
Estudio *in vitro* de la modulación de los linfocitos T
hepáticos en esteatosis y carcinoma hepatocelular

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Autora: Silvia Paredes Serrano

Tutor: José Manuel González Navajas

Curso académico 2022-2023

D. JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ NAVAJAS, Doctor y Profesor Asociado del área de Farmacología del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche

CERTIFICA

que el presente trabajo titulado:

“Estudio *in vitro* de la modulación de los linfocitos T hepáticos en esteatosis y carcinoma hepatocelular”

y que constituye la memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. SILVIA PAREDES SERRANO

ha sido realizado bajo su supervisión en el laboratorio del CIBERehd del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Alicante a 4 de septiembre de 2023.

Fdo. José Manuel González Navajas

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTARCT.....	4
2. ABREVIATURAS	5
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1. Carcinoma hepatocelular	7
3.1.1. Progresión de EHNA a CHC	8
3.2. Inmunología del carcinoma hepatocelular	9
3.2.1. Introducción al sistema inmunitario	9
3.2.2. Patogénesis inmunológica del CHC.....	10
3.3. Efecto de la ingesta de sal en la respuesta inmunitaria y en el desarrollo de cáncer.....	12
3.4. Adaptación metabólica de los linfocitos T	13
4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Consideraciones éticas y uso de animales	18
5.2. Aislamiento de linfocitos T <i>naïve</i> del bazo.....	18
5.3. Aislamiento de linfocitos T <i>naïve</i> del hígado	19
5.4. Citometría de flujo	20
5.5. Estrategia de ventanas para el análisis por citometría de flujo	21
5.6. Extracción de ARN.....	21
5.7. qRT-PCR	21
5.8. Análisis de los datos.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1. Efecto directo del NaCl en la respuesta efectora de los linfocitos T procedentes de hígados con esteatosis y CHC.....	23
6.2. Los ácidos grasos insaturados, pero no los saturados, cambian la respuesta del linfocito T al sodio.....	25
7. DISCUSIÓN	27
8. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	30
9. BILIOGRAFÍA.....	31

1. RESUMEN/ABSTARCT

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia de hígado más común y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se ha convertido en la causa de cirrosis hepática y CHC que más ha crecido en la última década a nivel mundial. El sistema inmunitario juega un papel crucial en la patogénesis del CHC y se sabe que la dieta occidental, rica en grasas y sal (NaCl), es un potencial disruptor del funcionamiento fisiológico del sistema inmune. En este Trabajo de Fin de Máster se ha estudiado la influencia del NaCl en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th1/Th17 en modelos de ratón con EHNA y CHC. Paralelamente, se ha investigado la influencia de la presencia de ácidos grasos en el microentorno de los linfocitos, estudiando también el efecto del ácido linoleico y del ácido palmítico en la diferenciación de los linfocitos CD4⁺. Los resultados obtenidos apuntan a que una dieta alta en sal (HSD) induce la diferenciación a linfocitos Th1 y Th1/Th17, así como una mayor producción de IFN γ . Los ratones alimentados con una HSD presentaban tumores de menor tamaño comparado con el grupo control. También se ha observado que el ácido linoleico promueve la diferenciación del perfil Th1, mientras que el ácido palmítico no parece tener ningún efecto en esta población, sugiriendo que la composición lipídica puede modular la respuesta de los linfocitos T.

Palabras clave: carcinoma hepatocelular, Th17, Th1, NaCl

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver neoplasia and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has become the fastest growing cause of liver cirrhosis and HCC in the last decade worldwide. The immune system plays a crucial role in the pathogenesis of HCC and it is known that the Western diet, which is rich in fat and salt (NaCl), is a potential disruptor of the physiological functioning of the immune system. In this Master Thesis, the influence of NaCl on Th1 and Th1/Th17 lymphocyte differentiation in mouse models of NASH and HCC has been studied. In parallel, the influence of the presence of fatty acids on the lymphocyte microenvironment has been investigated, studying also the effect of linoleic acid and palmitic acid on the differentiation of CD4⁺ lymphocytes. The results obtained point to the fact that a high salt diet (HSD) induces differentiation to Th1 and Th1/Th17 lymphocytes, as well as increased production of IFN γ . Mice fed a HSD developed fewer and smaller tumors in comparison with the control group. It has also been observed that linoleic acid promotes the differentiation of the Th1 profile, whereas palmitic acid does not seem to have any effect on this population, suggesting that lipid composition can modulate the T cell response.

Key words: hepatocellular carcinoma, Th17, Th1, NaCl

2. ABREVIATURAS

CHC: carcinoma hepatocelular

EHGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

EHNA: Esteatoepatitis No Alcohólica

ROS: del inglés, Reactive Oxygen Species

NFAT5: del inglés, Nuclear Factor of Activated T cells 5

mTOR: del inglés, mammalian Target of Rapamycin

ULK1: del inglés, Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

NRF2: del inglés, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

CD: Células Dentríticas

NK: Natural Killer

Th: T *helper*

Tc: T citotóxico

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

IL-6: interleucina 6

TGF- β : del inglés, Transformant Growth Factor β

STAT3: del inglés, Signal Transducer And Activator Of Transcription 3

CXCL-8: del inglés, Interleukin 8

CCL2: del inglés, CC Chemokine Ligand 2

GPIb: del inglés, Glicoprotein Ib

CXCR1: del inglés, C-X-C Motif Chemokine Receptor 1

IL12b: del inglés, Interleukin 12b

Ly6c: del inglés, Lymphocyte antigen 6 family member C1

Nkg7: del inglés, Natural killer cell granule protein 7

GzmB: Granzima B

FOXO1: del inglés, Forkhead box protein O1

FoxP3: del inglés, Forkhead Box P3

OMS: Organización Mundial de la Salud

NaCl: Cloruro de Sodio

SGK1: del inglés, Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1

HSD: del inglés, High Salt Diet

MAPK: del inglés, Mitogen-activated protein kinases

NOS2: del inglés, Óxido Nítrico

MDSCs: del inglés, Myeloid-Derived Supresor Cells

WD: del inglés, Western Diet

CCl₄: Tetracloruro de Carbono

WD-HS: del inglés, Western Diet-High Salt

ND: del inglés, Normal Diet

Gitr: del inglés, Glucocorticoid-induced TNFR-related protein

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia de hígado más común y constituye entre la tercera y cuarta causa de muerte por cáncer [1, 2]. Representando aproximadamente el 90% de todos los casos de cáncer de hígado, se estima que produce unas 800.000 muertes al año [3]. Aunque actualmente el diagnóstico de CHC se puede efectuar mediante técnicas no invasivas, como cribados por ecografía y pruebas serológicas, la emergente necesidad de mayor información a nivel molecular requiere de técnicas invasivas para el paciente, como biopsias hepáticas [2].

Existe una serie de factores de predisposición a hepatocarcinoma, destacando por su peso: cirrosis, hepatitis B y C, alcoholismo y enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) [1, 2].

Se ha identificado cirrosis preexistente en el 80% de los pacientes diagnosticados con CHC y, por tanto, cualquier agente etiológico conducente a daño hepático se puede considerar como un factor de riesgo. El abuso del alcohol destaca por su importancia como causa de CHC en España, observándose una correlación entre la dosis y el riesgo de padecerlo [2, 4].

La infección crónica por virus es la primera causa a nivel mundial de CHC. El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus de ADN y tiene mayor prevalencia en Asia y África, mientras que el virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN y es más común en Europa y Norte América [1]. Actualmente, se administran antivirales para controlar la infección por VHC y evitar la evolución a cirrosis. También se ha incluido la vacuna contra la hepatitis B en el calendario vacunal de España para prevenir la infección [2].

La EHGNA es un estado etiológico en el que incrementa el almacenamiento lipídico intrahepático habiendo poca o ninguna consumición de alcohol, estando principalmente relacionado con la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico [5]. La EHGNA puede evolucionar a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), estado en el que aumenta el estrés metabólico, estrés del retículo endoplasmático y la lipotoxicidad, lo que desemboca en la muerte celular de los hepatocitos y en la activación del sistema inmunitario, condición definida como necro-inflamación [3, 6]. La EHNA se ha convertido en la causa de cirrosis hepática y CHC que más ha crecido en la última década a nivel mundial, pues se ha establecido que la inflamación crónica asociada a hígado graso es un importante desencadenante de la carcinogénesis y la transformación de hepatocitos [1, 6].

3.1.1. Progresión de EHNA a CHC

El hígado destaca por ser un órgano con alta capacidad regenerativa. En condiciones de necro-inflamación, la tasa de muerte celular y división celular, junto con el microambiente inflamatorio y la respuesta inmunitaria desencadenada, promueven la fibrosis hepática y el desarrollo de CHC (Figura 1) [5].

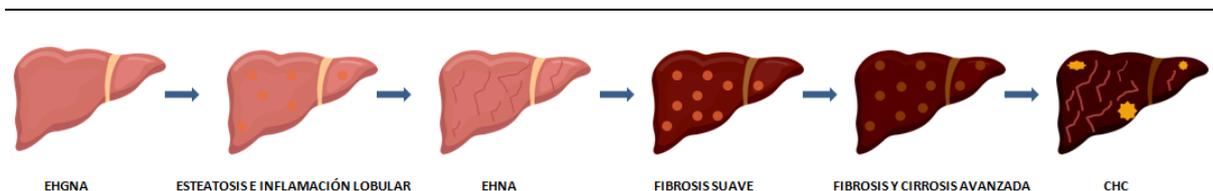


Figura 1. Estadios de la transición desde el EHNA hasta el CHC. La acumulación intrahepática de grasa y la alteración del metabolismo lipídico pueden conducir a la esteatosis y a la inflamación lobular. La infiltración de macrófagos y linfocitos como los Th17 facilitan la transición al EHNA. Si continúa el estado de necro-inflamación, se produce fibrosis hepática, que activa las células madre del hígado, que entran en proliferación y crean un ambiente de regeneración continua, lo que puede conducir finalmente al desarrollo del CHC. Figura adaptada de Anteen *et al.* 2019 [5].

La EHNA es un proceso multifactorial que introduce unas condiciones que predisponen a la carcinogénesis. El aumento del almacenamiento lipídico reprograma el metabolismo de los hepatocitos: se incrementa la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias, que conlleva a la acumulación de metabolitos tóxicos, además de aumentar el estrés oxidativo de las células y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS: *Reactive Oxygen Species*) [5]. Los macrófagos y los neutrófilos también juegan un papel en el estrés oxidativo, pues producen ROS como mecanismo de defensa [7]. Las ROS son altamente perjudiciales para la estabilidad del ADN, causando metilaciones anormales, inestabilidad cromosómica y mutaciones, lo cual favorece la carcinogénesis. Se ha encontrado mayores niveles de daño oxidativo en el ADN de pacientes con EHNA que en otros pacientes con otras afecciones hepáticas [8].

El exceso de triglicéridos activa la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*), que a su vez inhibe la autofagia. También se inhibe la actividad de la proteína quinasa de serina/treonina ULK1 [9]. El cese de estas actividades entre otras, también incrementa el estrés oxidativo. Uno de los mecanismos para contrarrestarlo es la activación de la ruta de p62, que activa el factor de transcripción NRF2 e induce la expresión de genes pro-supervivencia, como la glutatión-S-transferasa [10].

Las mutaciones en el ADN, la activación de oncogenes y la inestabilidad cromosómica debidas a la actividad de las ROS, junto con el aumento de la división celular hepática por la activación de mecanismos de reparación son las que conllevan finalmente al desarrollo de CHC.

3.2. Inmunología del carcinoma hepatocelular

3.2.1. Introducción al sistema inmunitario

La inmunidad se divide en dos tipos, según la respuesta: innata y adaptativa.

Los elementos de la inmunidad innata incluyen, entre otros: neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), las células citotóxicas naturales (NK: *Natural Killer*), citoquinas, complemento y proteínas de fase aguda (ver Tabla 1). La respuesta inmune innata suele ser rápida y poco específica, pudiendo incluso llegar a dañar tejidos normales [11]. Esta respuesta produce la liberación de mediadores proinflamatorios, ROS y enzimas, entre otros. Adicionalmente, los monocitos, macrófagos y neutrófilos tienen la capacidad de fagocitar patógenos y partículas extrañas o de desecho. Las células NK tienen receptores MHC de clase I que, si no unen su ligando al interactuar con alguna célula, inducen su lisis a través de perforinas [11].

Tabla 1.- Células de la inmunidad innata [11, 12]

Tipo celular	Función
Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none">- Fagocitar patógenos extracelulares- Liberación de citoquinas y quimiocinas
Eosinófilos	<ul style="list-style-type: none">- Proteger frente a infecciones por parásitos, principalmente helmintos, mediante liberación de gránulos.
Basófilos	<ul style="list-style-type: none">- Inflamación- Reacciones alérgicas
Mastocitos	<ul style="list-style-type: none">- Inflamación- Reacciones alérgicas
Macrófagos	<ul style="list-style-type: none">- Inician la inflamación- Defensa contra bacterias, hongos y parásitos- Producen ROS, prostaglandinas y citoquinas
Monocitos	<ul style="list-style-type: none">- Inician la inflamación- Defensa contra bacterias, hongos y parásitos- Producen ROS, prostaglandinas y citoquinas
Células dendríticas	<ul style="list-style-type: none">- Detectar patógenos y presentar antígenos para activar linfocitos T.
NK	<ul style="list-style-type: none">- Defensa contra infecciones víricas y bacterias- Eliminación de células cancerígenas

Los elementos de la inmunidad adaptativa incluyen a los linfocitos T y B, que son exclusivos de los animales superiores (ver Tabla 2). La respuesta inmune adaptativa es específica y tiene memoria. La reacción al primer encuentro con el antígeno puede tardar desde días a semanas, aunque gracias a la memoria, la respuesta será más rápida y vigorosa en las futuras exposiciones a ese mismo antígeno [12]. Los linfocitos B liberan anticuerpos específicos contra el antígeno reconocido, mientras que los linfocitos T producen citoquinas y perforinas [11]. Los linfocitos T se dividen en dos grupos: los T *helper* (Th) y los T citotóxicos (Tc). Las células NKT se definen morfológicamente como linfocitos granulares

grandes, ya que se diferencian a partir de precursores comunes a los de los linfocitos T y comparten con ellos funciones citotóxicas [11].

Tabla 2.- Células de la inmunidad adaptativa [11, 12]

Tipo celular		Función
Linfocitos B		- Síntesis de anticuerpos
Linfocitos T	Th (CD4 ⁺)	- Reguladores de los procesos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. - Apoyar las funciones efectoras de los linfocitos B, los linfocitos Tc y los fagocitos.
	Tc (CD8 ⁺)	- Inducen la apoptosis en aquellas células que exponen su antígeno específico.

3.2.2. Patogénesis inmunológica del CHC

En el 90% de los casos, el CHC se desarrolla como consecuencia de un estado inflamatorio crónico del hígado, debido a infecciones crónicas por hepatitis B/C, alcoholismo o la EHNA [1]. Las citoquinas inflamatorias pueden activar tanto células del sistema inmunitario como diversas vías de señalización intracelular en células no inmunitarias. Las más destacadas en pacientes con enfermedades hepáticas son el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [13]. La citoquina IL-6 es una de las principales mediadoras de la inflamación y es capaz de activar a la proteína STAT3. Su activación constitutiva está relacionada con la metástasis y la angiogénesis, favoreciendo así la transición al CHC [14].

El sistema inmunitario juega un papel crucial en la patogénesis del CHC. Entre las células de inmunidad innata del hígado encontramos: las células de Kupffer, monocitos, neutrófilos, células dendríticas (CD) y células *Natural Killer* (NK) [15]. Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado y constituyen su primera línea de defensa [16]. Cuando se activan, pueden liberar las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como las quimiocinas CXCL-8 y CCL2 [15]. En la EHNA la capacidad de renovación de estas las células de Kupffer se ve mermada y paulatinamente son sustituidas por monocitos que se infiltran, reclutados por la quimiocina CCL2 [17, 18]. Además, se ha observado que las células de Kupffer son las responsables del reclutamiento temprano de plaquetas por medio del receptor GPIb [19]. Las plaquetas se acumulan en la transición desde la EHNA a la EHNA y se ha resaltado su papel como inductoras del daño hepático inducido por linfocitos T citotóxicos [20].

Por otro lado, también se ha identificado un aumento de la población de células dendríticas CXCR1⁺, también denominadas CD1. En modelos murinos de EHNA, las CD1 activaban preferencialmente linfocitos T reguladores (T_{reg}). La interacción de las parejas CD1-T_{reg} aumentó la producción de la citoquina IL-12b (crítica para la respuesta de los linfocitos Th1) y de las proteínas de membrana Ly6c y Nkg7 (relacionadas con la activación de linfocitos T CD8⁺) [21]. La participación de

los linfocitos T CD8⁺ tiene gran importancia en el desarrollo del CHC a partir del EHNA. Un estudio en modelos de ratón de EHNA determinó que los linfocitos T CD8⁺ pueden volverse auto-agresivos, matando los hepatocitos, cuando se dan principalmente dos hechos: presencia de la citoquina IL-15, que produce la fosforilación y degradación del factor de transcripción FOXO1 en el linfocito T CD8⁺; y grandes cantidades de acetato, un ácido graso de cadena corta producto del metabolismo lipídico alterado, que es capaz de inducir en el linfocito T CD8⁺ la expresión de Granzima B (GzmB) y la liberación de TNF [22].

Los T_{reg} son un subconjunto de los linfocitos T CD4⁺ que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 y cuya función es mantener la autotolerancia y prevenir enfermedades autoinmunes [23]. Sin embargo, también pueden promover el desarrollo del CHC inhibiendo la inmunovigilancia, creando un ambiente inmunosupresivo en el hígado [24]. Se ha observado que en la transición de la EHNA al CHC, a pesar de disminuir el recuento de linfocitos T CD4⁺, la subpoblación de T_{reg} aumenta selectivamente, tanto en modelos de ratón como en biopsias hepáticas humanas. La diferenciación a linfocitos T_{reg} es promovida mediante la interacción con neutrófilos, las principales células del sistema inmune innato presentes durante la inflamación y el daño hepático [24].

Los linfocitos Th17 son potentes inductores de la inflamación y se han vinculado con la patogénesis de enfermedades autoinmunes [25]. En los últimos años, se ha empezado a tener en cuenta el papel de los linfocitos Th17 en diversas enfermedades hepáticas, entre ellas la transición de la EHNA a la EHNA y el CHC [26-28]. Los linfocitos Th17 secretan, entre otros factores, IL-17, IL-21, IL-22 y TNF- α . El receptor de la IL-17 se expresa tanto en células endoteliales y epiteliales como en monocitos y macrófagos, por lo que produce una respuesta inflamatoria muy intensa [28]. La IL-17 puede inducir la expresión de quimiocinas que atraen a los neutrófilos al sitio de la inflamación, aunque la IL-17 por sí sola también puede reclutar y activar a los neutrófilos [29]. Se ha determinado que existe una correlación entre la cantidad de Th17 infiltrados en el hígado y el grado de daño hepático en pacientes con infecciones crónicas por VHB o VHC [27].

Por otro lado, destacan los linfocitos Th1 son células pro-inflamatorias, que secretan interferón (IFN)- γ , IL-2 y TNF- α [28]. Se ha establecido que están involucrados en la inflamación del tejido adiposo y se ha observado un incremento de Th1 en pacientes con EHNA [30]. El papel de los linfocitos Th1 es crucial para la inmunidad antitumoral, pues una vez infiltrados en el tumor, activan a los linfocitos T citotóxicos y a las células NK [31, 32].

3.3. Efecto de la ingesta de sal en la respuesta inmunitaria y en el desarrollo de cáncer

Las pobres elecciones nutricionales conducen a una población cada vez más obesa, más propensa a la diabetes y al síndrome metabólico, propiciando un ambiente inflamatorio crónico. Según el Informe Regional Europeo de la Obesidad de la OMS 2022, dos de cada tres adultos y uno de cada tres niños presenta sobrepeso en Europa. En 2017, la Asociación Panamericana de la Salud informó que aproximadamente 360 millones de personas en América Latina y el Caribe presentaban sobrepeso. En Estados Unidos se superó por primera vez la tasa de obesidad del 40%, situándose en un 42% según el *State of Obesity: Better Policies for a Healthier America*. Las dietas hipercalóricas, altas en grasas o en azúcares conllevan a un desequilibrio metabólico de los hepatocitos, el primer eslabón de la cadena que termina en EHGNA, esteatosis o finalmente CHC [5].

Una de las características más alarmantes de la dieta occidental es su alto contenido en sal, siendo 10 veces mayor en los alimentos procesados que en las comidas domésticas preparadas personalmente [33]. El cloruro de sodio (NaCl) es capaz de modular e intensificar las funciones de las células inmunitarias, así como su diferenciación [34]. Se ha demostrado, *in vitro*, que la hipertonidad del medio dirige la diferenciación de las células CD4⁺ a células Th17 a través de la vía de señalización del p38/NAFT5 o de la SGK1; y que el NaCl aumenta la producción de IL-17, una potente citoquina inflamatoria, de manera dosis-dependiente [35]. Además, después de eliminar las condiciones hipertónicas, las células Th17 continuaron produciendo grandes cantidades de IL-17 [36]. En modelos murinos alimentados con una dieta alta en sal (*HSD: High-Salt Diet*) se observó el mismo efecto: aumentó la expresión de la IL-17 de manera dependiente al elemento p38/MAPK, el sensor de estrés hipertónico en mamíferos [36]. Wu *et al.* también estudiaron el efecto de la sal en la diferenciación de los linfocitos Th17 y demostraron que, tanto *in vitro* como *in vivo*, el incremento de NaCl activa la SGK1, que induce la expresión de los receptores de la IL-23 (citoquina que estabiliza y refuerza el fenotipo Th17), promoviendo así la diferenciación a linfocitos Th17 [37].

Como ya se ha mencionado, la hipertonidad induce la fosforilación de p38/MAPK, que activa varias dianas aguas abajo, entre ellas el factor NFAT5 [36]. Se ha demostrado que las HSD activan a los macrófagos a través de la señalización del NFAT5. En un cultivo *in vitro* de macrófagos, el aumento de la concentración de NaCl aumentó la liberación de NO, como consecuencia de la inducción de la expresión de la sintasa de óxido nítrico 2 (NOS2), la cual es una diana del factor NFAT5 [38].

Zlatar *et al.* demostraron que la hipertonidad afecta tanto a la viabilidad como a la funcionalidad de los neutrófilos [39]. *In vitro*, una concentración de 300 mM de NaCl (hipertonidad) reducía la

viabilidad de los neutrófilos, produciendo sobretodo necrosis en lugar de apoptosis. También se vio claramente inhibida la actividad de la fagocitosis, la peroxidación y la desgranulación [39].

Las células mieloides supresoras (*MDSCs = Myeloid-Derived Suppressor Cells*) se caracterizan por ser un grupo con potencial supresor inmunitario, que pueden ser inducidas cuando hay inflamación crónica. Pueden inhibir tanto linfocitos T y B como células dendríticas y NK [35]. He *et al.* estudiaron el efecto de la hipertonicidad sobre las MDSCs en modelos de ratón con melanoma. Observaron que en los animales alimentados con una HSD disminuyó el número de MDSCs en la sangre, en el bazo y en tejidos tumorales de ratón, y que los niveles de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incrementaron en estos mismos tejidos [40]. Además, observaron que en los ratones con una HSD el tamaño del tumor era menor en tamaño y en peso comparado con los animales alimentados con una ND, resultados que coinciden con los de Willebrand *et al* [35]. Se ha demostrado que las HSD disminuyen las funciones supresoras de las MDSCs tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratón y se ha hipotetizado que debido a esta inhibición, la respuesta antitumoral de los linfocitos T es más fuerte [35].

3.4. Adaptación metabólica de los linfocitos T

Diferentes moléculas orgánicas actúan como reguladores de la actividad de los linfocitos T, destacando entre ellas los lípidos. A continuación, se describirá cómo las señales del microambiente son capaces de condicionar la diferenciación y la función de los linfocitos T. Bachem *et al.* estudiaron el efecto de los ácidos grasos (AG) de cadena corta en los linfocitos CD8⁺. Entre ellos, el butirato inducía la transición de los linfocitos T CD8⁺ en células de memoria y era capaz de desacoplar el ciclo de Krebs, estimulando el catabolismo de los ácidos grasos como fuente de energía [41].

Como ya se ha mencionado anteriormente, el acetato, un AG de cadena corta que está elevado en modelos de ratón con EHNA, es capaz de inducir la expresión de GzmB y la liberación del TNF en los linfocitos CD8⁺ CXCR6⁺ (linfocitos residentes del hígado). El acetato, junto con la influencia de la IL-15, induce un comportamiento autoagresivo en los linfocitos CD8⁺ CXCR6⁺ [22].

En células T CD4⁺ de ratón, el ácido láurico (12C) incrementó la diferenciación en células Th1 y Th17 hasta un 50% más con respecto al control a través de la vía de señalización p38-MAPK, pero se determinó que no afectó ni a su expansión ni a su viabilidad. Por otro lado, en células T CD4⁺ humanas, la adición de ácido láurico aumentó el número de células secretoras de IFN γ hasta un 35% con respecto al control [42].

Diversos estudios indican que en el microambiente del tumor existe una acumulación anormal de lípidos, induciendo su recepción y almacenamiento en las células inmunitarias [43-45]. Se ha observado que, en respuesta a la amplia disponibilidad de lípidos en el microambiente tumoral, los

linfocitos CD8⁺ infiltrados importan más colesterol y AG de cadena larga [45]. La acumulación de estos lípidos reduce su actividad citotóxica y su producción de IFN γ y TNF, siendo estos signos de linfocitos T exhaustos [46]. Además, Manzo *et al.* determinaron que, en adenocarcinomas pancreáticos tanto de ratón como humano, la acumulación específica de AG de cadena larga impedía la función mitocondrial e inducía una reprogramación transcripcional relacionada con el metabolismo lipídico, resultando en una disminución del catabolismo lipídico [46]. Asimismo, la acumulación de lípidos entorpece la presentación de antígenos en las células dendríticas infiltradas en el tumor [47].

Por tanto, hay evidencias de que el microentorno es capaz de regular las funciones e inducir cambios en el metabolismo de los linfocitos T CD8⁺, los cuales son clave para la inmunidad antitumoral. Está claro que la amplia disponibilidad de lípidos que se puede llegar a dar en determinadas enfermedades, como la EHGNA o la EHNA, puede desregular el metabolismo lipídico de las células inmunitarias, perjudicando su función natural (por ej. disminuyendo la actividad citotóxica de los linfocitos) o modificando su comportamiento y autotolerancia (por ej. induciendo un comportamiento autoagresivo en los linfocitos T). La dieta es un importante condicionante de la inflamación y del microentorno del tumor y, por tanto, las comidas ricas en grasas y sal son potentes disruptores del funcionamiento fisiológico del sistema inmune.

4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

4.1. Antecedentes

Para investigar el impacto de la ingesta elevada de sal en el desarrollo de CHC asociado a hígado graso, se realizó una modificación del modelo de CHC por ingesta de dieta occidental (WD; del inglés *Western Diet*). En este modelo, los animales son alimentados con una dieta rica en grasa, colesterol y azúcar que va acompañada de una administración semanal de una dosis baja de tetracloruro de carbono (CCl_4) [48]. Con esta dieta, los animales desarrollan hígado graso (EHGNA), esteatohepatitis (EHNA) y finalmente CHC a las 24 semanas aproximadamente. Por tanto, supone un buen modelo para estudiar los mecanismos que conducen a la progresión de hígado graso a CHC.

La modificación añadida a esta dieta consistió en solicitar a la empresa productora del alimento que compusiese una dieta WD personalizada con un alto contenido en sodio (4%), en lugar del contenido normal de sodio en esta dieta (0.5%). A la dieta con el contenido elevado de sodio se la designó WD-HS (del inglés *Western Diet-High Salt*). A continuación, se sometieron a los ratones de la cepa C57BL6 a la dieta WD ($\text{WD}+\text{CCl}_4$) o a la dieta WS-HS ($\text{WS-HS}+\text{CCl}_4$). Como control se emplearon ratones alimentados con dieta normal (ND, del inglés *Normal Diet*) y ratones alimentados con dieta normal que además recibieron inyecciones de CCl_4 ($\text{ND}+\text{CCl}_4$) al igual que los alimentados con WD.

Como se observa en la Figura 2, los ratones que recibieron la dieta WD-HS mostraron una reducción significativa tanto en el número de tumores como en el tamaño máximo de los tumores hepáticos (Fig. 2A-B).

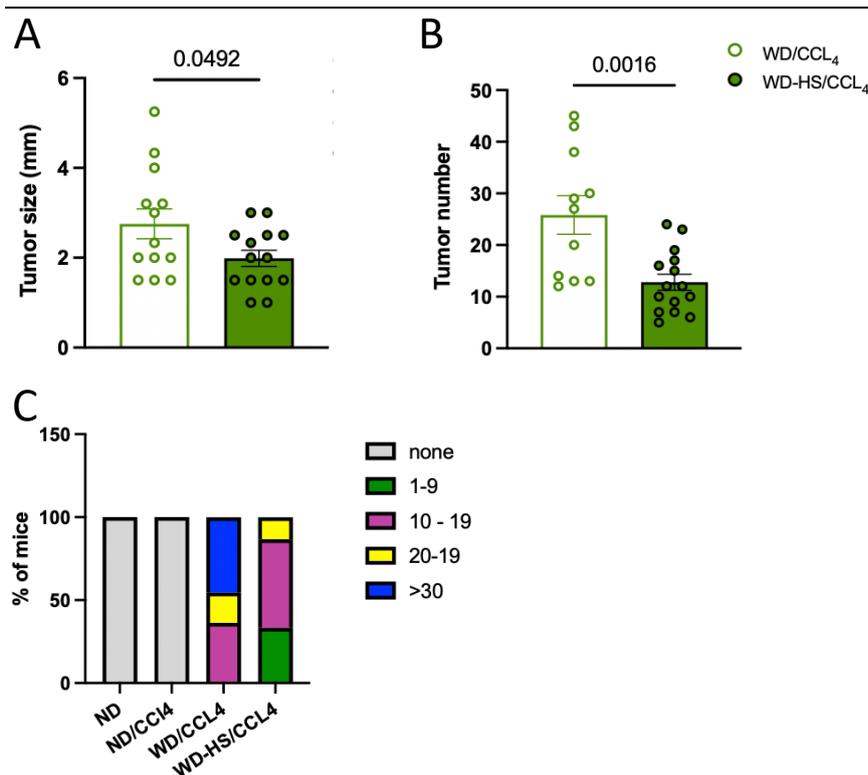


Figura 2. Impacto de la ingesta elevada de sal en el desarrollo de tumores hepáticos. **A)** Tamaño máximo de los tumores observados en cada animal. **B)** Número de tumores observados en cada animal. **C)** Porcentaje de animales de cada grupo con un número de tumores dentro de las franjas indicadas en la figura. ND: Dieta Control (*normal diet*). WD: Dieta occidental (*Western Diet*). WD-HS: Dieta occidental alta en sal (*Western Diet – High Salt*). CCl_4 : tetracloruro de carbono. Los datos proceden de un único experimento con un total de 5 (ND), 8 (ND/ CCl_4), 13 (WD/ CCl_4) y 14 (WD-HS/ CCl_4) animales por grupo.

La Figura 2C muestra el porcentaje de animales dentro de cada grupo que tenían un número total de tumores (contando únicamente tumores con tamaño >1 mm) dentro de las franjas indicadas en la figura.

Para analizar cómo la ingesta elevada de sal afecta a las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (T *helper*) presentes en el hígado de los ratones con EHGNA y CHC, se realizó un aislamiento de células CD4⁺ de los ratones de cada grupo. Estas células fueron estimuladas *in vitro* con una combinación de anticuerpos frente a CD3⁺ y CD28⁺ en presencia de un inhibidor del aparato de Golgi para bloquear la secreción de citocinas, y a continuación fueron analizadas por citometría de flujo (FACS) para determinar el fenotipo de las células presentes en cada hígado. Como se ve en la Figura 3, en los ratones alimentados con la dieta WD-HS se observó un incremento significativo en el porcentaje de células de tipo Th1 y Th1/Th17 (productoras de IFN γ e IL-17), mientras que el porcentaje de Th17 no varió de forma significativa.

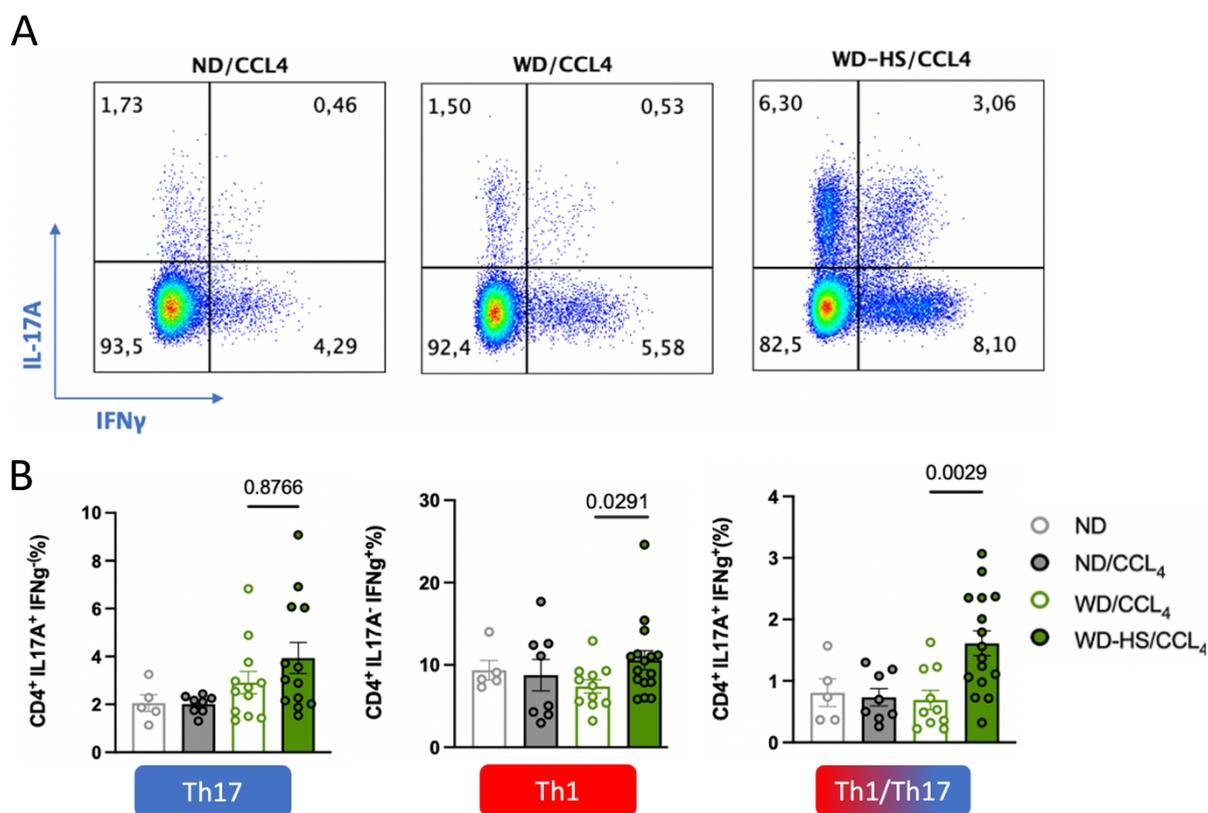


Figura 3. Análisis de las poblaciones de linfocitos T helper (Th) en el hígado de ratones sometidos a dieta occidental. **A)** Imágenes representativas de los gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo. **B-D)** Porcentaje de linfocitos Th17 (B), Th1 (C) y Th1/Th17 (D) en el hígado de cada grupo de ratones. Se muestran los valores individuales de cada animal. ND: Dieta Control (*normal diet*). WD: Dieta occidental (*Western Diet*). WD-HS: Dieta occidental alta en sal (*Western Diet – High Salt*). CCl₄: tetracloruro de carbono. Los datos proceden de un único experimento con un total de 5 (ND), 8 (ND/CCl₄), 13 (WD/CCl₄) y 14 (WD-HS/CCl₄) animales por grupo

En conjunto, los datos que se muestran en la figura 2 y 3, sugieren que la ingesta elevada de sodio reduce el desarrollo de carcinoma hepatocelular asociado a EHGNA y EHNA. Esto va acompañado de un incremento en las poblaciones hepáticas de linfocitos Th1 y Th1/Th17, que son células con un reconocido carácter antitumoral por su habilidad de producir grandes cantidades de IFN γ .

4.2. Objetivos

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Máster son:

1. Determinar si el sodio (Na⁺) afecta de forma directa la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ presentes en hígados con CHC asociado a hígado graso.
2. Analizar el efecto de los ácidos grasos en la respuesta celular al Na⁺ en linfocitos T *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Consideraciones éticas y uso de animales

Este proyecto se realizó aprovechando tejido sobrante (bazo e hígado) de ratones pertenecientes a un proyecto previamente revisado y aprobado por la Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la UMH (Referencia: UMH.HGA.JGN.01.20) y por la Dirección de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica (Código Autorización: 2020/VSC/PEA/0100).

Se usaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL6/J. Los ratones fueron comprados originalmente a la compañía Jackson Laboratories (www.jax.org) y posteriormente criados y mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) – Animalario de San Juan, en condiciones libres de patógenos (Specific Pathogen Free – SPF) con jaulas ventiladas individualmente, filtros de seguridad y con acceso a comida y agua ad libitum. Debido a la ausencia de modificaciones genéticas adicionales, nos referimos a ellos como ratones Wild Type o WT.

5.2. Aislamiento de linfocitos T *naïve* del bazo

En primer lugar, aislamos los linfocitos CD4⁺ totales del bazo de los ratones que fueron alimentados con una WD durante 24 semanas y a los que se les administró una inyección semanal de CCL₄ (0.5 mL/Kg).

Las células extraídas del tejido disgregado son teñidas con Trypan Blue para estimar la viabilidad y ser contadas bajo el microscopio óptico de campo claro en una cámara de Neubauer y resuspendidas posteriormente a una concentración de 1x10⁸ células/ml para aislar los linfocitos T *naïve* mediante el kit de separación inmunomagnética por selección negativa *EasySep Negative Selection – Mouse Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit* (StemCell Technologies).

Los linfocitos T *naïve* aislados se vuelven a contar y se utilizan 2x10⁶ células, mientras que el resto de los linfocitos T *naïve* se conservan a -80°C.

Las células se centrifugan y son resuspendidas a 1x10⁶ células/ml con el cóctel de diferenciación. Posteriormente se separan en dos tubos, con 5x10⁵ células cada uno, donde a uno se le añadirá 40 mM de NaCl y al otro, solución vehículo. Por último, transferimos el volumen a una placa de 96 pocillos previamente recubiertas con anticuerpos frente a CD3 para estimular la diferenciación.

- **Cóctel de diferenciación Th1:** medio de cultivo RPMI 1640 con penicilina-estreptomicina, L- glutamina, suero fetal bovino y β -Mercaptoetanol (medio RP10 complete) al cual se añade 10 ng/ml de IL-12, 10 μ g/ml de anticuerpos frente a IL-4 y 2 μ g/ml de anticuerpos frente a CD28. Se incubaron en dos condiciones: en presencia de 40 mM de NaCl y sin NaCl.
- **Cóctel de diferenciación Th17:** medio de cultivo IMDM con penicilina-estreptomicina, L- glutamina, HEPES, suero fetal bovino y β -Mercaptoetanol al cual se añade 10 μ g/ml de anticuerpos frente a IL-4, 10 μ g/ml de anticuerpos frente a IFN γ , 4 ng/ml de TGF- β , 20 ng/ml de IL-6 y 2 μ g/ml de anticuerpos frente a CD28. Se incubaron en dos condiciones: en presencia de 40 mM de NaCl y sin NaCl.
- **Cóctel de diferenciación Th0:** medio de cultivo RPMI 1640 con penicilina-estreptomicina, L- glutamina, suero fetal bovino y β -Mercaptoetanol (medio RP10 complete) al cual se añade 5ng/ml de IL-2 y 2 μ g/ml de anticuerpos frente a CD28. Se incubaron en dos condiciones: en presencia de 40 mM de NaCl y sin NaCl.

Las placas son incubadas a 37°C, 95% HR con atmósfera de CO₂ (5%) durante 5 días, tras los cuales el contenido de los pocillos es recogido: la mitad de las células se utilizan para analizar por citometría y la otra mitad se conserva a -80°C.

Tras recoger el contenido de los pocillos contamos de nuevo las células, centrifugamos y eliminamos el sobrenadante. Las células se resuspenden a 1x10⁶ células/ml en el medio de cultivo utilizado y se reestiman con un cóctel de activación leucocitaria *Leukocyte Activation Cocktail* con BD GolgiPlug (BD Biosciences) durante 4 horas para que produzcan citoquinas y estas queden retenidas en el retículo endoplásmico rugoso.

5.3. Aislamiento de linfocitos T naïve del hígado

Para obtener muestras de tejido hepático de ratones alimentados con WD durante 24 semanas, en primer lugar, se realizó una perfusión *in situ* del hígado con el fin de eliminar la sangre y con ello las poblaciones celulares no residentes en el hígado, para lo cual se insertó un catéter en la vena cava del animal anestesiado con isoflurano y se inyectó medio de perfusión (HBSS con 10 mM HEPES y 0,5 mM EGTA). El hígado se hincha y es extraído del animal, colocándose en una placa de Petri. A continuación, se toman pequeñas porciones de tejido hepático que se emplearán para extracción de ARN, para aislamiento de proteínas y para fijación del tejido con formalina. El resto se transfiere a una placa de Petri nueva, con 5 ml de HBSS 1X con Ca⁺² and Mg⁺² (Thermo Fisher Scientific), a temperatura ambiente.

El tejido se lava y posteriormente se añaden 5 ml de medio de digestión (*Liver Digestion Medium*, Thermo Fisher Scientific) Con ayuda de una jeringa estéril de 1 ml, se disgregó el tejido. El homogeneizado se transfirió a un tubo falcon de 50 ml, al que se le añadieron 13 ml más de medio de digestión. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se pasó el homogeneizado por un colador de células de 100 µm y se colocó en un nuevo tubo falcon de 50 ml, en el que se añadieron 25 ml de HBSS 1X para su lavado. Después se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de disolución de Percoll 37% para resuspender el residuo. Para preparar 45 ml de Percoll 37%, se requieren 14,985 ml de Percoll, 1,665 ml de PBS 10X y 28,35 ml de HBSS 1X.

La nueva disolución se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó a 800 g durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Los linfocitos se encontrarán en el fondo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los linfocitos en 12 ml de PBS 1X, 2% FCS. Tras una centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos a 4°C, los linfocitos estaban preparados para su recuento.

Posteriormente los linfocitos son resuspendidos a 1×10^6 células/ml con el cóctel de diferenciación Th0: medio de cultivo RPMI 1640 con penicilina-estreptomicina, L- glutamina, suero fetal bovino y β -Mercaptoetanol (medio RP10 complete) al cual se añade 5ng/ml de IL-2 y 2 µg/ml de anticuerpos frente a CD28. Se incubaron con GolgiPlug durante 4 horas en dos condiciones: con una concentración 40 mM de NaCl y sin NaCl. Por último, transferimos el volumen a una placa de 96 pocillos previamente recubiertas con anticuerpos frente a CD3 para activar el receptor de la célula T (TCR).

5.4. Citometría de flujo

Pasadas 4 horas de incubación se recogen las células en tubos y se lavan con PBS 1X con calcio y magnesio (FACs buffer) para eliminar el medio de cultivo.

A continuación, las células se tiñen con anticuerpos anti-ratón CD4-PECy7 diluido en PBS 1X (1:100) y con *Viability dye* V510 diluido en PBS 1X (1:1000) durante 25 minutos a 4 °C en oscuridad. Después se lavan con PBS 1X y se fijan con formalina al 10% durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad. Pasados los 20 minutos se vuelven a lavar y se resuspenden con *Cytofix/Cytoperm* buffer, se incuban durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad y luego se lavan con Perm buffer 1X donde se hará la tinción intracelular con anticuerpos frente a IFN γ (IFN γ -APC) e IL-17A (IL-17A-BV421).

Antes de hacer la tinción se coge un pequeño volumen de las muestras que más células tienen con el fin de preparar los FMOs (*fluorescence minus one*) que utilizaremos como control para establecer los cuadrantes de positividad para IFN γ e IL-17A. Al FMO de IFN γ no se le añade IFN γ -APC y al FMO de IL-17A no se le añade IL-17A-BV421.

Tras añadir la tinción intracelular se incubó durante 1 hora a 4 °C en oscuridad, pasado este tiempo se lavan con *Perm* buffer y se resuspenden en FACs buffer. Los datos son adquiridos mediante citometría de flujo utilizando el aparato *BD FACSCanto II Flow Cytometer* (BD Bioscience) y analizados mediante el software FlowJo.

5.5. Estrategia de ventanas para el análisis por citometría de flujo

Con el fin de analizar únicamente la población de linfocitos se selecciona dicha población según las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). A continuación, seleccionaremos las células simples excluyendo los dobletes y tripletes (grupos de 2, 3 o más células) en función del área (FSC-A) y el pico (FSC-H) de cada pulso. Una vez excluidos los dobletes, se seleccionan las células vivas utilizando un marcador de viabilidad (*Viability dye V500*) que penetra únicamente en las células no viables. Por último, dentro de las células vivas, se seleccionan las CD4⁺ (PE-Cy7) y a continuación se analiza la expresión intracelular de las citoquinas IL-17A (BV421) e IFN- γ (APC) en la muestra control (FMO). La señal en esta muestra control nos sirve de referencia para establecer los cuadrantes de positividad para IL-17A e IFN γ en el resto de las muestras.

5.6. Extracción de ARN

Las muestras de ARN son obtenidas a partir de las células CD4⁺ conservadas a -80°C mediante el kit de lisado celular *QIAshredder Kit* (QIAGEN) y el kit de extracción de ARN *RNeasy Micro Kit* (QIAGEN). El ARN total obtenido tras el proceso de extracción es medido mediante absorbancia utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ARN extraído se alícuota a 30 ng/ μ l y se conserva a -80°C.

5.7. qRT-PCR

Se sintetizó DNA complementario a partir de las muestras de ARN conservadas a -80°C a una concentración de 31 ng/ μ l utilizando el kit de transcripción inversa *PrimeScriptTM RT Master Mix* (Perfect Real Time) (Takara) utilizando la máquina *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific).

La PCR en tiempo real se realizó con *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific) utilizando el aparato QuantStudio 12K Flex (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific) con el siguiente programa: 2 minutos a 50°C; 2 minutos a 95°C; y 45 ciclos alteARNndo 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Los cebadores han sido diseñados utilizando la página *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) con ayuda de los programas BLAST y Clustal W y comprados en Integrated DNA Technologies (IDT).

Tabla 3.- Cebadores empleados para la qRT-PCR

Gen	Sentido	Secuencia
Foxp3	Directo	5'-AAATGTCCGGTCGAGCTTCC -3'
	Inverso	5'- TGCCCAAGATGTGCACTGAT-3'
Gitr	Directo	5'-TTGTGTTTGGCTTCCGGTGT-3'
	Inverso	5'-CCCAGGGAACATGGTGAGAAA-3'
Tcf7	Directo	5'-TCTTCTCTCGTCCCTGGAAGT-3'
	Inverso	5'-GCGCGGGATAACTACGGAAA-3'
CD36	Directo	5'-GCCAAGCTATTGCGACATGA-3'
	Inverso	5'-GAAAAGAATCTCAATGTCCGAGACT-3'

5.8. Análisis de los datos

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de D'Agostino y Pearson. Ninguna de las variables se ajustó a una distribución normal, con lo que se realizaron test no paramétricos. El análisis estadístico de las variables con datos pareados se realizó usando un test de rangos pareados de Wilcoxon, mientras que las variables con datos no pareados se analizaron usando el test de Mann-Whitney. Todos los valores *P* fueron de 2 colas y únicamente los valores *P* inferiores a 0,05 fueron considerados significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.0.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto directo del NaCl en la respuesta efectora de los linfocitos T procedentes de hígados con esteatosis y CHC.

Estudios previos han demostrado que el ión Na^+ induce la diferenciación de linfocitos T CD4^+ naïve (vírgenes) en células Th17 , productoras de la citoquina IL-17 [36]. Además, nuestros datos preliminares sugieren que el aumento en la ingesta de Na^+ se traduce en un aumento en las poblaciones de linfocitos tanto de tipo Th17 como de Th1 en el hígado de ratones con EHNA y CHC. Sin embargo, esos datos no indicaban si este aumento se debe a un efecto directo del Na^+ en los linfocitos T *helper* o si, por el contrario, se debe al efecto del Na^+ sobre otras poblaciones celulares que a su vez pudiesen modificar la activación y diferenciación de los linfocitos T como macrófagos, células dendríticas u otros tipos de células presentadoras de antígeno

Para determinar si las concentraciones elevadas de Na^+ tienen un efecto directo en los linfocitos T presentes en hígados con EHNA y CHC, se aislaron las células CD4^+ de los hígados de ratones alimentados con una dieta $\text{WD}+\text{CCl}_4$ durante 24 semanas. Estas células fueron estimuladas *in vitro* durante 4 horas con el cocktail GolgiPlug en presencia o ausencia de NaCl (40 mM) como se indica en la sección de Materiales y Métodos (ver apartado 5.3) y luego se analizó la producción de $\text{IFN}\gamma$, una citoquina inflamatoria que se ha visto que aumenta en las células infiltrantes en tumor[35], e IL-17.

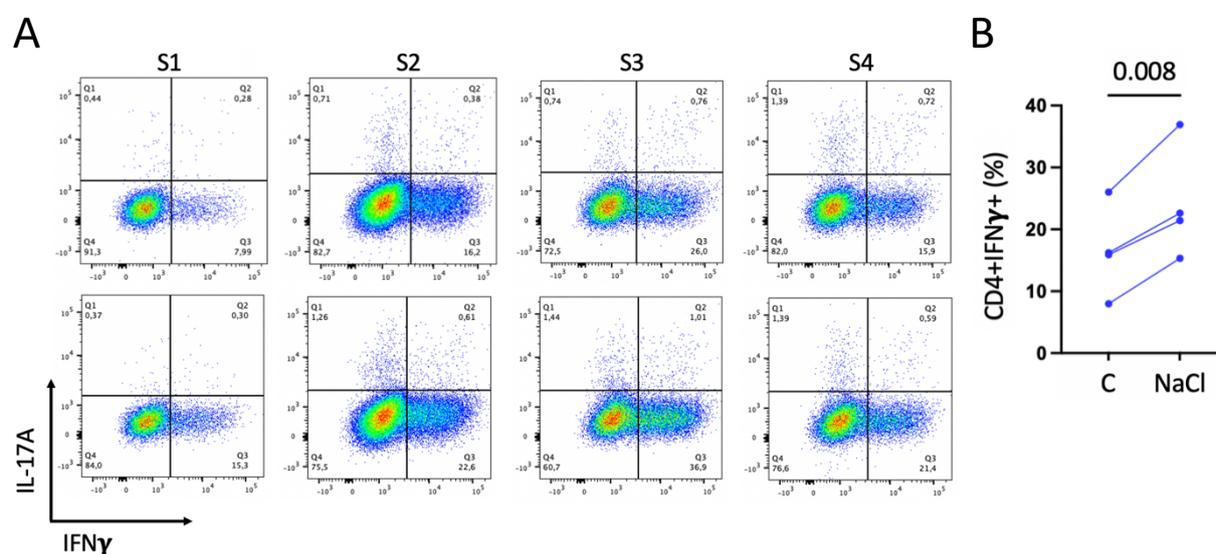


Figura 4. Efecto del NaCl en la producción de citocinas por los linfocitos T hepáticos. **A)** Imágenes representativas de los gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo. **B)** Porcentaje de linfocitos T CD4^+ que producen $\text{IFN}\gamma$ en ausencia (control) o presencia de 40 mM de NaCl en el medio de cultivo. Se muestran los valores pareados de muestras procedentes de 4 ratones con esteatohepatitis y carcinoma hepatocelular. Las diferencias fueron analizadas mediante un test de rangos pareados de Wilcoxon.

Como se observa en la Figura 4, la presencia de NaCl en el medio de cultivo generó un aumento en la producción de IFN γ por las células CD4⁺ hepáticas (Figura 4A-B), mientras que la producción de IL-17 fue muy reducida y no varió significativamente en presencia de NaCl. Estos datos indican que el NaCl tiene un efecto directo en la producción de IFN γ de los linfocitos T presentes en hígados con EHNA y CHC.

Para seguir caracterizando los efectos del NaCl en esta población celular, se aisló el ARN de las células estimuladas como se indica en el párrafo anterior. Posteriormente se analizó la expresión de diferentes genes asociados con la respuesta T dependiente. Entre todos los genes analizados, se observaron cambios significativos en *Foxp3*, *Gitr*, *Tcf7* y *Cd36*. En primer lugar, detectamos una reducción en la expresión de genes asociados a la estabilidad y función de las células T_{reg}, como *Foxp3* y *Gitr* [49] (Figura 5A-B). Estas células representan uno de los principales obstáculos en la respuesta inmunitaria antitumoral, ya que son capaces de inhibir las respuestas antitumorales del resto de linfocitos T *helper*, T citotóxicos o de las células NK. Por tanto, la reducción en la expresión de estos genes sugiere que la presencia de Na⁺ podría estar generando una disfunción de los T_{reg}. Esto podría contribuir, al menos en parte, a la reducción en el número de tumores que se observa en ratones con ingesta elevada de sal (Figura 2), pues la supresión del resto de linfocitos sería más débil, permitiendo una mayor actividad de estos.

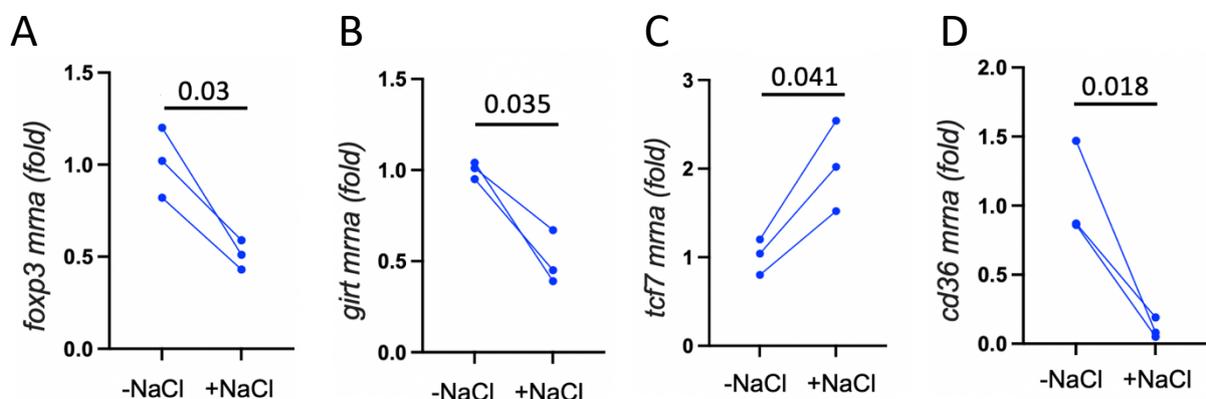


Figura 5. Efecto del NaCl en la expresión génica. Análisis de expresión génica por qRT-PCR en células T CD4⁺ aisladas del hígado de ratones con esteatohepatitis y CHC. **A)** Expresión génica de *Foxp3*. **B)** Expresión génica de *Gitr*. **C)** Expresión génica de *Tcf7*. **D)** Expresión génica de *Cd36*. Las diferencias fueron analizadas mediante un test de rangos pareados de Wilcoxon

También se detectó un incremento significativo en la expresión del factor de transcripción TCF1, codificado por el gen *Tcf7* en ratones (Figura 5C). Este factor está implicado en la generación de linfocitos Th1 de memoria [50]. Por último, también se identificó una reducción significativa en la expresión de CD36, un receptor de superficie celular que se conoce principalmente por su papel en el transporte y metabolismo de lípidos en las células inmunitarias [51] (Figura 5D). En los linfocitos T, la

expresión de CD36 se incrementa en presencia de ácidos grasos y está asociada a una menor producción de citoquinas y una respuesta antitumoral defectuosa, considerándose un marcador de 'agotamiento' de los linfocitos [52]. Por tanto, los datos de incremento en la expresión de *Tcf7* y descenso en la expresión de CD36 inducido por el NaCl *in vitro*, sugieren que la ingesta elevada en sal podría dar lugar a una mayor generación de linfocitos Th1 de memoria y a una disminución de linfocitos T exhaustos en hígados con EHNA y CHC, lo que también puede contribuir al fenotipo observado en nuestros ratones.

6.2. Los ácidos grasos insaturados, pero no los saturados, cambian la respuesta del linfocito T al sodio.

Diferentes estudios publicados en los últimos años han demostrado que los linfocitos Th responden a la presencia de Na⁺ polarizándose hacia células Th17 y produciendo grandes cantidades de IL-17 [36]. Sin embargo, nosotros hemos observado que los linfocitos Th presentes en el hígado de ratones con EHNA y CHC responden de forma diferente a la presencia del sodio: producen mayor cantidad de IFN γ (ver Figura 3). Estos resultados preliminares sugieren que dicho incremento dependiente de Na⁺ en la producción de IFN γ se debe a condiciones específicas del microambiente hepático durante el desarrollo de hígado graso.

Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo es determinar si la exposición de los linfocitos Th a lípidos hace que posteriormente respondan de forma diferente frente al Na⁺: en lugar de polarizarse a la población Th17, se diferencian a Th1. Para comprobarlo, aislamos linfocitos T CD4⁺ del bazo de ratones sanos alimentados con dieta estándar y los pre-estimulamos *in vitro* con dos tipos diferentes de lípidos (ácido linoleico y ácido palmítico), usando albúmina sérica bovina (BSA) como control. El ácido linoleico es un ácido graso poliinsaturado de 18 carbonos (C), mientras que el ácido palmítico es un ácido graso saturado de 16 C. A continuación, todas las células fueron estimuladas con un cocktail de diferenciación hacia Th1 en presencia de una concentración de 40 mM de NaCl. A los 5 días las células se re-estimularon para ver su capacidad de producción de IFN γ .

Como se puede ver en la Figura 6, el análisis por citometría de flujo (Figura 6A) sugiere que la exposición de los linfocitos T al ácido linoleico potencia su diferenciación hacia Th1 y la producción de IFN γ en presencia de NaCl (Figura 6A-B). Sin embargo, la exposición al ácido palmítico no tiene ningún efecto en la producción de IFN γ por estas células. Un aspecto importante a destacar es que tanto el ácido linoleico como el ácido palmítico no tuvieron un impacto significativo en la viabilidad de las células, lo que sugiere que los efectos observados en la diferenciación Th1 no están relacionados con la supervivencia celular. En conjunto, estos resultados proporcionan nuevos datos acerca de cómo los ácidos grasos específicos pueden modular las respuestas inmunológicas de los linfocitos T en presencia

de sodio y apuntan hacia la complejidad de las interacciones entre la composición de lípidos y la respuesta inmunológica durante el desarrollo de esteatosis y carcinoma hepatocelular.

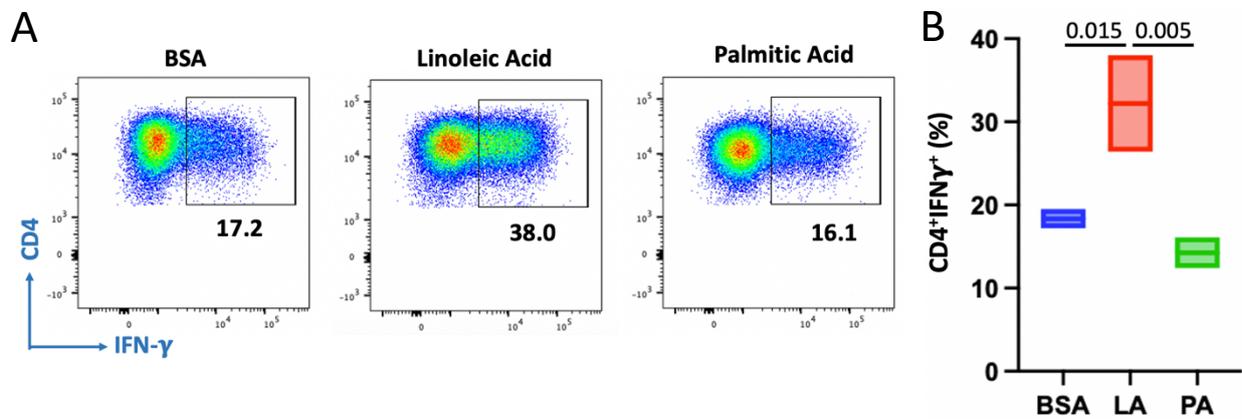


Figura 6. Efecto de los ácidos grasos insaturados en linfocitos T CD4⁺. A) Imágenes representativas de los gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo. B) Gráfico de cajas mostrando el porcentaje de linfocitos T CD4⁺IFN γ ⁺ tras inducir la diferenciación a Th1 en presencia de 40 mM de NaCl y con presencia o ausencia de ácidos grasos en el medio de cultivo. Los datos son representativos de un experimento con n=2. Mann-Whitney U test. BSA: albúmina sérica bovina. LA: ácido linoleico. PA: ácido palmítico.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio se centró en investigar el impacto directo del cloruro de sodio (NaCl) en la respuesta efectora de los linfocitos T en el contexto de hígado con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y carcinoma hepatocelular (CHC). Los resultados obtenidos proporcionan una visión más profunda de cómo el sodio y los ácidos grasos pueden influir en la respuesta inmunitaria en estos entornos patológicos.

En primer lugar, se observó que la presencia de Na⁺ en el medio de cultivo tiene un efecto directo en la producción de IFN γ por las células CD4⁺ hepáticas, pero no en la producción de IL-17. Estos resultados coinciden con los datos expuestos por Willebrand *et al.*, que detectaron una mayor expresión de TNF α y IFN γ en modelos murinos alimentados con una HSD, pero no observaron cambios en la expresión de IL-17 [35]. Por el contrario, contrastan con diversos trabajos anteriores que describen con detalle cómo el Na⁺ potencia la diferenciación de los linfocitos T hacia el subtipo Th17 [36, 37]. Sin embargo, en nuestro conocimiento, nuestro trabajo es el primero que estudia el efecto del Na⁺ en linfocitos T hepáticos, subrayando la importancia del microambiente en la respuesta celular al Na⁺. Esta capacidad del Na⁺ para influir directamente en la producción de IFN γ podría tener implicaciones significativas para la regulación de la respuesta inmunitaria y la respuesta antitumoral en CHC asociado a hígado graso.

Nuestro estudio también analiza algunos mecanismos subyacentes a estos efectos observados. Se encontró una disminución en la expresión de genes asociados a células T reguladoras (T_{reg}), como *Foxp3* y *Gitr*, en presencia de NaCl. El factor FOXP3 es esencial para la supervivencia de los linfocitos T_{reg} y controla la diferenciación de esta línea [53, 54] y el receptor GITR es un modulador de la función supresora de los T_{reg} [55]. Estos resultados concuerdan con los de Hernández *et al.*, que mostraron que una concentración de 40 mM de NaCl en linfocitos T_{reg} humanos cultivados in vitro bloquea su función supresora y promovía su diferenciación hacia el fenotipo Th1 [56]. Por tanto, esta disminución en la función de las células T_{reg} podría contribuir al fenotipo observado en los ratones alimentados con dieta WD-HS (ver Figura 2), debido al papel fundamental de estas células en la regulación de las respuestas inmunitarias y la supresión de respuestas antitumorales. Además, se identificó un aumento en la expresión del factor de transcripción TCF1, relacionado con la generación de linfocitos Th1 de memoria y con la inhibición de linfocitos T_{reg} [55], lo que sugiere que el sodio puede influir en la memoria inmunológica específica de Th1 en estos contextos patológicos.

Una de las observaciones más intrigantes es la influencia diferencial de los ácidos grasos insaturados y saturados en la respuesta de los linfocitos T al sodio. Encontramos que el ácido linoleico, un ácido graso poliinsaturado, potencia la diferenciación hacia Th1 y la producción de IFN γ en

presencia de NaCl, mientras que el ácido palmítico, un ácido graso saturado, no tiene un efecto significativo. Estos hallazgos sugieren que la composición lipídica puede modular la respuesta inmunológica de los linfocitos T al sodio, lo que podría ser de gran relevancia en los contextos de esteatosis y CHC. Un efecto diferencial de los ácidos grasos en la biología de los linfocitos T ya había sido descrito por Gorjão *et al.*, aunque en un contexto distinto. En dicho estudio, los autores estudiaron el efecto de los ácidos grasos en la proliferación de los linfocitos humanos de sangre periférica y observaron que la adición de ácido linoleico y oleico al medio aumentaba la proliferación, mientras que el ácido palmítico y el esteárico la inhibían [57].

El ácido linoleico se ha asociado con propiedades antiinflamatorias y la modulación de respuestas inmunitarias [58]. Por otro lado, los ácidos grasos saturados, en particular el ácido palmítico, se han asociado con inflamación crónica y disfunción inmunitaria en diferentes patologías [59]. El descubrimiento de que los ácidos grasos insaturados y saturados tienen efectos diferentes en la respuesta de los linfocitos T al sodio arroja luz sobre una interacción compleja y poco comprendida entre la composición lipídica y la señalización inmunológica en contextos patológicos [60, 61]. Los ácidos grasos, que son componentes esenciales de las membranas celulares y fuentes de energía, no solo desempeñan un papel estructural y metabólico, sino que también actúan como moléculas señalizadoras que influyen en múltiples procesos celulares, incluida la respuesta inmunitaria [62]. Sin embargo, nuestros datos indican que los efectos de los ácidos grasos sobre la respuesta inmunológica no son universales y sugieren que las propiedades biológicas específicas de cada tipo de ácido graso pueden modular cómo los linfocitos T responden a las señales de su entorno, como sucede con el sodio.

Es importante señalar que este trabajo también presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, el estudio se basa en el uso de un modelo animal y cultivos celulares *in vitro*. Aunque estos modelos son útiles, no siempre reflejan completamente las respuestas inmunitarias en humanos. Las diferencias entre especies en los ensayos *in vivo* y la falta de un entorno biológico completo en los ensayos *in vitro* podrían limitar la extrapolación directa de los resultados a situaciones clínicas en humanos. Por tanto, sería importante validar estos hallazgos en muestras humanas. En segundo lugar, el Na⁺ y los ácidos grasos probablemente interactúan con otros componentes del microambiente hepático que no están incluidos en nuestro análisis, como otros tipos celulares y factores solubles. Explorar las interacciones entre sodio, ácidos grasos y otros factores inmunorreguladores podría proporcionar una imagen más precisa de la respuesta inmunológica en estas condiciones. Por último, aunque se describen cambios en las funciones efectoras y en la expresión génica de linfocitos T, el estudio no profundiza completamente en los mecanismos moleculares subyacentes a estos cambios. Se necesitarían más

investigaciones para comprender cómo los ácidos grasos y el sodio interactúan con las vías de señalización intracelular y cómo influyen en la expresión génica para modular la respuesta inmunitaria.

En conjunto, estos resultados resaltan la complejidad de las interacciones entre los factores ambientales, como el Na⁺ y los ácidos grasos, y la respuesta inmunitaria en entornos patológicos como la esteatosis y el CHC. El estudio proporciona información valiosa sobre cómo el sodio puede influir en la respuesta inmunitaria Th1 en el hígado y cómo esta influencia puede ser mediada por la composición de lípidos. Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes para el desarrollo de enfoques terapéuticos dirigidos a modular las respuestas inmunitarias en condiciones hepáticas patológicas, especialmente en el contexto de la respuesta antitumoral. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos moleculares subyacentes a estas observaciones y para validar la relevancia clínica de estos resultados en seres humanos.

8. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En el presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) hemos estudiado *in vitro* la modulación de los linfocitos CD4⁺ hepáticos en modelos murinos de EHNA y CHC y los resultados obtenidos coinciden con los datos preliminares a este TFM y con estudios anteriores.

Por un lado, estudiamos el efecto de la concentración de Na⁺ sobre las poblaciones linfocitarias y encontramos que, en los ratones alimentados con una dieta occidental rica en sal (WD-HS), aumentaba la expresión de IFN γ , pero no de IL-17, sugiriendo así que, en este contexto de hígado graso y CHC, la ingesta elevada de sal induce la diferenciación hacia linfocitos Th1. Asimismo, tras analizar la expresión de ciertos genes, observamos que disminuyó la expresión de genes asociados a células Treg, como *Foxp3* y *Gitr*, y de un marcador de agotamiento de los linfocitos T, como *Cd36*. Por el contrario, detectamos un incremento en *Tcf7*, un gen implicado en la generación de linfocitos Th1 de memoria. En conjunto, los datos de expresión génica y de producción de citoquinas apuntan hacia un fenotipo más antitumoral de los linfocitos presentes en el hígado de los ratones alimentados con WD-HS.

Por otro lado, hemos estudiado el efecto de los ácidos grasos sobre la respuesta linfocitaria a la presencia de sal. Nuestros resultados muestran que el ácido linoleico, un ácido graso insaturado, potencia la diferenciación de linfocitos Th1 y la producción de IFN γ , mientras que el ácido palmítico, un ácido graso saturado, no afecta a las poblaciones linfocitarias. Podemos concluir que la composición de los ácidos grasos presentes en el microambiente del tumor afecta a las células inmunitarias e influye en su diferenciación.

En el futuro se deberá estudiar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto ejercido por la sal. La bibliografía apunta a la SGK1, al NAFT5, a la vía p38/MAPK y a FOXP3 como posibles inductores de la diferenciación a Th1 y Th17 en presencia de sal, y a la inhibición de la función efectora de los linfocitos T_{reg}. También deberemos estudiar la relación entre la sal y los ácidos grasos y cómo su interacción influencia en las poblaciones linfocitarias. Además, hay que estudiar el efecto sobre otras células inmunitarias, como las MDSCs, los macrófagos, los neutrófilos y las células NK, para intentar dibujar el panorama global de interacciones que se dan en el microentorno del tumor. Esto nos permitiría, en el futuro, determinar por qué en estudios previos a este TFM se ha observado una reducción en el número y tamaño de los tumores en ratones modelos de EHNA y CHC.

9. BILIOGRAFÍA

1. Llovet, J.M., et al., *Hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2021. **7**(1): p. 6.
2. Reig, M., et al., *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH*. Med Clin (Barc), 2021. **156**(9): p. 463 e1-463 e30.
3. Ringelhan, M., et al., *The immunology of hepatocellular carcinoma*. Nat Immunol, 2018. **19**(3): p. 222-232.
4. Rodríguez de Lope, C., et al., *Clinical characteristics of hepatocellular carcinoma in Spain. Comparison with the 2008–2009 period and analysis of the causes of diagnosis out of screening programs. Analysis of 686 cases in 73 centers*. Medicina Clínica (English Edition), 2017. **149**(2): p. 61-71.
5. Anstee, Q.M., et al., *From NASH to HCC: current concepts and future challenges*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019. **16**(7): p. 411-428.
6. Pinter, M., et al., *NASH and Hepatocellular Carcinoma: Immunology and Immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2023. **29**(3): p. 513-520.
7. Wilson, C.L., et al., *NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma*. Nature Communications, 2015. **6**(1).
8. Tanaka, S., et al., *Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma*. Journal of Gastroenterology, 2013. **48**(11): p. 1249-1258.
9. Reeves, H.L., M.Y.W. Zaki, and C.P. Day, *Hepatocellular Carcinoma in Obesity, Type 2 Diabetes, and NAFLD*. Digestive Diseases and Sciences, 2016. **61**(5): p. 1234-1245.
10. Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. Genes to Cells, 2011. **16**(2): p. 123-140.
11. Monserrat Sanz, J., et al., *Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato*. Medicina - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 2017. **12**(24): p. 1369-1378.
12. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-1789.
13. Bieghs, V. and C. Trautwein, *The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease*. Trends in Immunology, 2013. **34**(9): p. 446-452.
14. Subramaniam, A., et al., *Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2013. **1835**(1): p. 46-60.
15. Liaskou, E., D.V. Wilson, and Y.H. Oo, *Innate Immune Cells in Liver Inflammation*. Mediators of Inflammation, 2012. **2012**: p. 1-21.
16. Jenne, C.N. and P. Kubers, *Immune surveillance by the liver*. Nature Immunology, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
17. Miura, K., et al., *Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2012. **302**(11): p. G1310-G1321.
18. Tran, S., et al., *Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis*. Immunity, 2020. **53**(3): p. 627-640.e5.
19. Malehmir, M., et al., *Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer*. Nature Medicine, 2019. **25**(4): p. 641-655.
20. Iannacone, M., et al., *Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage*. Nature Medicine, 2005. **11**(11): p. 1167-1169.
21. Deczkowska, A., et al., *XCR1+ type 1 conventional dendritic cells drive liver pathology in non-alcoholic steatohepatitis*. Nature Medicine, 2021. **27**(6): p. 1043-1054.

22. Dudek, M., et al., *Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH*. Nature, 2021. **592**(7854): p. 444-449.
23. Togashi, Y., K. Shitara, and H. Nishikawa, *Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2019. **16**(6): p. 356-371.
24. Wang, H., et al., *Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis*. Journal of Hepatology, 2021. **75**(6): p. 1271-1283.
25. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(1): p. 485-517.
26. Chackelevicius, C.M., et al., *Th17 involvement in nonalcoholic fatty liver disease progression to non-alcoholic steatohepatitis*. World Journal of Gastroenterology, 2016. **22**(41): p. 9096.
27. Hammerich, L., F. Heymann, and F. Tacke, *Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases*. Clinical and Developmental Immunology, 2011. **2011**: p. 1-12.
28. Van Herck, M.A., et al., *The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**.
29. Jones, C.E. and K. Chan, *Interleukin-17 Stimulates the Expression of Interleukin-8, Growth-Related Oncogene- α , and Granulocyte–Colony-Stimulating Factor by Human Airway Epithelial Cells*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2002. **26**(6): p. 748-753.
30. Rau, M., et al., *Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver*. The Journal of Immunology, 2016. **196**(1): p. 97-105.
31. Mirlekar, B. and Y. Pylayeva-Gupta, *IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy*. Cancers (Basel), 2021. **13**(2).
32. Zwirner, N.W. and A. Ziblat, *Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 25.
33. Brown, I.J., et al., *Salt intakes around the world: implications for public health*. International Journal of Epidemiology, 2009. **38**(3): p. 791-813.
34. Junger, W.G., et al., *Hypertonic saline enhances cellular immune function*. Circ Shock, 1994. **42**(4): p. 190-6.
35. Willebrand, R., et al., *High salt inhibits tumor growth by enhancing anti-tumor immunity*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1141.
36. Kleinewietfeld, M., et al., *Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 518-22.
37. Wu, C., et al., *Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 513-517.
38. Jantsch, J., et al., *Cutaneous Na⁺ Storage Strengthens the Antimicrobial Barrier Function of the Skin and Boosts Macrophage-Driven Host Defense*. Cell Metabolism, 2015. **21**(3): p. 493-501.
39. Zlatar, L., et al., *Suppression of neutrophils by sodium exacerbates oxidative stress and arthritis*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1174537.
40. He, W., et al., *High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1732.
41. Bachem, A., et al., *Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8(+) T Cells*. Immunity, 2019. **51**(2): p. 285-297 e5.
42. Haghikia, A., et al., *Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine*. Immunity, 2016. **44**(4): p. 951-3.
43. Al-Khami, A.A., et al., *Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells*. Oncoimmunology, 2017. **6**(10): p. e1344804.

44. Ma, X., et al., *Cholesterol Induces CD8(+) T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment*. Cell Metab, 2019. **30**(1): p. 143-156 e5.
45. Xu, S., et al., *Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8(+) T cells in tumors*. Immunity, 2021. **54**(7): p. 1561-1577 e7.
46. Manzo, T., et al., *Accumulation of long-chain fatty acids in the tumor microenvironment drives dysfunction in intrapancreatic CD8+ T cells*. J Exp Med, 2020. **217**(8).
47. Herber, D.L., et al., *Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 880-6.
48. Tsuchida, T., et al., *A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer*. Journal of Hepatology, 2018. **69**(2): p. 385-395.
49. Khalife, E., et al., *Overexpression of Regulatory T Cell-Related Markers (FOXP3, CTLA-4 and GITR) by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Breast Cancer*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2018. **19**(11): p. 3019-3025.
50. Wu, T., et al., *TCF1 Is Required for the T Follicular Helper Cell Response to Viral Infection*. Cell Reports, 2015. **12**(12): p. 2099-2110.
51. Chen, Y., et al., *CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate*. Journal of Experimental Medicine, 2022. **219**(6).
52. Ao, Y.-Q., et al., *Tumor-infiltrating CD36+CD8+T cells determine exhausted tumor microenvironment and correlate with inferior response to chemotherapy in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2023. **23**(1).
53. Gavin, M.A., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 771-775.
54. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-1061.
55. Ephrem, A., et al., *Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent*. European Journal of Immunology, 2013. **43**(9): p. 2421-2429.
56. Hernandez, A.L., et al., *Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells*. Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(11): p. 4212-4222.
57. Gorjão, R., et al., *Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids*. Cell Biochemistry and Function, 2007. **25**(3): p. 305-315.
58. Viladomiu, M., R. Hontecillas, and J. Bassaganya-Riera, *Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid*. European Journal of Pharmacology, 2016. **785**: p. 87-95.
59. Fatima, S., et al., *Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**(13): p. 2547-2557.
60. Hidalgo, M.A., M.D. Carretta, and R.A. Burgos, *Long Chain Fatty Acids as Modulators of Immune Cells Function: Contribution of FFA1 and FFA4 Receptors*. Frontiers in Physiology, 2021. **12**.
61. Karsten, S., G. Schäfer, and P. Schauder, *Cytokine production and DNA synthesis by Human peripheral Lymphocytes in response to Palmitic, Stearic, Oleic, and Linoleic acid*. Journal of Cellular Physiology, 1994. **161**(1): p. 15-22.
62. Radzikowska, U., et al., *The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses*. Nutrients, 2019. **11**(12): p. 2990.