Aceite de pescado	Aceite de soja	Mezcla de 1:1 de aceite de cardo y de pescado
12:0		0,2		0,1
14:0	0,1	5,5	0,1	2,8
16:0	7,6	14,2	11,0	10,9
16:1	0,1	6,5	0,1	3,3
17:0			0,1	
18:0	2,9	3,2	4,4	3,05
18:1 (n-9)	13,6	10,1	23,3	11,85
18:1 (n-7)		3,1	1,55	
18:2 (n-6)	73,6	2,6	51,6	38,1
18:3 (n-6)		0,2		0,1
18:3 (n-3)	0,2	0,7	6,7	0,45
18:4 (n-3)		2,5		1,25
20:0	0,3	0,2	0,3	0,25
20:1 (n-9)	0,3	1,5	0,3	0,9
20:1 (n-7)		1,8		0,9
20:1 (n-5)		0,2		0,1
20:2 (n-6)			0,5	
20:3 (n-6)			0,04	
20:4 (n-6)	0,1	1,6	0,1	0,85
20:5 (n-3)		18,1		9,05
22:0			0,4	
22:1 (n-11)		2,0		1,0
22:1 (n-9)		0,5		0,25
22:1 (n-7)		0,1		0,05
22:5 (n-3)		2,7		1,35
22:6 (n-3)		12,9		6,45
22:6 (n-6)			0,3	

Grupos de tratamiento: Las 4 emulsiones se inyectaron en 10 animales de cada grupo. Se aplicaron 9 g de grasa/Kg p.c. diario en forma continua durante 24 horas. Los animales de experimentación que recibieron la mezcla 1:1 de aceite de cardo y pescado, sirvieron como grupo control de aceite, ya que la relación de ácidos grasos n-3/n-6 en esta mezcla de aceite según Kinsella (7), fue proporcionada en forma ideal. El grupo-control recibió un volumen apropiado de una solución de NaCl fisiológica.

Evaluación del rechazo del trasplante: Los trasplantes de corazón fueron palpados dos veces el día. El rechazo se consideró definitivo en el momento en que ya no había pulsaciones palpables y cuando el ECG documentaba el fin de la función del trasplante. Después de la explantación se pesaron los trasplantes y se verificó histológicamente el rechazo.

Análisis inmunohistológico del trasplante: Cortes congelados de 7 µm fueron secados al aire durante 12 horas, después se fijaron durante 10 minutos con acetona fría y finalmente se lavaron con TRIS-buffer. Los cortes fueron incubados con un suero normal de ratas (diluido 1/10) (Emp. Dakopatts, Hamburg, Alemania) durante 20 minutos y lavados con TRIS-buffer. Luego se incubaron con anticuerpos monoclonales ratón-anti-rata (diluido 1:100 en RPMI) contra los clones celulares MRC OX-19, W 3/25, MRC OX-8, MRC OX-1, MRC OX-33, W 3/13 (Emp. Camon, Wiesbaden Alemania) durante 30 minutos (Especificidad de anticuerpos en Tabla 3). Después del lavado con TRIS-buffer se incubó durante 30 minutos con inmunoglobulina de conejo-anti-ratón (diluido 1/20). Después de otro lavado (TRIS-buffer) se incubó durante 30 minutos con el complejo APAAP (diluido el 1/50) y se lavó de nuevo con TRIS-buffer. Se incubó luego durante 30 minutos en agitación con un sustrato de fosfatasa alcalina recién preparado, se lavó con TRIS-buffer y se coloreó para contrastar con hemalaun. Finalmente fue cubierto con glicergel (Emp. Dakopatts, Hamburg, Alemania). Las células marcadas se contaron bajo un microscopio (Emp. Leitz, Wetzlar, Alemania) con un aumento de 1000x bajo evaluación de 20 campos de visión representativos por corte con ayuda de una red calculadora (Emp. Leitz, Wetzlar, Alemania).

TABLA 3
Especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados para los análisis inmunohistológicos

Anticuerpos	Células marcadas
MRC OX-1	Leucocitos (CD 45+)
MRX OX-33	Células - B
W3/13	Células - T, PMN, NK, unas células plasmáticas
MRC OX-19	Células - T (CD5+)
W 3/25	Células - T - colaboradoras (CD4+), monocitos, macrófagos
MRC OX-8	Células - T - citotóxicas (CD8+), NK, monocitos, macrófagos

Análisis al 4to día del trasplante: En una segunda serie de experimentos se exsanguinaron 10 receptores de trasplante de cada grupo en un momento determinado del proceso de rechazo todavía no concluido (4º día del trasplante). La sangre extraída fue utilizada para las siguientes determinaciones:

Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica mediante FACS (fluoresceine activated cell sorter): En el 4º día p.o. se extrajo sangre (EDTA) del animal receptor. Se mezclaron 10 µl de anticuerpos monoclonales marcados de manera fluorescente (Emp. Camon, Wiesbaden, Alemania) contra CD (cluster of differentiation) 45 (panleucocitos), CD 3 (células T), CD 45R (células B), CD 4(células T4), CD 8 (células T8), CD 5(células T),

CD 25 (células T receptor de interleuquina-2 positivas) e IgG 1 ó IgG 2a (controles isotípicos), con 100 µl de sangre y se incubaron 15 minutos en oscuridad. Finalmente se añadió 1 µl de solución de lisis, se incubó 5 minutos y se centrifugó a 300 g por 5 minutos. El botón celular fue resuspendido en 0,5 ml de solución FACS-Flow y la lectura se realizó en FACS-Flow.

Análisis de la producción de interleuquina-6 de linfocitos estimulados por mitógenos: Sangre total heparinizada (10 IU de heparina/ml sangre) se diluyó con PBS. Los linfocitos fueron aislados por centrifugación en gradiente de densidad y ajustados con RPMI y suero fetal de vacuno al 5% a un número de células de 1×10^6 /ml. Se mezclaron 10^6 células con 0, 25, 50 y 100 µg Concanavalina A (Con A) respectivamente y se incubaron 24 horas a 37 °C. Después de centrifugar (2000rpm durante 10 minutos) se aspiró el sobrenadante, la secreción de interleuquina-6 se determinó mediante la medición de su concentración con ELISA-Kits de la Empresa Endogen (Boston, MA, USA).

Estadística: Después de haber comprobado la distribución normal mediante el test Kolmogorow-Smirnow, se analizaron las diferencias entre los grupos con la prueba «t». Se valoró como significativa la probabilidad <0,05. Los valores se describieron como valores medios ± desviación estandar de los valores medios.

RESULTADOS

Tiempo de sobrevida del trasplante: Los trasplantes de corazón en los animales de experimentación de ambos grupos de controles fueron rechazados después de 7 días por término medio (grupo-control de NaCl: $7,8 \pm 0,3$ días, grupo-control de aceite: $6,7 \pm 0,6$ días, ninguna diferencia significativa). En cambio se alargó significativamente el tiempo de sobrevida del trasplante mediante la infusión continua de aceite de cardo, de pescado y de soja ($p < 0,01$). Sin embargo el grupo de aceite de cardo ($13,3 \pm 1,0$ días) y el grupo de aceite de pescado ($12,3 \pm 0,4$ días) mostraron una prolongación significativa del tiempo de sobrevida del trasplante ($p < 0,01$ resp. 0,5) con respecto al grupo de aceite de soja ($10,4 \pm 0,7$ días) (Tabla 4).

Las diferencias entre el grupo de aceite de cardo y el grupo de aceite de pescado no fueron estadísticamente.

Peso de trasplante: El aumento relativo del peso del trasplante (una medida para la infiltración de células y edema intercelular durante el proceso de rechazo) (8) resultó ser de 3,01 en el grupo-control de NaCl, de 2,9 en el grupo-control de aceite, pero sólo de 2,11 ($p < 0,01$) en el grupo de aceite de cardo, de 2,34 ($p < 0,05$) en el grupo de aceite de pescado y de 2,15 ($p < 0,05$) en el grupo de aceite de soja.

Abastecimiento de energía y comportamiento del peso: Como se esperaba, el grupo-control de NaCl fue el que tomó más alimentos (un promedio de 59,8 g/Kg peso corporal diario), ya que estos animales de experimentación tenían que cubrir todas sus necesidades de energía por vía oral. Sin embargo los otros animales de experimentación que recibieron en forma parenteral 9 g de grasa/Kg p.c. diario, tomaron 40% menos de alimentos, es decir 35 g/Kg p.c. diario en el grupo de aceite de cardo, 32,3 g/Kg p.c. diario en el grupo de aceite de pescado, 37,5 g/Kg p.c. diario en el grupo de aceite de soja y 36,2 g/Kg p.c. diario en el grupo de control de aceite. Las ratas fueron inyectadas con emulsiones grasas, redujeron la ingestión de alimento

de tal manera que no se pudo constatar ninguna diferencia significativa entre la ingestión de energía diaria media (ingestión de energía oral y parenteral) y el grupo-control de NaCl (exclusivamente con una ingestión de energía por vía oral) (grupo-control de NaCl: 778 kJ/Kg p.c./día, grupo de aceite de pescado: 781 kJ/Kg p.c./día, grupo de aceite de soja: 845 kJ/Kg p.c./día, $p=0,61$). Después del trasplante todas las ratas perdieron peso. A pesar de que todas recibieron la misma cantidad de energía, las ratas tratadas con emulsiones grasas perdieron poco peso, pero significativamente más que las ratas del grupo-control de NaCl ($p<0,05$). En los grupos tratados con emulsiones grasas no se observó ninguna diferencia significativa. El peso medio en el 7° día después del trasplante fue de un 93% del peso inicial del grupo-control de NaCl y de un 85% en los grupos de aceite.

Secreción de interleuquina-6 de las células mononucleares:

La mayor secreción de interleuquina-6 de las células mononucleares en la sangre periférica de los grupos examinados se consiguió mediante la estimulación con 50 µg de Concanavalina A (Figura 1). El potencial de secreción de interleuquina-6 fue significativamente menor en el grupo de aceite de pescado ($22,2\pm 13,6$ pg/ 10^6 células) con respecto al grupo-control ($40,7\pm 8,3$ pg/ 10^6 células, $p<0,002$).

TABLA 4

Tiempo de supervivencia del trasplante (PVGxWistar/ ratas de Kyoto) con el tratamiento de emulsiones grasas poli-insaturadas con una relación de ácidos grasos n-3/n-6 diferente

Grupo	Tratamiento	n-3/n-6	Supervivencia del trasplante (días)	Término medio \pm error standard del valor medio	P
1	NaCl		7,7,7,7,7,8,8,9,9,9	7,8 \pm 0,3	
2	Mezcla-1: 1 de aceite de pescado y de cardo	1/2,1	5,5,5,5,6,7,7,9,9,9	6,7 \pm 0,56	no significativa frente 1
3	Aceite de cardo	1/360	9,11,11,12,13,13,13,15,16,20	13,3 \pm 1,0	<0,01 frente 1,2
4	Aceite de pescado	7,6/1	10,11,12,12,12,12,12,13,14,15	12,3 \pm 0,4	<0,01 frente 1,2 no significativa frente 3
5	Aceite de soja	1/6,5	8,8,8,9,10,11,12,12,13,13	10,4 \pm 0,7	<0,01 frente 1,2 <0,05 frente 3,4

TABLA 6

Distribución inmunohistológica de células infiltrantes en el trasplante rechazado (células/campo de visión, aumento: x1000)

Anticuerpos	Células marcadas	Isotransplante	Control n (1)	AP (2)	AS (3)	AC (4)	Significancia
MRC OX-1	Leucocitos (CD45 ⁺)	5,1 \pm 0,5	21,0 \pm 0,9	11,0 \pm 1,1	14,8 \pm 0,6	13,4 \pm 0,4	1 frente 2,3,4
MRC OX-33	Células-B	1,1 \pm 0,3	8,7 \pm 0,5	2,9 \pm 0,4	6,3 \pm 0,6	5,8 \pm 0,4	2 frente 1,3,4
W 3-13	Células-T, PMN,NK, unas células plasmáticas	3,2 \pm 0,4	13,1 \pm 0,7	7,8 \pm 0,6	12,0 \pm 0,4	8,6 \pm 0,3	2 frente 1,3
MRC OX-19	Células-T (CD5 ⁺)	0,9 \pm 0,3	6,3 \pm 0,6	2,4 \pm 0,3	3,6 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	1 frente 2,3,4
W 3/25:	Relación T4/T8	4,0	0,8 \pm 0,01	1,3 \pm 0,01	1,3 \pm 0,01	1,2 \pm 0,01	1 frente 2,3,4
MRC OX-8							

AP: Aceite de pescado AS: Aceite de soja

AC: Aceite de cardo

TABLA 5
Distribución porcentual de células mononucleares circulantes en la sangre periférica

Anticuerpos	Células	Control (1)	AP(2)	AC(3)	Significancia
Anti-CD45R	Células-B	25,7 \pm 1,7	34,0 \pm 1,3	25,0 \pm 2,9	2 frente 1,3
Anti-CD5	Células-T	69,0 \pm 2,8	59,8 \pm 2,6	66,7 \pm 3,3	2 frente 1,3
Anti-CD4	Células-T4	48,3 \pm 2,1	42,5 \pm 1,9	49,8 \pm 2,0	no significativa
Anti-CD8	Células-T8	29,7 \pm 2,7	35,8 \pm 5,3	31,0 \pm 2,0	no significativa
Anti-CD25	Células-T-IL2 Receptores - positivos	3,4 \pm 0,2	5,3 \pm 1,7	3,2 \pm 0,5	no significativa

AP: Aceite de pescado

AC: Aceite de cardo

Subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica: En el 4° días postoperatorio el número total de linfocitos-T (CD 5+) en la sangre periférica fue significativamente más bajo en el grupo de aceite de pescado ($59,8\pm 2,6$ %, $p<0,05$) con respecto al grupo-control ($69,0\pm 2,8$ %). La distribución porcentual de los subgrupos de las células-T (células-T4 (CD4+) y células-T8 (CD8+), células interleuquina-2-receptor-positivas (CD25+) no varió significativamente. También el porcentaje de linfocitos-B (CD45R+) fue en ambos grupos aproximadamente el mismo. Los linfocitos CD 45+, CD 5+, CD 4+, CD 8+, y CD 25+ entre el grupo de aceite de cardo y del grupo-control variaron significativamente.

Inmunohistología: El número total de leucocitos infiltrantes en los trasplantes de animales-control fue el más alto. Tanto el número total de leucocitos como todos los subtipos clasificados disminuyeron claramente en el resto de los grupos sin excepción ($p<0,01$). Las células-B estaban claramente menos representadas en los trasplantes del grupo de aceite de pescado que en el grupo de aceite de cardo y en el de soja. El número de células-T fue un poco mayor en el grupo de aceite de soja que en el grupo de aceite de cardo, y claramente mayor que en el grupo de aceite de pescado. La relación CD4/CD8 fue aproximadamente la misma en los grupos de aceite de pescado, de cardo y de soja, pero claramente mayor en comparación con los grupos-controles (Tabla 6).

DISCUSION

Ante la hipótesis de que los ácidos grasos n-3 y n-6 funcionalmente importantes se metabolizan competitivamente en componentes con características diferentes, se introdujo en el estudio la emulsión de aceite de soja de venta comercial así como también emulsiones lipídicas con una composición diferente de ácidos grasos poliinsaturados. La relación de ácidos grasos n-6/n-3 es de 370/1 en el aceite de cardo, de 6,5/1 en aceite de soja, de 2,1/1 en aceite mezclado y de 1/7,6 en aceite de pescado. El grupo de aceite mezclado sirvió, aparte del grupo de NaCl, como otro grupo-control para excluir el efecto general inmunosupresivo de grasas ya que según una hipótesis de Kinsella (7) la relación n-6/n-3 de 2:1 no debería tener ninguna influencia sobre la respuesta inmune. En efecto la infusión de aceite de mezcla en nuestro modelo no actuó inmunosupresivamente ya que el tiempo de supervivencia del trasplante en comparación con el grupo-control de NaCl no se alargó significativamente. Cambiando esta relación de ácidos grasos una vez a favor de los ácidos grasos n-3 y otra a favor de n-6 las emulsiones lipídicas resultaron inmunosupresivas. El tiempo de supervivencia del trasplante fue alargado significativamente en el grupo de aceite de cardo, soja y pescado frente al grupo-control de aceite.

En el grupo de aceite de cardo (n-6/n-3= 1/7,6) la prolongación del tiempo de supervivencia del trasplante fue aproximadamente igual, mientras que en el grupo de aceite de soja (n-6/n-3=6,5/1) el tiempo de supervivencia del trasplante se alargó significativamente con respecto a los grupos-controles, pero sin embargo menos que en los grupos de aceite de cardo y de pescado. Esto significa que el excedente n-6 en las emulsiones grasas, donde domina n-6, debe ser claramente mayor que el excedente de n-3 en las emulsiones donde domina n-3 para conseguir la misma magnitud de inmunosupresión.

La variación del tiempo de sobrevida del trasplante es la expresión biológica de la influencia en los mecanismos de rechazo tanto específicos como no específicos, la regulación de los vasos, la agregación de trombocitos y el comportamiento de células inmunocompetentes tanto específicas como no específicas que intervienen en el proceso de rechazo como un mecanismo delicadamente armonizado (9). En cuanto al rechazo celular los cambios del tiempo de sobrevida del trasplante se correlacionaron con el perfil inmunohistológico de los trasplantes rechazados. En los dos grupos con la mayor prolongación del tiempo de sobrevida (aceite de pescado y aceite de cardo respectivamente) estaban disminuidas las células infiltrantes, es decir los neutrófilos polimorfonucleares, los macrófagos, las células asesinas naturales y las células-T y -B, que son especialmente importantes en el proceso de rechazo (10,11), hasta un 50% del número de células del grupo-control.

En el grupo de aceite de soja la infiltración celular, así como el tiempo de sobrevida del trasplante, fue más alta que en los grupos de aceite de cardo y pescado pero menor que en los animales-controles. La relación CD4/CD8 sin haber intervenido en el proceso de rechazo es menor de 1 y se aumenta a un valor mayor de 1 mediante una terapia inmunosupresiva. De igual manera estaba aumentada en un 50% la relación CD4/CD8 en los grupos con efecto inmunosupresivo.

El perfil de las células circulantes en la sangre periférica representó las diferencias inmunohistológicas de los trasplantes rechazados sólo en el caso del grupo de aceite de pescado (n-6/n-3=1/7,6). Aquí estaban disminuidas las células-T circulantes en el sistema sanguíneo periférico con respecto al grupo-control. Esto se aclararía mediante la hipótesis de que añadiendo ácidos grasos n-3 en la bicapa

fosfolipídica de la superficie celular, el fluido membranal y la expresión de los receptores-citoquinas podría ser alterado de tal manera, que las células no podrían reaccionar adecuadamente a la señal de las citoquinas para emigrar del sistema linfocitario (13). La muestra de rechazo histológico, como producto de la infiltración y de la proliferación de células inmunocompetentes (células-T y -B) (14) y de la movilización de las células inflamatorias (granulocitos polimorfonucleares) (15) se modifican a través de la aplicación de emulsiones lipídicas, un fenómeno que hasta ahora no había sido descrito en ninguna bibliografía.

La infiltración y proliferación de células-T y -B se regula por citoquinas a través de la interacción celular (16). Así, investigamos la interleuquina-6 que junto con otras funciones inmunológicas participa en el rechazo agudo (16). La interleuquina-6 favorece la maduración de células-B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (17) y la diferenciación de células-T (16).

La producción y secreción de citoquinas se regula por la transducción de señales a través del sistema del segundo mensajero de los ácidos fosfolipídicos de araquidona (18,19,20). Es evidente que este sistema del segundo mensajero de ácidos fosfolipídicos de araquidona se modula mediante la aplicación intravenosa de emulsiones lipídicas con una variación de la relación de ácido araquidónico/eicosapentaénico de la reserva relevante de fosfolípidos de la membrana. En efecto, la secreción de interleuquina-6 estaba reducida en los animales infiltrados con aceite de pescado (acentuado n-3).

Endres sostenía ya en 1989 que las aplicaciones orales n-3 durante un espacio de 6 semanas, reducía la relación de ácidos de araquidona/eicosapentaénico de los fosfolípidos de las membranas de las células mononucleares y suprimía la secreción de citoquinas (21). A diferencia de la aplicación oral, se consiguió más rápidamente en nuestros experimentos este efecto, evidente a los 4 días de la aplicación del aceite de pescado. Pero en este círculo de regulación intervienen también las emulsiones lipídicas n-6 acentuadas, como nosotros lo hemos demostrado por primera vez.

El aceite de cardo (representante de emulsiones lipídicas n-6 acentuadas) redujo también el potencial de secreción de interleuquina-6 de las células mononucleares. La infiltración reducida de células específicas inmunocompetentes en los grupos de aceite de cardo y de pescado está aclarada por lo tanto por la producción reducida de citoquinas. La inhibición de proliferación e infiltración de células inmunocompetentes en el trasplante, causada por la reducción de citoquinas, llevó a una prolongación significativa del tiempo de supervivencia del trasplante.

Los diferentes tiempos de rechazo del trasplante, no se aclaran sólo a través de la modulación de los mecanismos de rechazo de las células mediadoras específicas T y B. Toda una serie de mecanismos no-específicos que también intervienen en el proceso de rechazo es regulada a través de mediadores lipídicos. La leucotriena B₄, sintetizada de ácidos lipídicos n-6 es una mediadora de adhesión, diapedesis (22) y quimiotaxis (23) de granulocitos polimorfonucleares neutrofilos. El tromboxano A₂ (derivado n-6) es un potente agregador de trombocitos y vasoconstrictor (24). La prostaglandina I₂ (derivado n-6) es un vasodilatador efectivo (24). La leucotriena B₄ y tromboxano A₂ se clasifican según estas características como factor estimulante del rechazo, prostaglandina I₂ como factor inhibidor del rechazo (3). Los mediadores lipídicos leucotriena B₅ y tromboxano A₃ que están sintetizados de ácidos grasos n-3 pierden las características de sus equivalentes n-6 (25), por el contrario la prostaglandina I₂ conserva el efecto vasodilatador de la prostaglandina I₂ (26).

Mediante las emulsiones lipídicas n-3 acentuadas se espera por lo tanto también una modificación de los mecanismos de rechazo no específicos y un debilitamiento del proceso de rechazo. Hace poco se comprobó en estudios clínicos y experimentales que una alimentación rica en ácidos grasos n-3 reduce la nefrotoxicidad que produce la ciclosporina y también la cuota de rechazo de trasplantes de riñón (27,28). En resumen, nuestros resultados demuestran que la infiltración celular y la proliferación de células inmunocompetentes en el lugar del proceso de rechazo inmunológico, está influida significativamente por la relación de ácidos grasos n-3/n-6 de emulsiones lipídicas intravenosas. Cuanto menos equilibrada es la relación de mezcla, más fuerte es la inhibición de la reacción de rechazo celular. Pero las emulsiones lipídicas no actúan fundamentalmente de manera inmunosupresiva. Lo que sí es decisivo es la relación de ácidos grasos n-3/n-6. Una relación equilibrada no afectó al rechazo celular. Tanto las emulsiones lipídicas acentuadas n-3 como n-6 redujeron la síntesis de citoquinas responsables de la interacción celular.

REFERENCIAS

- Nordenström J., Jarstrand L., Wismik A. Decreased chemotactic and random migration of leukocytes during intralipid (R) infusion. *Am J Clin Nutr*; 32:2426-2428. 1979.
- Calder P.C., Bevan S.J., Newsholme E.A. The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology* 75:108-115. 1992.
- Foegh M.L. Eicosanoids and platelet activating factor mechanisms in organ rejection. *Transplant Proc.* 20:1260. 1988.
- Leaf A. Effects of n-3 fatty acids on reocclusion after angioplasty. *Semin Thromb Hemost*; 14:290. 1988
- Weeks J.R. Long term intravenous infusion, in Meyers R.D. (ed). *Methods in psychobiology*, New York, Academic press. Vol 2. p.155. 1972.
- Heron I. A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats. *Acta Pathol Scand* 79:366. 1973.
- Kinsella J.E., Broughton K.S., Whelan J.W. Dietary unsaturated fatty acids. Interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *J Nutr Biochem* 1:123-141. 1990.
- Nowygrod R., Spotnitz H.M., Dubroff J.M., Hardy M.A., Reemtsma K. Organ mass: an indicator of heart transplant rejection. *Transplant Proc.* 15:11225-1231. 1983.
- Hayry P. Intragraft events in allograft destruction. *Transplantation.* 38:1-6. 1984.
- Mason D.W., Morris P.J. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol.* 4:119-145. 1986.
- Tilney N.L., Strom T.B., MacPherson S.G. et al. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allograft in inbred rats. *Transplantation.* 20:323-330. 1975.
- Rose M.L., Gracie J.A., Fraser A., Chisholm P.M., Yacoub M.H. Use of monoclonal antibodies to quantitate T. lymphocyte subpopulations in human cardiac allografts. *Transplantation* 38:230. 1984.
- Kinsella J.E. Lipids, membrane receptors, and enzymes.: effects of dietary acids. *JPEN* 14,5:200S-217s. 1990.
- Ruers T.J.M., Buurman W.A., Schutte B., van der Linden C.J., Kootstra G. Detection of cellular proliferation in rat cardiac allografts. *Transplant Proc.* 22,4:1933-1994. 1990.
- Christmas S.E., MacPherson G.G. The role of mononuclear phagocytes in cardiac allograft rejection in the rat. II. Characterization of mononuclear phagocytes extracted from rat cardiac allografts. *Cell Immunol.* 69:271. 1982.
- Halloran P., Batiuk T., Goes N. An overview of the cytokines in transplantation. *Transplantation Science* 3,2:69-76. 1993.
- Muraguchi A., Hirano T., Tang B. The essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B-cells. *J Exp Med.* 167:332. 1988.
- Abdel-Latif A.A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev* 38:227-272. 1986.
- Berridge J.M. Inositol triphosphate and diacylglycerol. Two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem.* 56:159-193. 1987.
- Majerus P.W., Conolly T.M., Deckmyn H. et al. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science.* 234:1519-1526. 1986.
- Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K., Lonnemann G., van der Meer J.W.M., Cannon J.G., Rogers T.S., Klempner M.S., Weber P.C., Schaefer E.J., Wolff S.M., Dinarello C.A.: The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *The New England Journal of Medicine.* 320:255-271. 1989.
- Dahlen S.E., Bjork J., Hedquist P., Arfors K.E., Hammarström S., Lindgren J.A., Samuelson B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:3887-3891. 1981.
- Goetzl E.J., Pickett W.C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol.* 125:1789-1791. 1980.
- Moncada S., Vane J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 30:293-331. 1979.
- Lee T.H. Pharmacological modulation of leukotriene and platelet activating factor biosynthesis and activities by alternative dietary fatty acids. *Clin Exp Allergy.* 19:15-23. 1989.
- Johnson R.A., Lincoln F.H., Nidy E.G., Schneider W.D., Thompson J.L., Axen U. Synthesis and characterization of prostacyclin, 6-keto-prostaglandin F_{1α}, prostaglandin I₁, and prostaglandin I₃. *J Am Chem Soc.* 100:7690-7705. 1978.
- Kelley V.E., Kirkman R.L., Bastos M., Barret L.V., Strom T.B. Enhancement of immunosuppression by substitution of fish oil for olive oil as a vehicle for cyclosporine. *Transplantation* 48:98-102. 1989.
- van der Heide H.J.J., Bilo H.J.G., Donker J.M., Wilming J.M., Tegzess A.M. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *The New England Journal of Medicine.* 329:769-773. 1993.

Recibido: 12-01-1995

Aceptado: 12-09-1996