

LÍPIDOS AISLADOS DE LECHE MATERNA REGULAN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS (Caco-2)

Sánchez^{2,3} Gabriela. y Barrera^{1,3} Girolamo.

¹Universidad de Carabobo

²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

³Laboratorio de Biotecnología Aplicada

girolamobarrera@hotmail.com

Resumen

La leche materna consiste en una mezcla de carbohidratos, proteínas y lípidos, muchos de los cuales constituyen compuestos bioactivos cuya función no ha sido explorada en su totalidad. Además de proporcionar nutrientes, confiere protección, desarrollo, tolerancia y modulación de la respuesta inflamatoria, especialmente en el sistema gastrointestinal del bebé. En la última década, ha tomado auge el estudio de lípidos en los métodos de señalización celular que regulan procesos tales como proliferación, metabolismo, e inflamación celular. En este sentido, la investigación se propuso estudiar el efecto de los lípidos de leche materna humana sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL6 e IL8) y antiinflamatoria (IL-10) en células epiteliales intestinales humanas (Caco-2). Para ello se cultivaron y estimularon células HT-29 con distintas concentraciones de lípidos de leche materna durante 48 h y se cuantificaron los niveles de las citoquinas: Interleuquina 6 (IL6), Interleuquina 8 (IL8), e Interleuquina 10 (IL10) mediante un ensayo inmuno enzimático (ELISA), y los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) correspondiente a cada citoquina mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de tipo cuantitativo (PCR en tiempo real). Se observó que los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias disminuyeron significativamente entre dos y tres veces ($p<0,01$) en células estimuladas con concentraciones crecientes de lípidos aislados de leche materna humana. Estos resultados sugieren que los lípidos de leche materna humana pudieran tener un rol importante sobre la modulación de citoquinas en el intestino del neonato.

Palabras clave: lípidos, leche materna, expresión de citoquina, células intestinales, Caco-2.

Introducción

La lactancia materna es el método de alimentación recomendado por excelencia para un recién nacido durante los primeros 6 meses de vida [ESPGAN, (1982); Koletzko *et al.*, (2001)]. Consiste en una mezcla de carbohidratos, lípidos y proteínas, entre los cuales se destacan diversos compuestos bioactivos tales como hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, lípidos, citoquinas, glutamina, lactoferrina, péptidos antimicrobianos, nucleótidos que influyen en el crecimiento y desarrollo del bebé, y especialmente se ha encontrado un papel importante de estos mediadores en la protección contra enfermedades gastrointestinales (Bernt y Walker, 1999).

En general, el promedio de lípidos contenido en la leche humana es cercano a 3,8 g/mL, aunque este valor presenta grandes variaciones [Koletzko, *et al.*, (2001)]. Se han identificado de la leche materna más de 200 ácidos grasos de diferente longitud de cadena e instauraciones, incluyendo el ácido linoleico (18:2n-6), el ácido α -linoleico (18:2n-3), dos ácidos grasos esenciales; y los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) de cadena larga, el ácido araquidónico (AA) (20:4n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6n-3) (Innis, 2007). Esta composición de ácidos grasos poli-insaturados es de vital importancia para el lactante pues presenta cierta inmadurez enzimática para la generación de un ácido graso a partir de los demás (Vilaplana, 2011). Los componentes lipídicos de la leche

materna proveen la mayor fuente de energía, contribuyendo con un 40-55% de la energía total producida por el neonato. Los PUFA de cadena larga sirven como componentes estructurales indispensables de las membranas celulares, además se destaca el efecto de los PUFA en el desarrollo neurológico y retinal o sensorial del bebé (Fleith y Clandinin, 2005), es por ello que muchas compañías se han avocado a suplementar con proporciones DHA y AA sus formulas infantiles, obteniendo resultados favorables. Field *et al* (2005) hace referencia a algunos estudios de los PUFA y el desarrollo del sistema inmune. Sin embargo, ha sido poco estudiado el papel de lípidos en la regulación de este sistema y las vías de señalización implicadas.

De este modo, se ha demostrado que un gran número de formas lipídicas tales como eicosanoides, fosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos, están implicadas en rutas de señalización celular actuando como mensajeros intracelulares y extracelulares que llevan a controlar la proliferación celular, apoptosis, metabolismo y migración celular (Zhang y Wakelam, 2010). También se destaca su papel en la regulación positiva y negativa de la inflamación celular. La transducción de la señal de los lípidos ocurre principalmente por los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), los receptores de ácido retinoico (RXRs) principalmente, y también a través de receptores tipo Toll 2 y 4, y receptores purinérgicos. Distintos estudios demuestran la capacidad agonista o antagonista de los

ligados lipídicos de estos receptores, y la modulación de la respuesta inflamatoria dada por el perfil de citoquinas (Lee y Hwang, 2006).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es estudiar el papel de los lípidos de leche materna en la regulación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8 e IL-6) y anti-inflamatorias (IL-10) en células epiteliales de colon de la línea celular Caco-2.

Materiales y Métodos

Material biológico y aislamiento de lípidos de leche materna: Se colectaron muestras de leche humana de madres voluntarias sanas (18-30 años) entre las 2-4 semanas post-parto, por medio de masajes manuales. Ninguna de las mujeres presentó antecedentes de enfermedades gastrointestinales, respiratorias, reumatólogicas, cardiovasculares. Todas las muestras se obtuvieron previo consentimiento firmado, y el estudio fue aprobado por el comité de investigación en bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). La extracción de lípidos se realizó según el método de Folch *et al.*, (1957).

Cultivo de células: La línea celular de colón Caco-2 (pases 7-17) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA), y fueron cultivadas de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 IU/mL, estreptomicina 50 mg/mL y suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%, a una

temperatura de 37°C y en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono.

ELISA: Se cultivaron células Caco-2 en placas de 6 pozos a una concentración de 2×10^5 células/mL y al obtener 50 % de confluencia, se colocaron en un medio sin FBS durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con distintas concentraciones de lípidos de leche materna (10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lípidos específicos comerciales (100 ng/mL) ó vehículo (DMSO 0,1%) durante 48 h. En algunos experimentos, las células fueron pre- incubadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS ó con maleato de perhexilina 80 μM durante 24 h, previo al tratamiento con los lípidos por 48 h. Se centrifugaron las células a 1000 g por 15 min a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante. Se realizaron ELISA comerciales para IL-6, IL-8 e IL-10 (Invitrogen Life Technologies N° de catalogo KHC0069, KHC0081 y KHC0101, respectivamente). Para la determinación de la cantidad de Proteína C reactiva se empleó el Kit comercial biogamma (Laboratorios Biogamma, Venezuela), y se siguieron las instrucciones del fabricante.

IV Reacción de la transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTq-PCR): Se Siguió el procedimiento inicial descrito anteriormente, luego de la centrifugación a 1000 g durante quince minutos, se tomó el precipitado. La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante mediante TrizolTM (Invitrogen, USA). La concentración y pureza del ARN se midió empleando un especrofotómetro Synergy HT spectrophotometer-BioTek Instruments). Se empleó un

total de 1 µg de ARN para transcribirlo a ADN complementario (cDNA) empleando un kit comercial (Invitrogen ThermoScriptTM RT-PCR System) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR en tiempo real (RTq-PCR) empleando los primers reportados por Barrera y col. (2009) y siguiendo la metodología de Saegusa et al., (2007).

Los datos se presentaran como la media ± desviación estándar, el análisis estadístico aplicado será la prueba T de student para datos no apareados, tomando como significativo un valor de $p<0,05$.

Resultados y Discusión

Los lípidos totales de leche materna (LTLM) tienen un efecto anti-inflamatorio. Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de los LTLM sobre células previamente activadas con LPS de la línea celular Caco-2 y se obtuvo una disminución de proteína C reactiva directamente proporcional a la concentración de lípidos empleada en el ensayo. La proteína C reactiva constituye una proteína de fase aguda, comúnmente empleada como un marcador muy sensible de la inflamación y el daño tisular (Tillett y Francis, 1930), y su disminución en el modelo empleado indica que los LTLM ejercen una respuesta anti-inflamatoria. Por lo tanto, posteriormente se realizaron ensayos en la regulación los LTLM sobre citoquinas pro y anti inflamatorias.

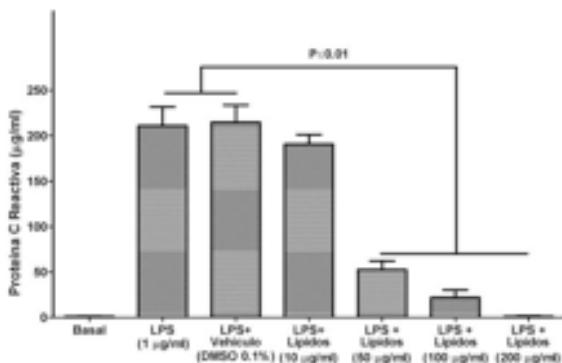


Figura 1. Efecto de los lípidos totales de la leche materna sobre la cantidad de proteína C reactiva detectada en células Caco-2.

Los LTLM regulan negativamente la cantidad de IL6 e IL8 y positivamente la cantidad de IL-10 secretadas por células intestinales Caco-2: Para evaluar

el efecto de la fracción lipídica de la leche materna sobre células intestinales de colon en la línea celular Caco-2, éstas se incubaron con distintas concentraciones

de lípidos con o sin estimulación previa con 1 µg/mL de lipopolisacárido (LPS), y se midió por la técnica de ELISA (Figura 2A, B, y C) y de PCR en tiempo real (RTq-PCR) (Figura 2 D, E, y F) la cantidad o niveles de expresión de IL-6, IL-8 e IL-10. En la Figura 2, se muestra una disminución de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 de forma inversamente proporcional al aumento de la concentración de lípidos en células

pre-incubadas con LPS, hasta que a la más alta concentración de lípidos evaluada (200 µg/mL) se obtuvieron valores cercanos al valor basal sin estimulación con LPS. Del mismo modo, se observó un aumento de IL-10, una citoquina con efecto anti-inflamatorio, en células sin estímulo previo de LPS de manera directamente proporcional a la concentración de LTLM empleados (Figura 2 C y F).

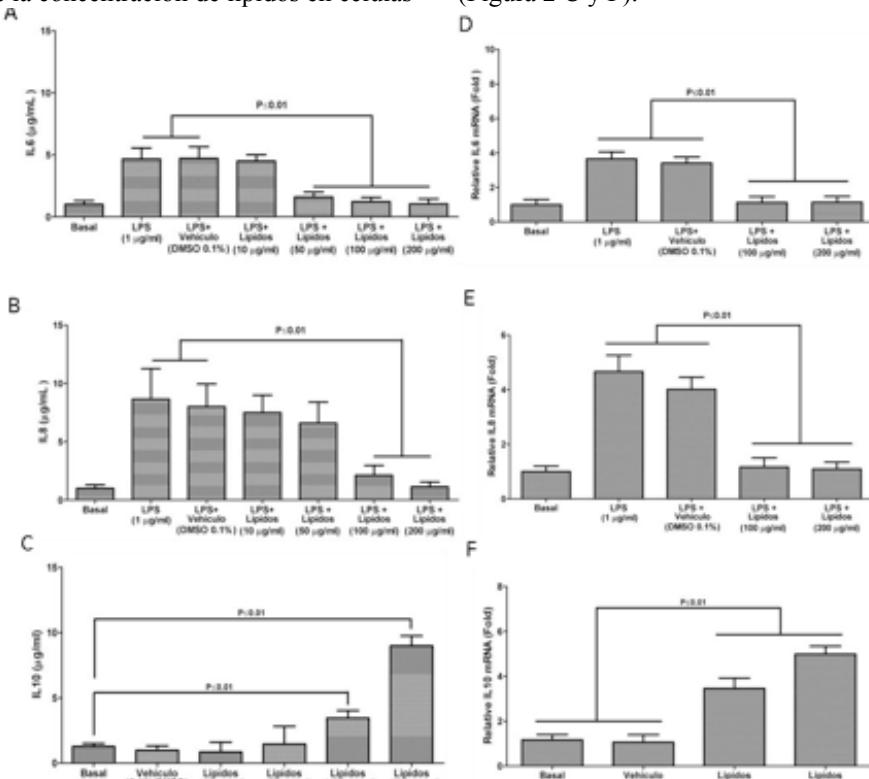


Figura 2. Efecto de los lípidos totales de leche materna sobre la cantidad (A, B y C) y los niveles de expresión (D, E y F) de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 y anti- inflamatorias IL-10 en células intestinales Caco-2.

Algunos fosfolípidos y ácidos grasos específicos de leche materna pueden regular negativamente las citoquinas

pro-inflamatorias: Para discernir cuales eran los lípidos responsables por el efecto anti-inflamatorio observado en la

fracción lipídica total en leche materna, se procedió a evaluar una batería de lípidos purificados comerciales, encontrados en una alta proporción en la leche materna. Se obtuvo que los fosfolípidos: fosfatidilcolina y fosfatidilserina, y los ácidos grasos: ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido araquidónico, también regulaban negativamente los niveles de expresión de las citoquinas IL-6 e IL-8 en células Caco-2 previamente estimuladas con LPS, cuantificado por RTq-PCR (Figuras 3 A y B). Mientras

que se obtuvo que las citoquinas pro-inflamatorias no disminuyeron en comparación con las células previamente estimuladas con LPS, al ser incubadas con el ácido caprino, que se utilizó como control negativo debido a que es un ácido graso que no se encuentra reportado como parte de los lípidos de la leche materna. Esto comprueba que el efecto anti-inflamatorio es específico para los lípidos de leche materna y no cualquier lípido con estructura parecida.

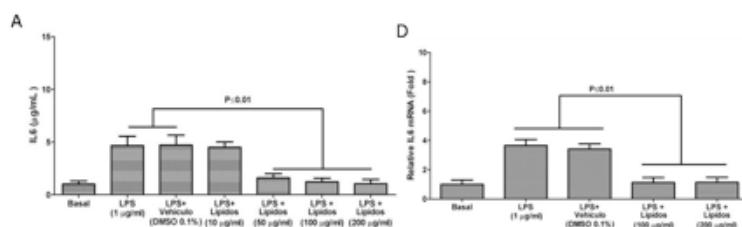


Figura 3. Efecto de los lípidos específicos de leche materna sobre los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 (A) e IL-8 (B) en células Caco-2.

El maleato de perhexilina inhibe el efecto anti-inflamatorio de la fosfatidilcolina y el ácido palmitoleico: El maleato de perhexilina es una droga que inhibe a la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (Li *et al.*, 2008). Se determinó la regulación de dos citoquinas pro-inflamatorias en presencia de este inhibidor, empleando los lípidos específicos presentes en leche materna que tuvieron el mayor efecto anti-inflamatorio en el modelo utilizado, como lo son la fosfatidilcolina y el ácido palmitoleico. Se observó que el nivel de expresión de las citoquinas

IL-6 e IL-8 disminuía significativamente en presencia de LPS, mientras que al ser preincubadas con LPS y el inhibidor maleato de perhexilina, este efecto era abolido, ya que los niveles de citoquinas se mantenían altos. De estos experimentos se puede deducir que el efecto anti-inflamatorio depende del transporte de estos lípidos específicos al interior de la célula, y de la señalización intracelular resultante.

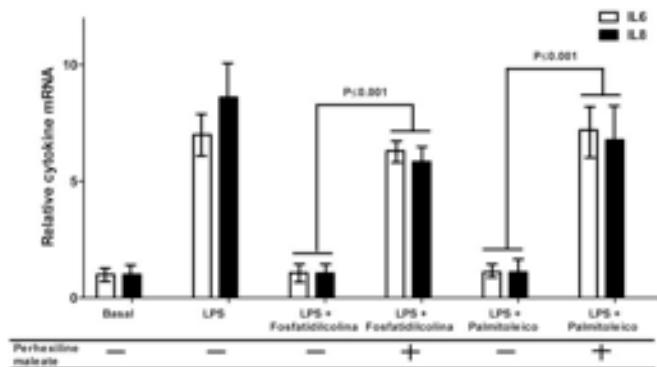


Figura 4. Efecto de la fosfatidicolina y el ácido palmitoleico sobre la regulación de las citoquinas IL-6 e IL-8 al ser preincubado con el inhibidor maleato de perhexilina.

Discusión de Resultados

El papel de los lípidos de leche materna ha sido estudiado de forma amplia en la última década, dado los beneficios, se tiene que la proporción y composición de lípidos encontrados en la leche materna no es reproducido en las formulas comerciales (Smit *et al.*, 2003). En este sentido, Lucas y Cole (1990) realizaron un estudio donde la alimentación con leche materna humana está asociada con la reducción del riesgo de padecer una enfermedad inflamatoria como la enterocolitis necrotizante del neonato en comparación con bebés alimentados con fórmula.

En el presente trabajo se describe el efecto anti-inflamatorio que presentan los LTLM en células intestinales humanas, dado por la disminución de la proteína C reactiva (Figura 1), de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8, así como el aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Figura 2). Como se describió anteriormente, se conoce

poco sobre los efectos de los lípidos en el sistema inmune y su efecto en la señalización que conlleva a este efecto anti-inflamatorio observado.

Se conoce que los PUFA de cadena larga consumidos en la dieta pueden modular la generación de células Th1 y Th2 en adultos. Field *et al.*, (2001) reportaron que los niños alimentados con formulas supplementadas con DHA y AA tenían poblaciones de linfocitos CD4 de memoria ó activadas por antígeno (CD45RO) y la cantidad de IL-10, parecidas a la presentada por bebés alimentados con leche materna humana, a diferencia de bebés alimentados con fórmula no suplementada (Field, 2005). En este sentido, se encontró que los lípidos específicos que producían el efecto anti-inflamatorio eran mayormente los fosfolípidos: fosfatidicolina (PC) y fosfatidilsérina; y los ácidos grasos: oleico, palmitoleico y el AA (Figura 3). Se destaca que la PC ha mostrado tener efecto anti-inflamatorio. Estudios recientes muestran que en enfermedades

inflamatorias del colon, como la colitis ulcerativa, los pacientes que la padecen muestran menor contenido de PC en comparación con individuos sanos, mientras que el tratamiento con PC disminuye la actividad inflamatoria. Treede *et al.*, (2007) realizaron experimentos en la línea celular Caco-2 donde observaron una inhibición de la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α , dada por la inhibición de la actividad de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ERK y p38 y de NF- κ B (que promueve la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias), mientras que otros fosfolípidos como la esfingomielina no producían estos efectos (Schneider *et al.*, 2010). Además otros autores señalan como uno de los receptores que media esta señalización a los PPAR γ 2 y PPAR α , indicando que la activación de estos receptores promueven una respuesta Th2 y disminuye la inflamación de enfermedades como la colitis (Saubermann *et al.*, 2002). De hecho, estudios recientes sugieren que la 1-palmitoil-2- oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina es un ligando endógeno de PPAR α (Chakravarthy *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2010).

En cuanto a los ácidos grasos, el ácido palmitoleico obtuvo el mayor efecto anti- inflamatorio, sin embargo no hay reportes de su papel en la inflamación. Por otro lado, Lee y col. (2001) reporta que en macrófagos los ácidos grasos no saturados promueven respuestas pro-inflamatorias; mientras que varios ácidos grasos insaturados, incluyendo PUFA s n-6 como el ácido araquidónico inhiben la expresión de genes tales como

COX- 2, iNOS e IL-1 α . Así mismo, se ha reportado que productos de nitración de ácidos grasos insaturados producidos de manera dependiente de reacciones de oxidación dependientes de óxido nítrico, un producto lipídico endógeno, tales como el ácido oleico 9- o 10-nitrooctadecanoico (OA-NO₂) es un agonista de PPAR γ y disminuye la actividad inflamatoria en el modelo experimental de la enfermedad intestinal inflamatoria [Borniquel *et al.*, (2010)]. En la Figura 4 se demuestra que el efecto anti-inflamatorio es bloqueado por el inhibidor de FATP, por lo cual se deduce que se necesita de la entrada de los lípidos específicos a la célula, para ejercer su señalización intracelular, posiblemente a través de receptores intracelulares como estudios sugieren que la PC es ligando de PPAR [Schneider *et al.*, (2010)].

Todos estos datos en conjunto, sugieren que factores lipídicos como fosfolípidos y ácidos grasos insaturados que se encuentran en la leche materna pudieran activar receptores específicos en células intestinales de colon que activan una señalización intracelular y de ese modo pudieran modular la respuesta inmune en el intestino del neonato, confirriendo una posible protección frente a enfermedades inflamatorias.

Conclusiones

El entendimiento de la composición y las propiedades funcionales de los lípidos de leche materna pueden proveer una guía valiosa para el desarrollo de nuevas fórmulas infantiles suplementadas que las mejoren, mas no

se pretende sustituir todos los numerosos beneficios de la alimentación con leche materna.

La protección que ofrece la leche materna frente a enfermedades inflamatorias intestinales en neonatos, pudiera estar asociada al efecto de los lípidos contenidos sobre rutas de señalización y modulación de citoquinas en enterocitos.

Referencias bibliográficas

- Barrera, G.; Portillo, R.; Mijares, A.; Rocafull, M.; del Castillo, J.; Thomas, L.; (2009). Immunoglobulin A with protease activity secreted in human milk activates PAR-2 receptors, of intestinal epithelial cells HT-29, and promotes beta-defensin-2 expression. *Immunology Letters*, 123: 52–59.
- Bernt K., Walker W., (1999). Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr* , 88(430):27-41(Suppl.)
- Borniquel, S., Jansson, E., Marsha, P.; Bruce A.; Lundberg, J.; (2010). Nitrated oleic acid up-regulates PPAR γ and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 48: 499–505.
- Chakravarthy, M., Lodhi, I., Yin, L.; Malapaka, R.; Xu, H.; Turk J.; Semenkovich, C.; (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*, 138: 476–488.
- ESPGAN Committee on Nutrition. 1982. Guidelines on infant nutrition: III. Recommendations for infant feeding. *Acta paediatrica Scandinavica*; 302 :1–27.
- Fernández, I., De las Cuevas, I., (2006). Enterocolitis necrotizante neonatal. *Boletín Pediátrico*, 46(SUPL. 1): 172-178
- Field, C. (2005). The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *The Journal of Nutrition*, 135(1):1-4.
- Fleith, M., Clandinin, M. (2005). Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(3):205-229.
- Folch, J., Lees M., Sloane, G., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
- Fullekrug, W., Stremmel, G., Griffiths, R., Ehehalt. (2007). Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 27155–27164.
- Innis, S. (2007). Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66: 397–404.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, Jensen, R., Sauerwald, T., (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, 65: S3–S18 (Suppl.).
- Lee, Y., Hwang, D., (2006). The Modulation of Inflammatory Gene Expression by Lipids: Mediation through Toll-like Receptors. *Molecular Cells*, 21(2):174-185.
- Li, H., Black, P., Chokshi, A., Sandoval-Alvarez, A., Vatsyayan, R., Sealls W., DiRusso, C., (2008). High-throughput screening for fatty acid uptake inhibitors in humanized yeast identifies atypical antipsychotic drugs

- that cause dyslipidemias. *Journal of Lipid Research*, 49: 230-244.
- Saegusa, S. Totsuka, M. Kaminogawa S., Hosoi. T., (2007). Cytokine Responses of Intestinal Epithelial-Like Caco-2 Cells to Non Pathogenic and Opportunistic Pathogenic Yeast in the presence of Butyric Acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10): 2428-2434.
- Saubermann, L., Nakajima, A., Wada, K., Zhao, S., Terauchi, Y. Kadowaki, T. Aburatani, H. Matsuhashi, N. Nagai R., Blumberg. R., (2002). Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma Agonist Ligands Stimulate a Th2 Cytokine Response and Prevent Acute Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 8(5):330–339.
- Schneider, H., Braun, A. Füllekrug, J. Stremmel W., Ehehalt. R., (2010). Lipid Based Therapy for Ulcerative Colitis: Modulation of Intestinal Mucus Membrane Phospholipids as a Tool to Influence Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 4149-4164.
- Smit, E., Martini, I., Kemperman, R., Schaafsma, A. Muskiet F., Boersma. E. (2003). Fatty acids in formulae for term infants: compliance of present recommendations with the actual human milk fatty acid composition of geographically different populations. *Acta Paediatr.*, 92(7):790-796.
- Tillett, W., Francis. T., (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine*, 52:561-571.
- Treede, I., Braun, A., Sparla, R., Kuhnel, M., Giese, T., Turner, J., Anes, H., Kulaksiz, J. Vilaplana, M., (2011). Nuevos nutrientes en leches infantiles. Ámbito farmacéutico, nutrición 30 (1): 46-52.
- Wymann, M., Schneiter. R., (2008). Lipid signalling in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 162-176.
- Zhang, Q. y M. Wakelam. 2010. Chemistry and Physics of Lipids, 163:S7.