



Universidad de Sevilla

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

TESIS DOCTORAL

NUEVAS ESTRATEGIAS Y MECANISMOS DE  
INMUNOMODULACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LAS  
HEMOPATÍAS MALIGNAS

Isabel Álvarez Laderas

2017





D. José Antonio Pérez Simón, Doctor en Medicina, Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, Investigador Responsable del Laboratorio de Terapia celular y nuevas dianas terapéuticas en oncohematología del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) y Profesor titular de la Universidad de Sevilla

**CERTIFICA:**

Que el trabajo doctoral titulado “Nuevas estrategias y mecanismos de inmunomodulación en el tratamiento de las hemopatías malignas” elaborado por D<sup>a</sup> Isabel Álvarez Laderas, licenciada en Bioquímica, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla a 26 de Abril de 2017.

Fdo. Dr. José Antonio Pérez Simón



D<sup>a</sup>. Teresa Caballero Velázquez, Doctora en Medicina,

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral titulado “Nuevas estrategias y mecanismos de inmunomodulación en el tratamiento de las hemopatías malignas” elaborado por D<sup>a</sup> Isabel Álvarez Laderas, licenciada en Bioquímica, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla a 26 de Abril de 2017.

Fdo. Dra. Teresa Caballero Velázquez

# ÍNDICE

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.2 Papel del sistema inmune en el control del cáncer.....	5
1.2 Linfocitos T CD4.....	6
1.2.1 Factores de transcripción críticos para la diferenciación del linaje T Helper.....	8
1.2.1.1 Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th1.....	8
1.2.1.2 Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th2.....	8
1.2.1.3. Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th17.....	9
1.2.1.4. Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Treg.....	9
1.2.2 Modificaciones epigenéticas.....	9
1.3 IMiDs .....	12
1.3.1 Propiedades de los IMiDs.....	13
1.3.1.1 Inmunológicas.....	13
1.3.1.1.1 Supresión de la producción de TNF $\alpha$ por monocitos inducidos por LPS y la actividad antiinflamatoria asociada.....	14
1.3.1.1.2 Coestimulación de linfocitos T.....	14
1.3.1.1.3 Aumento de las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK.....	15
1.3.1.2 Teratogénicas.....	16
1.4 Enfermedad injerto contra receptor.....	17
1.4.1 Fases de la Enfermedad Injerto Contra Receptor.....	18
1.4.1.1 Fase 1: activación de células presentadoras de antígeno.....	18
1.4.1.2 Fase 2: activación de células T del donante.....	18

1.4.1.3 Fase 3: fase efectora celular e inflamatoria.....	21
1.4.2 Tratamiento de la EICR.....	22
1.5 Polifenoles.....	23
1.5.1 Clasificación de los polifenoles.....	23
1.5.1.1 Flavonoides.....	23
1.5.1.2 Ácidos fenólicos.....	24
1.5.1.3 Alcoholes fenólicos.....	26
1.5.1.4 Estilbenos.....	26
1.5.1.5 Lignanos.....	27
1.5.2 Propiedades de los polifenoles.....	27
1.5.2.1 Actividad anti-oxidante.....	27
1.5.2.2 Actividad anti-cancerígena.....	28
1.5.2.4 Actividad anti-proliferativa.....	28
2.5.2.4 Actividad anti-inflamatoria.....	29
2. Objetivos.....	31
3. Material y métodos.....	35
3.1 Materiales.....	37
3.1.1 Material biológico.....	37
3.1.1.1. Obtención de células para cultivo.....	37
3.1.1.2. Animales.....	37
3.1.2 Material no biológico.....	37
3.1.2.1 Reactivos utilizados.....	37
3.1.2.2 Soluciones.....	39
3.2. Métodos.....	41
3.2.1 Extracción de la fracción polifenólica del aceite de olive virgen extra.....	41

3.2.2 Cultivos.....	41
3.2.2.1 Separación de células CD45RA.....	42
3.2.2.2 Polarización de linfocitos T CD45RA+ hacia linfocitos Th1 y Th2.....	42
3.2.2.2.1 Polarización hacia Th1.....	42
3.2.2.2.2 Polarización hacia Th2.....	43
3.2.3. Estudios de citometría de flujo.....	44
3.2.3.1 Análisis por citometría de flujo del inmunofenotipo de los linfocitos T polarizados.....	44
3.2.3.2 Estudios de viabilidad celular a las 18 horas de cultivo (CD25/Anexina-v/7-AAD/CD3) de linfocitos t tratados con FP del AOVE.....	45
3.2.3.3 Estudios de proliferación de linfocitos T tratados con la FP del AOVE (PKH/CD25/CD3).....	47
3.2.3.4 Estudio de citoquinas solubles por citometría de flujo.....	49
3.2.3.4.1 Estudio de citoquinas solubles de linfocitos T CD45RA+ polarizados hacia linfocitos Th1 y Th2.....	49
3.2.3.4.2 Estudio de citoquinas solubles de linfocitos T tratados con la FP del AOVE.....	50
3.2.4 Estudio de citoquinas solubles por ELISA.....	50
3.2.5 Estudios de Western Blot.....	51
3.2.5.1 Expresión de los factores de transcripción TBET y GATA3 en linfocitos CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28, citocinas y pomalidomida.....	51
3.2.5.2 Expresión de p-AKT, y NFκB en cultivos de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 tratados con FP de AOVE.....	53
3.2.6 Estudios de ChiP.....	54
3.2.6.1 Crosslinking.....	54



3.2.6.2 Lisis y sonicación.....	55
3.2.6.3 Cuantificación y chequeo.....	55
3.2.6.4 ChiP.....	56
3.2.6.5 Lavados y elución.....	56
3.2.6.6 Descrosslinking y tratamiento con proteinasa K.....	56
3.2.4 Estudios in vivo.....	57
3.2.4.1 Células empleadas en el trasplante.....	57
3.2.4.2 Alimentación.....	58
3.2.4.3 Irradiación.....	58
3.2.4.4 Trasplante.....	59
3.2.4.5 Evaluación de EICR.....	60
3.2.4.6 Análisis de hematimetría.....	60
3.2.4.7 Análisis histológico.....	60
3.2.4.8 Análisis por citometría de flujo.....	61
3.2.4.8.1 Análisis de citocinas en plasma.....	61
3.3 Análisis estadístico.....	62
4. Resultados.....	64
4.1. Efecto de la pomalidomida en la polarización de los linfocitos T.....	66
4.1.1 Ensayos funcionales.....	66
4.1.2 Patrón de citocinas en suero.....	68
4.1.3 Efecto de la pomalidomida en la expresión de los factores de transcripción TBET y GATA3.....	71
4.1.4 Efecto de la pomalidomida sobre las marcas de activación e inhibición de histonas en los factores de transcripción TBET y GATA3.....	73

4.2 Efecto inmunomodulador de los PF del AOVE en la EICR.....	75
4.2.1 Ensayos in vitro.....	75
4.2.1.1 Efecto de los PF del AOVE en la viabilidad celular.....	75
4.2.1.2 Efecto de los PF del AOVE en la activación celular.....	76
4.2.1.3 Efecto de los PF del AOVE en la proliferación celular.....	79
4.2.1.4 Efecto de la FP del AOVE en la producción de citoquinas.....	82
4.2.1.5 Estudio de vías de señalización implicadas en la activación del linfocito T.....	84
4.2.2 Ensayo in vivo.....	87
4.2.2.1 Modelo murino de EICR aguda.....	87
4.2.2.2 Estudios de hematimetría.....	89
4.2.2.3 Estudios de citometría.....	91
4.2.2.4 Estudios de citocinas en plasma.....	92
4.2.2.5 Cuantificación de butirato en heces.....	94
4.2.2.6 Estudios de histología de piel e intestino delgado.....	95
4.2.2.6.1 Valoración histológica de la piel.....	95
4.2.2.6.2 Valoración histológica del intestino delgado.....	97
5. Discusión.....	100
6. Conclusiones.....	112
7. Bibliografía.....	116



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN.

El sistema inmune desempeña un papel clave en la etiopatogenia del cáncer: impide el desarrollo de células tumorales y modela la inmunogenicidad de las células. Este sistema es un ejemplo de autorregulación sutil en el que podemos intervenir con diversas drogas. La tumorigénesis en humanos es un proceso con distintas fases y cada una refleja alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de células humanas normales en células malignas. Estas células tienen defectos en los circuitos regulatorios que controlan la proliferación y la homeostasis de las células normales. Hanahan y col. sugieren que los genotipos de las células cancerosas son una manifestación de 6 alteraciones en la fisiología de las células que colectivamente dirigen el crecimiento maligno: auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales de inhibición de crecimiento, evasión de muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo sin límites, angiogénesis sostenida, e invasión de tejidos y metástasis<sup>1</sup>. Sin embargo, actualmente está adquiriendo importancia el papel del microambiente del tumor y las células inmunes infiltrantes (término que engloba células con actividad inflamatoria propiamente dicha y aquellas con actividad más sutil)<sup>2</sup>.

En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias que pretenden explotar el potencial efecto del sistema inmune sobre el cáncer entre las que destacan las células T de receptor antigénico quimérico (Tcars), los inhibidores de “check point” y los IMiDs. Los CARS son quimeras de dominios derivados de anticuerpos y receptores de células T. Destacan las células T-CAR dirigidas frente a CD19 que han mostrado una respuesta completa en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B. También son efectivas frente a leucemias linfoblásticas crónica de células B, linfomas de células B y mieloma múltiple<sup>3</sup>.

Otra de las estrategias recientemente utilizadas son los inhibidores de “checkpoint”. Los receptores inhibidores de las células inmunes responden a uniones de membrana y a ligandos solubles para abortar o mitigar la intensidad de las respuestas inmunes elevando los umbrales de activación, deteniendo la proliferación o favoreciendo la apoptosis. Estos mecanismos inhibitorios seleccionados evolutivamente, son conocidos como “check points” y potencian la respuesta inmunológica contra el cáncer. Destacan los anticuerpos monoclonales (mAb) que interfieren con CTLA-4-CD80 / 86, PD-1-PD-L1, TIM3-GAL9 y LAG3-MHC-II<sup>4</sup>.

Los IMiDs son una familia de compuestos inmunomoduladores empleados en el tratamiento de diversas enfermedades debido a sus propiedades inmunomoduladoras y anti-tumorales. Poseen además actividad anticancerígena con selectividad para subgrupos de neoplasias malignas hematológicas, específicamente de células B maduras y los síndromes mielodisplásicos con delección del cromosoma 5q<sup>-5</sup>.

Antes del desarrollo de todas estas estrategias, el trasplante alogénico supuso la primera aproximación terapéutica basada en terapia celular en el tratamiento del cáncer y en particular en el de las hemopatías malignas. La infusión de médula ósea y progenitores hematopoyéticos movilizados contiene también linfocitos T TCR  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que favorecen el injerto, reconstituyen la inmunidad celular y ejercen un efecto antitumoral conocido con Enfermedad Injerto contra Receptor (EICL). Desafortunadamente, estas células también generan la Enfermedad Injerto contra Receptor (EICR)<sup>6</sup>.

Por otro lado, los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas y presentan diversas propiedades biológicas, fundamentalmente antiinflamatorias, antioxidantes y antiproliferativas<sup>7</sup> que podrían ser útiles en la profilaxis y tratamiento de la EICR.

En este trabajo nos centraremos en el estudio de la pomalidomida y los polifenoles derivados del aceite de oliva virgen extra como agentes inmunomoduladores. Ambos grupos de compuestos actúan a través de diversos mecanismos, algunos de ellos escasamente conocidos, lo que, unido al hecho de que aún en la actualidad se están identificando gran cantidad de polifenoles, convierte a estos compuestos en un área de investigación realmente interesante, tanto desde el punto de vista básico como por su potencial uso en clínica.

### **1.1 PAPEL DEL SISTEMA INMUNE EN EL CONTROL DEL CANCER**

La relación entre sistema inmune y cáncer ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años y fue Rudolph Virchow quien por primera vez, hace aproximadamente 150 años, destacó su importancia. Esta relación se basa en tres principios básicos de cómo el sistema inmune actúa para proteger y defender al individuo: detecta antígenos no propios de patógenos o células malignas o infectadas, permite que las funciones efectoras destruyan específicamente patógenos o células infectadas mientras que protegen al hospedador y desarrollan la memoria inmunológica a través de la respuesta inmune adaptativa. A través de este proceso, el sistema inmunológico ha adquirido características que dan lugar al paradigma conocido en el ámbito de la oncología como “inmunoedición”, que proporciona un equilibrio entre vigilancia y progresión del cáncer. Este mecanismo multifacético consta de tres fases primarias: eliminación, equilibrio y escape, que contribuyen a la eliminación del cáncer, la latencia y la progresión, respectivamente<sup>8</sup>.



## 1.2 LINFOCITOS T CD4.

Los linfocitos T CD4 juegan un papel clave en la protección inmune. Esto se debe a su capacidad para estimular la citotoxicidad celular y humoral, estimular la actividad microbicida de los macrófagos, reclutar neutrófilos, eosinófilos y basófilos en sitios de infección e inflamación, entre otros mecanismos.

Dependiendo de las señales producidas por las células inmunes innatas, las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden diferenciarse en distintas células efectoras: T helper 1 (Th1), T Helper 2 (Th2), T Helper 17 (Th17) o T reguladoras (Treg)<sup>9</sup>.

Los linfocitos Th1 median la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares. En humanos, juegan un papel importante en la resistencia a infecciones micobacterianas y son responsables de enfermedades autoinmunes. Entre las citoquinas que producen destacan IFN- $\gamma$ , linfotoxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) e IL-2<sup>10</sup>.

El IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 activa a los macrófagos aumentando su actividad microbicida<sup>11</sup>. LT $\alpha$  se considera un marcador de progresión en pacientes con esclerosis múltiple<sup>12</sup> y la producción de IL-2 es crítica en la formación de células T de memoria<sup>13</sup>.

Los linfocitos Th2 median la defensa frente a parásitos extracelulares, incluyendo los helmintos. Son importantes en la inducción y persistencia del asma y otras enfermedades alérgicas. Producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25<sup>10</sup>.

IL-4 regula positivamente la diferenciación de los linfocitos Th2 y es el principal mediador de la conmutación a IgE de las células B, permite la liberación por parte de mastocitos y basófilos de histamina y serotonina y la producción de IL-4, IL-13 y TNF- $\alpha$ <sup>14,15</sup>. IL-5 participa en el reclutamiento de eosinófilos<sup>16</sup>, IL9 induce la producción de

mucina por parte de células epiteliales durante las reacciones alérgicas<sup>17</sup> e IL-10 suprime la proliferación de los linfocitos Th1 y la función de las células dendríticas<sup>18</sup>. IL-13 es la citoquina efectora en la infección por helmintos y en la inducción de hipersensibilidad<sup>19</sup>. IL-25 es un factor de iniciación y amplificador de la respuesta de linfocitos Th2. Induce la producción de citoquinas como CCL5 Y CCL11 que reclutan eosinófilos<sup>20</sup>.

Los linfocitos Th17 median la respuesta inmune frente a bacterias extracelulares. Son responsables de la inducción de muchas enfermedades autoinmunes órgano específicas. Producen IL-17<sup>a</sup>, IL-17f, IL-21 e IL-22<sup>21</sup>.

Los linfocitos Treg juegan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia y en la regulación de la respuesta inmune. Producen citoquinas tales como TGF- $\beta$ , IL-10, e IL-35<sup>22</sup>.

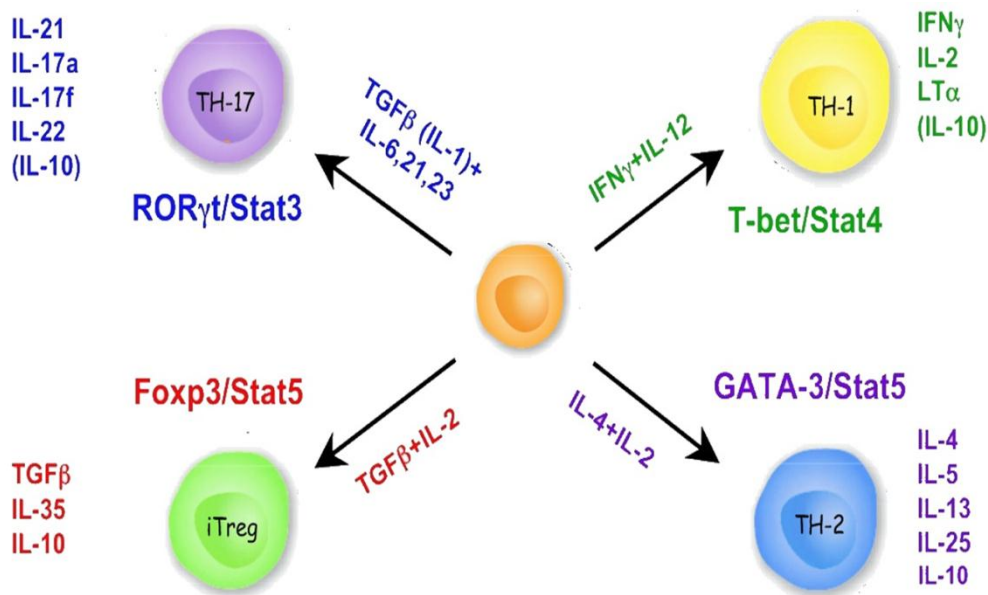


Figura 1: Esquema de la diferenciación de los linfocitos T CD4+, citoquinas y factores de transcripción implicados.

### **1.2.1 Factores de transcripción críticos para la diferenciación del linaje T helper.**

Distintos factores de transcripción incluyendo miembros del factor nuclear de células T activadas (NFAT), NFκB, y la proteína activadora 1 (AP - 1) están implicados en la regulación del proceso de diferenciación de los linfocitos T helper.

#### **1.2.1.1 Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th1.**

T-bet es el principal factor implicado en la diferenciación hacia Th1 y en la producción de IFN- $\gamma$ <sup>23</sup>. La sobreexpresión de T-bet en linfocitos Th2, induce la producción de IFN- $\gamma$  e inhibe la producción de IL-4<sup>24</sup>.

Stat4 es importante para la amplificación de la respuesta de los linfocitos Th1<sup>25</sup>. Además, Stat4 puede inducir directamente la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD4 activadas. Por otro lado, IL-2/Stat4 junto con NFκB, pueden causar la producción de IFN $\gamma$  independientemente de la estimulación del receptor de linfocito T.

#### **1.2.1.2 Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th2.**

Stat 6 activado por IL-4 es el principal transductor de señales en la diferenciación de células Th2 mediada por IL-4<sup>26</sup>. La activación *in vitro* de Stat6 es suficiente para inducir altos niveles de GATA-3, el principal regulador génico de Th2<sup>27</sup>. Además, la sobreexpresión de GATA-3 en células Th1 induce la producción de IL-4<sup>28</sup> y en ausencia de GATA3 la diferenciación de células Th2 está totalmente abolida<sup>29</sup>.

También destaca la familia Stat5. IL-2 estimula la activación de Stat5, requerido para la diferenciación de las células Th2. Se une directamente a los sitios de DNasa hipersensitivos (HS)II y HSIII en el intrón 2 del locus de IL4 en las células Th2 pero no en Th1<sup>30</sup>.

### **1.2.1.3. Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Th17.**

En la diferenciación hacia linfocito Th17, el factor de transcripción ROR $\gamma$ t juega un papel clave. Su sobre-expresión induce la producción de IL-17 y células deficientes en él, producen cantidades reducidas de IL-17<sup>31</sup>.

Por otro lado, Stat3, el principal transductor de señales para IL-6, IL-21 e IL-23 es indispensable para la producción de IL-17 y su delección resulta en la pérdida células productoras de IL-17<sup>32</sup>.

### **1.2.1.4. Factores de transcripción implicados en la diferenciación hacia linfocito Treg.**

Foxp3 es el principal factor de transcripción implicado en la diferenciación hacia linfocito Treg. La sobre-expresión de Foxp3 en linfocitos T convencionales los convierte en células con fenotipo Treg y les confiere capacidad supresiva. La expresión continua de Foxp3 es crítica para el mantenimiento de la actividad supresiva de los linfocitos Treg. De este modo, disminuyendo el grado de expresión de Foxp3 los linfocitos Treg pueden convertirse en linfocitos Th2, lo que demuestra una relación estrecha entre ambas subpoblaciones<sup>33</sup>.

## **1.2.2 Modificaciones epigenéticas**

Como ocurre en casi todos los procesos de diferenciación, un conjunto de genes están activados o reprimidos durante la transición de células T CD4 a Th1, Th2, Th17, e iTreg, y estos distintos estados están asociados con cambios en la conformación de genes diana.

La capacidad de los factores de transcripción de unirse al ADN en las regiones reguladoras de los genes, está afectada por su concentración, modificaciones postraduccionales y la localización subcelular así como el estado de la cromatina. El contexto epigenético depende de la posición y compactación de los nucleosomas, la interacción de estos con el ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y el estado de metilación del ADN<sup>34</sup>. De esta forma, a diferencia de la información genética, la información epigenética no está codificada por cambios en la secuencia de ADN sino por la diferente metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina.

En mamíferos, el ADN puede ser metilado en dinucleótidos de citosina CpG. Hasta la fecha, la metilación del ADN es el único mecanismo probado en el cual la información epigenética es propagada de una generación a otra<sup>35</sup>. La metilación en los promotores génicos y posiblemente en los elementos reguladores distales puede inhibir directamente la transcripción, sin embargo la metilación de ADN dentro de secuencias transcritas parece tener poco efecto en la transcripción<sup>36</sup>, aunque la demetilación en las secuencias transcritas de *Il4* e *Ifng* se correlaciona con altos niveles de expresión de estas citoquinas en linfocitos Th2 y Th1 respectivamente<sup>37</sup>. La metilación del ADN reprime la expresión génica bloqueando la unión de algunos factores de transcripción al promotor y a otros elementos reguladores, inhibiendo el reclutamiento de la ARN polimerasa II indirectamente y proporcionando sitios de acoplamiento para las proteínas de unión a dominios metil- CpG<sup>38</sup>.

La composición del nucleosoma y las modificaciones de las histonas son diversas y dinámicas. Las formas variantes de las histonas H2 y H3, se pueden incorporar o eliminar de los nucleosomas, y las histonas pueden ser modificadas por la adición o eliminación de grupos acetilo, metilos, fosfato, ubiquitina, sumoyl o ADP-ribosa<sup>39</sup>.

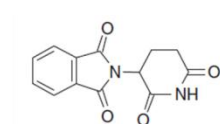
La acetilación altera la carga de las histonas, lo que reduce la interacción entre las histonas y el ADN y aumenta la movilidad del nucleosoma. Además, la incorporación de H1 condensa la cromatina y las modificaciones postraduccionales añaden o eliminan sitios de unión a proteínas reguladoras que facilitan o impiden la transcripción<sup>39</sup>.

Las distintas modificaciones de las histonas son reconocidas por proteínas reguladoras específicas o complejos que están involucrados en la transcripción. Diferentes estudios genómicos han identificado distintas combinaciones de histonas que permiten un ajuste y regulación de la transcripción, sin embargo, un pequeño conjunto de modificaciones parece ser suficiente para caracterizar genes y elementos reguladores como activos o accesibles, inactivos o silentes<sup>40</sup>. Especialmente, los promotores y potenciadores (enhancers) de genes activos o recientemente transcritos pueden caracterizarse por la presencia de histonas H3 Y H4 que son acetiladas en varios residuos, como la lisina 4 de la H3 (H3K4) que puede ser modificada con uno, dos o tres grupos metilo o por una forma alternativa de la H2A conocida como H2A.Z. Estas modificaciones de las histonas están ausentes en genes silenciados, mientras que sí encontramos dimetilación o trimetilación de la lisina 27 de la H3 (H3K27) o dimetilación o trimetilación de la lisina 9 (H3K9). La dimetilación o trimetilación de la H3K27 se encuentran fundamentalmente en la heterocromatina condensada de loci silentes específicos y la dimetilación y trimetilación de la H2K9 en la heterocromatina constitutiva o en sitios específicos de genes activos donde podrían inhibir la transcripción inapropiada. Los promotores de los genes que están listos para ser activados o silenciados, generalmente no tienen ninguna de estas modificaciones de las histonas o tienen un patrón bivalente de modificación, tienen tanto modificaciones permisivas (dimetilación y trimetilación de H3K4) o represivas (trimetilación de H3K27)<sup>41</sup>.

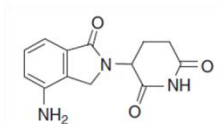
El estado epigenético de los elementos reguladores también puede modificarse cuando factores de transcripción y la ARN polimerasa II que están ligados, reclutan complejos remodeladores de la cromatina que alteran la conformación del nucleosoma. Estas regiones son accesibles para ser cortadas por la DNasa I, permitiendo que los elementos reguladores sean detectados como sitios hipersensibles a la DNasa I. De esta forma, los elementos reguladores funcionales pueden ser experimentalmente identificados por estudios que detecten sitios de hipersensibilidad de DNasas I, modificaciones postraduccionales de histonas y metilación de ADN<sup>42</sup>.

### **1.3 IMiDs.**

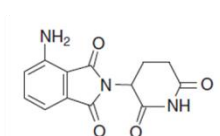
Los IMiDs son fármacos inmunomoduladores, análogos de la talidomida derivados del ácido glutámico. El término IMiDs hace referencia a la licencia obtenida por Celgene Corporation para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias y neoplásicas<sup>43</sup>. Inicialmente, se definieron por su capacidad de inhibir la secreción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) por monocitos inducida por lipopolisacarido (LPS), y posteriormente se clasificaron según sus efectos relativos sobre otras citocinas. Así, los IMiDs de clase I se consideran inhibidores de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS (TNF $\alpha$ , Interleuquina 1 IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) mientras que los compuestos de clase II (SeICIDS) muestran selectividad por la supresión de TNF $\alpha$ <sup>44</sup>. Incluyen diversos compuestos unificados por su capacidad de antagonizar a la fosfodiesterasa-4.



Talidadomida



Lenalidomida (Revlimid, IMiD3, CC5013)



Pomalidomida (Actimid, IMiD1, CC4047)

Figura 2: Estructura química de los IMiDs

Dentro de los IMiDs de clase I encontramos a la talidomida y sus análogos lenalidomida y pomalidomida. La talidomida es derivado sintético del ácido glutámico, es una molécula quiral y esto es biológicamente importante ya que sus enantiómeros S(-) y R(+) median diferentes actividades<sup>45</sup>. Sin embargo, la segregación de sus efectos biológicos mediante la administración de sus enantiómeros puros no es posible ya que *in vivo* se produce su interconversión fisiológica<sup>46</sup>.

La segunda generación de IMiDs CC-5013 (Revlimid, IMiD3, o lenalidomida) y CC-4047 (Actimid, IMiD1 o pomalidomida) son análogos de la talidomida desarrollados para aumentar la supresión de  $\text{TNF}\alpha$ <sup>47</sup>, de esta forma, son 50000 veces más potentes *in vitro* que la talidomida. Sin embargo, difieren en sus perfiles de toxicidad y su eficacia clínica entre distintos tipos de enfermedades.

### 1.3.1 Propiedades de los IMiDs.

#### 1.3.1.1 Inmunológicas.



### **1.3.1.1.1 Supresión de la producción de TNF $\alpha$ por monocitos inducidos por LPS y la actividad antiinflamatoria asociada.**

La talidomida y sus análogos suprimen la liberación de TNF $\alpha$  producida por los monocitos en respuesta al LPS o a antígenos micobacterianos<sup>48</sup>. La supresión de TNF $\alpha$  ocurre debido a una aceleración de la degradación del ARN mensajero de TNF $\alpha$ , un mecanismo que es específico de los análogos de la talidomida<sup>49</sup>. Además juegan un papel en la regulación traslacional a través de la inhibición del factor de iniciación de elongación eucariota (eIF)-4E<sup>50</sup>.

### **1.3.1.1.2 Coestimulación de linfocitos T.**

Evidencias clínicas y preclínicas sugieren que la estimulación de los linfocitos T mediada por IMiDs podría aumentar la inmunidad antitumoral<sup>51,52</sup>. Los IMiDs modulan la expresión de citoquinas suprimiendo o estimulando su liberación. En contraste con la supresión de la liberación de citoquinas inflamatorias por parte de los monocitos inducidos por LPS, IMiDs coestimulan la liberación de IL-2 e IFN- $\gamma$  por linfocitos T sometidos a ligación de CD3, a estimulación mitogénica o en respuesta a la presentación de aloantígenos por parte de células dendríticas. La co-estimulación de los linfocitos T por la lenalidomida solo se inhibe parcialmente por el bloqueo de CTLA-4-Ig del eje coestimulador B7 / CD28. Además, la lenalidomida induce la fosforilación de la tirosina de CD28 facilitando el reclutamiento y la activación de rutas de señalización intracelulares, incluyendo Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y el factor nuclear (NF) – kB<sup>53</sup>.

La coestimulación de la pomalidomida, activa a la Proteína Kinasa C (PKC) y PI3K para potenciar la translocación nuclear del factor nuclear de las células T activadas (NFAT) -2 y la proteína activada (AP) -1 dando como resultado un aumento de la unión

al ADN en el promotor de IL-2<sup>54</sup>. También se ha descrito como los IMiDs, inducen la interacción del complejo ubiquitín ligasa CRBN/DDB-1/Cul4 con los factores de transcripción IKZF1 (Ikaros) e IKZF3 (Aiolos), produciendo su ubiquitinación<sup>55</sup>.

El complejo CRBN/DDB-1/Cul4 está formado por distintas proteínas: Cereblon (CRBN), DDB1 (proteína 1 de unión a ADN dañado) Cul4 y Roc1. CRBN es una diana directa de la pomalidomida y DDB1 actúa como subunidad adaptadora del complejo ubiquitín ligasa E3 formado con Cul4 y Roc1. Este tipo de ubiquitín ligasa E3 se conoce como Cullin-RING ligasa 4 (CRL4). Se ha demostrado como en presencia de algunos IMiDs como pomalidomida y lenalidomida, este complejo se une a los factores de transcripción Ikaros y Aiolos produciendo su ubiquitinación y degradación<sup>56</sup>.

Ikaros, es un regulador clave de la hematopoyesis, específicamente del desarrollo de linaje linfóide y se expresa tanto en estadios tempranos de progenitores linfoides como en linfocitos T y B maduros. Se ha descrito como ratones deficientes en Ikaros, presentan un desarrollo tardío de los linfocitos T, indicando su papel crucial en el desarrollo temprano linfóide, sin embargo, ratones deficientes en Aiolos presentan un desarrollo normal. En linfocitos Th1 CD4+, Ikaros es un represor de la transcripción de IL-3 e IFN- $\gamma$ , mientras que Aiolos es un represor específico de IL-2<sup>57</sup>. De esta forma, los IMiDs inducen la ubiquitinación de los dos factores por el complejo CRBN/DDB-1/Cul4, su degradación en el proteosoma y por tanto la activación de los linfocitos T<sup>55</sup>.

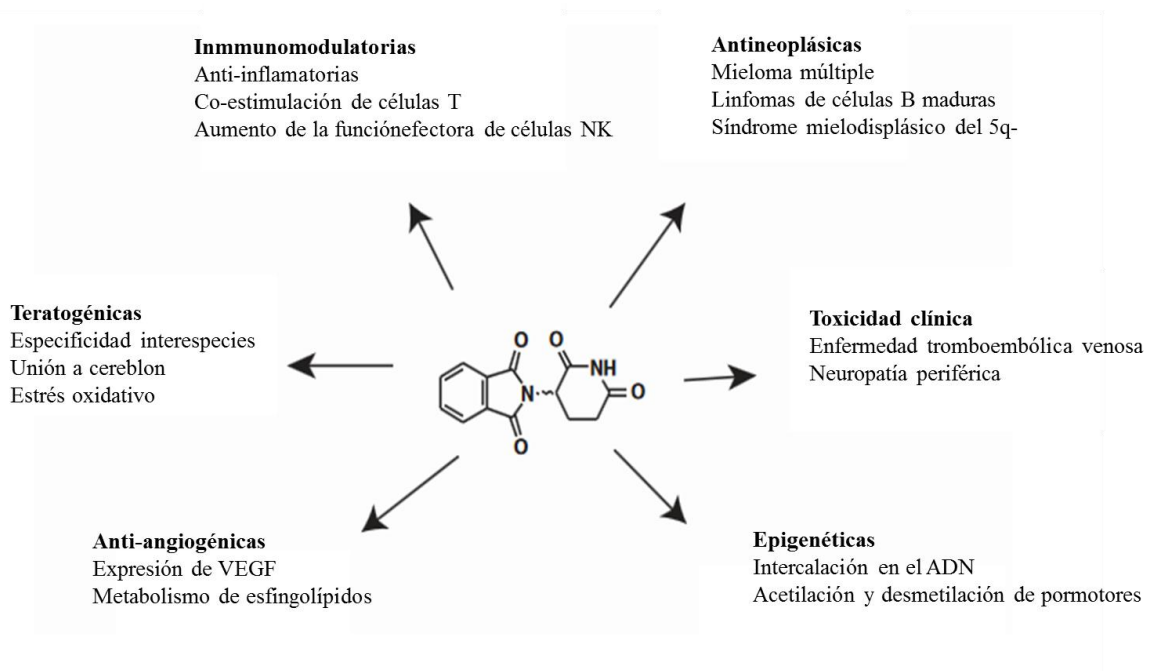
#### **1.3.1.1.3 Aumento de las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK.**

El aumento de células efectoras citotóxicas es consecuencia de la actividad inmunoestimuladora de los IMiDs en células T. La secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por células T CD4 después de la exposición a IMiDs aumenta la muerte mediada por células

Natural Killers (NK) tanto de líneas celulares leucémicas y células autólogas de mieloma in vitro<sup>58</sup>.

### 1.3.1.2 Teratogénicas.

Los mecanismos moleculares de la teratogenicidad de la talidomida han sido intensamente estudiados por el gran interés que suscita desde un punto de vista traslacional el uso de IMiDs eficaces y no teratogénicos. Entre los mecanismos teratogénicos de la talidomida destacan los efectos antiangiogénicos<sup>59</sup>, estrés oxidativo<sup>60</sup> y disfunción del complejo cereblon/ADN ubiquitín ligasa proteína 1. Figura 3:



Propiedades de los IMiDs.

## 1.4 ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) representa una opción curativa para numerosos pacientes con hemopatías malignas. Se fundamenta en la sustitución de un sistema hematopoyético neoplásico, defectuoso o insuficiente, por otro normal obtenido de un donante sano histocompatible.

Para ello, los pacientes reciben previamente un régimen de acondicionamiento basado en la administración de quimioterapia, a menudo combinada con radioterapia o depleción de linfocitos T. De esta forma, se reduce en número de células malignas y se inmunosuprime al receptor para disminuir el riesgo de rechazo del injerto<sup>61</sup>.

Tras el acondicionamiento se administran las células progenitoras capaces de reconstituir el sistema hematopoyético. Como fuente de progenitores puede emplearse: médula ósea, obtenida mediante punciones múltiples de las crestas iliacas bajo anestesia general, sangre periférica, tras movilización de los progenitores con factor estimulante de colonias granulocíticas o cordón umbilical que permite recoger progenitores mediante punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto.

En el TPH, además de los progenitores hematopoyéticos, se infunden otras células del donante como son los linfocitos T, que juegan un papel fundamental ya que contribuyen al efecto antitumoral eliminando las células neoplásicas residuales, el denominado “efecto de injerto contra tumor” (EICTL), y por otro lado, facilitan el implante de los progenitores del donante.

Sin embargo, estos linfocitos T también son capaces de provocar una respuesta aloimmune, que se basa en su capacidad para reconocer antígenos menores y mayores de histocompatibilidad del paciente ausentes en el donante, activándose y generando un

efecto citotóxico en órganos y tejidos sanos del receptor que se expresa clínicamente como Enfermedad Injerto contra Receptor (EICR)<sup>6</sup>.

#### **1.4.1 Fases de la Enfermedad Injerto contra Receptor.**

##### **1.4.1.1 Fase 1: Activación de células presentadoras de Antígeno.**

Como consecuencia de la administración del régimen de acondicionamiento u otros procesos inflamatorios intercurrentes (por ejemplo infecciones) se produce un daño tisular en el receptor, que conlleva la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1)<sup>62</sup>. La presencia de estas citoquinas aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células presentadoras de antígeno (APC), antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y moléculas co-estimuladoras<sup>63</sup>. Todo esto da lugar a la activación de las células dendríticas del receptor y al reconocimiento del MHC y/o antígenos menores de histocompatibilidad del receptor por los linfocitos T maduros del donante<sup>64</sup>. TNF $\alpha$  contribuye al daño intestinal afectando a la integridad de la mucosa gástrica lo que resulta en un aumento de la liberación de LPS. Éste provoca la liberación adicional de TNF $\alpha$  e IL-1 por macrófagos y linfocitos<sup>65</sup>. De esta forma, la liberación de LPS y la activación de linfocitos y macrófagos resulta en la amplificación del daño local de los tejidos y promueve la respuesta inflamatoria.

##### **1.4.1.2 Fase 2: Activación de células T del donante.**

La presentación de los antígenos del receptor a las células T del donante, la activación de los linfocitos T y la consiguiente proliferación y diferenciación de estas células T activadas es crucial en la segunda fase de la EICR. Después del trasplante, las células T del donante reconocen como extraños los antígenos del receptor presentados por las APC. Cuanto mayor es la disparidad entre el MHC del donante y el receptor, mayor es la respuesta generada por los linfocitos T. Durante el proceso de activación, las APC,

juegan un papel muy importante digiriendo proteínas en péptidos pequeños y presentándolos en su superficie en asociación con el MHC.

El reconocimiento del receptor de la células T (TCR) al péptido presentado en la molécula MHC de una APC proporciona la señal requerida para la estimulación del linfocito T<sup>66</sup>. Además, se requieren señales co-estimuladoras, las más importante mediadas por la interacción entre CD28 y B7 y CD40 y su ligando CD154<sup>67</sup>.

La activación y proliferación de los linfocitos T va seguida de la secreción de citoquinas y quimioquinas.

IL-2 se considera la principal citoquina involucrada en la EICR aguda debido al papel que juega como factor de crecimiento de células T<sup>68</sup>.

IFN- $\gamma$  es otra citoquina crucial en la segunda fase de la EICR aguda. Junto con la IL-2 induce la expansión de los linfocitos T y la respuesta de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos y estimula la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  por fagocitos mononucleares. Además, el IFN- $\gamma$  induce el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, quimioquinas, moléculas de HLA que incrementan el reclutamiento de células y la presentación de antígenos<sup>69</sup>.

Una característica de todas las reacciones inflamatorias es el reclutamiento excesivo en los sitios de inflamación. Este proceso está muy bien regulado e implica varias familias de proteínas incluyendo citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión, citoquinas quimiotácticas y quimioquinas<sup>70</sup>. Las quimioquinas inflamatorias se expresan en tejidos inflamados por células infiltradas, monocitos o macrófagos o por células epiteliales, endoteliales o fibroblásticas estimuladas por citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) o LPS. Este grupo de quimioquinas están especializadas en el reclutamiento de células efectoras, incluyendo monocitos, granulocitos, y linfocitos T efectores.

Los linfocitos T reguladores, una subpoblación de linfocitos T CD4+, que constitutivamente expresan el receptor de IL-2 (CD25) y que constituyen el 5-10% de los linfocitos T CD4+, han sido identificados por su papel crucial en el control de procesos autoinmunes. Los linfocitos T reguladores juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune a aloantígenos o antígenos propios<sup>71</sup>. Estudios *in vitro* han mostrado como estas células inhiben la activación de linfocitos CD4+ y CD8+ CD25- actuando directamente sobre las células T diana y las CPA<sup>72</sup>.

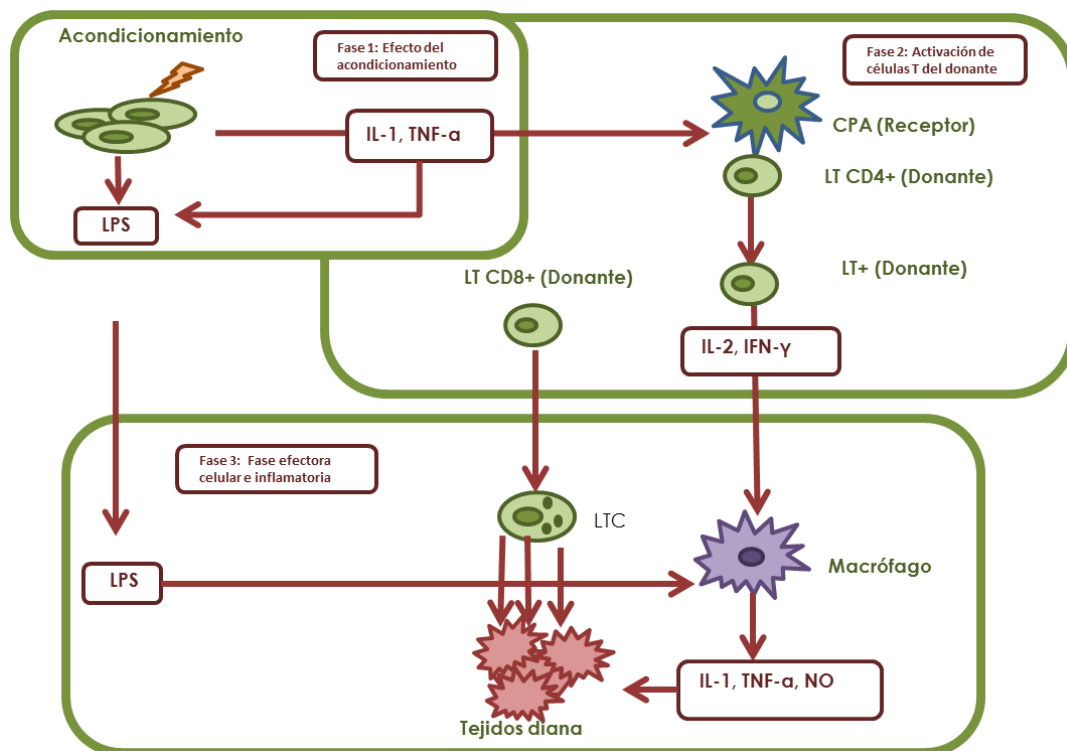


Figura 3: Fases de la Enfermedad Injerto contra Receptor

### **1.4.1.3 Fase 3: Fase efectora celular e inflamatoria.**

La tercera fase de la EICRa es una compleja cascada de múltiples efectores. Una vez que los linfocitos T se han activado y proliferan, son directa o indirectamente responsables del daño que se produce en los tejidos durante la EICR. Hay tres procesos citolíticos importantes en la función efectora de los linfocitos T y otras células citolíticas: perforina y granzima B, Fas ligando (FasL) y daño mediado por citocinas de forma directa.

Aunque los receptores involucrados en el reconocimiento de las dianas celulares difieren entre los linfocitos T citotóxicos y las células NK, el mecanismo por el cual actúan es esencialmente el mismo. Pueden hacerlo a través de dos rutas diferentes: citolisis mediada por perforina/granzima B y apoptosis mediada por Fas/FasL<sup>73</sup>. El receptor Fas un miembro de la familia de receptores TNF. Se expresa en muchos tejidos, entre los que encontramos los órganos diana de la EICRa, y su nivel de expresión pueden estar aumentado por citoquinas pro-inflamatorias durante la inflamación<sup>74</sup>. El ligando del receptor Fas (FasL)<sup>74</sup> también pertenece a la familia de TNF y se expresa fundamentalmente en células T activadas, macrófagos y neutrófilos. La interacción del receptor Fas con FasL produce la iniciación de la apoptosis mediada por Fas<sup>75</sup>.

La molécula formadora de poros perforina, es otra molécula efectora crucial de la citolisis producida por los linfocitos T citotóxicos y las células NK. La perforina se expresa fundamentalmente en estas células y se almacena en gránulos citotóxicos junto con granzimas y otras proteínas<sup>76</sup>. En presencia de calcio, la perforina polimeriza y forma canales en la membrana celular de las células diana lo que permite el paso de



granzimas. Esta activa la cascada de las caspasas produciéndose la muerte celular por apoptosis<sup>77</sup>.

#### **1.4.2 Tratamiento de la EICR**

Tradicionalmente, las estrategias de prevención para la reducción de la EICR se basan en el uso inhibidores de la calcineurina. Sin embargo, una mejor comprensión biológica sobre el papel de las células B, las células NK, las células T reguladoras y las APC, ha permitido nuevos enfoques que se dirigen a las diferentes células del sistema inmunológico, optimizando el tratamiento y la duración total de la terapia<sup>78</sup>. Sin duda, el desarrollo de nuevas estrategias de profilaxis y tratamiento de la EICR es el mayor reto en este campo de investigación

## **1.5 POLIFENOLES**

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas. Estos compuestos son esenciales para su fisiología, ya que contribuyen a su morfología, crecimiento, y reproducción. Además, los polifenoles están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta y la agresión de patógenos y predadores<sup>79</sup>.

Constituyen una parte importante de la dieta humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal, están presentes en la mayoría de las plantas que son comúnmente consumidas en la dieta Mediterránea, incluyendo legumbres, frutas, vegetales, vino tinto, te y aceite de oliva virgen extra (AOVE)<sup>79</sup>.

### **1.5.1 Clasificación de los polifenoles.**

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos<sup>80</sup>.

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en diferentes grupos en función de su estructura química, número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos. Las principales clases de polifenoles son: flavonoides, ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos<sup>79</sup>.

#### **1.5.1.1 Flavonoides**

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas (4000 compuestos diferentes). Son compuestos de bajo peso molecular que

comparten un esqueleto común difenilpirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico<sup>80</sup>.

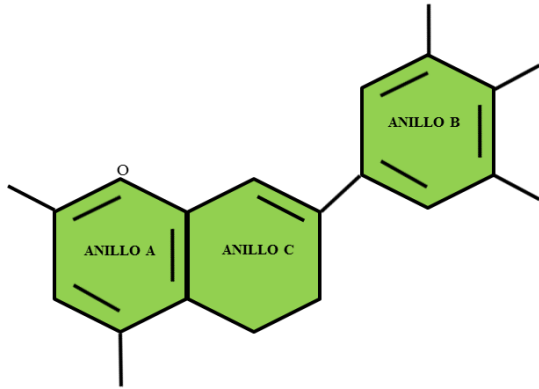


Figura 4: Estructura de los flavonoides.

En función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B, los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases. Dentro del anillo B, los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles.

### 1.5.1.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos benzoicos y cinámicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales, y que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos. La actividad de los ácidos fenólicos está también en función de los grupos hidroxilo del anillo aromático y de la unión de estos compuestos a ácidos orgánicos y/o a azúcares para formar ésteres. Se dividen en ácidos hidroxibenzoicos y

ácidos hidroxicinámicos. El contenido de ácidos hidroxibenzoicos en algunas plantas comestibles es relativamente bajo, excepto en los frutos rojos como los arándanos y frambuesas, en el té y el aceite de oliva<sup>81</sup>.

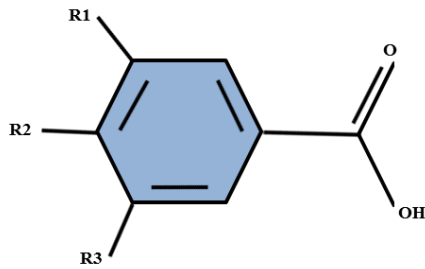


Figura 5: Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos.

Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos. Los principales representantes de este grupo son el ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico. Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y tipos de compuestos presentes en los alimentos<sup>81</sup>.

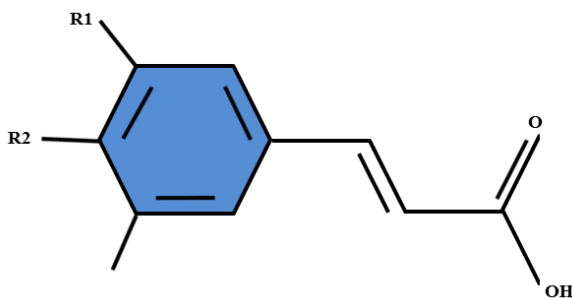


Figura 6: Estructura de los ácidos hidroxicinámicos.

### 1.5.1.3 Alcoholes fenólicos

El tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) constituyen los principales representantes dentro del grupo de los alcoholes fenólicos y se encuentran principalmente en el aceite de oliva extra virgen<sup>83</sup>.

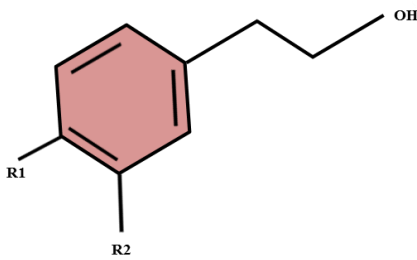


Figura 7: Estructura de los alcoholes fenólicos.

### 1.5.1.4 Estilbenos

Los estilbenos representan otro grupo importante de polifenoles. A pesar de que solo existen en un grupo limitado de plantas, existen numerosos estudios sobre el resveratrol, compuesto polifenólico más representativo de este grupo, debido a los enormes beneficios para la salud que genera. Se encuentra fundamentalmente en el vino tinto, las uvas y los frutos rojos<sup>80</sup>.

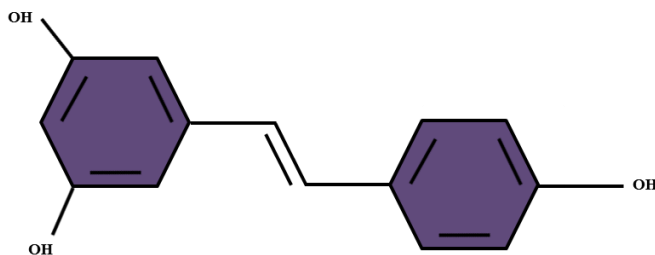


Figura 8: Estructura de los estilbenos.

### 1.5.1.5 Lignanós

Los lignanos se forman por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano con diferentes grados de oxidación en sus cadenas laterales y diferentes patrones de sustitución en sus anillos aromáticos<sup>80</sup>.

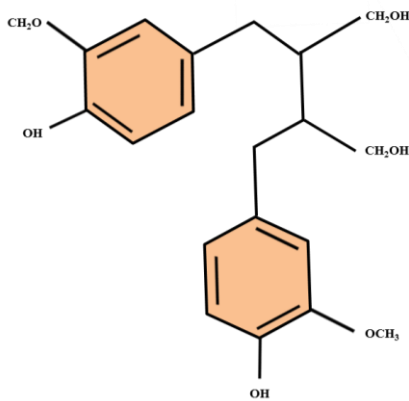


Figura 9: Estructura de los lignanos.

### 1.5.2 Propiedades de los polifenoles.

Los polifenoles pueden actuar como agentes anti-inflamatorios, anti-oxidantes, anti-microbianos, anti-proliferativos, anti-trombogénicos y anti-cancerígenos, lo que les convierte en compuestos que generan gran interés en el ámbito de la salud. En los últimos años, se les han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas)<sup>84</sup>.

#### 1.5.2.1 Actividad anti-oxidante.

Los polifenoles gracias a su actividad antioxidante pueden prevenir el daño oxidativo al ADN causado por los radicales libres impidiendo el proceso de inicio de la carcinogénesis. Este bloqueo tiene lugar a través de tres mecanismos: captación directa

de radicales libres, quelación de cationes divalentes y modulación de enzimas relacionadas con estrés oxidativo<sup>84</sup>.

Así, Epigallocatequin-3-galato (EGCC) y genisteína son importantes captadores de radicales libres. EGCC reduce el estrés oxidativo causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HePG2 a través de un incremento de los niveles de enzimas antioxidantes<sup>85</sup>.

### **1.5.2.2 Actividad anti-cancerígena.**

La inducción de la apoptosis puede ser considerada una de las dianas más importantes en el manejo preventivo frente al cáncer, revertiendo la conversión de una célula normal a una maligna. Muchos polifenoles incluyendo la quercitina, apigenina, curcumina o reveratrol, desempeñan su papel quimiopreventivo frente a la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis<sup>86</sup>. Las células tumorales parecen ser más sensibles al efecto pro-apoptótico de los polifenoles que las células normales<sup>84</sup>.

De esta forma, se ha descrito como EGCC puede inducir la muerte celular programada en varias líneas celulares de cáncer mediante la activación de proteínas como las caspasas-3, -8 y 9, la liberación mitocondrial del citocromo c e inhibición de proteínas inhibitoras de apoptosis (IAP2, XIAP, Bcl-2)<sup>87</sup>. También se ha descrito como la quercitina induce la apoptosis en varias líneas celulares cancerígenas produciéndose una fragmentación del ADN<sup>88</sup>, activación de proteínas proapoptóticas de la familia de Bax<sup>89</sup>, activación de las caspasas 3, 7 y 9 y activación de la PARP<sup>90</sup>.

### **1.5.2.3 Actividad anti-proliferativa**

Los polifenoles pueden afectar a la proliferación celular modulando vías de transducción de señales como PI3K/AKT, MAPKs (ERKs, JNKs, p38MAKs), PKCs, AP-1 y NF-κB.

EGCG inhibe la ruta de señalización PI3K/AKT disminuyendo los niveles de las subunidades p85 y p110 de PI3K y la fosforilación de AKT y ERK1/2<sup>91</sup>. Además, en líneas de hepatocarcinomas EGCG produce una disminución de los niveles de NF- $\kappa$ B (p65 o p50)<sup>87</sup> o la activación de su principal inhibidor (I $\kappa$ B)<sup>92</sup>.

#### **1.5.2.4 Actividad anti-inflamatoria**

Los mecanismos moleculares implicados en las propiedades anti-inflamatorias de los polifenoles incluyen:

- La inhibición de enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa COX-2, lipoxigenasa LOX y la oxido nítrico sintetasa inducible iNOS,
- La inhibición de PI3K, NF- $\kappa$ B, c-JUN
- La modulación de genes implicados en el ciclo celular y supervivencia.

Además, las citoquinas son los principales mediadores de inflamación local. El balance entre citoquinas pro-inflamatorias (IL-2, TNF $\alpha$ , IL6, IL-8 e IFN- $\gamma$ ) y anti-inflamatorias (IL-10, IL-4, TGF $\beta$ ) puede determinar el desarrollo enfermedades.

Ciertos flavonoides son capaces de disminuir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en muchos tipos celulares como células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PMA y macrófagos activados con LPS<sup>93</sup>.

Otros compuesto fenólicos del AOVE como la oleuropeina modulan la expresión de algunas citoquinas como la IL-1 $\beta$ <sup>94</sup>.





# **HIPÓTESIS**



## 2. HIPÓTESIS

- La pomalidomida actúa sobre los linfocitos T en estado de reposo, facilitando su polarización una vez activados, no sólo hacia célula Th1, sino también hacia célula Th2.
- Los polifenoles podrían ser capaces de inhibir el alreconocimiento de linfocitos T y atenuar la EICRa en el receptor.



# **OBJETIVOS**



### 3. OBJETIVOS

1. Analizar el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de los linfocitos T CD45RA+.
2. Analizar los mecanismos epigenéticos que podrían estar implicados en dicho proceso.
3. Analizar el efecto de la fracción polifenólica de AOVE sobre la viabilidad y activación de linfocitos T en cultivo.
4. Analizar las vías de señalización que podrían verse afectadas bajo el tratamiento con la fracción polifenólica del AOVE en linfocitos T en cultivo.
5. Determinar si el uso de una dieta rica en compuestos polifenólicos retrasa o disminuye la aparición de EICRa en un modelo murino.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4.1 MATERIALES

### 4.1.1 Material biológico

#### 4.1.1.1. Obtención de células para cultivo

Los estudios in vitro de linfocitos T se realizaron a partir de concentrados leucoplaquetarios procedentes de Centro Regional de Transfusiones y Hemodonación del Hospital Virgen del Rocío, de donante sano. Las muestras empleadas se obtuvieron tras el correspondiente consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

#### 4.1.1.2. Animales

Los experimentos relacionados con investigación animal se llevaron a cabo en el Animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) de acuerdo con las normas establecidas por el Comité Ético del Animalario. Se utilizaron las siguientes cepas de ratón: BALB/c (H2d), C57BL/6 (H2b).

### 4.1.2 Material no biológico

#### 4.1.2.1 Reactivos utilizados

Reactivos utilizados para cultivos celulares	Marca
RPMI	GIBCO ® Invitrogen
Tampón Salino Fosfato (PBS)	GIBCO ® Invitrogen
Penicilina- Estreptomina	GIBCO ® Invitrogen
Suero Humano AB	Sigma-Aldrich
Ficoll-Paque	GE-Healthcare Bio-Sciences
Anti-CD45RA+ Microbeads	Miltenyi Biotec.
Placas de 96 pocillos	Biofil ®
Brefeldina A	Sigma-Aldrich

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker mini kit	Dako Cytomation
Kit Anexina-V, 7amino-actinomicina-D	BD Pharmingen™
Kit IntraStain Fixation and Permeabilization	Dako Cytomation
Kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine	BD Bioscience
IL-2 human SimpleStep™ ELISA Kit	Abcam
Quantikine ELISA Human IL-10 Immunoassay	R&D

<b>Reactivos y anticuerpos utilizados para Western Blot</b>	<b>Marca</b>
Fluoruro de Sodio	BioLabs
DTT	AppliChem
Ortovanadato de sodio	BioLabs
ASB-14	Calbiochem
Pastillas de Cocktail inhibidor de proteasas	Roche
Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Gels	BioRad
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack	BioRad
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad
anti- NF-KB p65	Cell Signaling Tecnology
anti-β-Actin	Abcam
anti-Mapk1/Mapk2	Abcam
anti-Akt	Abcam
anti-T-bet (H-210): sc-21003	Santa Cruz Biotechnology
anti-GATA3 (HG3-35): sc-269	Santa Cruz Biotechnology
HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody	Jackson ImmunoResearch
HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody	Jackson ImmunoResearch

<b>Anticuerpos monoclonales</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
Anti-Human CD25	FITC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human CD4	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson Bioscience
Anti Human IFNγ	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human IL2 (Intracitoplasmático)	APC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human IL10 (Intracitoplasmático)	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human IL4 (Intracitoplasmático)	APC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human CD3	APC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Human CD25	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse H2Db	FITC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse H2Dd	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD45	APC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD3	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson Bioscience

Anti-Mouse CD25	PeCy7	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse B220	FITC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD45	APCCy7	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD4	APC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD11b	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD4	FITC	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse CD25	PE	Becton Dickinson Bioscience
Anti-Mouse FoxP3 (Intracitoplasmático)	APC	Becton Dickinson Bioscience

#### 4.1.2.2 Soluciones

##### Solución de crosslinking

50 mM Hepes pH 8.0

0.1M NaCl

1 mM EDTA pH 8

0.5 mM EGTA

11%Formaldehido

##### Lysis buffer 1

5 mM Pipes pH 8

85 mM KCl

0.5% NP4

##### Lysis buffer 2

1% SDS

10 mM EDTA

50 mM Tris HCl pH 8.1

##### IP buffer

0.01% SDS

1.1% Triton X-100

1.2 mM EDTA

16.7 mM Tris-HCl pH 8.1

167 mM NaCl

##### Wash 1

0.1% SDS

1% Triton X-100

2 mM EDTA

20 mM Tris-HCl pH 8.1

150 mM NaCl

##### Wash 2

0.1% SDS

1% Triton X-100

2mM EDTA

20mM Tris-HCl pH 8.1

500 mM NaCl

Wash 3

0.25 LiCl

1% NP-40

1% Deoxicolato de sodio

1mM EDTA

10mM Tris-HCl pH 8.1

TE1X

10mM Tris HCl

1 mM EDTA

Elution buffer (dynabeads)

1% SDS

TE1X

Solución de carga

TRIS 0.5M pH 6.8

Glicerol

20% SDS

1% Azul de bromofenol

DTT 1M

Tampón de electroforesis 10X

Trizma base 30g

Glicina 144g

SDS 10g

H<sub>2</sub>O

TBS

Trizma base 24.2 g/l

Glicina 80 g/l

Ajustar pH a 7

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1 Extracción de la fracción polifenólica del aceite de olive virgen extra.**

La fracción polifenólica del AOVE fue obtenida siguiendo el método descrito por Vázquez Roncero et al. con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 gramos de AOVE (Oleoestepa, Sevilla) con 200 ml de metanol y 50 ml de agua en vortex y tras sonicar la mezcla durante 15 minutos se dejó decantar durante 1 hora y media. Por último, se concentró la fracción metanólica en un rotavapor y liofilizó.

El producto polifenólico obtenido se resuspendió en DMSO para su uso en ensayos in vitro.

### **4.2.2 Cultivos**

Todas las células se manipularon en campana de flujo laminar y se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los concentrados leucoplaquetarios se diluyeron con suero fisiológico en una proporción 1:8 y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación (1600rpm durante 30 minutos) por gradiente de densidad con Ficoll. Tras la centrifugación se recogió la interfase de células mononucleadas con pipetas pasteur estériles. Posteriormente se lavaron 2 veces con la RPMI a 1200 rpm durante 10 minutos. Tras el segundo lavado, retiramos el sobrenadante y resuspendimos las células en RPMI suplementado con suero AB 10% y antibiótico 1%. Posteriormente, se procedió al recuento celular mediante cámara de Neubauer.



#### **4.2.2.1 Separación de células CD45RA**

Para la obtención de producto enriquecido en linfocitos T naive CD45RA<sup>+</sup> realizamos una separación inmunomagnética en el separador AutoMACS pro separator utilizando bolas magnéticas anti -CD45RA<sup>+</sup> de Miltenyi Biotec.

Para ello, resuspendimos el pellet celular en 800 µl de Running Buffer por cada 10<sup>6</sup> células y 200 µl de microbolas anti-CD45RA<sup>+</sup>. Se incubaron durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron con 8 ml de Running Buffer, centrifugando 10 minutos a 1200 r.p.m.

Tras descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 500 µl de Running Buffer. Para realizar la separación utilizamos el programa "Possel" que realiza una selección positiva de las células CD45RA<sup>+</sup>.

#### **4.2.2.2 Polarización de linfocitos T CD45RA<sup>+</sup> hacia linfocitos Th1 y Th2.**

Con el propósito de conocer el efecto que ejerce la pomalidomida sobre la polarización de los linfocitos T CD45RA<sup>+</sup>, cultivamos durante 5 días la separación celular CD45RA<sup>+</sup>, en placas de 96 pocillos en presencia de distintas citoquinas implicadas en la polarización hacia linfocitos Th1 y Th2 y en ausencia y presencia de pomalidomida.

##### **4.2.2.2.1 Polarización hacia Th1**

Planteamos 5 situaciones distintas en el caso de la polarización hacia Th1:

1. Control: células CD45RA<sup>+</sup> cultivadas en RPMI suplementado con antibiótico al 1% y Suero AB al 10%

2. Activación: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL). Se añadió anti-CD3 en 100µl de PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para favorecer su adherencia a la placa. Pasado este tiempo se retiró el anti-CD3 y se bloqueó con medio completo durante una hora a 37°C. Finalmente a la mezcla celular se le añadió anti-CD28.

3. Activación + citocinas: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL12 (5ng/ml), INF-γ (10ng/ml) y anti-IL4 (10µg/ml).

4. Activación + citocinas + pomalidomida 10nM: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL12 (5ng/ml), INF-γ (10ng/ml) y anti-IL4 (10µg/ml) y pomalidomida a 10nM.

5. Activación + citocinas + pomalidomida 100nM: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL12 (5ng/ml), INF-γ (10ng/ml) y anti-IL4 (10µg/ml) y pomalidomida a 100nM.

#### **4.2.2.2.2 Polarización hacia Th2**

Del mismo modo, planteamos 5 condiciones distintas para la polarización hacia Th2:

1. Control: Células CD45RA+ cultivadas en RPMI suplementado con antibiótico al 1% y Suero AB al 10%

2. Activación: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL). Se añadió anti-CD3 en 100µl de PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para favorecer su adherencia a la placa. Pasado este tiempo se retiró el anti-CD3 y se bloqueó con medio completo durante una hora a 37°C. Finalmente a la mezcla celular se le añadió anti-CD28.

3. Activación + citosinas: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL-4 (200 unit/ml), IL-2 (100 unit/ml), anti-IFN-γ (10µg/ml), anti-IL-12 (5µg/ml).

4. Activación + citocinas + pomalidomida 10nM: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL-4 (200 unit/ml), IL-2 (100 unit/ml), anti-IFN-γ (10µg/ml), anti-IL-12 (5µg/ml) y pomalidomida a 10nM.

5. Activación + citocinas + pomalidomida 100nM: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL) y tratado con IL-4 (200 unit/ml), IL-2 (100 unit/ml), anti-IFN-γ (10µg/ml), anti-IL-12 (5µg/ml) y pomalidomida a 100nM.

#### **4.2.3. Estudios de citometría de flujo**

##### **4.2.3.1 Análisis por citometría de flujo del inmunofenotipo de los linfocitos T polarizados.**

Para analizar el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de los linfocitos T, transcurridos los 5 días de cultivo añadimos brefeldina A (10 µg/ mL) a cada pocillo 4

horas antes del procesamiento para el análisis por citometría de flujo. Para ello, utilizó el kit IntraStain Fixation and Permeabilization kit (Dako Cytomation, Denmark) y se recogieron las células de la placa de 96 pocillos y se centrifugaron en tubos de citometría a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS y se marcaron con los anticuerpos de membrana anti-CD25-FITC y anti-CD4-PerCP-Cy5.5 durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, las células se resuspendieron en 100 µl de solución A (solución de fijación) y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se lavaron con PBS y centrifugaron a 2000 r.p.m durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 120 µl de Solución B (solución de permeabilización) y se marcaron con anticuerpos intracitoplasmáticos:

- anti-IFN $\gamma$ -PE y anti- IL2-APC para evaluar polarización hacia linfocito Th1.
- anti-IL10-PE y anti- IL4 (CD154)-APC para polarización hacia linfocito Th2.

Se incubaron durante 15 minutos y posteriormente lavaron con PBS centrifugando los tubos a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 100 µl de PBS y se adquirió en un citómetro FACSCanto II de BD.

#### **4.2.3.2 Estudios de viabilidad celular a las 18 horas de cultivo (CD25/Anexina-V/7-AAD/CD3) de linfocitos T tratados con FP del AOVE.**

Con el propósito de conocer el efecto que ejerce la FP del AOVE sobre la viabilidad de linfocitos T, cultivamos durante 48 horas células mononucleadas, en placas de 96 pocillos en ausencia y presencia de la FP del AOVE.

Para el análisis de la viabilidad celular empleamos el kit de Anexina-V, 7 amino-actinomicina-D, (7-AAD) de BD para citometría de flujo. La anexina V es un marcador

de apoptosis, mientras que la 7AAD se une al ADN señalando así el fraccionamiento y muerte celular.

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos, en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de FP (10, 45, 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

Planteamos tres situaciones distintas:

1. Control: Células mononucleadas

2. Activación: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5 $\mu\text{g/mL}$ ) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5 $\mu\text{g/mL}$ ). Se añadió anti-CD3 en 100 $\mu\text{l}$  de PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para favorecer su adherencia a la placa. Pasado este tiempo se retiró el anti-CD3 y se bloqueó con medio completo durante una hora a 37°C. Finalmente a la mezcla celular se le añadió anti-CD28.

3. Activación + FP de AOVE: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5 $\mu\text{g/mL}$ ) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5 $\mu\text{g/mL}$ ) y tratado con las diferentes concentraciones de la FP del AOVE (10, 45 y 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

Transcurridas las 48 horas de cultivo, se recogieron las células de la placa de 96 pocillos, y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante se añadieron 100 $\mu\text{L}$  de PBS a cada pocillo para resuspender las células y se recogieron en tubos de citometría. Las células mononucleadas se incubaron con CD25-FITC y CD3-APC durante 15 minutos.

Después de lavar con PBS, centrifugamos a 1200 rpm durante 10 minutos, retiramos el sobrenadante y añadimos 100 $\mu\text{L}$  de Binding Buffer 1x. En este momento empleamos el kit de anexina/7AAD de BD y en cada tubo añadimos 5 $\mu\text{L}$  de anexina-V-PE y 5 $\mu\text{L}$  de

7-AAD. Incubamos 15 minutos y después de ese tiempo se agregaron 400µL de Binding Buffer 1x e inmediatamente se adquirieron las células en el citómetro de flujo FACSCanto II. Adquirimos un total de 100000 eventos, utilizando el programa informático FACSDiva® y los eventos se analizaron mediante el programa: Infinicyt 7.1.

Consideramos células viables los eventos Anexina y 7-AAD negativos.

#### **4.2.3.3 Estudios de proliferación de linfocitos T tratados con la FP del AOVE (PKH/CD25/CD3).**

Con el propósito de conocer el efecto que ejerce la FP del AOVE sobre la proliferación de linfocitos T, nos planteamos cultivar durante 48 horas células mononucleadas, en placas de 96 pocillos en ausencia y presencia de la FP del AOVE.

Para este procedimiento empleamos el kit PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit. que contiene colas de carbono alifáticas que se incorporan a las regiones lipídicas de la membrana celular. De este modo si una célula se divide, las moléculas de PKH incorporadas a la membrana se reparten entre las células hijas siendo la pérdida de fluorescencia proporcional al grado de proliferación celular. La fluorescencia emitida por las células marcadas con PKH-67, se analiza por citometría de flujo en FL-1.

Este kit consta de una solución acuosa (el diluyente C) que mantiene la viabilidad de las células, a la vez que maximiza la solubilidad del colorante y su eficiencia de tinción durante el marcaje.  $10 \times 10^6$  células células mononucleares se resuspendieron en 500µL del diluyente C. A esta solución se le añadió 500µL de la solución de PKH (500µL del diluyente C suplementado con 2µL de PKH 67). Las células se incubaron durante 4 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, agregamos 1mL de suero AB y después de un minuto más de tiempo, terminamos el proceso añadiendo 2mL de medio

completo de RPMI. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en medio completo.

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos, en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de FP (10, 45, 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

Planteamos tres situaciones distintas:

1. Control: Células mononucleadas

2. Activación: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5 $\mu\text{g/ml}$ ) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5 $\mu\text{g/ml}$ ). Se añadió anti-CD3 en 100 $\mu\text{l}$  de PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para favorecer su adherencia a la placa. Pasado este tiempo se retiró el anti-CD3 y bloqueó con medio completo durante una hora a 37°C. Finalmente a la mezcla celular se le añadió anti-CD28.

3. Activación + FP de AOVE: cultivo estimulado de células mononucleadas con anti-CD3 humano (5 $\mu\text{g/ml}$ ) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5 $\mu\text{g/ml}$ ) y tratado con las diferentes concentraciones de la FP del AOVE.

Transcurridos 48 horas de cultivo se recogieron las células de la placa de 96 pocillos y se centrifugaron en tubos de citometría a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante. Las células se resuspendieron en PBS y se marcaron con CD25-PE y CD3-APC durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, las células se resuspendieron nuevamente en PBS.

Inmediatamente después las células se adquirieron en el citómetro FACSCanto II y utilizamos el programa informático ModFit LT 4.1 para analizar la proliferación celular

en base a la pérdida de intensidad del marcador verde fluorescente PKH e Infinicyt versión 7.1. de Cytognos.

#### **4.2.3.4 Estudio de citoquinas solubles por citometría de flujo.**

##### **4.2.3.4.1 Estudio de citoquinas solubles de linfocitos T CD45RA+ polarizados hacia linfocitos Th1 y Th2.**

Para poder realizar el análisis de las citoquinas solubles partimos de 100µl de sobrenadante obtenidos de cultivos de linfocitos T CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con diferentes citoquinas y pomalidomida.

En el estudio se empleó el Kit comercial BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, que nos permitió estimar la cantidad de las citoquinas solubles: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  presente en el sobrenadante.

El protocolo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, reconstituimos el estándar liofilizado con 2ml de Assay Diluent. A partir del estándar preparamos diluciones seriadas de concentraciones conocidas, de manera que podemos establecer una recta patrón. A continuación, se preparó la mezcla de las esferas de captura para cada una de las citoquinas a determinar.

Cada uno de los tipos de esferas emite una fluorescencia de diferente intensidad que se detecta en FL3, lo que nos permite realizar un análisis simultáneo de las seis citoquinas solubles.

Una vez preparados todos los reactivos necesarios, se mezclaron 50µL de las esferas de captura, 50µL de cada una de las diluciones estándar o 50µL de la muestra problema y 50µL del anticuerpo de detección (conjugado en PE). Incubamos durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadió 1mL de Wash Buffer y



centrifugamos a 200g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 300µL de Solución de Lavado. Adquirimos en un citómetro FACSCanto II, utilizando el programa BD FACS Diva software. El análisis de datos se desarrolla con el programa FCAP Array™ Software versión 3.0

#### **4.2.3.4.2 Estudio de citoquinas solubles de linfocitos T tratados con la FP del AOVE**

Para poder realizar el análisis de las citoquinas solubles partimos de 100µl de sobrenadante obtenidos de cultivos de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con diferentes dosis de polifenol.

Se realizó el mismo protocolo que para el estudio de las citocinas solubles linfocitos T CD45RA+ polarizados hacia linfocitos Th1 y Th2 (descrito en el apartado anterior)

#### **4.2.4 Estudio de citoquinas solubles por ELISA.**

Para analizar la producción de IL-2 por linfocitos Th1 cuantificamos esta citoquina en 100 µl de sobrenadante obtenido de cultivos de linfocitos T CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con IL12, INF-γ, anti-IL4 y pomalidomida. Para ello utilizamos el kit IL-2 human SimpleStep™ ELISA Kit de Abcam. Añadimos 50 µl de sobrenadante de cultivo a cada pocillo de las placas suministradas por el kit y 50 µl del cocktail de anticuerpos, incubando la placa 1 hora a temperatura ambiente y en agitación de 400 r.p.m. A continuación, lavamos cada pocillo 3 veces con 350 µl de Tampón de lavado PT y añadimos 100 µl de substrato TMB a cada pocillo incubando durante 10 minutos en oscuridad y a 400 r.p.m. Posteriormente, se añadieron 100 µl de Solución de parada y se incubaron en agitación durante 1 minuto. Por ultimo medimos

la densidad óptica a 450 nm y analizamos los datos en relación a la recta patrón anteriormente establecida.

Para analizar la producción de IL-10 por linfocitos Th2 cuantificamos esta citoquina en 100 µl de sobrenadante obtenido de cultivos de linfocitos T CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con IL4, IL-2, anti-INF- $\gamma$ , anti-IL12 y pomalidomida. Para ello utilizamos el kit Quantikine ELISA Human IL-10 Immunoassay de R&D. Añadimos 200 µl de sobrenadante de cultivo a cada pocillo de las placas suministradas por el kit incubando la placa 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, lavamos cada pocillo 4 veces con 350 µl de Tampón de lavado y añadimos 200 µl de conjugado de IL-10 a cada pocillo incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, lavamos cada pocillo 4 veces con 350 µl de Tampón de lavado y se añadieron 50 µl de Solución de parada a cada pocillo. Por ultimo medimos la densidad óptica a 450 nm y analizamos los datos en relación a la recta patrón anteriormente establecida.

#### **4.2.5 Estudios de Western Blot**

##### **4.2.5.1 Expresión de los factores de transcripción TBET y GATA3 en linfocitos CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28, citocinas y pomalidomida.**

Mediante estudios por Western Blot se analizaron la expresión de los factores de transcripción TBET y GATA3 implicados en la polarización hacia linfocitos Th1 y Th2 respectivamente en cultivos de linfocitos CD45RA+ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con las citoquinas antes mencionadas y pomalidomida.

Tras 5 días de cultivo, se recogieron las células de la placa de T75 y se homogenizaron en 20 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.3), conteniendo además DTT (2 mM), ASB (1%), NP-40 (1%), NaCl (150 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM), NaF (10 mM) (Sigma Aldrich, St.

Louis, MO, USA) y 10% de cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el Kit BCA (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rocford, IL, USA).

Mediante electroforesis se separaron 15 µg de proteína en geles de poliacrilamida- SDS las Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Polyacrylamide Gels SDS-PAGE preparados según Laemmli. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas verticales aplicando un voltaje de 100-150V y se transfirieron a membranas de PVDF. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (2% de BSA, Tween-20 al 0.1% en TBS) seguido de una incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-T-bet (H-210): sc-21003, anti-GATA3 (HG3-35): sc-269 (Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-Actin (Abcam, ab6276, Cambridge, UK). A continuación, se lavaron 2 veces las membranas con TTBS durante 10 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152, Baltimore, USA) o HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson Immuno Research, 715-035-150, Baltimore, USA) durante 1 hora.

La detección de los anticuerpos se realizó mediante reacción de quimioluminiscencia con el kit Western blotting Luminol Reagent (Santa Cruz biotechnology, sc-2048).

#### **4.2.5.2 Expresión de p-AKT, y NFκB en cultivos de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 tratados con FP de AOVE**

Mediante estudios por Western Blot se analizaron las posibles vías de señalización afectadas en los linfocitos T por el tratamiento con la FP del AOVE.

Con este fin evaluamos la expresión de la p-AKT, y NFκB en cultivos de linfocitos T en flask de 75 cm, estimulados con anti-CD3/anti-CD28 durante 48 horas, tratados con diferentes concentraciones de FP de AOVE (10, 45, 60 µg/ml).

Para el estudio de la expresión de NFκB realizamos subfraccionamiento celular para evaluar la expresión de dicha proteína en el citoplasma y núcleo celular. Transcurridas las 48 horas de cultivo, se recogieron las células y lavaron en 10 ml de PBS centrifugando a 1200 r.p.m durante 10 minutos. El pellet celular se resuspendió en el tampón CEB que contiene inhibidores de proteasas y se incubó durante 10 minutos a 4°C en agitación. Tras centrifugar a 500 x g durante 5 minutos se transfirió en sobrenadante (Extracto citoplasmático) a un tubo nuevo. Al pellet restante se le añadió tampón MEB, se vorteoó durante 5 segundos e incubó a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000xg durante 5 minutos obteniéndose sobrenadante con el extracto de membranas. Al pellet resultante se le añadió tampón NEB, se vorteoó durante 15 segundos e incubó durante 30 minutos a 4°C.

Tras centrifugar a 5000 xg durante 5 minutos se obtuvo sobrenadante con el extracto nuclear soluble y pellet al que se le añadió tampón de extracción de cromatina preparado con 100mM CaCl<sub>2</sub>, nucleasa Micrococcal y tampón NEB. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y centrifugó a 16000g durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido (extracto de unión a la cromatina nuclear) se transfirió a un nuevo tubo y al pellet restante se le añadió tampón PEB y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Tras centrifugar a 16000g durante 5 minutos se obtuvo sobrenadante con el extracto citoesquelético.

Para el estudio de P-AKT la obtención de proteína se realizó de la siguiente forma. Tras 48 horas de cultivo, se recogieron las células de la placa de 96 pocillos y se homogenizaron en 20 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.3), conteniendo además DTT (2 mM), ASB (1%), NP-40 (1%), NaCl (150 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM), NaF (10 mM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 10% de cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el Kit BCA (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rocford, IL, USA).

Posteriormente se realizó el mismo protocolo indicado en el apartado anterior utilizando en este caso los siguientes anticuerpos: anti-Akt (cell signaling, 9272, Danvers, MA, USA), anti-Mapk1/Mapk2 (Abcam, ab4819, Cambridge, UK), anti- NF-KB p65 (Cell Signaling Technology) and anti-β-Actin (Abcam, ab6276, Cambridge, UK).

## **4.2.6 Estudios de ChiP**

### **4.2.6.1 Crosslinking**

Tras 5 días de cultivo, se recogieron las células de la placa de T75 y se añadió 900 µl de solución de crosslinking +11% de formaldehído. Tras incubar durante 10 min a 37°C, se paró el crosslinking añadiendo 682 µl de Glicina 2M e incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS frío, siendo el último en 2 ml de PBS con inhibidores de proteasas durante 5 minutos a 4000 rpm a 4°C en Falcon de 15 ml de poliestireno aptos para bioruptor. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet se congeló a -80°C, hasta su uso.

#### **4.2.6.2 Lisis y sonicación**

Se resuspendió el pellet en 2.5 ml de lysis buffer 1 (+ inhibidores) y se homogenizó con la pipeta, tras incubar en hielo durante 10 minutos, se centrifugó 5 min a 4000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 1 ml de lysis buffer 2 (+inhibidores) con la pipeta. A continuación se sonicó en Bioruptor durante 10 ciclos de 30 segundos, con interrupciones de otros 30 segundos. Se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm a 4°C y se pasó el sobrenadante a un eppendorf limpio para volver a centrifugar durante 10 min a 13000 rpm 4°C y obtener en sobrenadante la cromatina. Está se puede conservar durante una semana a 4°C.

#### **4.2.6.3 Cuantificación y chequeo**

Partiendo de una alícuota de 100 µl se añadió 400 µl de Lysis buffer 2 y 10 µl Proteinasa K a 10 mg/ml, tras incubar a 65°C se fenolizó y precipitó con etanol y acetato de sodio 3M durante 30 min a -80°C. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a velocidad máxima y el pellet resultante se lavó con etanol al 70% y resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O miliQ para cuantificarlo en el nanodrop.

#### **4.2.6.4 ChIP**

Para cada punto se usarán 10-15 µg de cromatina previamente comprobada y cuantificada, el volumen se diluyó diez veces en IP buffer con inhibidores de proteasas y se añadió el anticuerpo (3-5 µg) incubándolo en rotación a 4°C.

#### **4.2.6.5 Lavados y Elución**

A cada tubo se agregó 30 µl de bolitas proteína A dynabeads y se incubó durante 2h en rotación a 4°C. Posteriormente se realizaron varios lavados con 500 µl Wash 1 buffer, incubando 5 minutos a 4°C, para posteriormente centrifugar durante 1 min a 3600 rpm a

4°C y descartar el sobrenadante. El proceso se repitió con los bufferes Wash 2, 3 y TE1X. A continuación, se añadieron 50 µl de Elution Buffer (TE1X+1% SDS) e incubó durante 10 minutos a 65°C, se pasaron 30 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron a las bolitas otros 30 µl de Elution buffer. Tras incubar 10 minutos a 65°C se pasaron 30 µl del sobrenadante junto a la elución anterior.

#### **4.2.6.6 Descrosslinking y tratamiento con proteinasa K.**

Se añadieron 90 µl de Elution Buffer a los 60 µl de Elución. Se cogió la décima parte del volumen obtenido de cromatina usado para la IP y se llevó a 150 µl con Elution buffer, incubándolo 4 horas a 65°C. Posteriormente, se añadió a cada tubo 142.5 µl TE1X y 7.5 µl de Proteinasa K (10 mg/ml), incubándolo durante 1h a 37°C. A continuación, se añadió 1 volumen de Fenol:cloroformo, se mezcló en Vortex y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad, pasando el sobrenadante a un nuevo tubo y añadiendo 1 volumen de cloroformo. Tras centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió 2 volúmenes de etanol 96%, acetato de sodio 3M y 1 µl de glucógeno. Se incubó durante 30 minutos a -80°C y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a velocidad máxima a 4°C. Se lavó el pellet con etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos a velocidad máxima a 4°C. Por último se descartó el sobrenadante y se secó el pellet, para resuspenderlo finalmente en 50 µl de agua miliQ

#### **4.2.4 Estudios in vivo**

Para la generación de EICH murino empleamos como donantes ratones de entre 8 -10 semanas de la cepa C57BL/6 con haplotipo H2b y como receptores ratones de entre 8-10 semanas de la cepa BALB/c con haplotipo H2d. De esta manera se consigue un modelo de incompatibilidad HLA para generar EICH comparable a la que sucede en

humanos. Mediante citometría de flujo, es posible la identificación de las células procedentes tanto del donante como del receptor en los ratones trasplantados, debido a la existencia de anticuerpos monoclonales específicos para cada cepa de ratón. De este modo se puede conocer el quimerismo a diferentes tiempos post-trasplante.

Se analizaron los efectos de una dieta estándar suplementada con 600 ppm de FP, sobre la aparición de EICH y la supervivencia de cada grupo experimental.

#### **4.2.4.1 Células empleadas en el trasplante**

En el modelo de trasplante alogénico murino utilizamos:

- MO procedente de los fémures y las tibias de los ratones donantes. Se introdujo RPMI a presión por el canal medular de los huesos usando agujas de 25G (0,5 x 16mm). La solución celular resultante se hizo pasar a través de filtros de 40µm de poro. Después del lavado de las células se procedió a un recuento celular mediante una cámara de Neubauer.
- Células maduras del bazo del ratón donante, para la generación de EICH en el ratón receptor. El bazo se disgregó mecánicamente con dos portas esmerilados. El producto obtenido se filtró a través de 40µm de poro y de la misma manera que con la MO tras el lavado de las células se determinó el número de células de las que disponíamos.

Las dos soluciones celulares se resuspendieron de modo que a cada ratón receptor se le inyectó  $5 \times 10^6$  células de MO asociado o no a  $5 \times 10^6$  células del bazo en 200µl de RPMI.

#### **4.2.4.2 Alimentación**

Para analizar el efecto de la FP del AOVE en el modelo murino de EICH se elaboraron dos tipos de dietas:



- Dieta control: Para ellos se mezclaron 100 gramos de dieta estándar en polvo irradiada(2014S Harlan Laboratories) con 70 ml de agua y 1 ml de Polietinel glicol (PEG) al 80% y Tween-80 al 20%. La masa resultante se amasó, se le dio forma de pellet y se dejó secar durante un par de horas.
- Dieta suplementada con 600 ppm de FP de AOVE: Para ello se mezclaron 100 gramos de dieta estándar en polvo irradiada (2014S Harlan Laboratories) con 70 ml de agua y 60 mg de FP de AOVE disuelto en 1 ml de Polietinel glicol (PEG) al 80% y Tween-80 al 20%. Al igual que la dieta control, la masa resultante se amasó, se le dio forma de pellet y se dejó secar durante un par de horas.

#### **4.2.4.3 Irradiación**

El proceso de irradiación se llevó a cabo empleando una fuente de Cesio 137.

Los ratones receptores se sometieron a una irradiación corporal letal de 1000cGy dividida en dos fracciones de 500cGy separadas por 4 horas.

#### **4.2.4.4 Trasplante**

Tres horas después de la segunda irradiación procedimos al trasplante de los ratones receptores. El ratón receptor se inmoviliza en una jaula donde con una bombilla infrarroja de calor conseguimos dilatar las venas laterales de su cola. Inmediatamente después administramos con una jeringa TERUMO MYJECTOR de 0,5mL y una aguja montada de 27x1/2"-0,4x12mm una infusión de  $5 \times 10^6$  células de MO asociado o no a  $5 \times 10^6$  esplenocitos de ratones donadores en 200µl de RPMI.

- Grupos experimentales:

Con estos dos tipos de dietas se establecieron cuatro grupos experimentales:

- 1. Grupo de ratones BALB/c trasplantados con células de médula ósea procedente de ratones C57BL/6 y que recibieron una dieta estándar en polvo irradiada (2014S Harlan Laboratories).
- 2. Grupo de ratones BALB/c trasplantados con células de médula ósea procedente de ratones C57BL/6 y que recibieron una dieta estándar en polvo irradiada (2014S Harlan Laboratories).
- 3. Grupo de ratones BALB/c trasplantados con células de médula ósea y células del bazo procedentes de ratones C57BL/6 y que recibieron una dieta estándar en polvo irradiada (2014S Harlan Laboratories).
- 4. Grupo ratones BALB/c trasplantados con células de médula ósea y células del bazo procedentes de ratones C57BL/6 y que recibieron una dieta estándar en polvo irradiada (2014S Harlan Laboratories) y suplementada con 600 p.p.m de FP de AOVE Oleostepa®, Sevilla.

#### **4.2.4.5 Evaluación de EICR**

Los ratones receptores después de ser irradiados se estabularon en jaulas estériles con aisladores de aire filtrado y presión positiva.

Todos los ratones de cada jaula recibieron el mismo tipo de dieta y a la cantidad de 3 gramos diarios por ratón. Se valoró individualmente tres veces a la semana la variación del peso así como la aparición de otros signos de EICR (postura, actividad, erizamiento del pelo e integridad de piel) empleando una escala de 0-2<sup>95</sup>.

#### **4.2.4.6 Análisis de hematimetría**

Para el análisis de las células sanguíneas, se sacrificaron ratones a los que se les había inducido EICRa y habían sido alimentados con dieta control y dieta suplementada con FP de AOVE a diferentes tiempos (días +5, y +21 post-trasplante). Se recolectó sangre periférica mediante punción cardiaca utilizando jeringuillas heparinizadas, en tubos de 1 ml (MiniCollect 1 ml K3EDTA, Grenier Bio-One, Kremsmünster, Austria). Las células se cuantificaron en el contador automático Mythic 18 Vet (Orphée, Geneva, Plan-les-Ouates, Switzerland).

#### **4.2.4.7 Análisis por citometría de flujo**

Con objeto de analizar el momento del quimerismo, la evolución del trasplante y el efecto de las diferentes dietas sobre la evolución de la EICR, se sacrificaron ratones a diferentes días post-trasplante (+4, +14, +21) y se analizó mediante citometría de flujo la sangre periférica, la MO y el bazo.

El panel utilizado fue el siguiente:

- H2Db-FITC/H2Dd-PE/CD45-APC/CD3-PerCP-Cy5.5/CD25-PeCy7.
- B220-FITC/CD11b-PE/CD4-APC/CD3-PerCP-Cy5.5/CD45-APCCy7- CD25-PeCy7.
- CD4-FITC/CD25- PE/FoxP3-APC

#### **4.2.4.8 Análisis de citocinas en plasma.**

Para poder realizar el análisis de las citoquinas solubles partimos de 250µl de sangre de ratón obtenida mediante punción cardiaca.

En el estudio se empleó el Kit comercial MACSPlex Cytokine 10 kit mouse de Miltenyi Biotec, que nos permitió cuantificar la cantidad las siguientes citoquinas solubles: GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en plasma.

El protocolo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos a 4°C y se congeló a -80°C el sobrenadante hasta su uso.

Para la realización de la recta de calibrado, reconstituimos el estándar liofilizado con 200 $\mu$ l de MACSPlex Buffer. A partir del estándar preparamos diluciones seriadas de concentraciones conocidas.

Una vez preparados todos los reactivos necesarios, se mezclaron 20 $\mu$ L de las esferas de captura de las 10 citocinas a cuantificar, 50 $\mu$ L de cada una de las diluciones estándar o 50 $\mu$ L de la muestra problema y 50 $\mu$ L de la solución MACSPlex. Incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y agitación. Posteriormente, se añadió 0.5mL de solución MACSPlex y centrifugamos a 3000g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 80 $\mu$ L de Solución MACSPlex y 20  $\mu$ L de Reactivo de detección. Incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Por último, añadimos 0.5mL de solución MACSPlex y centrifugamos a 3000g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 200 $\mu$ L de Solución MACSPlex. Adquirimos en un citómetro FACSCanto II, utilizando el programa BD FACS Diva software. El análisis de datos se desarrolla con el programa Infinicyt versión 7.1. de Cytognos.

#### **4.2.4.9 Cuantificación de butirato en heces**

Con el objetivo de analizar si el uso de una dieta rica en FP de AOVE producía cambios en la microbiota que pudieran tener efectos beneficiosos sobre la EICR, analizamos la concentración de ácido butírico en heces de ratones a los que se les había inducido EICRa a diferentes tiempos tras el trasplante.

Para ello recogimos en condiciones de esterilidad heces en los días +2, +7 y +14 tras el trasplante y las homogenizamos con 1.5 ml de agua MiliQ. A continuación, añadimos 0.4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (al 50%) y vortexamos durante 2 minutos para posteriormente añadir 300 µl de NaCl 5M, 1 ml de diethyl ether y 20 µl del patrón interno de ácido butírico. Por último, vortexamos durante 2 minutos y dejamos en nevera con hielo en balancín orbital durante 20 minutos para recoger la fase superior.

De esta fase, inyectamos 1 mL en el cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra y los resultados se compararon con los obtenidos con la recta de calibrado anteriormente preparada con 10 concentraciones diferentes de ácido butírico.

#### **4.2.4.10 Análisis histológico**

Con objeto de analizar la afectación de los distintos órganos dianas de la EICR, se sacrificaron ratones a diferentes tiempos (días +5, y +21 post-trasplante). Se extrajeron el bazo, piel, intestino delgado y grueso e hígado y fijaron en formaldehído al 4%. Los distintos tejidos fueron procesados para la inclusión en parafina, se realizaron cortes de 7mm y se realizó tinción con hematoxilina y eosina para posteriormente analizarlos histológicamente por microscopía.

### **4.3 Análisis estadístico.**

Se calcularon la media y desviación estándar y la mediana y el rango para cada variable.

Para evaluar el efecto de los fármacos sobre las distintas variables analizadas se empleó el test ANOVA o la T de student para datos pareados.

La supervivencia de los ratones en el modelo de EICH fue calculada desde el día del trasplante hasta la muerte por cualquier causa usando la estimación de Kaplan Meier.

Para la comparación entre las curvas de evolución de los signos de EICH de los ratones post-trasplante se empleó el test de modelo general de medidas repetidas.

Para la mayoría de los análisis estadísticos se usó el programa SPSS software (SPSS 15.0 Inc. Chicago IL. USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ .



# **RESULTADOS**





## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efecto de la pomalidomida en la polarización de los linfocitos T

#### 5.1.1 Ensayos funcionales

Analizamos el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de linfocitos T CD45RA+ estimulados con anti-CD3 anti-CD28 en presencia de IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 para inducir polarización hacia Th1 e IL-4, IL-2, anti-INF- $\gamma$  y anti-IL-12 para polarización hacia Th2.

En el caso del cultivo realizado en condiciones de polarización hacia linfocito Th1, observamos un incremento en la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI, median fluorescence intensity en inglés) para INF- $\gamma$  e IL-2 con el uso de pomalidomida a las dosis de 100 nM tal y como se muestra en la figura 10. La IL-2 y el INF- $\gamma$  son citoquinas producidas por linfocitos Th1, lo que nos pone de manifiesto que la pomalidomida favorece la polarización hacia linfocito Th1 bajo condiciones de activación y en presencia de IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4.

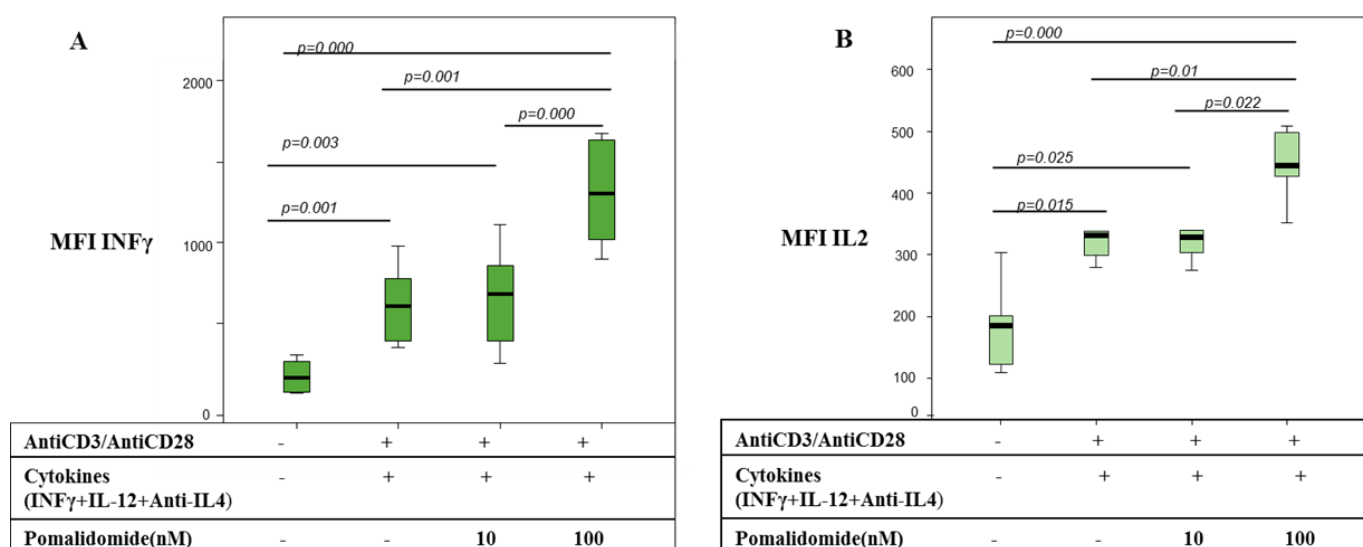


Figura 10: Intensidad Mediana de Fluorescencia de INF- $\gamma$  (A) e IL-2 (B) de linfocitos T CD45RA+ estimulados con antiCD3 y antiCD28 en presencia de IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 y pomalidomida a 10 nM y 100 nM para analizar polarización hacia linfocito Th1.

Cuando analizamos las condiciones de polarización hacia Th2, pudimos observar un incremento en la MFI de IL10 e IL4 en presencia de pomalidomida a las diferentes dosis utilizadas tal y como se muestra en la figura 11. En este caso, la IL-10 y la IL-4 son citoquinas producidas por linfocitos Th2, lo que pone de manifiesto que la pomalidomida favorece la polarización hacia linfocito Th2 bajo condiciones de activación y en presencia de IL-4, IL-2, anti-INF- $\gamma$  y anti-IL-12.

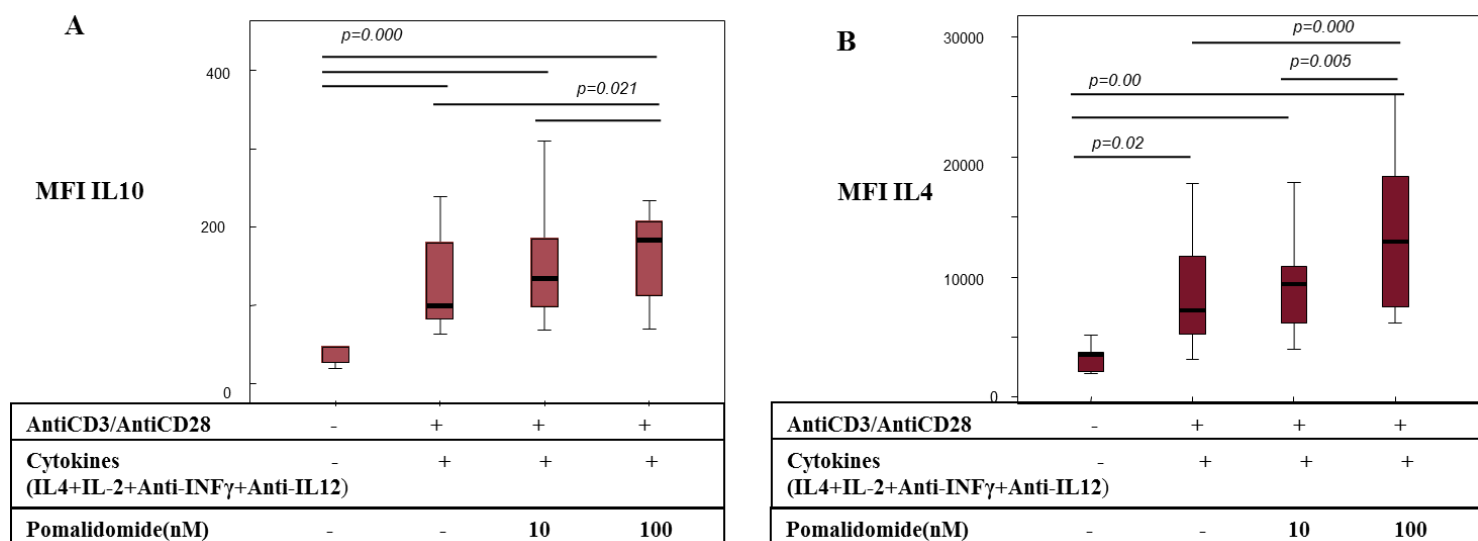


Figura 11: Intensidad Mediana de Fluorescencia de IL-10 (A) e IL-4 (B) de linfocitos naïve CD45RA+ estimulados con antiCD3 y antiCD28 en presencia de IL-4, IL2, Anti- INF- $\gamma$  y Anti-IL12 y pomalidomida a 10 nM y 100 nM para analizar polarización hacia linfocito Th2.

### 5.1.2 Patrón de citocinas en suero

Del mismo modo, comprobamos mediante citometría de flujo el efecto de la pomalidomida sobre el patrón de producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadante del cultivo de células naïve CD45RA+ activadas con anti-CD3 y antiCD28 y en presencia de las distintas citocinas utilizadas para la polarización (IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 para Th1 e IL-4, IL-2, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12 para Th2). Tal y como podemos observar en la figura 12, se produce un incremento de la concentración de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , e IL2, siendo este incremento estadísticamente significativo para IL-2 cuando añadimos pomalidomida a 100nM al cultivo.

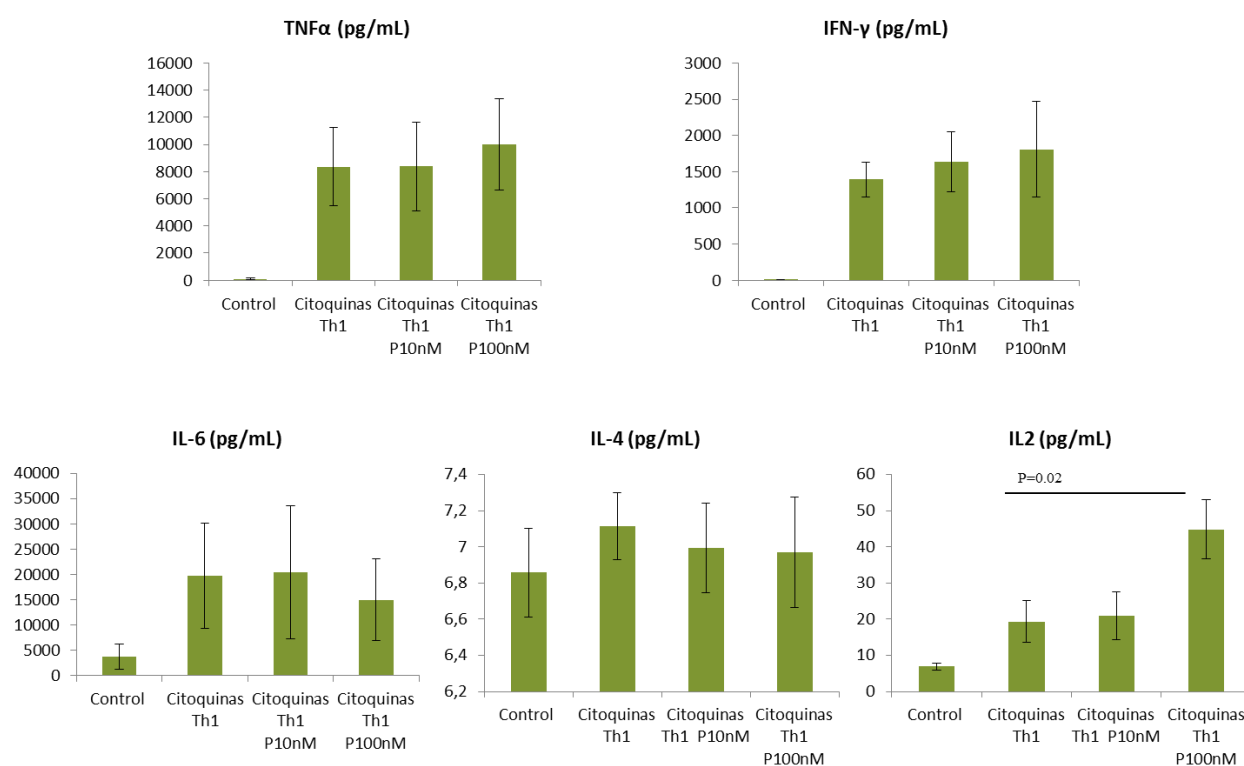


Figura 12: Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-6 mediante CBA en el sobrenadante de cultivo linfocitos naïve CD45RA+ activados y tratados con citocinas que inducen polarización hacia Th1 y pomalidomida a 10nM and 100 nM.

Al analizar el efecto de la pomalidomida sobre la producción de citoquinas en linfocitos T CD45RA+ activados y tratados con citoquinas que estimulan la polarización hacia linfocito Th2, encontramos que se producía un aumento en la concentración de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , y de IL-4 e IL-2, siendo en los dos últimos casos las diferencias estadísticamente significativas, en el sobrenadante del cultivo tal y como se observa en la figura 13. En este caso, los datos muestran un aumento en presencia de pomalidomida tanto en la polarización hacia Th1 como Th2 en condiciones de activación y en presencia de IL-4, IL-2, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12.

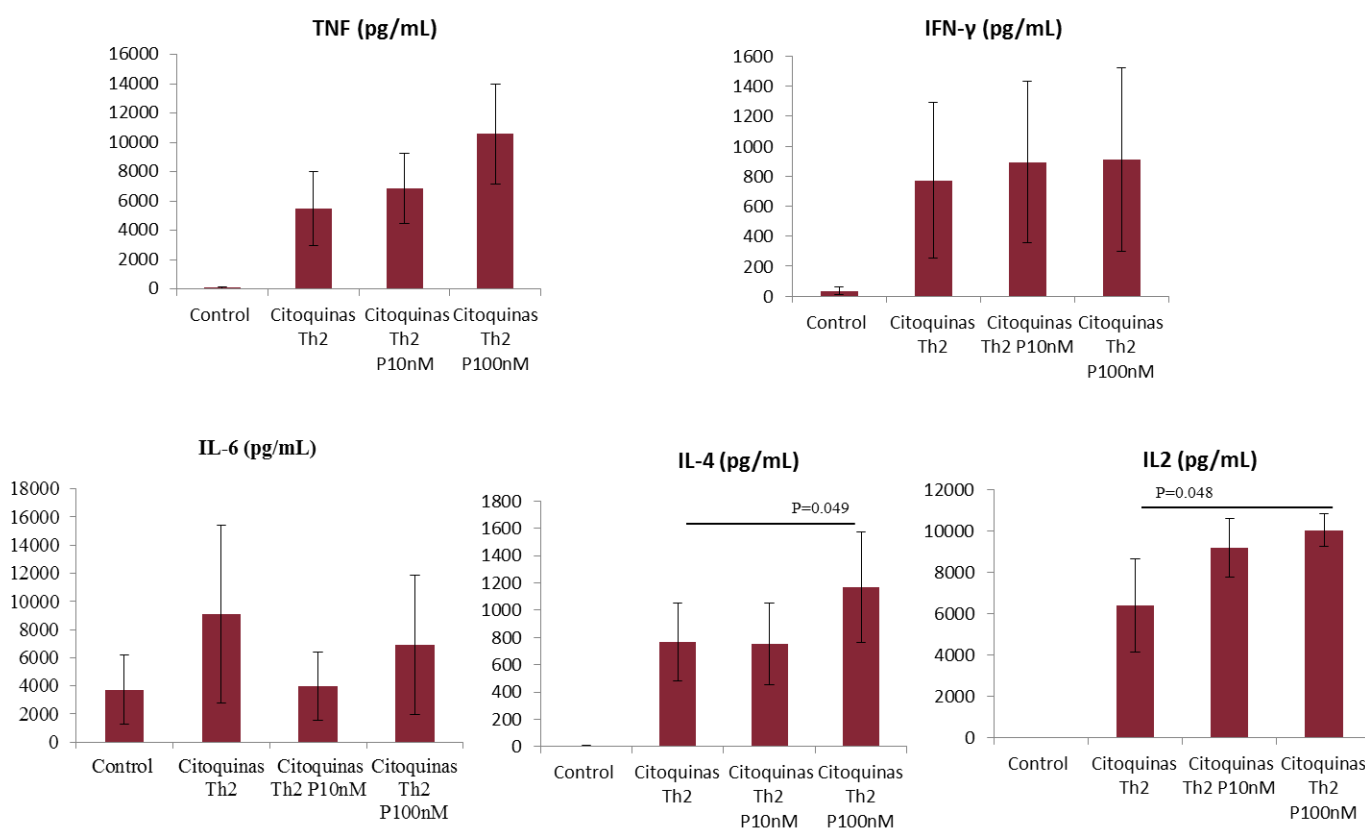


Figura 13: Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-4 e IL-6 mediante CBA en el sobrenadante de cultivo linfocitos naïve CD45RA+ activados y tratados con citoquinas que inducen polarización hacia Th2 y pomalidomida a 10 nM and 100 nM.

Con el propósito de confirmar los resultados anteriormente descritos sobre el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de los linfocitos Th1, analizamos mediante ELISA la producción de IL-2, en el sobrenadante de los cultivos.

Encontramos como la pomalidomida induce un aumento estadísticamente significativo en la producción de IL-2 de linfocitos naïve activados y tratados con IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 (figura 14). Estos resultados confirman que la pomalidomida favorece la polarización hacia linfocito en condiciones de activación y bajo tratamiento con distintas citoquinas.

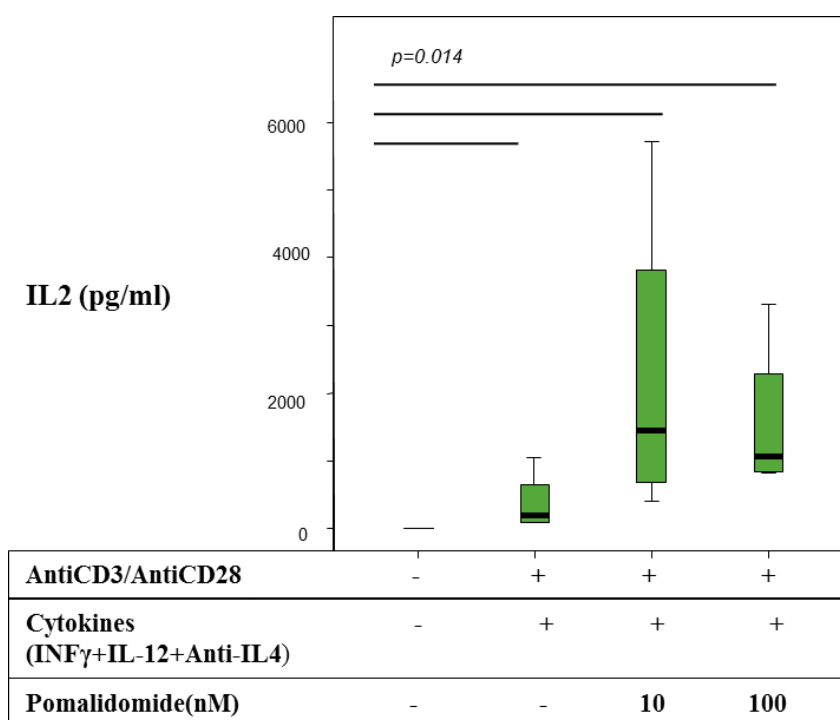


Figura 14: Determinación de la concentración de IL-2 (A) por ELISA en el sobrenadante del cultivo de células CD45RA+ naïve activados con anti-CD3 y anti-CD28, suplementado con citoquinas que inducen polarización hacia Th1 y pomalidomida a 10 and 100 nM.

### 5.1.3 Efecto de la pomalidomida en la expresión de los factores de transcripción Tbet y GATA3.

Con el objeto de analizar la expresión de los factores de transcripción Tbet y GATA3 implicados en la polarización hacia linfocito Th1 y Th2 respectivamente, realizamos experimentos de Western Blot en cultivos de linfocitos T naive, activados y tratados con las distintas citoquinas que inducen polarización hacia linfocito Th1 y Th2 en presencia o no de pomalidomida a distintas concentraciones. Como podemos observar en la figura 15, la pomalidomida a 100 nM producía un incremento en la expresión de Tbet en células CD45RA+ activadas con anti-CD3 y anti-CD28 y suplementadas con IL-2, INF- $\gamma$  y anti-IL-4. Con estos resultados, podemos afirmar que la pomalidomida, induce un aumento de la polarización hacia célula Th1 en condiciones de activación y con tratamiento con IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 a través de un aumento en la expresión del factor de transcripción Tbet.

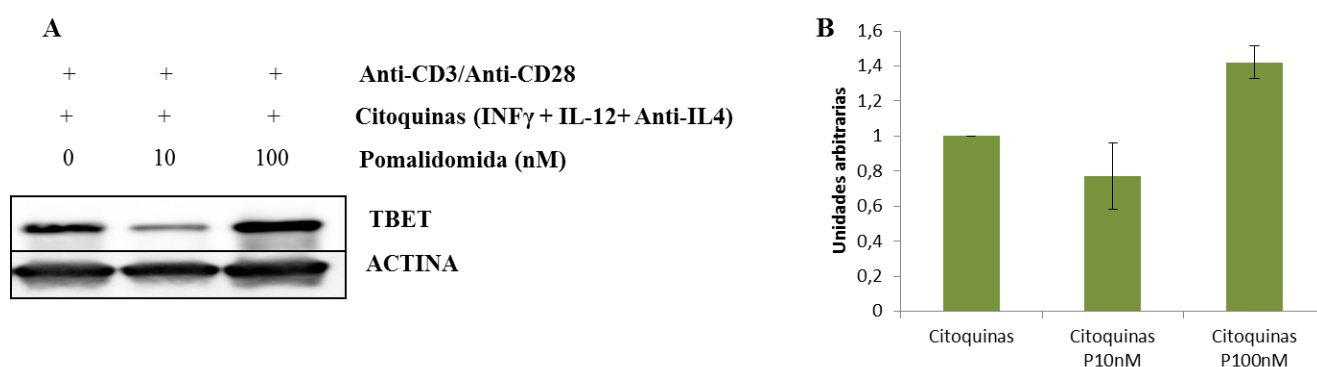


Figura 15: Ensayos de Western blot para TBET en de linfocitos naïve CD45RA+ estimulados con antiCD3 y antiCD28 en presencia deIL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 y pomalidomida a 10 nM y 100 nM

Del mismo modo, analizamos el efecto de la pomalidomida sobre la expresión de GATA-3 bajo condiciones de polarización hacia linfocito Th2, y tal y como se observa en la figura 16, comprobamos que la pomalidomida a 100 nM producía un incremento en la expresión de GATA-3. Con estos resultados, podemos inferir que la pomalidomida, induce un aumento de la polarización hacia linfocito Th2 en condiciones de activación y estimulación con IL-4, IL-2, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12, a través de un incremento en la expresión del factor de transcripción Tbet.

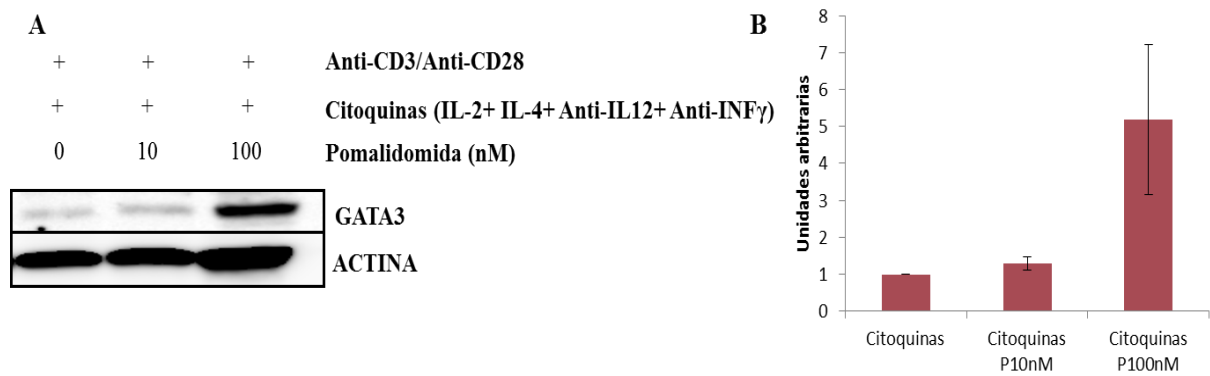


Figura 16: Ensayos de Western blot para GATA3 en linfocitos naïve CD45RA<sup>+</sup> estimulados con antiCD3 y antiCD28 en presencia de IL-4, IL2, Anti- INF- $\gamma$  y Anti-IL12 y pomalidomida a 10 nM y 100 nM.



### 5.1.4 Efecto de la pomalidomida sobre las marcas de activación e inhibición de histonas en los factores de transcripción Tbet y GATA3.

Por último, quisimos determinar si el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de los linfocitos estaba mediado a través de modificaciones epigenéticas, más específicamente, sobre marcas de activación o inhibición de histonas. Para ello, estudiamos la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) considerada como marca de activación de transcripción de genes y la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me27) considerada como marca de represión de transcripción de genes, en los factores de transcripción Tbet y GATA-3.

Para analizar las marcas de activación y represión de Tbet, realizamos cultivos de linfocitos T CD45RA+ activados con anti-CD3y antiCD28 en presencia de IL12, INF- $\gamma$  y anti-IL4 con o sin pomalidomida a 10 nM. En el caso de H3K4me3, pudimos comprobar como la pomalidomida a 10 nM, producía un aumento en estas marcas de activación (figura 17), encontrando diferencias estadísticamente significativas al comparar el cultivo control con el resto de las condiciones de cultivo. Las diferencias en las marcas de represión H3K27me3 no fueron estadísticamente significativas (figura 17).

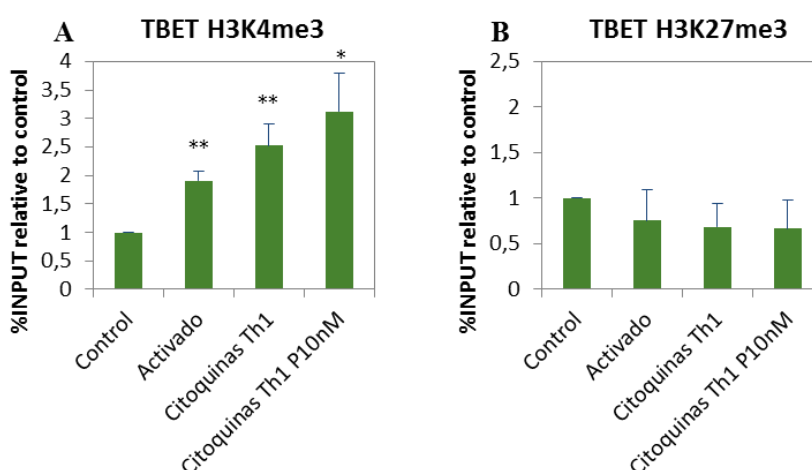


Figura 17: Análisis de las marcas de activación (A) y represión (B) de histonas en Tbet de cultivo de células CD45RA+ naïve activados con anti-CD3 y antiCD28, suplementado con citoquinas que inducen polarización hacia Th1 y pomalidomida a 10 nM.

Para analizar las marcas de activación y represión de GATA-3, realizamos cultivos de linfocitos T CD45RA+ activados con anti-CD3 y antiCD28 en presencia de IL-4, IL-2, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12 con o sin pomalidomida a 10 nM. En el caso de H3K4me3, pudimos comprobar como la pomalidomida a 10 nM, producía un aumento estadísticamente significativo en estas marcas de activación (figura 18). Nuevamente, las diferencias en las marcas de represión no fueron H3K27me3 no fueron estadísticamente significativas (figura 18).

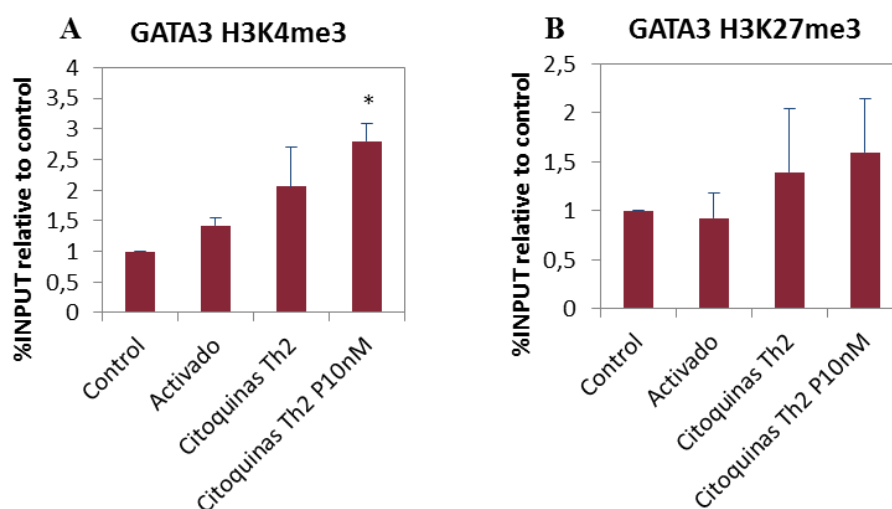


Figura 18: Análisis de las marcas de activación (A) y represión (B) de histonas en GATA-3 de cultivo de células CD45RA+ naïve activados con anti-CD3 y antiCD28, suplementado con citoquinas que inducen polarización hacia Th2 y pomalidomida a 10 and 100 nM

## 5.2 Efecto inmunomodulador de los PF del AOVE en la EICR.

### 5.2.1 Ensayos in vitro

#### 5.2.1.1 Efecto de los PF del AOVE en la viabilidad celular.

Con el propósito de conocer el efecto que ejerce la FP del AOVE sobre la viabilidad, cultivamos células mononucleadas, activadas con anti-CD3/anti-CD28 en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FP del AOVE (10, 45, 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

Para el análisis de la viabilidad celular empleamos el kit de Anexina-V, 7 amino-actinomicina-D, (7-AAD) de BD para citometría de flujo y pudimos comprobar como la FP del AOVE no afectaba a la viabilidad celular, no encontrándose diferencias en los porcentajes de células 7AAD+/Anexina + con las distintas dosis de FP, tal y como podemos observar en la figura 19.

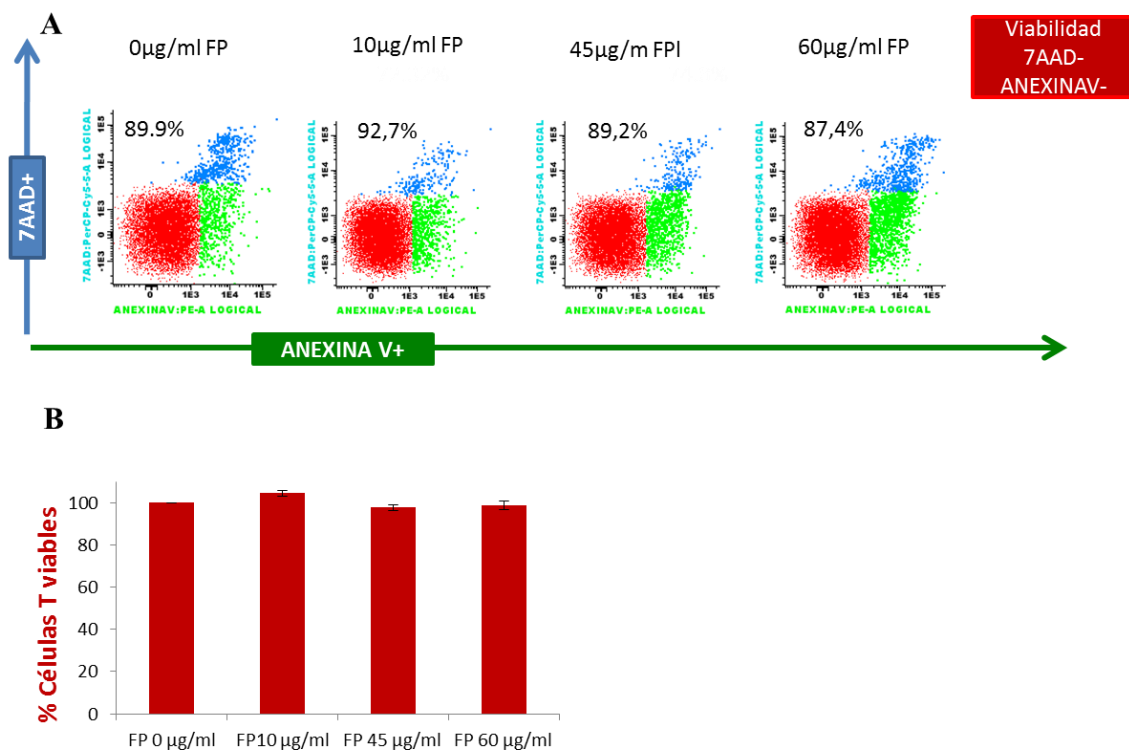


Figura 19: Diagramas de citometría de flujo de análisis deAnexina V y 7AAD de cultivos de linfocitos T activados con anti CD3 y anti CD28 y tratados con distintas

dosis de FP de AOVE. Se consideran las células viables aquellas Anexina V- 7AAD- (A) Porcentaje de células T viables (B).

### 5.2.1.2 Efecto de los PF del AOVE en la activación celular.

Con el fin de conocer el efecto que ejerce la FP del AOVE sobre la activación celular, cultivamos células mononucleadas, activadas con anti-CD3/anti-CD28 en ausencia y presencia de distintas concentraciones de FP del AOVE (10, 45, 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

El análisis de activación de linfocitos T se realizó por citometría de flujo mediante la expresión del marcador CD25. Pudimos observar como la FP del AOVE producía una disminución en el porcentaje de las células T activadas con anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con las diferentes dosis de FP del AOVE (figura 20), encontrándose la mayor disminución de la activación del cultivo con la dosis de 60  $\mu\text{g/ml}$  de FP.

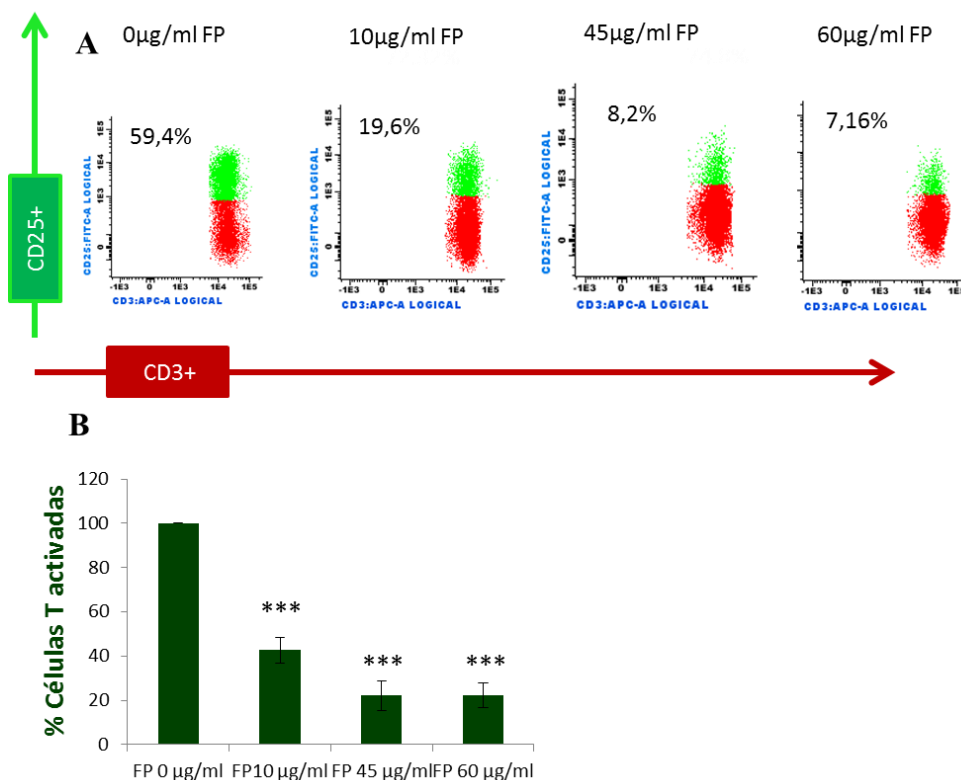


Figura 20: Diagramas de citometría de flujo de linfocitos T activados con anti CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE según la expresión en superficie de CD25 (A) Porcentaje de células T activadas.  $P < 0.01$

La FP del AOVE está constituida principalmente por 9 compuestos diferentes, siendo el tirosol, hidroxitirosol, los compuestos mayoritarios, por lo que quisimos comprobar si el efecto observado sobre la activación de los linfocitos T era el resultado del efecto aditivo de los distintos compuestos polifenólicos que forman la FP del AOVE. Para ello realizamos ensayos de viabilidad de cultivos de linfocitos T activados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con hidroxitirosol y tirosol (compuestos mayoritarios de la FP) a las mismas concentraciones a las que se encuentran en la FP del AOVE.

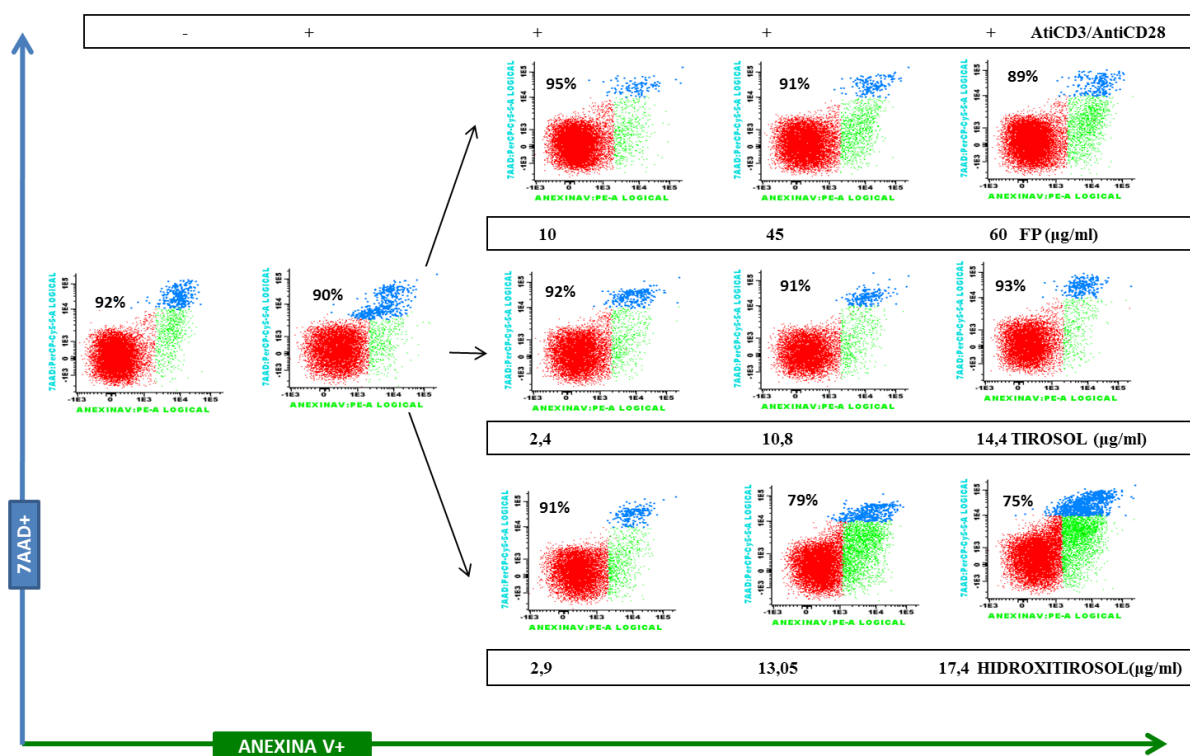


Figura 21: Diagramas de citometría de flujo de Anexina V y 7AAD de cultivo de linfocitos T activados con anti CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE, tirosol e hidroxitirosol.

Tal y como se muestra en la figura 21, la viabilidad del cultivo de linfocitos T no se afectada por el tratamiento con tirosol a las distintas dosis; sin embargo, en el caso del tratamiento con hidroxitirosol, se producía una disminución significativa de la viabilidad con las dos dosis más altas.

Al analizar la activación de los linfocitos T según la expresión de CD25, pudimos observar como la disminución de la activación era menor con cada compuesto utilizado de forma individual que con la FP del AOVE total, siendo la reducción de la activación significativa con la dosis mayor de tirosol y con las tres dosis estudiadas de hidroxitirosol.

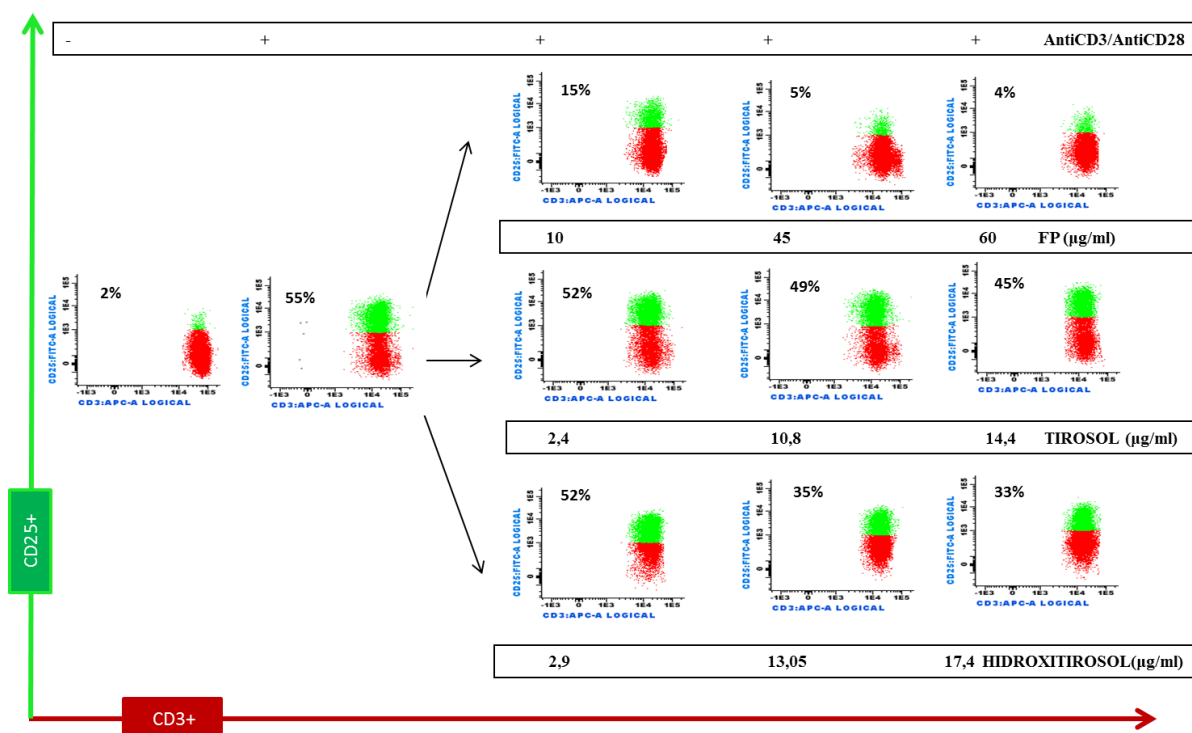


Figura 22: Diagramas de citometría de flujo de análisis de la activación de cultivo de linfocitos T estimulados con anti CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE, tirosol e hidroxitirosol.

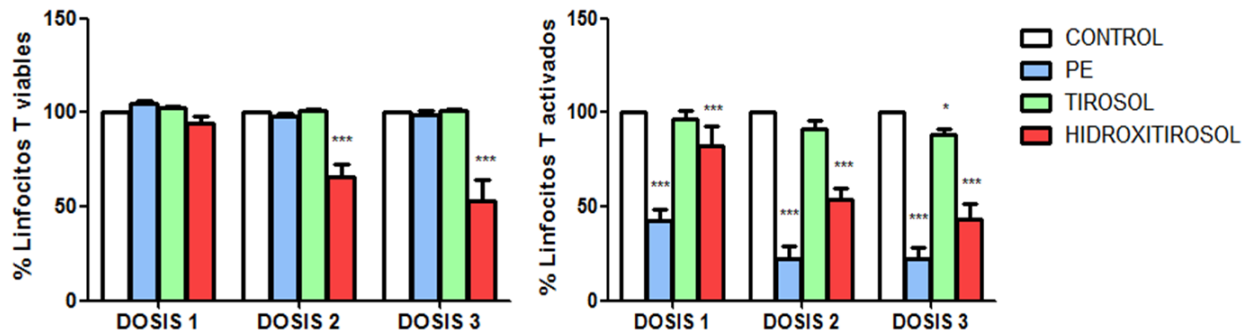


Figura 23: Porcentaje de células T viables (A) y células T activadas tras el tratamiento con las distintas dosis de FP de AOVE, tirosol e hidroxitirosol. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

### 5.2.1.3 Efecto de los PF del AOVE en la proliferación celular.

Del mismo modo estudiamos el efecto de la FP del AOVE sobre la proliferación de los linfocitos T. Para ello realizamos ensayos de proliferación con el kit PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit en linfocitos T activados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con las diferentes dosis de FP de AOVE. Observamos cómo se producía una disminución de las poblaciones en proliferación (subpoblaciones con intensidad débil para PKH). Una vez más, la mayor disminución de la proliferación la encontramos con la dosis de 60  $\mu\text{g/ml}$  de FP, tal y como observamos en la figura 24.

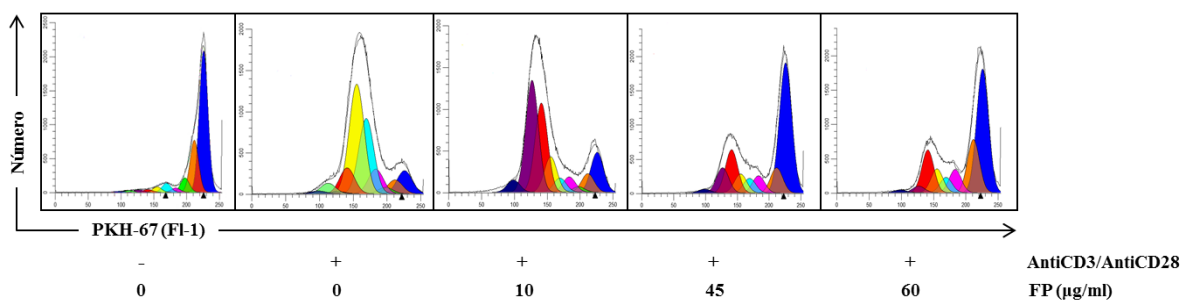


Figura 24: Ensayos de proliferación con PKH67 en cultivo de linfocitos T activados con anti-CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE.

Por último, quisimos determinar si el efecto observado sobre la proliferación de linfocitos T era el resultado del efecto aditivo de los distintos compuestos polifenólicos que forman la FP del AOVE. Para ello realizamos ensayos de proliferación de cultivos de linfocitos T activados con anti-CD3/anti-CD28 y tratados con hidroxitirosol y tirosol (compuestos mayoritarios de la FP) a las mismas concentraciones a las que se encuentran en la FP del AOVE.

Tal y como se observa en la figura 25, el tratamiento con hidroxitirosol produjo una disminución drástica de la proliferación con las dos dosis mayores, mayor que la producida con la FP del AOVE, quizás debida al aumento de la mortalidad anteriormente mostrada. Sin embargo, el tratamiento con tirosol no afectó a la proliferación del cultivo, como se muestra en la figura 25.



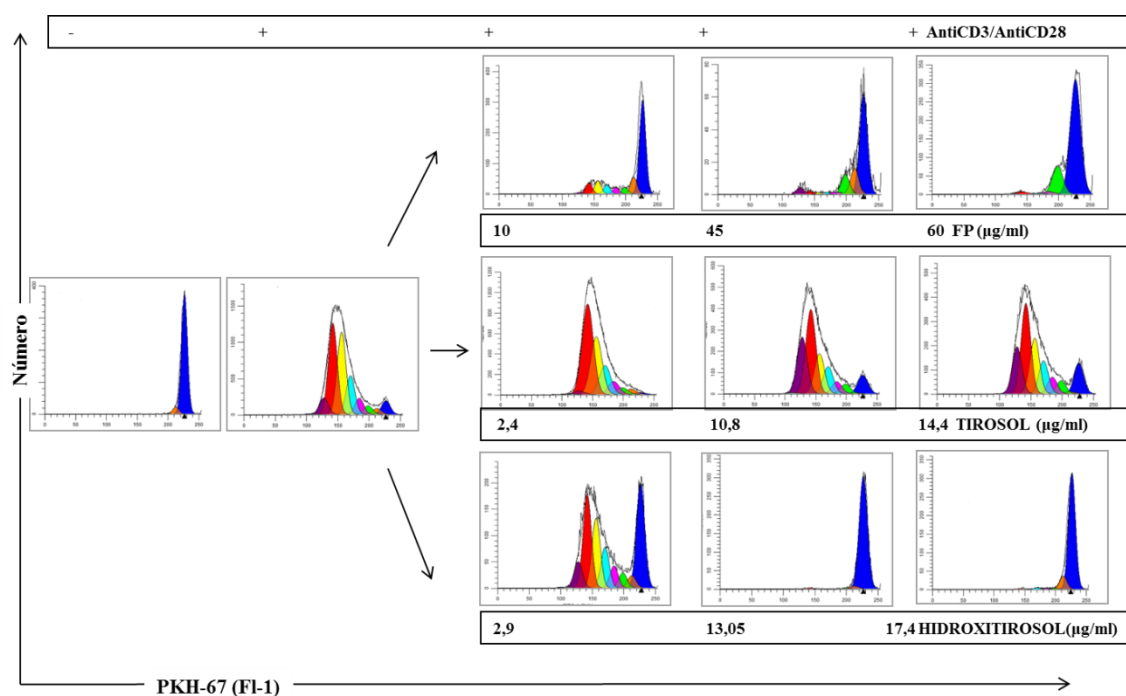


Figura 25: Ensayos de proliferación con PKH67 en cultivo de linfocitos T activados con anti-CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE, tirosol e hidroxitirosol.

Finalmente, para validar los resultados de proliferación celular de los linfocitos T tratados con la FP del AOVE observados mediante citometría de flujo empleando otra técnica, en este caso MTT.

Para ello tratamos células mononucleadas activadas con antiCD3 antiCD28 con las distintas dosis de FP del AOVE y las dosis correspondientes de tirosol e hidroxitirosol. Tal y como se muestra en la figura 26, pudimos comprobar que el tratamiento con FP del AOVE afectaba a la proliferación de los linfocitos en cultivo. En el caso del tratamiento con tirosol, no se producían cambios en la proliferación del cultivo, sin embargo, con hidroxitirosol, había disminución significativa de la proliferación, confirmándose los resultados obtenidos con los ensayos de proliferación con PKH.

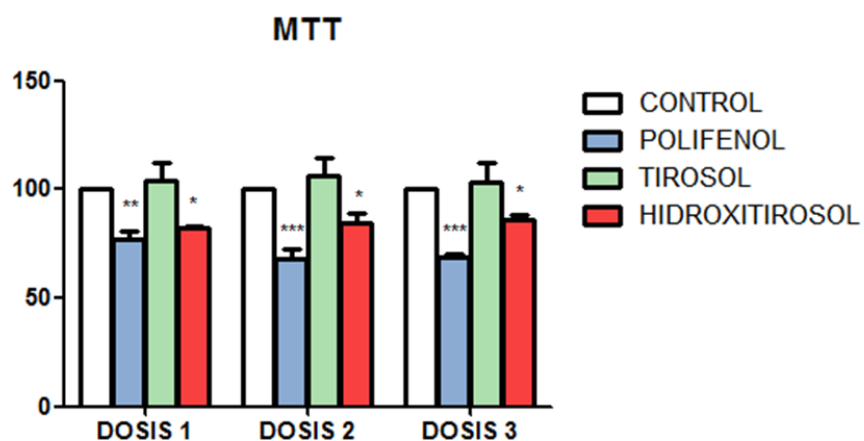


Figura 26: Ensayos de proliferación (MTT) en cultivo de linfocitos T activados con anti-CD3 y anti CD28 y tratados con distintas dosis de FP de AOVE, tirosol e hidroxitirosol.

#### 5.2.1.4 Efecto de la FP del AOVE en la producción de citoquinas.

Una vez analizado el efecto de la FP del AOVE sobre la viabilidad, activación y proliferación de los linfocitos T, valoramos si dicho tratamiento afectaba al patrón de producción de citoquinas de linfocitos T activados.

Para ello, mediante la técnica de CBA, cuantificamos la concentración de 6 citoquinas diferentes (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF, IL-4, IL-6 y IL-10) en el sobrenadante de cultivos de células mononucleadas activadas con antiCD3 y anticD28 y tratadas con las distintas dosis de FP del AOVE. Tal y como podemos observar en la figura 27, el tratamiento con FP del AOVE, producía una disminución significativa de la producción tanto de citoquinas Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2 and TNF) como Th2 (IL-4, IL-6 y IL-10).

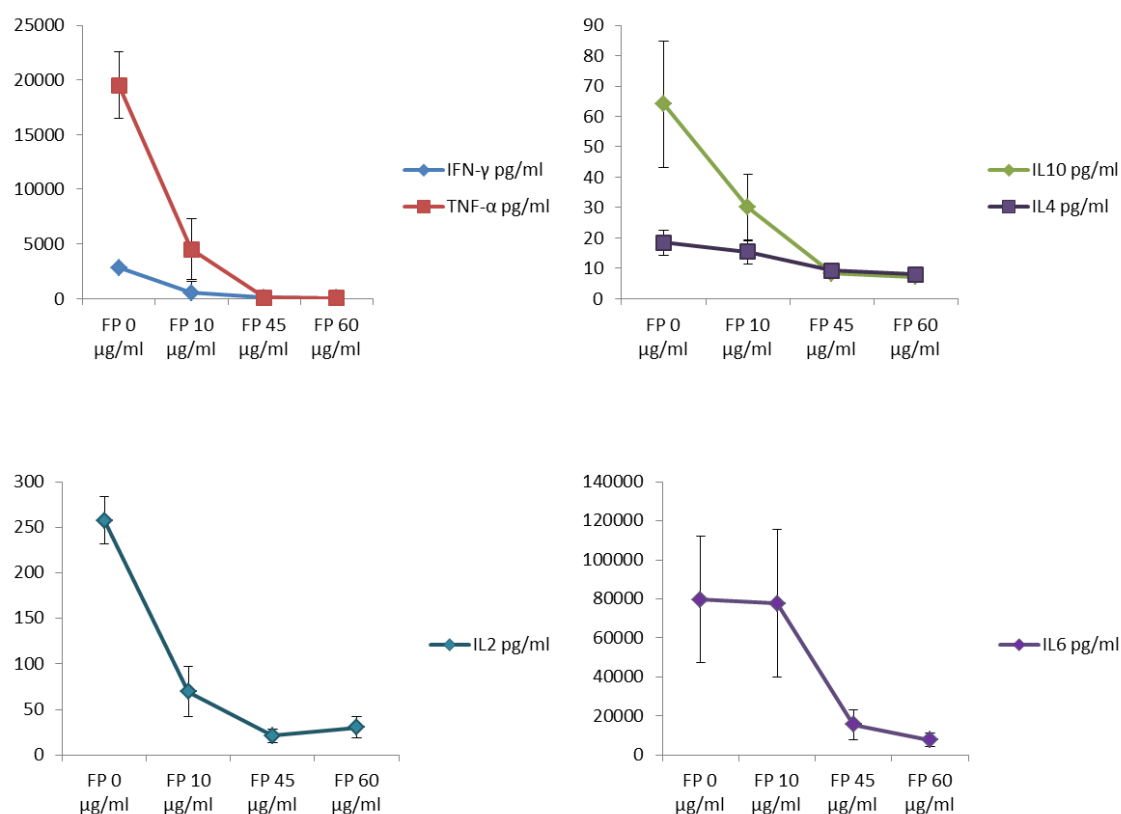


Figura 27: Determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-4 e IL-6 mediante CBA en el sobrenadante de cultivo de células mononucleadas activadas con antiCD3 y antiCD28 y tratadas con FP del AOVE (10, 45, 60  $\mu$ g/ml).

### 5.2.1.5 Estudio de vías de señalización implicadas en la activación del linfocito T.

Con los resultados anteriormente descritos, nos planteamos analizar qué vías de señalización implicadas en la activación de los linfocitos T se afectan con el tratamiento con FP del AOVE.

Para ello realizamos Western Blot de las proteínas p-AKT y NFκB de linfocitos activados con antiCD3 y antiCD28 y tratados con las distintas dosis de FP de AOVE.

En el caso del estudio de la proteína p-AKT, observamos cómo con la activación del cultivo con antiCD3 antiCD28 se produce un aumento de la expresión de la proteína fosforilada. Sin embargo, la exposición de los linfocitos a las distintas dosis de la FP del AOVE, induce una disminución de la expresión. Estos datos ponen de manifiesto, que el tratamiento con FP de AOVE, reduce la activación del cultivo de linfocitos activados con antiCD3 antiCD28.

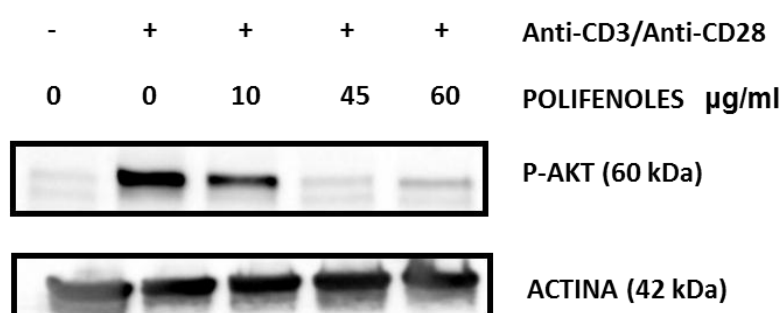


Figura 28: Ensayos de Western Blot para la proteína P-AKT en linfocitos activados con antiCD3 antiCD28 y tratados con las diferentes dosis de FP del AOVE (10, 45, 60  $\mu\text{g/ml}$ ).

En el caso de la proteína NFκB, realizamos subfraccionamiento de proteínas, para evaluar su expresión tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear.

En linfocitos en reposo, NF- $\kappa$ B está presente en el citoplasma formando un complejo con otras proteínas denominadas inhibidores de  $\kappa$ B, que bloquean la entrada de NF- $\kappa$ B al núcleo. Es sólo después de la activación de la PKC cuando el I $\kappa$ B se degrada y como consecuencia se liberan los componentes del NF- $\kappa$ B, que pueden ahora pasar del citoplasma al núcleo en donde ejerce su función.

Tal y como podemos ver en la figura 29, existe un aumento en la expresión de NF $\kappa$ B en el núcleo y una disminución de la expresión en el citoplasma al activar el cultivo con antiCD3 anti CD28. Sin embargo, con el tratamiento con FP del AOVE, se produce un aumento en la expresión de esta proteína en la fracción citoplasmática y una disminución en la fracción nuclear. Esto nos indica que la FP del AOVE, produce una disminución del paso de esta proteína al núcleo, y como consecuencia, una disminución de la activación de la célula.

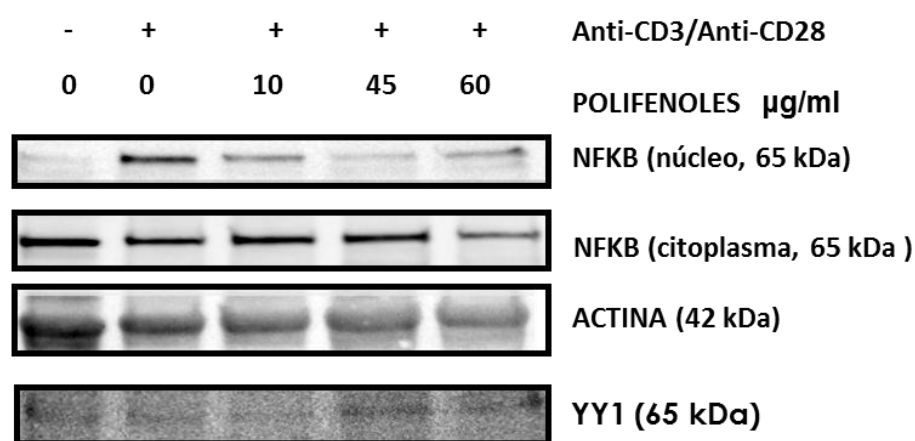


Figura 29: Ensayos de Western Blot para la proteína NF $\kappa$ B en la fracción citoplasmática y nuclear de linfocitos activados con antiCD3 antiCD28 y tratados con las diferentes dosis de FP del AOVE (10, 45, 60  $\mu$ g/ml).

Por último, evaluamos la expresión de NFκB mediante inmunohistoquímica en cultivos de células mononucleadas activadas con antiCD3 antiCD28 tratadas con la dosis de 60 µg/ml de FP de AOVE o sin tratar. Confirmamos como en células activadas, se produce una translocación al núcleo de la proteína NFκB; sin embargo, bajo tratamiento con FP de AOVE, NFκB se expresa en el citoplasma de la célula tal y como se observa en la figura 30.

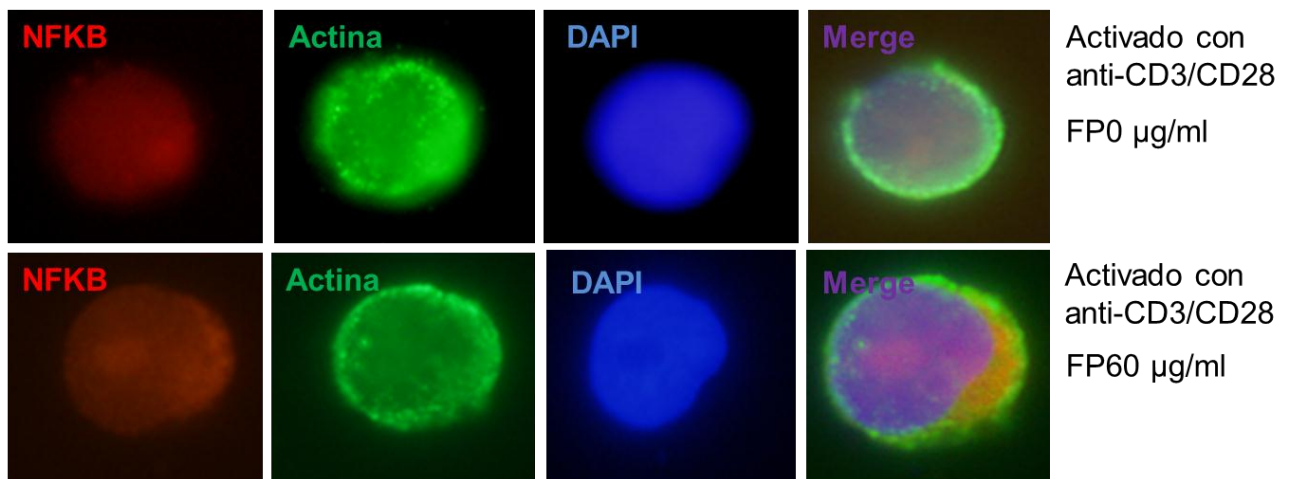


Figura 30: Expresión de NFκB mediante inmunohistoquímica en células mononucleadas activadas con antiCD3 antiCD28 tratadas con la dosis de 60 µg/ml de FP de AOVE o sin tratar.

## 5.2.2 Ensayo in vivo

### 5.2.2.1 Modelo murino de EICR aguda

Por último, estudiamos si el uso de una dieta rica en FP del AOVE retrasa o disminuye la aparición de EICR en un modelo murino.

El grupo control fue alimentado con dieta estándar y el grupo a estudio fue alimentado con dieta estándar suplementada con 600 ppm de compuesto polifenólico extraído del AOVE

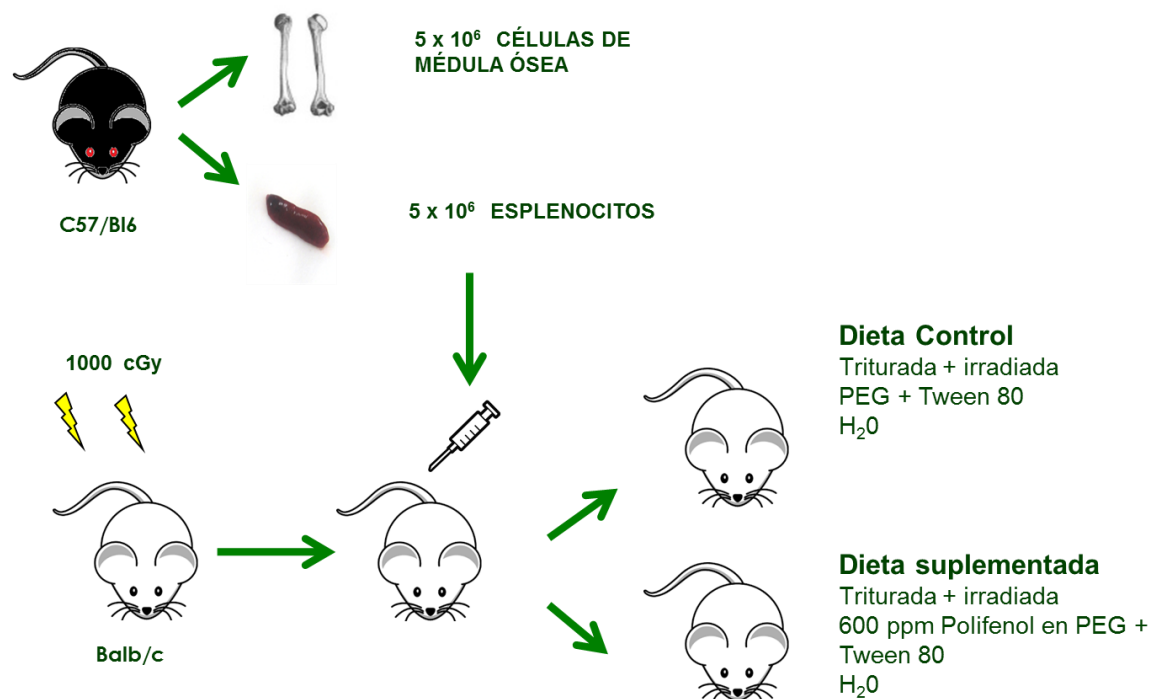


Figura 31: Esquema seguido para la generación del modelo murino de EICR.

Para evaluar el desarrollo y severidad de EICRa en nuestro modelo utilizamos el score descrito por Cooke et al<sup>95</sup>. Para ello, se valoró individualmente, tres veces a la semana la

variación del peso así como la aparición de otros signos de EICH (postura, actividad, erizamiento del pelo e integridad de piel) empleando una escala de 0-2.

Criterio	Grado 0	Grado 1	Grado 2
<b>Pérdida de peso</b>	<b>&lt; 10 %</b>	<b>&gt;10% to &lt;25%</b>	<b>&gt;25%</b>
<b>Postura</b>	<b>Normal</b>	<b>Leve retracción postural</b>	<b>Retracción postural severa</b>
<b>Actividad</b>	<b>Normal</b>	<b>Moderadamente disminuida</b>	<b>Severamente disminuida</b>

Figura 32 : Score utilizado en la evaluación de EICR. Modificado de Cooke et al.<sup>95</sup>

Al analizar la evolución del peso observamos una disminución más marcada en aquellos animales que habían sido alimentados con dieta control que en aquellos que tomaron la dieta suplementada con FP del AOVE, siendo las diferencias estadísticamente significativas entre los días +21 y +45. Ello a pesar de que los ratones que mostraban una pérdida de peso > 30% eran sacrificados de acuerdo a los criterios del comité ético, lo que restaba potencia estadística a la diferencia entre ambos grupos.

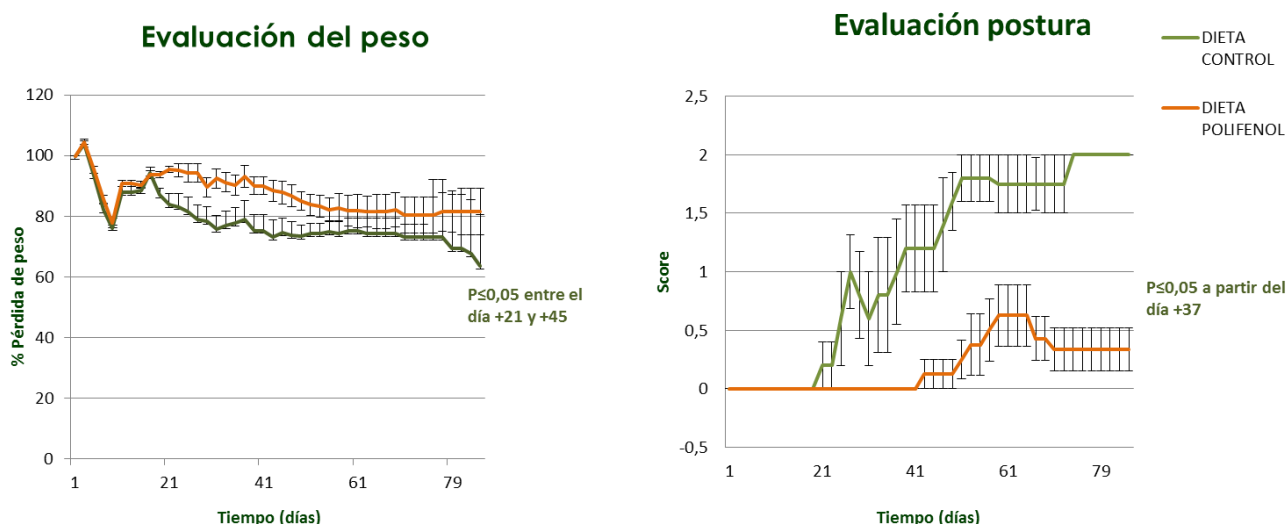


Figura 32: Evaluación del peso y postura en modelo de ratón de EICR alimentados con dieta control y dieta suplementada con FP de AOVE.



Del mismo modo, al analizarla postura de los ratones, encontramos una mayor afectación en aquellos animales que habían recibido una dieta no suplementada con FP de AOVE, siendo las diferencias estadísticamente significativas a partir del día +37.

Finalmente, aquellos animales que recibieron una dieta suplementada con FP del AOVE, presentaron una mayor supervivencia, siendo las diferencias estadísticamente significativas, como queda reflejado en la figura 33.

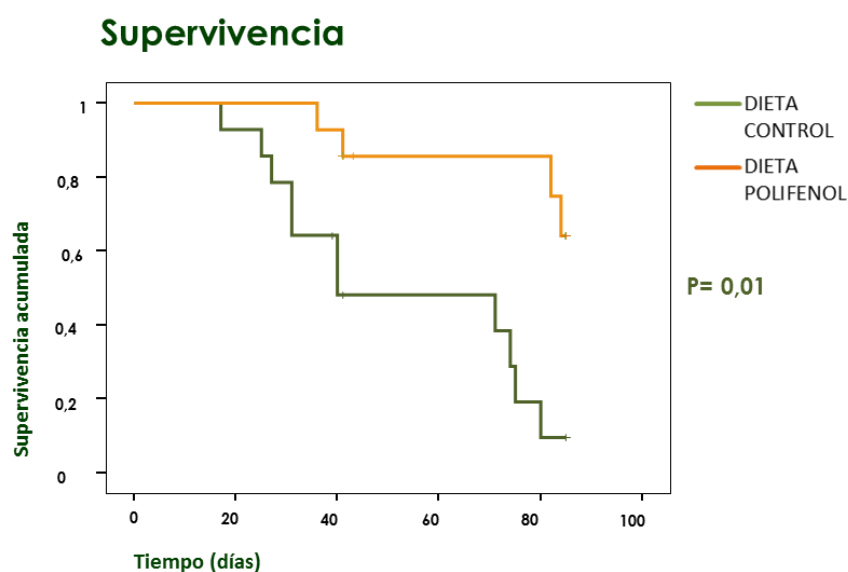


Figura 33: Curva de supervivencia en modelo de ratón de EICR alimentados con dieta control y dieta suplementada con FP de AOVE.

### 5.2.2.2 Estudios de hematimetría

Con el objetivo de analizar las distintas poblaciones sanguíneas, realizamos análisis de hematimetría de las células circulantes en sangre obtenidas mediante punción cardiaca. Se sacrificaron ratones alimentados con dieta control y con dieta suplementada con PF de AOVE a los 5 días y 21 días tras el trasplante.

Al analizar el resultado de hematimetría realizado a los 5 días tras el trasplante, encontramos diferencias significativas en la cantidad de linfocitos en sangre, siendo mayor en aquellos alimentados con la dieta control (Figura 34).

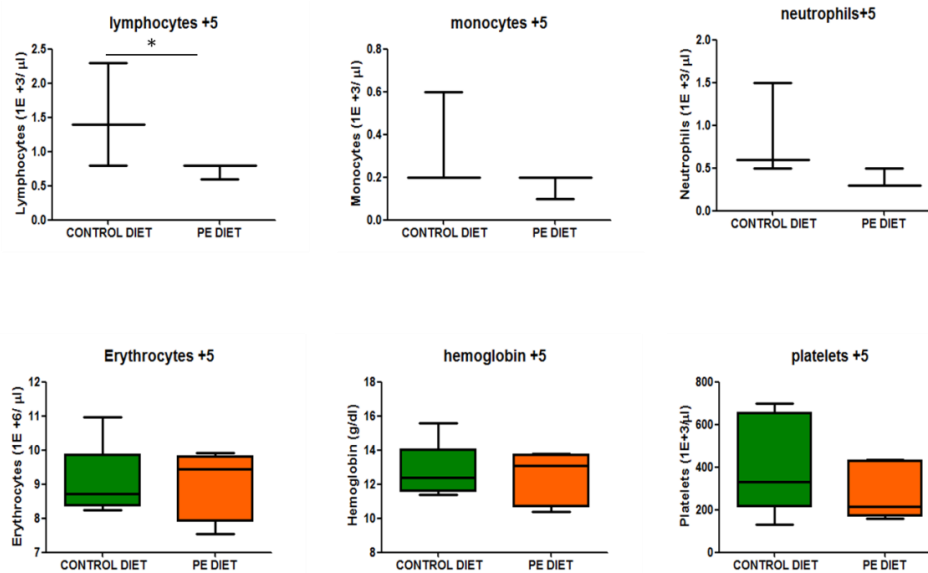


Figura 34: Cuantificación en sangre de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eritrocitos, hemoglobina y plaquetas en los dos grupos experimentales de ratón en el día +5 (n=4)

Análisis de hematimetría realizado a los 21 días tras el trasplante, encontramos diferencias significativas en la cantidad de plaquetas en sangre, siendo mayor en aquellos alimentados con la dieta control.

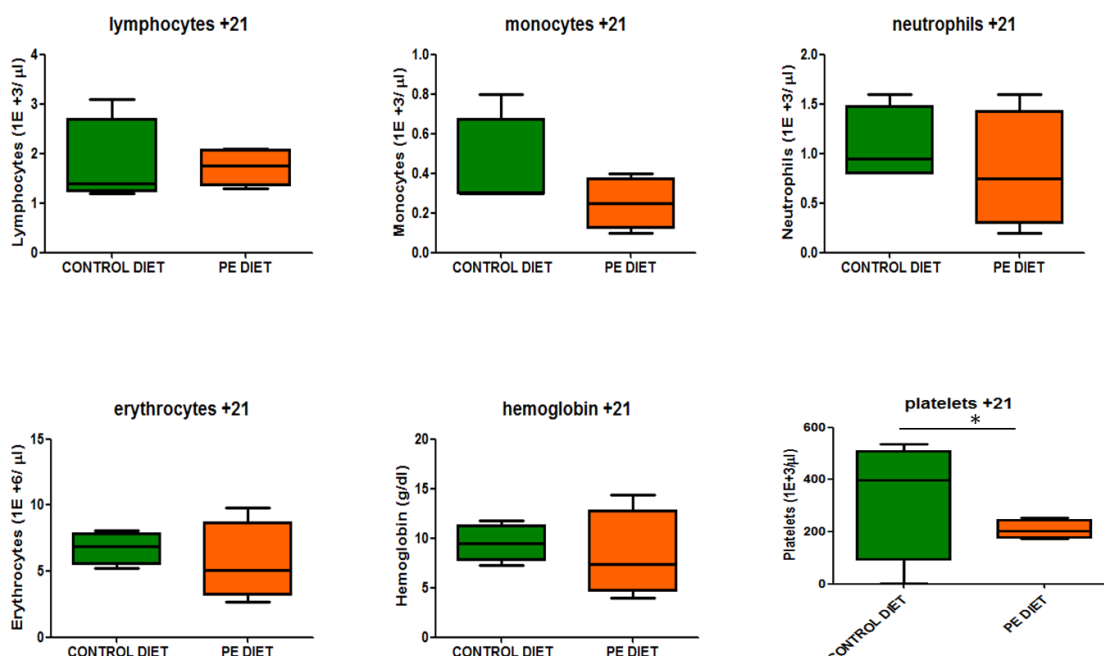


Figura 35: Cuantificación en sangre de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eritrocitos, hemoglobina y plaquetas en los dos grupos experimentales de ratón en el día + 21 (n=4)

### 5.2.2.3 Estudios de citometría

Con objeto de analizar la evolución del trasplante y el efecto de las diferentes dietas sobre la evolución de la EICR, la activación de los linfocitos T y los linfocitos T reguladores, se sacrificaron ratones en el día + 21 post-trasplante y se estudió mediante citometría de flujo la sangre periférica, la MO y el bazo.

Al analizar el porcentaje de células T activadas según la expresión de CD25, encontramos un mayor porcentaje de células T activadas en MO en aquellos animales alimentados con dieta suplementada con FP de AOVE, y un mayor porcentaje en aquellos alimentados con dieta control en sangre periférica, sin embargo las diferencias no fueron significativas en ningún caso (Figura 36).



Figura 36: porcentaje de células T activadas CD3+CD25+ en médula ósea, sangre y bazo.

Del mismo modo, analizamos mediante citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T reguladores a los 21 días tras el trasplante. En este caso tampoco encontramos diferencias significativas entre los dos grupos en MO, sangre y bazo.

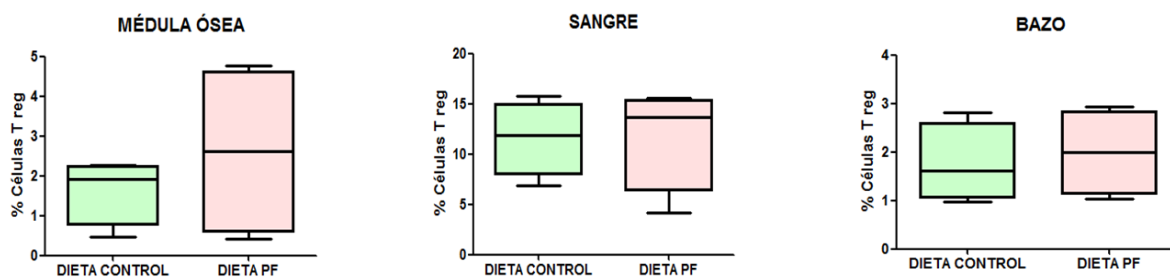


Figura 37: Porcentaje de células T reguladoras CD4+CD25+ Foxp3 + en médula ósea, sangre y bazo.

#### 5.2.2.4 Estudios de citocinas en plasma

A continuación, valoramos si el uso de una dieta suplementada en FP de AOVE en modelo murino de EICR, afectaba al patrón de producción de citoquinas solubles en suero.

Para ello, mediante ensayos de MACSPlex por citometría de flujo, cuantificamos la concentración de 10 citoquinas diferentes (GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23 y TNF- $\alpha$ ) en el plasma de ratones a los que se les había inducido EICRa y habían recibido un dieta control o una dieta suplementada con FP de AOVE.

Analizamos la concentración de citocinas en el plasma en el día +5 tras el trasplante, observamos que no existían diferencias significativas entre aquellos ratones alimentados con una dieta control y los que habían recibido una dieta suplementada con FP de AOVE (figura 38).

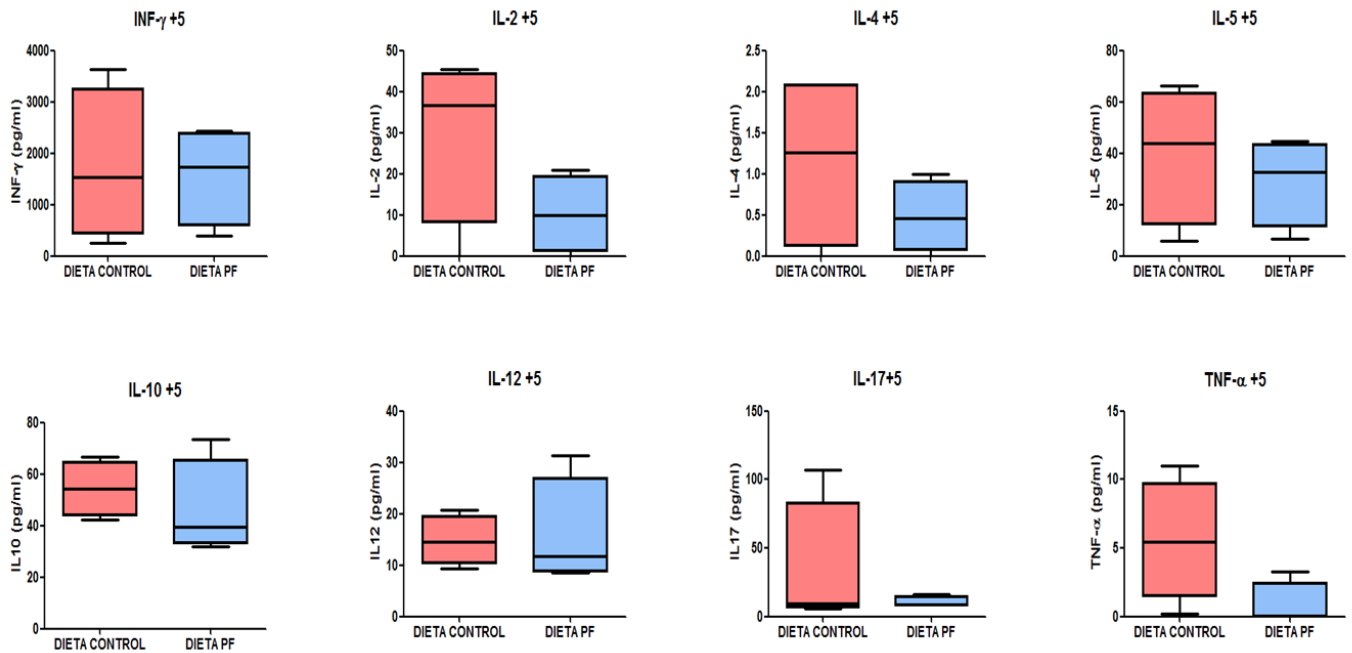


Figura 38: Determinación de la concentración de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17<sup>a</sup> y TNF- $\alpha$ , en el plasma de ratones 5 días después del trasplante.

### 5.2.2.5 Cuantificación de butirato en heces

Con el objetivo de analizar si el uso de una dieta rica en FP de AOVE producía cambios en la microbiota que pudieran tener efectos beneficiosos sobre la EICR, analizamos la concentración de ácido butírico en heces de ratones a los que se les había inducido EICRa a diferentes tiempos tras el trasplante (figura 39).

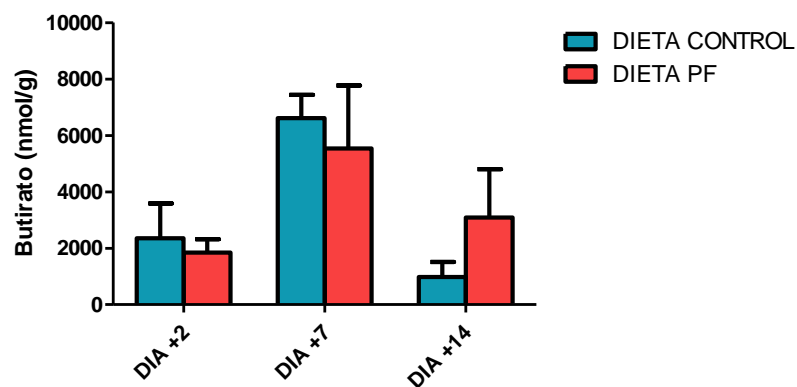


Figura 39: Cuantificación de la cantidad de ácido butírico en heces en los días +2, +7 y +14 tras el trasplante.

Tal y como podemos observar en la figura 40, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de butirato entre los animales alimentados con una dieta control y una dieta suplementada con FP de AOVE, sin embargo, cabe destacar en aumento en la concentración en el día +14 en aquellos animales que recibieron la dieta suplementada.

#### 5.2.2.6 Estudios de histología de piel e intestino delgado

Por último, en ratones a los que se les había inducido EICRa y alimentado con dieta control y dieta suplementada, realizamos estudios de histología en piel e intestino delgado en los días +5 y +21 tras el trasplante, con el propósito de valorar si el uso de una dieta rica el FP de AOVE disminuía la afectación de EICRa a nivel de tejidos y órganos.

##### 5.2.2.6.1 Valoración histológica de la piel.

Al analizar las muestras obtenidas en el día +5, no encontramos grandes diferencias. Tanto las muestras de los ratones que habían recibido una dieta control como aquellos

que habían recibido la dieta suplementada no presentaban alteraciones relevantes salvo vacuolización muy focal del epitelio del folículo piloso tal y como se observa en la figura 40.

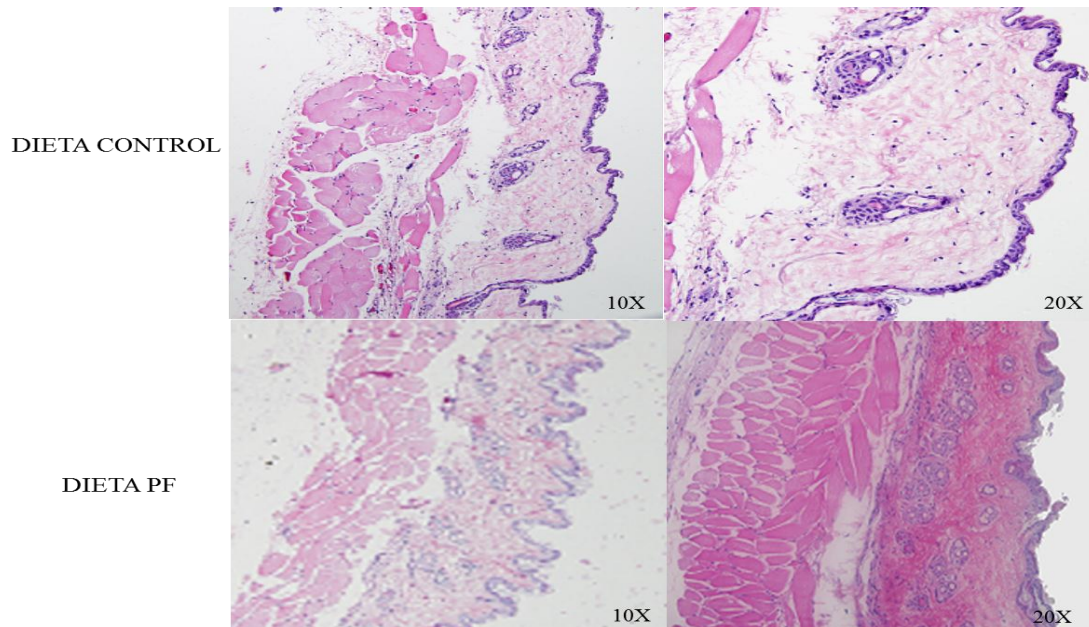


Figura 40: Cortes histológicos de muestras de ratón de piel teñidos con hematoxilina-eosina.

Cuando analizamos las muestras obtenidas en el día +21, encontramos que todas las muestras presentaban hiperqueratosis. Tanto en aquellos ratones que habían recibido una dieta control como en aquellos que habían recibido la dieta suplementada se observaba hipergranulosis focal, vacuolización focal y presencia de cuerpos apoptóticos en la capa basal de la epidermis además de infiltrado inflamatorio focal en la dermis (Figura 41).

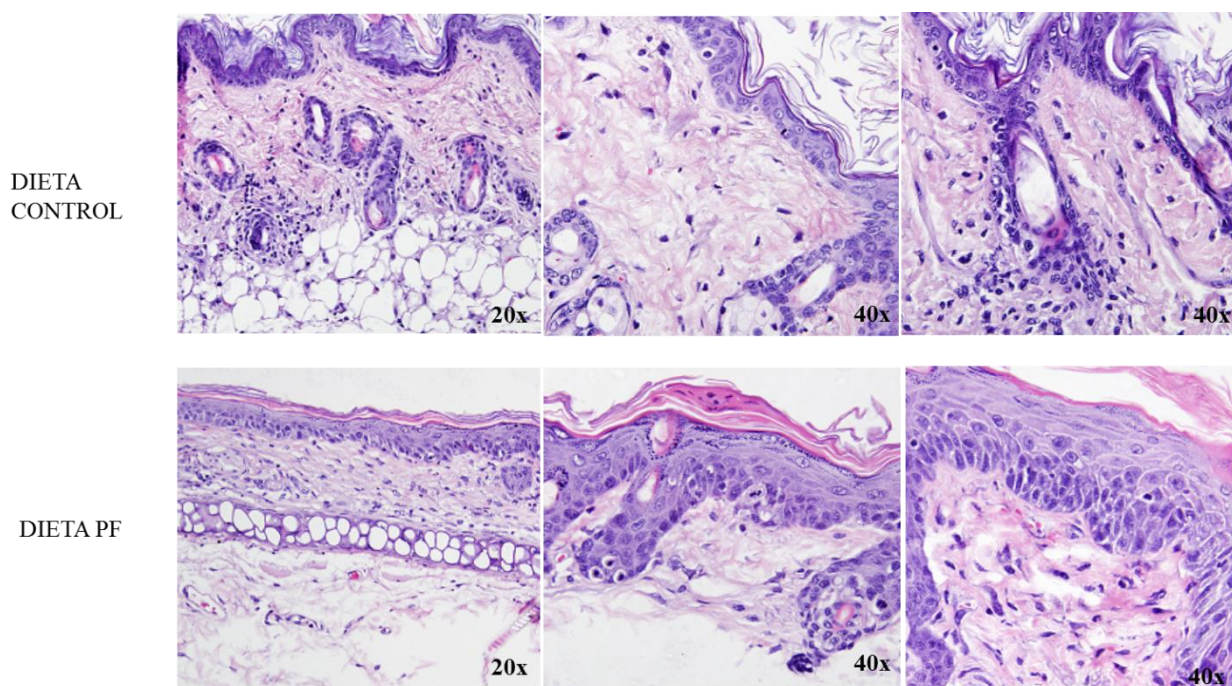


Figura 41: Cortes histológicos de muestras de ratón de piel teñidos con hematoxilina-eosina.

#### 5.2.2.6.2 Valoración histológica del intestino delgado.

Al analizar las muestras obtenidas en el día +5 encontramos diferencias entre los ratones alimentados con la dieta control y aquellos que habían recibido la dieta suplementada en FP de AOVE.

El intestino delgado de los ratones de dieta control mostraron presencia de cuerpos apoptóticos en las criptas glandulares en número variable, existiendo áreas con pocos cuerpos apoptóticos por 10 criptas y áreas focales en las que la mayoría de las criptas contenían un cuerpo apoptótico o más de un cuerpo apoptótico por cripta. Además se observaron criptas glandulares con luces dilatadas que contenían detritus celulares en su



interior. En algunos casos también se encontró infiltrado inflamatorio focal leve en la lámina propia.

Sin embargo, en aquellos ratones que recibieron la dieta suplementada encontramos áreas focales con ocasionales o pocos cuerpos apoptóticos por 10 criptas y criptas con luces dilatadas que contienen detritus en su interior. También existía infiltrado inflamatorio focal leve en lámina propia con aislados eosinófilos (figura 42).

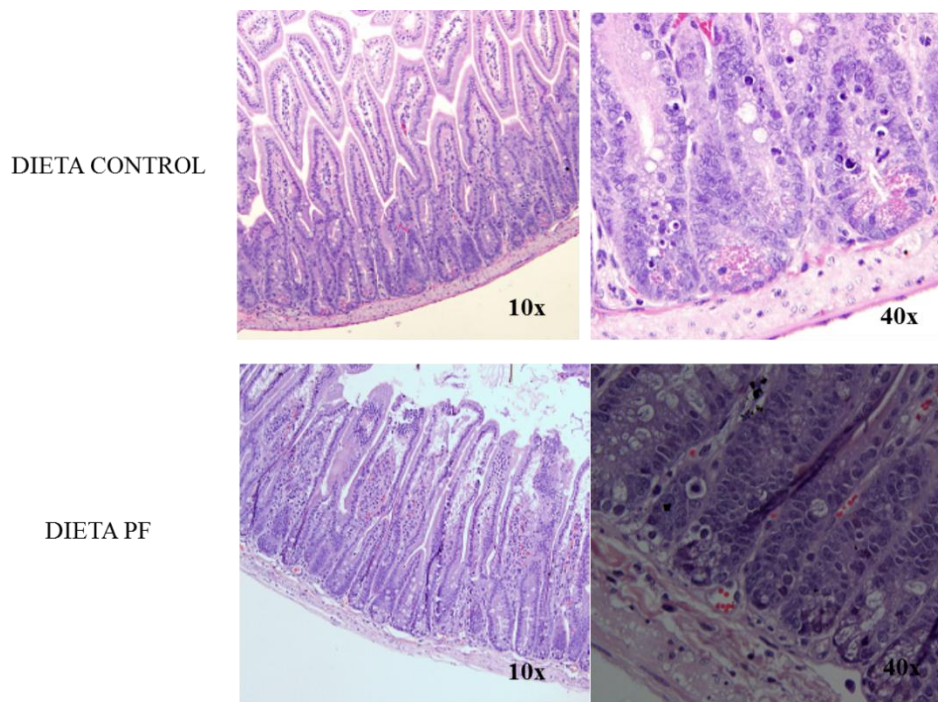


Figura 42: Cortes histológicos de muestras de intestino delgado de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.

Por último, al estudiar las muestras de intestino delgado en el día +21 seguimos encontrando diferencias en cuanto a la cantidad de cuerpos apoptóticos entre los dos grupos experimentales. Aquellos animales que recibieron la dieta control presentaron áreas focales en las que la mayoría de las criptas contienen un cuerpo apoptótico o más de un cuerpo apoptótico por cripta y criptas glandulares con luces dilatadas que

contienen detritus celulares en su interior además de infiltrado inflamatorio leve en lámina propia.

En los animales que recibieron dieta suplementada, había presencia de ocasionales cuerpos apoptóticos por 10 criptas e infiltrado inflamatorio moderado en lámina propia con presencia de aislados eosinófilos (figura 43).

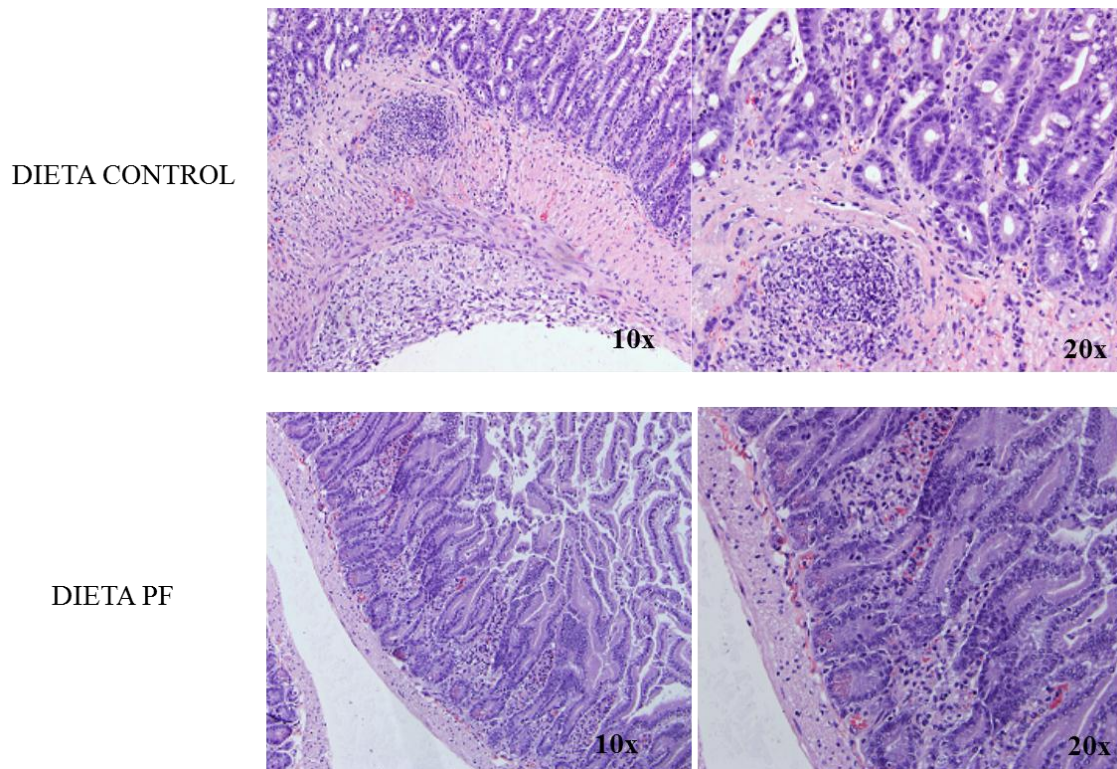


Figura 43: Cortes histológicos de muestras de intestino delgado de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.



# **DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral, se ha evaluado el efecto de la pomalidomida sobre la polarización de las células T CD45RA<sup>+</sup>. Para llevar a cabo dicho propósito, aprovechamos el modelo bien establecido de diferenciación *in vitro* de células T hacia linfocitos Th1 y Th2 basado en las distintas citoquinas añadidas en el medio de cultivo celular. La polarización hacia linfocito Th1, Th2, Treg o Th17 está regulada por varios factores de transcripción: T-bet<sup>23</sup>, GATA-3<sup>27</sup>, FoxP3<sup>33</sup> y ROR $\gamma$ t, respectivamente<sup>31</sup>. A su vez, la expresión de dichos factores de transcripción está regulada por distintas citoquinas tales como IL-12 e INF- $\gamma$  en el caso de T-bet, IL-4 que induce la expresión de GATA-3<sup>26</sup> y TGF- $\beta$  para los factores de transcripción ROR $\gamma$ t y FoxP3<sup>31</sup>. Este proceso también se regula a nivel epigenético<sup>96</sup>, y fármacos como la 5-azacitidina, por ejemplo, conducen a la desmetilación del promotor FoxP3 con posterior sobreexpresión de FoxP3 y expansión de las células T reguladoras<sup>97</sup>.

Se ha descrito consistentemente que los IMiDs, y concretamente la pomalidomida favorece la polarización hacia linfocitos Th1. En este sentido, comprobamos como la pomalidomida estimula la producción de INF- $\gamma$  e IL-2 en condiciones de cultivo polarizante hacia linfocito Th1 y que se correlacionaba con un aumento en la expresión del factor de transcripción T-bet como hemos demostrado mediante ensayos Western Blot. Sin embargo, existe información contradictoria con respecto a la polarización hacia linfocito Th2 y linfocito Treg. Xu y col. mostraron que los IMiDs no sólo favorecen la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> naïve hacia linaje Th1 sino que además, inducen a las células Th2 a cambiar hacia un fenotipo tipo Th1 además de producir un aumento en la expresión de T-bet<sup>98</sup>. Además, se ha demostrado que la exposición a pomalidomida disminuye la producción de IL-10 en células mononucleadas de sangre

periférica estimuladas con anti-CD3, sin embargo, en células mononucleadas estimuladas con LPS aumenta la producción de IL-10<sup>99</sup>. Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento con lenalidomida induce un aumento en el número de linfocitos Treg en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos<sup>100</sup>, junto con un aumento significativo del número absoluto de linfocitos T TCR  $\gamma\delta$  + y de células T reguladoras<sup>101</sup>. En el presente estudio comprobamos que la pomalidomida favorece la polarización de células CD45RA+ hacia linfocitos Th1 y Th2 y este efecto depende del tipo de citoquinas utilizadas en el medio de cultivo. A este respecto, la pomalidomida estimula la producción de IL-4 e IL-10 en presencia de condiciones de polarización hacia linfocito Th2 y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en condiciones de polarización Th1.

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de genes que determinan la polarización de las células T se regula a nivel epigenético. Además de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas contribuyen en gran medida a regular la expresión génica. Más específicamente, el H3K4me3 está fuertemente asociado con la cromatina activa y está enriquecido en las regiones activas de la cromatina, mientras que la metilación del H3K27 se asocia con la cromatina reprimida y se enriquece en las regiones inactivas de la cromatina. Sin embargo, se ha descrito que pueden co-localizar en algunas regiones genómicas<sup>102,103</sup>. Estas modificaciones bivalentes “preparan” a genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo para su activación o represión cuando la respuesta alternativa sea necesaria<sup>104</sup>.

Se ha demostrado que el locus *il4/il13* muestra marcas de activación H3K4me3 en células Th2 y marcas de inhibición H3K27me3 en células Th1<sup>105</sup>. Aunque las marcas represivas en los locus *Ifng* e *Il4* en las células Th2 y Th1, respectivamente, argumentan que hay poca flexibilidad, se han descrito marcas bivalentes del locus *Tbet*<sup>105</sup>. Además,

se ha descrito la ausencia de marcas H3K27me3 en el locus *Ifng* en células Treg que sugieren que estas células podrían producir IFN- $\gamma$ . Además, aunque el locus *Il17* está reprimido en células Th1, Th2 y Treg polarizadas<sup>105</sup>, Bending y col. han descrito que las células Th17 pueden convertirse fácilmente en un perfil Th1, expresando cantidades aumentadas de T-bet e IFN- $\gamma$  y reducidas de ROR $\gamma$ t e IL-17 tras la transferencia a ratones NOD / SCID28<sup>106</sup>. En conjunto, estos datos sugieren que la polarización de las células T parece ser más plástica y flexible de lo que podría pensarse en un inicio.

En el presente estudio se confirmó mediante ensayos de Western Blot que la pomalidomida aumenta la expresión de Tbet en células CD45RA + expuestas a IL-12, INF- $\gamma$  y anti-IL-4 y GATA-3 en células T naïve cultivadas con IL-4, IL-2, Anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12 y esta expresión se correlaciona con ensayos funcionales que confirman el correspondiente patrón de secreción de citoquinas. Así mismo, analizamos el efecto de la pomalidomida en las marcas de activación y represión en los dos principales factores de transcripción que regulan la polarización de las células T. Sorprendentemente, se encontró que la pomalidomida en combinación con citocinas que favorecen la diferenciación Th1 y Th2, aumenta las marcas de activación H3K4me3 en los factores de transcripción T-bet y GATA3, respectivamente. Por otro lado, con respecto a las marcas represivas, se encontró una disminución significativa de H3K7me23 en el factor de transcripción T-bet cuando polarizamos células CD45RA + hacia un fenotipo Th1 en presencia de pomalidomida. Estas observaciones son consistentes con los estudios de Kang y col.<sup>107</sup> Como se mencionó en la introducción de la presente tesis doctoral, el tratamiento con IMiDs aumenta la capacidad de CRL4CRBN de interactuar con Ikaros y Aiolos y conduce a su ubiquitinación lo que da como resultado una expresión alterada de IRF4 e IL-2<sup>55</sup>. CRL4CRBN no sólo participa en la actividad ubiquitina ligasa, sino que también está involucrado en modificaciones epigenéticas como H3K27me3 y



H3K27ac (que activa la transcripción de genes)<sup>108</sup>. Curiosamente, Kang y col. demostraron que el tratamiento con talidomida bloquea el reclutamiento de CRBN al locus *Kcna3*, un gen que codifica el canal de potasio KV1.3, y que permite la afluencia de calcio en las células T. La talidomida afectaba a las modificaciones de las histonas provocando una disminución de H3K27me3 y el aumento de H3K27ac.<sup>107</sup>

En resumen, hemos demostrado que la pomalidomida aumenta la polarización de células CD45RA + hacia linfocitos Th1 y Th2 dependiendo de las citoquinas utilizadas en el cultivo de células. Además, el tratamiento de células T naïve con pomalidomida afecta las modificaciones epigenéticas durante la polarización de las células T.

Por otro lado, en la presente tesis doctoral, hemos evaluado el efecto inmunomodulador de los polifenoles del AOVE en la EICRa. La EICRa es la principal complicación tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos<sup>109</sup>. Resulta en una mortalidad del 20% y una morbilidad del 50% de los pacientes<sup>110</sup>. Tal y como se comentó en la introducción de la presente tesis doctoral, se debe principalmente a la activación de las células T aloreactivas las cuales pueden infiltrar y atacar tejidos y órganos del receptor<sup>6</sup>. Tradicionalmente, las estrategias de prevención para la reducción de la EICR se basaban en el uso inhibidores de la calcineurina, sin embargo, actualmente, existen nuevos enfoques que se dirigen a las diferentes células del sistema inmunológico<sup>78</sup>.

En nuestro caso, hemos evaluado el efecto inmunomodulador de la FP del AOVE. Se ha demostrado como los polifenoles actúan en diversas rutas asociadas con proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis y metastasis<sup>84</sup>. En el presente trabajo hemos demostrado como los polifenoles presentes en el AOVE son un buen agente inmunomodulador ya que disminuyen la activación y la proliferación de los linfocitos T en cultivo. Estos resultados están en concordancia con otros anteriormente

publicados que muestran como los polifenoles disminuyen la producción IFN- $\gamma$  por parte de células T estimuladas.<sup>111</sup>. Mas específicamente, Zou y col. describieron que el resveratrol, un polifenol presente en las uvas, y algunos frutos rojos, inhibe la activación de los linfocitos T a través de la proteína Sirt1, receptor del resveratrol<sup>112</sup>. También se ha demostrado como la apigenina, un polifenol perteneciente a la familia de las flavonas, tiene efecto inhibitorio sobre los linfocitos T en respuesta a la Concavalina A permaneciendo en fase Go/G1 del ciclo celular<sup>113</sup> y como el pretratamiento con luteonina, otro polifenol perteneciente a la misma familia, bloquea la activación de linfocitos T estimulados con mastocitos<sup>114</sup>.

Las rutas de señalización de PI3K (AKT), GFR/Ras/MAPKs y NF- $\kappa$ B regulan la proliferación y activación de los linfocitos T, por ese motivo analizamos las proteínas P-AKT y NF- $\kappa$ B que podrían verse afectadas bajo el tratamiento con FP de AOVE. En este estudio comprobamos como distintas dosis de FP del AOVE disminuían la expresión de P-AKT en linfocitos estimulados con anti-CD3 anti-CD28. Nuestros resultados están en concordancia con los anteriormente publicados por diversos grupos. Así, se ha demostrado como EGCG inhibe la ruta PI3K/AKT disminuyendo los niveles de las subunidades p85 y p110 de PI3K y los niveles de P-AKT<sup>115</sup>. El tratamiento con curcumina inhibe la fosforilación de AKT en varios tipos celulares de cáncer, lo que resulta en un bloqueo del ciclo celular en la fase G1<sup>116</sup>. También se ha descrito como el tirosol, en el contexto de la inflamación alérgica, inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias y la degranulación de los mastocitos disminuyendo la fosforilación de AKT y PI3K<sup>117</sup>.

En el caso de la proteína NF- $\kappa$ B el tratamiento con FP del AOVE, produjo un aumento en la expresión de esta proteína en la fracción citoplasmática y una disminución en la fracción nuclear, poniendo de manifiesto la disminución de la activación de la célula.

Diversos estudios con EGCG han mostrado como este polifenol produce efectos inhibitorios en NF- $\kappa$ B y en un estudio in vivo llevado a cabo en ratas se atenuaba el daño del miocardio tras una situación de isquemia y reperfusión. Esta protección a nivel cardiaco estaba asociada con una disminución de IL-6 y una reducción en la activación de NF- $\kappa$ B<sup>118</sup>. En líneas celulares de mastocitos humanos activados, la quercitina disminuye la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 inhibiendo la degradación de I $\kappa$ B y la translocación al núcleo de p65, bloqueando por tanto la activación de NF- $\kappa$ B<sup>119</sup>. Del mismo modo, se ha descrito que el hidroxitirosol disminuye la activación de NF- $\kappa$ B, STAT-1 $\alpha$ , e IRF1 en macrófagos de ratón activados por LPS, inhibiendo por tanto, la expresión del gen COX-2<sup>120</sup>. Además se ha publicado como el tirosol ejerce el mismo efecto en líneas celulares de macrófagos activados con LPS<sup>121</sup>. En la misma línea, se ha demostrado en células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) estimuladas con LPS, que el hidroxitirosol, el reveratrol y la oleuropeína, a través de una disminución de la activación de NF- $\kappa$ B, suprimían la expresión de la proteína VCAM-1<sup>122</sup>.

También hemos podido comprobar, como los polifenoles presentes en el AOVE disminuyen la producción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cultivo. La activación y proliferación de los linfocitos T resulta en un aumento de la transcripción de genes de citoquinas y/o de sus receptores que produce la liberación masiva de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ) que amplifican la respuesta inmune y provocan daño tisular. Las citoquinas Th1 (proinflamatorias) son las más relacionadas con la EICRa. En este sentido, el número de linfocitos productores de IL-2 se ha relacionado con la severidad de la EICR. Para el comienzo de la expansión de los linfocitos T además de la IL-2 también se necesita la interleuquina-15 (IL-15). El IFN- $\gamma$  facilita la presentación de antígenos aumentando la expresión de moléculas de

adhesión, de quimioquinas y de moléculas HLA y es además un mediador en el proceso de daño tisular. En el modelo murino de EICRa realizado en esta tesis, hemos comprobado como aquellos animales que recibían una dieta suplementada con FP de AOVE presentaban niveles más bajos de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 y TNF- $\gamma$  a las 5 días tras el trasplante, aunque las diferencias no fueron significativas al compararlos con los animales que recibieron una dieta control. En este sentido, se ha descrito como diversos flavonoides son capaces de disminuir la expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 en muchos tipos celulares como macrófagos activados con LPS o células mononucleadas de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina<sup>123</sup>, astrocitos activados<sup>124</sup>, y en fibroblastos de mucosa nasal<sup>125</sup>. Alarcón-de-la-Lastra y col. demostraron como una dieta rica en AOVE reducía significativamente la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-17 en esplenocitos estimulados con LPS procedentes de ratones a los que se les había inducido lupus en comparación con aquellos animales que habían sido alimentados con una dieta estandar<sup>126</sup>. Este efecto inhibitorio del AOVE sobre cascadas de citocinas inhibitorias había sido previamente descrito por el mismo grupo en un modelo murino de artritis inducida por colágeno tipo II donde se disminuían los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17)<sup>127</sup>. En cultivos de sangre completa, se ha descrito como el glucósido de oleuropeína (polifenol presente en el AOVE), disminuye la producción de IL-1 $\beta$ <sup>128</sup>. Además, un ensayo clínico llevado a cabo en pacientes con enfermedad coronaria, ha mostrado evidencias de que el consumo de AOVE enriquecido en polifenoles está asociado a una disminución de la expresión de IL-6 y de proteína C reactiva<sup>129</sup>. Todos estos estudios apoyan la idea de que los polifenoles tienen la capacidad de modular la respuesta inmune y tienen una potente actividad anti-inflamatoria.

Por último, hemos comprobado como el uso de una dieta rica en FP del AOVE disminuye la aparición de EICRa en un modelo murino. Son pocos los trabajos en los que se ha evaluado el uso de polifenoles en el tratamiento de dicha enfermedad. Se ha descrito como algunos derivados químicos de plantas pueden reducir la severidad de algunos problemas asociados al trasplante como la EICR y los rechazos de injerto<sup>130</sup>. Este es el caso del extracto PG27 de una planta medicinal China (*Tripterygium wilfordii*) capaz de reducir la EICR en un modelo murino de trasplante alogénico de médula ósea<sup>131</sup>. Hyon y col. demostraron como el EGCG inhibe la activación de los linfocitos T *in vitro* y en modelo murino, esplenocitos tratados con este polifenol son menos potentes en la inducción de EICR, reduciendo moderadamente la supervivencia<sup>132</sup>. Posteriormente, DiPersio y col evaluaron el uso de EGCG mediante administración intraperitoneal en diferentes modelos animales de EICR sin obtener mejora en la supervivencia o en la reducción del peso con las dosis utilizadas<sup>133</sup>.

En este trabajo, aquellos animales que recibieron una dieta suplementada con FP de AOVE, presentaron una menor pérdida de peso, menor retracción postural y mayor supervivencia que aquellos alimentados con una dieta estándar.

Por otro lado, la microbiota intestinal está considerablemente alterada en pacientes con EICR y estas alteraciones correlacionan con la severidad de la enfermedad<sup>134</sup>. Diversos metabolitos microbianos como los ácidos grasos de cadena corta son producidos por la microbiota gastrointestinal. Entre ellos, destaca el butirato, fuente principal de energía de las células epiteliales intestinales y se ha descrito que es capaz de disminuir la severidad de la EICR<sup>135</sup>. Por ese motivo, analizamos si una dieta rica en FP de AOVE, modificaba la concentración de butirato en heces en el modelo murino empleado. La concentración de butirato era moderadamente superior en aquellos animales que

recibieron la dieta suplementada en el día +21 tras el trasplante, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En nuestro caso, si encontramos una mejora clara a nivel de aparato digestivo. Histológicamente, aquellos animales que recibieron la dieta suplementada presentaban menores signos de EICR que aquellos que se alimentaron con una dieta estándar ya que presentaban menor número de cuerpos apoptóticos en criptas, siendo ocasionales en los animales alimentados con dieta PF y más numerosos (uno o más cuerpos apoptóticos por cripta) en los que tomaron dieta estándar. En el estudio de la piel no encontramos grandes diferencias entre los dos grupos, por lo que parece que el efecto de la FP del AOVE, a nivel histológico es más eficaz a nivel local, es decir, tópicamente, solo existiendo mejora en el aparato digestivo.

Por tanto, podemos concluir que los polifenoles presentes en el AOVE son un buen agente inmunomodulador ya que son capaces de disminuir la activación y proliferación de los linfocitos T en cultivo y la producción de citocinas proinflamatorias. Además, su uso como suplemento dietético en un modelo murino de EICH aguda aumenta la supervivencia de los ratones y disminuye la severidad de la enfermedad, fundamentalmente en el tubo digestivo. Esto nos plantea la posibilidad de valorar su uso tópico en otros órganos diana de la EICRa por ejemplo en la piel



# **CONCLUSIONES**





## 7. CONCLUSIONES

1. La pomalidomida favorece la polarización de células CD45RA+ hacia linfocitos Th1 y Th2 y este efecto depende del tipo de citoquinas utilizadas en el medio de cultivo. Es decir, la pomalidomida estimula la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en condiciones de polarización Th1 y la producción de IL-4 e IL-10 en presencia de condiciones de polarización hacia linfocito Th2.
2. La pomalidomida aumenta la expresión del factor de transcripción Tbet en células CD45RA + expuestas a IL-12, INF- $\gamma$  y anti-IL-4 y del factor de transcripción GATA-3 en células T naïve cultivadas con IL-4, IL-2, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-12.
3. El tratamiento de células T naïve con pomalidomida afecta las modificaciones epigenéticas durante la polarización de las células T, así, la pomalidomida en combinación con citocinas que favorecen la diferenciación Th1 y Th2, aumenta las marcas de activación H3K4me3 en los factores de transcripción T-bet y GATA3, respectivamente. Con respecto a las marcas represivas, la pomalidomida disminuye H3K7me23 en el factor de transcripción T-bet cuando polarizamos células CD45RA + hacia un fenotipo Th1.
4. Los polifenoles presentes en el AOVE son un buen agente inmunomodulador ya que disminuyen la activación y la proliferación de los linfocitos T y la producción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en cultivo.
5. La FP del AOVE disminuye la expresión de P-AKT en linfocitos estimulados con anti-CD3 anti-CD28. En el caso de la proteína NF- $\kappa$ B el tratamiento con FP

del AOVE, produce un aumento en la expresión de esta proteína en la fracción citoplasmática y una disminución en la fracción nuclear, poniendo de manifiesto la disminución de la activación de la célula.

6. El uso de una dieta rica en FP del AOVE disminuye la aparición de EICRa en modelo murino de trasplante alogénico ya que aquellos ratones que fueron alimentados con una dieta suplementada presentaron una menor pérdida de peso, menor retracción postural y mayor supervivencia que aquellos alimentados con una dieta estándar.
7. A nivel histológico, la FP del AOVE reduce fundamentalmente la severidad de la EICRa intestinal, disminuyendo el número de cuerpos apoptóticos, por lo que ejerce un efecto local y su uso tópico podría ser estudiado como tratamiento para la afectación de la piel en EICRa.

# **BIBLIOGRAFÍA**



**8. BIBLIOGRAFIA**

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309-22.
3. Ramachandran M, Dimberg A, Essand M . The cancer-immunity cycle as rational design for synthetic cancer drugs: Novel DC vaccines and CAR T-cells. *Semin Cancer Biol*. 2017 Feb 28.
4. Perez-Gracia JL, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Sanmamed MF, Melero I. Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:89-97.
5. Shortt J1, Hsu AK, Johnstone RW. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2013 Sep 5;32(36):4191-202.
6. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):340-52.
7. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009 Aug;26(8):1001-43.
8. Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res*. 2016;2016:4273943.
9. Murphy KM1, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):933-44.

10. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
11. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988;240:516-518.
12. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* 1991;87:949-954.
13. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441:890-893
14. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):2943-51.
15. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature.* 1993;362:245-248
16. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* 1989;245:308-310.
17. Longphre M, Li D, Gallup M, et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest.* 1999;104:1375-1382.

18. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-2095.
19. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-456.
20. Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001;15:985-995.
21. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006; 24:677-688.
22. Sakaguchi S. Naturally arising CD4 + regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-562.
23. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000 Mar 17;100(6):655-69.
24. Lametschwandtner G1, Biedermann T, Schwärzler C, Günther C, Kund J, Fassl S, Hinteregger S, Carballido-Perrig N, Szabo SJ, Glimcher LH, Carballido JM. Sustained T-bet expression confers polarized human TH2 cells with TH1-like cytokine production and migratory capacities. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):987-94.
25. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 1996;382:174-177.



26. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*.1996;4:313-319.
27. Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, Arai N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity*. 1999; 11:677-688.
28. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998;9:745-755.
29. Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1993-1998.
30. Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*. 2003;19:739-748.
31. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.
32. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4313-7.
33. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.

34. Berger, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412 (2007).
35. Wilson, C.B., Makar, K.W., Shnyreva, M. & Fitzpatrick, D.R. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin. Immunol.* 17, 105–119 (2005).
36. Schübeler D, Lorincz MC, Cimborá DM, Telling A, Feng YQ, Bouhassira EE, Groudine M. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(24):9103-12.
37. Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity.* 1998 Dec;9(6):765-75.
38. Meissner A1, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766–770 (2008).
39. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705 (2007).
40. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):897-903.
41. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007 May 24;447(7143):407-12.
42. Rowell E, Merkenschlager M, Wilson CB. Long-range regulation of cytokine gene expression. *Curr Opin Immunol.* 2008 Jun;20(3):272-80.

43. Bartlett JB, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 314–322.
44. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 1999; 163:380–386.
45. Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997;64: 971–978.
46. Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Fyge A, Hoglund P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality* 1995;7: 44–52.
47. Muller GW, Corral LG, Shire MG, Wang H, Moreira A, Kaplan G et al. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem* 1996; 39 : 3238–3240.
48. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991;173: 699–703.
49. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993;177: 1675–1680.
50. Li S, Pal R, Monaghan SA, Schafer P, Ouyang H, Mapara M et al. IMiD immunomodulatory compounds block C/EBP{beta} translation through eIF4E down regulation resulting in inhibition of MM. *Blood* 2011; 117: 5157–5165.

51. Dredge K, Marriott JB, Todryk SM, Muller GW, Chen R, Stirling DI et al. Protective antitumor immunity induced by a costimulatory thalidomide analog in conjunction with whole tumor cell vaccination is mediated by increased Th1-type immunity. *J Immunol* 2002; 168: 4914–4919.
52. Noonan K, Rudraraju L, Ferguson A, Emerling A, Pasetti MF, Huff CA et al. Lenalidomide-induced immunomodulation in multiple myeloma: impact on vaccines and antitumor responses. *Clin Cancer Res* 2012;18: 1426–1434.
53. LeBlanc R, Hideshima T, Catley LP, Shringarpure R, Burger R, Mitsiades N et al. Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* 2004;103: 1787–1790.
54. Payvandi F, Wu L, Naziruddin SD, Haley M, Parton A, Schafer PH et al. Immunomodulatory drugs (IMiDs) increase the production of IL-2 from stimulated T cells by increasing PKC-theta activation and enhancing the DNA-binding activity of AP-1 but not NF-kappaB, OCT-1, or NF-AT. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25: 604–616.
55. Gandhi AK1, Kang J, Havens CG, Conklin T, Ning Y, Wu L, Ito T, Ando H, Waldman MF, Thakurta A, Klippel A, Handa H, Daniel TO, Schafer PH, Chopra R. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). *Br J Haematol.* 2014 Mar;164(6):811-21.
56. Ito T, Handa H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int J Hematol.* 2016 Sep;104(3):293-9.
57. Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol.* 2003 Jun;81(3):171-5.

58. Hsu AK, Quach H, Tai T, Prince HM, Harrison SJ, Trapani JA et al. The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood* 2011;117: 1605–1613.
59. Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD, Vargesson N. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106: 8573–8578.
60. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med* 1999;5: 582–585.
61. Korngold, B. Sprent, J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J. Exp. Med.*148, 1687–1698 (1978).
62. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994;83:2360–7.
63. Chang RJ, Lee SH. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol* 1986;137:2853–6.
64. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301–5
65. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1992;175:405–13.

66. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;338:1813–21.
67. Yu XZ, Martin PJ, Anasetti C. Role of CD28 in acute graft-versus-host disease. *Blood* 1998;92:2963–70.
68. Ringden O. Cyclosporine in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1986;42:445–52.
69. Mowat AM. Antibodies to IFN-gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. *Immunology* 1989;68:18–23.
70. Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436–45.
71. Sakaguchi S1, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.
72. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000 Jun;30(6):1538-43.
73. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994;370:650–2.
74. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992;148:1274–9.
75. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–56.

76. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998;10:581–7.
77. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995;81:9–12
78. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Sep;11(9):536-47.
79. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*56, 317-333 (1998).
80. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 May;79(5):727-47.
81. Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1989;28(4):315-47.
82. Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Grossi G, Tolomelli B, Zambonin L, Landi L. Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *J Agric Food Chem*. 2001 Dec;49(12):6026-32.
83. Visioli F, De La Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, D'Archivio M, Faria A, Favé G, Fogliano V, Llorach R, Vitaglione P, Zoratti M, Edeas M. Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011 Jul;51(6):524-46.
84. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2008 May;52(5):507-26.
85. Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H. Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2002 Apr;48(2):89-94.
86. Surh, Y.-J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 768–780.

87. Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, Takashima H, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanoue T. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J Hepatol.* 2006 Jun;44(6):1074-82.
88. Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, Horie S, Kashiwayanagi M, Saito T, Murayama T. Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull.* 2007 Apr;30(4):682-6.
89. Zhang XM, Chen J, Xia YG, Xu Q. Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005 Mar;55(3):251-62.
90. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):647-59.
91. Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 1;91(2):232-42.
92. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13322-30.
93. Blonska M, Czuba ZP, Krol W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA expression and IL-1beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. *Scand J Immunol.* 2003 Feb;57(2):162-6.



94. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*. 2005 Mar;21(3):389-94.
95. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford JM, Ferrara JL. An Experimental Model of Idiopathic Pneumonia Syndrome After Bone Marrow Transplantation: I. The Role of Minor H Antigens and Endotoxin. *Blood*. 1996;8: 3230-3239
96. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009 Feb;9(2):91-105.
97. Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosío S, Santamaría C, Caballero-Velázquez T, Blanco B, Herrero-Sánchez C, García JL, Carrancio S, Hernández-Campo P, González FJ, Flores T, Ciudad L, Ballestar E, Del Cañizo C, San Miguel JF, Pérez-Simon JA. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):107-21.
98. Xu W, Celeridad M, Sankar S, Webb DR, Bennett BL. CC-4047 promotes Th1 cell differentiation and reprograms polarized human Th2 cells by enhancing transcription factor T-bet. *Clin Immunol*. 2008 Sep;128(3):392-9.
99. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, Patterson RT, Stirling DI, Kaplan G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol*. 1999 Jul 1;163(1):380-6.
100. Wolschke C, Stübiger T, Hegenbart U, Schönland S, Heinzlmann M, Hildebrandt Y, Ayuk F, Atanackovic D, Dreger P, Zander A, Kröger N. Postallograft lenalidomide induces strong NK cell-mediated antimyeloma

- activity and risk for T cell-mediated GvHD: Results from a phase I/II dose-finding study. *Exp Hematol.* 2013 Feb;41(2):134-142.
101. Paiva B, Mateos MV, Sanchez-Abarca LI, Puig N, Vidriales MB, López-Corral L, Corchete LA, Hernandez MT, Bargay J, de Arriba F, de la Rubia J, Teruel AI7, Giraldo P, Rosiñol L, Prosper F, Oriol A, Hernández J, Esteves G, Lahuerta JJ, Bladé J, Perez-Simon JA, San Miguel JF; Spanish Myeloma Group / Program Study and Treatment of Hematological Malignancies cooperative study groups. Immune status of high-risk smoldering multiple myeloma patients and its therapeutic modulation under LenDex: a longitudinal analysis. *Blood.* 2016 Mar 3;127(9):1151-62.
102. Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 24;103(43):15782-7.
103. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol.* 2006 May;8(5):532-8.
104. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):315-26.
105. Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT, Schones DE, Peng W, Sun HW, Paul WE, O'Shea JJ, Zhao K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 2009 Jan 16;30(1):155-67.
106. Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice

- convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest*. 2009 Mar;119(3):565-72.
107. Kang JA, Park SH, Jeong SP, Han MH, Lee CR, Lee KM, Kim N, Song MR, Choi M2, Ye M, Jung G, Lee WW, Eom SH, Park CS, Park SG. Epigenetic regulation of Kcna3-encoding Kv1.3 potassium channel by cereblon contributes to regulation of CD4+ T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 2;113(31):8771-6.
108. Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol*. 2006 Nov;8(11):1277-83.
109. Choi, S and Reddy, P. Graft –versus-host disease. *Panminerva Med*. 52, 111-124 (2010).
110. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. and Holler, E. Graft versus host disease. *Lancet* 373, 1550-1561. (2009).
111. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jan;147(1):155-63.
112. Zou T, Yang Y, Xia F, Huang A, Gao X, Fang D, Xiong S, Zhang J. Resveratrol Inhibits CD4+ T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. *PLoS One*. 2013 Sep 20;8(9):e75139.
113. Liang ZD, Zeng YY, Huang XY, He F. Effect of Apigenin on proliferation, cell cycle and apoptosis of mouse T cells in vitro. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2008 Apr;24(4):337-40.
114. Theoharides TC, Kempuraj D, Iliopoulou BP. Mast cells, T cells, and inhibition by luteolin: implications for the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:423-30.
115. Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H.
116. Beevers CS, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer*. 2006 Aug 15;119(4):757-64.

117. Je IG, Kim DS, Kim SW, Lee S, Lee HS, Park EK, Khang D, Kim SH. Tyrosol Suppresses Allergic Inflammation by Inhibiting the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase in Mast Cells. *PLoS One*. 2015 Jun 11;10(6):e0129829.
118. Aneja R, Hake PW, Burroughs TJ, Denenberg AG, Wong HR, Zingarelli B. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Mol Med*. 2004 Jan-Jun;10(1-6):55-62.
119. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res*. 2007 May;56(5):210-5.
120. Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005 Jun;371(6):457-65.
121. Moreno JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med*. 2003 Nov 1;35(9):1073-81.
122. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Apr 1;23(4):622-9.
123. Comalada M, Ballester I, Bailón E, Sierra S, Xaus J, Gálvez J, de Medina FS, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 16;72(8):1010-21.
124. Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull*. 2007 Jun 15;73(1-3):55-63.

125. Kim IB, Kim DY, Lee SJ, Sun MJ, Lee MS, Li H, Cho JJ, Park CS. Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2006 Jun;29(6):1120-5.
126. Aparicio-Soto M, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Rosillo MÁ, Sánchez-Fidalgo S, Utrilla J, Martín-Lacave I, Alarcón-de-la-Lastra C. Dietary extra virgin olive oil attenuates kidney injury in pristane-induced SLE model via activation of HO-1/Nrf-2 antioxidant pathway and suppression of JAK/STAT, NF- $\kappa$ B and MAPK activation. *J Nutr Biochem.* 2016 Jan;27:278-88.
127. Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Sánchez-Fidalgo S, Aparicio-Soto M, Villegas I, Alarcón-de-la-Lastra C. Dietary extra-virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Nutr.* 2016 Feb;55(1):315-25.
128. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition.* 2005 Mar;21(3):389-94.
129. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, López-Sabater MC, Bruguera J, Covas MI; SOLOS Investigators. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2008 Apr;62(4):570-4.
130. Wilasrusmee C, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, Kittur S, Kittur DS. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg.* 2002 Oct;68(10):860-4.
131. Fidler JM, Ku GY, Piazza D, Xu R, Jin R, Chen Z. Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*. III. Suppression of graft-versus-host disease in murine allogeneic bone marrow transplantation by the PG27 extract. *Transplantation.* 2002 Aug 27;74(4):445-57.
132. Kanamune J, Iwanaga Y, Kina T, Noguchi H, Matsumura K, Uemoto S, Hyon SH. Attenuation of murine graft-versus-host disease by a tea polyphenol. *Cell Transplant.* 2012;21(5):909-18.
133. Choi J, Cooper ML, Ziga ED, Ritchey J, DiPersio JF. Effect of epigallocatechin-3-gallate on graft-versus-host disease. *Cell Transplant.* 2014;23(9):1163-6.

134. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, No D5, Gobourne A, Viale A, Dahi PB, Ponce DM, Barker JN, Giralt S, van den Brink M, Pamer EG. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014 Aug 14;124(7):1174-82.
135. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigskecht M, Hanash A, Toubai T, Oravec-Wilson K, Wu SR, Sun Y, Rossi C, Fujiwara H, Byun J, Shono Y, Lindemans C, Calafiore M, Schmidt TC, Honda K, Young VB, Pennathur S, van den Brink M, Reddy P. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol*. 2016 May;17(5):505-13.