

UNIVERSIDAD DE JAÉN
**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS INMUNOMODULADORES DE LAS
DIETAS LIPÍDICAS Y PAPEL DETERMINANTE
EN LOS ESTADOS DE INMUNOSUPRESIÓN**

**PRESENTADA POR:
JOSÉ MARÍA CERÓN RODRÍGUEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. GERARDO ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS LÓPEZ
DRA. DÑA. M^a ÁNGELES PUERTOLLANO VACAS
DRA. DÑA. ELENA PUERTOLLANO VACAS**

JAÉN, 12 DE DICIEMBRE DE 2014

ISBN 978-84-8439-961-2

ÍNDICE

ÍNDICE

1.- Introducción	2
1.1.- Sistema inmunitario, aspectos generales	3
1.1.1.- Inmunidad innata o natural.	3
1.1.1.1.- Barreras epiteliales	3
1.1.1.2.- Tipos celulares de la respuesta inmune innata	4
1.1.1.3.- Inflamación	7
1.1.2.- Inmunidad adaptativa o específica.	12
1.1.2.1.- Especificidad y diversidad en la inmunidad adaptativa.	13
1.1.2.2.- Memoria de la inmunidad adaptativa.	13
1.1.2.3.- Especialización en la inmunidad adaptativa.	13
1.1.2.4.- Contención y homeostasis de la inmunidad adaptativa.	13
1.1.2.5.- Ausencia de autorreactividad en la inmunidad adaptativa.	14
1.1.2.6.- Tipos celulares en la respuesta inmune adaptativa.	14
1.1.2.7.- Inmunidad celular.	15
1.1.2.8.- Inmunidad humoral.	16
1.2.- Familias lipídicas.	19
1.2.1.- Familias lipídicas	19
1.2.2.- Deficiencias lipídicas e inmunidad.	21
1.3.- Consecuencias biológicas.	22
1.3.1.- Mecanismos de los ácidos grasos para modular las funciones inmunes	22
1.3.1.1.-Alteración en la fluidez de membrana (presentación de antígenos y transducción de señales)	22
1.3.1.2.- Formación de peróxidos lipídicos (estrés oxidativo)	23
1.3.1.3 Regulación en la formación de eicosanoides	24
1.3.1.4 Modificación en la expresión génica	25
1.3.1.5 Apoptosis	26
1.3.2.- Modulación de la microbiota intestinal	27
1.3.3.- Funciones del sistema inmune moduladas por los ácidos grasos	28

1.3.3.1	Proliferación de linfocitos	28
1.3.3.2	Producción de citoquinas	30
1.3.3.3	Actividad de células Natural Killer (NK)	32
1.3.3.4	Presentación de antígenos	34
1.3.3.5	Producción de anticuerpos	35
1.4	Consecuencias clínicas	37
1.4.1	Ácidos grasos, inmunidad e infección	37
1.4.1.1	Bacterias	38
1.4.1.2	Virus	40
1.4.1.3	Parásitos	41
1.4.2.	Dietas ricas en ácidos grasos e inmunosupresión	42
1.4.2.1	Ciclofosfamida (CPA)	43
1.4.2.2	GK 1.5	44
1.4.2.3	RB6-8C5	45
1.4.3	Ácidos grasos en nutrición hospitalaria	47
1.4.3.1	Nutrición enteral y parenteral	47
1.4.3.2	Emulsiones lipídicas en nutrición parenteral	48
1.4.3.2.1	Primera generación	48
1.4.3.2.2	Segunda generación	49
1.4.3.2.3	Tercera generación	51
1.4.3.3	Emulsiones lipídicas ricas en aceite de oliva	52
2.	Hipótesis y objetivos	56
3.	Material y métodos	60
3.1	Ensayos <i>in vivo</i>	60
3.1.1	Animales y dietas lipídicas experimentales	60
3.1.2	Preparación de los inmunosupresores CPA, GK 1.5 y RB6-8C5	62
3.1.3	Tratamiento con los agentes inmunosupresores CPA, GK 1.5 y RB6-8C5	62
3.1.4	Preparación de <i>Listeria monocytogenes</i> y posterior infección experimental	62
3.1.5	Ensayos de supervivencia	63

3.1.6	Recuperación de bacterias viables en bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5	63
3.1.7	Recuperación de bacterias viables en hígado de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5	64
3.2	Órganos y células murinas	64
3.2.1	Extracción de bazo, hígado y timo	64
3.2.2	Recolección y preparación de esplenocitos de ratón	65
3.2.3	Recolección y preparación de timocitos de ratón	65
3.3	Ensayos <i>ex vivo</i>	65
3.3.1	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	65
3.3.2	Ensayo de proliferación celular con mitógenos en esplenocitos y timocitos de ratón	66
3.3.3	Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esplenocitos de ratón	66
3.3.4	Determinación de citoquinas en sangre periférica de ratón	67
3.3.5	Cuantificación de la producción de eicosanoides	67
3.3.5.1	Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	67
3.3.5.2	Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	68
3.3.5.3	Tromboxano B ₂ (TXB ₂)	68
3.3.6	Inmunofenotipaje en sangre periférica de ratón mediante citometría de flujo	69
3.4	Análisis estadístico	71
4.	Resultados	73
4.1	Ensayos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	73
4.1.1	Peso de los ratones después del tratamiento con los inmunosupresores (CPA, GK 1,5 y RB6-8C5) y tras la infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i> .	73
4.1.2	Peso de los órganos (bazos, hígados y timos) de los ratones después del tratamiento con los inmunosupresores y tras la infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i> .	75

4.1.3	Índices esplénicos de los ratones sometidos a inmunosupresión y tras la infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i> .	79
4.1.4	Ensayo de supervivencia frente a <i>Listeria monocytogenes</i> en ratones sometidos a inmunosupresión.	81
4.1.5	Recuperación de bacterias viables en bazo e hígado de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5.	82
4.1.6	Ensayo de proliferación celular con mitógenos en esplenocitos y timocitos (linfoproliferación), de los ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5.	87
4.1.7	Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en bazo de los ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5.	96
4.1.8	Medida de citoquinas en sangre periférica de ratón.	98
4.1.9	Determinación de eicosanoides.	119
4.1.10	Inmunofenotipaje en sangre periférica de ratón.	126
4.2.	Resumen de resultados.	137
4.2.1	Parámetros fisiológicos	137
4.2.2	ROS y recuperación de bacterias viables en bazo e hígado.	138
4.2.3	Linfoproliferaciones en bazo y timo ± concanavalina A.	139
4.2.4	Citoquinas Th1/Th2	140
4.2.5	Eicosanoides y subpoblaciones linfocitarias.	141
5.	Discusión	143
5.1	Efecto de las diferentes dietas lipídicas en los grupos experimentales no sometidos a tratamiento inmunosupresor.	144
5.2	Efecto de las diferentes dietas lipídicas en los grupos experimentales sometidos a tratamiento inmunosupresor.	151
5.2.1	Ciclofosfamida (CPA)	151
5.2.2	GK 1,5	155
5.2.3	RB6-8C5	158
6.	Conclusiones	163

7. Bibliografía	166
7.1. Artículos científicos	166
7.2. Libros y páginas webs.	188
8. <i>Publicaciones</i>	

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

La palabra "inmunidad" es un sustantivo abstracto derivado del adjetivo en latín "in-mūn(itātem)" que significa estar exento de obligación; aunque se desconoce el nombre del autor que empleó por primera vez la palabra inmunología como ciencia de estudio; si se sabe que entre 1906 y 1909 ya aparecía la palabra documentada en inglés (immunology), y muchos siglos antes los romanos ya la empleaban para los altos cargos políticos, que no estaban obligados a pagar impuestos.

La inmunodeficiencia es la carencia de funcionalidad ya sea de forma total o parcial del sistema inmune en humanos o animales, aumentando la susceptibilidad de sufrir una infección por microorganismos patógenos. La pérdida de funcionalidad del sistema inmune puede deberse a una patología de carácter autoinmune como por ejemplo en enfermedades tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (en el año 2009 afectaba a 33,3 millones de personas en todo el mundo) (Gresele *et al.*, 2011), la enfermedad de Crohn o el lupus eritematoso sistémico (del 20 al 50% de los casos con implicación renal) (Karras, 2011) entre otras; o bien en casos en los que se induce inmunosupresión a través de tratamientos en la lucha contra el cáncer con radioterapia o inmunoterapia, donde se pretende inactivar el sistema inmune para beneficio terapéutico (Mellman *et al.*, 2011).

La malnutrición empeora al desarrollo general y expresión de la respuesta inmune de forma significativa, siendo una de las principales causas de inmunodeficiencia a nivel mundial (Chandra, 1996). Los ácidos grasos presentes en la dieta además de servir como sustrato energético para la célula son capaces de modular el sistema inmune positiva o negativamente tanto en la resistencia a la infección por parte del hospedador, como en los procesos inflamatorios que se pueden derivar.

No todos los ácidos grasos actúan de igual forma al ser incorporados por las células eucariotas, los ácidos grasos pertenecientes a la serie n-3 o también conocidos como omega-3 presentan propiedades beneficiosas para el sistema cardiovascular, pero muestran deficiencias en aspectos relacionados con la resistencia contra microorganismos infecciosos pudiendo empeorar la resistencia del hospedador a dicha infección (Irons *et al.*, 2003). En cambio, numerosos estudios han demostrado que el ácido oleico y los componentes fenólicos presentes en el aceite de oliva a los que se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, no empeoran la resistencia del hospedador a la infección en humanos y animales de experimentación (Puertollano *et al.*, 2007; Puertollano *et al.*, 2010).

1.1.- Sistema inmunitario, aspectos generales

Se conoce por sistema inmunitario al conjunto de procesos biológicos, fisiológicos y estructuras celulares en humanos y animales que participan en la defensa contra agentes infecciosos o ajenos al interior de la cavidad corporal. Debido a la gran variedad de microorganismos patógenos y otras amenazas para la salud, la evolución ha provisto a humanos con un sistema inmunitario altamente sofisticado, flexible y potente que actúa de forma conjunta y coordinada dando lugar a la respuesta inmunitaria.

1.1.1.- Inmunidad innata o natural

Este tipo de inmunidad es la primera línea constituida por mecanismos de defensa celulares, bioquímicos y barreras físicas frente a los microorganismos patógenos encontrándose siempre funcional para garantizar una rápida y efectiva respuesta. Las características principales de este tipo de respuesta inmunitaria: i) especificidad frente a estructuras compartidas por grupos de microorganismos afines (patrones moleculares asociados a patógenos), ii) diversidad de actuación limitada (codificada por la línea germinal), iii) no presenta memoria y iv) falta de reactividad frente a uno mismo; los principales componentes de la inmunidad innata son:

- Barreras epiteliales y sustancias antimicrobianas producidas en las mismas.
- Células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (células NK).
- Proteínas sanguíneas como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.
- Citoquinas que regulan y coordinan la actividad de las células involucradas en este tipo de respuesta inmunitaria.

1.1.1.1.- Barreras epiteliales

La primera barrera física que impide la entrada de microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos a nuestro organismo, son las superficies de los epitelios en los que se incluyen la piel y las superficies mucosas de los aparatos respiratorio y gastrointestinal. Los epitelios presentan la capacidad de producir ciertos péptidos con características antimicrobianas como son las catelicidinas y defensinas, que son distintas desde el punto de vista estructural. Un estudio reciente sobre mucinas en superficies mucosas (Kim, 2012) revela la importancia de estas como barreras ante infecciones respiratorias aéreas.

Las defensinas (Lehrer y Lu, 2012) son pequeños péptidos catiónicos de 29 a 34 aminoácidos y que se clasifican en tres familias α , β y ϕ según la localización de los puentes disulfuro; se producen en células epiteliales de la superficie de mucosas respiratorias, intestinales y de la piel; también en leucocitos que contienen gránulos como los neutrófilos, que en la actualidad se relacionan con procesos de alergia y asma (Vega *et al.*, 2011); linfocitos NK y los linfocitos T citotóxicos; ejerciendo todos una actividad tóxica frente a hongos, bacterias y microorganismos. Las catelicidinas proceden de una proteína precursora de 18 KDa conformada por dos dominios, son producidas por neutrófilos y distintas barreras epiteliales como la piel, las mucosas digestivas y respiratorias; después de la proteólisis que puede estimularse por acción de las citoquinas de la inflamación o distintos productos microbianos, la proteína precursora da lugar a dos péptidos funcionales con toxicidad frente a un amplio rango de microorganismos.

1.1.1.2.- Tipos celulares de la respuesta inmune innata

La mayoría de células que participan en este tipo de respuesta son producidas en la médula ósea y son transportadas a través del torrente sanguíneo hasta los tejidos donde actúan; se incluyen los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas.

Los **neutrófilos** o también leucocitos polimorfonucleares con el núcleo multilobulado conectado entre sí, presentan un diámetro de 12-15 μm y su función principal es la fagocitosis y la destrucción inicial de los microorganismos. Los neutrófilos albergan en su citoplasma dos tipos de gránulos, los específicos que contienen enzimas como la colagenasa, lisozima o elastasa; y gránulos azurófilos que son lisosomas que contienen enzimas y sustancias antimicrobianas. Este tipo celular presenta una vida media en sangre de 6 horas después mueren por apoptosis y son fagocitados por macrófagos residentes en hígado o bazo. Los neutrófilos migran hacia los focos de infección en pocas horas desde la entrada de los microorganismos al organismo, al penetrar en tejidos funcionan unas pocas horas y después mueren; la producción de neutrófilos se ve aumentada por la acción del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Los neutrófilos colaboran con plaquetas para atrapar y erradicar bacterias patógenas (Harding y Kubes, 2012).

Los **macrófagos** son los mediadores más antiguos de la inmunidad innata, proceden de un tipo de células que se encuentran en sangre periférica y no están del todo diferenciadas; son los monocitos con un diámetro de 10-15 μm , núcleo con forma arriñonada y un citoplasma con lisosomas, vacuolas fagocíticas y un citoesqueleto filamentoso. Al penetrar en tejidos las células

maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos específicos de tejidos reciben un nombre distinto como por ejemplo las células de Kupffer en el hígado que secretan interleuquinas (IL) y factor de necrosis tumoral (TNF) (Seki *et al.*, 2011), macrófagos alveolares en el pulmón, osteoclasto en hueso o los microglíocitos en el sistema nervioso central. Son las células efectoras dominantes en las últimas etapas de la respuesta inmunitaria innata. Los macrófagos tienen la capacidad de estimularse y producir distintas citoquinas en presencia de lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas (Rossol *et al.*, 2011).

Las **células citolíticas naturales o Natural Killer (NK)** son un subconjunto de linfocitos procedentes de la médula ósea que constituyen entre el 5% y 20% de las células mononucleares presentes en el bazo y en la sangre, no son frecuentes en otros órganos linfáticos periféricos. Sus precursores en la médula ósea tienen aspecto de linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos; no son linfocitos T ni B y no expresan receptores del antígeno de distribución clonal como las inmunoglobulinas o los presentes en linfocitos T. En la respuesta inmunitaria innata destruyen a células infectadas por microorganismos por la acción de mecanismos líticos y mediante la secreción de interferón (IFN- γ) que activa a los macrófagos para eliminar los microorganismos ingeridos. La activación de los linfocitos NK está regulada por un equilibrio entre los receptores activadores e inhibidores que reconocen moléculas sobre la superficie de otras células; las señales activadoras quedan bloqueadas por las señales inhibitoras con el fin de impedir el daño a células normales. El conjunto de receptores activadores de los linfocitos NK reconocen un grupo heterogéneo de ligandos que son expresados por células que están infectadas por virus (Vidal *et al.*, 2011) u otros microorganismos intracelulares o que están dañadas. Los linfocitos NK reconocen las células y destruyen aquellas que han quedado cubiertas por los anticuerpos, a dicho proceso se le conoce como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las citoquinas interleuquina 12 (IL-12) y la interleuquina 15 (IL-15) estimulan la proliferación y actividad de linfocitos NK; la IL-12 procede de los macrófagos e induce la producción de IFN- γ por parte del linfocito NK, la IL-15 se produce en macrófagos y en otros muchos tipos celulares y es un factor de crecimiento para las linfocitos NK. Las concentraciones elevadas de IL-2 también favorecen la actividad de este tipo de linfocitos (Zwiner y Domaica, 2010).

Los linfocitos NK destruyen las células infectadas a través de la acción de unos gránulos proteicos que se encuentran en su citoplasma, al activarse ocurre la exocitosis de las proteínas en las inmediaciones de las células diana. Existen dos tipos de proteínas en los gránulos una de ellas

es la perforina, que facilita la entrada de otras proteínas conocida como granzimas al citoplasma de las células diana; la granzimas son enzimas que activan la apoptosis en células diana (Wang y Weng, 2011).

Las **células dendríticas** derivan de precursores ubicados en la médula ósea, presentan propiedades fagocíticas y se encuentran en tejidos linfáticos, el epitelio de mucosas y el parénquima de los órganos. Tienen un importante papel en la respuesta inmunitaria innata a las infecciones y en su vinculación con la respuesta inmunitaria adaptativa ya que expresan receptores para el reconocimiento de patrones; además reconocen virus endocitados y producen interferones con potente actividad antivírica (Frank *et al.*, 2012). Existen dos subconjuntos de células dendríticas, las células dendríticas mielocíticas que tienen una alta capacidad de estimular respuestas intensas de los linfocitos T y las plasmocíticas, que presentan un aspecto similar a las células plasmáticas cuando se encuentran en estado inmaduro y al activarse adquieren aspecto dendrítico; se encuentran en la sangre en forma de precursores y en bajo número en los órganos linfáticos. Las células dendríticas inmaduras residentes en epitelios y tejidos captan antígenos de naturaleza proteica dándose la maduración de la célula dendrítica y los transportan hasta ganglios linfáticos de drenaje; este tipo de células presenta la capacidad de expresar dos tipos de receptores específicos en su superficie. Receptores de tipo *toll* que reconocen moléculas de origen microbiano y activan a linfocitos para que inicien su maduración y expresen citocinas (Schmid *et al.*, 2011). El receptor CCR7 específico de quimiocinas producidas en las zonas T de los ganglios linfáticos, también es expresado por linfocitos T vírgenes. La expresión de dicho receptor se debe a que las células dendríticas se activan debido a la presencia de microorganismos, la producción de citocinas a nivel local como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la pérdida de adhesión a los epitelios.

Las células dendríticas presentan características que las hacen ser las células presentadoras de antígenos más eficaces para desencadenar la respuesta primaria por parte de los linfocitos T:

- 1^a) Presentan una localización estratégica en los principales lugares de entrada de microorganismos y en órganos diana para microorganismos infecciosos.
- 2^a) Expresan receptores que les confieren la capacidad de capturar agentes extraños.
- 3^a) Migran preferentemente a zonas T de ganglios linfáticos en donde circulan los linfocitos T vírgenes en busca de antígenos extraños a los que unirse.

4ª) Las células dendríticas maduras expresan moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de los linfocitos T vírgenes.

Las células dendríticas Natural Killer (DCNK) parecen ser las principales fuentes iniciales de IFN-gamma en el comienzo de una infección con *L. monocytogenes*; las células DCNK a diferencia de células NK, presentan una gran producción temprana de la anterior molécula durante la infección (Plitas *et al.*, 2007).

1.1.1.3.- Inflamación

La inflamación es una compleja reacción en los tejidos vascularizados del sistema inmunitario, consiste en la acumulación y la activación de leucocitos y proteínas plasmáticas en un punto de infección, de exposición a toxinas o de lesión celular. La **inflamación inmune** es consecuencia de una respuesta inmunitaria adaptativa al antígeno. El infiltrado celular en el lugar de la inflamación contiene células del sistema inmune innato (neutrófilos y macrófagos) reclutados por acción de citoquinas producidas por linfocitos T. Los cambios que se producen en los leucocitos y en el endotelio vascular están mediados por las interacciones moleculares entre las moléculas de adhesión del endotelio (selectinas y ligandos de integrinas) y receptores específicos de los leucocitos (ligandos de selectinas e integrinas). Los leucocitos inactivados experimentan un proceso de rodamiento en el endotelio y tiene lugar las uniones entre los ligandos de selectinas del leucocito y las selectinas endoteliales; el rodamiento depende de las interacciones selectina-ligando pero en células T y eosinófilos puede originarse una unión y un rodamiento independiente a selectinas por unión de la integrina VLA-4 con la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1).

Los leucocitos se activan por acción de las quimiocinas, reordenan sus citoesqueletos y pasan a tener una forma más aplanada y mayor movilidad, lo que permite que las integrinas se unan a sus ligandos endoteliales.

A continuación se da una adherencia estable de los leucocitos al endotelio por medio de la unión de integrinas de gran afinidad a sus ligandos (molécula de adhesión intercelular ICAM-1 y molécula de adhesión vascular VCAM-1), cuya expresión aumenta por acción de las citoquinas de la inflamación.

En último lugar ocurre la transmigración de los leucocitos a través de las uniones entre las células endoteliales de la pared vascular. Una vez que el leucocito se encuentra en el tejido, migra empleando sus integrinas para introducirse en la red de fibrina o fibronectina formada a partir de las proteínas plasmáticas extravasadas.

En el proceso inflamatorio también participan los linfocitos T vírgenes, estos quedan retenidos en gran número en los ganglios linfáticos responsables de drenar un foco infeccioso o inflamatorio; los mecanismos responsables en esta retención pasajera de los linfocitos T son las citocinas del sistema inmunitario innato interferón (IFN) α y β . En la actualidad se ha confirmado la existencia de múltiples mecanismos para una elevada y rápida producción de IFN-gamma en infecciones con el patógeno intracelular *L. monocytogenes* (Bou Ghanem *et al.*, 2009). Se diferencian dos tipos de inflamación:

- Aguda

Su duración es relativamente corta (minutos, horas o días), se caracteriza por un inicio rápido, exudado de fluidos plasmáticos (proteínas, fibrinas y leucocitos) y migración de neutrófilos. Los neutrófilos son importantes fuentes de leucotrienos (LT) y prostaglandinas (PG) (Wright *et al.*, 2010); el LTB₄ se produce a partir del ácido araquidónico (ARA) por acción de las enzimas lipoxigenasas y es un quimioatrayente que promueve la adhesión y migración de neutrófilos (Hallett *et al.*, 2008); la PGE₂ también deriva del ARA pero por acción de la enzima ciclooxigenasa y tiene principalmente un efecto antiinflamatorio en neutrófilos y retrasando la apoptosis en los mismos (Ottonello *et al.*, 1998). Los neutrófilos sintetizan y secretan IL-8 en respuesta a múltiples estímulos tales como el TNF- α y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) (Fujishima *et al.*, 1993), además neutrófilos activados sintetizan IL-1, IL-1RA, IL-6, IL-12, TFG- β , TNF- α y oncostatina M (Cassatella, 1999; Cross *et al.*, 2004).

- Crónica

Puede durar semanas, meses o años; histológicamente se caracteriza por el infiltrado de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de fluido). Un aspecto importante es la diferenciación en los órganos linfáticos periféricos de los linfocitos T vírgenes a células efectoras, la salida de linfocitos activados se rige por la vía del 1-fosfato-esfingosina (S1P); se trata de un factor quimiotáctico lipídico que se encuentra en altas concentraciones en sangre, y se une a un receptor específico de linfocitos T acoplado a la proteína G (S1P1). Los linfocitos T efectoras expresan moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas que se unen a ligandos específicos de células endoteliales en focos inflamatorios periféricos. Las citocinas que participan en los procesos inflamatorios pueden resumirse en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como trabajos donde se estudian o cuantifican.

Citoquinas proinflamatorias	Fuente	Diana	Consecuencias biológicas	Citas
TNF-α	Macrófagos. Linfocitos T.	Células endoteliales. Neutrófilos. Hipotálamo. Hígado. Músculo. Muchos tipos celulares	Activación (inflamación y coagulación) fiebre y síntesis de proteínas de la fase aguda, catabolismo (caquexia) y apoptosis.	3,71,52, 252,241
IL-1	Macrófagos Células endoteliales Algunas células epiteliales.	Células endoteliales. Hipotálamo. Hígado.	Activación (inflamación y coagulación) fiebre y síntesis de proteínas de la fase aguda.	68, 196, 280
IL-2	Linfocitos T	Linfocitos T/B. Linfocitos NK.	Activación, proliferación, aumento de la síntesis de citocinas.	17, 81, 195, 317, 343
IL-5	Linfocitos T CD4+ TH2	Eosinófilos y linfocitos B.	Activación y aumento de la producción en eosinófilos y proliferación de linfocitos B.	136, 164, 290
IL-6	Macrófago células endoteliales Linfocitos T.	Hígado. Linfocitos B.	Síntesis de proteínas de la fase aguda y proliferación de linfocitos productores de anticuerpos.	130, 173, 234, 249, 308
IL-8	Macrófagos Células endoteliales Células epiteliales.	Neutrófilos. Células endoteliales. Macrófagos Mastocitos . Queratinocitos.	Quimiotaxis en neutrófilos y participación como mediador en la inflamación.	91, 216, 225, 226
IL-12	Macrófagos células dendríticas	Linfocitos T. Linfocitos NK.	Diferenciación a TH1 de linfocitos T, aumento de la actividad citotóxica y síntesis de IFN- γ .	87, 221, 241, 281
IFN-γ	Linfocitos NK Linfocitos T CD8+ TH1.	Macrófagos. Linfocitos T/B. Diversas células.	Activación de macrófagos, cambios de isotipo en linfocitos B y diferenciación a TH1	139, 211, 221, 241, 340

Abreviaturas: IFN- γ , interferón gamma.

Citocinas antiinflamatorias	Fuente	Diana	Consecuencias biológicas	Citas
IL-4	Linfocitos T CD4 ⁺ TH ₂ Mastocitos.	Linfocitos T/B. Macrófagos Mastocitos.	Cambio de isotipo en linfocitos B a IgE. Diferenciación de linfocitos T a TH ₂ . Inhibición de la activación de macrófagos por medio de IFN-γ. Proliferación (in vitro) de mastocitos.	65, 173, 217, 274, 296
IL-10	Macrófagos Linfocitos T (sobre todo reguladores)	Macrófago. Células dendríticas.	Inhibición de la síntesis de IL-12 y de expresión de coestimuladores del CPH de clase II.	218, 231, 315
IL-13	Linfocitos T CD4 ⁺ TH ₂ Linfocitos T NK Mastocitos.	Linfocitos B. Células epiteliales. Fibroblasto. Macrófagos.	Cambio de isotipo en linfocitos B a IgE. Aumento de la producción de moco en células epiteliales. Aumento de la síntesis de colágeno en fibroblastos y macrófagos.	92, 218, 273, 331
IL-19	Familia de citoquinas de IL-10.	Monocitos. Linfocitos T/B.	Estimulación de monocitos por acción conjunta junto a LPS o GM-CSF. Importante papel en enfermedades inmunes como el asma o la psoriasis.	8, 94, 129
IL-23	Macrófagos Células dendríticas.	Linfocitos T Linfocitos NK.	Inhibición de los linfocitos TH1. Síntesis de IFN-γ en linfocitos NK.	182, 200, 281
TGF-β	Linfocitos T Macrófagos Otros tipos celulares.	Linfocitos T/B Macrófagos Fibroblastos	Inhibición de la proliferación de funciones efectoras en linfocitos T. Inhibición de la proliferación y síntesis de IgA en linfocitos B. Inhibición de la activación de macrófagos. Aumento de la síntesis de colágeno en fibroblastos.	6, 19, 67

Abreviaturas: IFN-γ, interferón gamma. CPH, complejo principal de histocompatibilidad. Ig E, inmunoglobulina E. LPS, lipopolisacárido. GM-CSF, factor estimulador de las colonias granulocitos- monocitos. Ig A, inmunoglobulina A.

En el proceso de la inflamación también intervienen las **moléculas de adhesión**, que se encuentran en las superficies celulares y tienen como función favorecer las interacciones adhesivas con otras células sobre una matriz extracelular. Los leucocitos expresan diversos tipos de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y miembros de las superfamilias de inmunoglobulinas), estas tienen un papel decisivo en la migración y activación celular en las respuestas inmunes innata y adaptativa. Desde el punto de vista de los procesos inflamatorios e infecciosos las moléculas de adhesión más interesantes son las VCAM-1 o CD106 (Vanderstocken *et al.*, 2010) e ICAM-1 o CD45 (Shi *et al.*, 2010), ambas son consideradas marcadores de activación endotelial (Frijns *et al.*, 1997) y pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas con

dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina en número variable; son ligandos de integrinas permitiendo la adhesión entre leucocitos y endotelio. La selectina E o CD62E (Lee *et al.*, 2010), se expresa en células endoteliales activadas y pertenece a la familia de las selectinas con un dominio extracelular de tipo lectinas que le confiere la actividad adhesiva, tienen un papel fundamental en la unión de neutrófilos y linfocitos con el endotelio vascular.

Las **quimiocinas** (citocinas quimiotácticas) forman una amplia familia de proteínas de 8 a 10 Kda, sus funciones se relacionan con la motilidad celular durante el desarrollo, el mantenimiento tisular y tienen función quimioatrayente en respuestas inmunitarias e inflamatorias. La característica bioquímica común en este tipo de moléculas es la conservación de cuatro residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro; dependiendo de si las dos primeras cisteínas están juntas o separadas se originan dos tipos de familias. En las quimiocinas CC los residuos de cisteína se encuentran juntos, y en las CXC, las cisteínas están separadas por otro aminoácido; además existen dos quimiocinas que no se incluyen en las anteriores familias, la linfotactina y la fractalkina. Dentro de la familia de quimiocinas CC encontramos tres que están muy relacionadas con los procesos inflamatorios e infecciosos y tienen como función la atracción de poblaciones mixtas de leucocitos. La proteína inflamatoria de macrófagos 1- α CCL3 (**MIP-1 α**) (Narni-Mancinelli *et al.*, 2007) está producida por distintos tipos celulares como macrófagos (especialmente en presencia de endotoxinas bacterianas), células dendríticas y linfocitos; sus dianas son macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y fibroblastos; tiene como principal función el reclutamiento y activación de leucocitos polimorfonucleares; también induce la síntesis y liberación de otras citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α). La proteína quimioatrayente de monocitos 1 CCL2 (**MCP-1**) (Gu *et al.*, 1997) producida por macrófagos activados, monocitos, fibroblastos y queratinocitos; sus dianas son monocitos, células T, dendríticas, eosinófilos, basófilos y NK; su función principal es activar a monocitos para llegar a tejidos y dar macrófagos. La quimiocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación (**RANTES**) o CCL5 (Koppe *et al.*, 2012) es producido por linfocitos T, células endoteliales y plaquetas; se trata de una quimiocina para monocitos, células T, dendríticas, NK, basófilos y eosinófilos; también activa la desgranulación de granulocitos.

A nivel fisiológico en la respuesta inflamatoria se produce enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor, esta sintomatología refleja los tres tipos de cambios que se producen de forma coordinada en los vasos sanguíneos locales:

- a) Aumento del diámetro vascular y aumento del flujo local sanguíneo dando lugar al enrojecimiento y el calor.
- b) Activación de células endoteliales resultando en una mayor producción de citoquinas y moléculas de adhesión; de dicha forma se facilita la unión de leucocitos circulantes, su reclutamiento y activación. Esto conlleva la salida de neutrófilos al foco de la inflamación ayudando así a macrófagos locales en su función.
- c) Aumento de la permeabilidad vascular favoreciéndose la salida a los tejidos de células y proteínas que llegan al lugar de la inflamación donde se acumulan. En dicha etapa se produce la hinchazón y dolor.

1.1.2.- Inmunidad adaptativa o específica

Se trata de un tipo de inmunidad a cargo de los linfocitos y estimulada por la exposición a los agentes infecciosos, a diferencia de la inmunidad innata se caracteriza por una alta especificidad frente a las distintas macromoléculas, así como por su memoria o capacidad de responder con una mayor intensidad tras la exposición repetida al mismo patógeno. El sistema inmune adaptativo tiene la capacidad de reconocer y reaccionar frente a una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas, este tipo de inmunidad lleva a cabo tres estrategias para eliminar la mayoría de microorganismos en los casos de infección:

- Los anticuerpos segregados se unen a los microorganismos extracelulares, bloquean su capacidad para infectar las células del huésped favoreciendo así la ingestión por los fagocitos y su posterior destrucción.
- Los fagocitos ingieren a los microorganismos y los destruyen, los linfocitos T cooperadores fomentan sus capacidades microbicidas.
- Los linfocitos T citolíticos o citotóxicos (LTC) destruyen células infectadas que son inaccesibles a los anticuerpos.

Una de las principales características del sistema inmune adaptativo es la producción de una gran cantidad de linfocitos durante su maduración y tras recibir una estimulación antigénica, entre ellos elige a las células más aptas para combatir a los microorganismos infecciosos.

1.1.2.1.- Especificidad y diversidad en la inmunidad adaptativa

Es la responsable de que los distintos antígenos den lugar a respuestas específicas, también ocurre con distintas porciones de un complejo proteínico, un polisacárido o cualquier otro tipo de macromolécula. Cada linfocito expresa receptores de membrana capaces de distinguir entre pequeñas diferencias estructurales de antígenos distintos. El repertorio linfocítico es el número total de especificidades antigénicas que presentan los linfocitos de una sola persona, se estima que es capaz de distinguir entre 10^7 y 10^9 determinantes antigénicos diferentes. La diversidad permite que el sistema inmunitario responda a una amplia variedad de antígenos, surge de la variabilidad que posee la estructura de los lugares de unión antigénica en los receptores linfocíticos destinados a los antígenos.

1.1.2.2.- Memoria de la inmunidad adaptativa

La memoria da lugar a una amplificación de las respuestas después de producirse una reexposición al mismo antígeno. Las respuestas a una segunda exposición o sucesivas (respuestas inmunitarias secundarias) suelen ser más amplias y rápidas que la respuesta primaria al antígeno; cada exposición repetida a un antígeno amplía el clon de linfocitos específicos dirigidos contra el mismo. La estimulación de linfocitos vírgenes por un antígeno da lugar a células de memoria longevas con características especiales para aumentar la eficiencia en la respuesta inmune.

1.1.2.3.- Especialización en la inmunidad adaptativa

Genera respuestas inmunes óptimas diferentes y especiales para la defensa frente a diferentes tipos de microorganismos. Debido a dicha característica la inmunidad humoral y celular son estimuladas por distintos tipos de microorganismo patógenos o por las diferentes fases de la infección (intracelular o extracelular); cada tipo de respuesta inmunitaria protege al huésped de forma específica y concreta según el tipo de microorganismo o la fase de la infección.

1.1.2.4.- Contención y homeostasis de la inmunidad adaptativa

Esta característica permite al sistema inmunitario responder al contacto con antígenos nuevos. Las respuestas inmunitarias normales disminuyen con el paso del tiempo tras la estimulación con el antígeno, de esta forma el sistema inmunitario recupera su estado basal de reposo (**homeostasis**). La **contención** de las respuestas inmunitarias ocurre porque las reacciones que desencadenan los antígenos para su eliminación suprimen el estímulo necesario para la supervivencia y activación de los linfocitos, lo que da lugar a que estos mueran por apoptosis.

1.1.2.5.- Ausencia de autorreactividad en la inmunidad adaptativa

Es una de las propiedades más destacadas y evita la producción de lesiones en el hospedador durante las respuestas a los antígenos extraños. La insensibilidad inmunitaria se denomina tolerancia, la tolerancia frente a los antígenos propios o autotolerancia se conserva por diversos mecanismos; el objetivo es la eliminación, inactivación funcional o muerte de aquellos linfocitos que expresen receptores específicos frente a antígenos propios es decir que sean autorreactivos. Las **enfermedades autoinmunes** se originan de alteraciones que afectan a la inducción o a la conservación de la autotolerancia dando lugar a respuestas inmunitarias contra antígenos propios.

1.1.2.6.- Tipos celulares en la respuesta inmune adaptativa

Los **linfocitos** son las células encargadas del reconocimiento de antígenos extraños de forma específica y de la respuesta frente a ellos, son los mediadores de la inmunidad celular y humoral; existen dos poblaciones linfocitarias, los linfocitos B y los linfocitos T. Los **linfocitos B** son las únicas células productoras de anticuerpos; reconocen a los antígenos extracelulares y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, de esta manera actúan como mediadores de la inmunidad humoral. Las principales funciones efectoras de los linfocitos B son la neutralización de los microorganismos, la fagocitosis y la activación del sistema del complemento.

Los **linfocitos T** son células de la inmunidad celular, reconocen los antígenos de los microorganismos intracelulares, destruyen a dichos patógenos o a las células infectadas por los mismos y no producen anticuerpos. Las moléculas de membrana que reconocen a los antígenos para los linfocitos T, son distintos de estos pero con una estructura afín; además presentan una especificidad restringida hacia los antígenos, reconociendo y respondiendo a los antígenos de membrana de las superficies celulares pero esto no ocurre con antígenos solubles. Existen dos poblaciones bien caracterizadas de linfocitos T, los **linfocitos T cooperadores** y los **linfocitos T citolíticos o citotóxicos (LTC)**.

Los linfocitos T cooperadores tienen como funciones efectoras la activación de macrófagos, la inflamación y la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B; los LTC tienen como función efectora la destrucción de las células productoras de antígenos extraños, como son las infectadas por virus o por otros patógenos intracelulares.

Otras poblaciones linfocitarias son los **linfocitos T reguladores** que tienen como principal función la reducción y/o inhibición de la respuesta inmunitaria.; y los **linfocitos citolíticos**

naturales (NK) que presentan como función principal la inmunidad innata frente a virus y otros microorganismos intracelulares. Las distintas clases de linfocitos se distinguen por la expresión de proteínas de superficie denominadas moléculas CD que están numeradas.

Las **células presentadoras de antígenos (CPA)** en el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa llevan a cabo la captación de antígenos y su exposición ante unos linfocitos específicos; las más especializadas son las células dendríticas que atrapan a los antígenos microbianos procedentes del exterior, los transportan hasta los órganos linfáticos y los presentan ante linfocitos T vírgenes que desencadenan las respuestas inmunitarias. La activación de los linfocitos por parte de los antígenos da lugar a la puesta en marcha de numerosos mecanismos destinados a eliminarlos; las **células efectoras** tienen como función principal la eliminación de los microorganismos, dos ejemplos de células efectoras en sus distintas modalidades son los linfocitos T activados y los fagocitos mononucleares.

1.1.2.7.- Inmunidad celular

Los **linfocitos T cooperadores CD4** proliferan tras su activación y se diferencian en células efectoras con funciones que dependen de las citocinas segregadas. Como primera respuesta se secreta IL-2 que es un factor de crecimiento que actúa en linfocitos activados estimulando la expansión clonal de los mismos. Parte de la descendencia se diferencia a células efectoras con distintas funciones y citocinas secretadas, estas células abandonan los órganos linfáticos y se dirigen a focos de infección asociados a inflamación. Cuando estas células efectoras diferenciadas se encuentran de nuevo con los microorganismos asociados a las células, se activan para la eliminación de las mismas. Algunos linfocitos T cooperadores CD4 secretan IFN- γ que es un potente activador de macrófagos y estimula en estos la producción de sustancias microbicidas; también pueden secretar citocinas que estimulan la producción de inmunoglobulina E (Ig E) que activa a eosinófilos para eliminar parásitos demasiado grandes cuando la fagocitosis no es efectiva. Además este tipo de linfocitos pueden estimular las respuestas de los linfocitos B.

Los **linfocitos T CD8** activados proliferan y se diferencian a LTC que destruyen células con microorganismos en su interior (virus o bacterias ingeridas por macrófagos que escapan de vesículas fagocíticas y llegan al citoplasma); con la desaparición de células infectadas los LTC eliminan los reservorios de la infección.

1.1.2.8.- Inmunidad humoral

Se trata de un tipo de respuesta inmunitaria adaptativa mediada por los anticuerpos producidos por los linfocitos B, siendo el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos y sus toxinas. Los linfocitos B se activan, proliferan y se diferencian a células secretoras de anticuerpos que cumplen distintas funciones; la respuesta de los linfocitos B a los antígenos proteínicos requiere de una señal activadora por parte de los linfocitos T CD4. Tras la ingestión y degradación de los antígenos proteicos por parte de los linfocitos B; estos exponen sus péptidos ligados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) para que sean reconocidos por los linfocitos T cooperadores, que finalmente activan a los propios linfocitos B. Parte de la descendencia de los clones expandidos de los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos; los lugares de unión de los anticuerpos coinciden con los lugares de unión iniciales del linfocito B al antígeno. La **maduración de la afinidad** es un proceso que mejora la calidad de la respuesta inmunitaria humoral, ocurre cuando los linfocitos T cooperadores estimulan la producción de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno. La activación inicial de los linfocitos genera células de memorias longevas que sobreviven años después de la infección, es lo que se conoce como **memoria inmunológica**; estas células poseen una amplia reserva de linfocitos específicos frente a un antígeno y responden con mayor rapidez y eficacia que las células indiferenciadas.

Los linfocitos B inmaduros son transportados a través de la sangre desde la médula ósea hasta la pulpa roja del bazo, en este órgano maduran hasta convertirse en linfocitos B foliculares o linfocitos B de la zona marginal. Los primeros migran hacia la pulpa blanca por un proceso dependiente de integrinas en la que está implicada de manera directa la quimiocina CXCL13; una vez completada la maduración en la pulpa blanca esplénica regresan a la circulación alojándose en ganglios linfáticos y tejidos linfáticos de mucosas. Cuando los linfocitos B vírgenes entran en el estroma de los órganos linfáticos secundarios viajan hasta los folículos donde se encuentran con antígenos y quedan activados. Las subpoblaciones de linfocitos B que expresan determinados tipos de anticuerpos emigran desde los órganos linfáticos secundarios hacia los tejidos específicos, de tal forma los linfocitos B activados segregan diferentes tipos de anticuerpos denominados isotipos con diversas funciones efectoras. Se debe destacar que los linfocitos B secretores de IgG son atraídos por diversos tejidos hacia los focos de inflamación crónica atribuyéndose también la unión de VLA-4, VCAM-1 y CXCL10 entre otras quimiocinas en la superficie endotelial de los mismos. Los **anticuerpos** son producidos por linfocitos B y células plasmáticas en los órganos

linfáticos y la médula ósea, después entran en la sangre y se dirigen a lugares donde hay antígenos. La mayoría de anticuerpos en el suero tienen una vida media de tres semanas, pero ciertas células plasmáticas pueden emigrar a la médula ósea y vivir durante años sin dejar de producir anticuerpos en concentraciones bajas. Estos anticuerpos secretados por células longevas proporcionan una respuesta inmediata frente a una reexposición al microbio (memoria inmunológica). Los anticuerpos sintetizados en los tejidos linfáticos asociados a las mucosas son transportados a través de las barreras epiteliales a hacia la luz de los órganos mucosos.

Los polisacáridos y los lípidos estimulan la producción de inmunoglobulina M (IgM), los antígenos proteínicos según los linfocitos T cooperadores pueden estimular la producción de IgG, IgA o IgE.

Este tipo de respuesta combate a los microorganismos patógenos de múltiples formas; los anticuerpos IgG suelen recubrir a los microorganismos “marcándolos” antes de su fagocitosis, ya que los neutrófilos y macrófagos (fagocitos) expresan receptores para las colas de las IgG. La mayor parte de la IgG del suero de un individuo normal es secretada por células productoras de anticuerpos de vida larga, que son inducidas por la exposición a diversos antígenos a lo largo de la vida del individuo. Algunos anticuerpos presentan unas funciones determinadas especiales en puntos anatómicos concretos, como son los casos de la IgA y la IgG.

La IgA suele encontrarse también en los epitelios mucosos y se encarga de neutralizar microorganismos a la luz de las vías respiratorias o el tubo digestivo entre otras ubicaciones. La IgG pasa al feto por transporte activo a través de la placenta con la finalidad de proteger al recién nacido hasta que madure su sistema inmunitario.

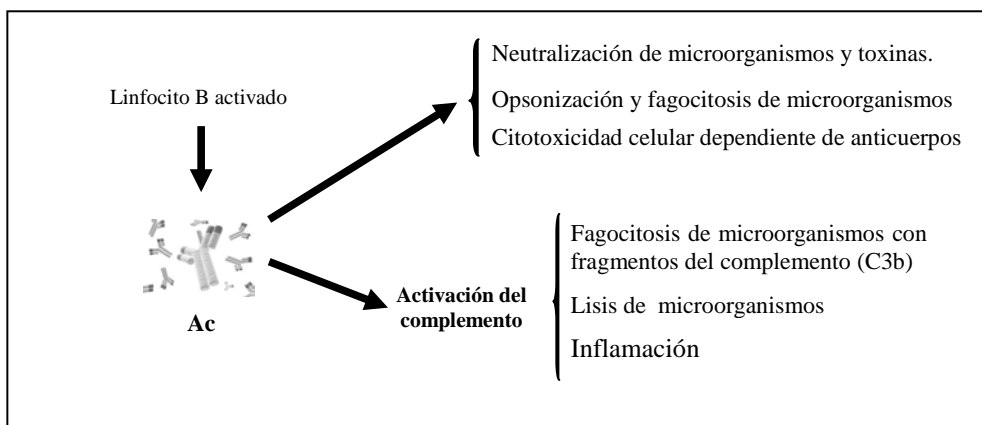


Figura 1. Funciones efectoras de los anticuerpos (Ac) producidos por los linfocitos B, dichas funciones efectoras pueden ser llevadas a cabo por distintos isotipos de anticuerpos. Adaptado de Abbas, Lichtman y Pillai (Inmunología celular y molecular, 6ª edición).

Los anticuerpos contra los microorganismos y las toxinas microbianas se encargan de bloquear la unión de los mismos a los receptores celulares, inhibiendo o “neutralizando” así la infección por parte de los microorganismos. La mayor parte de los anticuerpos neutralizantes en la sangre son del isotipo IgG e IgA en el caso de los órganos mucosos; los más eficaces son aquellos que presentan una alta afinidad por el antígeno. Aunque muchas de las funciones efectoras de los distintos anticuerpos son mediadas por las regiones constantes de las cadenas pesadas, todas ellas se desencadenan por la unión de los antígenos a las regiones variables. Las funciones de los distintos isotipos de los anticuerpos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las principales funciones de los diferentes isotipos de anticuerpos.

Isotipo	Funciones principales
IgA	Subdividida en IgA ₁ e IgA ₂ , en la circulación en forma de monómero. Inmunidad de las mucosas, secreción en forma de dímero en el epitelio de la luz de los aparatos digestivo y respiratorio, también en las lágrimas y la leche materna. Activación del complemento por la vía de la lecitina o por la vía alternativa.
IgD	Monómero que actúa como receptor antigénico de linfocitos B vírgenes cuando actúa como anticuerpo de membrana.
IgE	Desgranulación de los mastocitos en reacciones de hipersensibilidad inmediata. Predomina en la respuesta alérgica y frente al ataque de parásitos.
IgG	Monómeros IgG ₁ (altas cantidades en suero), IgG ₂ , IgG ₃ e IgG ₄ . Opsonización de antígenos para la posterior fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos. Activación de la vía clásica del complemento. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por linfocitos NK y macrófagos. Paso de los anticuerpos de la madre a través de la placenta y del intestino en la inmunidad neonatal (IgG ₁ e IgG ₃) Inhibición por retroalimentación (Feed-back negativo) de la activación de los linfocitos B.
IgM	En suero forman pentámeros con diez sitios de unión al antígeno. Activación de la vía clásica del complemento. Receptor antigénico de los linfocitos B vírgenes cuando actúa como anticuerpos de membrana.

Abreviaturas: Ig, inmunoglobulina; NK, natural killer.

En la **opsonización y fagocitosis mediada por anticuerpos**, los anticuerpos del isotipo IgG “recubren” (opsonizan) a los microorganismos estimulando su fagocitosis al unirse a receptores de Fc sobre los fagocitos. Este tipo de receptores estimulan la fagocitosis de partículas opsonizadas y liberan señales que estimulan las actividades microbicidas de los leucocitos; dentro del tipo de los receptores Fc los más importantes son los receptores para las cadenas pesadas de los anticuerpos IgG, son los receptores Fcγ y existen tres tipos (FcγRI, FcγRII y FcγRIII). Los linfocitos NK y otros leucocitos se unen a las células recubiertas de anticuerpos mediante los receptores de Fc y las destruyen, es lo que se conoce como **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)**. La unión de las células diana al receptor FcγRIII activa al linfocito NK y este sintetiza y libera citocinas como el IFN-γ.

1.2.- Familias lipídicas

1.2.1.- Familias lipídicas

Los ácidos grasos (tracilglicéridos), son moléculas que constan de cadenas hidrocarbonadas y un grupo carboxilo siendo las unidades básicas de los lípidos saponificables. La clasificación de los mismos atiende a la presencia o ausencia de dobles o triples enlaces, los **ácidos grasos saturados** son aquellos que no presentan ningún tipo de doble ni triple enlace; los **ácidos grasos insaturados** se clasifican en dos tipos, i) **ácidos grasos monoinsaturados** (poseen un único doble enlace) y ii) **ácidos grasos poliinsaturados** (presentan múltiples dobles enlaces).

Los ácidos grasos poliinsaturados conocidos también como **PUFA's** (del inglés *polyunsaturated fatty acids*) se clasifican en tres importantes familias atendiendo a la posición y número de los dobles enlaces contenidos, de dicha forma las tres principales familias: **ácidos grasos ω -3 (n-3)** la posición del primer doble enlace se encuentra entre los carbonos tres y cuatro de la cadena hidrocarbonada; **ácidos grasos ω -6 (n-6)** presentan el primer doble enlace entre los carbonos seis y siete; y **ácidos grasos ω -9 (n-9)** con el primer enlace doble entre los carbonos nueve y diez de la cadena hidrocarbonada.

Dentro del conjunto de los ácidos grasos, los procedentes de animales son de naturaleza saturada algunos ejemplos son el ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) o el ácido esteárico (18:0); los ácidos grasos procedentes de vegetales suelen ser de naturaleza insaturada. Existen dos ácidos grasos denominados esenciales al no poder sintetizarlos *de novo* el organismo a partir de otros ácidos grasos y han de ser aportados con la dieta, ya que el ser humano carece de las enzimas Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa (presentes en muchas plantas) para la inserción de enlaces dobles en las posiciones n-3 y n-6, son el **ácido linoleico** de la serie n-6 (18:2n-6) y el **ácido α -linolénico** de la serie n-3 (18:3n-3). El ácido linoleico suele estar presente en aceites de maíz, girasol y azafrán, el ácido α -linolénico se encuentra en el aceite de linaza. La deficiencia en estos ácidos grasos afecta a la fisiología de multitud de células y tejidos, especialmente a las de origen nervioso (McNamara *et al.*, 2010; Lands, 2012); también esta deficiencia produce una disminución en el peso del bazo y el hígado así como una supresión de la respuesta inmune celular acompañada de una disminución en la producción de anticuerpos. Estos ácidos grasos están implicados en la biosíntesis de biolípidos (prostaglandinas y leucotrienos) que participan en la inflamación. A partir de estos ácidos grasos esenciales el cuerpo humano si puede sintetizar otros por medio de rutas de biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados.

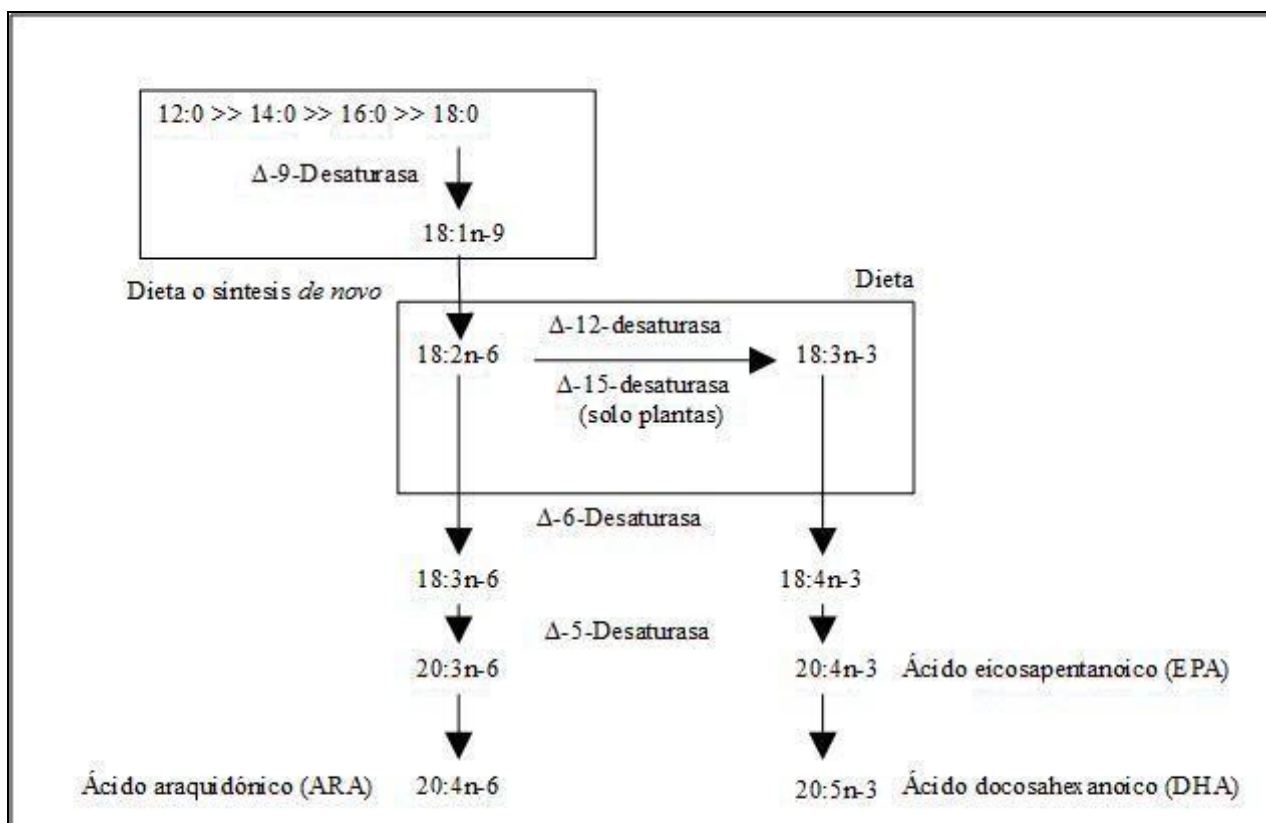


Figura 2. Ruta de biosíntesis de los principales ácidos grasos poliinsaturados a partir de ácidos grasos esenciales (ácidos linoleico y α -linolénico) que son ingeridos a través de la dieta ya que solo pueden ser sintetizados por plantas, donde están presentes las enzimas Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa. Adaptado de Calder, Field y Gills (Nutrición y función inmune, 2002).

Dentro de los grupos de ácidos grasos poliinsaturados citados anteriormente se pueden clasificar los aceites que compondrán las dietas lipídicas en el presente trabajo. Para evitar la deficiencia de ácidos grasos esenciales la dieta control contiene un contenido del 5% en **aceite de maíz**, ya que este aceite es rico en ácido linoleico (n-6) (59 %), ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (n-9) (24%) y en menor medida en ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico) (13 %), también se caracteriza por la presencia de α -tocoferol (vitamina E). Otro de los aceites empleados es el **aceite de girasol** en cuya composición también podemos encontrar ácido linoleico (n-6) en torno a un 63 %, ácido oleico (n-9) un 21 % y hasta un 12 % de grasas saturadas (ácidos palmítico y esteárico). Estos dos aceites son claros representantes del tipo de grasa presente en las dietas occidentales de países como Estados Unidos, donde otros tipos de aceites no están presentes de la forma que estos lo están.

Como grasas representativas de la dieta mediterránea se ha empleado el aceite de oliva en dos variedades, virgen extra y virgen extra ecológico. El **aceite de oliva virgen extra** se constituye principalmente de ácido oleico (n-9) (55-83 %), ácido linoleico (n-6) (3,5-21 %) y

entorno a un 20 % de ácidos grasos saturados. El **aceite de oliva virgen extra ecológico** se caracteriza porque su aceituna cumple los requisitos del cultivo ecológico y es recogida en el momento óptimo de su maduración (enero), a diferencia del aceite de oliva virgen extra la aceituna es molida el mismo día que se recoge. El aceite de oliva ecológico solo es producido en aquellas almazaras autorizadas para la elaboración del mismo, bajo condiciones de cultivo ecológico establecidas por la entidad u organismo certificador que deben cumplirse y someterse a un control periódico como son:

- Mantenimiento de una adecuada cubierta vegetal en el olivar para evitar la erosión del suelo.
- Manejo del suelo con un laboreo reducido con aportes adecuados de materia orgánica, no se emplea ningún tipo de tratamiento químico.
- Máximo aprovechamiento de los aportes de las aguas de las precipitaciones debido a un adecuado manejo del sistema agua-suelo.
- Se restringe el uso de productos químicos y fitosanitarios en el control de plagas y enfermedades con el fin de disminuir la cantidad de contaminantes en el medio ambiente y en los alimentos.

El **aceite de pescado** contiene un alto contenido en ácidos grasos de cadena larga (n-3), 8-15 % de DHA, 10-15 % de EPA y 2-4 % de ácido octadecatetraenoico entre otros en menor proporción. En la década de los años setenta se descubrió la influencia del aceite de pescado en el sistema inmunológico de humanos y animales debido a su alto contenido en ácidos grasos n-3; a día de hoy es empleado en proporciones adecuadas en emulsiones lipídicas para nutrición enteral.

1.2.2.- Deficiencias lipídicas e inmunidad

La hipolipidemia o disminución de los niveles de lípidos en sangre es una de las principales consecuencias de los estados de malnutrición, esto puede inducir un proceso de inmunodeficiencia secundaria. Los ácidos grasos tienen un papel clave en la modulación de las propiedades estructurales y funcionales a nivel celular; la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana determina su fluidez, función y transporte (Stubbs y Smith, 1990).

En los últimos años son numerosos los estudios que han demostrado la influencia de las deficiencias en ácidos grasos esenciales (linoleico y α -linolénico) sobre el sistema inmune de

humanos y animales (Lands, 2012; Palsdottir *et al.*, 2011), haciendo especial mención en como la proporción en el consumo entre las cantidades de ácidos grasos ω -3 y ω -6 afecta a parámetros inmunológicos (Malaisse *et al.*, 2009; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002) y en procesos tumorales (Kang y Liu, 2012). Estudios realizados en poblaciones de esquimales de Groenlandia entre los años 1950 y 1970 demostraban la baja incidencia de procesos inflamatorios (Kromann y Green, 1980) y de enfermedades isquémicas del corazón (Kromhout, 1989), debido a un alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 contenidos en el aceite de pescado; ya que uno de los constituyentes principales de las dietas esquimales es el pescado crudo. Posteriores estudios han demostrado que dietas con un alto contenido en ácidos grasos ω -3 se relacionan con un aumento de la susceptibilidad a infecciones tales como *Mycobacterium tuberculosis* (Bonilla *et al.*, 2010a) o *Listeria monocytogenes* (Puertollano *et al.*, 2001b).

1.3.- Consecuencias biológicas

1.3.1.- Mecanismos de los ácidos grasos para modular las funciones inmunes

Los ácidos grasos contenidos en las dietas lipídicas pueden modular la función inmune y consecuentemente la respuesta inflamatoria (de Pablo y Álvarez de Cienfuegos, 2000), a través de alteraciones en la estructura y composición de la membrana; además pueden modificar funciones y señales de proteínas y eicosanoides así como cambios en la expresión de genes.

1.3.1.1.- Alteración en la fluidez de membrana (presentación de antígenos y transducción de señales)

La activación de las células inmunes resulta en la síntesis *de novo* y un incremento de la translocación en los fosfolípidos de membrana (Jackson *et al.*, 2008). La fluidez de membrana que es un importante regulador del proceso de fagocitosis se determina por: i) los componentes lipídicos y ii) la composición de ácidos grasos.

La función inmune depende de la interacción entre los distintos tipos celulares implicados en la respuesta inmunológica a través del efecto en la composición de la membrana, los ácidos grasos aportados en la dieta tienen gran influencia en dichas interacciones (Küllenberg *et al.*, 2012).

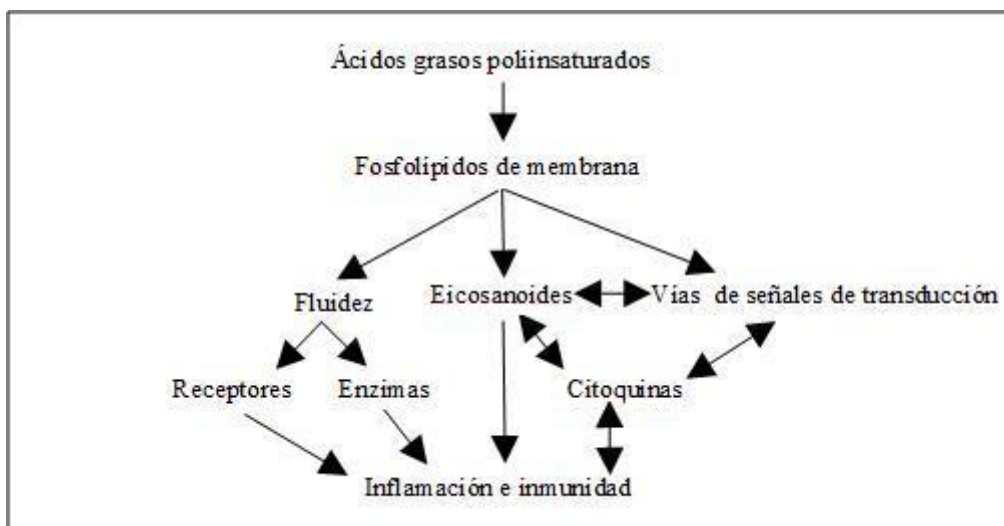


Figura 3. Mecanismos por los que los ácidos grasos poliinsaturados pueden ejercer efectos en la inflamación y sistema inmune (Calder y Grimble, 2002).

Cambios en las estructuras de las membranas lipídicas celulares pueden modular la actividad de proteínas que se encuentran en las mismas y actúan como canales iónicos, moléculas de adhesión, transportadoras, receptoras, involucradas en señales de transducción o enzimas. La unión de las citoquinas a sus receptores también puede verse alterada por estos mismos motivos (Gupta *et al.*, 2012). Los lípidos de fuentes endógenas o exógenas afectan a multitud de rutas de señalización por la acción de múltiples mecanismos; muchas de las moléculas de señalización se generan en los fosfolípidos de membrana y estos a su vez regulan la actividad de proteínas que están involucradas en la respuesta celular inmunológica influenciando en el patrón de liberación de los ácidos grasos de los linfocitos (Hsueh *et al.*, 2011).

1.3.1.2.- Formación de peróxidos lipídicos (estrés oxidativo)

Desde hace tiempo se sabe que la oxidación de los ácidos grasos de la serie n-3 es más rápida que los de la serie n-6, hecho que podría aumentar la susceptibilidad de las membranas a la peroxidación lipídica (Romieu *et al.*, 2008). El aumento del riesgo de oxidación por el consumo de ácidos grasos n-3, se puede contrarrestar con el consumo de antioxidantes en la dieta (vitamina E) o acompañado con ácidos grasos como los contenidos en el aceite de oliva (n-9) que además posee diversas sustancias polifenólicas de capacidad antioxidante (oleuropeína, α-tirosol,...). Actualmente son diversos los estudios que demuestran las propiedades antioxidantes del ácido oleico en animales (Al-Shudiefat *et al.*, 2013) y en cultivos celulares (Sarriá *et al.*, 2012).

1.3.1.3.- Regulación en la formación de eicosanoides

Los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos) son moléculas bioactivas con un papel clave entre ácidos grasos, inflamación y función inmune; son sintetizados a partir de ácidos grasos de veinte átomos de carbono partiendo de los precursores que son el ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6), el ácido araquidónico (20:4n-6) y el ácido eicosapentanoico (20:5n-3).

Las dos mayores vías para la síntesis de eicosanoides son las de dos enzimas distintas: la i) lipoxigenasa (LOX) y la ii) cicloxigenasa (COX). El ácido araquidónico en las membranas celulares es movilizado por varias fosfolipasas de las cuales la más importante es la fosfolipasa A2. Los ácidos grasos poliinsaturados ingeridos en la dieta influyen directamente en las rutas de biosíntesis de los mismos, sobre los leucotrienos (Hagi *et al.*, 2010; Stanke-Labesque *et al.*, 2008); sobre prostaglandinas (Viau *et al.*, 2012) y sobre tromboxanos (Ewart *et al.*, 2002).

Dentro de la clasificación de los ácidos grasos, el que presenta mayor importancia como sustrato para la formación de mediadores inflamatorios es el ARA (20:4n-6) que es el precursor de dos importantes moléculas bioactivas como son la prostaglandina E2 (PGE2) y el leucotrieno B4 (LTB4), ambas implicadas directamente en la respuesta inmunológica. El precursor del ARA que es el ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6) (DGLA) por acción de otras lipoxigenasas y cicloxigenasas distintas a las de la ruta del ARA da lugar a otras series distintas de mediadores inflamatorios. El EPA (20:5n-3) de forma independiente da lugar a otras series de leucotrienos y prostaglandinas.

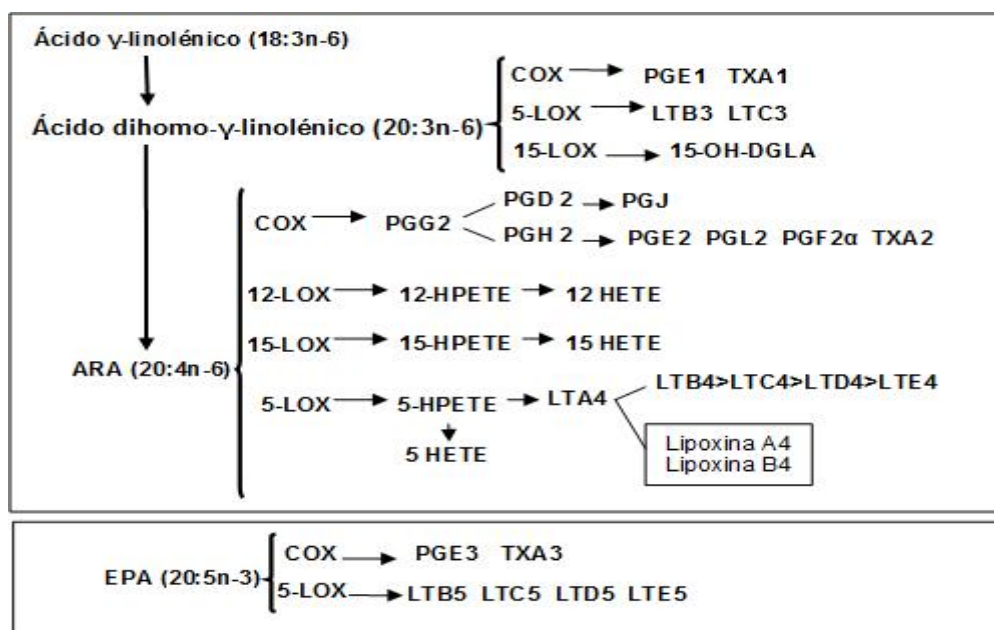


Figura 4. Rutas de biosíntesis de eicosanoides a partir del EPA y ARA. Abreviaturas COX: ciclooxigenasa, LOX: lipoxigenasa; HETE: Ácido hidroxieicosatetraenoico; HETE: Ácido hidroperoxieicosatetraenoico; PG: prostaglandina; LT: leucotrieno; TX: tromboxano. Adaptado de Calder, Field y Gills (Nutrición y función inmune, 2002).

1.3.1.4.- Modificación en la expresión génica

Los ácidos grasos poliinsaturados regulan la expresión de una variedad de genes codificados por proteínas reguladoras con un papel clave en las rutas metabólicas de hepatocitos y adipocitos (Schmidt *et al.*, 2012). Los ácidos grasos poliinsaturados regulan la expresión de los genes de citoquinas, moléculas de adhesión, enzimas ciclooxigenasa (COX) y óxido nítrico sintasa, y otras proteínas inflamatorias (de Mello *et al.*, 2009; Weaber *et al.*, 2009).

Todas estas regulaciones a nivel génico son llevadas a cabo a través de la regulación en la transcripción del factor nuclear kappa beta (NFκB). Este factor es activado por disociación y fosforilación de la subunidad inhibitoria kappa B, y el dímero que queda libre es traslocado directamente al núcleo celular donde actúa sobre los genes. Diversos estudios afirman que una dieta rica en aceite de pescado (alto contenido en ácidos grasos n-3) afecta a la actividad del NFκB disminuyendo la producción de mediadores inflamatorios (Mbodji *et al.*, 2013).

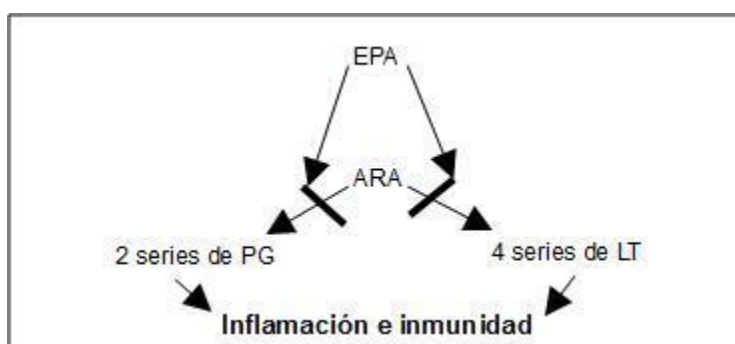


Figura 5. Inhibición de la producción de mediadores inflamatorios derivados del ARA por acción del EPA. Abreviaturas: EPA (ácido eicosapentaenoico), ARA (ácido araquidónico), PG (prostaglandinas), LT (leucotrienos).

Un segundo grupo de factores de transcripción con un papel importante en la inflamación son los receptores activados para la proliferación de peroxisomas (PPAR's), de los que existen dos principales que son el PPAR α y el PPAR γ con funciones en el hígado y en el tejido adiposo respectivamente. Los PPAR's inducen una β -oxidación peroxisomal que da lugar a una disminución de los eicosanoides inflamatorios; además pueden actuar como activadores o antagonistas de otros factores de transcripción donde se incluye el NFκB (Zuñiga *et al.*, 2011). El EPA y el DHA son considerados agonistas del PPAR- α e inhibidores de la capacidad de unión del NFκB al ADN (Adkins y Kelley, 2010). Recientes estudios en el campo de la endocrinología señalan a la hormona tiroidea como potente modulador del metabolismo lipídico y establecen una relación con la regulación de PPAR (Souza *et al.*, 2011). Otros estudios afirman que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 disminuyen la función de células dendríticas mediante la inhibición

del NfκB y la activación del PPAR-γ, ya que tiene un papel clave en la maduración de las células dendríticas (Draper *et al.*, 2011).

Algunos de los fosfolípidos que se encuentran en las membranas plasmáticas celulares tales como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI), la fosfatidilcolina (PC) o la fosfatidilserina (PS), se hidrolizan por acción de las fosfolipasas dando lugar a un segundo mensajero que es el diacilglicerol (DAG) o el fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). El DAG se encarga de la activación de la proteína intracelular protein quinasa C (PKC) responsable de las señales de transducción; el IP₃ produce un incremento del ión Ca²⁺ a nivel intracelular que hace que este se una a la proteína calmodulina formando complejos que activan a enzimas importantes implicados en la activación de factores de transcripción.

En la actualidad son diversos los estudios que relacionan también el NFκB con el desarrollo de procesos tumorales (Xiao y Fu, 2011), recientemente se ha descubierto la regulación del NFκB a través de las telomerasas que se reactivan en procesos oncológicos (Ghosh *et al.*, 2012). El PPARγ es objetivo de multitud de estudios relacionados con mecanismos de resistencia a fármacos en células tumorales (Cizkova *et al.*, 2012); se ha descubierto también como objetivo terapéutico en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (Spaner *et al.*, 2013).

1.3.1.5.- Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo celular con un importante papel en la modulación de la función inmune. En la actualidad son numerosos los estudios que demuestran la acción apoptótica de los ácidos grasos tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. Debe destacarse también el importante papel de la peroxidación lipídica en la inducción del proceso de apoptosis. Desde hace tiempo se conoce el efecto apoptótico del ácido palmítico (ácido graso saturado), sobre cultivos celulares por disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), (de Pablo *et al.*, 1999), actuando directamente sobre la mitocondria. A nivel *in vitro* se ha constatado que los ácidos grasos de la serie n-3 producen una inhibición del crecimiento y tienen un efecto apoptótico en células de cáncer de colon (Fasano *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Un reciente estudio demuestra la capacidad antifúngica de ciertos ácidos grasos a través del proceso de apoptosis en levaduras (Thibane *et al.*, 2012). A nivel *in vivo* existen estudios relacionando la apoptosis y los ácidos grasos en el desarrollo cerebral de rata (Tuzun *et al.*, 2012), cáncer de páncreas en ratón (Song *et al.*, 2011) y en tejido mamario de ratón (Sun *et al.*, 2011). Actualmente los estudios se centran en la apoptosis como mecanismo efectivo contra el cáncer y los procesos de metástasis (Ichihara *et al.*, 2011).

Respecto a la relación entre apoptosis y ácidos grasos monoinsaturados de la serie n-9 que son los mayoritarios en el aceite de oliva, también se aborda desde un punto de vista oncológico como es el grado de apoptosis que produce en células procedentes de cáncer de mama (Solanas *et al.*, 2010) y en linfocitos de ratón con daño pulmonar (Bi *et al.*, 2010).

1.3.2.- Modulación de la microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal de mamíferos es uno de los ecosistemas más poblado del planeta albergando a más de 800 especies distintas de bacterias, la mayoría se encuentran en el colon; los dos tipos de bacterias dominantes en el mismo son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Estudios demuestran la relación existente entre los ácidos grasos poliinsaturados, probióticos y microbiota intestinal (Laparra y Sanz, 2010), el perfil consumido de ácidos grasos puede dar lugar a cambios en la composición de la microbiota intestinal (Alcock *et al.*, 2012). Un reciente estudio demuestra cambios importantes a nivel de la microbiota intestinal de ratones tratados a una dieta rica en ácidos grasos saturados (Liu *et al.*, 2012a), y se tiene constancia de que un elevado consumo de ácidos poliinsaturados de la serie n-3 producen un incremento de las especies de lactobacilos y bifidobacterias en la microbiota intestinal (Pachikian *et al.*, 2011).

Los ácidos grasos de la dieta comienzan a llevar a cabo sus efectos moduladores al momento de ingerirse, en la cavidad orofaríngea los productos derivados de los ácidos grasos por acción de las lipasas eliminan patógenos potenciales y previenen la formación de biofilms orales; en el estómago los ácidos grasos y monoglicéridos aumentan la acidez inhibiendo el crecimiento de bacterias, virus y parásitos; en el intestino delgado los ácidos grasos producen una disminución del pH evitando así la sobrepoblación y colonización bacteriana; finalmente en el intestino grueso los metabolitos de ácidos grasos de cadena corta impiden el paso de patógenos a lugares de unión en células epiteliales. Un estudio demuestra la modulación del perfil de ácidos grasos en el tejido hepático y adiposo a través de la modulación inducida por la dieta en el metabolismo de la microbiota intestinal (Wall *et al.*, 2009). En otro estudio con una dieta compuesta por aceite de oliva y extractos secos y refrigerados vegetales, diseñada para tener un fuerte efecto en la composición de la microbiota intestinal, se consiguió reducir el desarrollo intestinal de adenomas en ratones reduciéndose de esta forma la carcinogénesis (Mai *et al.*, 2007). Uno de los motivos de la modulación de la microbiota intestinal es el tratamiento de ciertas patologías que guardan una estrecha relación con la composición de la microbiota intestinal, como la obesidad (Farias *et al.*, 2011) o la diabetes (Musso *et al.*, 2011).

1.3.3.- Funciones del sistema inmune moduladas por los ácidos grasos

Diversos estudios confirman el efecto modulador que producen los ácidos grasos sobre la función inmune (de Pablo y Álvarez de Cienfuegos, 2000; Galli y Calder, 2009). Uno de los parámetros de mayor importancia en la respuesta inmunológica es la inflamación, que también tiene un importante papel en la modulación ejercida por los ácidos grasos (Calder y Grimble, 2002; Calder, 2006) incluso a nivel genético (Weaver *et al.*, 2009). Los dos ácidos grasos que principalmente van a modular las funciones del sistema inmune son el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA) ambos de la serie n-3, son los componentes mayoritarios del aceite de pescado; los estudios atribuyen a estas propiedades inmunosupresoras (Fritsche *et al.*, 2000) siendo poco efectivos en situaciones de infección (Irons *et al.*, 2003). Los ácidos grasos contenidos en el aceite de oliva no son tan desfavorables en los estados de inmunosupresión e infección (Puertollano *et al.*, 2007; Al-Shudiefat *et al.*, 2013).

1.3.2.1.- Proliferación de linfocitos

La linfoproliferación o proliferación de linfocitos B y T es uno de los parámetros más estudiados en inmunología para observar el tipo de depleción ejercida sobre la respuesta humoral o celular; a nivel *in vitro* se emplea un estímulo para la activación de los linfocitos y la posterior proliferación, los más empleados son mitógenos que producen una activación policlonal:

- Concanavalina A (Con A) o fitohemaglutinina (PHA), activación de células T.
- Lipopolisacárido de pared bacteriana de *E. coli* (LPS), activación de linfocitos B.
- Pokeweed mitogen (PWM), activa tanto a linfocitos T como a B.

Los linfocitos T son muy eficaces en la identificación de células infectadas y coordinando una respuesta inmune efectiva contra patógenos; los linfocitos T se activan cuando el antígeno se le presenta es asociación de moléculas del MHC o cuando es transportado desde el sitio de la infección hacia órganos linfoides periféricos. La proliferación de células T requiere de muchos estímulos procedentes de las glicoproteínas de superficie (CD80, CD85 o CD28) de células presentadoras de antígenos. Existen tres eventos claves que preceden a la activación de los linfocitos T: i) el incremento de Ca^{2+} intracelular, ii) cambios en el pH y iii) cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

Los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 ejercen un efecto inmunosupresor sobre linfocitos T CD4 (Shaikh *et al.*, 2012). Además, se ha descubierto que una supresión a nivel de la

sinapsa inmunológica imposibilita la translocación mitocondrial disminuyendo la entrada de Ca^{2+} en las células T e impidiendo su activación (Yog *et al.*, 2010). Las células dendríticas maduras son potentes activadores de células T, un estudio refleja este hecho relacionándolo con las capacidad inmunosupresora de los ácidos grasos de la serie n-3 (Brix *et al.*, 2010); otros trabajos muestran la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados de influenciar los microdominios de membrana o balsas lipídicas (Brassard *et al.*, 2007), y la regulación de linfocitos T reguladores a través del PPAR γ (Iwami *et al.*, 2011). El carácter inmunosupresor de estos ácidos grasos los hace candidatos a tener un papel importante en enfermedades inflamatorias (Bassaganya-Riera y Hontecillas, 2010; Wood *et al.*, 2011). En la inmunidad humoral la unión de las inmunoglobulinas (IgM o IgD) con el antígeno (epítipo del microorganismo) complementario y el reconocimiento por el Th CD4 de dicho complejo, inicia la proliferación de las células B. La interacción entre linfocitos B y la respuesta de células T cooperadoras (Th):

- i) Los antígenos se unen a receptores de la inmunoglobulina de células B.
- ii) Las células B expresan en su superficie secuencias del péptido patógeno y moléculas del MHC de clase II.
- iii) Las células cooperadoras T CD4 se unen al complejo anterior (péptido y MHC) y manda señales para la activación de células B a través de citoquinas secretadas y la expresión de la molécula de superficie CD40.
- iv) El resultado es la expansión clonal de las células B y la secreción al plasma de inmunoglobulinas con la misma especificidad de las células B.

Existen estudios basados entre la interacción entre ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y cuantificación de la estimulación de células B a través de la expresión de sus receptores de superficie (Rockett *et al.*, 2010); recientemente se ha descubierto dos proteínas implicadas en la regulación de los linfocitos B, la CD20 y la CD23. Estas proteínas son sometidas a un proceso de modificación post-transcripcional reversible denominado S-palmitilación (Ivaldi *et al.*, 2012). En la actualidad un estudio ha demostrado la activación a través del aceite de pescado y LPS de las células B con un aumento de tamaño en las balsas lipídicas de membrana (Rockett *et al.*, 2012), pero con una supresión en la activación de células T CD4 transgénicas inmaduras; otro estudio del mismo autor corrobora el hecho de que las balsas lipídicas sean susceptibles de modificarse a través de los ácidos grasos de la serie n-3 (Rockett *et al.*, 2011). La interacción entre ambos tipos de linfocitos es de vital importancia en el conjunto de la inmunidad adaptativa.

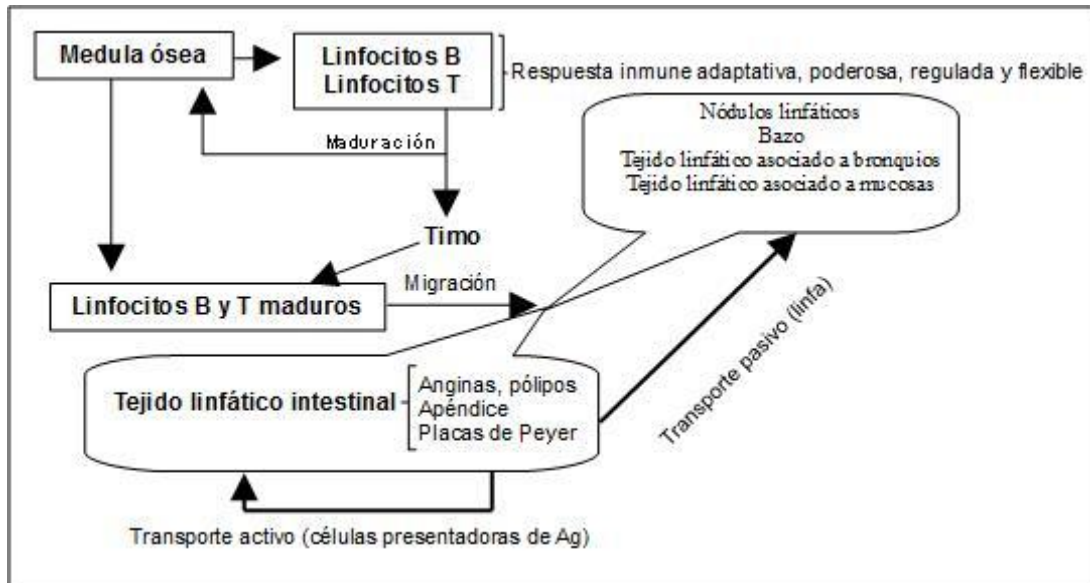


Figura 6. Relación existente entre los linfocitos y tejidos involucrados; como consecuencia de la circulación constante de los linfocitos T y B los tejidos corporales están bajo una continua vigilancia inmunológica de patógenos invasores. Abreviaturas: Ag (antígeno). Adaptado de Huston, 1997.

1.3.2.2.- Producción de citoquinas

El sistema inmunológico como consecuencia de un proceso infeccioso activa a los linfocitos T cooperadores CD4 o *helper* y esto genera dos tipos de respuestas denominadas Th1 y Th2. La diferenciación de los precursores de células Th está determinada por factores ambientales y genéticos en el momento del reconocimiento del antígeno por las células T, pero el factor más potente es el ambiente local de citoquinas presentes en el momento de la activación. Los virus y las bacterias promueven la diferenciación a la respuesta Th1 y los helmintos y alérgenos promueven Th2. Durante la activación del sistema inmune las células liberan citoquinas y otros mediadores solubles implicados en la señalización celular y en la modificación del metabolismo; son las interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de crecimiento (GF), factores estimuladores de colonias (CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

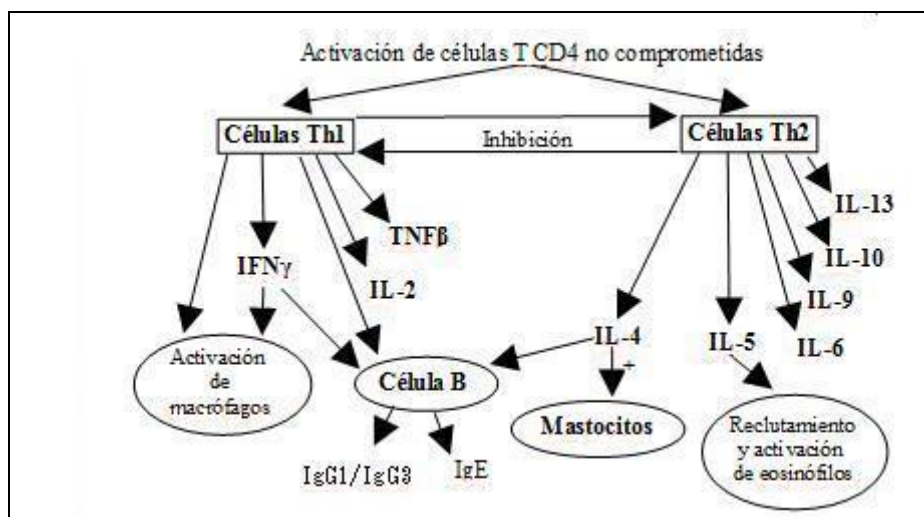


Figura 7. Diversidad funcional de las células Th. Abreviaturas: IL (interleuquina), TNF (Factor de necrosis tumoral), IFN (Interferón), Ig (inmunoglobulina). Adaptado de Abbas *et al* 1996; Mosmann y Sad, 1996).

La IL-6 y TNF α junto a la IL-1 forman el grupo de las citoquinas proinflamatorias siendo mediadores importantes en el proceso de la inflamación, la producción de estas citoquinas se ve incrementada rápidamente después de un trauma o la invasión del organismo por patógenos; son responsables de síntomas como la fiebre, la producción de proteínas de fase aguda o la inmunomodulación. Los estudios en animales afirman que un aumento en la ingesta de EPA y DHA producen un aumento de los niveles de IL-1 y de la respuesta de tejidos a las citoquinas (Grimble y Tappia, 1998), en cambio el ARA reduce la expresión de la misma (Bousserouel *et al.*, 2003); recientes estudios confirman que el EPA suministrado en la nutrición parenteral produce una disminución de la IL-6 y el TNF a nivel de hepatocitos y macrófagos mayor que el ARA (Hao *et al.*, 2010); otro estudio que compara el efecto entre las dietas orientales (aceite de oliva) y las occidentales (mayor contenido en ácidos grasos saturados), una combinación de aceite de oliva y nueces en el desayuno no aumenta los niveles de ARN mensajero del TNF α y la IL-6 en células mononucleares de sujetos sanos (Jiménez-Gómez *et al.*, 2009).

La administración oral de ácido oleico (n-9) y ácido linoleico (n-6) tienen la capacidad de modular la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos de rata disminuyendo la producción de IL-1 β e IL-6 (Magdalon *et al.*, 2012); en cambio el ARA tiene la capacidad de potenciar la inflamación produciendo un incremento de la IL-6 y el TNF α en células endoteliales (Grenon *et al.*, 2012) y un aumento en la adhesión de los monocitos a las mismas.

Actualmente el aceite de oliva virgen extra ha mostrado efectos antiinflamatorios en marcadores biológicos relacionados con la aterosclerosis produciendo una disminución de la IL-6 y los receptores de TNF a corto y largo plazo (Urpi-Sardá *et al.*, 2012). Las propiedades

antiinflamatorias asociadas al ácido oleico y otros componentes polifenólicos presentes en el aceite de oliva se han empleado en el tratamiento de patologías tales como enfermedades inflamatorias intestinales (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2010), reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF α e IFN γ) en comparación con el aceite de girasol; en procesos alérgicos (Yamada *et al.*, 2008) inhibiendo la producción de IL-4 y TNF α en células RBL-2H3; en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Lou-Bonafonte *et al.*, 2012) y en procesos infecciosos (Puertollano *et al.*, 2007).

Se ha demostrado la acción beneficiosa de la suplementación de ácidos grasos de la serie n-3 en el tratamiento de enfermedades respiratorias y procesos alérgicos infantiles (Shek *et al.*, 2012); además los ácidos grasos de la serie n-3 tienen la capacidad de mejorar la defensa del hospedador ante una exposición secundaria con el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* en un modelo murino (Cruz-Chamorro *et al.*, 2011). Este hecho puede deberse a un incremento de la respuesta Th1 (Figura 7).

1.3.2.3.- Actividad de células Natural Killer (NK)

Las células NK (*Natural Killer*) o también conocidas como linfocitos NK se encuentran en la circulación y en el bazo y tienen la función de eliminar células infectadas por virus o que han sido transformadas, esta función la llevan a cabo a través de la inmunidad innata y no a través de la adaptativa, ya que no se activan por antígenos específicos y no está regulada su función a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Uno de los aspectos que se debe destacar es la reducción de la funcionalidad de este tipo de células con el envejecimiento así como la capacidad citotóxica de las mismas. Uno de los mecanismos empleados por las células NK para la eliminación de otras células transformadas, es la secreción de la enzima perforina que abre poros en las membranas plasmáticas celulares, estudios recientes confirman este hecho (Hazeldine *et al.*, 2012).

En los últimos años son numerosos los estudios que relacionan la actividad de las células NK con diferentes marcadores de superficie, un ejemplo es el marcador CD57 presente en células NK altamente diferenciadas (Gayoso *et al.*, 2011) y el receptor activador NKp46 que es el encargado de activar la lisis en células diana después de su dimerización (Jaron-Mendelson *et al.*, 2012); desde que en 1997 Alessandro y Lorenzo Moretta identificaron el NKp46 en los siguientes años se identificaron otros dos receptores naturales de citotoxicidad el NKp44 en el año 1998 y el NKp30 en 1999 (Moretta *et al.*, 2000; Brusilovsky *et al.*, 2012), al parecer estos receptores son los

responsables de que las células NK diferencien entre células sanas y transformadas o infectadas por virus.

Actualmente son numerosos los estudios que se publican relacionando las células NK con otros eventos inmunológicos. Un estudio relaciona la actividad de las células NK con el estrés oxidativo y niveles elevados de la IL-6 y el TNF α (Kaszubowska *et al.*, 2011); recientemente se ha publicado que el desarrollo de las células NK también es regulado por el ligando de quimiocinas CXCL12 y su receptor principal CXCR4 (Noda *et al.*, 2011).

La relación que existe entre los ácidos grasos de la dieta y las células NK se ha estudiado desde años atrás. Los primeros estudios que datan del año 1988 mostraban una relación inversamente proporcional entre la cantidad total de grasa en la dieta y la actividad de las células NK, es decir un incremento en la cantidad de grasa ingerida en la dieta resulta en una disminución de la actividad que desarrollan las células NK (Barone y Hebert, 1988; Hebert *et al.*, 1990). En este mismo año otras investigaciones demostraban el carácter inmunosupresor del EPA sobre las células NK a nivel *in vitro* e *in vivo* (Yamashita *et al.*, 1988) y la disminución de la actividad de células NK al aumentar la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) en ratones envejecidos a los que se les había suministrado EPA y tocoferol (Meydani *et al.*, 1988). En los siguientes años se confirma los efectos inmunosupresores del EPA y el DHA conjugados con triacilglicerol (TG) sobre las células NK (Yamashita *et al.*, 1991; Hamazaki, 1992), estudios animales en bazo de rata demostraron la modulación de la actividad de las células NK a través del leucotrieno B4 (LTB4) y el ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) producido por macrófagos (Chang *et al.*, 1991), esto reveló la implicación de los productos de la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX) en el metabolismo del ARA (Cifone *et al.*, 1993). En 1994 un estudio de la universidad de Oxford establecía los efectos producidos por diferentes tipos de dietas lipídicas sobre la función de las células NK, los ácidos grasos monoinsaturados contenidos en una dieta confeccionada con aceite de oliva producía una menor actividad de las células NK (Yaqoob *et al.*, 1994); dos años más tarde el mismo grupo de investigación demostraba que el ácido oleico era el responsable de la modulación producida por el aceite de oliva comentada anteriormente (Jeffery *et al.*, 1996). Años más tarde han afirmado que los ácidos grasos monoinsaturados tienen un efecto inmunosupresor menor que el aceite de pescado (n-3) sobre la actividad de las células NK (Yaqoob *et al.*, 1998).

En 1995 un trabajo comenzaba a relacionar el papel inmunomodulador de los ácidos grasos n-3 y la función de las células NK en pacientes con tumores sólidos (Gogos *et al.*, 1995). Los primeros estudios basados en el efecto de los ácidos grasos sobre células NK en humanos

comenzaron a realizarse a finales del siglo pasado, el resultado era la inhibición de las mismas por parte del DHA (Kelley *et al.*, 1999), sin embargo otro estudio afirmaba que la suplementación con EPA y no con otros ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 o n-6, tenía efecto inmunosupresor sobre las células NK en sujetos sanos mayores de 55 años (Thies *et al.*, 2001). Nuestro grupo de investigación demostró el papel inmunosupresor de las dietas lipídicas (especialmente la basada en aceite de pescado) sobre las células NK en ratones a los que se le habían un linfoma murino (Puertollano *et al.*, 2001a).

Debido al claro efecto inmunomodulador de los ácidos grasos sobre las funciones inmunes, las investigaciones comenzaron a centrarse en el efecto de la composición de ciertas fórmulas empleadas en la nutrición enteral sobre la actividad de las células NK (Sakurai *et al.*, 2006). En los últimos años las investigaciones se encaminan en conocer los mecanismos moleculares y genéticos por los cuales los ácidos grasos poliinsaturados modulan la actividad de las células NK (Mukaro *et al.*, 2008; Fernandes, 2008; Salinthonne *et al.*, 2011), para ello también se han empleado modelos de infección experimental con virus como el de la *Influenza* (Schwerbrock *et al.*, 2009), inducción de linfomas y trasplante de células cancerígenas en animales (Johansson *et al.*, 2010; Goldfarb *et al.*, 2012) y en infecciones bacterianas (Puertollano *et al.*, 2004a; Girardi *et al.*, 2011).

1.3.2.4.- Presentación de antígenos

La presentación de antígenos es la exhibición de los péptidos ligados a moléculas del MHC sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos (CPA) que permite el reconocimiento específico por los receptores de linfocitos T (LTR) y la activación de los linfocitos T. Las CPA son células que exhiben sobre su superficie fragmentos peptídicos de los antígenos proteínicos asociados a moléculas del MHC y activan a linfocitos T específicos del antígeno, también expresan moléculas coestimuladoras para la óptima activación de los linfocitos T. Las CPA profesionales son los linfocitos T cooperadores indiferenciados, células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B y macrófagos; estas células expresan moléculas del MHC de clase II y coestimuladores. Estudios pioneros implicaban en el proceso de presentación del antígeno por parte de los macrófagos y monocitos a la PGE2 y al IFN γ (Zlotnik *et al.*, 1985; Kunkel *et al.*, 1986), los estudios indicaban que el IFN γ además de promover otras acciones inmunológicas favorecía la presentación de antígenos en monocitos (Klein *et al.*, 1990) y la PGE2 inhibe la capacidad de presentación de antígenos de macrófagos intraperitoneales (Ertel *et al.*, 1993).

En 1992 se demostró que el ácido eicosapentanoico conjugado con triacilglicerol (EPA-TG) tenía la capacidad de inhibir la función de células presentadoras de antígenos en esplenocitos murinos (Fujikawa *et al.*, 1992). Más tarde un estudio relacionaba la malnutrición proteino-energética y la capacidad de presentación de antígenos de macrófagos intraperitoneales; ratones que se habían alimentado con una dieta baja en proteínas (2,5% de caseína) presentaban deficiencias en los componentes de la presentación de antígenos de macrófagos intraperitoneales durante una infección experimental con *Mycobacterium* (Redmond *et al.*, 1995). A finales de la década de los noventa aparecieron estudios que ratificaban la acción inmunosupresora de los ácidos poliinsaturados de la serie n-3 sobre la presentación de antígenos, el EPA y DHA inhiben la expresión de moléculas del MHC de clase II y del IFN γ que es el responsable de activar a monocitos que presentan antígenos (Hughes y Pinder, 1997) y también la disminución en la actividad de presentación de antígenos de células dendríticas en ratas (Sanderson *et al.*, 1997). En el año 2007 un trabajo implicaba a la proteína kinasa C Δ como estimuladora del proceso de presentación de antígenos a través de moléculas del MHC de clase II en células dendríticas murinas (Majewski *et al.*, 2007).

Recientemente algunos estudios han mostrado el carácter protector de los ácidos monoinsaturados del aceite de oliva en células presentadoras de antígenos comparado con otros ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, que afectan a la composición de triglicéridos de las deposiciones lipídicas (Shaikh *et al.*, 2008). Un año antes este mismo investigador publicó un trabajo donde explicaba la inmunosupresión ejercida por los ácidos grasos en el proceso de presentación de antígenos a través de moléculas del antígeno leucocitario humano de clase I (HLA I) (Shaikh y Edidin, 2007). Un trabajo de un grupo de científicos de las universidades de Shanghai y Baltimore han demostrado que el consumo de una dieta con un alto contenido en ácidos grasos saturados o monoinsaturados induce la depleción de células NK hepáticas, resultando en un empeoramiento en la presentación de antígenos por parte de hepatocitos a células NK (Hua *et al.*, 2010).

1.3.2.5.- Producción de anticuerpos

Dicha acción es llevada a cabo por acción de los linfocitos B con el objetivo principal de neutralizar y eliminar a los antígenos responsables de poner en marcha la producción de anticuerpos. Otro tipo de moléculas con un importante papel en este proceso son las citoquinas producidas por los linfocitos T cooperadores (T helper), ya que estas promueven la proliferación

de linfocitos B y activan las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. La capacidad de los ácidos grasos de modular las funciones inmunológicas implica que la producción de inmunoglobulinas también se vea afectada por la acción que ejercen los mismos.

Los primeros estudios que relacionan este hecho datan del año 1982 relacionándose el consumo de una dieta rica en EPA con un aumento en la producción de las inmunoglobulinas (IgE e IgG) (Prickett *et al.*, 1982). A lo largo de los años ochenta la bibliografía que hace mención a esta relación es escasa, en 1991 un estudio examina la influencia del ácido α -linoleico en el perfil de inmunoglobulinas séricas de humanos inmunocompetentes; el resultado fue de ausencia de cambios en las concentraciones de las mismas (Kelley *et al.*, 1991). Fritsche y colaboradores realizaron un estudio sobre la influencia de los ácidos grasos poliinsaturados sobre diversos parámetros inmunológicos, entre otros evaluaron la respuesta primaria de anticuerpos de ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta de pescado o una control y con distintas concentraciones de α -tocoferol acetato (vitamina E); se observó que la respuesta primaria de anticuerpos era mayor en ratas alimentadas con una dieta de aceite de pescado y 900 mg/Kg de vitamina E (Fritsche *et al.*, 1992). El mismo autor si encontró en otro trabajo en aves de corral destinadas al consumo humano, una disminución de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en esplenocitos del 50% en aves que habían sido alimentadas con dietas basadas en el aceite de soja o pescado comparadas con las que habían sido alimentadas con aceite de maíz o manteca (Fritsche y Cassity, 1992). Tres años más tarde otro estudio evaluó la acción de los ácidos grasos de la dieta sobre la modulación de los nucleótidos de la respuesta inmune humoral; ratones alimentados con una dieta libre de nucleótidos y de alto contenido en grasas saturadas producían más anticuerpos *in vivo* pero el aumento en la producción de anticuerpos inducido por los nucleótidos era menos eficiente comparado con otras dietas (Jyonouchi *et al.*, 1996).

Con el paso del tiempo y con la mejora de la tecnología los trabajos han ido evolucionando con mayor grado de sofisticación. En 1996 un trabajo reflejó los cambios en la producción de inmunoglobulinas en células B de esplenocitos procedentes de ratas Sprague-Dawney alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos de la serie n-3 y lectinas (Lim *et al.*, 1996); el resultado fue la fuerte inhibición de la producción de IgA e IgM y débilmente la IgG. Un estudio muestra cambios a nivel del ADN encargado de la producción de anticuerpos en ratones con un modelo experimental de lupus sistémico eritematoso y alimentados con ácidos grasos de la serie n-3 (Reifen *et al.*, 1998). Un estudio a comienzos de la década anterior examina la influencia de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 en la respuesta de anticuerpos de gallinas

(Parmentier *et al.*, 2002).

Recientemente un trabajo estudia la influencia del consumo maternal de aceite de pescado o de linaza en la respuesta de anticuerpos de ratones neonatos, el resultado es una reducción en dicha respuesta por parte del consumo de aceite de pescado pero no con la de aceite de linaza (Lauritzen *et al.*, 2011). Actualmente no existen muchos estudios que relacionen los ácidos grasos monoinsaturados y la producción de anticuerpos así como el efecto comparado de los mismos con otros tipos de ácidos grasos, esta es la dirección en la que han de encaminarse las investigaciones en el futuro.

1.4.- Consecuencias clínicas

Después de haber establecido la relación existente entre los ácidos grasos y determinados parámetros inmunológicos, y siendo evidente el efecto modulador de aquellos sobre los mismos; a continuación vamos a describir la utilidad desde el punto de vista clínico-hospitalario de los efectos producidos por los ácidos grasos a nivel inmunológico. Determinadas enfermedades se caracterizan por presentar desordenes inflamatorios que pueden ser modulados por la acción inmunosupresiva de los ácidos grasos (Wanten y Calder, 2007); en los casos de pacientes inmunocomprometidos por una inmunosupresión inducida o secundaria (quimioterápicos, VIH, etc) los efectos inmunosupresores anteriormente citados pueden dar lugar a un incremento de la susceptibilidad a los agentes infecciosos, aunque determinados ácidos grasos presentan efectos menos negativos (Puertollano *et al.*, 2007). Hoy día los ácidos grasos se emplean en la elaboración de fórmulas destinadas a la nutrición enteral y parenteral, se conocen como emulsiones lipídicas. La composición de las mismas no es la misma en todos los casos, pero si mantienen un equilibrio en la ratio de ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6 para no producir desequilibrios en el organismo. Debemos destacar que el ácido oleico presente en el aceite de oliva se emplea en la formulación de algunas emulsiones lipídicas.

1.4.1.- Ácidos grasos, inmunidad e infección

Al cabo de los años y tras muchas investigaciones se ha establecido que el estado nutricional determina el grado de inmunocompetencia del organismo; mientras una nutrición adecuada con los correctos niveles de vitaminas y nutrientes da lugar a un correcto funcionamiento del sistema inmune, los estados de malnutrición da lugar a un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas por un incorrecto funcionamiento inmunológico. Las investigaciones con el transcurso de los años se han realizado sobre variedad de ácidos grasos los

más citados son ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (DHA y EPA en aceite de pescado), n-6 (ARA en aceite de girasol), ácidos grasos saturados (grasas de origen animal) y ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico en aceite de oliva).

Una de las consecuencias directas es la reducción o supresión de ciertos mediadores inflamatorios, por dicho motivo algunos han sido aplicado en el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunes (Ruggiero *et al.*, 2009) que conllevan desordenes inflamatorios con el inconveniente de que pueden reducir la inmunidad celular frente a patógenos (de Pablo *et al.*, 2000).

1.4.1.1.- Bacterias

Los estudios animales alimentados con dietas lipídicas y bacterias Gram negativas.

Tabla 3. Breve revisión bibliográfica de los efectos promovidos por algunas dietas lipídicas sobre animales de experimentación tras la infección con diferentes bacterias Gram negativas.

Patógeno	Animal	Dieta lipídica	Resultados	Citas
<i>Escherichia coli</i>	Rata	10% Aceite de pescado 10% Aceite de maíz	Menor composición de lípidos totales y triglicéridos en hígado de ratas sépticas alimentadas con 10% aceite de pescado.	170
<i>Salmonella enteritidis</i> (LPS)		13.5% Aceite de pescado + 1.5% Aceite de girasol, 15% Aceite de girasol.	PUFAs ω -3 disminuyen la mortalidad y la homeostasis de la glucosa en el shock endotóxico en ratas lactantes de 10 días de edad.	79
<i>Escherichia coli</i>		Emulsiones lipídicas NTP, 20% Intralipid, 20% Lipofundina, 20% Clinoleic	Ninguna emulsión parece tener ventajas sobre las otras, pero la basada en aceite de oliva preserva el sistema de fagocitos mononucleares.	97
<i>Salmonella enterica</i> serovar enteritidis	Gallina Lohmann blanca	Ácido caproico (ácido graso de cadena media)	Disminución de la expresión de genes de virulencia y de la invasión de células del epitelio intestinal	307
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ratón C57BL/6	Dieta ω -3 y dieta ω -6	La dieta ω -3 mejora la respuesta del hospedador a la infección pulmonar, el DAFC y el aglutinamiento de células inflamatorias	235
<i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Ratón BALB/c	10% Aceite de atún 10% aceite de sunola	Aumento de los niveles de PUFAs ω -3 en tejidos orales y disminución en la pérdida de hueso alveolar en la periodontitis.	16
<i>Helicobacter pylori</i>	Ratón C57BL/6	DHA 50 μ M	DHA inhibe la colonización intestinal de <i>H. pylori</i> y disminuye la respuesta inflamatoria del hospedador.	49

Abreviaturas: PUFAs (*Polyunsaturated Fatty acids*, ácidos grasos poliinsaturados); NTP (Nutrición Total Parenteral); DAFC (*Distal Alveolar Fluid Clearance*, Aclaramiento en fluido alveolar distal); DHA (Ácido docosahexanoico).

Los estudios animales con dietas lipídicas y bacterias Gram positivas.

Tabla 4. Breve revisión bibliográfica de los efectos promovidos por algunas dietas lipídicas sobre animales de experimentación tras la infección con diferentes bacterias Gram positivas.

Patógeno	Animal	Dieta lipídica	Resultados	Citas
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Rata Fischer	Dietas semipurificadas con restricción calórica	La restricción calórica aumenta la actividad fagocítica de macrófagos alveolares y mejora la resistencia a la infección, pero suprime la producción de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico y el TNF α .	70
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ratón C3H/H	20g/Kg de etil-ester de oliva, EPA+DHA; y 180g/Kg de otra dieta de aceite de pescado.	EPA y DHA empeoran de forma significativa la respuesta de IL-12 e IFN γ en ratones sometidos a infección experimental.	87
	Ratón BALB/c	20% Aceite de pescado, 20% Aceite de oliva, 20% Aceite de coco.	Aumento del número de células peritoneales y de la supervivencia en la dieta de coco, la dieta de pescado y oliva muestran un mayor aclaramiento bacteriano a las 96 horas.	63
		18% Aceite de pescado	PUFAs n-3 no afectan al desarrollo y función <i>in vivo</i> de células T de memoria y efectoras CD4 y CD8 específicas de <i>Listeria</i>	138
	Ratón BALB/c	20% Aceite de pescado, 20% Aceite de oliva, 20% Aceite de coco.	Aumento de la secreción de IL-12p70 en ratones alimentados con aceite de pescado, aumento del TNF α en la dieta de coco y reducción en las tres dietas del IFN γ .	241
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ratón C57BL/6 y Ratón Ob/Ob	Dieta alta en grasas (35 % en grasa) y dieta baja en grasas (4%).	Ratones alimentados con la dieta alta en grasas muestran un aumento de la mortalidad ante una septicemia posiblemente por una supresión de la función inmune.	291

Abreviaturas: TNF (factor de necrosis tumoral), EPA (ácido eicosapentanoico), DHA (ácido docosahexanoico), IL (interleuquina), IFN (interferón), PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados).

1.4.1.2.- Virus

Tabla 5. Breve revisión bibliográfica de los efectos promovidos por algunas dietas lipídicas sobre animales de experimentación tras la infección con diferentes virus.

Patógeno	Animal	Dieta lipídica	Resultados	Citas
<i>Coxsackievirus B5</i>	Ratón C57BL/6	Dieta alta en grasas (18% grasa)	El aumento de colesterol hepático aumenta la susceptibilidad y mortalidad de ratones a la infección viral, con una disminución del aclaramiento viral en sangre y una respuesta defectuosa de macrófagos y monocitos.	37
<i>Mouse hepatitis virus 3 (MHV3)</i>	Ratón A/J	Dieta de alto contenido en grasas hipercolesterolémica	Ratones alimentados con la dieta con hepatitis aguda, altos recuentos virales en hígado con focos necróticos y altos niveles de transaminasas en suero.	28
<i>Virus hepatitis B (VHB)</i>	Ratón transfectado	Dieta baja en proteínas (contenido de caseína reducido 6%).	Ratones alimentados con menor contenido de proteínas muestran una inhibición en el crecimiento de hepatocarcinoma hepático inducido por el VHB.	45
<i>Virus Influenza</i>	Ratón BALB/c	Dieta de aceite de pescado y dieta de mezcla de grasa de res animal.	Ratones alimentados con aceite de pescado reflejan una supresión de la citotoxicidad de células T pulmonares específicas frente al virus y un incremento de la respuesta proliferativa.	33
<i>Reovirus tipo 1 Lang</i>	Ratón B6C3F1	Dieta control y dieta enriquecida con aceite de pescado.	La dieta de DHA no altera la mucosa o la respuesta sistémica de Ig al virus, pero retrasa su aclaramiento del tracto gastrointestinal.	15
<i>Virus Influenza</i>	Ratón C57BL/6	Dieta control y dieta rica en aceite de pescado.	El consumo de aceite de pescado en ratones agrava la infección con el virus y aumenta la susceptibilidad de padecer otras infecciones virales.	272
		Dieta baja en grasas (10,5% de grasas) y dieta alta en grasas (58% de grasas)	Incremento de la morbilidad y mortalidad durante una infección viral secundaria con un empeoramiento en el mantenimiento de la respuesta de células T de memoria específicas, en ratones con obesidad inducida.	153
<i>Norovirus murino</i>	Ratón C57BL/6	Dieta de alto contenido en grasas (58,9%)	La infección no afecta a la homeostasis de la glucosa en ratones alimentados con una dieta que induce obesidad y resistencia a la diabetes a corto plazo.	229
<i>Virus H1N1 2009</i>	Ratón C57BL/6	Dieta de alto contenido en grasas que induce obesidad.	La respuesta frente al virus puede verse comprometida a causa de la obesidad con un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en tejido pulmonar y un aumento de la mortalidad	158

1.4.1.3.- Parásitos

Tabla 6. Breve revisión bibliográfica de los efectos promovidos por algunas dietas lipídicas sobre animales de experimentación tras la infección con diferentes parásitos.

Patógeno	Animal	Dieta lipídica	Resultados	Citas
<i>Plasmodium berghei</i> y <i>Plasmodium chabaudi</i>	Ratón	Dieta de alto contenido en colesterol	Una terapia con quimioterápicos es menos efectiva en el caso de ratones alimentados con altos niveles de colesterol.	101
<i>Plasmodium yoelii</i>	Ratón Swiss albino	Dieta con vitamina E, selenio y aceite de hígado de bacalao.	El uso de una droga antimalárica típica de China (Qinghaosu) en ratones con deficiencia en vitamina E y con aceite de hígado de bacalao aumentaba su eficacia, pero no con deficiencia en selenio.	175
<i>Schistosoma mansoni</i>	Ratón CD1	0, 10 y 20% de aceite de menhaden (pescado).	Ratones alimentados con la dieta del 20% en aceite de pescado muestran una mayor penetración del parásito.	93
<i>Plasmodium berghei</i>	Rata noruega	Dieta con aceite de pescado y dieta con aceite de maíz.	Ratas alimentadas con aceite de pescado muestran una disminución en la presencia de esquizontes del parásito acompañado de una disminución en la producción de IL-6 e IL-1.	316
<i>Schistosoma mansoni</i>	Ratón	Dieta de aceite de hígado de bacalao, dieta de aceite de coco y dieta de aceite de soja.	Ratones alimentados con la dieta n-3 muestran una disminución en el tamaño de las áreas de granuloma a nivel pulmonar producidas por el parásito.	178
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ratón CBA/J	Dieta de alto contenido en grasas	Ratones alimentados con la dieta y sometidos a la infección experimental con el parásito desarrollan aterosclerosis temprana con aumento de la IL-6.	294
<i>Schistosoma mansoni</i>	Ratón	Dieta alta en grasas (29% lípidos) y dieta normal (12% lípidos).	Ratones infectados y alimentados con la dieta alta en grasas padecen una desorganización esplénica con un aumento en la densidad de la pulpa blanca e hiperplasia en centros germinales y pulpa roja.	58

Abreviaturas: IL (interleuquina).

1.4.2.- Dietas ricas en ácidos grasos e inmunosupresión

La inmunosupresión o inmunodepresión es la inhibición de uno o más componentes que integran el sistema inmunitario innato o adaptativo, surgida a raíz de una enfermedad subyacente o provocada a propósito mediante fármacos con el fin de prevenir o tratar el rechazo de un injerto, o una enfermedad autoinmunitaria. En la actualidad existen una serie de inmunosupresores que habitualmente se emplean como quimioterápicos como la ciclosporina, ciclofosfamida (CPA), metotrexato (MTX), etc. Como ejemplo de enfermedades subyacentes que dan lugar a una inmunodeficiencia adquirida o secundaria se encuentra el *virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH) que inhibe a los linfocitos T CD4⁺ cooperadores; infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* que pueden producir anergia frente a muchos antígenos y existen registros de niños africanos con infecciones palúdicas crónicas que presentan una disminución en la función de los linfocitos T. Una neoplasia maligna agresiva de linfocitos T denominada leucemia o linfoma de linfocitos T del adulto (LTA) da lugar a una inmunosupresión grave que aumenta la susceptibilidad a múltiples infecciones oportunistas.

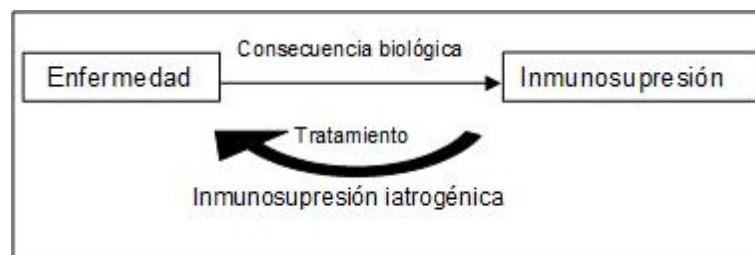


Figura 8. Relación entre la inmunosupresión y la enfermedad. Determinadas enfermedades pueden dar lugar a una inmunosupresión secundaria como consecuencia biológica. En cambio para ciertas patologías es necesaria la administración de fármacos que inducen una inmunosupresión (iatrógena), necesaria en el tratamiento de las mismas.

La malnutrición proteínica-calórica es una de las principales causas de mortalidad en los países en desarrollo y se asocia desde hace tiempo a un deterioro de la inmunidad celular y humoral frente a los microorganismos infecciosos; los procesos de metástasis en médula ósea, la inmunosupresión por trasplantes o enfermedades autoinmunes y la esplenectomía también dan lugar a situaciones de inmunocompromiso. El presente trabajo se centra en la acción de tres fármacos de diferente acción inmunosupresora; la ciclofosfamida (CPA), el GK 1,5 y el RB6-8C5. Pero en la actualidad existen otros muchos fármacos que producen dicha acción.

Tabla 7. Principales causas de inmunosupresión más importantes.

Causa	Inmunosupresión
VIH	Eliminación de linfocitos T CD4 cooperadores.
Malnutrición proteínica-calórica	Trastornos metabólicos inhiben la función y maduración de los linfocitos
Quimioterapia y radioterapia antineoplásica	Reducción de los precursores de linfocitos en médula ósea.
Metástasis en médula ósea y por leucemia	Reducción del lugar para la maduración de los leucocitos.
Trasplantes y enfermedades autoinmunes	Reducción en la activación linfocitaria.
Esplenectomía	Reducción en la fagocitosis de microorganismos.

1.4.2.1.- Ciclofosfamida (CPA)

La ciclofosfamida (CPA) es un agente citostático alquilante del grupo de las mostazas nitrogenadas, su nombre específico según la IUPAC es 2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-13,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato, y su fórmula química es $C_7H_{15}C_{12}N_2O_2PH_2O$; se presenta como un polvo cristalino de color blanco que es soluble en agua, etanol y suero fisiológico. La CPA tiene un amplio espectro antineoplásico y es empleada junto a otros fármacos en el tratamiento de linfomas, leucemias y tumores, así como determinadas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener o esclerosis múltiple.

La ciclofosfamida después de su administración y de llegar al hígado es activada por el sistema de enzimas microsomales hepáticas y pasa a desarrollar una acción citotóxica. La CPA se convierte en primer lugar en aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida y a continuación en acroleína y fosforamida que son dos potentes alquilantes que forman puentes en el ADN e impiden su replicación, esto da lugar a la muerte de las células; los linfocitos T son muy sensibles a la acción de la CPA. Los primeros estudios sobre la acción de dicho fármaco ya mostraban importantes reducciones en poblaciones de timocitos y esplenocitos murinos (Merritt *et al.*, 1982), a continuación se comenzó a estudiar a nivel hematopoyético y su relación con la síntesis de prostaglandinas (Nickevich *et al.*, 1986); en 1989 un trabajo daba conocer una posible modulación de la CPA en el metabolismo del ácido araquidónico de macrófagos peritoneales (Giordano *et al.*, 1988) y más tarde la participación de las lipoxigenasas en el metabolismo de las misma (Kanekal y Kehrer, 1994). La CPA se emplea desde hace tiempo en tratamientos quimioterápicos y en determinadas ocasiones las células tumorales desarrollan resistencia a la misma (Hamuro *et al.*, 1996).

En el año 1997 un estudio de la universidad de Tokio creó un modelo de enteropatía por sensibilidad alimentaria en ratones BALB/c a los que se inmunosuprimieron con CPA y además fueron alimentados con distintas dietas lipídicas n-6 y n-3; los resultados mostraron una clara influencia de la dieta en la producción de leucotrienos de los ratones (Ohtsuka *et al.*, 1997) y en ratones con un modelo de enfermedad autoinmune (Bhattacharya *et al.*, 2003). Un estudio en pacientes con cáncer de mama relaciona la capacidad de ciertos ácidos grasos de aumentar la sensibilidad de los tumores de mama a los fármacos citotóxicos (Bougnoux *et al.*, 1999) en otro caso más reciente se evalúa la eficacia de los efectos antitumorales de determinadas drogas citotóxicas en presencia de ácidos grasos de la serie n-3 (Wynter *et al.*, 2004).

Aunque no son muchos los artículos que relacionan dietas lipídicas y ciclofosfamida se debe destacar el publicado por nuestro grupo de investigación en el que se examina la resistencia de ratones BALB/c alimentados con dietas lipídicas y tratados con CPA frente a una infección con *Listeria monocytogenes* (Cruz-Chamorro *et al.*, 2007), el resultado fue el empeoramiento de la inmunosupresión en ratones alimentados con aceite de pescado y tratados con CPA; sin embargo recientes estudios resaltan el papel protector del ácido eicosapentanoico en la peroxidación lipídica que ocurre en el hígado por acción de la CPA (Li *et al.*, 2011).

1.4.2.2.- GK 1.5

El anticuerpo monoclonal purificado GK1,5 o anti-L3T4 (anti-CD4) reconoce a moléculas de superficie (L3T4) de linfocitos T CD4 murinos y se une a ellos de forma específica produciendo un bloqueo en las funciones de los mismos. Estudios iniciales sobre este inmunosupresor mostraban que presentaba la capacidad de bloquear la unión específica al antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Wilde *et al.*, 1983; Swain *et al.*, 1984).

En 1986 un estudio probó los efectos del GK 1,5 en ratones desafiados mediante una infección con el bacilo de *Calmette-Guérin* que implica el desarrollo de anemia acompañada de un aumento en el número de granulocitos y monocitos, el resultado fue que el GK 1,5 impedía el desarrollo de anemia e incrementaba la producción de fagocitos en ratones infectados (Marchal y Milon, 1986). En los siguientes años comienzan a aparecer estudios en animales sometidos a múltiples modelos de infección; un ejemplo es la supresión de granulomas hepáticos en ratones infectados con *Schistosoma mansoni* debido al tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-L3T4 (Mathew y Boros, 1986); también se investigó la modulación en las subpoblaciones linfocitarias de las placas de Peyer en ratones infectados con *Giardia muris* y tratados con GK1,5

(Ermak *et al.*, 1988). En 1989 un estudio evaluaba los efectos de la administración de GK 1,5 en ratones infectados con *Listeria monocytogenes* (Czuprynski *et al.*, 1989; Czuprynski y Brown, 1990), los resultados mostraban un claro aumento del aclaramiento bacteriano en bazo e hígado de ratones tratados con GK 1,5 y además presentaban un aumento moderado de la resistencia a un desafío secundario con el mismo patógeno. En el mismo año otro estudio con GK 1,5 en ratones infectados con el virus del *Herpes simplex* reflejaba una mayor actividad de las células NK en los ratones inmunosuprimidos (Erlich *et al.*, 1989). Este inmunosupresor también ha sido probado en modelos de infección con patógenos como *Candida albicans* (Cenci *et al.*, 1989), *Trypanosoma cruzi* (Rottenberg *et al.*, 1990) o *Treponema pallidum* subespecie *pertenue* en hamster (Liu *et al.*, 1991).

Actualmente la bibliografía sobre la relación entre la modulación ejercida a nivel del sistema inmune por los ácidos grasos en animales sometidos a un modelo de infección y el uso del anticuerpo monoclonal GK 1,5 es escasa. Los estudios se centran más en el uso del mismo como fármaco inmunosupresor frente a patógenos infecciosos, pero sin tener en cuenta los cambios inmunes producidos por la dieta.

1.4.2.3.- RB6-8C5

El RB6-8C5 o también conocido como GR1 o Ly6G es un anticuerpo monoclonal purificado antigranulocito que reacciona con la proteína Ly6G que es a su vez el antígeno de diferenciación mielóide Gr1, el resultado es la depleción de los neutrófilos y monocitos a nivel sistémico. Los primeros estudios sobre este anticuerpo se centraban en la regulación de la expresión del antígeno RB6-8C5 en células murinas de médula ósea (Hestdal *et al.*, 1991), a continuación se pasó a estudiar a las familias de células que eran afectadas por el mismo (familia mielóide Ly6) (Fleming *et al.*, 1993) y en los siguientes años ya se investigaba el papel llevado a cabo por los neutrófilos en la adquisición de resistencia, en un modelo de infección con *Listeria monocytogenes* (Czuprynski *et al.*, 1994; Rakhmilevich, 1995; López *et al.*, 2000). A partir de 1997 multitud de trabajos evalúan la acción ejercida sobre neutrófilos por el RB6-8C5 sobre modelos de infección con distintas bacterias patógenas *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica* (Conlan, 1997); también con *Staphylococcus aureus* (Verdrengh y Tarkowski, 1997) y *Mycobacterium tuberculosis* (Pedrosa *et al.*, 2000).

Al comienzo de la pasada década un trabajo publicado cuantificaba la producción de citoquinas en ratones tratados con el anticuerpo RB6-8C5 e infectados con *Legionella*

pneumophila; ratones inmunosuprimidos mostraban una disminución de los niveles de IFN γ e IL-12 y un aumento de la IL-4 e IL-10 (Tateda *et al.*, 2001), los autores sugieren el importante papel inmunoregulador llevado a cabo por neutrófilos. Otro trabajo dos años más tarde corrobora el hecho del papel de los neutrófilos en la modulación de la respuesta inmunológica, existen evidencias suficientes a partir de los trabajos publicados para afirmar que los neutrófilos afectan directamente al balance de las respuestas celulares Th1 y Th2 (Mednick *et al.*, 2003). En el año 2005 un grupo de investigadores de la universidad de Missouri evaluaron como se veía afectada la resistencia del hospedador en ratones alimentados con ácidos grasos ω -3, inmunosuprimidos con RB6-8C5 e infectados con *Listeria monocytogenes*; la conclusión fue que la reducción en la resistencia del hospedador a la infección mediada por los ácidos grasos ω -3, ocurría de forma independiente a la actividad de neutrófilos (Fritsche *et al.*, 2005). Este trabajo reafirma el hecho de que ciertos ácidos grasos como son los de la serie n-3 no son tan beneficiosos en situaciones de infección debido al carácter inmunosupresor de los mismos. En los últimos años los estudios se han centrado en investigar a un más el papel de los neutrófilos como moduladores de la respuesta inmunológica, en la mayoría de artículos los animales que son inmunosuprimidos se someten a una infección experimental junto a animales no inmunosuprimidos con el objetivo de comparar la respuesta inmune en ambos; no hace mucho tiempo un trabajo utilizaba un modelo de infección con esporas de *Bacillus anthracis* cepa Ames (Cote *et al.*, 2006) y otro un modelo con *Acinetobacter baumannii* (van Faassen *et al.*, 2007). Al parecer la depleción de neutrófilos producida por el RB6-8C5 puede tener efectos beneficiosos frente a la hepatotoxicidad producido la droga analgésica acetaminofén (Liu *et al.*, 2006). La especificidad de unión del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 ha sido cuestionada ya que se une a la proteína Ly6G de la línea mieloide y a la Ly6C que es expresada también en células dendríticas, subpoblaciones linfocitarias y monocitos de ratón; de forma alternativa se propone el empleo del anticuerpo monoclonal (1A8) específico solo de la línea Ly6G (Daley *et al.*, 2008).

Recientemente un trabajo de la universidad del norte de Texas refleja el importante papel protector de los neutrófilos en el hígado, en ratones inmunosuprimidos con RB6-8C5 e infectados con *Listeria monocytogenes* (Carr *et al.*, 2011), posiblemente el papel protector se debe a la producción de TNF α por parte de neutrófilos. Cabe destacar también que dicho anticuerpo no muestra resultados muy esperanzadores en el tratamiento de tumores hepáticos en ratones (Ma *et al.*, 2012).

1.4.3.- Ácidos grasos en nutrición hospitalaria

En pacientes hospitalizados críticos son frecuentes estados de malnutrición y alteraciones graves del sistema inmune, en estas ocasiones es cuando se emplea la nutrición artificial (o también Soporte Nutricional Especializado), que se proporciona al individuo cuando este es incapaz de ingerir cualquier tipo de comida por vía oral. Las emulsiones lipídicas suelen ser empleadas en la nutrición artificial ya que actúan como suministro de energía y fuente de ácidos grasos esenciales, sin embargo en determinados casos pueden asociarse a problemas de infección a través de contaminaciones en la ruta de administración, o bien por alteraciones en la respuesta inmune inducidas por componentes de las fórmulas administradas. Actualmente se debe destacar como hecho importante el efecto producido por algunas dietas lipídicas en el sistema inmune y su aplicación clínica en pacientes inmunocomprometidos o críticos con mayor susceptibilidad a las infecciones por patógenos oportunistas; esto se debe a que el metabolismo lipídico juega un papel importante en la inmunidad celular del individuo. Las emulsiones lipídicas empleadas antiguamente estaban constituidas con ácidos grasos de la serie ω -6 (ácido linoleico en el aceite de soja) siendo asociadas a complicaciones de secundarias en pacientes críticos y a aumentos de la mortalidad. En los últimos años han aparecido nuevas emulsiones lipídicas basadas en la incorporación de aceite de oliva (ácidos grasos monoinsaturados) y diversos trabajos demuestran su eficacia frente a otras (Garnacho-Montero *et al.*, 2002; Puertollano *et al.*, 2010).

1.4.3.1.- Nutrición enteral y parenteral

Dentro del campo de la nutrición artificial existen dos tipos de nutrición según la vía de administración, distinguiéndose así la nutrición enteral y la nutrición parenteral.

La **nutrición enteral** se define como la administración de nutrientes por vía digestiva, debido a la incapacidad de ingerirlos por vía oral y por ello es necesario el uso de sondas que aseguren la llegada de nutrientes al estómago. En este tipo de nutrición la administración de nutrientes puede ser llevada a cabo de dos formas distintas; como dieta total (la dieta se administra íntegramente), o bien como suplemento (complemento de la dieta oral). La *Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE)* propone como requisito imprescindible para que el paciente reciba este tipo de nutrición, es que presente una mínima capacidad motora y funcional en su aparato digestivo.

En la **nutrición parenteral** en cambio, los nutrientes son administrados por vía intravenosa; este tipo de nutrición está dirigida a pacientes que presentan la incapacidad de

ingerir los nutrientes por vía oral o digestiva para cubrir las necesidades nutricionales. Al igual que en el anterior tipo de nutrición, en esta también existen dos formas de administrar los nutrientes. Por vía central, el suministro de nutrientes es por una vena de gran calibre que normalmente suele ser la vena cava superior; o por vía periférica con el suministro de nutrientes a través de una vena de pequeño calibre.

Según la SENPE la población diana de para la utilización de alguno de los dos tipos de nutrición es muy variada, pero normalmente suelen ser pacientes hospitalizados críticos, como casos de malnutrición por imposibilidad de alimentarse por vía oral por causas como intestino corto, enfermedad inflamatoria intestinal, peritonitis, coma, traumatismo cráneo-encefálico, complicaciones secundarias en cirugía abdominal, enteritis, cáncer o anorexia nerviosa; además la SENPE señala que en determinados casos el Soporte Nutricional Especializado se convierte en un arma terapéutica actuando los nutrientes como fármacos, señalando los importantes avances en los últimos años en el campo de la nutrición en nuestro país.

1.4.3.2.- Emulsiones lipídicas en nutrición parenteral

A lo largo de la historia se han sucedido tres generaciones distintas de emulsiones lipídicas intravenosas, la composición de ácidos grasos de las mismas han ido evolucionando de forma paralela a los conocimientos adquiridos en las investigaciones sobre el metabolismo de los mismos y su relación con el sistema inmune. Este hecho hace que las emulsiones lipídicas para la nutrición parenteral se clasifiquen en orden ascendente desde la primera a la tercera generación:

1.4.3.2.1.- Primera generación

Se trata de emulsiones lipídicas basadas en aceite de soja o de cártamo, su principal finalidad era proporcionar ácidos grasos esenciales para evitar su déficit y secundariamente servir de fuente de energía. Este tipo de emulsiones contienen un alto porcentaje (50-60%) de ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω -6 (ácido linoleico) que se ha asociado a alteraciones inmunológicas, además están desaconsejadas en pacientes quirúrgicos graves, quemados, sépticos o críticos con altos niveles de agresión. Dos ejemplos de emulsiones lipídicas de primera generación son Intralipid[®] 20% y Soyacal[®] 20%, ambas están constituidas en su totalidad por aceite de soja y fueron las primeras que empezaron a comercializarse en España en 1966. Los primeros estudios en este tipo de emulsiones se centraban en la composición de nutrientes y la estabilidad de los mismos al ser administrados (Harrie *et al.*, 1986), llegando a la conclusión de

que eran físicamente estables (Barat *et al.*, 1987). Posteriormente estas emulsiones han sido empleadas en estudios comparativos con otras emulsiones lipídicas de generaciones posteriores (Balet *et al.*, 2004).

1.4.3.2.2.- Segunda generación

Dentro de esta generación encontramos distintos tipos de emulsiones cuya finalidad común respecto a la anterior generación, es la de reducir los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6. Dentro de este grupo existen tres emulsiones lipídicas que han sido elaboradas empleando estrategias diferentes.

Las **emulsiones basadas en una mezcla física de aceite de soja y triglicéridos de cadena media (TCM)** se componen de un 50% de aceite de soja y un 50% de aceite de coco o palma con una altísima proporción de TCM. Este tipo de emulsiones parecen mejorar el balance nitrogenado, la tolerancia hepática y el perfil inmunológico respecto a las anteriores emulsiones de primera generación; aún así no ha demostrado mejores resultados clínicos y el uso de la misma en altas dosis debe limitarse en casos de diabetes, acidosis y cetosis. Un ejemplo comercial de estas emulsiones es la Lipofundina (LCT/MCT®) 20% que apareció en el año 1991, se compone de aceites de soja y de coco al 50% cada uno y presenta mayor contenido en α -tocoferol que las de primera generación. Los primeros estudios después de su comercialización en nuestro país recomendaban su uso en pacientes críticos (Ball, 1993) y sometidos a cirugía, al mejorar el metabolismo proteico (Jiang *et al.*, 1993). En nuestro país los estudios se centraron en un principio en como afectaban estas emulsiones a la función plaquetaria (Porta *et al.*, 1994) y a la coagulación (Martínez *et al.*, 1995). En 1999 un estudio realizado en pacientes sanos a los que se les había suministrado Lipofundina LCT/MCT® 20%, neutrófilos no estimulados presentaban un aumento en la producción de radicales de oxígeno (Wanten *et al.*, 1999); posteriores estudios desaconsejaban su uso en casos de traumatismo cerebral grave al relacionar a dicha emulsión con aumentos de la presión intracraneal (Wolf *et al.*, 2004). Desde la aparición de otras emulsiones lipídicas más evolucionadas los siguientes estudios son la mayoría de índole comparativo aunque en los últimos años se destacan dos estudios; el primero trata de cómo afecta la lipofundina a la composición de ácidos grasos de los tejidos de lechones (Amusquivar *et al.*, 2008), y el segundo y más reciente en conejos donde la lipofundina induce hiperlipidemias, aumento del estrés oxidativo y de la lesiones ateroscleróticas (Delgado-Roche *et al.*, 2012). En un ensayo clínico aleatorizado se desaconseja el uso de este tipo de emulsión en pacientes sometidos a cirugía abdominal (Wang *et*

al., 2012) y un último estudio realizado también en conejos refleja como la nutrición total parenteral con este tipo de emulsiones puede dar lugar a cambios en la composición de ácidos grasos de fosfolípidos cerebrales (Maciá-Botejara *et al.*, 2013).

Las **emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva y soja** se componen de un 80% de aceite de oliva y un 20% de aceite de soja para evitar deficiencias en ácidos grasos esenciales. La novedad es que esta emulsión incorpora el ácido oleico que como se veía anteriormente es un ácido graso monoinsaturado de la serie ω -9, considerándose una emulsión segura y bien tolerada. En 1998 comenzó a comercializarse en España una emulsión de este tipo, Clinoleic[®] 20% con ciertas ventajas frente a otras como una mejor resistencia a la peroxidación lipídica, efecto neutro sobre el sistema inmune y una menor producción de mediadores proinflamatorios; además algunos componentes fenólicos presentes en el aceite de oliva tienen carácter antioxidante y antiinflamatorio.

Las **emulsiones basadas en una mezcla química de aceite de soja y TCM** se componen de lípidos sistémicos obtenidos a partir de la hidrólisis del aceite de coco (34%) y de soja (64%) con reestirificación posterior al azar. Estas emulsiones parecen mejorar el balance nitrogenado respecto a las mezclas físicas de soja, con menos alteraciones hepáticas y sobre el sistema inmunitario. Un ejemplo de este tipo de emulsiones es Structolipid[®] que comenzó a comercializarse en nuestro país en el año 2000, los primeros estudios sobre esta emulsión mostraban un aumento de la peroxidación lipídica *in vitro* en neutrófilos polimorfonucleares (Wu *et al.*, 1999). En 2006 un estudio en sujetos voluntarios sanos comparaba el efecto de Structolipid[®] 20% con Intralipid[®] 20%, ambas por vía intravenosa, los resultados de los sujetos tratados con la primera emulsión mostraban un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en suero y de la lipoproteína lipasa (LPL); en cambio la vida media en sangre fue mayor en la segunda emulsión eliminándose en mayor tiempo (Nordenström *et al.*, 2006). Más tarde un trabajo publicado por investigadores de la empresa Fresenius-Kabi analizaba los componentes de los recipientes de plástico en los que se comercializa Structolipid[®] (Ellborg *et al.*, 2010), los resultados mostraban que los componentes estaban de acuerdo a la farmacopea de los Estados Unidos. Posteriores estudios en esta emulsión se centran también en la posible liberación de PVC en las vías de administración y su interacción con este tipo de emulsiones (Bagel *et al.*, 2011).

1.4.3.2.3.- Tercera generación

Esta última generación de lípidos ha sido desarrollada con la finalidad de modular la respuesta inflamatoria frente a la agresión, en este tipo de emulsiones se incluye el aceite de pescado para aumentar el aporte de ácidos grasos de la serie ω -3 buscando de esta forma un efecto fármaco-nutriente.

Diversos estudios han sugerido la importancia en el consumo de la ratio de ácidos grasos ω -6/ ω -3; al parecer la especie humana evolucionó con un ratio cercano a 1 y la dieta occidental actual tiene una relación de 15-20, asociándose este último hecho a un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas tales como la aterosclerosis, hipertensión, obesidad, diabetes, etc. Según los estudios la mejor ratio ω -6/ ω -3 dependiendo de la patología varía en un rango de 2 a 5 y en casos de inflamación sistémica de 2 a 4. Estas emulsiones se muestran seguras y sin efectos adversos significativo, actualmente en España existen dos tipos de emulsiones de tercera generación que incorporan aceite de pescado.

Las **emulsiones lipídicas basadas en aceite de soja, TCM y aceite de pescado (emulsiones MSF)**, se basan en emulsiones de segunda generación en las que se sustituye parte del aceite de soja por aceite de pescado. En nuestro país desde 2005 se comercializa Lipoplus[®] que se compone de un 40% de aceite de soja, 50% de aceite de coco y 10% de aceite de pescado; además la ratio de ω -6/ ω -3 es de 2,7 mucho menor que en anteriores generaciones de emulsiones debido a la incorporación del aceite de pescado. Los beneficios de la incorporación de ácidos grasos ω -3 a este tipo de emulsiones ha sido reflejado en diversos estudios; a nivel de la síntesis de leucotrienos por leucocitos de pacientes sometidos a cirugía mayor (Köller *et al.*, 2003), en un ensayo con pacientes con cirugía abdominal (Wichmann *et al.*, 2007) y en pacientes de la UCI con cirugía abdominal de neurisma aórtica (Berger *et al.*, 2006).

Las **emulsiones lipídicas basadas en aceite de soja, TCM, aceite de oliva y aceite de pescado (emulsiones SMOF)**, se componen de una mezcla física de aceites de soja (30%), TCM (30%), oliva (25%) y pescado (15%); se trata de un nuevo concepto de emulsión a la luz de los actuales conocimientos adquiridos en las investigaciones. Desde el año 2005 se comercializa SMOFLipid[®] 20% con la anterior composición de ácidos grasos y el ratio ω -6/ ω -3 balanceado a 2,5.

1.4.3.3.- Emulsiones lipídicas ricas en aceite de oliva

Hoy día las dos principales emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva son como se ha visto anteriormente Clinoleic® 20% y SMOFLipid® 20%, de segunda y tercera generación respectivamente. La composición detallada de las mismas se refleja en la siguiente tabla:

Tabla 8. Composición de las dos principales emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva.

	ClinOleic® 20%	SMOFLipid® 20%
% Aceite de coco	-	30
% Aceite de oliva	80	25
% Aceite de pescado	-	15
% Aceite de soja	20	30
% Ácido oleico	65	28
% Ácido linoleico	17	19
% Ácido linolénico	3	2
% ARA	0,5	0,5
% EPA	-	2
% DHA	-	2
mg/L α -Tocoferol	30	200
Ratio ω -6/ ω -3	9	2,5
Generación	2 ^a	3 ^a
Comercializado desde	1998	2005

Abreviaturas: ARA (ácido araquidónico), EPA (ácido eicosapentanoico), DHA (ácido docosahexanoico).

Los primeros estudios que investigaban el efecto de estas emulsiones se centraron primero en Clinoleic que fue la primera en aparecer, en 1999 un estudio en pacientes pediátricos destacaba la eficacia y seguridad a largo plazo del aceite de oliva produciendo una disminución en la peroxidación lipídica comparado con las emulsiones basadas en aceite de soja (Goulet *et al.*, 1999). Un año más tarde otro trabajo realizado en linfocitos de ratas experimentales evidenció que la emulsión basada en aceite de oliva prevenía *in vivo* la inhibición en la expresión de la molécula CD25 que suele ocurrir con emulsiones lipídicas convencionales (Moussa *et al.*, 2000). Se debe destacar que las emulsiones lipídicas basadas en aceite de oliva pueden realizar una modulación selectiva de la respuesta inmune manteniendo la inmunidad protectora y reduciendo la respuesta inflamatoria (Granato *et al.*, 2000). Dos años más tarde otro trabajo en nuestro país ratificaba este hecho en ratas con una septicemia experimental con *E. coli* a las que se le había suministrado tres emulsiones lipídicas diferentes una de ellas Clinoleic (Garnacho-Montero *et al.*, 2002), la emulsión basada en aceite de oliva preservaba la función y supervivencia de fagocitos mononucleares. En un caso ratas tratadas con emulsiones lipídicas fueron sometidas a extirpación hepática y posteriormente se estudió su regeneración, la emulsión basada en aceite de oliva tenía

importantes efectos beneficiosos en la regeneración hepática posiblemente por sus propiedades antioxidantes (Ok *et al.*, 2003).

Los estudios posteriores realizados con la emulsión lipídica Clinoleic suelen emplear también emulsiones lipídicas basadas en aceite de semilla de soja para comparar los efectos que producen ambas, en la mayoría de casos Clinoleic muestra mejores efectos y se propone como una alternativa segura frente a las emulsiones basadas en aceite de soja (Sala-Vila *et al.*, 2007). Los siguientes estudios demuestran los efectos de Clinoleic:

- Pacientes adultos con nutrición parenteral domiciliaria y afectados por fallo crónico intestinal (Thomas-Gibson *et al.*, 2004).
- En la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (Reimund *et al.*, 2004).
- En el tiempo de estancia en la UCI y en los niveles de glucosa de pacientes críticos con trauma múltiple (Huschak *et al.*, 2005).
- En la función de neutrófilos humanos *in vitro* y en las interacciones celulares leucocito-endotelio de rata *in vivo* (Buenestado *et al.*, 2006).
- En los niveles de proteínas de fase aguda y en el número total de leucocitos de pacientes críticos con infección (Mateu de Antonio *et al.*, 2008).
- En células mononucleares de sangre periférica de infantes prematuros (Gawecka *et al.*, 2008) y en neonatos críticos (Webb *et al.*, 2008).
- En el periodo postoperatorio de pacientes sometidos a cirugía digestiva (Puiggròs *et al.*, 2009).
- En pacientes pediátricos sometidos a trasplante de médula ósea y que requieren nutrición parenteral (Hartman *et al.*, 2009).
- En los efectos vasculares, metabólicos e inflamatorios de sujetos sanos (Siqueira *et al.*, 2011).

Respecto al otro tipo de emulsión lipídica SMOFLipid debido a su reciente aparición en el año 2005 el número de estudios en *Pubmed* es más reducido. En 2006 un grupo de investigadores de un centro clínico alemán publicaron los efectos beneficiosos de esta emulsión lipídica en pacientes quirúrgicos (Grimm *et al.*, 2006; Mertes *et al.*, 2006), en 2009 otro estudio de otro centro alemán afirmaba que esta emulsión lipídica era más efectiva que Clinoleic al conservar mejor la primera la integridad hepatocelular (Piper *et al.*, 2009). Un año más tarde se publicaron datos acerca de su seguridad y eficacia en infantes prematuros con efectos beneficiosos en la colestasis (Tomsits *et al.*, 2010) y en la disminución del estrés oxidativo (Skouroliahou *et al.*, 2010); este último autor actualmente ha publicado un trabajo donde no existían evidencias de la regulación de la colestasis por parte de esta emulsión lipídica (Skouroliahou *et al.*, 2012).

La estabilidad a largo plazo de esta emulsión lipídica también ha sido investigada (Janu *et al.*, 2011) y también como se ve afectada la misma en presencia de altas concentraciones de glucosa y calcio (Télessy *et al.*, 2011). Actualmente un trabajo de la Universidad de Huelva cuestiona la estabilidad a largo plazo de esta emulsión lipídica haciendo referencia a variaciones en el tamaño de las gotas lipídicas que no se adaptan a lo establecido en la farmacopea de los Estados Unidos (Gallegos *et al.*, 2012). Uno de los últimos trabajos publicados resalta la tolerabilidad y seguridad de esta emulsión lipídica e incluye en su publicación datos que demuestran una disminución de dos transaminasas hepáticas (ALT y AST) y de la bilirrubina total, realizado en pacientes estables sometidos a nutrición parenteral (Klek *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **Hipótesis** del presente trabajo parte del hecho ya comprobado de la acción moduladora de los diferentes tipos de aceite presentes en la dieta, en función de los ácidos grasos que mayoritariamente están presentes en ellos, ejercen sobre el sistema inmunológico; en el presente trabajo se ha prestado una especial atención al aceite de oliva virgen extra, que ejerce un efector inmunosupresor más leve que el ejercido por otros tipos de lípidos como es el caso del aceite de pescado. El aceite de oliva virgen extra ecológico al ser producido en ausencia de fitosanitarios y otros productos químicos, es un firme candidato a ser incluido en el estudio, ya que la bibliografía sobre el efecto del mismo a nivel inmunológico en situaciones de inmunosupresión no es muy numerosa.

Los **objetivos** que se pretenden alcanzar en la presente tesis doctoral fueron los siguientes:

I) Comparar los posibles efectos producidos por el aceite de oliva virgen extra ecológico sobre el sistema inmune tras una infección experimental con la bacteria *Listeria monocytogenes*.

II) Analizar y definir el efecto de la ingestión prolongada de ácidos grasos poliinsaturados como el aceite de pescado (n-3) y el aceite de girasol (n-6); y ácidos grasos monoinsaturados como los aceites de oliva (n-9) virgen extra y virgen extra ecológico. Todo ello en un modelo murino experimental (BALB/c) sometido a inmunosupresión con i) el fármaco inmunosupresor ciclofosfamida, o con anticuerpos monoclonales ii) RB6-8C5 (que produce una depleción de neutrófilos) y iii) GK 1,5 (que provoca una depleción en linfocitos T CD4).

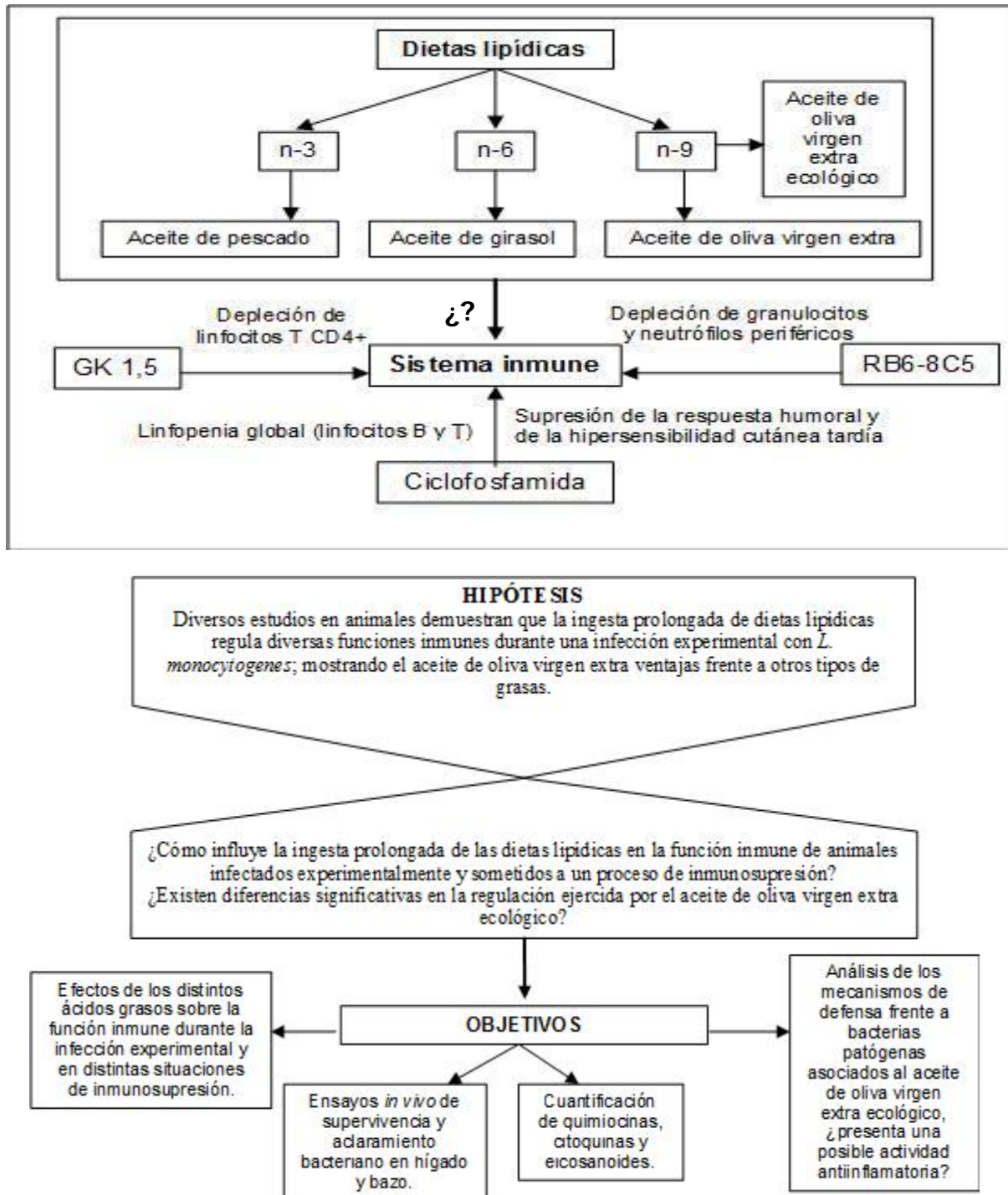
III) Cuantificar la resistencia y capacidad de recuperación de los animales alimentados con las dietas lipídicas anteriormente citadas y sometidos a una infección experimental con *Listeria monocytogenes*, mediante la realización de ensayos *in vivo* de supervivencia y recuentos de bacterias viables de bazo e hígado.

IV) Comprobar las posibles diferencias existentes en los mecanismos de defensa frente a bacterias patógenas asociados al consumo de aceite de oliva virgen extra procedente de cultivo, recolección y producción estrictamente ecológica. Analizar la posible existencia de inmunotóxicos en aceites no ecológicos.

V) Identificar *in vivo* mecanismos de acción intercelulares (producción de citoquinas), mediadores lipídicos responsables de señalización intracelular (eicosanoides), subpoblaciones linfocitarias que puedan verse afectadas y modificadas en procesos de inmunosupresión tras la ingestión habitual de los distintos tipos de aceites.

VI) Comprobar la posible existencia de un efecto sinérgico entre los componentes de la dieta objeto de estudio (aceite de oliva ecológico) con una probada actividad antiinflamatoria, que pueda facilitar la prevención de enfermedades inflamatorias en situaciones de inmunocompromiso.

Figura 9. Resumen de los ácidos grasos de las dietas experimentales y los tres tipos de agentes inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). La cuestión planteada es como influye la alimentación con los diferentes tipos de ácidos grasos durante un periodo de tiempo, en el sistema inmune de animales inmunodeprimidos e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes*. En base a una hipótesis inicial se establecieron unos objetivos en el desarrollo del presente trabajo.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.- Ensayos *in vivo*

3.1.1.- Animales y dietas lipídicas experimentales

Se han empleado en todos los ensayos, ratones BALB/c de 4 semanas de edad y un peso comprendido entre los 15-20 g (Janvier). Los ratones se estabularon en una dependencia con una temperatura constante de 24° C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h; los ratones se distribuyeron de forma aleatoria para cada ensayo en número de 50 ejemplares por cada grupo experimental, con agua y alimento *ad libitum* durante el periodo de 1 mes.

Desde su elaboración y hasta su utilización, todas la dietas estuvieron almacenadas en oscuridad y a una temperatura de 4° C. Los ratones fueron alimentados durante un periodo de 30 días con una de las dietas lipídicas que fueron reemplazadas cada 24 horas por otras nuevas para evitar su oxidación. Como control negativo se empleó una dieta baja en grasas con un contenido en lípidos del 5 % (50 mL de aceite de maíz/kg dieta), con la finalidad de evitar deficiencias en ácidos grasos esenciales. Las mezclas vitamínica y mineral fueron preparadas por separado antes de la elaboración de la dieta lipídica y almacenadas en cantidades stock de 1 kg en oscuridad y temperatura ambiente.

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a la legislación nacional y europea sobre el cuidado y uso de animales de experimentación, y siguiendo los consejos del comité bioético de experimentación animal de la Universidad de Jaén (86/609/EEC, R.D. 53/2013).

Tabla 9. Composición de las dietas experimentales y aceites utilizados.

Componente	g/kg de dieta (%)	Baja en grasas g/kg de dieta (%)
Colina	2 (0,2%)	2 (0,2%)
D,L-metionina	3 (0,3%)	3 (0,3%)
Mezcla vitamínica	10 (1%)	10 (1%)
Mezcla mineral	35 (3,5%)	35 (3,5%)
Celulosa	80 (8%)	80 (8%)
Sacarosa	155 (15,5%)	205 (20,5%)
Caseína	200 (20%)	200 (20%)
Grasas *	200 (20%)*	50 (5%)
Almidón de trigo	315 (31,5%)	415 (41,5%)

Componentes lipídicos (*)

Aceite	g/kg de dieta
Oliva virgen extra	200
Oliva virgen extra ecológico	200
Girasol	200
Pescado	200
Maíz (dieta baja en grasa)	50

Tabla 10. Mezcla vitamínica

Componente	g/kg	Componente	g/kg
Ácido fólico	0.2	Riboflavina	0.6
Ácido nicotínico	3	Tiamina hidrocloreuro	0.6
Biotina	0.02	Vitamina A	1.9975
Cianocobalamina	0.001	Vitamina D ₃	0.0025
Pantotenato de calcio	1.6	Vitamina E	9.995
Piridoxina hidrocloreuro (vit B6)	0.7	Vitamina K	0.005

* Se completa todo con 981,279 g de sacarosa.

Tabla 11. Mezcla mineral

Componente	g/kg
Carbonato cúprico (Fluka)	0.3
Carbonato de manganeso (Fluka)	3.5
Carbonato de zinc (Fluka)	1.6
Citrato férrico (Merck)	6
Citrato potásico monohidratado (Sigma-Aldrich)	220
Cloruro sódico (Sigma)	500
Fosfato cálcico dibásico (Sigma-Aldrich)	74
Iodato potásico (Fluka)	0.01
Óxido de magnesio (Merck)	24
Sulfato potásico (Sigma-Aldrich)	52
Seleniato de sodio pentahidratado (Merck)	0.01
Sulfato crómico de potasio dodecahidratado (Fluka)	0.55

* Se completa todo con 118,03 g de sacarosa.

3.1.2.- Preparación de los inmunosupresores CPA, GK 1.5 y RB6-8C5

La ciclofosfamida (CPA), (Sigma-Aldrich) se reconstituyó en esterilidad a una concentración de 1,5 mg/mL en PBS (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos monoclonales purificados de rata anti-L3T4 (GK 1.5; BD Pharmigen) y anti-Gr-1 (RB6-8C5; BD Pharmigen) se reconstituyeron también en esterilidad a una concentración de 0,5 mg/mL en PBS (Sigma-Aldrich).

3.1.3.- Tratamiento con los agentes inmunosupresores CPA, GK 1.5 y RB6-8C5

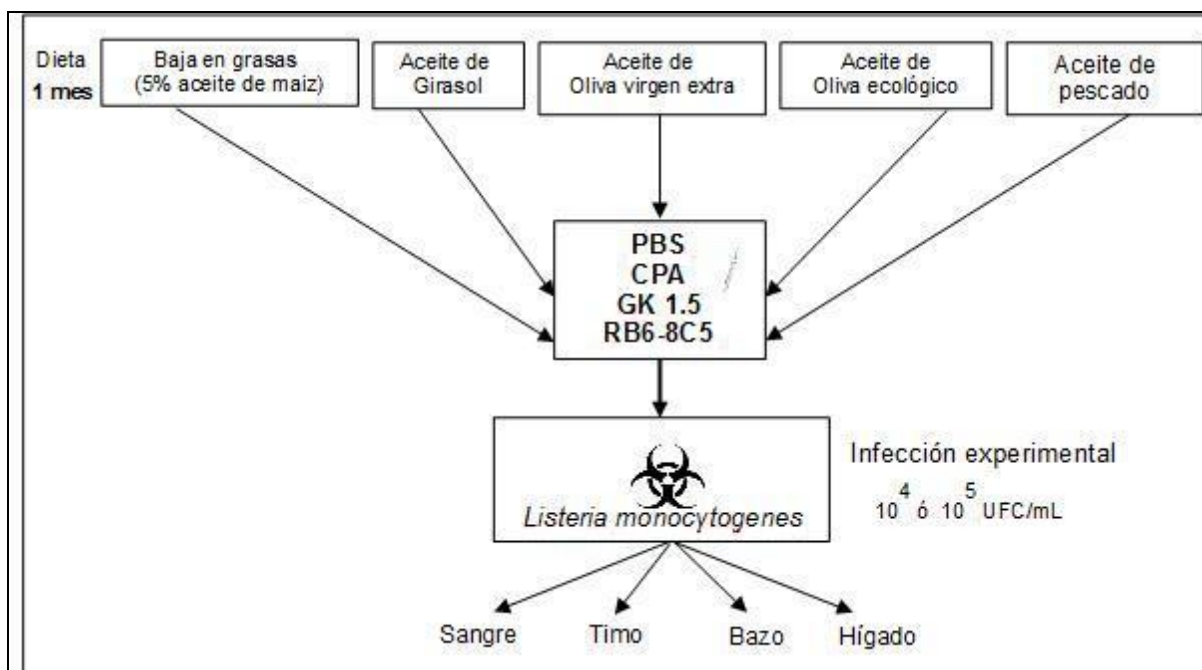
Transcurrido un periodo de 30 días de alimentación con las dietas experimentales, uno de los grupos se trató con una dosis de CPA de 100 mg/kg en PBS (Sigma-Aldrich) a las 72, 48 y 24 horas previas la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Dos de los grupos se inmunosuprimieron con una dosis de 2,5 mg/kg de los anticuerpos monoclonales GK 1.5 y RB6-8C5 por separado reconstituidos en PBS (Sigma-Aldrich), 24 horas antes de la infección experimental. A un último grupo se le inyectó con una dosis de 100 μ L de PBS (Sigma-Aldrich) 24 horas antes de la infección experimental con el objetivo de que actuara como control negativo. La administración del tratamiento en todos los grupos se realizó a través de la vía intraperitoneal mediante el empleo de jeringas de 1 mL (Acofar).

3.1.4.- Preparación de *Listeria monocytogenes* y posterior infección experimental

Una cepa virulenta de *Listeria monocytogenes* aislada en el H.U. Virgen de las Nieves (Granada), se sembró en medio agar-sangre (Scharlau Chemie), 24 h a 37° C y aerobiosis. Posteriormente el cultivo se resuspendió en solución salina al 0.9 % (p/v) y mediante espectrofotometría se determinó la concentración de 10^7 UFC/mL ([D.O] a 550 nm = 1) (Puertollano *et al.*, 2008). Las concentraciones de trabajo para cada uno de los ensayos llevados a cabo se obtuvieron mediante la realización de diluciones seriadas (1:10), en solución salina estéril al 0,9 % (p/v), (NaCl, Scharlau Chemie) a partir de la concentración de 10^7 UFC/mL.

Después de la alimentación de los ratones con las dietas experimentales durante 30 días y el posterior tratamiento con los correspondientes inmunosupresores, los ratones se infectaron experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a una concentración de 10^4 UFC/mL en el caso del ensayo de recuperación de bacterias viables a partir de bazo e hígado, y de 10^5 UFC/mL para el ensayo de supervivencia, en solución salina estéril 0.9 % (p/v), (NaCl, Scharlau Chemie). El procedimiento de infección se llevó a cabo mediante la inyección con una jeringa de 1 mL (Acofar) en el plexo retro-orbital ocular, de igual forma en todos los grupos. Los animales se anestesiaron con una solución de ketamina y xilacina previamente a dicho procedimiento.

Figura 10. Diseño experimental



3.1.5.- Ensayos de supervivencia

Cinco grupos de ratones BALB/c (cada uno n=40) se alimentaron con cada una de las dietas experimentales (baja en grasas, girasol, oliva virgen extra, oliva ecológico y pescado) durante 30 días, cada grupo se dividió en cuatro subgrupos (n=10) con sus correspondientes tratamientos inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5), incluido el grupo control (PBS). *Listeria monocytogenes* se resuspendió en solución salina estéril 0.9 % (p/v), (NaCl, Scharlau Chemie) a una concentración de 10^5 UFC/mL, tal y como se describe en el apartado (3.4), 100 μ L se inyectaron en el plexo retro-orbital ocular de la anterior suspensión (10^4 UFC/ratón) con una jeringa (Acofar) de 1 mL. La muerte de los animales se registró cada 24 horas y la duración del ensayo fue de 10 días desde el momento de la infección con el patógeno.

3.1.6.- Recuperación de bacterias viables en bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5

Los grupos de ratones (n=40) divididos en sus respectivos subgrupos (n=10) se alimentaron con las dietas experimentales durante 30 días. Después del tratamiento con los correspondientes inmunosupresores los animales se desafiaron con una infección experimental con *Listeria monocytogenes*, una dosis de 100 μ L de una suspensión de 10^4 UFC/mL en solución salina estéril 0.9 % (p/v), (Scharlau-Chemie), se inyectó a través del plexo retro-orbital ocular empleando para ello una jeringa de 1 mL (Acofar). Los bazos de los animales se extrajeron en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica de tipo II, posteriormente se pesaron y disgregaron con rejillas estériles en placas de Petri con 10 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich). Los bazos

disgregados se recogieron en tubos para la realización de diluciones seriadas en solución salina estéril 0.9 % (p/v) (NaCl Scharlau Chemie). De cada una de las diluciones se transfirieron 5 μ L a una placa de agar-sangre (Scharlau Chemie). Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis 24 h a 37° C y las colonias se recontaron a las 0, 24 y 48 h de la infección con *Listeria monocytogenes*; el número de bacterias viables se expresó gráficamente como \log_{10} .

3.1.7.- Recuperación de bacterias viables en hígado de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5

Los grupos de ratones (n=40) separados en sus respectivos subgrupos (n=10) se alimentaron con las dietas experimentales durante 30 días. Después del tratamiento con los correspondientes inmunosupresores los animales se infectaron experimentalmente con *Listeria monocytogenes*, una dosis de 100 μ L de una suspensión de 10^4 UFC/mL en solución salina estéril 0.9 % (p/v), (Scharlau-Chemie), se inyectó a través del plexo retro-orbital ocular con una jeringa de 1 mL (Acofar). Los hígados de los animales se extrajeron en condiciones estériles en el interior de una cabina de seguridad biológica de tipo II, se pesaron y disgregaron con rejillas estériles en placas de Petri con 10 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich). Los hígados ya disgregados se recogieron en tubos para la realización de diluciones seriadas en solución salina estéril 0.9 % (p/v) (NaCl Schrlau Chemie). De cada una de las diluciones se transfirieron 5 μ L a una placa de agar-sangre (Scharlau Chemie). Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis 24 h a 37° C y las colonias se recontaron a las 0, 24 y 48 h de la infección con *Listeria monocytogenes*; el número de bacterias viables se expresó gráficamente como \log_{10} .

3.2.- Órganos y células murinas

3.2.1.- Extracción de bazo, hígado y timo

Los ratones BALB/c previamente introducidos en una cabina de seguridad biológica (Telstar), se anestesiaron con una solución de ketamina y xilacina siguiendo las pautas que se establecen en la legislación vigente sobre experimentación animal (86/609/EEC, R.D. 53/2013). Antes de la extracción de la sangre a través del plexo retro-orbital ocular los ratones se pesaron y desinfectaron con etanol al 70°; la extracción de los órganos se realizó en condiciones asépticas tras realizarse una incisión abdominal. Los órganos ya extraídos se pesaron y depositaron en tubos con 3 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich), y se conservaron a una temperatura de 4° C hasta su inmediato procesado para los correspondientes ensayos.

3.2.2.- Recolección y preparación de esplenocitos de ratón

El bazo se depositó en una placa de Petri con 10 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich). La disgregación del órgano se llevó a cabo mediante una rejilla estéril y las células se incubaron 15 minutos a 4° C con 3 mL de tampón de lisis 10x (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron tres veces con PBS estéril (Sigma-Aldrich) a 1200 R.P.M durante 5 minutos a 4° C (Beckman-Coulter Allegra 22R). Los recuentos celulares se realizaron en la cámara de Neubauer disponiendo 20 µL de la suspensión celular en 180 µL de solución de recuento de Turck (ácido acético glacial 3 %, agua milliQ 97 % y azul de metileno). Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^5 células/mL en medio de cultivo completo RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) con un 10 % de SBF (PAA Laboratories GmbH) y 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (PAA Laboratories GmbH).

3.2.3.- Recolección y preparación de timocitos de ratón

El timo se depositó en una placa de Petri con 10 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich), se disgregó mediante una rejilla estéril y las células se incubaron 15 minutos a 4° C con 3 mL de tampón de lisis 10X (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron tres veces con PBS estéril (Sigma-Aldrich) a 1200 R.P.M, 5 minutos a 4° C (Beckman-Coulter Allegra X22R). Los recuentos celulares se realizaron en la cámara de Neubauer disponiendo 20 µL de la suspensión celular en 180 µL de solución de recuento de Turck (ácido acético glacial 3 %, agua milliQ 97 % y azul de metileno). Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^5 células/mL en medio de cultivo completo RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) con un 10 % de SBF (PAA Laboratories GmbH) y 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (PAA Laboratories GmbH).

3.3.- Ensayos *ex vivo*

3.3.1.- Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Dicho ensayo se llevó a cabo empleando el compuesto 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) y siguiendo los pasos del ensayo de Mossman (Mossman, 1983). Una solución stock de MTT se preparó a una concentración de 5 mg/mL en PBS estéril (pH=7.2, Sigma-Aldrich); se esterilizó, se filtró (Millipore 0.22 µm) y se almacenó en oscuridad a 4° C. El MTT o sal de tetrazolio tiene la capacidad de difundir de forma pasiva hasta el interior de la mitocondrias de las células vivas donde es transformado en cristales de formazán con un color magenta característico. La concentración celular se ajustó a 5×10^5 células/mL (10^5 células/pocillo) en una placa microtiter de 96 pocillos (Nunc). Después del tratamiento correspondiente se añadieron 20 µL de la solución stock de MTT a cada pocillo y la placa se incubó

durante 4 horas a 37° C, en una atmósfera con el 5 % de CO₂ y humedad relativa del 98 %. Tras el periodo de incubación la placa se centrifugó a 1200 R.P.M (Beckman GS-6R) durante 5 minutos a 4° C, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los cristales precipitados en 150 µL de una solución de alcohol isopropílico (Panreac Química) con ácido clorhídrico a 0.04 N, con el objeto de disolver correctamente los cristales de formazán. La densidad óptica de la placa se leyó en un lector de placas microtiter (BioRad, mod. 680) a una longitud de onda de referencia de 620 nm y de medida 550 nm.

3.3.2.- Ensayo de proliferación celular con mitógenos en esplenocitos y timocitos de ratón.

El objetivo del ensayo es el de activar a los linfocitos del bazo y del timo con mitógenos específicos y cuantificar la proliferación celular de los mismos mediante la técnica anteriormente descrita del MTT (3.10.1). Una placa de 96 pocillos (Nunc) se dispuso a una concentración celular de 10⁵ células/pocillo (5x10⁵ células/mL) en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10 % de SBF (PAA Laboratories GmbH) y 1 % de antibiótico penicilina/esptreptomicina (PAA Laboratories GmbH). El mitógeno concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich) se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) y añadido a cada pocillo a una concentración de 50 mg/mL; se dispusieron pocillos en ausencia del tratamiento con los mitógenos que actuaron como control. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C en una atmósfera con un 5 % de CO₂ y una humedad relativa del 98%. Transcurridas las 24 horas de incubación se realizó el ensayo de viabilidad celular (MTT) y los valores se expresaron en valores de índices de estimulación linfocitaria respecto a la dieta control y animales tratados con PBS.

3.3.3.- Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esplenocitos de ratón.

El compuesto 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Sigma- Aldrich) difunde pasivamente al interior celular donde las esterasas intercelulares liberan los grupos acetato y el resto se oxida dando lugar a una molécula fluorescente. Una placa de 24 pocillos (Nunc) se preparó con 2x10⁶ esplenocitos/mL en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10 % de SBF (PAA Laboratories GmbH) y 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (PAA Laboratories GmbH). Las células se incubaron durante 1 hora a 37° C con H₂DCFDA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40 µM/pocillo. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS (Sigma-Aldrich) a 1200 rpm (Beckman-Coulter, Allegra X22R), 5 minutos y 4° C. Finalmente las células se resuspendieron en 500 µL de PBS (Sigma-Aldrich) y la emisión de fluorescencia fue cuantificada en

un fluorímetro (Genios plus, Tecan) a una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 530 nm. Los valores se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF).

3.3.4.- Determinación de citoquinas en sangre periférica de ratón

La sangre se extrajo con una pipeta Pasteur (Albus) a través del plexo retro-orbital ocular a las 0, 24 y 48 horas de ratones anestesiados tratados y no tratados e infectados con *Listeria monocytogenes*. La sangre se depositó en tubos heparinizados (BD Pharmigen) a una temperatura de 4° C. Acto seguido los elementos formes se separaron del suero centrifugando la sangre a 2000 R.P.M (Beckman GS-6R), 20 minutos a 5° C. Los sueros se almacenaron a -20° C para posteriores análisis, en alícuotas de 60 µL para el análisis de eicosanoides y de 30 µL para el análisis de citoquinas por citometría de flujo.

Las citoquinas se analizaron y cuantificadas empleando el kit de citometría Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex (eBioscience, San Diego, CA, USA), y siguiendo las instrucciones del fabricante; las citoquinas analizadas: Interleuquina (IL)-1- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, factor estimulador de colonias de granulocito-mastocito (GM-CSF), interferón (IFN)- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . Las muestras de cada ratón fueron dispuestas por duplicado y la curva patrón por triplicado.

3.3.5.- Cuantificación de la producción de eicosanoides

A partir de las alícuotas de 60 µL de los sueros de los ratones que han sido almacenadas a -20° C, se cuantificaron la producción de eicosanoides mediante un kit de ELISA colorimétrico. Los eicosanoides analizados: prostaglandina E2 (PGE₂), leucotrienos B4 (LTB₄) y tromboxano B2 (TXB₂); todos los ensayos se realizaron empleando kits de la misma casa comercial (Oxford Biomedical research, MI USA).

3.3.5.1.- Prostaglandina E2 (PGE₂)

Esta prostaglandina deriva de la PGH₂ que es sintetizada a partir del ácido araquidónico a través de la ruta de la ciclooxigenasa; la PGE₂ es producida por diversos tipos celulares como pueden ser fibroblastos, macrófagos y células epiteliales. Esta prostaglandina está implicada en la regulación de la función inmunológica y en la regulación de los procesos del sueño, entre otras actividades. La base del principio del ensayo es la competición que se lleva a cabo entre un conjugado enzimático y la PGE₂ presente en la muestra, por unirse a anticuerpos monoclonales de conejo anti-PGE₂ que recubren el interior de los pocillos de la placa del kit. La densidad óptica es inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂. Para la

realización del ensayo se dispusieron 50µL de las muestras de suero objeto de estudio y de los estándares del kit por duplicado. Los resultados se obtuvieron empleando un lector de placas microtiter (BioRad, mod. 680) para la determinación de la densidad óptica [D.O.]. Los resultados se expresaron como porcentajes de incremento respecto a los grupos control.

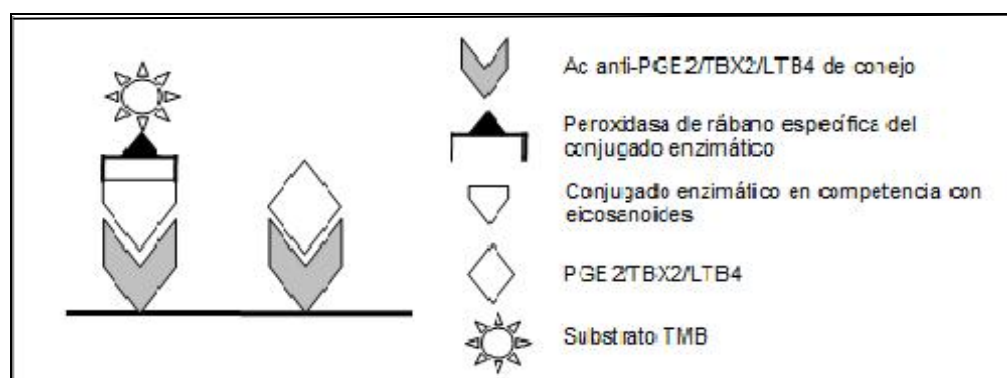
3.3.5.2.- Leucotrieno B4 (LTB4)

El LTB4 deriva del LTA4 que es sintetizado a partir del ácido araquidónico, es producido por células fagocíticas como macrófagos y es la sustancia quicio-atrayente más potente para leucocitos. El LTB4 juega un importante papel en los procesos inflamatorios ya que estimula la permeabilidad vascular. Al igual que el anterior, el ensayo está basado en la competición del mismo LTB4 con un conjugado enzimático por unirse a los anticuerpos de conejo que se encuentran en la placa del kit. Los resultados se expresaron como incremento de porcentaje respecto a los grupos control.

3.3.5.3.- Tromboxano B2 (TXB2)

El TXB2 es un producto hidrolizado estable del TXA2 que es inestable y deriva de la PGH2, esta como se cita en el primer apartado (3.3.5.1) deriva del ácido araquidónico a través de la ruta de la ciclooxigenasa. La principal actividad del TXB2 es la inducción de la agregación plaquetaria y de otros productos como colágeno y trombina. Los tipos celulares productores de este tipo de molécula son plaquetas, macrófagos y fibroblastos. Aunque sigue el mismo principio de los dos anteriores ensayos (3.3.5.1 y 3.3.5.2), este caso el conjugado enzimático compete con el TXB2 por unirse a los anticuerpos anti-eicosanoide de conejo.

Figura 11. ELISA. Descripción reconstructiva de la reacción llevada a cabo en los pocillos de la placa de los kits de detección de eicosanoides. A mayor densidad óptica y color azul menor cantidad de eicosanoide.



Abreviaturas: Ac, anticuerpo; PGE2, prostaglandina E2; TBX2, tromboxano X2; LTB4, leucotrieno B4; TMB, tetrametil bendidina.

3.3.6.- Inmunofenotipaje en sangre periférica de ratón mediante citometría de flujo

El inmunofenotipaje es un método en que los anticuerpos son usados para la detección de antígenos celulares en las muestras de estudio. El objetivo del ensayo es la determinación del perfil inmunológico de muestras de sangre periférica de ratón sometido a una infección experimental con *Listeria monocytogenes*, mediante una técnica de citometría de flujo. Los ratones se trataron con CPA, GK 1,5, RB6-8C5 o PBS (control); y se alimentaron durante un mes con una dieta baja en grasas (control), de girasol, oliva virgen extra, oliva ecológico o de aceite de pescado. La sangre se extrajo del plexo retro-orbital ocular empleando una pipeta Pasteur (Albus) y fue depositada en Eppendorff de 1,5 mL (Daslab) heparinizados (heparina Analema) a 4° C, 500 µL de cada ratón se transfirieron a cinco tubos experimentales (BD). Cada uno de los cinco tubos con los 100 µL de sangre, llevaban una combinación distinta de anticuerpos monoclonales unidos a fluoróforos con afinidad a marcadores de superficie específicos de células linfocitarias, y se detectaron y cuantificaron por cada uno de los tres láseres del citómetro (FL-1, FL-2 y FL-3); a continuación se detallan las cantidades de anticuerpos monoclonales que se emplearon:

Tabla 12. Cantidades de anticuerpos monoclonales necesarios en el inmunofenotipaje.

Tubo/ Anticuerpo	Anti-CD3e	Anti-CD4	Anti-CD8a	Anti-CD16/CD32	Anti-CD19
1	Solo 100 µL de sangre				
2	2 µL		2 µL		
3		4 µL			
4				2 µL	
5					4 µL

Los tubos con los anticuerpos monoclonales específicos como se detalla anteriormente (Tabla 12), se incuban en oscuridad a 4° C durante 40 minutos. Transcurrido el periodo de incubación con los anticuerpos monoclonales (tabla 6), se lisaron los glóbulos rojos con 1,5 mL de tampón de lisis que contenía un 30 % (p/v) de peróxido de hidrógeno (Sigma), durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la realización del protocolo de lisis en los glóbulos rojos, los tubos experimentales se centrifugaron a 1200 r.p.m (Beckman-Coulter Allegra 22R), 5 minutos a 4° C; y los sobrenadantes se desecharon para eliminar el tampón de lisis (Sigma). A continuación los tubos experimentales se lavaron dos veces con PBS 1x (Sigma-Aldrich), durante 5 minutos a 1200 r.p.m (Beckman-Coulter Allegra 22R) y a una temperatura de 4° C. En todos los lavados los sobrenadantes se decantaron con el objetivo de retirar el exceso de anticuerpo monoclonal unido a fluoróforo. Por último tras haber realizado el último lavado, los precipitados se resuspendieron en 500 µL de Facs Flow (BD) y se analizaron empleando los tres canales o láseres (FL-1, FL-2 y FL-3)

del citómetro (BD FACScalibur). Todos los anticuerpos monoclonales empleados en el ensayo se suministraron por el mismo fabricante (BD-Pharmigen; BD Biosciences, San Diego, CA USA); las especificaciones de cada uno de los anticuerpos se pueden observar en la siguiente tabla (Tabla 13):

Tabla 13. Especificaciones de BD-Pharmigen sobre los anticuerpos monoclonales empleados.

Marcador	Fluoróforo	Procedencia	Especificación	Clon	[(mg/mL)]	Láser
CD3	FITC	Hámster	Anti-mouse CD3e	145-2611	0,5	FL-1
CD4	PerCP	Rata	Anti-mouse CD4	RM4-5	0,2	FL-3
CD8	PE		Antimouse CD8a	53-6.7		FL-2
CD16/32			Anti-mouse	2.4G2		FL-2
CD19	PerCP-Cy 5.5		Anti-mouse CD19	1D3		FL-3

Abreviaturas: FITC, fluoresceína isotiocianato; PerCP, complejo proteínico peridina-clorofila; PE, ficoeritrina; PerCP-Cy, proteína peridina-clorofila con extremo de cianina; FL, láser de fluorescencia.

Previamente a la realización del ensayo es necesario llevar a cabo una calibración del citómetro con los isotipos control de los anticuerpos monoclonales unidos a fluoróforos que han sido empleados en el presente ensayo; la finalidad de este procedimiento es la de establecer un control negativo de las subpoblaciones linfocitarias objeto de estudio. La siguiente tabla (Tabla 14) muestra los isotipos controles empleados (BD-Pharmigen; BD Biosciences, San Diego, CA USA):

Tabla 14. Especificaciones de BD-Pharmigen sobre los isotipos controles empleados en la calibración del citómetro (BD FACScalibur).

Isotipo	Fluoróforo	Procedencia	Especificación	[(mg/mL)]	Contenido (mg/mL)
CD3	FITC	Hámster	IgG ₁ , κ Isotype control	0,5	0,25 / 0,5
CD4	PerCP	Rata	IgG _{2a} , κ Isotype control	0,2	0,1 / 0,5
CD8	PE		IgG _{2a} , κ Isotype control		
CD16/CD32			IgG _{2b} , κ Isotype control		
CD19	PerCP-Cy 5.5		IgG _{2a} , κ Isotype control		

Abreviaturas: FITC, fluoresceína isotiocianato; PerCP, complejo proteínico peridina-clorofila; PE, ficoeritrina; PerCP-Cy, proteína peridina-clorofila con extremo de cianina; IgG, inmunoglobulina G.

3.4.- Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en todos los ensayos en forma de media \pm error estándar asociado a la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el análisis de la varianza, teniendo como objeto la comparación de los efectos producidos por las distintas dietas respecto al grupo control (dieta baja en grasas), y de los diferentes inmunosupresores respecto al control de los mismos (PBS). Las medias se compararon empleando para ello el test de Fisher (Fisher's least significant difference, LSD test). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- Ensayos *in vivo* y *ex vivo*

4.1.1.- *Peso de los ratones después del tratamiento con los inmunosupresores (CPA, GK 1,5 y RB6-8C5) y tras la infección experimental con Listeria monocytogenes.*

Después de la infección experimental con *L. monocytogenes*, el peso de los ratones alimentados con sus respectivas dietas lipídicas y tratados con los correspondientes inmunosupresores; en ningún caso, el tratamiento con los agentes inmunosupresores produjo una disminución en el peso corporal de los ratones tratados. Las diferencias estadísticas significativas cuando existieron fueron entre subgrupos de dieta sometidos a un mismo tratamiento inmunosupresor (Tabla 15).

En el grupo de ratones control (PBS), los que fueron alimentados con una dieta constituida con aceite de oliva ecológico mostraron un incremento significativo del peso a las 48 h, respecto a los alimentados con las demás dietas.

El grupo tratado con CPA mostró una disminución significativa del peso corporal de los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado en el momento de la de la infección experimental.

Los ratones inmunosuprimidos con GK 1.5 mostraron una reducción significativa en el peso de los mismos que fueron alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado tanto a las 24 como a las 48 h; y un aumento significativo en el peso de los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de girasol a las 24 y 48 h después de la infección con *L. monocytogenes*.

En el grupo tratado con RB6-8C5 se encontraron diferencias estadísticas significativas con un aumento en el peso de los ratones alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de pescado a las 24 h, respecto a los ratones alimentados con la dieta baja en grasas en el mismo punto de tiempo (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en el **peso corporal** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Peso ratón (g)	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	24,35 ± 0,99	23,17 ± 1,41	21,97 ± 1,99	23,38 ± 1,59	20,19 ± 0,68	22,53 ± 1,37
Aceite de oliva	21,5 ± 1,82	22,97 ± 2,77	24,65 ± 1,49	20,62 ± 0,44	19,63 ± 1,20	19,64 ± 1,76
Aceite de oliva ecológico	22,23 ± 0,79	20,78 ± 1,25	26,24 ± 1,15*	20,31 ± 0,69	21,99 ± 2,10	22,18 ± 2,17
Aceite de pescado	22,81 ± 0,94	19,39 ± 0,74	20,95 ± 0,44	18,81 ± 0,20*	19,12 ± 0,21	18,87 ± 1,21
Aceite de girasol	20,65 ± 2,40	23,06 ± 0,31	24,78 ± 2,87	23,61 ± 2,80	22,23 ± 1,89	20,07 ± 0,79
Tiempo post-infección (h)	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	23,67 ± 0,60	21,63 ± 0,97	22,4 ± 0,01	19,67 ± 0,81	16,19 ± 5,90	19,33 ± 0,67
Aceite de oliva	23,7 ± 2,21	26,1 ± 1,80	25,13 ± 2,30	21,17 ± 2,97	26,47 ± 3,40*	23,98 ± 1,04
Aceite de oliva ecológico	27,97 ± 3,11	23,5 ± 0,87	24,13 ± 2,08	21,91 ± 1,02	21,37 ± 0,45	25,39 ± 3,85
Aceite de pescado	23,6 ± 1,41	19,33 ± 3,05*	22,25 ± 0,79*	21,34 ± 1,07	23,32 ± 0,94*	20,89 ± 0,63
Aceite de girasol	27,27 ± 1,86	26,77 ± 1,50*	27,43 ± 1,65*	20,91 ± 0,88	20,78 ± 0,99	24,41 ± 1,65

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticas significativas.

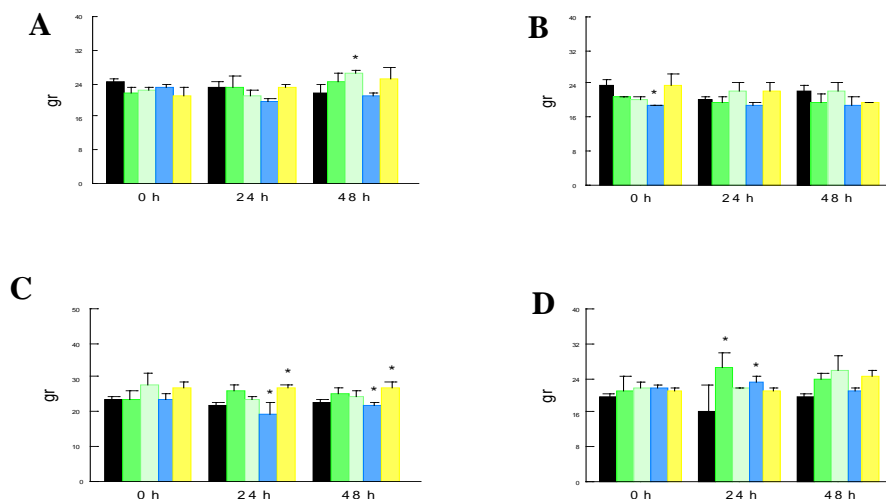


Figura 11. Peso de los ratones en gramos alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]). Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los ratones se pesaron por triplicado. Las barras corresponden a la media ± error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.2.- Peso de los órganos (bazos, hígados y timos) de los ratones después del tratamiento con los inmunosupresores y tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

Los grupos de los ratones que fueron tratados con CPA y GK 1,5 mostraron diferencias estadísticas significativas en el peso del bazo entre los distintos subgrupos de dieta; por el contrario los grupos que tratados con PBS y RB6-8C5 no mostraron diferencias significativas entre las diferentes dietas (Tabla 16).

Dentro del grupo de CPA se encontró una disminución significativa en el peso de los bazos de ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado a las 48 h post-infección, respecto a los alimentados con las dietas de aceite de oliva y girasol.

Los ratones que fueron tratados con el agente inmunosupresor GK 1,5 y alimentados con una dieta basada en aceite de pescado, presentaron un incremento significativo en el peso del bazo respecto a las demás dietas a las 24 h de la infección experimental.

Los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, no sobrevivieron a la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en el **peso del bazo** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

<u>Peso bazo (mg)</u>	PBS		CPA	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	290 ± 125	163 ± 013	73 ± 025	110 ± 027
Aceite de oliva	367 ± 058	300 ± 0	167 ± 058	200 ± 082
Aceite de oliva ecológico	117 ± 035	157 ± 021	50 ± 010	125 ± 050
Aceite de pescado	213 ± 006	237 ± 124	123 ± 025	60 ± 014*
Aceite de girasol	105 ± 007	360 ± 017	57 ± 012	213 ± 075
	GK 1,5		RB6-8C5	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	107 ± 040	158 ± 038	250 ± 030	170 ± 012
Aceite de oliva	157 ± 040	85 ± 013	233 ± 115	200 ± 100
Aceite de oliva ecológico	160 ± 053	98 ± 005	133 ± 021	140 ± 036
Aceite de pescado	283 ± 029*	108 ± 065	203 ± 029	-
Aceite de girasol	193 ± 012	110 ± 041	123 ± 006	440 ± 467

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticas significativas.

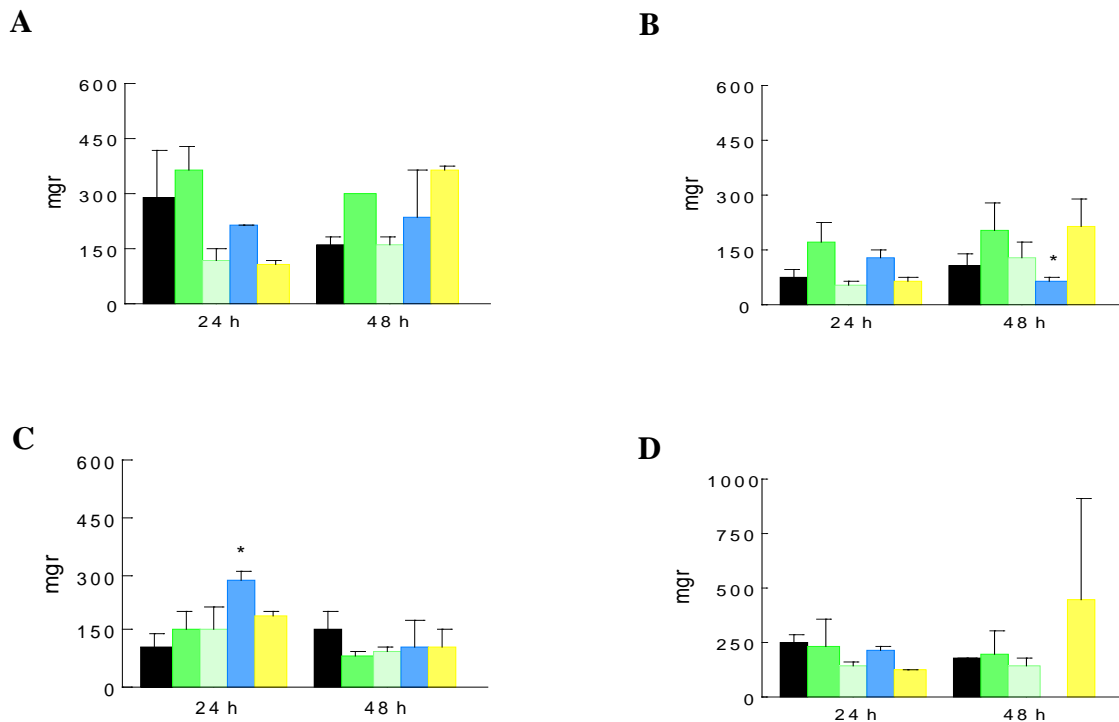


Figura 12. Peso en miligramos de los bazos de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]). Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los bazos se pesaron por triplicado. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La Tabla 17 representa los pesos de los hígados de los diferentes grupos a las 24 y 48 h después de la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. No se observó diferencias estadísticamente significativas respecto al peso de los mismos en los grupos de PBS y CPA; en cambio si se observaron diferencias significativas en los grupos de GK 1,5 y RB6-8C5.

El grupo tratado con GK 1,5 mostró un incremento estadísticamente significativo a las 24 h post-infección en los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado respecto a los alimentados con dieta control. Los ratones tratados con RB6-8C5 reflejaron un aumento significativo en el peso del hígado con la dieta de aceite de oliva a las 24 h respecto a las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de girasol.

Los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, no sobrevivieron a la infección experimental con *L.monocytogenes* (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en el **peso del hígado** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

<u>Peso hígado (g)</u>	PBS		CPA	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	1,48 ± 0,18	1,23 ± 0,13	1,23 ± 0,06	1,15 ± 0,13
Aceite de oliva	1,47 ± 0,12	1,47 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,23 ± 0,10
Aceite de oliva ecológico	1,4 ± 0,24	1,13 ± 0,26	1,32 ± 0,10	1,08 ± 0,05
Aceite de pescado	1,26 ± 0,09	1,48 ± 0,21	1,09 ± 0,02	1,11 ± 0,03
Aceite de girasol	1,09 ± 0,42	0,97 ± 0,07	1,14 ± 0,10	1,29 ± 0,18
	GK 1,5		RB6-8C5	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	1,18 ± 0,24	1,06 ± 0,05	1,37 ± 0,13	1,39 ± 0,08
Aceite de oliva	1,23 ± 0,12	1,13 ± 0,05	1,83 ± 0,15*	1,5 ± 0,17
Aceite de oliva ecológico	1,27 ± 0,15	1,20 ± 0,10	1,41 ± 0,19	1,28 ± 0,02
Aceite de pescado	1,48 ± 0,10*	1,18 ± 0,16	1,31 ± 0,12	-
Aceite de girasol	1,47 ± 0,15	1,3 ± 0,10	1,11 ± 0,08	1,06 ± 0,10*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=7 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ se consideraron diferencias estadísticas significativas.

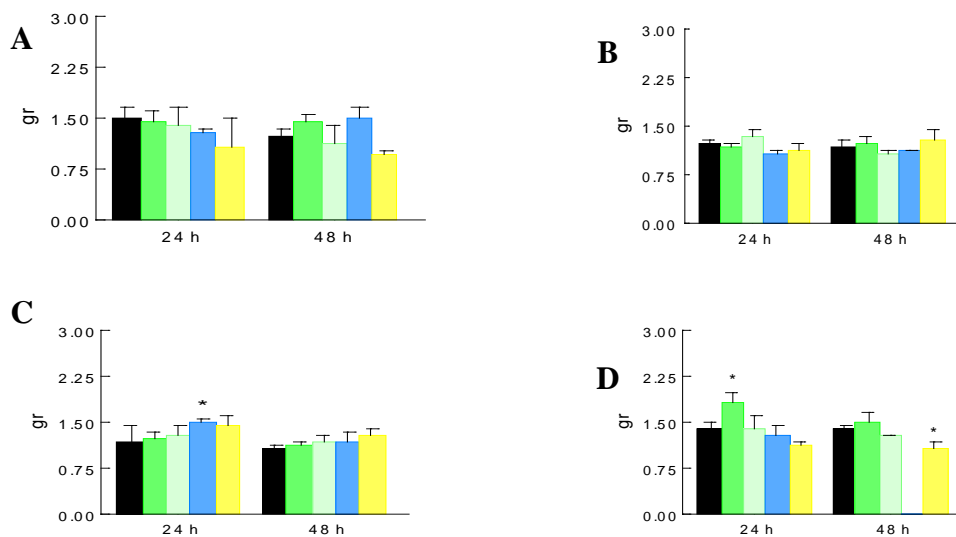


Figura 13. Peso en gramos de los hígados de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]). Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los hígados se pesaron por triplicado. Las barras corresponden a la media ± error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

El peso del timo (Tabla 18) mostró diferencias estadísticas significativas en los grupos de CPA y RB6-8C5; por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los grupos de PBS y GK 1,5.

Los ratones tratados con CPA y alimentados con la dieta basada en aceite de pescado, reflejaron un incremento significativo en el peso de los timos a las 48 h respecto a la dieta baja en grasas; los pesos de los timos de ratones alimentados con la dieta de girasol a las 24 h, también mostraron un aumento significativo respecto a las restantes dietas.

Dentro del tratamiento con RB6-8C5, se observó un aumento significativo en el peso de los timos de ratones alimentados con la dieta basada en aceite de oliva ecológico a las 48 h, en comparación a las dietas baja en grasas y de aceite de oliva no ecológico, después de la infección experimental. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en el **peso del timo** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

<u>Peso timo (mg)</u>	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	67 ± 39	36 ± 16	44 ± 33	7 ± 02	8 ± 01	15 ± 09
Aceite de oliva	52 ± 22	96 ± 14	59 ± 39	48 ± 38	3 ± 01	29 ± 11
Aceite de oliva ecológico	30 ± 18	19 ± 03	29 ± 27	9 ± 01	10 ± 11	38 ± 11
Aceite de pescado	33 ± 29	47 ± 45	13 ± 03	7 ± 02	31 ± 25	67 ± 22*
Aceite de girasol	61 ± 34	64 ± 37	51 ± 30	12 ± 06	66 ± 29*	48 ± 32
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	40 ± 27	48 ± 18	9 ± 07	34 ± 06	47 ± 20	139 ± 44
Aceite de oliva	34 ± 10	36 ± 31	44 ± 31	48 ± 16	50 ± 13	132 ± 53
Aceite de oliva ecológico	67 ± 22	24 ± 18	45 ± 46	40 ± 07	48 ± 14	187 ± 19*
Aceite de pescado	62 ± 41	22 ± 20	33 ± 37	52 ± 05	45 ± 11	-
Aceite de girasol	76 ± 03	55 ± 31	30 ± 12	41 ± 14	54 ± 09	166 ± 21

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

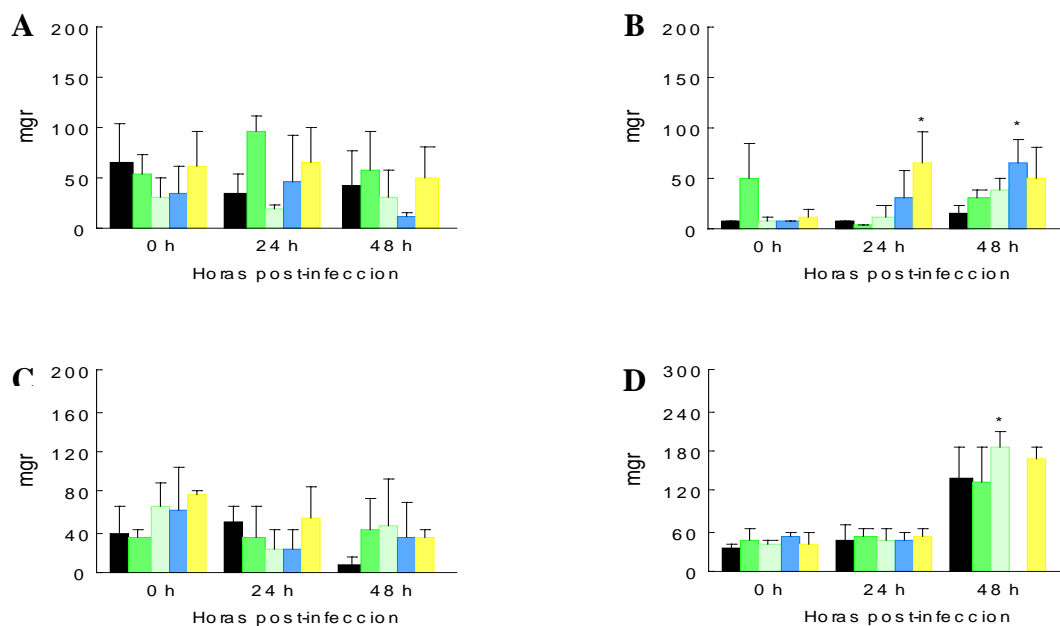


Figura 14. Peso en miligramos de los timos de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]). Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los timos se pesaron por triplicado. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.3.- Índices esplénicos de los ratones sometidos a inmunosupresión y tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*.

El índice esplénico indica la proporción del peso del bazo respecto al peso corporal del animal y se relaciona con un cuadro de esplenomegalia asociado a la infección por *Listeria monocytogenes*. La Tabla 19 representan los índices esplénicos a las 24 y 48 h después de la infección experimental con *L. monocytogenes*. Los grupos de CPA y GK 1,5 mostraron diferencias significativas, en cambio no se encontraron en los grupos tratados con PBS y RB6-8C5.

Dentro del grupo de ratones que fue tratado con CPA, se encontró una reducción significativa en el índice esplénico de ratones alimentados con una dieta basada en aceite de pescado a las 48 h post-infección, respecto a las dietas basadas en aceite de girasol y aceite de oliva.

En el grupo del inmunosupresor GK 1,5 se observó un incremento significativo del índice esplénico respecto a las demás dietas, en ratones que fueron alimentados con una dieta basada en aceite de pescado a las 24 h de la infección experimental con *L. monocytogenes*.

Los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, no sobrevivieron a la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 19).

Tabla 19. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en el **índice esplénico** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Índice esplénico $\times 10^{-3}$	PBS		CPA	
	24	48	24	48
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	12,64 \pm 5,9	7,42 \pm 0,63	3,66 \pm 1,37	4,85 \pm 0,89
Aceite de oliva	15,26 \pm 0,49	12,37 \pm 0,84	8,4 \pm 2,56	10,35 \pm 4,36
Aceite de oliva ecológico	5,35 \pm 2,21	5,91 \pm 0,49	2,26 \pm 0,24	5,64 \pm 2,13
Aceite de pescado	10,56 \pm 0,38	11,4 \pm 6,06	6,45 \pm 1,27	3,25 \pm 1,11*
Aceite de girasol	4,58 \pm 0,37	13,74 \pm 0,38	2,54 \pm 0,37	10,64 \pm 3,88
	GK 1,5		RB6-8C5	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	4,96 \pm 2,03	7,04 \pm 1,72	13,87 \pm 2,28	9,99 \pm 2,09
Aceite de oliva	5,98 \pm 1,3	3,41 \pm 0,63	8,99 \pm 4,93	8,53 \pm 4,24
Aceite de oliva ecológico	6,86 \pm 2,44	4,13 \pm 0,37	6,17 \pm 0,95	5,44 \pm 2,05
Aceite de pescado	14,07 \pm 3,65*	4,81 \pm 2,91	9,04 \pm 1,62	-
Aceite de girasol	7,24 \pm 0,68	3,96 \pm 1,28	5,94 \pm 0,01	4,99 \pm 0,38

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=7 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

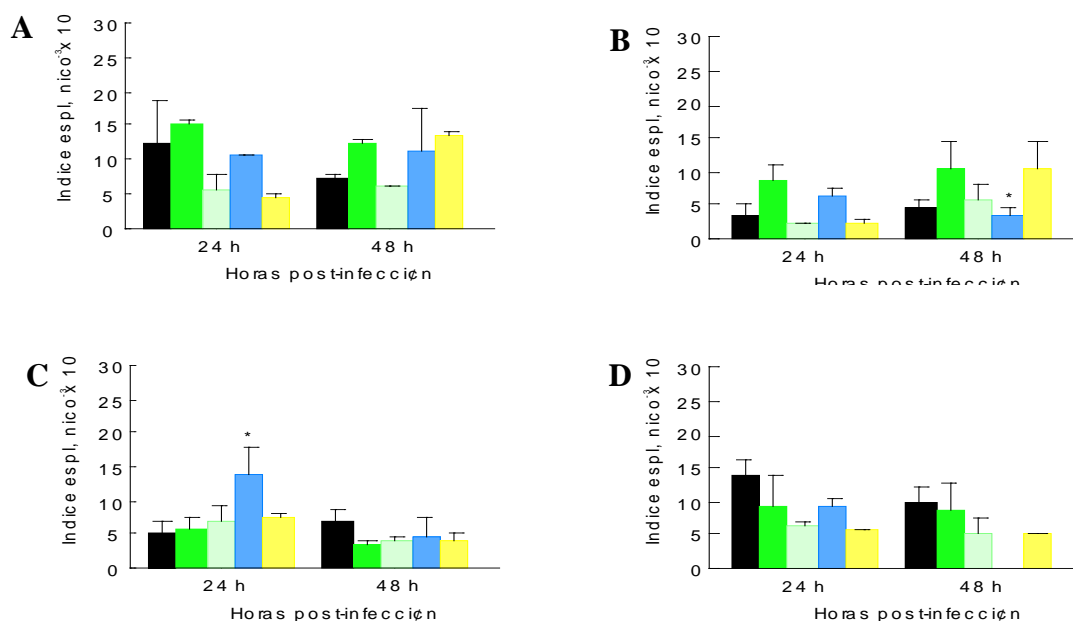


Figura 15. Índice esplénico ($\times 10^{-3}$) de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]). Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los índices esplénicos se realizaron por triplicado. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.4.- Ensayo de supervivencia frente a *Listeria monocytogenes* en ratones sometidos a inmunosupresión

La Figura 16 muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones no inmunosuprimidos (PBS) (figura 16A), y que se sometieron a un proceso de inmunosupresión con CPA (figura 16B), GK1,5 (figura 16C) y RB6-8C5 (figura 16D); frente a una dosis letal (10^5 UFC) de una cepa virulenta de *Listeria monocytogenes* por vía endovenosa. La gráfica representa el porcentaje de ratones que sobreviven en los distintos días después de la infección experimental con el patógeno.

En todos los casos pueden observarse bajos porcentajes de supervivencia en los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado transcurridos 2 días desde la infección experimental; en los grupos de tratamiento control (figura 16A), CPA (figura 16B) y GK 1.5 (figura 16C) existieron incrementos del 70%-80% en la mortalidad de los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado en el día 2, y en el día 3 el porcentaje de supervivencia fue del 10 % en estos tratamientos.

En el caso de ratones alimentados con aceite de pescado y tratados con RB6-8C5 (figura 16D) murieron todos en las 48 h posteriores a la infección experimental. También con este tratamiento todos los ratones alimentados con las demás dietas reflejaron bajos porcentajes de supervivencia del 20 %-10 %; este hecho implicaría el papel fundamental de los granulocitos en las primeras etapas del control de la infección bacteriana.

Los ratones alimentados con la dieta baja en grasas mostraron porcentajes de supervivencia del 70% (PBS), 60% (GK 1.5) y del 50% (CPA).

Los ratones alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva virgen extra ecológico, mostraron mayores porcentajes de supervivencia respecto a los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado en todos los tratamientos excepto con RB6-8C5. En el tratamiento con GK 1.5 (figura 16C), los ratones alimentados con estas dos dietas que contenían aceite de oliva mostraron porcentajes de supervivencia del 90 %; este tipo de grasa mostró claras ventajas ante una depleción de células T CD4+.

El porcentaje de supervivencia de los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de girasol fue similar al de ratones control y alimentados con la dieta de aceite de oliva en los controles y tratados con CPA; sin embargo en los tratamientos con GK 1.5 y RB6-8C5 el porcentaje de supervivencia fue inferior al 50%.

Figura 16A

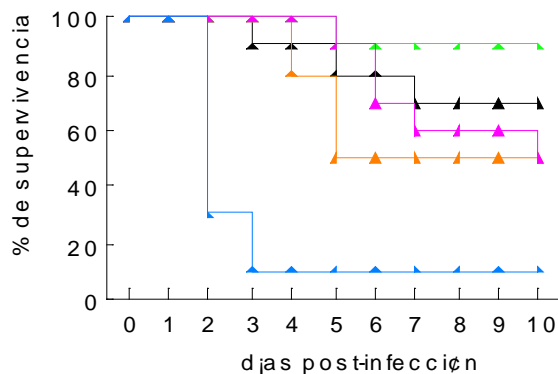


Figura 16B

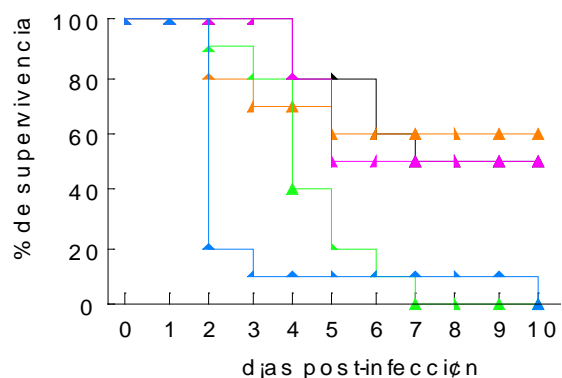


Figura 16C

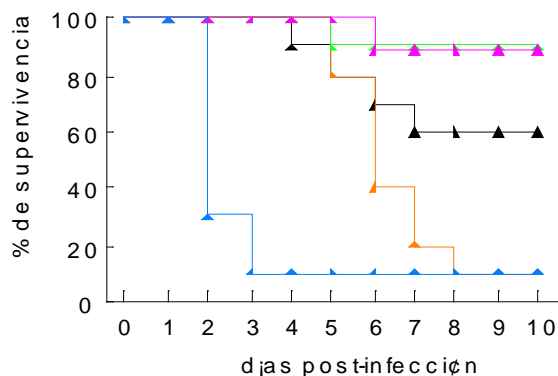


Figura 16D

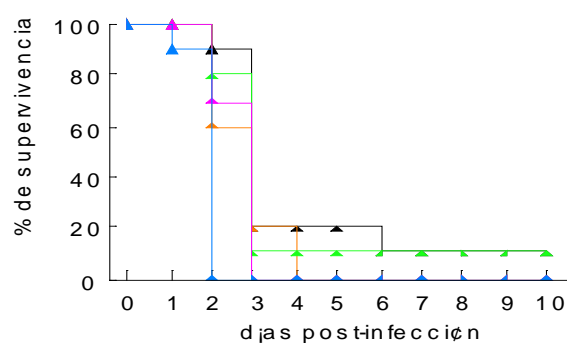


Figura 12. Medida del porcentaje de supervivencia durante una infección experimental con *Listeria monocytogenes* de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados por vía intraperitoneal con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con las dietas lipídicas durante 4 semanas ($n=10$ en cada subgrupo de dieta), se les inyectó vía intraperitoneal PBS estéril (grupo control), CPA, GK 1.5 o RB6-8C5; y seguidamente infectados por vía intravenosa con *L. monocytogenes* (10^6 unidades formadoras de colonias [UFC]/mL). La línea negra representa el porcentaje de supervivencia de ratones control alimentados con la dieta baja en grasas (—▲—). La línea azul representa el porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado (—▲—). La línea verde representa el porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva virgen extra (—▲—). La línea rosa representa el porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico (—▲—). La línea naranja representa el porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con la dieta de aceite de girasol (—▲—). Los datos expresan los resultados totales de cuatro experimentos independientes y fueron analizados mediante el test de mortalidad de Kaplan-Meier.

4.1.5.- Recuperación de bacterias viables en bazo e hígado de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5

La recuperación de bacterias viables en bazo se refleja en la Tabla 20, todos los grupos tratados mostraron diferencias significativas entre las distintas dietas lipídicas. En el grupo control (PBS) a las 24 y 48 h, existió una disminución significativa en la recuperación de bacterias viables del subgrupo de la dieta baja en grasas respecto a las demás dietas; sin embargo el subgrupo de aceite de pescado reflejó un incremento significativo a las 24 y 48 h por encima de los demás

subgrupos. En el grupo tratado con CPA los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado reflejaron un aumento significativo de las bacterias viables en el bazo respecto a las demás dietas a las 24 y 48 h después de la infección experimental con la bacteria patógena.

Dentro del grupo que fue tratado con el inmunosupresor GK 1,5 existió una reducción significativa a las 24 h en el subgrupo de aceite de oliva ecológico respecto a todos los demás subgrupos alimentados con dietas; y un aumento significativo en las bacterias viables en bazos de ratones alimentados con la dieta baja en grasas a las 48 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de oliva ecológico. Los animales que fueron alimentados con la dieta basada en aceite de oliva ecológico mostraron una disminución significativa a las 24 h en el número de bacterias viables recuperadas de bazo respecto a los animales alimentados con las demás dietas, y las 48 h respecto a los alimentados con las dietas de aceite de pescado y baja en grasas. Los ratones alimentados con la dieta basada en aceite de pescado, reflejaron un aumento significativo en las bacterias viables recuperadas en bazo a las 48 h en comparación a los ratones alimentados con las demás dietas.

En el grupo tratado con RB6-8C5 se evidenció un aumento significativo en las bacterias viables recuperadas de los bazos de ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado a las 24 h respecto a los animales alimentados con la dieta baja en grasas; y un incremento en los animales alimentados con la dieta rica en aceite de girasol a las 48 h también respecto al subgrupo de baja en grasas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **recuperación de bacterias viables en bazo** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Bazo (log₁₀)	PBS		CPA	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	1,3 ± 0,30*	1,25 ± 0,50*	2,43 ± 0,23	2,56 ± 0,54
Aceite de oliva	3,06 ± 0,40	3,69 ± 0,36	2,72 ± 0,10	3,12 ± 0,24
Aceite de oliva ecológico	2,49 ± 0,20	3,81 ± 0,58	2 ± 0	2,5 ± 0,38
Aceite de pescado	3,95 ± 0,65*	5,96 ± 0,65*	4,47 ± 0,40*	6,1 ± 0,20*
Aceite de girasol	3,16 ± 0,28	4,9 ± 1,02	2,53 ± 0,21	2,9 ± 0,42
	GK 1,5		RB6-8C5	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	3,4 ± 0,17	4,06 ± 0,29*	2,66 ± 0,05	4,12 ± 1,06
Aceite de oliva	2,78 ± 0,16	3,08 ± 0,15	3,69 ± 0,36	5,53 ± 0,81
Aceite de oliva ecológico	1,99 ± 0,03*	3,25 ± 0,62	3,53 ± 0,72	5,3 ± 0,30
Aceite de pescado	3,26 ± 0,24	4,83 ± 0,57*	4,75 ± 0,50*	-
Aceite de girasol	3,13 ± 0,46	3,73 ± 0,20	4,07 ± 0,21	6,52 ± 0,68*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=7 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

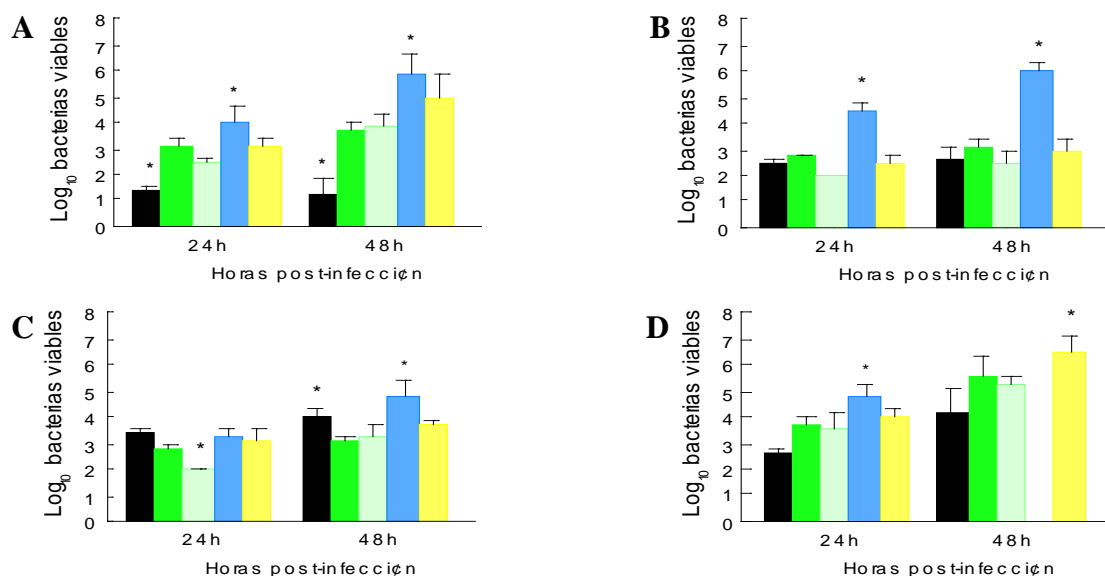


Figura 17. Recuperación de *Listeria monocytogenes* viables a partir del bazo de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Las bacterias se aislaron tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados del recuento del número de colonias bacterianas se expresaron como log₁₀ de bacterias viables. Las barras corresponden a la media ± error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La Tabla 21 muestra la recuperación de bacterias viables en hígado donde también todos los grupos tratados y el control (PBS) mostraron diferencias significativas. En el grupo de PBS, los ratones alimentados con la dieta baja en grasas mostraron una disminución significativa a las 24 y 48 h, respecto a todos los ratones alimentados con las demás dietas. La recuperación de bacterias viables en hígado de los animales alimentados con la dieta rica en aceite de pescado a las 24 h se incrementó de forma significativa respecto a los subgrupos alimentados con la dieta baja en grasas y la dieta que contenía aceite de oliva ecológico; y a las 48h respecto a los todos los demás subgrupos alimentados.

Los ratones tratados con el inmunosupresor CPA y alimentados con la dieta de aceite de pescado mostraron un incremento significativo en la recuperación de bacterias viables de hígado a las 24 y 48 h respecto a los animales alimentados con las demás dietas; a las 48 h se destacó una disminución significativa del número de bacterias viables en el subgrupo alimentado con la dieta baja en grasas respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado.

En el grupo de ratones tratados con GK 1,5 se incrementó significativamente el número de bacterias viables en los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado a las 24 h respecto a los subgrupos alimentados con la dieta baja en grasas y la dieta rica en aceite de oliva ecológico; a las 48 h se produjo un incremento significativo del subgrupo alimentado con la dieta baja en grasas en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de oliva. Los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico mostraron una reducción significativa en la recuperación de bacterias viables a las 48 h, respecto a los subgrupos alimentados con la dieta de aceite de pescado y aceite de girasol. El subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado fue significativamente mayor a todos los demás a las 48 h, y el alimentado con la dieta de aceite de girasol también se incremento de forma significativa respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de aceite de oliva y aceite de pescado.

Dentro del grupo de tratamiento con RB6-8C5 se destaca un incremento significativo en la recuperación de bacterias viables en los animales alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado a las 24 h respecto al subgrupo de ratones alimentados con la dieta baja en grasas; a las 48 h el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol se incremento significativamente respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y el subgrupo de dieta baja en grasas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 21).

Tabla 21. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **recuperación de bacterias viables en hígado** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 24 y 48 h post-infección. (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Hígado (\log_{10})	PBS		CPA	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	1,46 ± 0,15*	2,07 ± 0,50*	2,98 ± 0,30	2,92 ± 0,85*
Aceite de oliva	3,53 ± 0,68	3,53 ± 0,68	3,25 ± 0,52	4,02 ± 0,68
Aceite de oliva ecológico	3,18 ± 0,36	4,77 ± 1,57	2,83 ± 0,72	4,56 ± 0,30
Aceite de pescado	5,17 ± 0,51*	5,77 ± 0,68*	4,87 ± 0,23*	6,09 ± 0,07*
Aceite de girasol	3,5 ± 0,34	3,5 ± 0,34	3,16 ± 0,28	3,65 ± 0,40
	GK 1,5		RB6-8C5	
Tiempo post-infección (h)	24	48	24	48
Baja en grasas	3 ± 0	3,58 ± 0,68*	3,56 ± 0,31	4,63 ± 0,53
Aceite de oliva	3,19 ± 0,17	2,5 ± 0,14	4,38 ± 0,43	5,49 ± 0,50
Aceite de oliva ecológico	2,59 ± 0,53	2,49 ± 0,16*	4,67 ± 0,35	4,77 ± 0,68
Aceite de pescado	3,95 ± 0,09*	4,88 ± 0,51*	5,14 ± 0,47*	-
Aceite de girasol	3,26 ± 0,24	3,52 ± 0,33*	4,93 ± 0,48	6,19 ± 0,27*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=7 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

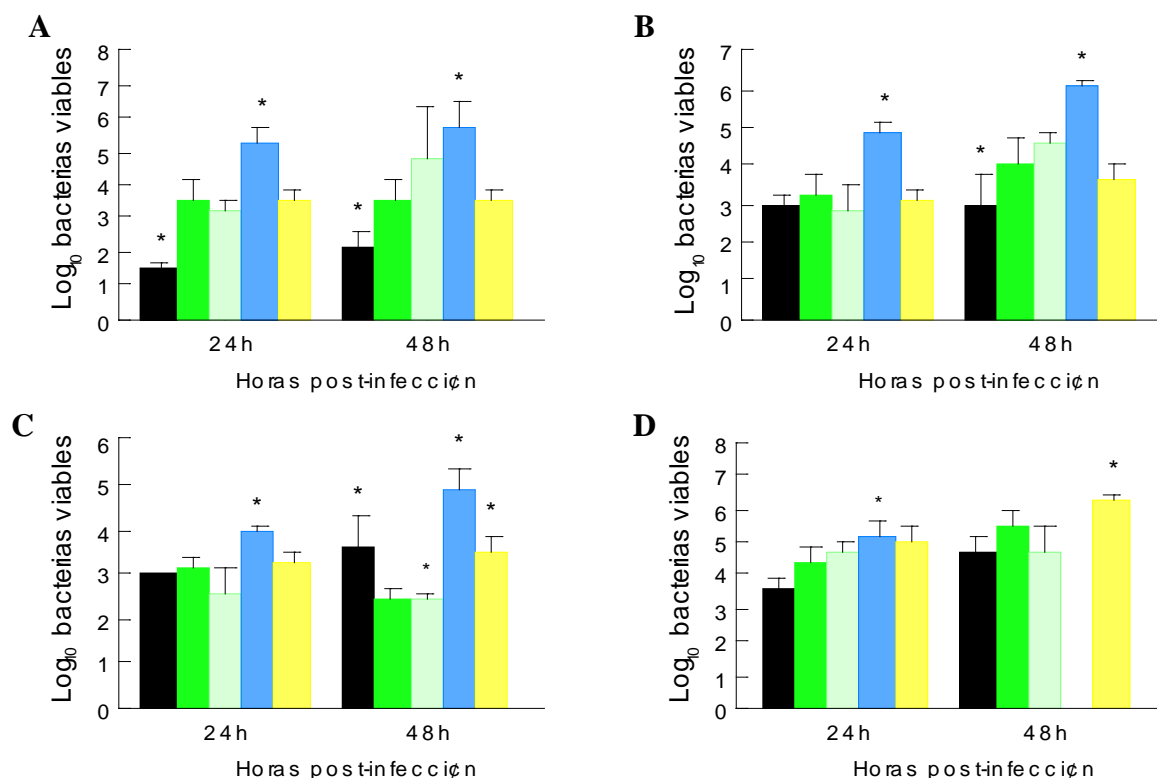


Figura 18. Recuperación de *Listeria monocytogenes* viables a partir del hígado de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D). Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente por vía intravenosa con *L. monocytogenes* (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Las bacterias fueron aisladas tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados del recuento del número de colonias bacterianas fueron expresados como \log_{10} de bacterias viables. Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.6.- Ensayo de proliferación celular con mitógenos en esplenocitos y timocitos (linfoproliferación), de los ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5.

La siguiente tabla (Tabla 22) representa el porcentaje de incremento del índice de estimulación en bazo en presencia y ausencia del mitógeno concanavalina A (Con A), respecto a la dieta baja en grasas (100 % de estimulación) después de la infección experimental con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^4 UFC).

El grupo de animales control tratado con PBS en ausencia de concanavalina A, reflejó un incremento significativo a las 24 h del porcentaje de estimulación en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de girasol y aceite de oliva ecológico. En el grupo de PBS estimulado con concanavalina A, se encontró una

disminución significativa en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico a las 0 h respecto a los animales alimentados con las demás dietas ensayadas; sin embargo los ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado a las 24 y 48 h, reflejaron un incremento significativo en los dos puntos de tiempo respecto a los animales alimentados con las dietas de aceite de girasol y aceite de oliva (Tabla 22).

En el grupo de ratones tratados con CPA en ausencia del mitógeno, se encuentra una reducción significativa en los ratones alimentados con la dietas basadas en aceite de oliva ecológico y aceite de oliva a las 0 h, respecto a los alimentados con las dietas de aceite de girasol y aceite de pescado; y un incremento significativo respecto a los animales alimentados con las demás dietas, de los mismos subgrupos alimentados con aceite de oliva ecológico y aceite de oliva a las 24 h.

Dentro del grupo tratado con CPA y estimulado posteriormente con el mitógeno, se observó un incremento significativo en el subgrupo alimentado con aceite de oliva ecológico a las 0 h, respecto a los subgrupos de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y aceite de girasol. Los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva reflejaron un incremento significativo del porcentaje de estimulación a las 24 h respecto a los animales alimentados con las demás dietas. A las 48 h de la infección experimental en el grupo de CPA estimulado con el mitógeno, todos los subgrupos de ratones alimentados con dietas mostraron diferencias significativas destacándose incrementos en los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de oliva ecológico, y una considerable disminución en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol (Tabla 22).

En el grupo de tratamiento con GK 1,5 en ausencia de la concanavalina A, el porcentaje de estimulación del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico a las 0 h se incrementó significativamente respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de girasol y aceite de oliva; el subgrupo de ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado a las 0 h también se incremento de forma significativa, en comparación al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva.

Dentro del grupo que fue tratado con GK 1,5 y estimulado con el mitógeno, los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva ecológico a las 0 h mostraron un incremento significativo respecto a los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva, y una disminución significativa comparado con los alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado. El subgrupo de ratones alimentado con una dieta basada en aceite de pescado mostró incrementos significativos del porcentaje de estimulación en los tres puntos de tiempo; a las 0 y 48 h respecto a los subgrupos de ratones alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de oliva

ecológico; y a las 24 h en comparación al subgrupo alimentado con la dieta de aceite de girasol.

No se encontraron diferencias significativas en el grupo de tratamiento con RB6-8C5 y no estimulado con el mitógeno, en cambio si se encontraron en los que fueron estimulados en presencia de concanavalina A. Los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de girasol reflejaron una reducción significativa del porcentaje de estimulación a las 0 y 48 h, respecto al subgrupo de ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **proliferación linfocitaria en bazo** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección en presencia y ausencia de concanavalina A (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Esplenocitos						
<u>% incremento respecto a baja en grasas</u>	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 053	100 ± 019	100 ± 013	100 ± 015	100 ± 030	100 ± 014
Aceite de oliva	162 ± 013	128 ± 051	79 ± 018	65 ± 013*	148 ± 011*	118 ± 015
Aceite de oliva ecológico	141 ± 015	106 ± 027	100 ± 015	67 ± 023*	169 ± 017*	119 ± 010
Aceite de pescado	159 ± 041	146 ± 018*	106 ± 012	106 ± 019	127 ± 037	107 ± 008
Aceite de girasol	147 ± 039	107 ± 029	81 ± 016	98 ± 014	137 ± 014	118 ± 021
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 017	100 ± 042	100 ± 019	100 ± 019	100 ± 067	100 ± 038
Aceite de oliva	96 ± 017	92 ± 028	128 ± 023	180 ± 062	182 ± 037	166 ± 091
Aceite de oliva ecológico	159 ± 017*	86 ± 018	106 ± 018	113 ± 011	169 ± 030	124 ± 065
Aceite de pescado	147 ± 034*	103 ± 024	145 ± 048	150 ± 018	184 ± 023	-
Aceite de girasol	107 ± 017	119 ± 036	99 ± 025	99 ± 020	135 ± 010	128 ± 015
Esplenocitos + Con A						
<u>% incremento respecto a baja en grasas</u>	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 013	100 ± 014	100 ± 012	100 ± 017	100 ± 014	100 ± 008
Aceite de oliva	107 ± 014	107 ± 018	104 ± 015	80 ± 027	140 ± 011*	161 ± 019*
Aceite de oliva ecológico	63 ± 012*	127 ± 009	121 ± 020	116 ± 019*	99 ± 008	151 ± 020*
Aceite de pescado	126 ± 031	148 ± 031*	148 ± 022*	97 ± 014	115 ± 013	122 ± 015*
Aceite de girasol	101 ± 006	96 ± 008	106 ± 005	87 ± 013	114 ± 009	94 ± 009*
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 014	100 ± 015	100 ± 016	100 ± 020	100 ± 050	100 ± 022
Aceite de oliva	91 ± 013	71 ± 019	88 ± 019	177 ± 080	209 ± 056	263 ± 143
Aceite de oliva ecológico	158 ± 025*	96 ± 033	115 ± 013	114 ± 018	114 ± 041	166 ± 067
Aceite de pescado	178 ± 024*	113 ± 023*	162 ± 049*	161 ± 026	206 ± 034	-
Aceite de girasol	116 ± 020	94 ± 012	89 ± 025	73 ± 021*	140 ± 022	143 ± 058

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

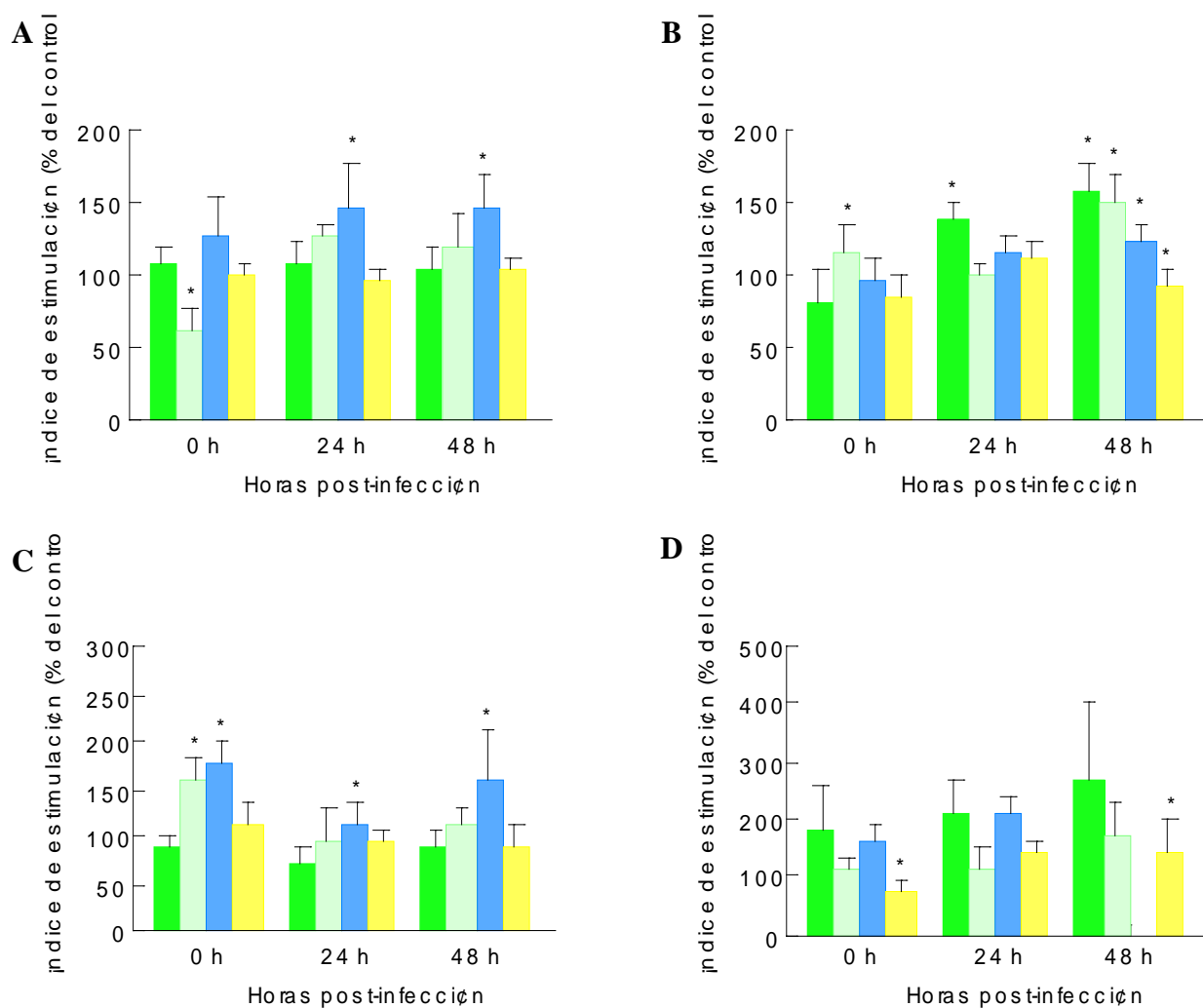


Figura 19. Porcentaje de incremento respecto a controles del Índice de estimulación linfocitaria en bazo de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados; y tratados previamente con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D); en presencia de Con A. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente vía intravenosa con *L. monocytogenes* (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. La dieta control o baja en grasas equivale al 100% de proliferación linfocitaria (datos no mostrados). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los esplenocitos se aislaron tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados del ensayo de viabilidad celular fueron expresados como porcentaje de incremento respecto al grupo control (baja en grasas). Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

El porcentaje de incremento del índice de estimulación linfocitaria en timocitos respecto a la dieta baja en grasas se representa en la siguiente tabla (Tabla 23), fue realizado también en presencia y ausencia del mitógeno concanavalina A.

Dentro del grupo control (PBS) en ausencia del mitógeno concanavalina A, el subgrupo de ratones alimentado con la dieta de aceite de girasol mostró una disminución significativa a las 0 h respecto a los ratones que fueron alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva ecológico,

aceite de pescado y aceite de oliva. A las 24 h después de la infección experimental, el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico mostró un aumento significativo respecto al subgrupo de ratones alimentado con la dieta rica en aceite de oliva. Los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva ecológico y aceite de girasol se redujeron de forma significativa a las 48 h en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de pescado y aceite de oliva.

El porcentaje de incremento en el índice de estimulación de los ratones control (PBS) y estimulados con el mitógeno concanavalina A, fue significativamente mayor en el subgrupo de ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado a las 48 h respecto a los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de oliva.

El grupo tratado con CPA no mostró diferencias significativas en ausencia del mitógeno concanavalina A; en cambio en presencia del mismo, mostró una disminución significativa en el subgrupo de animales alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol a las 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dieta (Tabla 23).

Los timocitos de ratones tratados con GK 1,5 sin estimular con el mitógeno, experimentaron una reducción significativa en el subgrupo de ratones alimentados con la dieta rica en aceite de oliva a las 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva ecológico, aceite de girasol y aceite de pescado; por el contrario se dio un incremento significativo en los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva ecológico también a las 48h, en comparación a los ratones alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de pescado.

La posterior estimulación con el mitógeno concanavalina A en el grupo de ratones tratados con GK 1,5, reflejó diferencias estadísticas significativas en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico; a las 0 h una disminución respecto a los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva, y a las 48 h un incremento en comparación también a los animales alimentados con la dieta que contenía aceite de oliva. El subgrupo alimentado con una dieta rica en aceite de pescado mostró una reducción significativa del porcentaje de incremento a las 24 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de girasol y aceite de oliva ecológico (Tabla 23).

El grupo tratado con RB6-8C5 en ausencia de concanavalina A, mostró un incremento significativo del porcentaje en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva a las 0 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de pescado y aceite de girasol; a las 48 h, el porcentaje en el subgrupo alimentados con la dieta rica en aceite de oliva

ecológico fue significativamente mayor que en los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de girasol.

Los timocitos de ratones tratados con RB6-8C5 y posteriormente estimulados con la concanavalina A, solo mostraron un incremento significativo a las 24 h en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico respecto a los que fueron alimentados con la dieta rica en aceite de pescado. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 23).

Tabla 23. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **proliferación linfocitaria en timo** de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección en presencia y ausencia de concanavalina A (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Timocitos						
<u>% incremento respecto a baja en grasas</u>	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 016	100 ± 009	100 ± 045	100 ± 019	100 ± 005	100 ± 012
Aceite de oliva	125 ± 017	117 ± 011	194 ± 027	82 ± 024	110 ± 020	114 ± 023
Aceite de oliva ecológico	140 ± 019	120 ± 011*	157 ± 015*	90 ± 024	112 ± 011	96 ± 016
Aceite de pescado	131 ± 015	109 ± 018	186 ± 018	103 ± 015	109 ± 013	104 ± 022
Aceite de girasol	93 ± 038*	110 ± 015	161 ± 020*	91 ± 041	112 ± 024	93 ± 009
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 023	100 ± 036	100 ± 018	100 ± 050	100 ± 020	100 ± 023
Aceite de oliva	125 ± 014	95 ± 009	58 ± 033*	181 ± 026*	108 ± 028	47 ± 014
Aceite de oliva ecológico	124 ± 014	105 ± 024	122 ± 015*	158 ± 024	122 ± 010	92 ± 054*
Aceite de pescado	126 ± 012	88 ± 017	107 ± 007	145 ± 016	91 ± 026	-
Aceite de girasol	109 ± 019	87 ± 034	102 ± 018	142 ± 064	107 ± 019	35 ± 009
Timocitos + Con A						
<u>% incremento respecto a baja en grasas</u>	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 009	100 ± 026	100 ± 012	100 ± 023	100 ± 016	100 ± 018
Aceite de oliva	121 ± 024	80 ± 019	83 ± 011	84 ± 008	123 ± 021	109 ± 009
Aceite de oliva ecológico	97 ± 010	83 ± 009	104 ± 010	104 ± 019	100 ± 014	106 ± 018
Aceite de pescado	106 ± 007	68 ± 012	111 ± 013*	79 ± 008	102 ± 010	108 ± 11
Aceite de girasol	101 ± 012	86 ± 025	89 ± 015	87 ± 012	103 ± 017	68 ± 006*
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 008	100 ± 039	100 ± 008	100 ± 023	100 ± 011	100 ± 018
Aceite de oliva	118 ± 010	114 ± 022	73 ± 025	129 ± 025	86 ± 011	54 ± 006
Aceite de oliva ecológico	99 ± 018*	144 ± 036	104 ± 017*	122 ± 024	109 ± 013*	76 ± 031
Aceite de pescado	110 ± 021	99 ± 020*	86 ± 008	118 ± 020	75 ± 016	-
Aceite de girasol	105 ± 005	121 ± 017	99 ± 010	109 ± 022	86 ± 011	59 ± 007

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

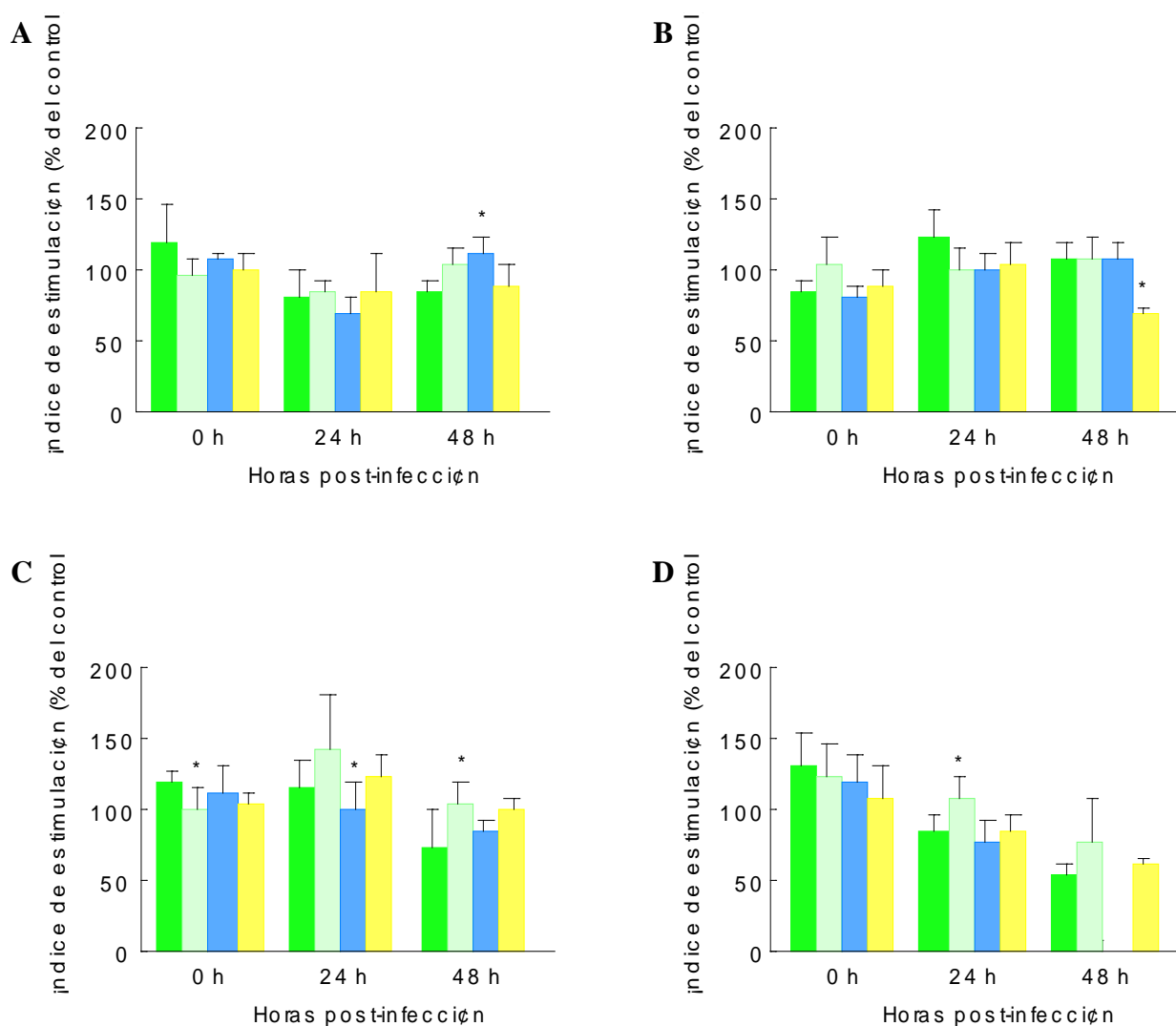


Figura 20. Porcentaje de incremento respecto a controles del índice de estimulación linfocitaria en timo de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados; y tratados previamente con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D); en presencia de Con A. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente por vía intravenosa con *L. monocytogenes* (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. La dieta control o baja en grasas equivale al 100% de proliferación linfocitaria (datos no mostrados). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los timocitos se aislaron tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados del ensayo de viabilidad celular fueron expresados como porcentaje de incremento respecto al grupo de dieta control (baja en grasas). Las barras corresponden a la media \pm error estándar de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.7.- Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en bazo de los ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con CPA, GK 1.5 y RB6-8C5.

Los radicales libres de oxígeno se cuantificaron a través de una técnica fluorimétrica y se expresaron en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). La siguiente tabla (Tabla 24) muestra los resultados obtenidos.

En el grupo de ratones control (PBS), el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado mostró una reducción significativa en las URF a las 24 h, en comparación al subgrupo de animales alimentado con la dieta baja en grasas, y a las 48 h respecto a los alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva, aceite de girasol y baja en grasas; por el contrario, los ratones del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva ecológico mostraron un incremento significativo a las 48 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas baja en grasas y de aceite de pescado.

Dentro del grupo tratado con CPA se produjo un incremento significativo del subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado a las 0, 24 y 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas; también se incrementó significativamente a las 48 h el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas baja en grasas, de aceite de oliva y de aceite de girasol (Tabla 24).

En el grupo de tratamiento con GK 1,5 no se encontraron diferencias significativas en los valores de las URF a las 0 y 24 h después de la infección experimental con *L. monocytogenes*; sin embargo a las 48 h se produjo un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva respecto a todos los subgrupos alimentados con las demás dietas, y del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado en comparación al subgrupo de animales alimentado con la dieta baja en grasas.

En el grupo de animales tratados con RB6-8C5 se produjo un incremento significativo a las 0 y 24 h en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado sobre todos los subgrupos alimentados con las demás dietas; y el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico mostró un incremento significativo respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de girasol y aceite de oliva, y a la dieta baja en grasas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 24).

Tabla 24. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)** en bazo de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

ROS (URF)	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	415 ± 020	474 ± 056	416 ± 164	175 ± 024	303 ± 044	385 ± 095
Aceite de oliva	431 ± 045	309 ± 051	563 ± 079	163 ± 036	284 ± 024	402 ± 092
Aceite de oliva ecológico	536 ± 127	426 ± 036	644 ± 118*	222 ± 124	269 ± 034	878 ± 108*
Aceite de pescado	564 ± 124	234 ± 025*	269 ± 178*	510 ± 044*	742 ± 192*	996 ± 131*
Aceite de girasol	362 ± 032	402 ± 022	512 ± 236	136 ± 016	262 ± 036	346 ± 034
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	323 ± 056	222 ± 015	485 ± 089	139 ± 021	172 ± 034	205 ± 024
Aceite de oliva	282 ± 065	302 ± 048	1575 ± 588*	123 ± 016	163 ± 024	297 ± 057
Aceite de oliva ecológico	566 ± 106	315 ± 075	885 ± 217	143 ± 023	195 ± 013	591 ± 214*
Aceite de pescado	354 ± 024	397 ± 014	1190 ± 513*	498 ± 044*	514 ± 150*	-
Aceite de girasol	290 ± 035	292 ± 011	863 ± 683	139 ± 017	168 ± 020	196 ± 042

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

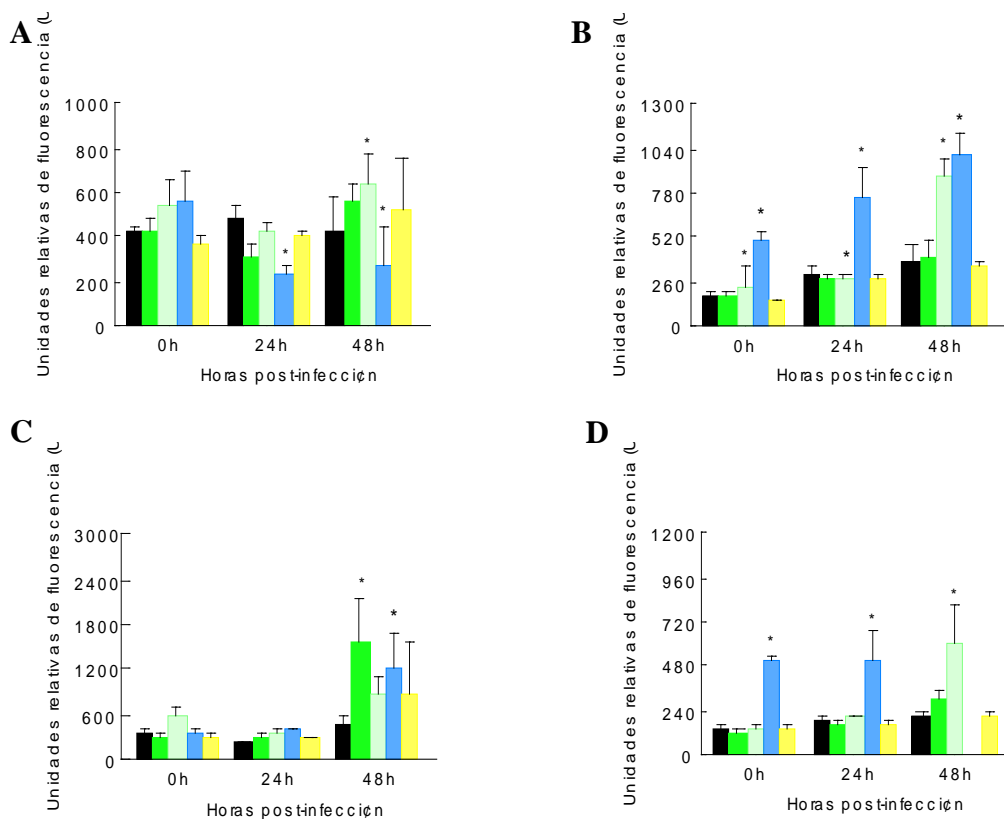


Figura 21. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esplenocitos de ratones alimentados con las dietas lipídicas, inmunosuprimidos o no e infectados con *Listeria monocytogenes* Esplenocitos procedentes de ratones Balb/c alimentados durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) con sus respectivas dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *L. monocytogenes* por vía intravenosa. Los esplenocitos fueron obtenidos como se describe en el apartado de material y métodos e incubados con el compuesto H₂DCFDA, posteriormente se cuantificó la producción del producto oxidado que emite fluorescencia. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verde claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de las unidades relativas de fluorescencia (URF) cuantificadas de tres determinaciones independientes analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (*P< 0.05).

4.1.8.- Medida de citoquinas en sangre periférica de ratón.

La determinación de los niveles de citoquinas en el presente trabajo fue llevada a cabo mediante una técnica de citometría de flujo. Las citoquinas determinadas fueron las siguientes: IL-1A, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-4 e IL-17; los resultados se expresaron como porcentaje de variación de las dietas respecto a la dieta control (baja en grasas).

Los datos referentes a IL-1A se recogieron en la siguiente tabla (Tabla 25). En los grupos control (PBS) y de tratamiento con CPA, el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado mostró un incremento significativo a las 48 h respecto a los subgrupos de animales alimentados con las demás dietas.

En el tratamiento con GK 1,5, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado mostró un incremento significativo a las 0 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas; a las 24 h el porcentaje del subgrupo alimentados con la dieta que contenía aceite de oliva, se redujo significativamente en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado.

Dentro del grupo de ratones tratado con el inmunosupresor RB6-8C5, se destacan dos importantes incrementos significativos a las 24 h en los subgrupos alimentados con la dieta de aceite de oliva ecológico y aceite de girasol, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y aceite de pescado. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 25).

Tabla 25. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 1A (IL-1A)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 1A						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 039	100 ± 044	100 ± 009	100 ± 017	100 ± 051	100 ± 005
Aceite de oliva	147 ± 013	143 ± 031	77 ± 006	123 ± 013	73 ± 023	106 ± 002
Aceite de oliva ecológico	92 ± 012	165 ± 015	86 ± 009	128 ± 017	62 ± 049	98 ± 012
Aceite de pescado	132 ± 041	367 ± 118	625 ± 579*	113 ± 033	55 ± 001	1390 ± 555*
Aceite de girasol	141 ± 035	239 ± 039	96 ± 006	106 ± 017	61 ± 014	106 ± 008
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 011	100 ± 012	100 ± 006	100 ± 009	100 ± 015	100 ± 044
Aceite de oliva	140 ± 026	91 ± 021*	78 ± 007	281 ± 197	264 ± 099	103 ± 040
Aceite de oliva ecológico	98 ± 018	152 ± 017	112 ± 011	128 ± 033	1759 ± 1038*	96 ± 032
Aceite de pescado	312 ± 065*	158 ± 011	94 ± 010	184 ± 087	326 ± 072	-
Aceite de girasol	128 ± 008	117 ± 14	85 ± 003	95 ± 005	1432 ± 347*	113 ± 058

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

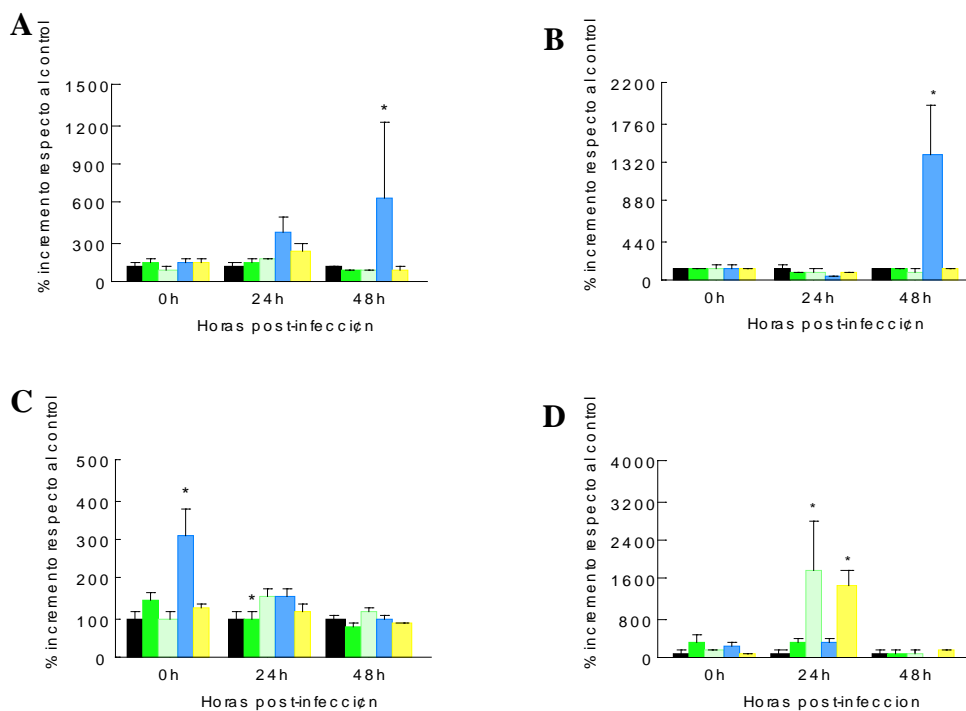


Figura 22. Medida de interleuquina-1A (IL-1A) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente por vía intravenosa con *L. monocytogenes* (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-1A en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

En la determinación de la IL-2 (Tabla 26) no se encontraron diferencias significativas en el grupo control (PBS) ni en los tratados con CPA y RB6-8C5. En cambio en el grupo de tratamiento con GK 1,5 se observó una diferencia significativa, a las 0 h el subgrupo de animales alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol se incrementó de forma significativa respecto a los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 26).

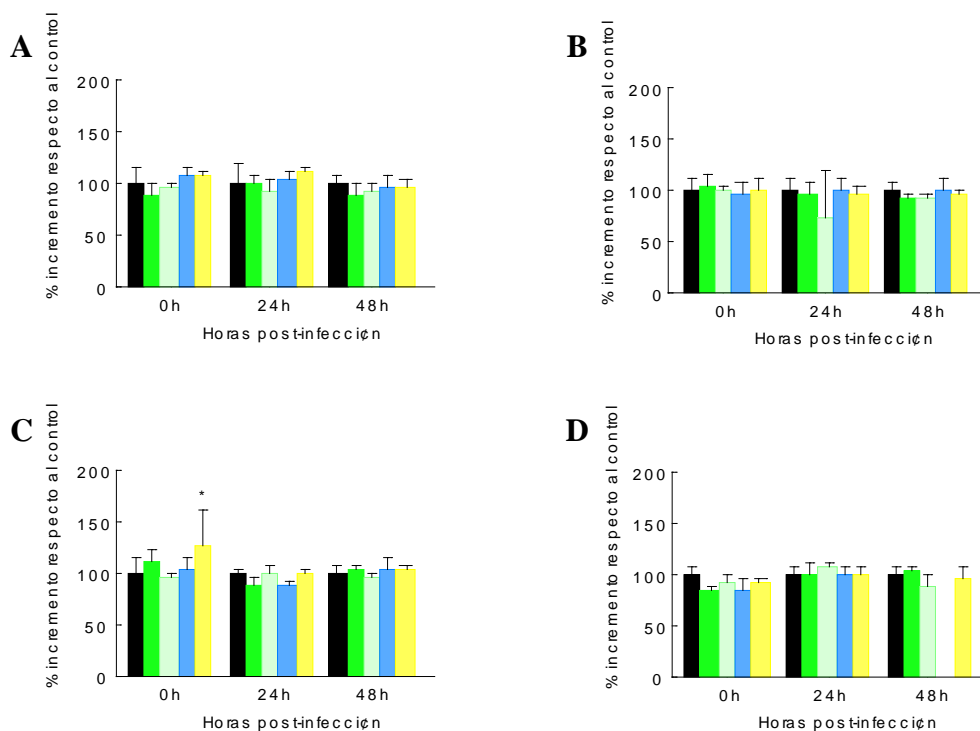


Figura 23. Medida de interleuquina-2 (IL-2) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-2 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

Tabla 26. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 2 (IL-2)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 2						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 \pm 016	100 \pm 019	100 \pm 007	100 \pm 010	100 \pm 011	100 \pm 006
Aceite de oliva	89 \pm 009	99 \pm 010	89 \pm 010	104 \pm 011	97 \pm 010	91 \pm 007
Aceite de oliva ecológico	95 \pm 005	94 \pm 009	94 \pm 007	101 \pm 003	72 \pm 049	93 \pm 002
Aceite de pescado	108 \pm 008	103 \pm 007	96 \pm 011	95 \pm 011	102 \pm 009	100 \pm 010
Aceite de girasol	107 \pm 006	112 \pm 004	98 \pm 006	101 \pm 011	94 \pm 010	95 \pm 004
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	111 \pm 014	100 \pm 004	100 \pm 008	100 \pm 008	100 \pm 006	100 \pm 009
Aceite de oliva	111 \pm 014	90 \pm 005	102 \pm 005	85 \pm 003	102 \pm 008	105 \pm 003
Aceite de oliva ecológico	94 \pm 007	99 \pm 008	97 \pm 004	94 \pm 006	106 \pm 005	90 \pm 009
Aceite de pescado	102 \pm 012	89 \pm 003	104 \pm 011	85 \pm 010	100 \pm 007	
Aceite de girasol	128 \pm 034*	99 \pm 007	103 \pm 004	93 \pm 003	102 \pm 008	97 \pm 009

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

La Tabla 27 muestra el porcentaje de variación en los niveles de IL-5 en los subgrupos de dieta respecto al subgrupo alimentado con la dieta baja en grasas, con los diferentes tratamientos. El grupo control (PBS) y los grupos tratados con GK 1,5 y RB6-8C5 no reflejaron diferencias significativas; en cambio si se observaron en el grupo inmunosuprimido con CPA, con un incremento significativo del subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado a las 48 h sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 27).

Tabla 27. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 5 (IL-5)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 5						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 010	100 ± 004	100 ± 012	100 ± 007	100 ± 005	100 ± 005
Aceite de oliva	97 ± 004	99 ± 009	94 ± 007	102 ± 003	97 ± 007	102 ± 006
Aceite de oliva ecológico	101 ± 004	97 ± 004	95 ± 003	100 ± 007	72 ± 049	93 ± 003
Aceite de pescado	97 ± 002	94 ± 005	96 ± 009	100 ± 006	98 ± 003	154 ± 025*
Aceite de girasol	100 ± 008	98 ± 005	101 ± 003	105 ± 005	98 ± 009	99 ± 007
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 006	100 ± 010	100 ± 003	100 ± 005	100 ± 003	100 ± 007
Aceite de oliva	96 ± 007	95 ± 015	102 ± 006	97 ± 003	95 ± 003	103 ± 007
Aceite de oliva ecológico	93 ± 003	99 ± 004	110 ± 008	92 ± 003	94 ± 003	99 ± 007
Aceite de pescado	102 ± 011	102 ± 011	114 ± 006	85 ± 014	100 ± 013	
Aceite de girasol	114 ± 017	101 ± 009	117 ± 010	99 ± 005	104 ± 013	102 ± 006

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

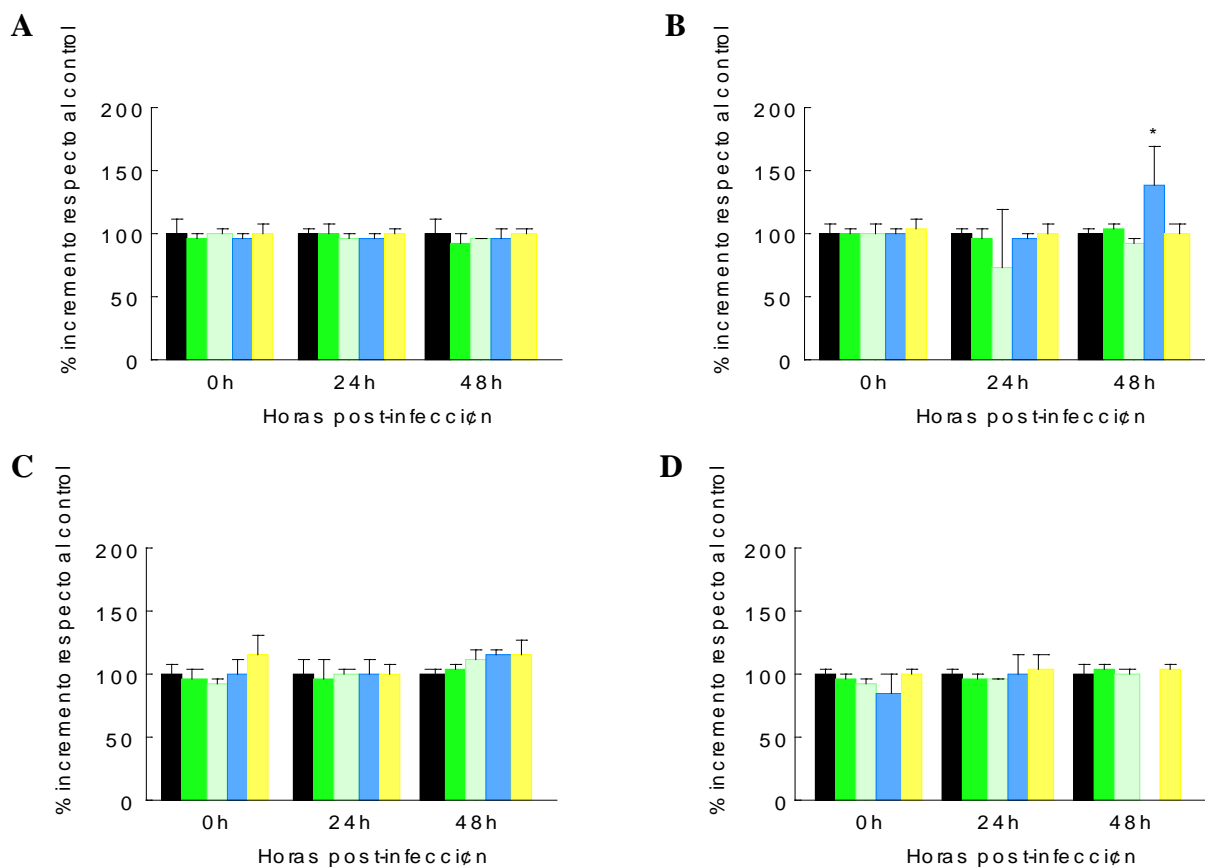


Figura 24. Medida de interleuquina-5 (IL-5) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-5 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

En la siguiente tabla (Tabla 28) se muestra el porcentaje de variación de los niveles de IL-6; todos los grupos tratados presentan diferencias significativas entre los subgrupos alimentados con las diferentes de dieta.

En el grupo de PBS (control) se observó un incremento significativo a las 24 h del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico sobre todos los subgrupos alimentados con las demás dietas, aunque también se observaron elevados niveles a las 24 h en los ratones alimentados con las dietas que contenían aceite de pescado, aceite de oliva y aceite de girasol. A las 48 h se observa un incremento significativo del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado en comparación a los subgrupos alimentados con las demás dietas.

En el grupo de ratones tratados con CPA se destaca un incremento significativo a las 48 h en

el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado.

Dentro del tratamiento con GK 1.5, también se observan diferencias significativas, existió un incremento en el porcentaje del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado a las 24 h (respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de girasol y aceite de oliva); y a las 48 h (en comparación a todos los subgrupos alimentados con dietas).

En grupo tratado con RB6-8C5 se destacaron varios incrementos significativos a las 24 h; el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol respecto al subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva; el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva respecto a los subgrupos alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva ecológico y aceite de girasol; y el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado respecto al subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 28).

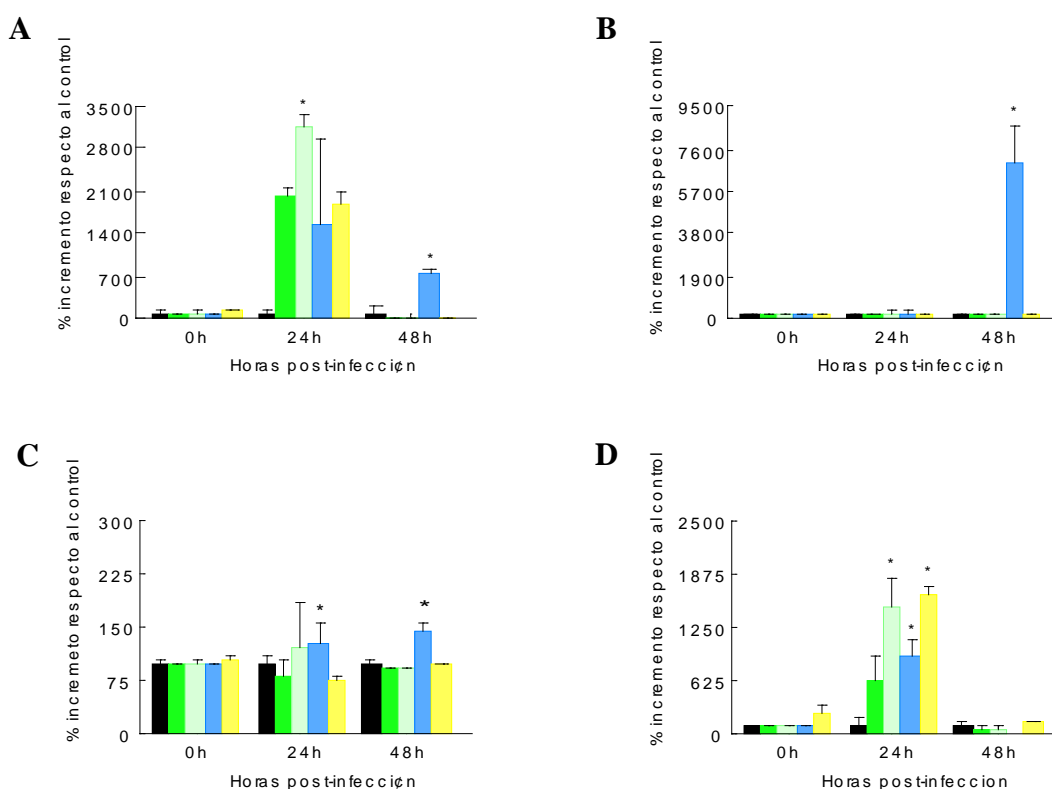


Figura 25. Medida de interleuquina-6 (IL-6) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-6 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

Tabla 28. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 6 (IL-6)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 6						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 \pm 004	100 \pm 019	100 \pm 107	100 \pm 003	100 \pm 011	100 \pm 026
Aceite de oliva	94 \pm 001	2029 \pm 134	20 \pm 009	102 \pm 003	82 \pm 026	106 \pm 022
Aceite de oliva ecológico	100 \pm 002	3121 \pm 211*	11 \pm 002	101 \pm 001	135 \pm 135	93 \pm 013
Aceite de pescado	92 \pm 006	1566 \pm 1379	757 \pm 054*	145 \pm 050	116 \pm 014	7032 \pm 1694*
Aceite de girasol	102 \pm 003	1894 \pm 179	22 \pm 008	111 \pm 011	145 \pm 020	111 \pm 019
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 \pm 002	100 \pm 008	100 \pm 004	100 \pm 003	100 \pm 099	100 \pm 015
Aceite de oliva	97 \pm 002	78 \pm 024	91 \pm 003	101 \pm 002	606 \pm 319	48 \pm 049
Aceite de oliva ecológico	98 \pm 003	122 \pm 060	93 \pm 002	108 \pm 002	1506 \pm 033*	57 \pm 010
Aceite de pescado	96 \pm 004	129 \pm 025*	144 \pm 013*	97 \pm 007	893 \pm 203*	
Aceite de girasol	101 \pm 007	75 \pm 007	95 \pm 002	248 \pm 093	1638 \pm 112*	119 \pm 024

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

El porcentaje de variación de los niveles de IL-10 entre los distintos subgrupos con los diferentes tratamientos se representa en la siguiente tabla (Tabla 29). Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con CPA, RB6-8C5 y en el grupo control (PBS); sin embargo el grupo de GK 1.5 no mostró diferencias significativas.

En los grupos de PBS (control) y CPA se produjo un incremento significativo en los animales alimentados con la dieta rica en aceite de pescado a las 48 h, sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas ensayadas.

En el grupo tratado con RB6-8C5 también se observa un incremento significativo a las 48 h después de la infección con *L. monocytogenes*, en este caso en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite oliva y aceite de oliva ecológico. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 29).

Tabla 29. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 10 (IL-10)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 10						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 007	100 ± 003	100 ± 002	100 ± 001	100 ± 003	100 ± 004
Aceite de oliva	94 ± 0,40	98 ± 002	97 ± 002	99 ± 006	97 ± 001	102 ± 002
Aceite de oliva ecológico	100 ± 002	102 ± 002	99 ± 002	98 ± 003	75 ± 050	99 ± 002
Aceite de pescado	91 ± 004	94 ± 001	127 ± 025*	97 ± 003	98 ± 001	124 ± 003*
Aceite de girasol	97 ± 004	100 ± 003	98 ± 003	98 ± 003	98 ± 002	103 ± 001
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 002	100 ± 001	100 ± 003	100 ± 005	100 ± 004	100 ± 002
Aceite de oliva	98 ± 002	99 ± 001	100 ± 001	97 ± 001	103 ± 001	91 ± 002
Aceite de oliva ecológico	96 ± 003	98 ± 002	101 ± 002	97 ± 001	103 ± 003	90 ± 002
Aceite de pescado	98 ± 002	100 ± 002	103 ± 002	90 ± 005	100 ± 010	
Aceite de girasol	100 ± 005	100 ± 003	98 ± 002	93 ± 003	97 ± 002	116 ± 022*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

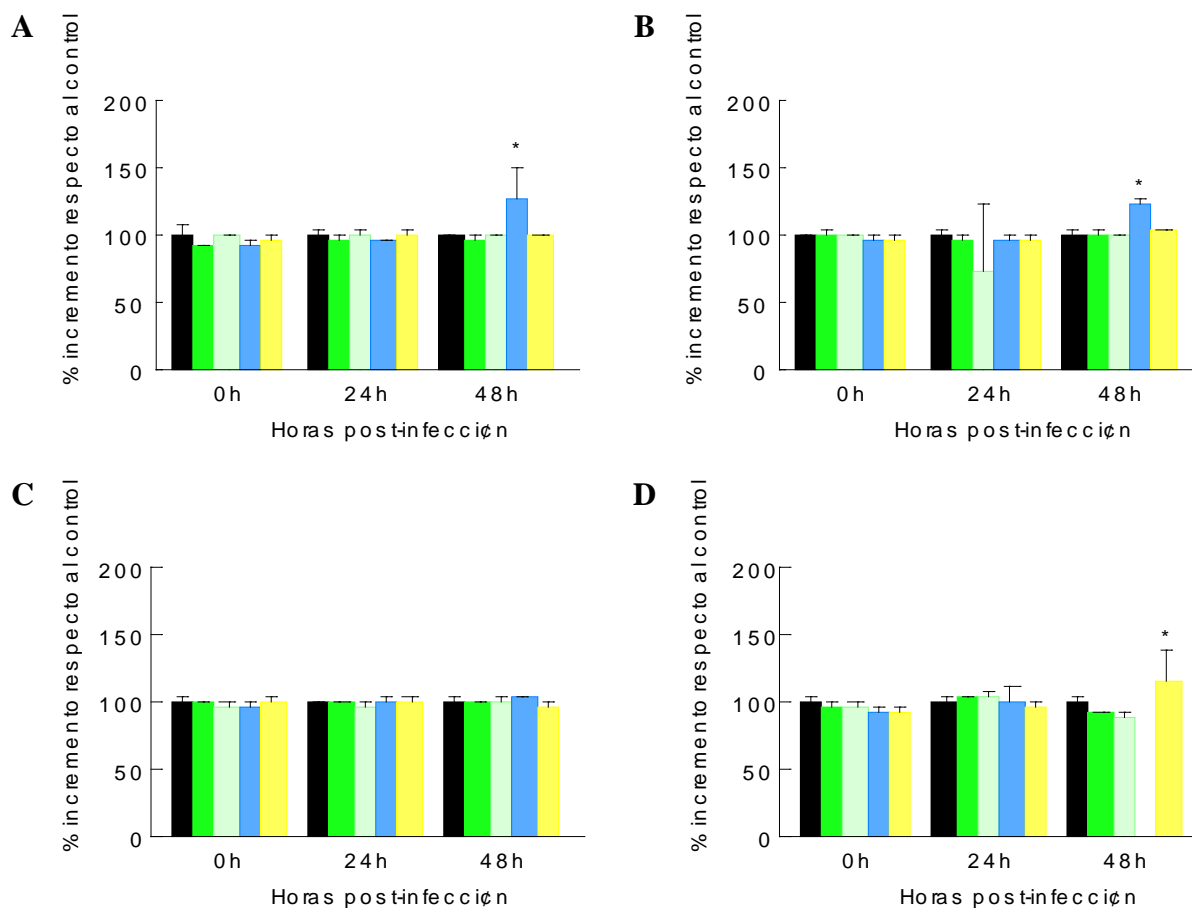


Figura 26. Medida de interleuquina-10 (IL-10) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-10 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La siguiente tabla (Tabla 30) representa la variación de los niveles del porcentaje de la IL-12p70; existieron diferencias significativas en todos los grupos de tratamiento.

En grupo de PBS (control) se observa un incremento significativo a las 24 h en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado, en comparación a los grupos alimentados con las demás dietas.

Los animales tratados con CPA mostraron incrementos significativos a las 24 h en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol, y a las 48 h en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado.

En los grupos tratados con los inmunosupresores GK 1,5 y RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado fue significativamente mayor 24 h después de la infección experimental. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla 30).

Tabla 30. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 12p70 (IL-12p70)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 12p70						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 020	100 ± 020	100 ± 006	100 ± 001	100 ± 007	100 ± 004
Aceite de oliva	82 ± 004	212 ± 150	95 ± 009	99 ± 005	104 ± 013	90 ± 004
Aceite de oliva ecológico	81 ± 003	121 ± 003	90 ± 007	98 ± 006	70 ± 047	85 ± 004
Aceite de pescado	100 ± 013	1289 ± 374*	85 ± 004	95 ± 005	112 ± 010	167 ± 028*
Aceite de girasol	100 ± 009	240 ± 061	88 ± 005	102 ± 005	144 ± 014*	85 ± 009
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 007	100 ± 046	100 ± 054	100 ± 007	100 ± 051	100 ± 004
Aceite de oliva	107 ± 007	54 ± 004	88 ± 019	84 ± 005	223 ± 117	111 ± 005
Aceite de oliva ecológico	98 ± 005	62 ± 013	50 ± 003	107 ± 008	62 ± 009	97 ± 010
Aceite de pescado	104 ± 010	132 ± 091*	51 ± 005	90 ± 010	551 ± 295*	
Aceite de girasol	114 ± 018	69 ± 006	69 ± 022	108 ± 008	99 ± 019	120 ± 027

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

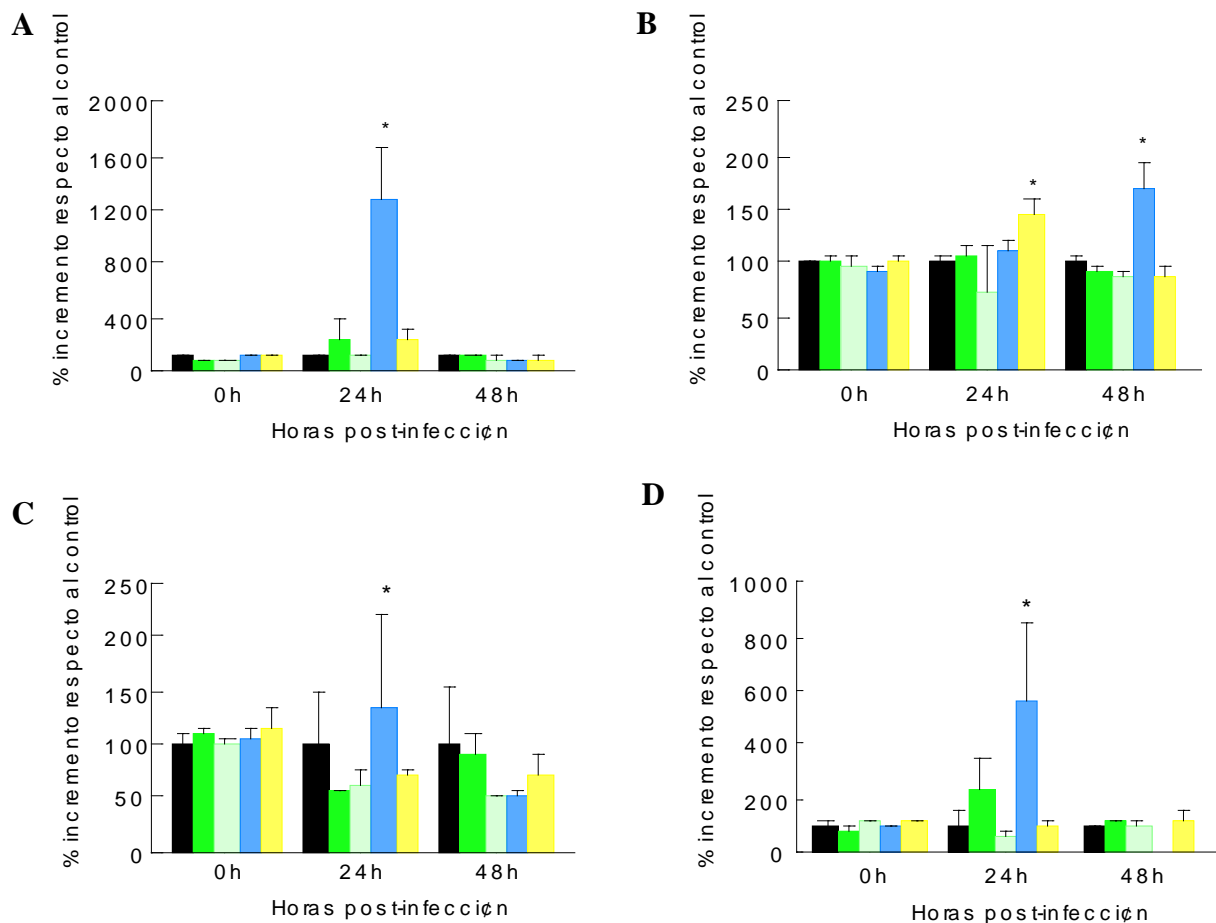


Figura 27. Medida de interleuquina-12p70 (IL-12p70) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-12p70 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La Tabla 31 representa la variación en los niveles de porcentaje de IFN- γ entre los diferentes grupos y tratamientos, existiendo también diferencias significativas en todos. En el grupo tratado con PBS (control), la dieta de aceite de oliva mostró un incremento significativo a las 24 y 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas.

En el grupo tratado con CPA los ratones del subgrupo alimentados con la dieta de aceite de pescado, mostraron un incremento significativo a las 48 h de la infección experimental sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas.

Dentro del grupo de tratamiento con GK 1,5 se observó un incremento significativo a las 0 h del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol; y a las 24 y 48 h del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado. Dentro del grupo de animales tratados con RB6-8C5 se observó un incremento significativo en los ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado a las 24 h, respecto a los alimentados con la dieta rica en aceite de oliva ecológico. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 31).

Tabla 31. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interferon gamma (IFN γ)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

IFNγ						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 025	100 ± 020	100 ± 019	100 ± 004	100 ± 005	100 ± 009
Aceite de oliva	85 ± 004	360 ± 266*	311 ± 023*	100 ± 003	103 ± 004	111 ± 013
Aceite de oliva ecológico	94 ± 004	119 ± 024	91 ± 019	98 ± 004	74 ± 050	105 ± 008
Aceite de pescado	96 ± 006	138 ± 036	121 ± 036	99 ± 002	118 ± 007	1016 ± 174*
Aceite de girasol	106 ± 004	210 ± 110	87 ± 005	99 ± 006	101 ± 010	109 ± 004
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 003	100 ± 004	100 ± 005	100 ± 003	100 ± 051	100 ± 008
Aceite de oliva	100 ± 007	90 ± 001	94 ± 002	82 ± 002	252 ± 045	149 ± 012
Aceite de oliva ecológico	97 ± 005	90 ± 003	91 ± 011	97 ± 005	70 ± 007	93 ± 011
Aceite de pescado	102 ± 004	123 ± 006*	117 ± 015*	95 ± 009	445 ± 350*	
Aceite de girasol	119 ± 018*	98 ± 004	100 ± 006	95 ± 005	249 ± 190	115 ± 011

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10) en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

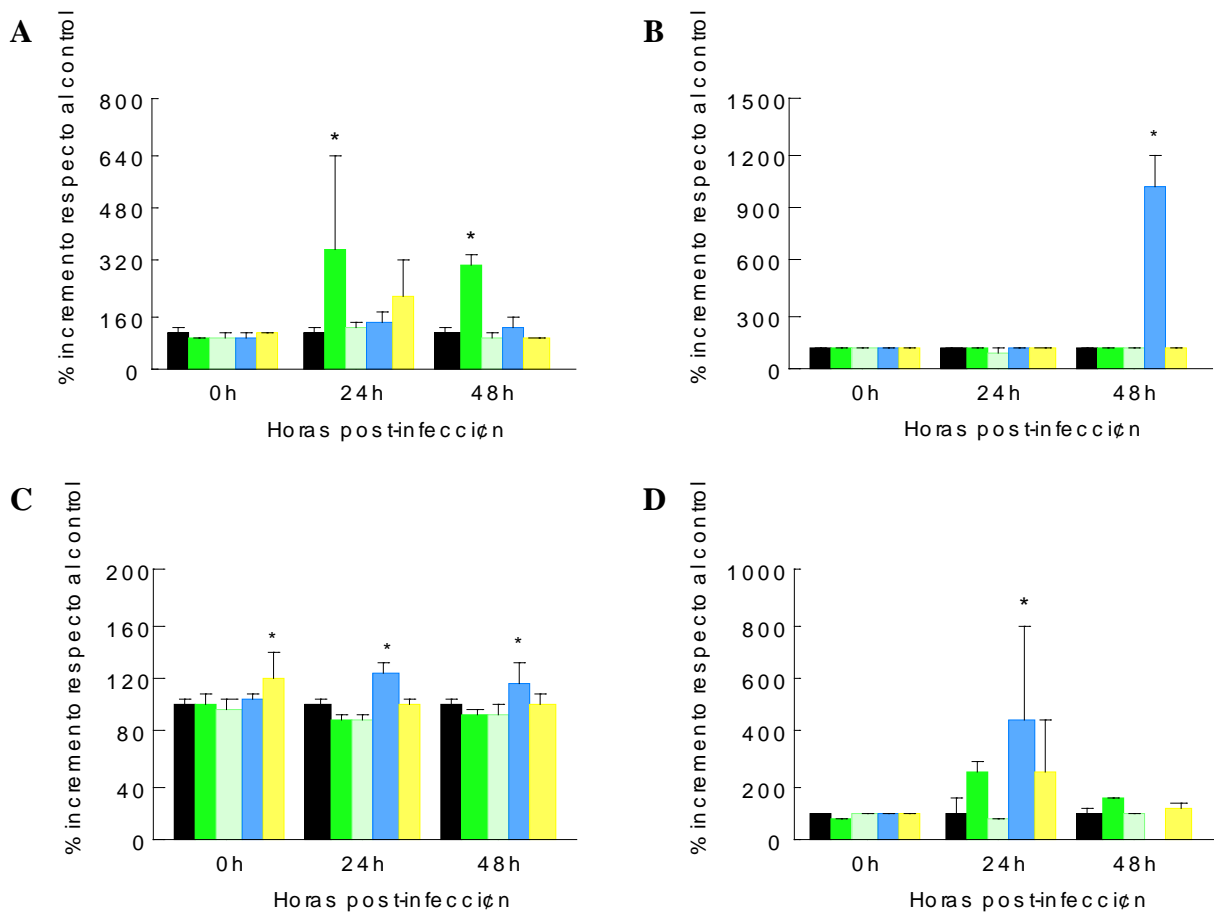


Figura 28. Medida de interferón gamma (IFN γ) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IFN γ en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* P < 0.05).

La siguiente tabla (Tabla 32) la variación en los porcentajes de TNF- α entre los distintos grupos y subgrupos. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los grupos tratados con GK 1,5 y CPA, por el contrario si existieron diferencias significativas en el grupo control (PBS) y en el tratado con RB6-8C5.

En el grupo tratado con PBS (control), el subgrupo alimentado la dieta que contenía aceite de pescado mostró un incremento significativo a las 24 y 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas.

En el grupo tratado con RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado a las 24 h se incrementó significativamente en comparación a los subgrupos de ratones alimentados con las demás dietas; y a las 48 h el subgrupo de animales alimentados con la dieta que contenía aceite de girasol, mostró un incremento significativo respecto a los subgrupos alimentados con la dietas que contenían aceite de oliva y aceite de oliva ecológico. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 32).

Tabla 32. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de factor de necrosis tumoral alpha (TNF α)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

TNFα						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 028	100 ± 028	100 ± 004	100 ± 004	100 ± 007	100 ± 005
Aceite de oliva	97 ± 001	117 ± 022	131 ± 027	106 ± 004	95 ± 002	102 ± 003
Aceite de oliva ecológico	99 ± 001	137 ± 007	107 ± 002	102 ± 003	77 ± 051	100 ± 005
Aceite de pescado	107 ± 005	277 ± 060*	359 ± 027*	99 ± 004	100 ± 005	102 ± 004
Aceite de girasol	104 ± 004	141 ± 013	102 ± 009	104 ± 002	103 ± 004	103 ± 005
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 005	100 ± 003	100 ± 003	100 ± 006	100 ± 027	100 ± 037
Aceite de oliva	105 ± 005	99 ± 004	96 ± 003	90 ± 001	159 ± 031	97 ± 005
Aceite de oliva ecológico	104 ± 002	98 ± 001	100 ± 002	99 ± 005	110 ± 031	72 ± 013
Aceite de pescado	99 ± 004	100 ± 003	105 ± 004	81 ± 010	341 ± 039*	
Aceite de girasol	114 ± 020	102 ± 002	101 ± 004	100 ± 009	149 ± 021	169 ± 070*

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

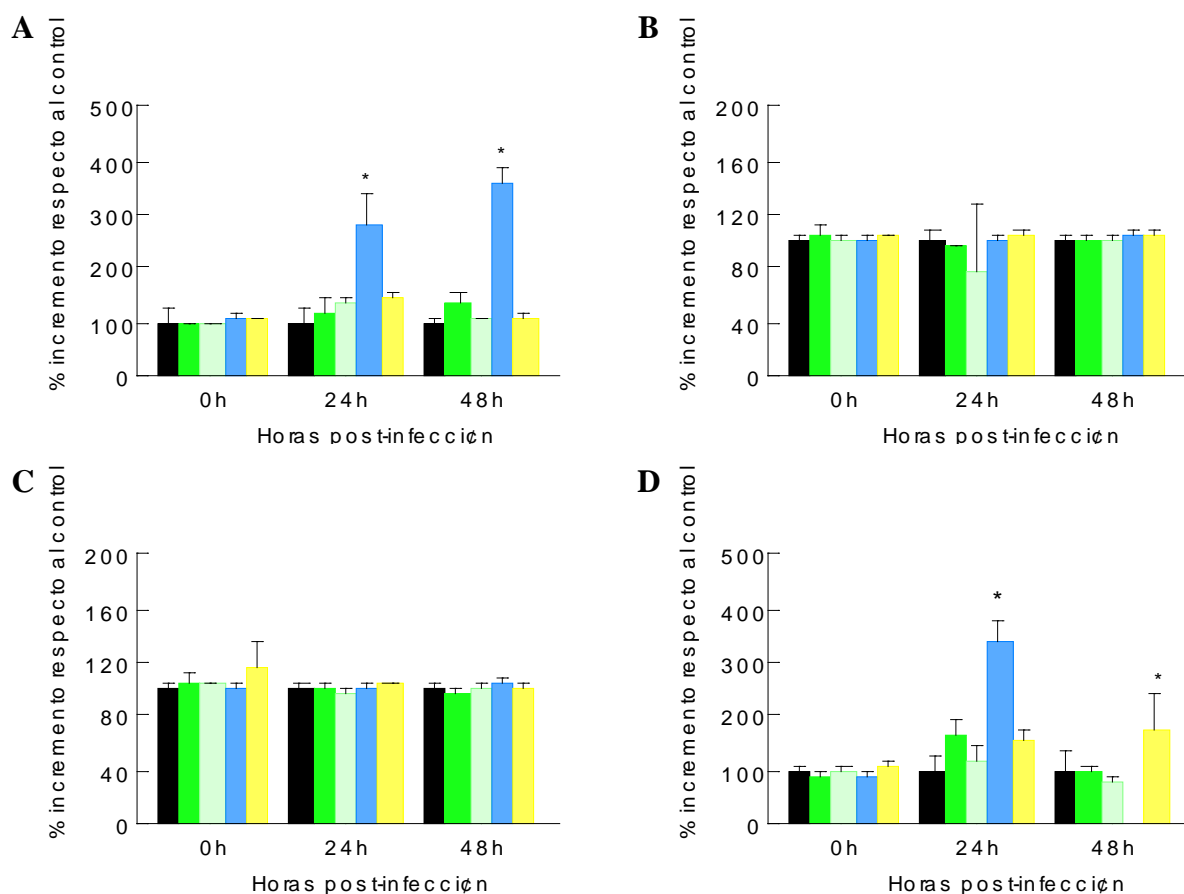


Figura 29. Medida del factor de necrosis tumoral alpha (TNFα) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras azul claro (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de TNFα en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” de eBioscience, que es capaz de medir por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

El porcentaje de variación en los niveles de GM-CSF se representa en la siguiente tabla (Tabla 33). Los grupos de tratamiento PBS (control), CPA y GK 1,5 no mostraron diferencias significativas entre sus respectivos subgrupos de ratones alimentados con sus respectivas dietas; en cambio el grupo tratado con RB6-8C5 si mostró diferencias significativas.

El subgrupo de ratones alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado y tratados con RB6-8C5, mostró una reducción significativa a las 0 y 24 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas. Dentro del mismo grupo de tratamiento con RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol mostró un incremento a las 24 h en comparación al subgrupo de ratones alimentado con la dieta de aceite de oliva. La ausencia de datos en los ratones tratados

con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 33).

Tabla 33. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

GM-CSF						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 006	100 ± 005	100 ± 004	100 ± 002	100 ± 003	100 ± 002
Aceite de oliva	90 ± 003	93 ± 001	87 ± 002	100 ± 001	97 ± 002	99 ± 001
Aceite de oliva ecológico	97 ± 003	98 ± 004	93 ± 003	101 ± 002	73 ± 049	100 ± 004
Aceite de pescado	94 ± 002	92 ± 004	90 ± 005	101 ± 001	97 ± 002	99 ± 002
Aceite de girasol	95 ± 004	98 ± 003	93 ± 007	101 ± 003	98 ± 001	98 ± 003
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 003	100 ± 001	100 ± 003	100 ± 004	100 ± 005	100 ± 007
Aceite de oliva	99 ± 003	101 ± 002	97 ± 002	100 ± 006	100 ± 001	87 ± 004
Aceite de oliva ecológico	98 ± 003	101 ± 002	97 ± 001	99 ± 003	104 ± 006	85 ± 002
Aceite de pescado	98 ± 002	102 ± 001	100 ± 001	89 ± 005*	90 ± 003*	
Aceite de girasol	106 ± 010	102 ± 002	99 ± 003	97 ± 002	108 ± 004*	84 ± 0

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

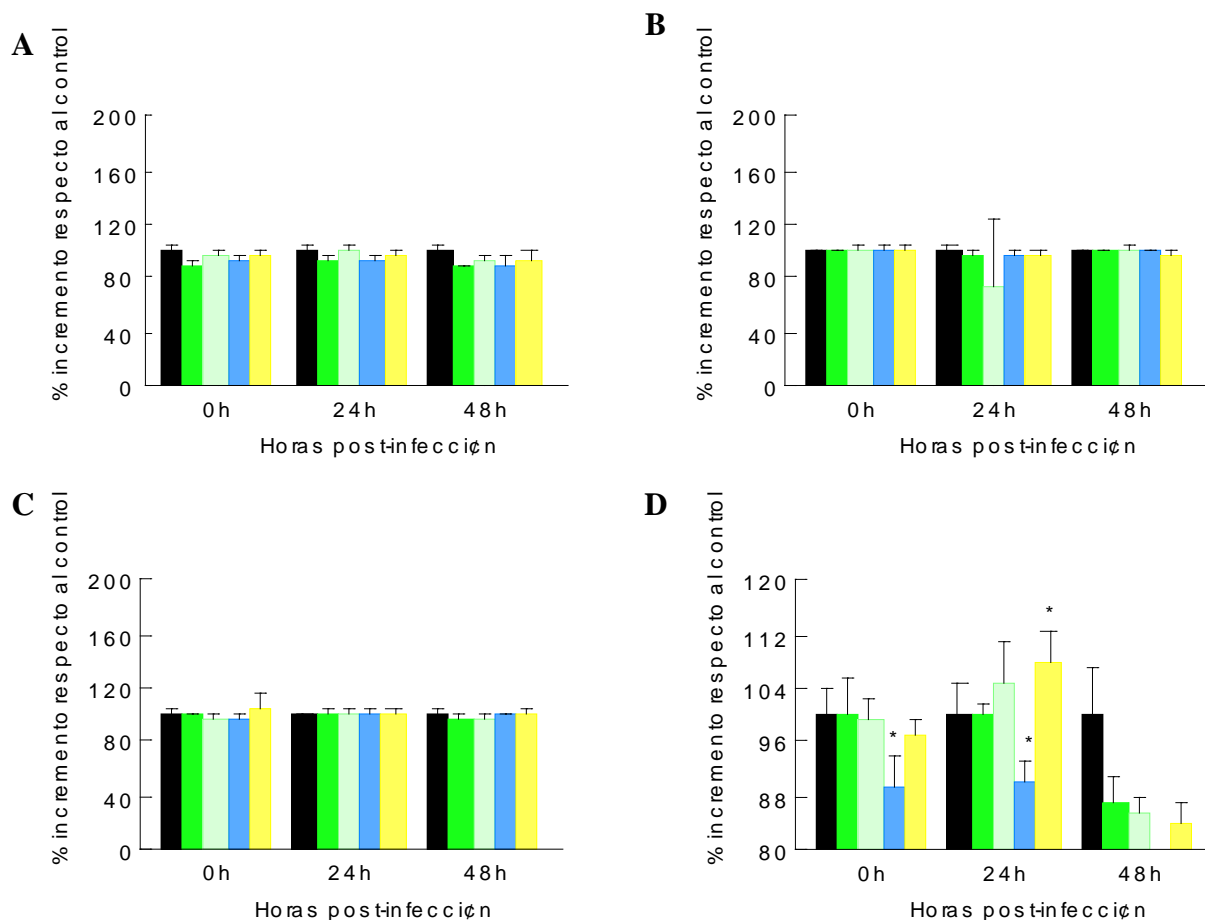


Figura 30. Medida del factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de GMC-SF en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” de eBioscience, que es capaz de cuantificar por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La Tabla 34 representa la variación en los niveles de los porcentajes de IL-4. El grupo control (PBS), y los tratados con CPA y RB6-8C5 mostraron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo en el grupo tratado con GK 1,5 no se encontró diferencia significativa alguna. En el grupo control (PBS) se produjo un aumento significativo a las 0 h, en el subgrupo de ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva ecológico respecto al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado; a las 24 h el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol se incrementó significativamente en comparación al subgrupo de ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado; y a las 48 h se observó una reducción significativa en el subgrupo alimentado con la dieta

de aceite de pescado respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas.

Los animales tratados con CPA mostraron un incremento significativo en las variaciones de los niveles de porcentaje del subgrupo alimentado con la dieta de pescado a las 48 h, en comparación al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva en el mismo punto de tiempo.

Dentro del grupo de tratamiento con RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado mostró una reducción significativa en su porcentaje a las 0 y 24 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 34).

Tabla 34. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 4 (IL-4)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 4						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 006	100 ± 005	100 ± 003	100 ± 004	100 ± 004	100 ± 004
Aceite de oliva	98 ± 002	94 ± 004	94 ± 002	95 ± 005	103 ± 003	97 ± 003
Aceite de oliva ecológico	101 ± 001*	98 ± 001	98 ± 002	94 ± 0,50	78 ± 052	98 ± 003
Aceite de pescado	95 ± 003	93 ± 003	88 ± 001*	97 ± 003	102 ± 001	105 ± 007*
Aceite de girasol	97 ± 002	99 ± 002*	97 ± 003	96 ± 002	102 ± 004	97 ± 003
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 002	100 ± 002	100 ± 001	100 ± 003	100 ± 002	100 ± 001
Aceite de oliva	97 ± 002	100 ± 001	100 ± 001	103 ± 002	103 ± 002	103 ± 004
Aceite de oliva ecológico	96 ± 003	98 ± 002	100 ± 003	98 ± 002	105 ± 004	99 ± 003
Aceite de pescado	97 ± 005	104 ± 002	100 ± 005	88 ± 004*	92 ± 004*	
Aceite de girasol	104 ± 008	100 ± 003	102 ± 002	99 ± 004	101 ± 003	97 ± 002

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

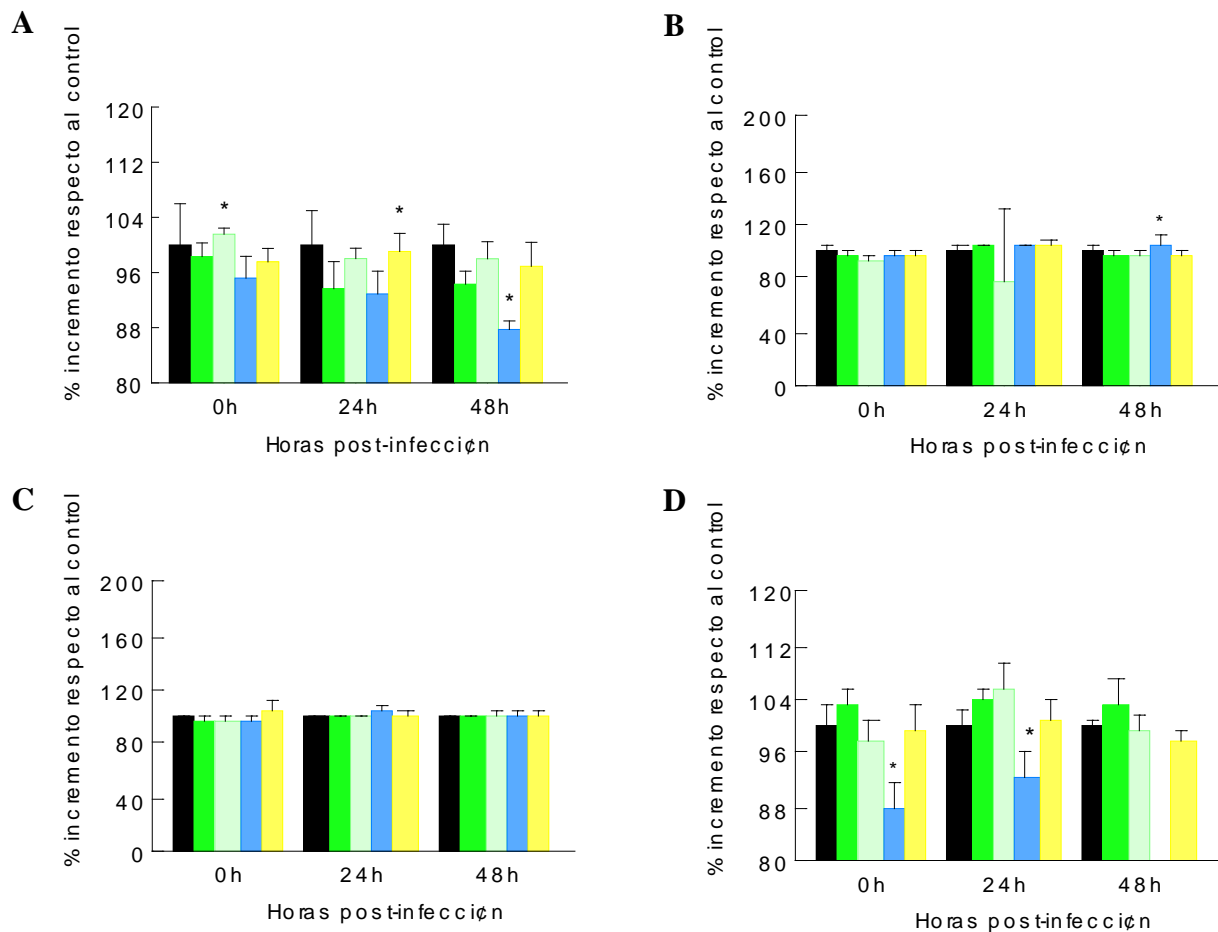


Figura 31. Medida de la interleuquina 4 (IL-4) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*.

Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-4 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex" de eBioscience, que es capaz de cuantificar por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La variación en el porcentaje de los niveles de la IL-17 se representan en la siguiente tabla (Tabla 35). El grupo tratado con PBS (control) y el tratado con RB6-8C5 mostraron diferencias significativas; en cambio los grupos tratados con CPA y GK 1.5 mostraron unos niveles no detectables por dicha técnica (datos no reflejados). Dentro del grupo control (PBS), el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva disminuyó de forma significativa a las 24 h respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de girasol; y a las 48 h en comparación al subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado.

En el grupo de ratones tratados con el inmunosupresor RB6-8C5, se encontró un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de girasol a las 24 h respecto a los subgrupos alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y aceite de oliva ecológico; también un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado a las 24 h en comparación al subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 35).

Tabla 35. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de interleuquina 17 (IL-17)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Interleuquina 17						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 005	100 ± 004	100 ± 004	100 ± 005	100 ± 005	100 ± 006
Aceite de oliva	93 ± 001	99 ± 005*	92 ± 002*	105 ± 002	201 ± 100	94 ± 004
Aceite de oliva ecológico	97 ± 001	109 ± 004	95 ± 0,50	99 ± 001	424 ± 072	87 ± 005
Aceite de pescado	89 ± 003	103 ± 007	102 ± 008	88 ± 004	749 ± 685*	
Aceite de girasol	98 ± 0,50	107 ± 003*	98 ± 001	108 ± 003	868 ± 433*	130 ± 042

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

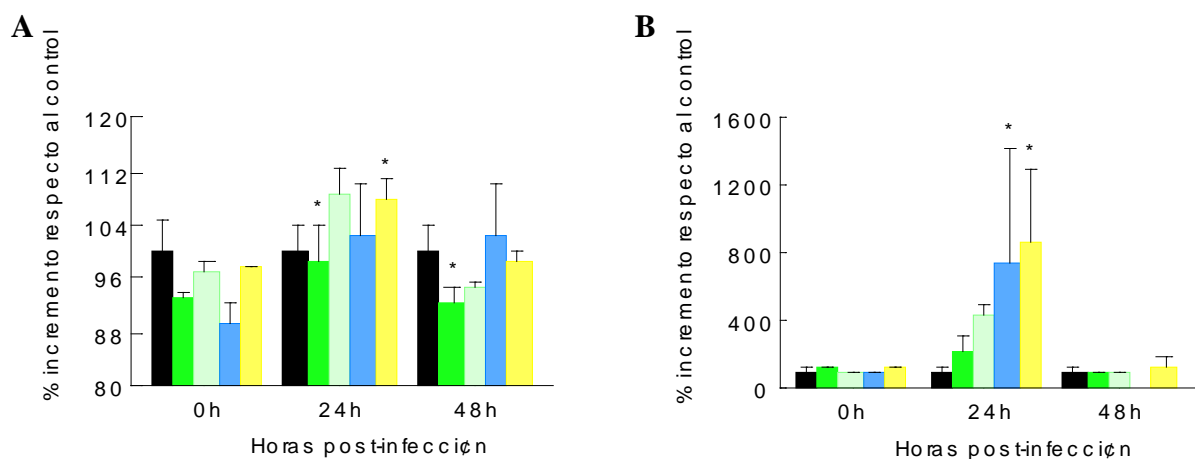


Figura 32. Medida de la interleuquina 17 (IL-17) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A) o RB6-8C5 (B) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de IL-17 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex” de eBioscience, que es capaz de cuantificar por citometría hasta 10 citoquinas simultáneamente. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.9.- Determinación de eicosanoides.

La variación en el porcentaje, respecto a la dieta baja en grasas, de los niveles de leucotrieno B4 (LTB4) se representó en la siguiente tabla (Tabla 36). Los resultados obtenidos en los test estadísticos reflejaron la existencia de diferencias significativas en el grupo control (PBS) y en los tres grupos de tratamiento.

En el grupo control (PBS) se destacó una reducción significativa en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva ecológico a las 0 h, respecto al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva.

En el grupo que fue tratado con CPA se encontró una reducción significativa en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva ecológico a las 0 h, respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas. Con el mismo tratamiento se observó un incremento significativo a las 24 h en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva respecto a todos los demás, y en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de pescado y aceite de oliva ecológico; a las 48 h se observó un incremento significativo en los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y

aceite de girasol, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado.

En el grupo de animales que fue tratado con el inmunosupresor GK 1.5, se observó un incremento significativo a las 0 y 24 h del subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de pescado y aceite de oliva ecológico; en contraste, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva mostró una disminución significativa a las 48 h, comparado con los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de girasol y aceite de oliva ecológico. En este grupo tratado con GK 1.5 también se destacó un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol a las 0 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado. Los ratones alimentados con la dieta de aceite de pescado y tratados con GK 1.5 a las 48 h, mostraron unos niveles tan bajos que no fue posible cuantificarlos con la técnica empleada

El grupo de ratones que fue tratado con RB6-8C5 mostró un incremento significativo a las 0 y 24 h de los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de pescado y aceite de girasol, sobre los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva y aceite de oliva ecológico; a las 48 h el incremento significativo se observó en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol sobre todos los subgrupos alimentados con las demás dietas. La ausencia de datos del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado a las 48 h en los tratamientos con GK 1.5 y RB6-8C5, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 36).

Tabla 36. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de leucotrieno B4 (LTB4)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Leucotrieno B4						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 009	100 ± 017	100 ± 020	100 ± 015	100 ± 010	100 ± 020
Aceite de oliva	239 ± 064	164 ± 015	162 ± 051	163 ± 027	175 ± 043*	137 ± 016*
Aceite de oliva ecológico	38 ± 008*	37 ± 031	25 ± 003	22 ± 003*	28 ± 005	26 ± 007
Aceite de pescado	161 ± 100	138 ± 112	110 ± 118	111 ± 058	54 ± 013	30 ± 008
Aceite de girasol	156 ± 028	118 ± 011	137 ± 040	142 ± 008	116 ± 024*	108 ± 013*
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 027	100 ± 057	100 ± 021	100 ± 021	100 ± 023	100 ± 014
Aceite de oliva	146 ± 011*	124 ± 022*	48 ± 04*	21 ± 004	9 ± 017	18 ± 008
Aceite de oliva ecológico	28 ± 016	23 ± 012	120 ± 083	53 ± 016	42 ± 023	42 ± 024
Aceite de pescado	60 ± 004	35 ± 004	-	158 ± 010*	187 ± 026*	-
Aceite de girasol	133 ± 025*	84 ± 015	149 ± 027	101 ± 003*	147 ± 032*	96 ± 012*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

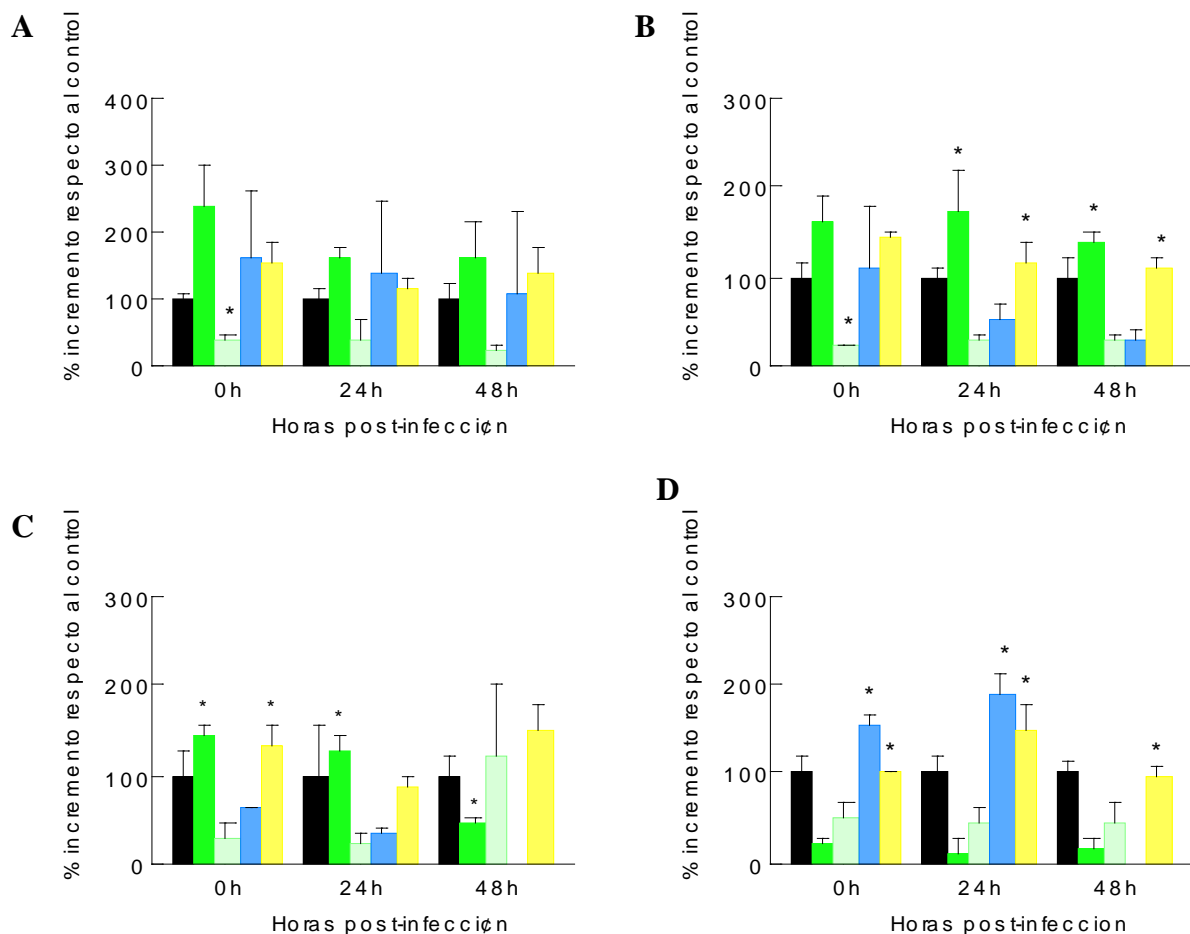


Figura 33. Medida del leucotrieno B4 (LTB4) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de LTB4 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Leukotriene B4 EIA Kit" de Oxford Biomedical Research, que es capaz de cuantificar este eicosanoide por ELISA competitivo. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

A continuación la siguiente tabla (Tabla 37) muestra el porcentaje de variación obtenida en la determinación de los niveles de tromboxano B2 (TXB2). Los grupos tratados con PBS (control) y CPA no mostraron diferencias significativas entre los distintos subgrupos alimentados con dietas; por el contrario si se encontraron diferencias significativas en los grupos que se trataron con GK 1,5 y RB6-8C5.

En el grupo tratado con GK 1,5 se produjo una disminución significativa del subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico a las 24 h, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas ricas en aceite de pescado y aceite de girasol; a las 48 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado se incrementó significativamente sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas.

Dentro del grupo tratado con RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado se incrementó de forma significativa a las 24 h sobre todos los subgrupos alimentados con las demás dietas. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 37).

Tabla 37. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de tromboxano B2 (TXB2)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Tromboxano B2						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 043	100 ± 012	100 ± 002	100 ± 044	100 ± 026	100 ± 018
Aceite de oliva	144 ± 011	1134 ± 1376	155 ± 048	307 ± 196	203 ± 042	157 ± 024
Aceite de oliva ecológico	92 ± 010	262 ± 068	195 ± 191	166 ± 029	193 ± 028	154 ± 026
Aceite de pescado	113 ± 026	228 ± 056	150 ± 091	188 ± 137	99 ± 053	130 ± 012
Aceite de girasol	198 ± 237	222 ± 104	123 ± 031	103 ± 008	196 ± 048	240 ± 144
GK 1,5						
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 017	100 ± 028	100 ± 017	100 ± 056	100 ± 027	100 ± 039
Aceite de oliva	261 ± 119	261 ± 054	126 ± 011	90 ± 004	159 ± 043	147 ± 006
Aceite de oliva ecológico	160 ± 029	130 ± 022*	163 ± 018	81 ± 004	115 ± 009	163 ± 007
Aceite de pescado	152 ± 046	300 ± 108	535 ± 152*	274 ± 024	446 ± 064*	-
Aceite de girasol	143 ± 026	296 ± 047	141 ± 026	258 ± 265	142 ± 023	224 ± 072

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

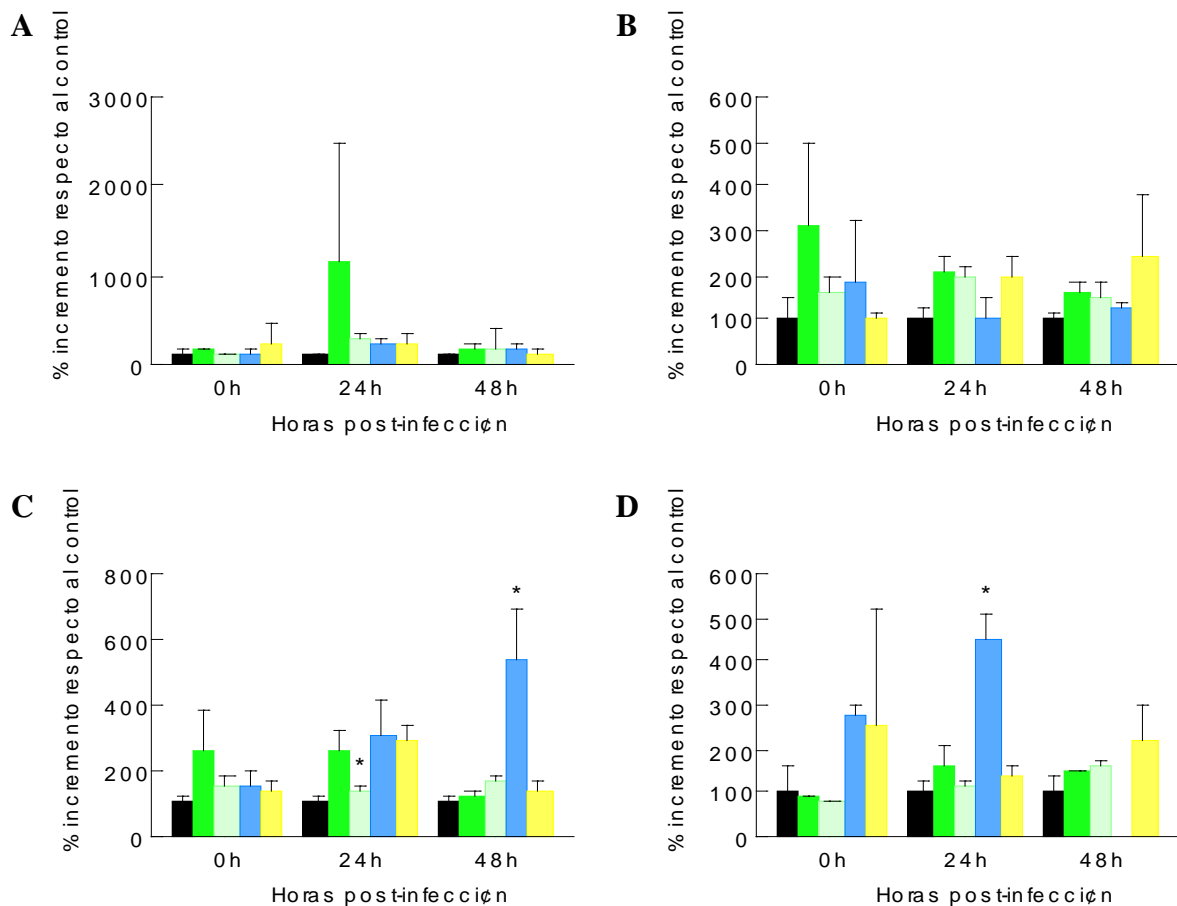


Figura 34. Medida del tromboxano B2 (TXB2) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*.

Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de TXB2 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit "Thromboxane B2 EIA Kit" de Oxford Biomedical Research, que es capaz de cuantificar este eicosanoide por ELISA competitivo. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

El porcentaje de variación respecto a la dieta control (baja en grasas) para los niveles de prostaglandina E2 (PGE2), se representó en la siguiente tabla (Tabla 38). En esta determinación se encontraron diferencias significativas en todos los grupos.

En el grupo control (tratado con PBS) se destacó un incremento significativo a las 0 h de los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y aceite de girasol, respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado; a las 24 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva continuó con un incremento significativamente mayor al resto de subgrupos alimentados con las demás dietas, en cambio el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol experimentó una reducción significativa en comparación al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva; finalmente a las 48 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado mostró un incremento significativo sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas, y el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de girasol disminuyó de forma significativa respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico, aceite de oliva y aceite de pescado.

El grupo tratado con CPA solo mostró diferencias significativas a las 0 h, cuando el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva se incrementó significativamente sobre los demás subgrupos, y el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol experimentó una reducción significativa respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de pescado.

En el grupo inmunosuprimido con GK 1.5 encontramos un incremento a las 0 h del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva ecológico respecto al subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de girasol, y a las 24 h un incremento del subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas ricas en aceite de girasol y aceite de oliva ecológico.

En el grupo de animales tratados con RB6-8C5 se observó que a las 0 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva mostró un incremento significativo sobre los subgrupos alimentados con las demás dietas; a las 24 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado se incrementó significativamente sobre los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de girasol y aceite de oliva, y el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de girasol se redujo de forma significativa respecto al subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva ecológico. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 38).

Tabla 38.- Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de prostaglandina E2 (PGE2)** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Prostaglandina E2						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 015	100 ± 045	100 ± 030	100 ± 026	100 ± 011	100 ± 050
Aceite de oliva	733 ± 106*	439 ± 080*	708 ± 079	1000 ± 246*	108 ± 017	103 ± 014
Aceite de oliva ecológico	310 ± 070	274 ± 086	759 ± 104	577 ± 354	173 ± 050	84 ± 048
Aceite de pescado	179 ± 036	165 ± 087	1656 ± 070*	516 ± 232	115 ± 045	156 ± 056
Aceite de girasol	524 ± 089*	54 ± 007*	139 ± 023*	234 ± 045*	83 ± 005	74 ± 015
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 058	100 ± 064	100 ± 047	100 ± 016	100 ± 013	100 ± 010
Aceite de oliva	282 ± 060	433 ± 278*	302 ± 074	253 ± 050*	131 ± 017	147 ± 048
Aceite de oliva ecológico	464 ± 169*	132 ± 010	250 ± 027	94 ± 009	191 ± 042	90 ± 028
Aceite de pescado	294 ± 162	154 ± 086	183 ± 098	135 ± 017	252 ± 064*	-
Aceite de girasol	147 ± 101	60 ± 009	160 ± 109	95 ± 012	88 ± 037*	110 ± 014

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

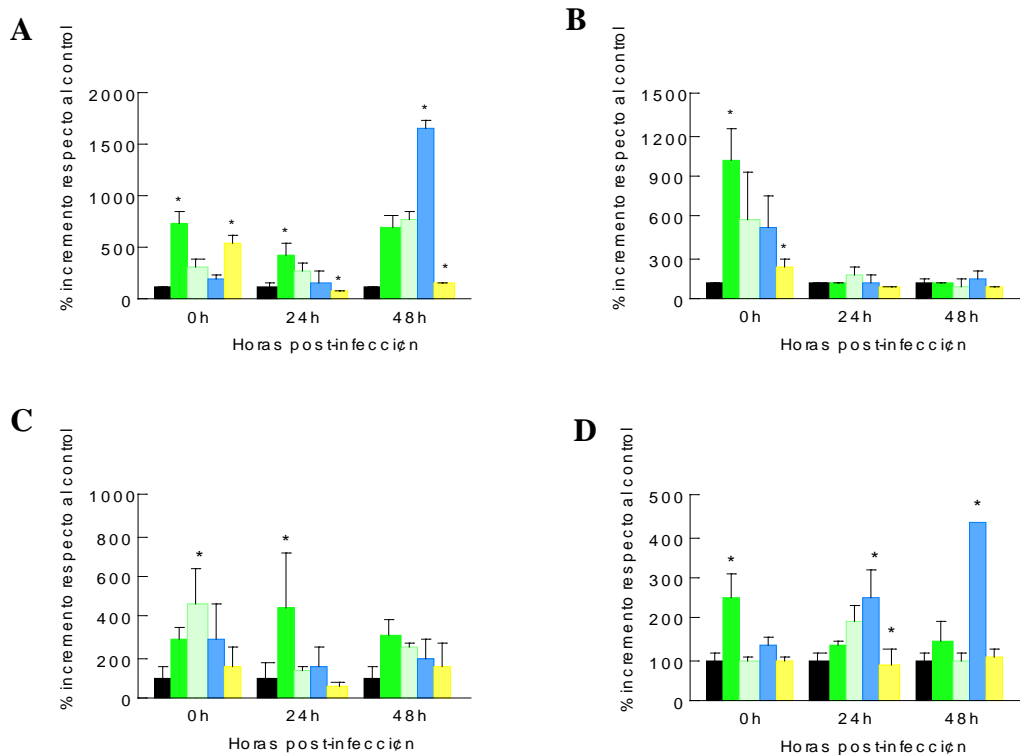


Figura 35. Medida de la prostaglandina E2 (PGE2) en suero de sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La producción de PGE2 en suero fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental y se cuantificó mediante el kit “PGE2 EIA Kit” de Oxford Biomedical Research, que es capaz de cuantificar este eicosanoide por ELISA competitivo. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

4.1.10.- Inmunofenotipaje en sangre periférica de ratón.

Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron mediante el empleo de una técnica de citometría de flujo, los análisis se realizaron en las siguientes: linfocitos CD3, linfocitos CD8, linfocitos CD4, linfocitos NK y linfocitos CD 19/32. Los resultados se expresaron como porcentaje de variación respecto a la dieta baja en grasas (control) de los subgrupos alimentados con dietas dentro de cada grupo de tratamiento.

La siguiente tabla (Tabla 39) muestra los resultados que se obtuvieron tras el análisis de la subpoblación de linfocitos CD3. El análisis estadístico mostró que no existieron diferencias significativas en los grupos tratados con PBS (control), CPA y GK 1.5; en cambio en el grupo tratado con RB6-8C5 a las 0 h se incrementó significativamente el porcentaje de linfocitos CD3 del subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico respecto al subgrupo alimentado con la

dieta de aceite de girasol, y a las 48 h, este último subgrupo, se incrementó significativamente en comparación al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico.

La ausencia de datos a las 24 h en el tratamiento control en los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva se debe a la incapacidad de dicha técnica de cuantificar unos niveles tan bajos. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 39).

Tabla 39. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de linfocitos CD3** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Linfocitos CD3						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 006	100 ± 001	100 ± 001	100 ± 006	100 ± 005	100 ± 013
Aceite de oliva	99 ± 016	↓↓↓↓	121 ± 036	100 ± 003	101 ± 005	104 ± 016
Aceite de oliva ecológico	105 ± 006	123 ± 001	114 ± 023	99 ± 002	101 ± 002	101 ± 009
Aceite de pescado	122 ± 007	116 ± 001	137 ± 015	103 ± 001	92 ± 007	101 ± 006
Aceite de girasol	76 ± 020	104 ± 001	113 ± 013	88 ± 021	97 ± 012	99 ± 005
GK 1,5						
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 014	100 ± 0,20	100 ± 009	100 ± 005	100 ± 015	100 ± 044
Aceite de oliva	86 ± 020	112 ± 003	100 ± 002	134 ± 017	96 ± 004	76 ± 026
Aceite de oliva ecológico	96 ± 026	102 ± 014	107 ± 010	158 ± 017*	97 ± 006	57 ± 005
Aceite de pescado	95 ± 014	76 ± 023	103 ± 010	143 ± 005	80 ± 016	-
Aceite de girasol	81 ± 005	86 ± 040	120 ± 018	120 ± 014	103 ± 013	111 ± 013*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

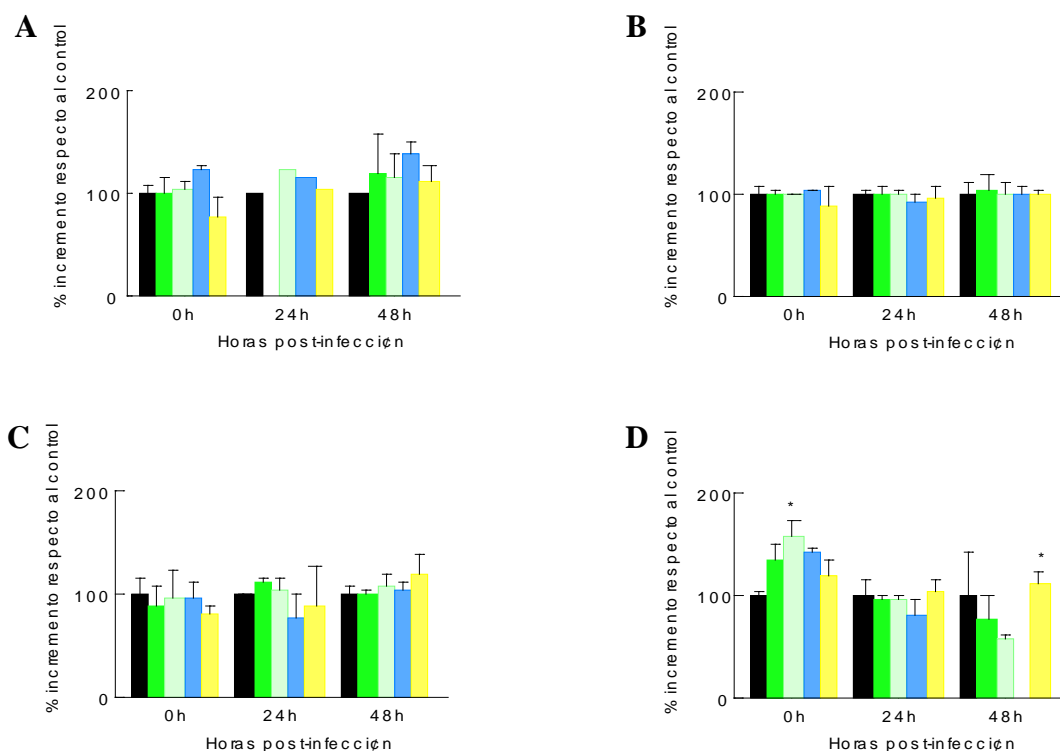


Figura 36. Cuantificación de linfocitos T CD3 en sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La medida de células CD3 en sangre fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental. La cuantificación se realizó mediante una técnica de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La siguiente tabla (Tabla 40) muestra los resultados que se obtuvieron tras el análisis de la subpoblación de linfocitos CD8; en este caso no se encontraron diferencias significativas en el grupo control (PBS) y en el grupo tratado con GK 1,5, en cambio si se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con CPA y RB6-8C5.

Los animales tratados con CPA mostraron una reducción significativa en el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado en los tres puntos de tiempo; a las 0 y 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de girasol, y a las 24 h comparado con los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de oliva.

El grupo tratado con el inmunosupresor RB6-8C5 mostró una disminución significativa en la variación del porcentaje del subgrupo alimentado la dieta que contenía aceite de girasol, respecto a los ratones alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y aceite de oliva ecológico.

La ausencia de datos a las 24 h en el tratamiento control en los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva ecológico se debe a la incapacidad de la técnica de cuantificar unos niveles tan bajos. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 40).

Tabla 40. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de linfocitos CD8** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Linfocitos CD8						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 005	100 ± 001	100 ± 001	100 ± 001	100 ± 002	100 ± 027
Aceite de oliva	98 ± 015	132 ± 002	165 ± 009	105 ± 009	101 ± 018	87 ± 016
Aceite de oliva ecológico	112 ± 003	↓↓↓↓	132 ± 029	129 ± 003	99 ± 003	126 ± 011
Aceite de pescado	92 ± 019	93 ± 001	90 ± 071	83 ± 012*	54 ± 016*	65 ± 015*
Aceite de girasol	64 ± 037	78 ± 001	159 ± 031	130 ± 009	80 ± 012	129 ± 035
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 028	100 ± 003	100 ± 020	100 ± 012	100 ± 029	100 ± 010
Aceite de oliva	122 ± 020	119 ± 009	116 ± 018	107 ± 005	70 ± 006	160 ± 023
Aceite de oliva ecológico	109 ± 052	114 ± 024	92 ± 021	98 ± 017	74 ± 015	141 ± 019
Aceite de pescado	79 ± 024	68 ± 011	88 ± 019	107 ± 008	110 ± 027	-
Aceite de girasol	110 ± 004	90 ± 046	86 ± 011	92 ± 017	92 ± 040	84 ± 012*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

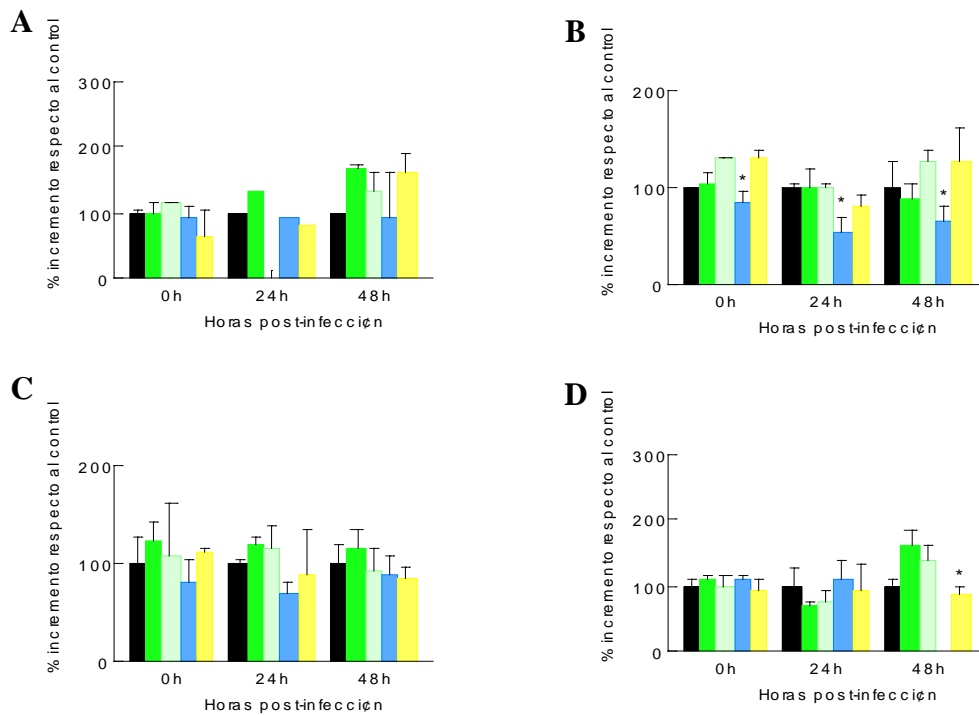


Figura 37. Cuantificación de linfocitos T CD8 en sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La medida de células CD8 en sangre fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental. La cuantificación se realizó mediante una técnica de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

La Tabla 41 representa los resultados obtenidos en la determinación de la subpoblación de linfocitos CD4; el análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas en el grupo control (PBS) y el tratado con CPA, por el contrario se encontraron diferencias significativas en los grupos tratados con GK 1,5 y RB6-8C5.

Los animales tratados con GK 1,5 mostraron un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de pescado a las 24 y 48 h sobre todos los subgrupos de ratones alimentados con las demás dietas.

En el grupo de tratamiento con RB6-8C5 se produce un incremento significativo en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico respecto al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de girasol, este mismo subgrupo disminuyó significativamente a las 48 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas.

La ausencia de datos a las 24 h en el tratamiento control en los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva ecológico se debe a la incapacidad de la técnica de cuantificar unos niveles tan bajos. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 41).

Tabla 41. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de linfocitos CD4** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Linfocitos CD4						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 004	100 ± 001	100 ± 001	100 ± 004	100 ± 012	100 ± 012
Aceite de oliva	108 ± 011	131 ± 002	103 ± 028	97 ± 003	107 ± 002	93 ± 012
Aceite de oliva ecológico	111 ± 007	↓↓↓	106 ± 022	90 ± 004	104 ± 003	77 ± 013
Aceite de pescado	134 ± 011	119 ± 001	125 ± 022	107 ± 003	95 ± 004	100 ± 014
Aceite de girasol	86 ± 031	88 ± 001	103 ± 017	87 ± 008	101 ± 014	82 ± 008
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 050	100 ± 019	100 ± 024	100 ± 005	100 ± 004	100 ± 016
Aceite de oliva	38 ± 019	231 ± 210	91 ± 094	145 ± 021	105 ± 018	53 ± 005
Aceite de oliva ecológico	53 ± 057	162 ± 040	77 ± 007	178 ± 030*	97 ± 013	46 ± 003
Aceite de pescado	79 ± 007	842 ± 241*	688 ± 155*	147 ± 003	72 ± 017	-
Aceite de girasol	135 ± 106	200 ± 157	154 ± 001	134 ± 019	109 ± 027	0,3 ± 0,20*

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

* $P < 0,05$ fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

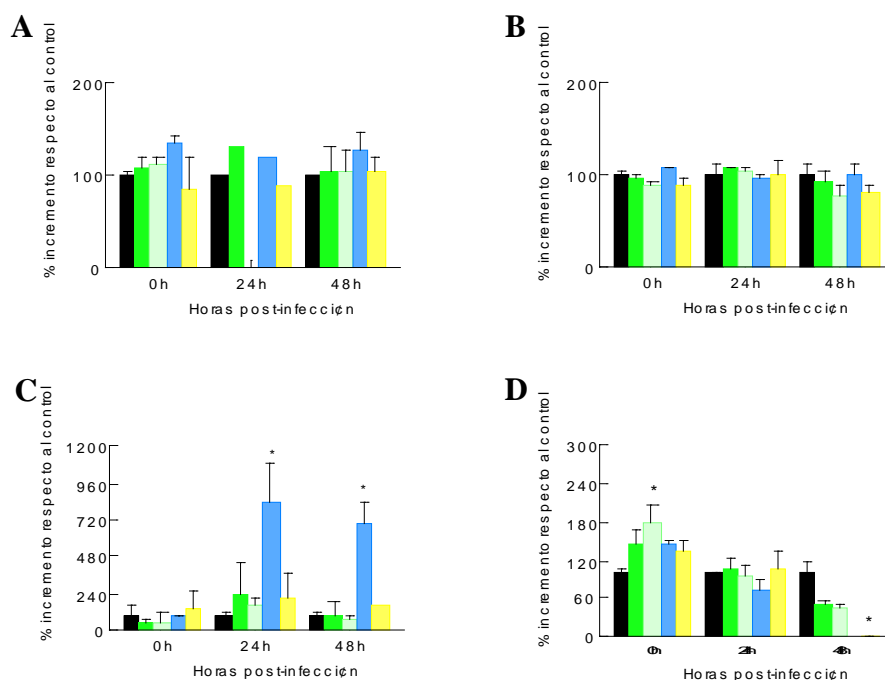


Figura 38. Cuantificación de linfocitos T CD4 en sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La medida de células CD4 en sangre fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental. La cuantificación se realizó mediante una técnica de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

Los resultados de la determinación de la subpoblación de linfocitos NK se representaron en la siguiente tabla (Tabla 42). El posterior análisis estadístico no mostró diferencias significativas en los grupos de tratamiento con PBS (control), CPA y RB6-8C5; en cambio solo se encontró una diferencia significativa en el grupo de GK 1.5 a las 24 h, donde el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado se incremento significativamente respecto al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva ecológico.

La ausencia de datos a las 24 h en el tratamiento control en los ratones alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y aceite de girasol, se debe a la incapacidad de la técnica de cuantificar unos niveles tan bajos. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 42).

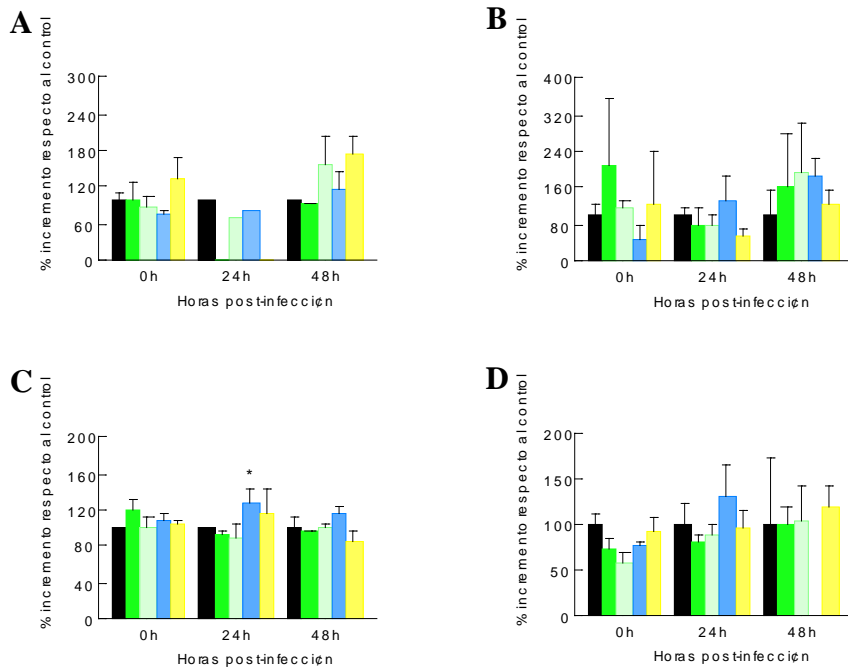


Figura 39. Cuantificación de linfocitos NK en sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La medida de células NK en sangre fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental. La cuantificación se realizó mediante una técnica de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (* $P < 0.05$).

Tabla 42. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de linfocitos NK** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Linfocitos NK						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 011	100 ± 001	100 ± 002	100 ± 023	100 ± 012	100 ± 057
Aceite de oliva	97 ± 028	↓↓↓ ↓	91 ± 003	205 ± 151	74 ± 040	161 ± 113
Aceite de oliva ecológico	88 ± 014	68 ± 001	154 ± 046	113 ± 017	79 ± 018	191 ± 107
Aceite de pescado	74 ± 006	83 ± 001	115 ± 030	47 ± 026	130 ± 055	182 ± 039
Aceite de girasol	132 ± 035	↓↓↓ ↓	172 ± 032	121 ± 114	52 ± 014	121 ± 033
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 001	100 ± 001	100 ± 010	100 ± 010	100 ± 025	100 ± 072
Aceite de oliva	119 ± 014	91 ± 006	95 ± 002	74 ± 011	80 ± 010	98 ± 023
Aceite de oliva ecológico	101 ± 08	90 ± 013	99 ± 006	58 ± 012	87 ± 012	102 ± 040
Aceite de pescado	109 ± 005	125 ± 018*	114 ± 008	76 ± 003	133 ± 033	-
Aceite de girasol	104 ± 004	115 ± 027	85 ± 010	91 ± 016	98 ± 020	119 ± 024

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

*P < 0,05 fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

La siguiente tabla (Tabla 43) representa los resultados obtenidos en el análisis de la subpoblación de linfocitos CD19/32. Los tres grupos de tratamiento mostraron diferencias significativas a excepción del grupo control (PBS), donde el análisis estadístico no mostró la existencia de diferencias significativas.

En el grupo de animales que fue tratado con CPA, se produjo un incremento significativo a las 48 h en el subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de oliva ecológico respecto a los subgrupos alimentados con las dietas ricas en aceite de pescado y aceite de oliva.

En el grupo tratado con el inmunosupresor GK 1.5, se produjo un incremento significativo del subgrupo alimentado con la dieta que contenía aceite de pescado a las 0 h respecto al subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva, y a las 24 h en comparación a los subgrupos alimentados con las dietas de aceite de oliva ecológico y aceite de oliva.

En el grupo de RB6-8C5, el subgrupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado se incrementó significativamente a las 24 h respecto a los subgrupos alimentados con las demás dietas; y a las 48 h el subgrupo alimentado con la dieta de aceite de oliva fue significativamente mayor comparado con los subgrupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva ecológico y aceite de girasol.

La ausencia de datos a las 24 h en el tratamiento control en los ratones alimentados con la dieta de aceite de oliva se debe a la incapacidad de la técnica de cuantificar unos niveles tan bajos. La ausencia de datos en los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con aceite de pescado a las 48 h, se debe a la incapacidad de los animales de superar la infección (Tabla 43).

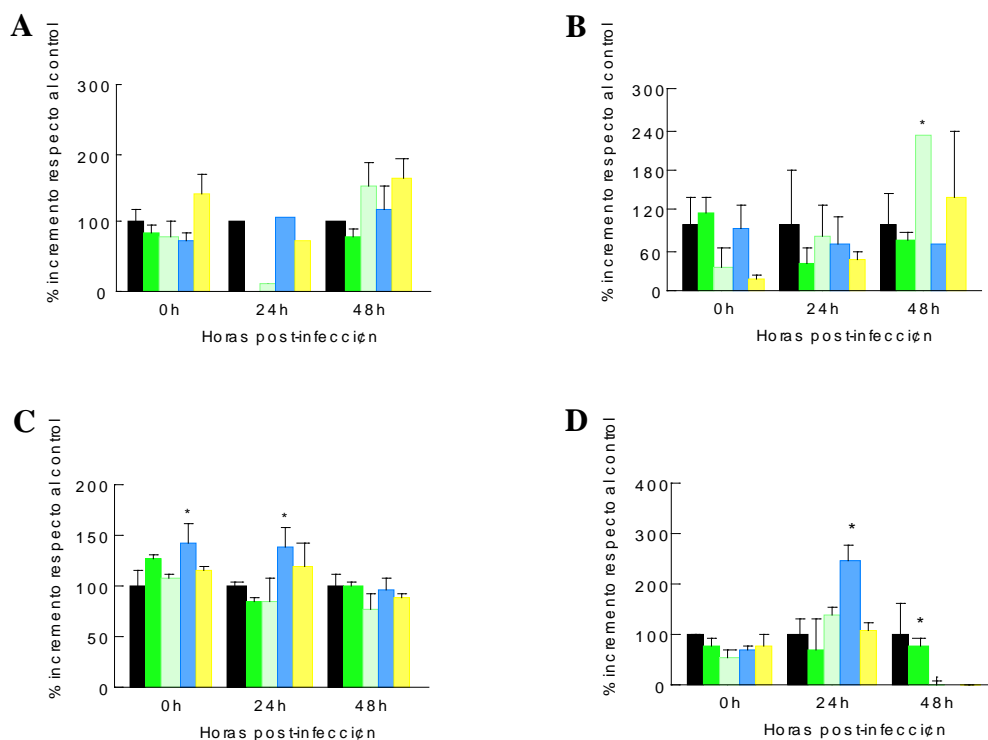


Figura 36. Cuantificación de linfocitos CD19 en sangre periférica procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con PBS (A), CPA (B), GK 1.5 (C) o RB6-8C5 (D) previamente a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*. Ratones Balb/c alimentados con sus respectivas dietas lipídicas durante 30 días (n=15 en cada intervalo de tiempo) e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* por vía intravenosa (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC/mL]); al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal PBS. Las barras negras corresponden a la dieta control o baja en grasas (■). Las barras azules (■) corresponden a la dieta de aceite de pescado. Las barras verdes (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra. Las barras verdes claras (■) corresponden a la dieta de aceite de oliva virgen extra ecológico. Las barras amarillas (■) corresponden a la dieta de aceite de girasol. La medida de células CD19 en sangre fue determinada a las 0, 24 y 48 h tras la infección experimental. La cuantificación se realizó mediante una técnica de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (n=4 en cada intervalo de tiempo), el análisis estadístico se realizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los valores con asterisco presentan una diferencia significativa respecto a la dieta baja en grasas o control (*P<0.05).

Tabla 43. Efecto de la administración de las dietas lipídicas durante un periodo de 30 días, en la **producción de linfocitos CD19/32** en sangre periférica de ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* a las 0, 24 y 48 h post-infección (n=10 en cada subgrupo de dieta).

Linfocitos 19/32						
% incremento respecto a baja en grasas	PBS			CPA		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 017	100 ± 002	100 ± 001	100 ± 037	100 ± 078	100 ± 043
Aceite de oliva	82 ± 012	↓↓↓↓	77 ± 013	115 ± 024	40 ± 021	76 ± 013
Aceite de oliva ecológico	76 ± 025	82 ± 001	153 ± 035	32 ± 030	81 ± 044	230 ± 001*
Aceite de pescado	71 ± 011	109 ± 001	121 ± 029	91 ± 035	70 ± 042	68 ± 001
Aceite de girasol	143 ± 029	75 ± 001	162 ± 028	19 ± 003	45 ± 014	139 ± 096
	GK 1,5			RB6-8C5		
Tiempo post-infección (h)	0	24	48	0	24	48
Baja en grasas	100 ± 014	100 ± 004	100 ± 010	100 ± 003	100 ± 029	100 ± 060
Aceite de oliva	127 ± 004	84 ± 003	99 ± 004	76 ± 013	70 ± 060	79 ± 014*
Aceite de oliva ecológico	108 ± 002	85 ± 021	78 ± 013	50 ± 019	140 ± 016	2 ± 002
Aceite de pescado	143 ± 018*	141 ± 016*	96 ± 011	70 ± 006	243 ± 038*	-
Aceite de girasol	115 ± 005	118 ± 023	88 ± 005	78 ± 022	108 ± 011	1 ± 001

Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de cuatro experimentos independientes (n=10 en cada subgrupo de dieta). Fueron analizados mediante test de Student-Newman-Keuls con un intervalo de confianza del 95%.

**P* < 0,05 fueron consideradas diferencias estadísticas significativas.

4.2.- Resumen de resultados.

En las siguientes tablas se muestra un resumen de las diferencias significativas encontradas

4.2.1.- Parámetros fisiológicos.

		Peso ratón	Peso bazo	Peso hígado	Peso timo	Índice esplénico
PBS	LF	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-
	E	* ↑ 48 h	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-
CPA	LF	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
	P	* ↓ 0 h	* ↓ 48 h	-	* ↑ 48 h	* ↓ 48 h
	G	-	-	-	* ↑ 24 h	-
GK 1.5	LF	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
	P	* ↓ 24 h	* ↑ 24 h	* ↑ 24 h	-	* ↑ 24 h
	G	* ↑ 24 y 48 h	-	-	-	-
RB6-8C5	LF	-	-	-	-	-
	O	* ↑ 24 h	-	* ↑ 24 h	-	-
	E	-	-	-	* ↑ 48 h	-
	P	* ↑ 24 h	-	-	-	-
	G	-	-	* ↓ 48 h	-	-

En la columna de la izquierda se encuentran el tratamiento control (PBS) y los inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). Abreviaturas: LF (*low fat*, baja en grasas), O (aceite de oliva virgen extra), E (aceite de oliva virgen extra ecológico), P (aceite de pescado), G (aceite de girasol). Flecha ascendente: incremento; flecha descendente: reducción.

4.2.2.- ROS y Recuperación de bacterias viables en bazo e hígado.

		ROS	Aclaramiento bazo	Aclaramiento hígado
PBS	LF	-	* ↓ 24 y 48 h	* ↓ 24 y 48 h
	O	-	-	-
	E	↑ 48 h	-	* ↑ 48 h
	P	↑ 24 y 48 h	* ↑ 24 y 48 h	* ↑ 24 h
	G	-	-	-
CPA	LF	-	-	* ↓ 24 h
	O	-	-	-
	E	↑ 48 h	-	-
	P	↑ 0, 24 y 48 h	* ↑ 24 y 48 h	* ↑ 24 y 48 h
	G	-	-	-
GK 1.5	LF	-	* ↑ 48 h	* ↑ 48 h
	O	↑ 48 h	-	-
	E	-	* ↓ 24 h	* ↓ 48 h
	P	↑ 48 h	* ↑ 48 h	* ↑ 24 y 48 h
	G	-	-	* ↑ 48 h
RB6-8C5	LF	-	-	-
	O	-	-	-
	E	↑ 48 h	-	-
	P	↑ 0 y 24 h	* ↑ 24 h	* ↑ 24 h
	G	-	* ↑ 48 h	* ↑ 48 h

En la columna de la izquierda se encuentran el tratamiento control (PBS) y los inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). Abreviaturas: LF (*low fat*, baja en grasas), O (aceite de oliva virgen extra), E (aceite de oliva virgen extra ecológico), P (aceite de pescado), G (aceite de girasol). Flecha ascendente: incremento; flecha descendente: reducción.

4.2.3.- Linfoproliferaciones en bazo y timo ± concanavalina A.

		Proliferación bazo	Proliferación bazo + ConA	Proliferación timo	Proliferación timo + Con A
PBS	LF	Dieta control			
	O	-	-	-	-
	E	-	* ↓ 0 h	* ↑ 24 h * ↓ 48 h	-
	P	* ↑ 24 h	* ↑ 24 y 48 h	-	* ↑ 48 h
	G	-	-	* ↓ 0 y 48 h	-
CPA	LF	Dieta control			
	O	* ↓ 0 h * ↑ 24 h	* ↑ 24 y 48 h	-	-
	E	* ↓ 0 h * ↑ 24 h	* ↑ 0 y 48 h	-	-
	P	-	* ↓ 48 h	-	-
	G	-	* ↓ 48 h	-	* ↓ 48 h
GK 1.5	LF	Dieta control			
	O	-	-	* ↓ 48 h	-
	E	* ↑ 0 h	* ↑ 0 h	* ↑ 48 h	* ↓ 0 h * ↑ 48 h
	P	* ↑ 0 h	* ↑ 0, 24 y 48 h	-	* ↓ 24 h
	G	-	-	-	-
RB6-8C5	LF	Dieta control			
	O	-	-	* ↑ 0 h	-
	E	-	-	* ↑ 48 h	* ↑ 24 h
	P	-	-	-	-
	G	-	* ↓ 0 y 48 h	-	-

En la columna de la izquierda se encuentran el tratamiento control (PBS) y los inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). Abreviaturas: LF (*low fat*, baja en grasas), O (aceite de oliva virgen extra), E (aceite de oliva virgen extra ecológico), P (aceite de pescado), G (aceite de girasol), Con A (concanavalina A). Flecha ascendente: incremento; flecha descendente: reducción.

4.2.4.- Citoquinas Th1/Th2.

Citoquinas Th1/Th2		
PBS	LF	Sin diferencias significativas.
	O	↓ IL-17 24 y 48 h ↑ IFN γ 24 y 48 h ↑ TNF α 24 y 48 h
	E	↑ IL-4 0 h ↑ IL-6 24 h
	P	↑ IL-1 α 48 h ↓ IL-4 48 h ↑ IL-6 48 h ↑ IL-10 48 h ↑ IL-12p70 24 h
	G	↑ IL-4 24 h ↑ IL-17 24 h
CPA	LF	Sin diferencias significativas.
	O	Sin diferencias significativas.
	E	Sin diferencias significativas.
	P	↑ IL-1 α 48 h ↑ IL-4 48 h ↑ IL-5 48 h ↑ IL-6 48 h ↑ IL-10 48 h ↑ IL-12p70 48 h ↑ IFN γ 48 h
	G	Sin diferencias significativas.
GK 1.5	LF	Sin diferencias significativas.
	O	↓ IL-1 α 24 h
	E	Sin diferencias significativas.
	P	↑ IL-1 α 0 h ↑ IL-6 24 y 48 h ↑ IL-12p70 24 h ↑ IFN γ 24 y 48 h
	G	↑ IL-2 0 h ↑ IFN γ 0 h
RB6-8C5	LF	Sin diferencias significativas.
	O	Sin diferencias significativas.
	E	↑ IL-1 α 24 h ↑ IL-6 24 h
	P	↓ IL-4 0 y 24 h ↑ IL-6 24 h ↑ IL-12p70 24 h ↑ IL-17 24 h ↑ IFN γ 24 h ↑ TNF α 24 h ↓ GM-CSF 0 y 24 h
	G	↑ IL-1 α 24 h ↑ IL-6 24 h ↑ IL-10 48 h ↑ IL-17 24 h ↑ TNF α 48 h ↑ GM-CSF 24 h

En la columna de la izquierda se encuentran el tratamiento control (PBS) y los inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). Abreviaturas: LF (*low fat*, baja en grasas), O (aceite de oliva virgen extra), E (aceite de oliva virgen extra ecológico), P (aceite de pescado), G (aceite de girasol), IL-1 (interleuquina-1), IL-2 (interleuquina-2), IL-4 (interleuquina-4), IL-5 (interleuquina-5), IL-6 (interleuquina-6), IL-10 (interleuquina-10), IL-12p70 (interleuquina-12p70), IL-17 (interleuquina-17), IFN γ (interferón gamma), GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocito-macrófago), TNF α (factor de necrosis tumoral alpha). Flecha ascendente: incremento; flecha descendente: reducción.

4.2.5.- Eicosanoides y subpoblaciones linfocitarias

		Eicosanoides	Subpoblaciones linfocitarias
PBS	LF		No se encontraron diferencias significativas
	O	↑ PGE2 0 y 24 h	
	E	↓ LTB4 0 h	
	P	↑ PGE2 48 h	
	G	↑ PGE2 0 h ↓ 24 y 48 h	
CPA	LF		
	O	↑ LTB4 24 y 48 h ↑ PGE2 0 h	
	E	↓ LTB4 0 h	↑ CD19/32 48 h
	P		↑ CD8 0, 24 y 48 h
	G	↑ LTB4 24 y 48 h ↓ PGE2 0 h	
GK 1.5	LF		
	O	↑ LTB4 0 y 24 h ↓ LTB4 48 h ↑ PGE2 24 h	
	E	↓ TXB2 24 h ↑ PGE2 0 h	
	P	↑ TXB2 48 h	↑ CD4 24 y 48 h ↑ CD19/32 0 y 24 h ↑ NK 24 h
	G	↑ LTB4 0 h	
RB6-8C5	LF		
	O	↑ PGE2 0 h	↑ CD19/32 48 h
	E		↑ CD3 0 h ↑ CD4 0 h
	P	↑ LTB4 0 y 24 h ↑ TXB2 24 h ↑ PGE2 24 h	↑ CD19/32 24 h
	G	↑ LTB4 0, 24 y 48 h ↓ PGE2 24 h	↑ CD3 48 h ↓ CD4 48 h ↓ CD8 48 h

En la columna de la izquierda se encuentran el tratamiento control (PBS) y los inmunosupresores (CPA, GK 1.5 y RB6-8C5). Abreviaturas: LF (*low fat*, baja en grasas), O (aceite de oliva virgen extra), E (aceite de oliva virgen extra ecológico), P (aceite de pescado), G (aceite de girasol), LTB4 (leucotrieno B4), PGE2 (prostaglandina E2), TXB2 (tromboxano B2). Flecha ascendente: incremento; flecha descendente: reducción.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

La relación establecida entre el estado nutricional del individuo y su respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas, está constada desde hace bastante tiempo cuando los primeros trabajos del año 1976 demostraron una disminución en la frecuencia de las células T en niños con malnutrición (Nahani *et al.*, 1976).

A lo largo de esa década y en los siguientes años, en niños en estado de malnutrición se realizaron varios estudios que establecieron una primera relación entre "*inmunonutrición e infección*", (Brown 1977), más tarde se relacionó de forma directa la inmunocompetencia del individuo y su estado nutricional (Chandra, 1981; Cunningham-Rundles, 1982; Chandra, 1991). Se puede observar como a lo largo de los años ochenta comienzan a aparecer una serie de estudios en los que se relacionaba la inmunonutrición con diversas patologías como la enfermedad de Crohn (Harries *et al.*, 1984), procesos oncológicos (Jeejeebhoy y Mequid, 1986), infecciones pulmonares (Martin, 1987) y además, en personas de avanzada edad (Goodwin y Garry, 1988). En esta década deben destacarse uno de los primeros trabajos en los que se estudiaba el efecto de la nutrición en el transcurso de una infección experimental con *Listeria monocytogenes*; en el año 1984 Kos y colaboradores demostraron el empeoramiento de la inmunidad específica frente a dicha bacteria, en ratones alimentados con una dieta de alto contenido en grasa, colesterol y sacarosa (Kos *et al.*, 1984). Se debe destacar que una serie de estudios epidemiológicos llevados a cabo en estos años, demostraba que las grandes cantidades ingeridas de aceite de pescado (serie n-3) en esquimales de Groenlandia debido a un alto consumo de pescado en la dieta de estos, producía una supresión del sistema inmune que era causa de una baja incidencia de enfermedades autoinmunes pero con un incremento de las enfermedades infecciosas (Kromann y Green, 1980), con una elevada incidencia de la tuberculosis en dicha población (Grzybowki y Dorken, 1983).

Durante el transcurso de los años se han publicado multitud de estudios más detallados de la modulación ejercida por ciertos tipos de ácidos grasos sobre la respuesta inmune (Calder, 1998); como es el caso de los ácidos grasos de la serie n-6 (Utermohlen y Tucker, 1986) y la serie n-3 (Alexander, 1998), la relación de los mismos con los procesos inflamatorios (Blackburn, 1992; Grimble, 2005). Desde el momento en el que se demostró el importante papel de los ácidos grasos en la modulación inmune, se comenzaron a desarrollar fórmulas de nutrientes para los pacientes hospitalizados que requerían de un aporte nutricional enteral o parenteral. Hoy día las fórmulas empleadas son numerosas y variadas, siendo aplicadas en función de la patología a tratar, además, en varias de ellas se incluye el ácido oleico (serie n-9) presente en el aceite de oliva (ClinOleic®,

SMOFlipid®). El aceite de oliva demostró tener propiedades beneficiosas ejerciendo una menor supresión del sistema inmune junto a una disminución en la incidencia en patologías autoinmunes, cáncer y enfermedades cardiovasculares Zamora-Ardoy *et al.*, (2004); Sales-Campos *et al.*, (2013); Moreno-Luna *et al.*, (2012).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado investigaciones en los que se demuestra la influencia de los distintos tipos de ácidos grasos, en especial el aceite de oliva, en el sistema inmune en general (de Pablo y Álvarez de Cienfuegos, 2000); en la actividad fagocítica y producción de citoquinas de células peritoneales murinas (de Pablo *et al.*, 1998), en la resistencia natural de ratones alimentados con diferentes dietas lipídicas frente a una infección con *L. monocytogenes* (de Pablo *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001b; Puertollano *et al.*, 2002), en la combinación de dietas lipídicas y antioxidantes (Puertollano *et al.*, 2003), en la determinación de la apoptosis producida en timocitos murinos de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados con *L. monocytogenes* (Puertollano *et al.*, 2004a) y en la resistencia de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con ciclofosfamida a una infección experimental con *L. monocytogenes* (Cruz-Chamorro *et al.*, 2007).

En el presente estudio se ha determinado la influencia de cinco dietas experimentales en un modelo murino sometido a una infección experimental con *L. monocytogenes* y tratado previamente con tres agentes inmunosupresores diferentes. La elección de esta bacteria Gram positiva y de crecimiento intracelular se debe a la presencia de la misma en los alimentos y el rápido proceso de infección que se produce dando lugar a importantes efectos citopáticos y sistémicos (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). El empleo de modelos experimentales murinos y sometidos a listeriosis se ha extendido en los últimos años debido un mayor conocimiento sobre su papel en el interior celular y de los mediadores inmunes implicados.

5.1.- Efecto de las diferentes dietas lipídicas en los grupos experimentales no sometidos a tratamiento inmunosupresor.

En los ratones no sometidos a tratamiento inmunosupresor alguno, y posteriormente infectados con *L. monocytogenes*, los distintos tipos de dietas ensayados no parecen afectar de forma importante al peso corporal, salvo en el caso de la dieta rica en aceite de oliva de cultivo ecológico, cuyo grupo posee a las 48 horas de la infección un peso corporal estadísticamente superior al resto de los otros grupos experimentales (Tabla 15). Es de destacar el hecho que no existan diferencias en el peso corporal entre el grupo alimentado con la dieta baja en grasas (5%), y los tres grupos de ratones alimentados con las dietas ricas en grasas (20%).

Los índices esplénicos dan idea de la esplenomegalia inducida por la infección experimental. En nuestro modelo experimental la administración de las distintas dietas lipídica no produce variaciones, estadísticamente significativas, en este parámetro inmunitario entre los distintos grupos experimentales utilizados en nuestro estudio (Tabla 19).

En el grupo de animales de experimentación no sometido a tratamiento inmunosupresor, destaca la escasa capacidad de supervivencia en ratones alimentados con la dieta que contiene aceite de pescado al 20%, que ya a los tres días sólo alcanza el 10% del total de ratones infectados experimentalmente con *L. monocytogenes*. Este efecto supresor de la respuesta inmune inducido por el consumo de una dieta rica en ácidos grasos ω -3, como son los mayoritariamente presentes en el aceite de pescado, ya fue puesto de manifiesto por Fritsche *et al.*, (2000), aunque otros autores afirmaron posteriormente que este tipo de lípidos de la dieta son poco efectivos en situaciones de infección (Irons *et al.*, 2003). Nuestros resultados demuestran de forma taxativa que, al menos, en situaciones de inmunocompetencia, la presencia en la dieta, de una alta concentración aceite de pescado, tiene un dramático efecto en la supervivencia de ratones experimentalmente infectados con la bacteria *L. monocytogenes*. En la literatura científica abunda los artículos que describen efectos neutros o incluso beneficiosos de dietas con aceite de pescado en situaciones de infección bacteriana tanto en modelos experimentales con ratas (Farolan, *et al.*, 1996; Garnacho-Montero *et al.*, 2002) o incluso con ratones (Pierre *et al.*, 2007; Bendyk *et al.*, 2009) aunque debemos resaltar que estos estudios fueron realizados en infecciones experimentales con bacterias distintas a *L. monocytogenes*, que es la bacteria que nosotros hemos empleado en nuestro estudio. Estas diferencias a nivel procedimental pueden, gran parte, explicar resultados tan contradictorios.

En investigaciones realizadas con modelos similares al descrito en este trabajo, nuestro grupo de investigación, así como otros grupos, han mostrado una reducción de la supervivencia de ratones de la cepa BALB/c, alimentados con dietas ricas en aceite de pescado (de Pablo *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2005; Strandberg *et al.*, 2009). Los resultados de estas investigaciones nos llevan a afirmar que una dieta que contenga una alta proporción de aceite de pescado, empeora, significativamente las posibilidades de supervivencia ante una infección con *L. monocytogenes*.

Al contrario de lo que ocurre en grupo experimental alimentado con una dieta en la que es componente lipídico está constituido por aceite de pescado al 20%, el grupo alimentado la dieta que contiene aceite de oliva también al 20%, a los 10 días postinfección, mantiene una supervivencia del 90%.

La alta mortalidad de los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, puede explicarse al analizar los resultados obtenidos en estudio del aclaramiento bacteriano en hígado y bazo, en los que se observa altos recuentos bacterianos en ambos órganos, tanto a las 24 como a las 48 horas de la infección con *L. monocytogenes* que nos indica un fracaso de los mecanismos de eliminación de agentes infecciosos en este grupo experimental. Hecho ya documentado desde el estudio realizado por Kromann y Green, (1980). Menor explicación tiene la alta supervivencia del grupo de ratones alimentados con aceite de oliva virgen extra, en los que el recuento de bacterias viables a las 48 horas de la infección en ambos órganos, fue mayor que los encontrados en el grupo alimentados con la dieta con la concentración óptima de grasa, dieta BG, pero la supervivencia de este último grupo estuvo muy por debajo que la que presentó el grupo alimentados con aceite de oliva convencional. Una posible explicación de este hecho se deba a una mayor efectividad de los mecanismos implicados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el caso de los animales alimentados con aceite de oliva convencional.

Tras la entrada del agente infeccioso al interior de un organismo el principal mecanismo de la defensa inmediata a la infección, lo constituye la respuesta de los fagocitos, principalmente neutrófilos y monocitos/macrófagos. Tras la ingesta del microorganismo, en los fagocitos se desarrolla una serie de acontecimientos moleculares que implican la producción de sustancias tóxicas para el agente invasor, relacionadas con el oxígeno como superóxidos, iones y radicales libres del oxígeno, que reciben el nombre genérico de especies reactivas del oxígeno (EROs), que poseen una potente actividad antimicrobiana y que son las responsables de muerte intracelular de los microorganismos fagocitados. Nuestros resultados muestran que en el momento de la infección experimental con *L. monocytogenes*, la producción de EROs en los grupos alimentados con las diferentes dietas, no presentan diferencia estadísticamente significativas. Sin embargo, tanto a las 24 como a las 48 horas de la infección, la producción de EROs en el grupo de ratones alimentados con la dieta en la que el componente lipídico es aceite de pescado al 20%, es estadísticamente menor en comparación con los grupos alimentados con las otras dietas. Debemos resaltar que nuestros resultados muestran que a las 48 h de la infección, la producción de EROs en el grupo alimentado con la dieta BG es menor que en el caso de los ratones alimentados con la dieta AG; AO y AOE, siendo en este último caso la diferencia, estadísticamente significativa. Tal vez la escasa producción de EROs en el grupo de ratones alimentados con la dieta AP, sea una de las causas que produce la dramática incapacidad de estos animales a sobrevivir a la infección experimental de *L. monocytogenes*.

Tras el contacto con agente infeccioso, los fagocitos y otras células implicadas en los mecanismos de defensa frente a infecciones, provocan la activación de otro de los fundamentales mecanismos de defensa frente a las agresiones externas: la respuesta inflamatoria, en la que un numeroso conjunto de factores liberados por granulocitos y monocitos/macrófagos, juegan un papel primordial. Los macrófagos tras la interacción con el agente infeccioso liberan una serie de citoquinas que juegan un papel fundamental en la activación y potenciación de la respuesta inflamatoria y que además, actúan como activadores de los linfocitos para completar todos los mecanismos responsables de la lucha frente a las infecciones. Nuestros resultados muestran (Tablas 25, 28, 30, 32; y Figuras 22 A, 25 A, 27 A, 29 A) sorprendentemente, que una dieta en la que el componente lipídico está constituido por aceite de pescado a una concentración del 20%, provoca en los macrófagos una liberación mayor, estadísticamente significativa, de las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 e IL-6 a las 48 horas de la infección con *L. monocytogenes*, de IL-12 a las 24 horas y de TNF- α tanto a las 24 como a las 48 horas de la infección bacteriana. Esta elevada producción de citoquinas proinflamatorias sin embargo, no sólo no se traduce en una mayor eficacia en el control de la infección bacteriana, sino que es precisamente a las 48 horas de la infección, cuando se produce una dramática reducción en el porcentaje de supervivencia de los ratones experimentalmente infectados. No parece ser descabellado pensar que, precisamente la elevada concentración de factores inflamatorios, muy especialmente de TNF- α podría contribuir de forma decisiva, a la elevada mortalidad de este grupo experimental utilizado. Debemos hacer mención que algunos autores ya habían descrito incrementos en los niveles de IL-1 como consecuencia de un incremento en la ingesta de ácido eicosapentaenoico (EPA) (Grimble y Tappia, 1998). Por el contrario, recientes estudios confirman que el EPA, ácido graso poliinsaturado de la serie n-3, igual que los que se encuentran en el aceite de pescado, suministrado en la nutrición parenteral, produce una disminución de la IL-6 y el TNF- α a nivel de hepatocitos y macrófagos mayor que el ácido araquidónico (ARA) (Hao *et al.*, 2010). Esta discordancia con nuestros resultados creemos que se basa en la diferente vía de administración de la dieta y en segundo lugar y a nuestro juicio, la más importante, que estos autores utilizan en la dieta únicamente el ácido graso, en lugar de la grasa completa, aceite de pescado, como lo hacemos nosotros.

Si existe concordancia entre nuestros resultados y los mostrados por Bousserouel *et al.*, (2003) en los que describieron que la incorporación de ARA, ácido graso de la serie n-6, origina una reducción la expresión de IL-1. También nuestros resultados son coincidentes, en parte con los presentados por Jiménez-Gómez *et al.*, (2009), que en un estudio que compara el efecto entre las dietas que contienen aceite de oliva y otras dietas con mayor contenido en ácidos grasos saturados,

muestra que una combinación de aceite de oliva y nueces en el desayuno, no aumenta los niveles de ARN mensajero del TNF- α y de IL-6 en células mononucleares de sujetos sanos. En nuestro caso existe un incremento muy pasajero a las 24 horas en los niveles de IL-6, aunque éste desaparece ya a las 48 horas. Además, Magdalon *et al.*, (2012) describieron incrementos en los niveles de IL-6 asociados a la administración oral de ácido oleico (n-9) y ácido linoleico (n-6), que nuestro caso solo se logra este incremento a las 24 horas y que posteriormente, los niveles de esta citoquina, vuelve a valores incluso menores que el grupo experimental alimentado con la dieta baja en grasas.

Se hace necesario advertir que en la mayoría de los casos descritos con anterioridad, los niveles de citoquinas proinflamatorias que se determinaron, se hicieron en una situación de normalidad, mientras que en nuestro caso, las determinaciones se efectuaron tras un mes de dieta y una posterior infección experimental con *L. monocytogenes*, circunstancia que evidentemente, modifica de forma importante la producción y posterior liberación de las citoquinas proinflamatorias.

En cuanto a las citoquinas pro-inflamatorias de la respuesta Th1, producidas principalmente por linfocitos, al contrario de lo que ocurre en células del sistema fagocítico-mononuclear, no existen grandes diferencias en sus niveles séricos entre los grupos alimentados con los diferentes tipos de dietas (Tablas 26, 33; y Figuras 23 A y 30 A), salvo en el caso de IFN- γ en el grupo alimentado con aceite de oliva cultivado en condiciones ordinarias, en el que existe un fuerte y significativo incremento, tanto a las 24 como a las 48 horas de la infección con *L. monocytogenes*. El incremento de los niveles séricos de esta citoquina, podría explicar la alta capacidad de supervivencia de este grupo experimental frente a la infección bacteriana experimentalmente inducida. Es interesante el comportamiento de los ratones alimentados con la dieta rica en AP, en cuanto a los niveles séricos de IFN- γ , ya que su síntesis y liberación está estimulada por el TNF- α liberado por los macrófagos, y sin embargo, a pesar de presentar niveles significativamente incrementados de síntesis de esta última citoquina, no esté aumentada en este grupo experimental la producción de IFN- γ .

En granulocitos, los fosfolípidos de la membrana por acción de la fosfolipasa A son metabolizados hasta ácido araquidónico (ARA), y éste por acción de la ciclooxigenasa, origina prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), mientras que por vía de la lipooxigenasa produce leucotrienos (LTs); estos tres grupos de moléculas participan muy activamente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados (Tablas 36, 37, 38; y figuras 33 A, 34 A, 35 A) muestran que tras la infección con *L. monocytogenes*, una dieta rica en AO incrementa los niveles de PGE2 y a las 48 horas de la infección. Además se elevan dichos niveles en el grupo de ratones alimentados con AP, coincidiendo también con altas concentraciones séricas de IL-1 y TNF- α , pero por el

contrario se observa una baja capacidad para la producción de ROS, lo que sin duda alguna se traduce en una ineficacia para el control de la infección y en un incremento en la mortalidad de ratones alimentados con la dieta rica en AP y posteriormente infectados con *L. monocytogenes*. Otros productos del metabolismo de ARA por acción de la ciclooxigenasa, son los tromboxanos; en nuestro modelo experimental, los ratones alimentados con la dieta AO y e infectados experimentalmente, son los únicos que muestran incrementos en los niveles de estos mediadores inflamatorios, y solo a las 24 horas de la infección. Por acción de la lipooxigenasa, a partir de ARA se obtiene los leucotrienos, otro de los mediadores de la respuesta inflamatoria, en nuestro caso, todas las dietas experimentales, muestran incrementos con respecto a la dieta BG en los niveles de LTB₄, salvo el caso de la dieta AOE, que muestra una disminución significativa de los niveles de dicho mediador. Debemos resaltar que esta disminución no aparece en la dieta que contiene AO cultivado en condiciones estándar. Este hecho debe ser estudiado más detenidamente porque sin duda alguna debe deberse a algún componente químico minoritario del aceite de oliva en que se diferencie ambos tipos de grasas y que sea debido a tratamiento fitosanitarios que estén ausentes en el olivar ecológico.

En la determinación de los niveles séricos de citoquinas pertenecientes a las respuesta Th2 o antiinflamatoria (Tablas 27, 29, 34; y Figuras 24 A, 26 A, 31 A), los resultados más relevantes los hemos encontrado en el caso de la citoquina antiinflamatoria IL-4. Esta citoquina, sintetizada principalmente por linfocitos Th2 y algunos granulocitos activados, es crucial para detener respuesta Th1 y favorecer la de tipo Th2, ya que bloquea la síntesis de IL-1, TNF- α , e IL-6, liberados por macrófagos y otras células inmunitarias, está significativamente disminuida a las 48 horas de la infección bacteriana en el grupo experimental de ratones alimentados con AP, lo que favorece el desarrollo de una importante respuesta inflamatoria y así, explicaría los incrementos, estadísticamente significativos, que se observan en la determinación de los niveles séricos, sobretodo de la IL-1 y el TNF- α en este grupo experimental. Por el contrario, en la determinación de los niveles de IL-10, otra importante citoquina que participa en el desarrollo de la respuesta Th2, y también a las 48 horas de la infección, en el grupo de ratones alimentados con la dieta AP, muestra que su concentración es estadísticamente superior, a la que presentan los grupos experimentales alimentados con las otras dietas. No resulta fácil explicar el incremento de la IL-10, que posee una marcada actividad inhibidora de los macrófagos en general, y de la síntesis de citoquinas producidos por ellos en particular; tal vez ante el fracaso en el control de la infección, en el caso del grupo alimentado con la dieta AP, por la vía de la respuesta inflamatoria o Th1, se inicie un cambio de estrategia para un desesperado intento de control de la infección por la otra vía, la Th2, que en

cualquier caso y a la vista de nuestros resultados de supervivencia a la infección tampoco posee éxito.

El efecto de los diferentes tipos de dietas en la capacidad de linfoproliferación de esplenocitos y timocitos, se muestran en las (Tablas 22, 23; y Figuras 19 A, 20 A), en ellas debemos destacar también son precisamente los linfocitos, principalmente del bazo, procedentes del grupo alimentado con la dieta AP los que presentan, tanto a las 24 como a las 48 horas postinfección, una mayor capacidad de proliferación cuando son estimulados con el mitógeno ConA, cuando se compara con la que presentan los esplenocitos procedentes de los grupos alimentados con las otras dietas lipídicas, lo que sugiere un grado superior de activación que coincidiría con la fuerte respuesta inflamatoria originada para controlar la infección bacteriana. Llama la atención el escaso grado de activación que muestran los esplenocitos procedentes del grupo de ratones alimentados con la dieta AOE en el momento de la infección, aunque tras la infección se activan rápidamente para mostrar índices de proliferación que son superiores al que muestran el resto de esplenocitos, salvo los procedentes de ratones alimentados con la dieta AP. En cuanto a la capacidad de proliferar en presencia de ConA, los timocitos de ratones alimentados con la dieta AP, a las 48 horas de la infección, vuelven a mostrar valores de activación, estadísticamente superiores a los que presentan los timocitos de ratones alimentados con las otras dietas lipídica. Podemos concluir, por tanto, que la dieta AP, provoca una fuerte estimulación de la respuesta inmune, pero que esta activación no solo no es eficaz para controlar la infección, experimentalmente inducida, por *L. monocytogenes*, sino que los hacen especialmente susceptibles a la misma. Todo esto no induce a pensar que, muy posiblemente, esta superestimulación sea, en mayor o en menor medida, responsable de la alta mortalidad de los ratones alimentados con la dieta AP cuando sufren la infección de *L. monocytogenes*.

En cuanto al efecto de los diferentes tipos de dietas sobre las distintas subpoblaciones leucocitarias, nuestros resultados no muestran efectos destacables ya que en ningún caso, las diferencias encontradas, carecen de significación estadística.

5.2- Efecto de las diferentes dietas lipídicas en los grupos experimentales sometidos a tratamiento inmunosupresor.

5.2.1- Ciclofosfamida (CPA).

La ciclofosfamida (CPA) es uno de los agentes inmunosupresores clásicos, utilizado tanto en la clínica como en investigación. Tras su administración y por acción de los enzimas hepáticos se transforma acroleína y fosforamida que son dos potentes alquilantes que impiden la replicación del ADN celular. Las células más sensibles a la acción de este fármaco inmunosupresor son las derivadas de la línea mieloide. Los primeros estudios sobre la acción de éste fármaco ya mostraban importantes reducciones en poblaciones de timocitos y esplenocitos murinos (Merritt *et al.*, 1982); posteriormente la CPA se empleó en tratamientos quimioterápicos, aunque en determinadas ocasiones las células tumorales desarrollaron resistencia a la misma (Hamuro *et al.*, 1996). En nuestro laboratorio la hemos utilizado para la obtención de modelos experimentales de inmunosupresión (Cruz-Chamorro *et al.*, 2007).

La relación entre CPA y ácidos grasos se remonta a los estudios realizados para evidenciar su relación con la síntesis de prostaglandinas (Nickevich *et al.*, 1986); en 1989 un trabajo daba conocer una posible modulación de la CPA en el metabolismo del ácido araquidónico de macrófagos peritoneales (Giordano *et al.*, 1988) y más tarde la participación de las lipoxigenasas en el metabolismo de las mismas (Kaneikal y Kehrer, 1994). En cuanto al efecto de la CPA con dietas lipídicas en modelos experimentales, podemos citar el estudio efectuado en el año 1997 en la universidad de Tokio, en el que se creó un modelo de enteropatía por sensibilidad alimentaria en ratones BALB/c a los que se inmunosuprimieron con CPA y además se alimentaron con distintas dietas lipídicas que contenía ácidos grasos de la serie n-6 y n-3; los resultados mostraron una clara influencia de la dieta en la producción de leucotrienos de los ratones (Ohtsuka *et al.*, 1997); también el efectuado en ratones con un modelo de enfermedad autoinmune (Bhattacharya *et al.*, 2003). Un estudio en pacientes con cáncer de mama relaciona la capacidad de ciertos ácidos grasos de aumentar la sensibilidad de los tumores de mama a los fármacos citotóxicos (Bougnoux *et al.*, 1999); otro estudio más reciente evaluó la eficacia de los efectos antitumorales de determinadas drogas citotóxicas en presencia de ácidos grasos de la serie n-3 (Wynter *et al.*, 2004). Aunque no son muchos los artículos que relacionan dietas lipídicas y ciclofosfamida se debe destacar el publicado por nuestro grupo de investigación en el que se examina la resistencia de ratones BALB/c alimentados con dietas lipídicas y tratados con CPA frente a una infección con *Listeria monocytogenes* (Cruz-Chamorro *et al.*, 2007), el resultado fue el empeoramiento de la capacidad de

respuesta inmune en ratones alimentados con aceite de pescado y tratados con CPA; sin embargo recientes estudios resaltan el papel protector del ácido eicosapentanoico en la peroxidación lipídica que ocurre en el hígado por acción de la CPA (Li *et al.*, 2011).

La administración del agente inmunosupresor CPA, produce en los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado (AP), una disminución significativa en su peso corporal, fenómeno que no lo encontramos en el grupo experimental alimentado con AP pero no tratado con agente inmunosupresor alguno (Tabla 15). A pesar de la disminución del peso corporal, el índice esplénico del grupo alimentado con la dieta AP, fue significativamente menor que el del resto de los grupos experimentales y tratados con CPA (Tabla 19), lo que sugiere que en este grupo el agente CPA provoca una importante eliminación de células de la serie mieloide que produce una disminución muy importante de estas células en el bazo tras la infección con *L. monocytogenes*. El valor del índice esplénico en el grupo experimental AP tratado con CPA es muy inferior al que presentan todos los grupos alimentados con el resto de dietas lipídicas, tanto inmunocompetentes como tratados con CPA, lo que nos induce a pensar que la dieta AP convierte a los ratones de este grupo en especialmente sensibles a la inmunosupresión inducida por CPA.

El tratamiento inmunosupresor con CPA no parece afectar de forma importante a la supervivencia de los grupos de ratones alimentados con las dietas BG; AOE; AG y AP y experimentalmente infectados con *L. monocytogenes*, solo el grupo alimentado con la dieta AO cultivado de forma tradicional, sufre una importante reducción de su supervivencia a la infección bacteriana (Figura 16 B). Es de resaltar la extraordinaria diferencia en el comportamiento de los grupos alimentados con aceite de oliva procedente de cultivo, tradicional y el ecológico. En principio, no encontramos una explicación razonable a este comportamiento, ya que en principio, y de acuerdo con la actual normativa relativa a los tratamientos agrícolas, no deberían existir productos tóxicos para el organismo en el tratamiento químico del olivar.

Al igual que en el caso de los ratones no tratados con agentes inmunosupresores, el grupo de ratones tratados con CPA e infectados con *L. monocytogenes*, el grupo que posee una menor supervivencia fue el alimentado con AP, hecho que viene corroborado con el hecho de haber encontrado, tanto en el hígado como en el bazo, un mayor número de bacterias viables, tanto a las 24 como a las 48 horas de la infección (Figuras 17 B y 18 B). De acuerdo con el número de bacterias viables recuperadas en ambos órganos, no parece que el tratamiento con CPA afecte, en principio al número total de bacterias viables recuperadas a partir de hígados y bazos procedentes de ratones infectados y tratados con CPA en comparación con estos mismos datos en el grupo de ratones no sometidos a tratamiento inmunosupresor.

El tratamiento con CPA, al contrario de lo que en principio podríamos pensar, no sólo no reduce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), con gran capacidad bactericida, sino que al contrario, produce un fuerte incremento en su producción en el grupo de ratones alimentados con AP (Figura 21 B); grupo que es especialmente sensible a la infección experimental bacteriana. A la luz de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia a esta infección, esta superproducción, de compuestos tóxicos para las bacterias, no se traduce en ningún tipo de protección de los ratones infectados. Resulta muy interesante, desde el punto de vista biológico, esta potente respuesta de sobreproducción de compuestos reactivos del oxígeno en este grupo tratado con CPA, en contraposición con la depresión en la síntesis de estas especies reactivas que presentaron los ratones alimentados con esta misma dieta pero no sometidos a tratamiento inmunosupresor. Pareciera que esta inmunosupresión químicamente inducida, intenta ser neutralizada por una elevada producción de estas sustancias de actividad antibacteriana en un desesperado intento de controlar la infección, esfuerzo que como hemos comentado anteriormente, no produce efecto positivo, para el ratón, tal como nos indican los resultados de supervivencia ya comentados anteriormente.

La producción de citoquinas con actividad proinflamatoria, liberadas por los macrófagos, en este grupo de ratones alimentados con los distintos tipos de grasas, sometidos a tratamiento inmunosupresor con CPA, e infectados con *L. monocytogenes*, muestra un fuerte incremento, muy especialmente a las 48 horas postinfección, sobretodo en la síntesis de IL-1A y de IL-6, y mucho menor en el caso de IL-12p-70; incremento que no lo hemos encontrado en el caso del TNF- α (Figura 29 B). Sin embargo esta importante producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos no parece tener efecto protector alguno frente a la infección de *L. monocytogenes*.

El fuerte incremento en la síntesis de algunas citoquinas proinflamatorias en macrófagos, también aparece en el caso del IFN- γ producido por los linfocitos, que muestra un espectacular incremento a las 48 horas tras la infección bacteriana (Figura 28 B). Volvemos en este punto a insistir que la importante producción de estas citoquinas proinflamatorias, no se traduce en protección alguna frente a la infección, y tal vez solo se trata de un desesperado e inútil intento del organismo ante una infección que pone en serio peligro la vida del ratón y que induce a los pocos leucocitos no destruidos por la CPA a una importante superproducción en algunas citoquinas directamente implicadas en la defensa innata inmediata frente a las infecciones.

Un fenómeno parecido al anteriormente descrito, aparece en el caso de los ratones alimentados con AO y tratados con CPA en la producción de productos proinflamatorios derivados

del metabolismo del ácido araquidónico. Recordemos que este grupo experimental posee una supervivencia frente a la infección solo algo superior que la del grupo alimentado con AP e inferior a los otros grupos experimentales, sin embargo la producción en granulocitos de PGE₂; TXB₂ y LTB₄, es superior a la del resto de grupos experimentales (Figuras 33 B, 34 B, 35 B), siendo en este último caso los resultados fuertemente significativos. Por tanto podemos concluir que la activación de la síntesis de productos pertenecientes a la respuesta Th₁, de carácter proinflamatorio, tanto en los grupos alimentados con AP y AO, y tratados con CPA, no produce protección alguna frente a la infección, todo lo contrario parece que este exceso de compuestos, incrementa la mortalidad frente a la infección bacteriana.

En cuanto a la producción de citoquinas de la respuesta Th₂ en los grupos de ratones alimentados con los distintos tipos de dietas y sometidos a tratamiento con CPA, al igual que ocurría en el caso del grupo experimental no sometido a tratamiento inmunosupresor, no presentan diferencias algunas en ninguna de las tres citoquinas determinadas. Todo parece indicar que este tipo de respuesta no tiene una especial incidencia en los mecanismos de defensa temprana frente a la infección por *L. monocytogenes*.

El tratamiento con CPA no parece tener una gran trascendencia en la capacidad proliferativa de linfocitos procedentes de bazos y timos de ratones alimentados con los distintos tipo de dietas y sometidos a tratamiento con CPA, e infectados con *L. monocytogenes* (Figuras 19 B y 20 B). Solo los linfocitos de ratones de los grupos alimentados con los dos tipos de aceite de oliva, AO y AOE, muestran una mayor capacidad de proliferación que los correspondientes al grupo no tratado con el agente inmunosupresor; siendo los esplenocitos a las 48 horas de la infección bacteriana, los que presentaron una mayor capacidad de inmunosupresión.

En el análisis de las distintas subpoblaciones leucocitarias, los resultados que hemos obtenidos no son clarificadores del efecto biológico producido por el agente inmunosupresor CPA, sólo podemos constatar de forma más o menos concluyente que en ratones alimentados con la dieta AP y tratados con CPA, las poblaciones de linfocitos T supresores/ citotóxicos (CD 8), y linfocitos B, (CD 19/32), están disminuidas con respecto al grupo control no tratado con agente inmunosupresor. Aunque esta disminución en las poblaciones celulares implicadas, no basta para explicar la especial susceptibilidad a la infección bacteriana, ya que el grupo experimental equivalente no inmunosuprimido, eral igualmente sensible a la infección. Tampoco hemos encontrado una explicación, científicamente coherente al incremento, estadísticamente significativo, de la población de células B (CD 19/32) en el grupo de ratones alimentados con AOE a las 24 horas de la infección.

5.2.2- GK 1.5

Con la utilización del anticuerpo monoclonal GK 1.5, que produce la depleción de linfocitos T CD4 murinos, intentamos analizar el papel que juegan estas células en los mecanismos de defensa frente a infecciones bacterianas y como la ingesta de dietas con diferentes componentes lipídicos pueden modificar la inmunosupresión originada como consecuencia la eliminación de este tipo de linfocitos.

El tratamiento con el anticuerpo GK 1.5 en el grupo de ratones alimentados con la dieta AP y posteriormente sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes*, provoca una importante y significativa disminución en el peso de los animales a las 24 horas de la infección experimental, pérdida de peso que se recupera muy parcialmente a las 48 horas, aunque permanece significativamente inferior al resto de grupos experimentales. Debemos resaltar que este tratamiento inmunosupresor y en este tipo de dieta es el que presenta una mayor influencia en el peso corporal de los animales de todos los grupos analizados. Por el contrario, y sin saber a ciencia cierta la etiología de este fenómeno, los ratones alimentados con la dieta AG, y tratados con GK 1.5, fueron los que presentaron, de forma casi absoluta, las mayores cifras de peso corporal de todos los grupos analizados, tanto antes como a las 24 y 48 horas después de la infección (Tabla 15) .

También resulta sorprendente el alto valor del índice esplénico que hemos encontrado en el grupo de ratones alimentados con la dieta AP a las 24 horas de la infección bacteriana (Tabla 19). En general los tratamientos inmunosupresores utilizados en nuestro estudio no han mostrado que ejerzan un efecto apreciable, salvo el ya comentado de la CPA en el grupo de ratones alimentados con este mismo tipo de dieta a las 48 horas de la infección que produce una disminución significativa en este parámetro inmunitario. Sin embargo esta esplenomegalia producida, que en principio implicaría un acumulo de células encargadas en la defensa frente a la infección, por supuesto que no estarían los linfocitos CD4 que se han eliminado con el anticuerpo GK 1.5, no se traduce en una mayor protección frente a la infección ya que la mortalidad del grupo experimental alimentado con la dieta AP es la que presenta una mayor mortalidad a la infección experimental por *L. monocytogenes* (Figura 16 C).

La elevada tasa de mortalidad que presenta el grupo de ratones alimentados con la dieta AP, sometidos a tratamiento inmunosupresor con el anti cuerpo GK 1.5 que produce la depleción de linfocitos CD 4, se explica fácilmente al observar los altos valores de recuperación de bacterias viables procedentes del bazo y sobretodo de ratones experimentalmente infectados con *L.*

monocytogenes (Tablas 20, 21; y Figuras 17 C, 18 C). Aunque debemos nuevamente hacer constar que los valores de aclaramiento bacteriano tras la infección, en ratones inmunosuprimidos por GK 1.5 muestran una similar o incluso mayor eficacia en este parámetro que el grupo de ratones no sometidos a tratamiento inmunosupresor alguno, hecho que nos permite afirmar que en estas primeras etapas de la lucha para el control de la infección, las células T CD4, no juegan un papel fundamental, además nuestros resultados son concordantes con lo descrito por Czuprynski *et al.*, 1989; Czuprynski y Brown, 1990), cuyos resultados mostraban un claro aumento del aclaramiento bacteriano en bazo e hígado de ratones tratados con GK 1,5 e infectados con *L. monocytogenes*, y además presentaban un aumento moderado de la resistencia a un desafío secundario con el mismo patógeno.

La depleción de linfocitos CD4, por el tratamiento con el anticuerpo GK 1.5, sí que tiene transcendencia en la generación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS), tras la infección con *L. monocytogenes*. Al menos hasta las primeras 24 horas de la misma, se produce una drástica disminución en su síntesis, en todos los grupos experimentales utilizados, pero esta intensa reducción en estas moléculas de fuerte actividad antibacteriana, salvo en el caso de ratones alimentados con la dieta AP, no se traduce en un incremento en la mortalidad de los ratones infectados, ni en la recuperación de bacterias viables a partir del hígado y bazo de los mismos. La disminución en la producción de ROS, desaparece y a las 48 horas de la infección hemos obtenidos resultados que indican un importante incremento en la síntesis de ROS, en todos los grupos experimentales y sobre todo en los grupos alimentados con aceite de oliva, muy especialmente el procedente de cultivo tradicional, y el grupo alimentado con la dieta AP (Tabla 24 y Figura 21 C).

La síntesis de monoquinas de carácter proinflamatorio, en los ratones tratados con el agente GK 1.5 y alimentados con la dieta AP, presenta un comportamiento similar a la que presentan, en general todos los grupos experimentales alimentados con este tipo de dieta, es decir, incrementos significativos en algunas de ellas, bien a las 24 o a las 48 horas de la infección. (Tablas, 26, 33; y Figuras 23 C y 30 C). Incrementos en la producción de moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria, que vuelve a no traducirse en protección frente a la infección de *L. monocytogenes*. Ciertamente que en el caso de ratones inmunosuprimidos con el anticuerpo GK 1.5, esta ausencia de eficacia a pesar de una buena producción de este tipo de citoquinas, puede explicarse porque algunas de estas monoquinas suelen producir la activación de linfocitos T, que van a ser eliminados por la acción del anticuerpo usado para producir la inmunosupresión.

La capacidad de síntesis de citoquinas de carácter proinflamatorio, sintetizadas por linfocitos Th1, está expresada tomando como referencia, la producida por el grupo alimentado con la dieta BG y además tratado con el anticuerpo GK 1.5, es decir que analizamos sus niveles de forma independiente al tipo de tratamiento inmunosupresor utilizado, por lo que en principio no es válida cualquier comparación ni con el grupo no inmunosuprimido ni con los grupos suprimidos con otros agentes. La producción de IL-2 e IFN- γ se encuentran incrementada en el momento de la infección experimental en el grupo de ratones alimentados con la dieta AG, mientras que los ratones alimentados con la dieta AP, este incremento de la última citoquina se produce a las 24 y 48 horas de la infección (Tablas 26, 31; y Figuras 23 C, 28 C). Sin embargo no hemos encontrado diferencias significativas, al igual que en el resto de grupos experimentales tratados y no tratados con inmunosupresores, en la capacidad de síntesis de citoquinas de respuesta Th2 (Tablas 27, 29, 34; y Figuras 24 C, 26 C, 31 C).

De una u otra forma, el tratamiento con el anticuerpo GK 1,5 afecta no sólo a la población de linfocitos CD4, sino que además, y debido a la débil presencia de las citoquinas producidas por ellos, a la de células del sistema fagocito-mononuclear. Por el contrario, la población celular menos afectada sería la de las células polimorfonucleares y por tanto, la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, no debería verse muy afectada por el tratamiento con el anticuerpo GK 1.5. Sin embargo, los niveles de estas sustancias, se encuentra incrementados de forma significativa en el grupo de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva (Tablas 36, 38; y Figuras 33 C, 35 C). Esta elevada producción de estas sustancias con importante actividad proinflamatoria, bien podrían ser las responsable de este tipo de respuesta que protege a ambos grupos experimentales de la infección de *L. monocytogenes* que queda reflejada en la gráfica de supervivencia (Figura 16 C).

Muy interesante resulta los resultados obtenidos en la capacidad de linfoproliferación estimulada por ConA, de células procedentes del grupo de ratones alimentados con la dieta AP, cuyos esplenocitos muestra valores significativamente superiores al del grupo control y no sólo antes de la infección sino incluso después de la misma (Tablas 22, 23; y Figuras 19 C, 20 C), a pesar de la ya mencionada sensibilidad de este grupo a la infección de *L. monocytogenes*.

En las distintas subpoblaciones linfocitarias el tratamiento con el anticuerpo GK 1.5, solo provoca diferencias entre los distintos tipos de dietas ensayadas en este trabajo, precisamente en la población de linfocitos CD 4, que se encuentra muy incrementada en los ratones alimentados con la dieta AP con respecto a los grupos experimentales alimentados con las otras dietas (Tabla 41 y

Figura 38 C). Es curioso resaltar que la población de linfocitos más especializados en el correcto desarrollo de la respuesta inmune, sea la población linfocitaria más protegida frente al anticuerpo que produce su eliminación en el grupo de ratones cuya dieta lo hace menos resistente a la infección bacteriana. Creemos que es un hecho que requiere de posteriores análisis para intentar comprender este, a nuestro juicio, complejo fenómeno biológico. Por el contrario, y obviamente, la subpoblación de linfocitos T CD 8, se encuentra disminuida en este grupo experimental (Tabla 40 y Figura 37 C). También debemos resaltar que la dieta AP produce un incremento no sólo de los linfocitos T CD 4, sino también de los linfocitos B, definido por la presencia de la molécula CD 19/32, al menos antes y en las primeras 24 horas de la infección bacteriana (Tabla 43 y Figura 40 C).

5.2.3- RB6-8C5

Los neutrófilos juegan un importante papel en la regulación de la respuesta Th1/Th2 (Mednick *et al.*, 2003). El anticuerpo RB6-8C5, ya comentamos en el apartado correspondiente, es un anticuerpo monoclonal purificado antigranulocito que reacciona con la proteína Ly6G que es el antígeno de diferenciación mieloide Gr1, y su aplicación en el ratón origina la depleción de los neutrófilos y monocitos a nivel sistémico. Creemos que la utilización de este anticuerpo monoclonal es de un gran interés para conocer el verdadero papel que juegan los neutrófilos en la defensa frente a infecciones por bacterias patógenas intracelulares como *L. monocytogenes*, papel que ya fue puesto en evidencia por Czuprynski *et al.*, (1994) y Rakhmilevich, A. L. (1995). Debemos hacer constar que recientemente se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con el monoclonal RB6-8C5, no solo produce la depleción de neutrófilos sino también elimina a monocitos y a células T, CD8 (+) (Carr, *et al.*, 2011).

El importante grado de inmunosupresión que produce el anticuerpo monoclonal RB6-8C5, hace que a las 48 horas de la infección con *L. monocytogenes*, ya no existía ningún ratón superviviente en el grupo alimentado con la dieta AP, por ello no se presentan resultados de los parámetros inmunitarios determinados.

El análisis de los resultados obtenidos muestra que el tratamiento con este anticuerpo es el que produce una mayor disminución en la capacidad de resistencia frente a la infección con *L. monocytogenes*, no solo en el grupo experimental alimentado con la dieta AP, sino que también hemos encontrado una elevada mortalidad en los grupos alimentados con el resto de dietas, tanto las de baja concentración en grasas (BG) como las dieta AG y las dos de aceite de oliva. El grado de inmunosupresión es tan importante en estos casos, que a las 48 horas de la infección ya habían

muerto todos los ratones alimentados con la dieta AP y a las 72 horas lo habían hecho los alimentados con la dieta AG (Figura 16 D). Con respecto a la mortalidad observada en el grupo alimentado con la dieta AP, debemos recordar que Fritsche *et al.*, (2005) describieron que la alta sensibilidad de este grupo a la infección de *L. monocytogenes*, es independiente de la actividad de los neutrófilos que han sido eliminados por el tratamiento con el monoclonal RB6-8C5.

Los resultados que hemos obtenido en la supervivencia de ratones alimentados con los distintos tipos de dietas y tratados con el anticuerpo RB6-8C5, era, de esperar ya que el monoclonal RB6-8C5 elimina tanto a las células polimorfonucleares (PMNs), como a las células del sistema fagocítico-mononuclear; ambos tipos celulares, responsables de la defensa temprana frente a infecciones bacterianas, defensa en la que los linfocitos T CD4, que no son eliminados con el anticuerpo monoclonal RB6-8C5, juegan un papel mucho menos importante.

El número de bacterias viables en hígado y bazo, de los ratones infectados con *L. monocytogenes*, es el mayor que hemos obtenido en todos los grupos experimentales objeto de estudio en esta Tesis doctoral (Tablas 20, 21; y Figuras 17 D, 18 D), lo que nos confirma que los leucocitos sensibles a RB6-8C5, son las células más implicadas en la defensa antibacteriana. Además, de todos los grupos experimentales, clasificados en función de la dieta con la que fueron alimentados, los de la dieta AP, fueron los más sensibles a la infección, nuestros resultados son concordantes con los obtenidos por Fritsche *et al.*, (2005) muestran que la reducción de la resistencia a la infección por *L. monocytogenes* en animales alimentados con la dieta AP, es independiente de la actividad de los neutrófilos.

Al igual que ocurría en los grupos experimentales tratados con el agente CPA, en los que de forma sorprendente, había un incremento en la producción de sustancias reactivas del oxígeno (ROS), los ratones tratados con RB6-8C5 y alimentados con la dieta AP, muestran altos valores en la cifras de unidades relativas de fluorescencia asociadas a la producción de ROS (Tabla 24 y Figura 21 D) aunque estos altos valores no se traduzcan en protección frente a la infección. Tanto CPA como RB6-8C5, son potentes agentes que provocan la eliminación de las potenciales células productoras de ROS. Por eso resulta sorprendente la elevada producción de ROS en ratones tratados con agentes que eliminan células potenciales productoras de ROS y alimentados con la dieta AP, que logran con un escaso número de estas células producir ROS en cantidades superiores a las que se producen en ratones alimentados con las otras dietas, salvo el caso del grupo de ratones alimentados con la dieta AOE que a las 48 horas de la infección experimental de *L. monocytogenes*, produce cantidades significativamente superiores de ROS cuando se compara con las que muestran los ratones alimentados con la dietas con alto contenido de aceite de oliva cultivado en condiciones estándar,

aceite de girasol y con la dieta baja en grasas.

Los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas por células del sistema fagocítico-mononuclear, en ratones inmunosuprimidos con el tratamiento con el monoclonal RB6-8C5, están, en general, aumentados a las 24 horas de la infección experimental en las dietas experimentales ensayas (Tablas 25, 28, 30, 32; y Figuras 22 D, 25 D, 27 D, 29 D). Destacamos que en el caso de la IL-1A, este incremento se observa en los ratones alimentados con las dietas AOE y AG; en el caso de la IL-6, el incremento se observa en todas las dietas con alto contenido lipídico, mientras que en casos de IL-12p-70 y TNF- α , solo afecta a los ratones alimentados con la dieta AP. Nuestros resultados son concordantes con lo descrito por otros autores como Fritsche *et al.*, (2005), que describieron incrementos en los niveles de IL-6 y Carr *et al.*, (2011) en el caso de TNF- α , en modelos similares al utilizado por nosotros, y con los de Verdrengh y Tarkowski, (1997) que encontraron incrementos significativos en los niveles de IL-6 y TNF- α , en ratones tratado con este monoclonal y experimentalmente infectados con *Staphylococcus aureus*. Mednick *et al.*, 2003 también encontraron incrementos significativos en la producción de TNF- α e IL-12, en macrófagos pulmonares en un modelo de infección experimental pulmonar con *Cryptococcus*. Por el contrario otros autores como Tateda *et al.*, 2001, describieron niveles bajos de IL-12 en ratones deplecionados con RB6-8C5, e infectados experimentalmente con *Legionella pneumophila*. Algunos de los autores citados anteriormente hacen especial hincapié, en que en ratones tratados con RB6-8C5, e infectados con *L. monocytogenes*, el mecanismo de protección frente a la infección se hace por la producción de TNF- α (Carr *et al.*, 2011).

En cuanto a la citoquinas pertenecientes a la respuesta Th1 y producidas principalmente por linfocitos, sólo hemos encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-17 y de IFN- γ a las 24 horas de la infección bacteriana. Resultados similares ya encontraron Verdrengh y Tarkowski, (1997) en el modelo experimental ya citado anteriormente con infección con *S. aureus*. Al igual que en los casos de citoquinas producidas por macrófagos, en el caso de las producidas por linfocitos, también existe en la bibliografía, trabajos que muestran resultados contradictorios con los nuestros. Tateda *et al.*, 2001, encontraron que en ratones tratados con RB6-8C5, e infectados con *L. pnneumophila*, bajos niveles de citoquinas pertenecientes a la respuesta Th1 o proinflamatoria, y entre estas citoquinas que están a niveles inferiores que los del grupo control, estaría el IFN- γ .

No hemos encontrados en la bibliografía utilizada, referencias que describan el efecto de las dietas sobre los niveles de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos en animales de experimentación tratados con el anticuerpo monoclonal RB6-8C5. Nuestros resultados muestran que

los niveles de los mediadores proinflamatorios originados por la vía de la ciclooxigenasa, PGE2 y TXB2, están incrementados en ratones a los que se les ha tratado con el monoclonal RB6-8C5, tras la infección experimental con *L. monocytogenes*, incremento que es estadísticamente significativo en el grupo de ratones alimentados con la dieta AP (Tablas 37, 38; y Figuras 34 D, 35 D). En el caso del mediador proinflamatorio procedente de la vía de la lipooxigenasa, LTB4, resulta muy interesante comprobar que este incremento no solo no aparece en los grupos alimentados con aceite de oliva, tanto procedente de cultivo tradicional como del ecológico, sino que son menores que los del grupo control (Tabla 36 y Fig 33 D).

Nuevamente aparece un fenómeno de difícil explicación: tratamientos con agentes inmunosupresores específicos de células productoras de citoquinas proinflamatorias, hace que los ratones pertenecientes a los grupos más sensibles a la infección bacteriana, sean los que presente mayores niveles de estas citoquinas proinflamatorias. Esto nos induce a sospechar que el exceso de este tipo de citoquinas, puede contribuir de una u otra forma a incrementar la susceptibilidad de los ratones a la infección con *L. monocytogenes*.

La capacidad linfoproliferativa tanto de esplenocitos como de timocitos, estimulada con el mitógeno Conacavalina A (ConA), presenta dos comportamientos muy distintos (Tablas 22, 23; y Figuras 19 D, 20 D). Por un lado los esplenocitos procedentes de ratones tratado con RB6-8C5, muestran en general, mayor capacidad de proliferar al ser estimulados con el mitógeno ConA que los del grupo control, salvo el caso del grupo alimentado con la dieta AG en el momento de ser infectado experimentalmente con la bacteria, mientras que por el contrario, los timocitos procedentes de ratones deplecionados en granulocitos, muestran siempre una menor capacidad linfoproliferativa estimulada con ConA, que los timocitos procedentes del grupo control.

Tanto el número de linfocitos T CD3, como CD4 en sangre periférica de ratones tratados con el agente inmunosupresor RB6-8C5, y alimentados con todos los tipos de las dietas experimentales, muestran valores superiores en el momento de la infección experimental, que los del grupo control, aunque posteriormente sus valores van disminuyendo salvo en el caso de los linfocitos CD3 en ratones alimentados con la dieta AG. Los linfocitos definidos por la presencia en su superficie celular del marcador CD 19/32 experimentan un importante incremento a las 24 horas de la infección con *L. monocytogenes* (Tablas 39, 41, 43; y Figuras 36 D, 38 D, 40 D), por contrario, en el caso de los ratones alimentados con aceite de oliva, se produce una disminución a las 48 horas de la infección.

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1. Los ácidos grasos presentes en las dietas lipídicas ejercen una modulación del sistema inmune, alterando la resistencia del hospedador frente a la infección con un patógeno intracelular.

2. De todas las dietas ensayadas, las que contiene altas concentraciones de aceite de pescado, son los más inmunosupresores, de todas, incrementando de forma significativa la susceptibilidad a la infección con *Listeria monocytogenes* en los ratones alimentados con esta dieta; los efectos desfavorables del aceite de pescado aumentaron en los tratamientos con los inmunosupresores CPA y RB6-8C5.

3. El efecto inmunosupresor producido por las dietas que contienen altas concentraciones en aceite de oliva y aceite de oliva ecológico fue reducido en comparación al aceite de pescado. Además el aceite de oliva ecológico mostró mayores beneficios inmunológicos que el aceite de oliva virgen extra.

4. Los lípidos presentes en el aceite de pescado además de reducir la supervivencia, incrementan el número de bacterias viables recuperadas del bazo y del hígado, en ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*, tratados y no tratados con agentes inmunosupresores.

5. Las dietas de aceite de oliva y aceite de oliva ecológico muestran índices de proliferación en esplenocitos y timocitos estimulados, similares a la dieta de aceite de pescado; además el tratamiento con RB6-8C5 provoca una disminución progresiva durante el transcurso de la infección en la proliferación de timocitos estimulados.

6. Los tratamientos con los agentes inmunosupresores CPA y RB6-8C5, muestran mayor capacidad inmunosupresora que el agente GK 1.5 en ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*.

7. La administración de dietas lipídicas con aceite de pescado incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en bazo, y de forma más acusada en ratones inmunosuprimidos.

8. La administración de dietas lipídicas ricas en aceite de pescado y aceite de girasol en ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes* e inmunosuprimidos, produce un marcado incremento de la síntesis de citoquinas inflamatorias.

9. Las propiedades inmunomoduladoras de los lípidos presentes en las dietas afectan también a la síntesis de eicosanoides, el aceite de oliva ecológico redujo la síntesis de leucotrieno B4 (LTB4), y el aceite de pescado incrementó los niveles de tromboxano B2 (TXB2).

10. Los ácidos grasos contenidos en las dietas, no modificaron las subpoblaciones linfocitarias en los ratones del grupo control, en cambio, los tratamientos con los agentes inmunosupresores CPA, GK 1,5 y RB6-8C5, si originaron algunos cambios en las subpoblaciones de linfocitos, especialmente en animales alimentados con las dietas con alto contenido en aceite de pescado, aceite de oliva ecológico y aceite de girasol.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

7.1. Artículos científicos

1. Abbas A.K., Murphy K.M. and Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603): 787-93.
2. Adkins Y. and Kelley D.S. (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 21(9): 781-92.
3. Al-Shudiefat A.A., Sharma A.K., Bagchi A.K., Dhingra S. and Singal P.K. (2013) Oleic acid mitigates TNF α induced oxidative stress in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 372: 75-82.
4. Alcock J., Franklin M.L. and Kuzawa C.W. (2012) Nutrient signaling: evolutionary origins of the immune-modulating effects of dietary fat. *Q Rev Biol* 87(3): 187-223.
5. Alexander J.W. (1998) Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition* 14(7-8): 627-33.
6. Allen S.J., Mott K.R., Wechsler S.L., Flavell R.A., Town T. and Ghiasi H. (2011) Adaptive and innate transforming growth factor beta signaling impact herpes simplex virus 1 latency and reactivation. *J Virol* 85(21): 11448-56.
7. Amusquivar E., Sánchez M., Hyde M.J., Laws J., Clarke L. and Herrera E. (2008) Influence of fatty acid profile of total parenteral nutrition emulsions on the fatty acid composition of different tissues of piglets. *Lipids* 43: 713-22.
8. Azuma Y.T., Nakajima H. and Takeuchi T. (2011) IL-19 as a potential therapeutic in autoimmune and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 17(34): 3776-80.
9. Bagel S., Dessaigne B., Bourdeaux D., Boyer A., Bouteloup C., Bazin J.E., Chopineau J. and Sautou V. (2011) Influence of lipid type on bis (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) leaching from infusion line sets in parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 35(6): 770-5.
10. Balet A., Cardona D., Jané S., Molins-Pujol A.M., Sánchez-Quesada J.L., Gich I. and Mangués M.A. (2004) Effects of multilayered bags vs ethylvinyl-acetate bags on oxidation of parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 28(2): 85-91.
11. Ball M.J. (1993) Parenteral nutrition in the critically ill: use of a medium chain triglyceride emulsion. *Intensive Care Med* 19(2): 89-95.
12. Barat A.C., Harrie K., Jacob M., Diamantidis T.G. and McIntosh N.L. (1987) Effect of amino acid solutions on total nutrient admixture stability. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 11(4): 384-8.
13. Barone J. and Hebert J.R. (1988) Dietary fat and natural killer cell activity. *Am J Clin Nutr* 50(4):861-7.
14. Bassaganya-Riera J. and Hontecillas R. (2010) Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(5): 569-73.
15. Beli E., Li M., Cuff C. and Pestka J. (2008) Docosahexaenoic acid-enriched fish oil consumption modulates immunoglobulin responses to and clearance of enteric reovirus infection in mice. *J Nutr* 138(4): 813-9.
16. Bendyk A., Marino V., Zilm P.S., Howe P. and Bartold P.M. (2009) Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodont Res* 44: 211-216.

17. Benson A., Murray S., Divakar P., Burnaevskiy N., Pifer R., Forman J. and Yarovinsky F. (2012) Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. *J Immunol* 188(2): 800-10.
18. Berger A., Roberts M.A. and Hoff B. (2006) How dietary arachidonic-acid and docosahexaenoic-acid rich oils differentially affect the murine hepatic transcriptome. *Lipids Health Dis* 5: 10.
19. Beswick E.J., Pinchuk I.V., Earley R.B., Schmitt D.A. and Reyes. V.E. (2011) Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 79(7): 2737-45.
20. Bhattacharya A., Lawrence R.A., Krishnan A., Zaman K., Sun D. and Fernandes G. (2003) Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. *J Am Coll Nutr* 22(5): 388-99.
21. Bi M.H., Ott J., Fischer T., Hecker M., Dietrich H., Schaefer M.B., Markart P., Wang B.E., Seeger W. and Mayer K. (2010) Induction of lymphocyte apoptosis in a murine model of acute lung injury-modulation by lipid emulsions. *Shock* 33(2): 179-88.
22. Blackburn G.L. (1992) Nutrition and inflammatory events: highly unsaturated fatty acids (omega-3 vs omega-6) in surgical injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2): 183-8.
23. Bonilla D.L., Fan Y.Y., Chapkin R.S. and McMurray D.N. (2010a) Transgenic mice enriched in omega-3 fatty acids are more susceptible to pulmonary tuberculosis: impaired resistance to tuberculosis in fat-1 mice. *J Infect Dis* 201(3): 399-408.
24. Bou Ghanem E.N., McElroy D.S. and D'Orazio S.E. (2009) Multiple mechanisms contribute to the robust rapid gamma interferon response by CD8+ T cells during *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 77(4): 1492-501.
25. Bougnoux P., Germain E., Chajès V., Hubert B., Lhuillery C., Le Floch O., Body G. and Calais G. (1999) Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Br J Cancer* 79(11-12): 1765-9.
26. Bousserouel S., Brouillet A., Béréziat G., Raymondjean M. and Andréani M. (2003) Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1. *J Lipid Res* 44:601-11.
27. Brassard P., Larbi A., Grenier A., Frisch F., Fortin C., Carpentier A. C. and Fülöp T. (2007) Modulation of T-cell signalling by non-esterified fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(5-6): 337-43.
28. Braunwald J., Nonnenmacher H., Pereira C.A. and Kirn A. (1991) Increased susceptibility to mouse hepatitis virus type 3 (MHV3) infection induced by a hypercholesterolaemic diet with increased adsorption of MHV3 to primary hepatocyte cultures. *Res Virol* 142(1): 5-15.
29. Brix S., Lund P., Kjaer T.M., Straarup E.M., Hellgren L.I. y Frøkiaer H. (2010) CD4(+) T-cell activation is differentially modulated by bacteria-primed dendritic cells, but is generally down-regulated by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunology* 129(3): 338-50.
30. Brown. R.E. (1977) Intereaction of nutrition and infection in clinical practice. *Pediatr Clin North Am* 24(1): 241-52.
31. Brusilovsky M., Rosental B., Shemesh A., Appel M.Y. and Porgador A. (2012) Human NK cell recognition of target cells in the prism of natural cytotoxicity receptors and their ligands. *J Immunotoxicol* 9(3): 267-74.
32. Buenestado A., Cortijo J., Sanz M.J., Naim-Abu-Nabah Y., Martinez-Losa M., Mata M., Issekutz A.C., Martí-Bonmatí E. and Morcillo E.J. (2006) Olive oil-based lipid emulsion's neutral effects on neutrophil functions and leukocyte-endothelial cell interactions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30(4): 286-96.

33. Byleveld M., Pang G.T., Clancy R.L. and Roberts D.C. (2000) Fish oil feeding enhances lymphocyte proliferation but impairs virus-specific T lymphocyte cytotoxicity in mice following challenge with influenza virus. *Clin Exp Immunol* 119(2): 287-92.
34. Calder P.C. (1998) Fat chance of immunomodulation. *Immunol Today* 19(6): 244-7.
35. Calder P.C. (2006) n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(suppl 6): 1505S-19S.
36. Calder P.C. and Grimble R.F. (2002) Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 56(3): S14-S19.
37. Campbell A.E., Loria R.M., Madge G.E., and Kaplan A.M. (1982) Dietary hepatic cholesterol elevation: Effects on *Coxsackievirus B* infection and inflammation. *Infect. Immun.* 37(1): 307-17.
38. Carr K.D., Sieve A.N., Indramohan M., Break T.J., Lee S. and Berg R.E. (2011) Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 41(9): 2666-76.
39. Cassatella M.A. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73: 369-509.
40. Cenci E., Romani L., Vecchiarelli A., Puccetti P. and Bistoni F. (1989) Role of L3T4⁺ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice. *Infect. Immun.* 57(11): 3581-7.
41. Chandra. R.K. (1981) Immunocompetence as a functional index of nutritional status. *Br Med Bull* 37(1):89-94.
42. Chandra R.K. (1991) 1990. McCollum award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 53(5): 1087-101.
43. Chandra R.K. (1996) Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25): 14304-7.
44. Chang K.J., Salto H., Tatsuno I., Tamura Y. and Yoshida S. (1991) Role of 5-lipoxygenase products of arachidonic acid in cell to cell interaction between macrophages and natural killers cells in rat spleen. *J Leukoc Biol* 50(3): 273-8.
45. Cheng Z., Hu J., King J., Jay G. and Campbell T.C. (1997) Inhibition of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus transfected mice by low dietary casein. *Hepatology* 26(5): 1351-4.
46. Cifone M.G., Botti D., Festuccia C., Napolitano T., Del Grosso E., Cavallo G., Chessa M.A. and Santoni A. (1993) Involvement of phospholipase A2 activation and arachidonic acid metabolism in the cytotoxic function of rat NK cells. *Cell Immunol* 148: 247-58.
47. Cizkova K., Konieczna A., Erdosova B., Lichnovska R. and Ehrmann J. (2012) Peroxisome proliferator activated receptors in regulation of cytochromes P450: New way to overcome multidrug resistance? *J Biomed Biotechnol* 2012:656428.
48. Conlan J.W. (1997) Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 65(2): 630-5.
49. Correia M., Michel V., Matos A.A., Carvalho P., Oliveira M.J., Ferreira R.M., Dillies M.A., Huerre M., Seruca R., Figueiredo C., Machado J.C. and Touati E. (2012) Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One* 7(4): e35072.

50. Cote C.K., Van Rooijen N. and Welkos S.L. (2006) Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* 74(1): 469-80.
51. Cross A., Edwards S.W., Bucknall R.C. and Moots R.J. (2004) Secretion of oncostatin M by neutrophils in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 1430-6.
52. Cruz-Chamorro L., Puertollano E., de Cienfuegos G.A., Puertollano M.A. and de Pablo M.A. (2011) Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in a murine model fed dietary lipids. *Nutrition* 27(10): 1053-60.
53. Cruz-Chamorro L., Puertollano M.A., Puertollano E., Alvarez de Cienfuegos G. and de Pablo M.A. (2007) Examination of host immune resistance against *Listeria monocytogenes* infection in cyclophosphamide-treated mice after dietary lipid administration. *Clin Nutr* 26(5): 631-9.
54. Cunningham-Rundles S. (1982) Effects of nutritional status on immunological functions. *Am J Clin Nutr* 35(suppl 5): 1202-10.
55. Czuprynski C. J. and Brown J. F. (1990) Effects of purified anti-Lyt-2 mAb treatment on murine listeriosis: comparative roles of Lyt-2+ and L3T4+ cells in resistance to primary and secondary infection, delayed-type hypersensitivity and adoptive transfer of resistance. *Immunology* 71(1): 107-12.
56. Czuprynski C. J., Brown J.F., Wagner R.D. and Steinberg H. (1994) Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infect Immun* 62(11): 5161-3.
57. Czuprynski C. J., Brown J.F., Young K.M. and Cooley A.J. (1989) Administration of purified anti-L3T4 monoclonal antibody impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun* 57(1): 100-9.
58. da Silva A.C., Neves J.K., Irmão J.I., Costa V.M., Souza V.M., de Medeiros P.L., da Silva E.C., de Lima M do C., Pitta Ida R., Albuquerque M.C. and Galdino S.L. (2012) Study of the activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against Schistosomiasis mansoni in mice. *ScientificWorldJournal* 520524.
59. Daley J.M., Thomay A.A., Connolly M.D., Reichner J.S. and Albina J.E. (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to replete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83(1): 64-70.
60. de Mello V.D.F., Erkkila A.T., Schwab U.S., Pulkkinen L., Kolehmainen M., Atalay M., Mussalo H., Lankinen M., Oresic M., Lehto S. and Uusitupa M. (2009) The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *Eur J Nutr* 48(8): 447-55.
61. de Pablo M.A. and Álvarez de Cienfuegos G. (2000) Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol* 78(1): 31-9.
62. de Pablo M.A., Ortega E., Gallego A.M., Álvarez E., Pancorbo P.L. and Álvarez de Cienfuegos G. (1998) The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 44(1): 57-67.
63. de Pablo M.A., Puertollano M.A., Gálvez A., Ortega E., Gaforio J.J. and Álvarez de Cienfuegos G. (2000) Determination of natural resistance of mice fed dietary lipids to experimental infection induced by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(2): 127-33.

64. de Pablo M.A., Susin S.A., Jacotot E., Larochette N., Costantini P., Ravagnan L., Zamzami N. and Kroemer G. (1999) Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis* 4(2): 81-7.
65. Deangelis R.A., Markiewski M.M., Kourtzelis I., Rafail S., Syriga M., Sandor A., Maurya M.R., Gupta S., Subramaniam S. and Lambris J.D. (2012) Complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration. *J Immunol* 188(2): 641-8.
66. Delgado Roche L., Acosta Medina E., Fraga Pérez A., Bécquer Viar M.A., Soto López Y., Falcón Cama V., Vázquez López A.M., Martínez-Sánchez G. and Fernández Sánchez E. (2012) Lipofundin-induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesion in new zealand white rabbits. *Int J Vasc Med* 2012:898769.
67. Denniston A.K., Kottoor S.H., Khan I., Oswal K., Williams G.P., Abbott J., Wallace G.R., Salmon M., Rauz S., Murray P.I. and Curnow S.J. (2011) Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function. *J Immunol* 186(1): 305-11.
68. Dewamitta S.R., Nomura T., Kawamura I., Hara H., Tsuchiya K., Kurenuma T., Shen Y., Daim S., Yamamoto T., Qu H., Sakai S., Xu Y. and Mitsuyama M. (2010) Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 alpha secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 78(5): 1884-94.
69. Djemli-Shipkolye A., Raccach D., Pieroni G., Vague P., Coste T.C. and Gerbi A. (2002) Differential effects of ω 3 PUFA supplementation on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: Possible role of the membrane ω 6/ ω 3 ratio. *J Membr Biol* 191(1): 37-47.
70. Dong W., Selgrade M.K., Gilmour I.M., Lange R.W., Park P., Luster M.I. and Kari F.W. (1998) Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(3): 462-9.
71. Dos Santos S.A., de Andrade Junior D.R. and de Andrade D.R. (2011) TNF-alpha production and apoptosis in hepatocytes after *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* invasion. *Rev Inst Trop Sao Paulo* 53(2): 107-12.
72. Draper E., Reynolds C.M., Canavan M., Mills K.H., Loscher C.E. and Roche H.M. (2011) Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- κ B independent of PPAR γ . *J Nutr Biochem* 22(8): 784-90.
73. Ellborg A., Ferreira D., Mohammanednejad J. and Wårnheim T. (2010) Comment to "The pharmacopeial evolution of intralipid injectable emulsion in plastic containers: from a coarse to a fine emulsion". *Int J Pharm* 392(1-2): 198-200.
74. Erlich K.S., Wofsy D., Dix R.D. and Mills J. (1989) Effects of selective depletion of L3T4⁺ T-lymphocytes on Herpes simplex virus encephalitis. *Clin Immunol Immunopathol* 52(2): 190-201.
75. Ermak T.H., Steger H.J., Owen R.L. and Heyworth M. F. (1988) Modulation of lymphocyte subsets in Peyer's patches of mice treated with monoclonal antibody against helper T-cells. *J Histochem Cytochem* 36(4): 417-23.
76. Ertel W., Morrison M.H., Ayala A. and Chaudry I.H. (1993) Modulation of macrophage membrane phospholipids by n-3 polyunsaturated fatty acids increases interleukin 1 release and prevents suppression of cellular immunity following hemorrhagic shock. *Arch Surg* 128(1): 15-20.
77. Ewart H.S., Cole L.K., Kralovec J., Layton H., Curtis J.M., Wright J.L. and Murphy M.G. (2002) Fish oil containing phytosterol esters alters blood lipid profiles and left ventricle generation of thromboxane A(2) in adult guinea pigs. *J Nutr* 132(6): 1149-52.
78. Farias M.M., Silva C. and Rozowski J. (2011) Gut microbiota: Role in obesity. *Rev Chil Nutr* 38(2): 228-33.

79. Farolan L.R., Goto M., Myers T.F., Anderson C.L. and Zeller W.P. (1996) Perinatal nutrition enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuates endotoxic shock in newborn rats. *Shock* 6(4): 263-6.
80. Fasano E., Serini S., Piccioni E., Toesca A., Monego G., Cittadini A.R., Ranelletti F. O. and Calviello G. (2012) DHA induces apoptosis by altering the expression and cellular location of GRP78 in colon cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1822(11): 1762-72.
81. Feau S., Arens R., Togher S. and Schoenberger S.P. (2011) Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nat Immunol* 12(9): 908-13.
82. Fernandes G. (2008) Progress in nutritional immunology. *Immunol Res* 40(3): 244-61.
83. Fleming T.J., Fleming M.L. and Malek T. R. (1993) Selective expression of Ly-6G myeloid lineage cells in mouse bone marrow. *J Immunol* 151(5): 2399-408.
84. Frank G.M., Buela K.A., Maker D.M., Harvey S.A. and Hendricks. R.L. (2012) Early responding dendritic cells direct the local NK response to control Herpes Simplex virus 1 infection within the cornea. *J Immunol* 188(3): 1350-9.
85. Frijns C.J., Kappelle L.J., van Gijn J., Nieuwenhuis H.K., Sixma J.J. and Fijnheer R. (1997) Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 28(11): 2214-8.
86. Fritsche K.L. and Cassity N.A. (1992) Dietary n-3 fatty acids reduce antibody-dependent cell cytotoxicity and alter eicosanoid release by chicken immune cells. *Poult Sci* 71(10): 1646-57.
87. Fritsche K.L., Anderson M. and Feng C. (2000) Consumption of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid impair murine interleukin-12 and interferon-gamma production *in vivo*. *J Infect Dis* 182 Suppl 1: S54-61.
88. Fritsche K.L., Irons R., Pompos L., Janes J., Zheng Z. and Brown C. (2005) Omega-3 polyunsaturated fatty acid impairment of early host resistance against *Listeria monocytogenes* infection is independent of neutrophil infiltration and function. *Cell Immunol* 235(1): 65-71.
89. Fritsche K.L., Cassity N.A. and Huang S.C. (1992) Dietary (n-3) fatty acid and vitamin E interactions in rats: effects on vitamin E status, immune cell prostaglandin E production and primary antibody response. *J Nutr* 122(4): 1009-18.
90. Fujikawa N., Yamashita N., Yamazaki K., Sugiyama E., Suzuki H. and Hamazaki T. (1992) Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology* 75(2): 330-5.
91. Fujishima S., Hoffman A.R., Vu T., Kim K.J., Zheng H., Daniel D., Kim Y., Wallace E.F, Larrick J.W. and Raffin T.A. (1993) Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J Cell Physiol* 154: 478-85.
92. Fuschiotti. P. (2011) Role of **IL-13** in systemic sclerosis. *Cytokine* 56(3): 544-9.
93. Fusco A.C., Weaver S., Salafsky B. and Shibuya T. (1992) Influence of a menhaden oil diet on cercarial penetration of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 78(4): 738-40.
94. Gallagher G. (2010) Interleukin-19: multiple roles in immune regulation and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(5): 345-52.
95. Gallegos C., Valencia C., Partal P., Franco J.M., Maglio O., Abrahamsson M. and Brito-de la Fuente E. (2012) Droplet-size distribution and stability of commercial injectable lipid emulsions containing fish oil. *Am J Health Syst Pharm* 69(15): 1332-5.

96. Galli C. and Calder P.C. (2009) Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: A critical review. *Ann Nutr Metab* 55(1-3): 123-39.
97. Garnacho-Montero J., Ortiz-Leyba C., Garnacho-Montero M.C., Garcia-Garmendia J.L., Pérez-Paredes C., Moyano-Del Estad M.R., Barrero-Almodóvar A. and Jiménez-Jiménez F.J. (2002) Effects of three intravenous lipid emulsions on the survival and mononuclear phagocyte function of septic rats. *Nutrition* 18(9): 751-4.
98. Gawecka A., Michalkiewicz J., Kornacka M.K., Luckiewicz B. and Kubizewska I. (2008) Immunologic properties differ in preterm infants fed olive oil vs soy-based lipid emulsions during parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 32(4): 448-53.
99. Gayoso I., Sanchez-Correa B., Campos C., Alonso C., Pera A., Casado J.G., Morgado S., Tarazona R. and Solana R. (2011) Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 3(4):337-43.
100. Ghosh A., Saginc G., Leow S.C., Khattar E., Shin E.M., Yan T.D., Wong M., Zhang Z., Li G., Sung W.K., Zhou J., Chng W.J., Li S., Liu E. and Tergaonkar V. (2012) Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 14(12): 1270-81.
101. Ginsburg H., Landau I. and Baccam D. (1988) Effect of the cholesterol-rich diet on the susceptibility of rodent malarial parasites to chloroquine chemotherapy. *Life Sci* 42(1): 7-10.
102. Giordano M., Geffner J.R., Prat A., Palermo M.S., Serebrinsky G.P. and Isturiz M.A. (1988) Cyclophosphamide modulates arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages. *Int J Immunopharmacol* 10(8): 939-44.
103. Girardi E., Yu E.D., Li Y., Tarumoto N., Pei B., Wang J., Illarionov P., Kinjo Y., Kronenberg N. and Zajonc D. M. (2011) Unique interplay between sugar and lipid in determining the antigenic potency of bacterial antigens for NK T-Cells. *PLoS Biol* 9(11): e1001189.
104. Gogos C.A., Ginopoulos P., Zoumbos N.C., Apostolidou E. and Kalfarentzos F. (1995) The effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on T-lymphocyte subsets of patients with solid tumors. *Cancer Detect Prev* 19(5): 415-7.
105. Goldfarb Y., Shapiro H., Singer P., Kalderon Y., Levi B., Glasner A., Benish M. and Ben-Eliyahu S. (2012) Fish oil attenuates surgery-induced immunosuppression, limits post-operative metastatic dissemination and increases long-term recurrence-free survival in rodents inoculated with cancer cells. *Clin Nutr* 31(3): 396-404.
106. Goodwin. J.S. and Garry. P.J. (1988) Lack of correlation between indices of nutritional status and immunologic functions in elderly humans. *J Gerontol* 43(2): M46-9.
107. Goulet O., de Potter S., Antébi H., Driss F., Colomb V., Béréziat G., Alcindor L.G., Corriol O., Le Brun A., Dutot G., Forget D., Perennec V. and Ricour C. (1999) Long-term efficacy and safety of a new olive oil-based intravenous fat emulsion in pediatric patients: a double-blind randomized study. *Am J Clin Nutr* 70(3): 338-45.
108. Granato D., Blum S., Rössle C., Le Boucher J., Malnoë A. and Dutot G. (2000) Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions *in vitro*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24(2): 113-8.
109. Grenon S. M., Aguado-Zuniga J., Hatton J.P., Owens C.D., Conte M.S. and Hughes-Fulford M. (2012) Effects of fatty acids on endothelial cells: inflammation and monocyte adhesion. *J Surg Res* 177(1): e35-43.
110. Gresele P., Falcinelli E., Sebastiano M. and Baldelli F. (2011) Endothelial and platelet function alterations in HIV-infected patients. *Thromb Res* 129(3): 301-8.

111. Grimble R.F. and Tappia P.S. (1998) Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Zhernahrungswiss* 37(Suppl 1): 57-65.
112. Grimble R.F. (2005) Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol* 21(2): 216-22.
113. Grimm H., Mertes N., Goeters C., Schlotzer E., Mayer K., Grimminger F and Fürst P. (2006) Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *Eur J Nutr* 45(1): 55-60
114. Grzybowski S. and Dorken E. (1983) Tuberculosis in Inuit. *Ecol Dis* 2(2): 145-8.
115. Gu L., Rutledge B., Fiorillo J., Ernst C., Grewal I., Flavell R., Gladue R. and Rollins. B. (1997) In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 62(5): 577-80.
116. Gupta S., Knight A.G., Gupta S., Keller J.N. and Bruce-Keller A.J. (2012) Saturated long-chain fatty acids activating inflammatory signalling in astrocytes. *J Neurochem* 120(6): 1060-71.
117. Hagi A., Nakayama M., Shinzaki W., Haji S. and Ohyanagi H. (2010) Effects of the omega-6: omega-3 fatty acid ratio of fat emulsions on the fatty acid composition in cell membranes and the anti-inflammatory action. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34(3): 263-70.
118. Hallett J.M., Leitch A.E., Riley N.A., Duffin R., Haslett C. and Rossi A.G. (2008) Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29: 250-7.
119. Hamazaki T. (1992) Intravenous infusion of n-3 polyunsaturated fatty acids. 1992. *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2): 171-3.
120. Hamuro J., Kikuchi T., Takatsuki F. and Suzuki M. (1996) Cancer cell progression and chemoimmunotherapy-dual effects in the induction of resistance to therapy. *Br J Cancer* 73(4): 465-71.
121. Hao W., Wong O.Y., Liu X., Lee P., Chen Y. and Wong K.K. (2010) ω -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. *J Pediatr Surg* 45(12): 2412-8.
122. Harding M. and Kubes P. (2012) Innate immunity in the vasculature: interactions with pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 15(1): 85-91.
123. Harrie K.R., Jacob M., McCormick D., Reid J.S. and McIntosh N.L. (1986) Comparison of total nutrient admixture stability using two intravenous fat emulsions, Soyacal and Intralipid 20%. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 10(4): 381-7.
124. Harries A.D., Danis V.A. and Heatley R.V. (1984) Influence of nutritional status on immune functions in patients with Crohn's disease. *Gut* 25(5): 465-72.
125. Hartman C., Ben-Artzi E., Berkowitz D., Elhasid R., Lajterer N., Postovski S., Hadad S. and Shamir R. (2009) Olive oil-based intravenous lipid emulsion in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation: A short-term prospective controlled trial. *Clin. Nutr.* 28(6): 631-5.
126. Hazeldine J., Hampson P. and Lord J.M. (2012) Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging. Cell.* 11(5): 571-9.

127. Hebert J.R., Barone J., Reddy M.M. and Backlund J.Y. (1990) Natural killer cell activity in a longitudinal dietary fat intervention trial. *Clin Immunol Immunopathol* 54(1): 103-16.
128. Hestdal K., Ruscetti F.W., Ihle J.N., Jacobsen S.E., Dubois C.M., Kopp W.C., Longo D.L. and Keller J.R. (1991) Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147(1): 22-8.
129. Hsu Y.H., Hsieh P.P. and Chang M.S. (2012) Interleukin-19 blockade attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 51(3): 434-42.
130. Hsueh H. W., Zhou Z., Whelan J., Allen K.G., Moustaid-Moussa N., Kim H. and Claycombe K.J. (2011) Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 Expression in ob/ob mouse adipose stem cells via toll-like receptor-2-mediated pathways. *J Nutr* 141(7): 1260-6.
131. Hua J., Ma X., Webb T., Potter J. J., Oelke M. and Li Z. (2010) Dietary fatty acids modulate antigen presentation to hepatic NK T-cells in nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 51(7): 1696-703.
132. Hughes D. A. and Pinder A.C. (1997) N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro. *Clin Exp Immunol* 110(3): 516-23.
133. Huschak G., Zur Nieden K., Hoell T., Riemann D., Mast H. and Stuttmann R. (2005) Olive oil based nutrition in multiple trauma patients: a pilot study. *Intensive. Care. Med.* 31(9):1202-8.
134. Huston D.P. (1997) The biology of the immune system. *JAMA* 278(22): 1804-14.
135. Ichihara H., Zako K., Komizu Y., Goto K. and Ueoka R. (2011) Therapeutic effects of hybrid liposomes composed of phosphatidylcholine and docosahexaenoic acid on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis *in vivo*. *Biol Pharm Bull* 34(6): 901-5.
136. Ikutani M., Yanagibashi T., Ogasawara M., Tsuneyama K., Yamamoto S., Hattori Y., Kouro T., Itakura A., Nagai Y., Takaki S. and Takatsu K. (2012) Identification of innate **IL-5**-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J Immunol* 188(2): 703-13.
137. Irons R., Anderson M.J., Zhang M. and Fritsche K.L. (2003) Dietary fish oil impairs primary host resistance against *Listeria monocytogenes* more than the immunological memory response. *J Nutr* 133(4): 1163-9.
138. Irons R., Pinge-Filho P. and Fritsche K.L. (2005) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect the in vivo development and function of *Listeria*-specific CD4+ and CD8+ effector and memory/effector T cells in mice. *J Nutr* 135(5): 1151-6.
139. Irons R. and Fritsche K. L. (2005) Omega-3 polyunsaturated fatty acids impair in vivo interferon-gamma responsiveness via diminished receptor signaling. *J Infect Dis* 191(3): 481-6.
140. Ivaldi C., Martin B.R., Kieffer-Jaquinod S., Chapel A., Levade T., Garin J. and Journet A. (2012) Proteomic analysis of S-acylated proteins in human B cells reveals palmitoylation of the immune regulators CD20 and CD23. *PLoS One* 7(5): e37187.
141. Iwami D., Nonomura K., Shirasugi N. and Niimi M. (2011) Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 11(3): 384-9.
142. Jackson S. K., Abate W., Parton J., Jones S. and Harwood J.L. (2008) Lysophospholipid metabolism facilitates Toll-like receptor 4 membrane translocation to regulate the inflammatory response. *J Leukoc Biol* 84(1): 86-92.

143. Janů M., Brodská H., Vecka M., Masteiková R., Kotrlíková E., Lažauskas R., Pečiūra R. and Bernatoniene J. (2011) Comparison of long-term stability of parenteral all-in-one admixtures containing new lipid emulsions prepared under hospital pharmacy conditions. *Medicina (Kaunas)* 47(6): 323-33.
144. Jaron-Mendelson M., Yossef R., Appel M.Y., Zilka A., Hadad U., Afergan F., Rosental B., Engel S., Nedvetzki S., Braiman A. and Porgador A. (2012) Dimerization of NKp46 receptor is essential for NKp46-mediated lysis: Characterization of the dimerization site by epitope mapping. *J Immunol* 188(12): 6165-74.
145. Jeejeebhoy K.N. and Mequid M.M. (1986) Assessment of nutritional status in the oncologic patient. *Surg Clin North Am* 66(6): 1077-90.
146. Jeffery N.M., Yaqoob P., Newsholme E.A. and Calder P.C. (1996) The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann Nutr Metab* 40(2): 71-80.
147. Jiang Z. M., Zhang S.Y., Wang X.R., Yang N.F., Zhu Y. and Wilmore D. (1993) A comparison of medium-chain and long-chain triglycerides in surgical patients. *Ann Surg* 217(2): 175-84.
148. Jiménez-Gómez Y., López-Miranda J., Blanco-Colio L.M., Marín C., Pérez-Martínez P., Ruano J., Paniagua J.A., Rodríguez F., Egido J. and Pérez-Jiménez F. (2009) Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 204(2): e70-6.
149. Johansson A.S., Norén-Nyström U., Larefalk A., Holmberg D. and Lindkog M. (2010) Fish oil delays lymphoma progression in the TLL mouse. *Leuk Lymphoma* 51(11): 2092-7.
150. Jyonouchi H., Sun S. and Sato S. (1996) Nucleotide-free diet suppresses antigen- driven cytokine production by primed T cells: Effects of supplemental nucleotides and dietary fatty acids. *Nutrition* 12(9): 608-15.
151. Kanekal S. and Kherer J.P. (1994) Metabolism of cyclophosphamide by lipoxygenases. *Drug Metab Dispos* 22(1): 74-8.
152. Kang J. X. and Liu A. (2012) The role of the tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio in regulating tumour angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 32(1-2):201-10.
153. Karlsson E. A., Sheridan P.A. and Beck M.A. (2010) Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol* 184(6): 3127-33.
154. Karras A. (2011) Renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Presse Med* 41(3 pt 1): 260-6.
155. Kaszubowska L., Kaczor J.J., Hak L., Dettlaff-Pokora A., Szarynska M. and Kmiec Z. (2011) Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *J Physiol Pharmacol* 62(1):101-9.
156. Kelley D.S., Branch L.B., Love J.E., Taylor P.C., Rivera Y.M. and Iacono J. M. (1991) Dietary alpha-linoleic acid and immunocompetence in humans. *Am J Clin Nutr* 53(1): 40-6.
157. Kelley D.S., Taylor P.C., Nelson G.J., Schmidt P.C., Ferretti A., Erikson K.L., Yu R., Chandra R.K. and Mackey B.E. (1999) Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids* 34(4): 317-24.

158. Kim Y.H., Kim J.K., Kim D.J., Nam J.H., Shim S.M., Choi Y.K., Lee C.H. and Poo H. (2012) Diet-induced obesity dramatically reduces the efficacy of a 2009 pandemic H1N1 vaccine in a mouse model. *J Infect Dis* 205(2): 244-51.
159. Klein J.B., Schepers T.M., Dean W.L., Sonnenfeld G. and McLeish K.R. (1990) Role of intracellular calcium concentration and protein kinase C activation in IFN γ stimulation of U937 cells. *J Immunol* 144(11): 4305-11.
160. Klek S., Chambrier C., Singer P., Rubin M., Bowling T., Staun M., Joly F., Rasmussen H., Strauss B.J., Wanten G., Smith R., Abraham A., Szczepanek K. and Shaffer J. (2013) Four-week parenteral nutrition using a third generation lipid emulsion (SMOFlipid)-a double-blind, randomised, multicentre study in adults. *Clin Nutr* 32(2): 224-31.
161. Köller M., Senkal M., Kemen M., König W., Zumtobel V. and Muhr G. (2003) Impact of omega-3 fatty acid enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery. *Clin Nutr* 22(1): 59-64.
162. Koppe U., Högner K., Doehn J.M., Müller H.C., Witzenrath M., Gutbier B., Bauer S., Pribyl T., Hammerschmidt S., Lohmeyer J., Suttorp N., Herold S. and Opitz B. (2012) *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3 dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol* 188(2): 811-7.
163. Kos W.L., Kos K.A. and Kaplan A.M. (1984) Impaired function of immune reactivity to *Listeria monocytogenes* in diet-fed mice. *Infect Immun* 43(3): 1094-6.
164. Kouro T. and Takatsu K. (2010) IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* 21(12): 1303-9.
165. Kromann N. and Green A. (1980) Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 208(5): 401-6.
166. Kromhout D. (1989) N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J Intern Med Suppl* 731: 47-51.
167. Küllemberg D., Taylor L.A., Schneider M. and Massing U. (2012) Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis* 11:3.
168. Kunkel S.L., Campbell D.A., Chensue S.W. and Higashi G.I. (1986) Species-dependent regulation of monocyte/macrophage Ia antigen expression and antigen presentation by prostaglandin E. *Cell Immunol* 97(1): 140-5.
169. Lands B. (2012) Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* 4(9): 1338-1357.
170. Lanza-Jacoby S., Wong S.H., Tabares A., Baer D. and Schneider T. (1992) Disturbances of the composition of plasmalipoproteins during gram-negative sepsis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1124(3): 233-40.
171. Laparra J.M. and Sanz Y. (2010) Interaction of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res* 61(3): 219-25.
172. Lauritzen L., Kjaer T.M.R., Porsgaard T., Fruekilde M.B., Mu H. and Frøkiaer H. (2011) Maternal intake of fish oil but not of linseed oil reduces de antibody response in neonatal mice. *Lipids* 46(2):171-8.
173. Lee Y.W., Lee W.H. and Kim P.H. (2010a) Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium. *Cytokine* 49(1): 73-9.

174. Lehrer R.I. and Lu W. (2012) α -Defensins in human innate immunity. *Immunol Rev* 245(1): 84-112.
175. Levander O.A., Ager A.L., Morris V.C. and May R.G. (1989) Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Am J Clin Nutr* 50(2): 346-52.
176. Li M., Zhu Q., Hu C., Giesy J. P., Kong Z. and Cui Y. (2011) Protective effect of a eicosapentanoic acid on genotoxicity and oxidative stress of cyclophosphamide in mice. *Environ Toxicol* 26(3): 217-23.
177. Lim B.O., Yamada K., Hung P., Watanabe T., Taniguchi S. and Sugano M. (1996) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and lectins on immunoglobulin production by spleen lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 60(6): 1025-27.
178. Lima S.F., Ribeiro R.A., Arantes R., Coehlo P.M.Z. and Vieira L.Q. (1998) Influence of dietary n-6 and n-3 lipids upon the development of pulmonary granulomas induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(Suppl 1): 197-8.
179. Liu H., Alder J.D., Steiner B.M., Stein-Streilein J., Lim L. and Schell R.F. (1991) Role of L3T4+ and 38+ T-cell subsets in resistance against infection with *Treponema pallidum* subsp *pertenue* in hamster. *Infect Immun* 59(2): 529-36.
180. Liu T., Hougen H., Vollmer A.C. and Hiebert S.M. (2012a) Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe* 18(3): 331-7.
181. Liu Z.X., Han D., Gunawan B. and Kaplowitz N. (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43(6): 1220-30.
182. Liu Z., Feng B.S., Yang S.B., Chen X., Su J. and Yang P.C. (2012b) Interleukin (IL)-23 suppresses IL-10 in the intestine of inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 287(5): 3591-7.
183. López S., Marco A.J., Prats N. and Czaprynski C.J. (2000) Critical role of neutrophils in eliminating *Listeria monocytogenes* from the central nervous system during experimental murine listeriosis. *Infect Immun* 68(8): 4789-91.
184. Lou-Bonafonte J.M., Arnal C., Navarro M.A. and Osada J. (2012) Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res* 56(7): 1043-57.
185. Ma C., Kapanadze T., Gamrekelashvili J., Manns M.P., Korangy F. and Greten T.F. (2012) Anti-Gr-1 antibody depletion fails to eliminate hepatic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol* 92(6): 1199-206.
186. Maciá-Botejara E., Morán-Penco J.M., Espin-Jaime M.T., Botello-Martínez F., Salas-Martínez J., Caballero-Loscos M.J. and Molina-Fernández M. (2013) Brain lipid composition in rabbits after total parenteral nutrition with two different lipid emulsions. *Nutrition* 29(1): 313-7.
187. Magdalon J., Vinolo M.A., Rodrigues H.G., Paschoal V.A., Torres R.P., Mancini-Filho J., Calder P.C., Hatanaka E. and Curi R. (2012) Oral administration of oleic or linoleic acids modulates the production of inflammatory mediators by rat macrophages. *Lipids* 47(8): 803-12.
188. Mai V., Colber L.H., Perkins S.N., Schatzkin A. and Hursting S.D. (2007) Intestinal microbiota: A potential diet-responsive prevention target in ApcMin mice. *Mol Carcinog* 46(1): 42-8.
189. Majewski M., Bose T.O., Sillé F.C.M., Pollington A.M., Fiebigler E. and Boes M. (2007) Protein kinase C delta stimulates antigen presentation by class II MHC in murine dendritic cells. *Int Immunol* 19(6): 719-32.

190. Malaisse W.J., Bulur N., Zhang Y., Hacquebard M., Portois L., Sener A. and Carpentier Y. (2009) The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. I. Liver data. *Int. J Mol Med* 24(1):111-23.
191. Marchal G. and Milon G. (1986) Control of hemopoiesis in mice by sensitized L3T4⁺ Lyt2-lymphocytes during infection with bacillus Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(11): 3977-81.
192. Martin. T.R. (1987) The relationship between malnutrition and lung infections. *Clin Chest Med* 8(3): 359-72.
193. Martínez M.J., Folch N., Torregrosa N., Alfaro A. and Obaldia M.C. (1995) Coagulation and total parenteral nutrition: the effect of 2 lipid emulsions. *Nutr Hosp* 10(2): 74-80.
194. Mateu de Antonio J., Grau S., Luque S., Marín-Casino M., Albert I. and Ribes E. (2008) Comparative effects of olive oil-based and soyabean oil-based emulsions on infection rate and leucocyte count in critically ill patients receiving parenteral nutrition. *Br J Nutr* 99(4): 846-54.
195. Mathew R. C. and Boros D.L. (1986) Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 54(3): 820-6.
196. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Barber D.L., Hieny S., Feng C.G., Caspar P., Oland S., Gordon S. and Sher A. (2011) Innate and adaptive interferons suppress IL-1 alpha and IL-1 beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* 35(6): 1023-34.
197. Mbodji K., Charpentier C., Guérin C., Querec C., Bole-Feysot C., Aziz M., Savoye G., Déchelotte P. and Marion-Letellier R. (2013) Adjunct therapy of n-3 fatty acids to 5-ASA ameliorates inflammatory score and decreases NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr Biochem* 24(4): 700-5.
198. McNamara R.K., Jandacek R., Rider T., Tso P., Cole-Strauss A. and Lipton J. W. (2010) Omega-3 fatty acid deficiency increases constitutive pro-inflammatory cytokine production in rats: relationship with central serotonin turnover. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83(4-6): 185-91.
199. Mednick A. J., Feldmesser M., Rivera J. and Casadevall A. (2003) Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *Eur J Immunol* 33(6): 1744-53.
200. Meeks K.D., Sieve A.N., Kolls J.K., Ghilardi N. and Berg R.E. (2009) IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 183(12): 8026-34.
201. Mellman I., Coukos G. and Dranoff G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480(7378): 480-9.
202. Merrit M. V., Licht N.J., Hatfield C.A. and Fast P.E. (1982) Membrane fluidity and cholesterol in thymus and spleen cells from mice treated with immunomodulatory drugs. *Immunopharmacology* 5(1): 49-64.
203. Mertes N., Grimm H., Fürst P. and Stehle P. (2006) Safety and efficacy of a new parenteral lipid emulsion (SMOFlipid) in surgical patients: a randomized, double-blind, multicenter study. *Ann Nutr Metab* 50(3): 253-9.
204. Meydani S. N., Yogeeswaran G., Liu S., Baskar S. and Meydani M. (1988) Fish oil and tocopherol-induced changes in natural killer cell-mediated cytotoxicity and PGE₂ synthesis in young and old mice. *J Nutr* 118(10): 1245-52.

205. Moreno luna R., Muñoz-Hernandez R., Miranda M.L., Costa A.F., Jimenez-Jimenez L., Vallejo-Vaz A.J., Muriana F.J., Villar J. and Stiefel P. (2012) Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *Am J Hypertens* 25(12): 1299-304.
206. Moretta L., Biassoni R., Bottino C., Mingari M.C. and Moretta A. (2000) Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 21(9): 420-2.
207. Moretta A. and Moretta L. (1997) HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9(5): 694-701.
208. Mosmann T.R. and Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. 1996. *Immunol Today* 17(3): 138-46.
209. Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immuno Methods* 65:55-63.
210. Moussa M., Le Boucher J., Garcia J., Tkaczuk J., Ragab J., Dutot G., Ohayon E., Ghisolfi J. and Thouvenot J.P. (2000) *In vivo* effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. *Clin Nutr* 19(1): 49-54.
211. Mraheil M.A., Billion A., Mohamed W., Rawool D., Hain T. and Chakraborty T. (2011) Adaptation of *Listeria monocytogenes* to oxidative and nitrosative stress in IFN- γ -activated macrophages. *Int J Med Microbiol* 301(7): 547-55
212. Mukaro V.R., Costabile M., Murphy K.J., Hii C.S., Howe P.R. and Ferrante A. (2008) Leukocyte numbers and function in subjects eating n-3 enriched foods: selective depression of natural killer cell levels. *Arthritis Res Ther* 10(3): R57.
213. Musso G., Gambino R. and Cassader M. (2011) Obesity, diabetes, and gut microbiota. *Annu Rev Med* 62: 361-80.
214. Nahani J., Nik-Aenn A., Rafii M. and Mohagheghpour N. (1976) Effects of malnutrition of several parameters of the immune system of children. *Nutr Metab* 20(5): 302-6.
215. Narni-Mancinelli E., Campisi L., Bassand D., Cazareth J., Gounon P., Glaichenhaus N. and Lauvau G. (2007) Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *J Exp Med* 204(9): 2075-87.
216. Neagoe P.E., Dumas E., Hajjar F. and Sirois M.G. (2012) Angiotensin-1 but not angiotensin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. *J Cell Physiol* 227(8): 3099-110.
217. Neumann K., Eppler E., Filgueira L., Groscurth P., Gasal E., Schaffner A., Schoedon G. and Schneemann M. (2003) *Listeria* species escape from the phagosomes of interleukin-4-deactivated human macrophages independent of listeriolysin. *Immunol Cell Biol* 81(6): 431-9.
218. Newcomb D.C., Boswell M.G., Huckabee M.M., Goleniewska K., Dulek D.E., Reiss S., Lukacs N.W., Kolls J.K. and Peebles R.S.Jr. (2012) IL-13 regulates Th17 secretion of IL-17A in an IL-10-dependent manner. *J Immunol* 188(3): 1027-35.
219. Nikcevic D.A., Young M.R., Ellis N.K., Newby M. and Wepsic H.T. (1986) Stimulation of hematopoiesis in untreated and cyclophosphamide treated mice by the inhibition of prostaglandin synthesis. *J Immunopharmacol* 8(3): 299-313.
220. Noda M., Omatsu Y., Sugiyama T., Oishi S., Fujii N., and Nagasawa T. (2011) CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood* 117(2): 451-8.
221. Nomura T., Kawamura I., Tsuchiya K., Kohda C., Baba H., Ito Y., Kimoto T., Watanabe I. and Mitsuyama M. (2002) Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. *Infect Immun* 70(3): 1049-55.

222. Nordenström J., Thörne A., Aberg W., Carneheim C. and Olivecrona T. (2006) The hypertriglyceridemic clamp technique. Studies using long-chain and structured triglyceride emulsions in healthy subjects. *Metabolism* 55(11): 1443-50.
223. Ohtsuka Y., Yamashiro Y., Shimizu T., Nagata S., Igarashi J., Shinohara K., Oguchi S. and Yabuta K. (1997) Reducing cell membrane n-6 fatty acids attenuate mucosal damage in food-sensitive enteropathy in mice. *Pediatr Res* 42(6): 835-9.
224. Ok E., Yilmaz Z., Karaküçük I., Akgün H. and Sahin H. (2003) Use of olive oil based emulsions as an alternative to soybean oil based emulsions in total parenteral nutrition and their effects on liver regeneration following hepatic resection in rats. *Ann Nutr Metab* 47(5): 221-7.
225. Okuda J., Hayashi N., Tanabe S., Minagawa S. and Gotoh N. (2011) Degradation of interleukin 8 by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* 17(6): 782-92.
226. Opitz B., Püschel A., Beermann W., Hocke A.C., Förster S., Schmeck B., van Laak V., Chakraborty T., Suttrop N. and Hippenstiel S. (2006) *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* 176(1): 484-90.
227. Ottonello L., Gonella R., Dapino P., Sacchetti C. and Dallegri F. (1998) Prostaglandin E2 inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels. *Exp Hematol* 26: 895-902.
228. Pachikian B.D., Neyrinck A.M., Portois L., De Backer F.C., Sohet F.M., Hacquebard M., Carpentier Y.A., Cani P.D. and Delzenne M. (2011) Involvement of gut microbial fermentation in themetabolic alterations occurring in n-3 polyunsaturated fatty acids-depleted mice. *Nutr Metab (Lond)* 8(1): 44.
229. Paik J., Fierce Y., Drivdahl R., Treuting P.M., Seamons A., Brabb T. and Maggio-Price L. (2010) Effects of murine norovirus infection on a mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Comp Med* 60(3): 189-95.
230. Palsdottir V., Olsson B., Borén J., Strandvik B. and Gabrielsson B.G. (2011) Postnatal essential fatty acid deficiency in mice affects lipoproteins, hepatic lipids, fatty acids and mRNA expression. Prostaglandins *Leukot Essent Fatty Acids* 85(3-4): 179-88.
231. Park S.J. and Shin. J.I. (2011) The role of interleukin 10 in the prevention of allergic asthma in mouse models with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* pii:45041L1.
232. Parmentier H.K., Awati A., Nieuwland M.G., Schrama J.W. and Sijben J.W. (2002) Different sources of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids and their effects on antibody responses in chickens. *Br Poult Sci* 43(4): 533-44.
233. Pedrosa J., Saunders B.M., Appelberg R., Orme I. M., Silva M.T. and Cooper A.M. (2000) Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 68(2): 577-83.
234. Personnic N., Bruck S., Nahori M.A., Toledo-Arana A., Nikitas G., Lecuit M., Dussurget O., Cossart P. and Bierne H. (2010) The stress-induced virulence protein InlH controls interleukin-6 production during murine listeriosis. *Infect Immun* 78(5): 1979-89.
235. Pierre M., Husson M.O., Le Berre R., Desseyn J. L., Galabert C., Béghin L., Beermann C., Dagenais A., Berthiaume Y., Cardinaud B., Barbry P., Gottrand F. and Guery B.P. (2007) Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(6): L1422-31.
236. Piper S.N., Schade I., Beschmann R.B., Maleck W.H., Boldt J. and Röhm K.D. (2009) Hepatocellular integrity afer parenteral nutrition: Comparison of a fish-oil-containing lipid emulsion with a olive-soybean oil-based lipid emulsion. *Eur J Anaesthesiol* 26(12): 1076-82.

237. Plitas G., Chaudhry U.I., Kingham T.P., Raab J.R. and DeMatteo R.P. (2007) NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 178(7): 4411-6.
238. Porta I., Planas M., Padró J.B., Picó M., Valls M. and Schwartz S. (1994) Effect of two lipid emulsions on platelet function. *Infusionsther Transfusionsmed* 21(5): 316-21.
239. Prickett J.D., Robinson D.R. and Bloch K.J. (1982) Enhanced production of IgE and IgG antibodies associated with a diet enriched in eicosapentaenoic acid. *Immunology* 46(4): 819-26.
240. Puertollano M.A., Algarra I., Ortega E., de Pablo M.A. and Alvarez de Cienfuegos G. (2001a) Loss of natural killer cell activity after murine tumor transplantation appears as a consequence of dietary lipid administration. *Anticancer Res* 21(4A): 2697-702.
241. Puertollano M.A., Cruz-Chamorro L., Puertollano E., Pérez-Toscano M.T., Alvarez de Cienfuegos G. and de Pablo M.A. (2005) Assessment of interleukin-12, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha secretion in sera from mice fed with dietary lipids during different stages of *Listeria monocytogenes* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(9): 1098-103.
242. Puertollano M.A., de Pablo M.A. and Álvarez de Cienfuegos G. (2003) Anti-oxidant properties of N-acetyl-L-cysteine do not improve the immune resistance of mice fed dietary lipids to *Listeria monocytogenes* infection. *Clin Nutr* 22(3): 313-9.
243. Puertollano M.A., de Pablo M.A. and Álvarez de Cienfuegos G. (2001b) Immunomodulatory effects of dietary lipids alter host natural resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32(1): 47-52.
244. Puertollano M.A., de Pablo M.A. and Álvarez de Cienfuegos G. (2002). Relevance of dietary lipids as modulators of immune functions in cells infected with *Listeria monocytogenes*. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(2): 352-7.
245. Puertollano M.A., Puertollano E., Alvarez de Cienfuegos G. and de Pablo M.A. (2007) Significance of olive oil in the host immune resistance to infection. *Br J Nutr* 98(Suppl 1): S54-8.
246. Puertollano M.A., Puertollano E., Álvarez de Cienfuegos G. and de Pablo Martínez M.A. (2010) Olive oil, immune system and infection. *Nutr Hosp* 25(1): 1-8.
247. Puertollano M.A., Puertollano E., Jiménez-Valera M., Ruiz-Bravo A., de Pablo M.A. and Álvarez de Cienfuegos G. (2004a) Lack of apoptosis in *Listeria monocytogenes*-infected thymocytes from mice fed with dietary lipids. *Curr Microbiol* 48(5): 373-8.
248. Puertollano M.A., Puertollano E., Ruiz-Bravo A., Jiménez-Valera M., De Pablo M.A. and De Cienfuegos G.A. (2004b) Changes in the immune functions and susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection in mice fed dietary lipids. *Immunol Cell Biol* 82(4): 370-6.
249. Puertollano E., Puertollano M.A., Cruz-Chamorro L., Alvarez de Cienfuegos G., Ruiz- Bravo A. and de Pablo M.A. (2008) Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice. *Br J Nutr* 99(4): 819-25.
250. Puiggròs C., Sánchez J., Chacón P., Sabín P., Roselló J., Bou R. and Planas M. (2009) Evolution of lipid profile, liver function, and pattern of plasma fatty acids according to the type of lipid emulsion administered in parenteral nutrition in the early postoperative period after digestive surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 33(5): 501-12.
251. Rakhmilevich A.L. (1995) Neutrophil are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *J Leukoc Biol* 57(6): 827-31.

252. Ramos J.M., García-Sepulcre M.F., Masiá M., Brotons A., Grau M.C. and Gutiérrez F. (2010) *Listeria monocytogenes* infection in patients with inflammatory bowel diseases receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Rev Esp Enferm Dig* 102(10): 614-6.
253. Redmond H.P., Gallagher H.J., Shou J. and Daly J.M. (1995) Antigen presentation in protein-energy malnutrition. *Cell Immunol* 163(1): 80-7.
254. Reifen R., Blank M., Afek A., Kopilowiz Y., Sklan D., Gershwin M.E., German B., Yoshida S. and Shoenfeld Y. (1998) Dietary polyunsaturated fatty acids decrease anti-dsDNA and anti-cardiolipin antibodies production in idiotypic induced mouse model of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7(3): 192-7.
255. Reimund J.M., Scheer O., Muller C.D., Pinna G., Duclos B. and Baumann R. (2004) *In vitro* modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions. *Clin Nutr* 23(6): 1324-32.
256. Rockett B.D., Salameh M., Carraway K., Morrison K. and Shaikh S.R. (2010) n-3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion *in vitro* and *ex vivo*. *J Lipid Res* 51(6): 1284-97.
257. Rockett B.D., Franklin A., Harris M., Teague H., Rockett A. and Shaikh S.R. (2011) Membrane raft organization is more sensitive to disruption by (n-3) PUFA than nonraft organization in EL4 and B cells. *J Nutr* 141(6): 1041-8.
258. Rockett B.D., Teague H., Harris M., Melton M., Williams J., Wassall S.R. and Shaikh S.R. (2012) Fish oil increases raft size and membrane order of B cells accompanied by differential effects on function. *J Lipid Res* 53(4): 674-85.
259. Romieu I., García-Esteban R., Sunyer J., Rios C., Alcaraz-Zubeldia M., Velasco S.R. and Holguin F. (2008) The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM_{2.5}. *Environ Health Perspect* 116(9): 1237-42.
260. Rossol M., Heine H., Meusch U., Quandt D., Klein C., Sweet M.J. and Hauschildt S. (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31(5):379-446.
261. Rottenberg M.E., Cardoni R.L. and Segura E.L. (1990) Involvement of L3T4⁺, LY2.2⁺ T cell subsets and non-T cells in the resistance of mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol* 20(3): 397-400.
262. Ruggiero C., Lattanzio F., Lauretani F., Gasperini B., Andres-Lacueva C. and Cherubini A. (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and immune-mediated diseases: inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 15(36): 4135-48.
263. Sakurai Y., Oh-Oka Y., Kato S., Suzuki S., Hayakawa M., Masui T., Yoshida I., Tonomura S., Mitsutaka S., Nakamura Y., Uyama I., Komori Y. and Ochiai M. (2006) Effects of long-term continuous use of immune-enhancing enteral formula on nutritional and immunologic status in non-surgical patients. *Nutrition* 22(7-8): 713-21.
264. Sala-Vila A., Barbosa V.M. and Calder P.C. (2007) Olive oil in parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(2): 165-74.
265. Sales-Campos H., Souza P.R., Peghini B.C., da Silva J.S. and Cardoso C.R. (2013) An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 13(2): 201-10.
266. Salinthon S., Schillace R.V., Tsang C., Regan J.W., Bourdette D.N. and Carr D.W. (2011) Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein-coupled receptor-dependent and-independent mechanism. *J Nutr Biochem* 22(7): 681-90.

267. Sánchez-Fidalgo S., Villegas I., Cárdeno A., Talero E., Sánchez-Hidalgo M., Motilva V. and Alarcón de la Lastra C. (2010) Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin Nutr* 29(5): 663-73.
268. Sanderson P., MacPherson G.G., Jenkins C.H. and Calder P.C. (1997) Dietary fish oil diminishes the antigen presentation activity of rat dendritic cells. *J Leukoc Biol* 62(6): 771-777.
269. Sarriá B., Mateos R., Gallardo E., Ramos S., Martín M.A., Bravo L. and Goya L. (2012) Nitroderivatives of olive oil phenols protect HepG2 cells against oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 50(10): 3752-8.
270. Schmid M.A., Takizawa H., Baumjohann D.R., Saito Y. and Manz M.G. (2011) Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood* 118(18): 4829-40.
271. Schmidt S., Stahl F., Mutz K.O., Scheper T., Hahn A. and Schuchard P. (2012) Different gene expression profile in normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation: Result from a randomized controlled trial. *Lipids Health Dis* 11: 105.
272. Schwerbrock N.M., Karlsson E.A., Shi Q., Sheridan P.A. and Beck M.A. (2009) Fish oil-fed mice have impaired resistance to influenza infection. *J Nutr* 139(8): 1588-94.
273. Seki S., Nakashima H., Nakashima M. and Kinoshita M. (2011) Antitumor immunity produced by the liver Kupffer cells, NK cells, NKT cells, and CD8 CD122 T cells. *Clin Dev Immunol* Art ID 868345.
274. Seki T., Kumagai T., Kwansa-Bentum B., Furushima-Shimogawara R., Anyan W.K., Miyazawa Y., Iwakura Y. and Ohta N. (2012) Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infect Immun* 80(1): 159-68.
275. Shaikh S.R. and Edidin M. (2007) Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules. *J Lipid Res* 48(1): 127-38.
276. Shaikh S.R., Jolly C.A. and Chapkin R.S. (2012) n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. *Mol Aspects Med* 33(1): 46-54.
277. Shaikh S.R., Mitchell D., Carroll E., Li M., Schneck J. and Edidin M. (2008) Differential affects of saturated and monounsaturated fatty acids on MHC class I antigen presentation. *Scand. J Immunol* 68(1): 30-42.
278. Shek L.P., Chong M.F., Lim J.Y., Soh S.E. and Chong Y.S. (2012) Role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in infant allergies and respiratory diseases. *Clin Dev Immunol* 2012: 730568.
279. Shi C., Velázquez P., Hohl T.M., Leiner I., Dustin M.L. and Pamer E.G. (2010) Monocyte trafficking to hepatic sites of bacterial infection is chemokine independent and directed by focal intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* 184(11): 6266-74.
280. Shi L., He L., Sarvepalli P. and McCluskey L.P. (2012) Functional role for interleukin-1 in the injured peripheral taste system. *J Neurosci Res* 90(4): 816-30.
281. Sieve A.N., Meeks K.D., Lee S. and Berg R.E. (2010) A novel immunoregulatory function for IL-23: inhibition of IL-12-dependent IFN- γ production. *Eur J Immunol* 40(8): 2236-47.

282. Siqueira J., Smiley D., Newton C., Le N.A., Gosmanov A.R., Spiegelman R., Peng L., Osteen S.J., Jones D.P., Quyyumi A.A., Ziegler T.R. and Umplierrez G.E. (2011) Substitution of standard soybean oil with olive oil-based lipid emulsion in parenteral nutrition: comparison of vascular, metabolic, and inflammatory effects. *J Clin Endocrinol Metab* 96(10): 3207-16.
283. Skouroliakou M., Konstantinou D., Koutri K., Kakavelaki C., Stathopoulou M., Antoniadou M., Xemelidis N., Kona V. and Markantonis S.A. (2010) double-blind, randomized clinical trial of the effect of omega-3 fatty acids on the oxidative stress of preterm neonates fed through parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr* 64(9): 940-7.
284. Skouroliakou M., Konstantinou D., Agakidis C., Delikou N., Koutri K., Antoniadou M. and Karagiozoglou-Lampoudi T. (2012) Cholestasis, bronchopulmonary dysplasia, and lipid profile in preterm infants receiving MCT/ ω -3-PUFA-containing or soybean -based lipid emulsion. *Nutr Clin Pract* 27(6): 817-24.
285. Solanas M., Grau L., Moral R., Vela E., Escrich R. and Escrich E. (2010) Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* 31(5): 871-9.
286. Song K.S., Jing K., Kim J.S., Yun E.J., Shin S., Seo K.S., Park J.H., Heo J.Y., Kang J.X., Suh K.S., Wu T., Park J.I., Kweon G.R., Yoon W.H., Hwang B.D. and Lim K. (2011) Omega-3-polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* via downregulation of Wnt/Beta-catenin signaling. *Pancreatol* 11(6): 574-84.
287. Souza L.L., Cordeiro A., Oliveira L.S., de Paula G.S., Faustino L.C., Ortega-Carvalho T.M., Oliveira K.J. and Pazos-Moura C.C. (2011) Thyroid hormone contributes to the hypolipidemic effect of polyunsaturated fatty acids from fish oil: *in vivo* evidence for cross talking mechanisms. *J Endocrinol* 11(1): 65-72.
288. Spaner D.E., Lee E., Shi Y., Wen F., Li Y., Tung S., McCaw L., Wong K., Gary-Gouy H., Dalloul A., Ceddia R. and Gorzycynski R. (2013) PPAR-alpha is a therapeutic target for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27(5): 1090-9.
289. Stanke-Labesque F., Molière P., Bessard J., Laville M., Véricel E. and Lagarde M. (2008) Effect of dietary supplementation with increasing doses of docosahexaenoic acid on neutrophil lipid composition and leukotriene production in human healthy volunteers. *Br J Nutr* 100(4): 829-33.
290. Stein M.L. and Munitz A. (2010) Targeting interleukin IL-5 for asthma and hypereosinophilic diseases. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 4(3): 201-9.
291. Strandberg L., Verdrengh M., Enge M., Andersson N., Amu S., Önnheim K., Benrick A., Brisslert M., Bylund J., Bokarewa M., Nilsson S. and Jansson J.O. (2009) Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. *PLoS One* 4(10): e7605.
292. Stubbs C.D. and Smith A.D. (1990) Essential fatty acids in membrane: physical properties and function. *Biochem Soc Trans* 18(5): 779-81.
293. Sun H., Hu Y., Gu Z., Owens R.T., Chen Y.Q. and Edwards I.J. (2011) Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis* 32(10): 1518-24.
294. Sunnemark D., Harris R.A., Frostegård J. and Orn A. (2000) Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of *Trypanosoma cruzi* infection and a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 153(2): 273-82.

295. Swain S.L., Dialynas D.P., Fitch F.W. and English M. (1984) Monoclonal antibody to L3T4 blocks the function of T cells specific for class 2 major histocompatibility complex antigens. *J Immunol* 132(3): 1118-23.
296. Swartzendruber J.A., Byrne A.J. and Bryce P.J. (2012) Cutting edge: histamine is required for IL-4-driven eosinophilic allergic responses. *J Immunol* 182(2): 536-40.
297. Tateda K., Moore T.A., Newstead M.W., Zeng X., Matsukawa A., Swanson M.S., Yamauchi K. and Standiford T.J. (2001) Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *J Immunol* 166(5): 3355-61.
298. Télessy I.G., Balogh J., Turmezei J., Dredán J. and Zekó R. (2011) Stability assessment of o/w parenteral nutrition emulsions in the presence of high glucose and calcium concentrations. *J Pharm Biomed Anal* 56(2): 159-64.
299. Thibane V.S., Ells R., Hugo A., Albertyn J., Van Rensburg W.J., Van Wyk P.W., Kock J.L. and Pohl C.H. (2012) Polyunsaturated fatty acids causes apoptosis in *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms. *Biochim Biophys Acta* 1820(10): 1463-8.
300. Thies F., Nebe-von-Caron G., Powell J.R., Yaqoob P., Newsholme E.A. and Calder P.C. (2001) Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y. *Am J Clin Nutr* 73(3): 539-48.
301. Thomas-Gibson S., Jawhari A., Atlan P., Brun A.L., Farthing M. and Forbes A. (2004) Safe and efficacious prolonged use of an olive oil-based lipid emulsion (ClinOleic[®]) in chronic intestinal failure. *Clin Nutr* 23(4): 697-703.
302. Tomsits E., Pataki M., Tölgyesi A., Fekete G., Rischak K. and Szollár L. (2010) Safety and efficacy of a lipid emulsion containing a mixture of soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil, and fish oil: a randomised, double-blind clinical trial in premature infants requiring parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51(4): 514-21.
303. Tuzun F., Kumral A., Ozbal S., Dilek M., Tugyan K., Duman N. and Ozkan H. (2012) Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci* 30(4): 315-23.
304. Urpi-Sarda M., Casas R., Chiva-Blanch G., Romero-Mamani E.S., Valderas-Martinez P., Arranz S., Andres-Lacueva C., Llorach R., Medina-Remón A., Lamuela-Raventos R.M. and Estruch R. (2012) Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res* 65(6): 577-83.
305. Utermohlen V. and Tucker M.A. (1986) Possible effects of dietary n-6 series polyunsaturated fatty acids on the development of immune dysfunction and infection. *Proc Nutr Soc* 45(3): 327-31.
306. Van Faassen H., KuoLee R., Harris G., Zhao X., Conlan J.W. and Chen W. (2007) Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 75(12): 5597-608.
307. Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F., Bohez L., Pasmans F., Volf J., Sevcik M., Rychlik I., Haesebrouck F. and Ducatelle R. (2004) Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 70(6): 3582-7.
308. Vanden-Bush T.J., Buchta C.M., Claudio J. and Bishop G.A. (2009) Cutting edge: importance of IL-6 and cooperation between innate and adaptive immune receptors in cellular vaccination with B lymphocytes. *J Immunol* 183(8): 4833-7.

309. Vanderstocken G., Bondue B., Horckmans M., Di Pietrantonio L., Robaye B., Boeynaems J.M. and Communi D. (2010) P2Y2 receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation. *J Immunol* 185(6): 3702-7.
310. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 584-640.
311. Vega A., Ventura I., Chamorro C., Aroca R., Orovigt A., Gómez E., Puente Y., Martínez A., Asturias J.A. and Monteseirín J. (2011) Neutrophil defensins: their possible role in allergic asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21(1): 38-43.
312. Verdrengh M. and Tarkowski A. (1997) Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 65(7): 2517-21.
313. Viau S., Leclère L., Buteau B., Grégoire S., Acar N., Bron A., Creuzot-Garcher C.P., Bretillon L. and Joffre C. (2012) Polyunsaturated fatty acids induce modification in the lipid composition and the prostaglandin production of the conjunctival epithelium cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250(2): 211-22.
314. Vidal S.M., Khakoo S.I. and Biron C.A. (2011) Natural killer cell responses during viral infections: flexibility and conditioning of innate immunity by experience. *Curr Opin Virol* 1(6): 497-512.
315. Vivier E and Ugolini S. (2009) Regulatory natural killer cells: new players in the IL-10 anti-inflammatory response. *Cell Host Microbe* 6(6): 493-5.
316. Vreden S.G., Blok W.L., Sauerwein R.W., Oettinger M.C., Verhave J.P., Meuwissen J.E., Van der Meer J.W. and Van den Broek M.F. (1995) Inhibition of *Plasmodium berghei* liver schizont development and reduction of cytokine production capacity in rats by dietary fish oil supplementation. *Am J Trop Med Hyg* 53(2): 206-10.
317. Walch M., Rampini S.K., Stoeckli I., Latinovic-Golic S., Dumrese C., Sundstrom H., Vogetseder A., Marino J., Glauser D.L., van den Broek M., Sander P., Groscurth P. and Ziegler U. (2009) Involvement of CD252 (CD134L) and IL-2 in the expression of cytotoxic proteins in bacterial- or viral-activated human T cells. *J Immunol* 182(12): 7569-79.
318. Wall R., Ross R. P., Shanahan F., O'Mahony L., O'Mahony C., Coakley M., Hart O., Lawlor P., Quigley E.M., Kiely B., Fitzgerald G. F. and Stanton C. (2009) Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr* 89(5): 1393-401.
319. Wang J., Yu J.C., Kang W.M. and Ma Z.Q. (2012) Superiority of a fish oil-enriched emulsion to medium-chain triacylglycerols/long-chain triacylglycerols in gastrointestinal surgery patients: A randomized clinical trial. *Nutrition* 28(6): 623-9.
320. Wang J.S. and Weng T.P. (2011) Hypoxic exercise training promotes antitumour cytotoxicity of natural killer cells in young men. *Clin Sci (Lond)* 121(8): 343-53.
321. Wanten G.J. and Calder P.C. (2007) Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr* 85(5): 1171-84.
322. Wanten G. J., Naber A.H., Kruijmel J.W., Tool A.T., Roos D. and Jansen J.B. (1999) Influence of structurally different lipid emulsions on human neutrophil oxygen radical production. *Eur J Clin Invest* 29(4): 357-63.

323. Weaver K.L., Ivester P., Seeds M., Case L.D., Arm J.P. and Chilton F.H. (2009) Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans. *J Biol Chem* 284(23): 15400-7.
324. Webb A.N., Hardy P., Peterkin M., Lee O., Shalley H., Croft K.D., Mori T.A., Heine R.G. and Bines J.E. (2008) Tolerability and safety of olive oil-based lipid emulsion in critically ill neonates: A blinded randomized trial. *Nutrition* 24(11-12): 1057-64.
325. Wichmann M.W., Thul P., Czarnetzki H.D., Morlion B.J., Kemen M. and Jauch K.W. (2007) Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): Data from a prospective, randomized, multicenter trial. *Crit Care Med* 35(3): 700-6.
326. Wilde D.B., Marrack P., Kappler J., Dialynas D.P. and Fitch F.W. (1983) Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity; monoclonal antibody GK1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. *J Immunol* 131(5): 2178-83.
327. Wolf S., Krammer M., Trost H.A. and Lumenta C.B. (2004) Lipofundin-induced intracranial pressure rise after severe traumatic brain injury-a case report. *Zentralbl Neurochir* 65(2): 81-3.
328. Wood L.G., Garg M.L. and Gibson P.G. (2011) A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 127(5): 1133-40.
329. Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C. and Edwards S.W. (2010) Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49: 1618-31.
330. Wu G.H., Jarstrand C. and Nordenström J. (1999) Phagocyte-induced lipid peroxidation of different intravenous fat emulsions and counteractive effect of vitamin E. *Nutrition* 15(5): 359-64.
331. Wynn T.A. (2003) IL-13 effectors functions. *Annu Rev Immunol* 21: 425-56.
332. Wynter M.P., Russell S.T. and Tisdale M.J. (2004) Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo* 18(5): 543-7.
333. Xiao G. and Fu J. (2011) NF- κ B and cancer: A paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res* 1(2): 192-221.
334. Yamada P., Zarrouk M., Kawasaki K. and Isoda H. (2008) Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. *J Ethnopharmacol* 116(2): 279-87.
335. Yamashita N., Maruyama M., Yamazaki K., Hamazaki T. and Yano S. (1991) Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 59(3): 335-45.
336. Yamashita N., Sugiyama E., Hamazaki T. and Yano S. (1988) Inhibition of natural killer cell activity by eicosapentaenoic acid *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 150(1): 497-505.
337. Yang T., Fang S., Zhang H.X., Xu L.X., Zhang Z.Q., Yuan K.T., Xue C.L., Yu H.L., Zhang S., Li Y.F., Shi H.P. and Zhang Y. (2013) N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer stem-like cells in vitro. *J Nutr Biochem* 24(5): 744-53.
338. Yaqoob P., Knapper J.A., Webb D.H., Williams C.M., Newsholme E.A. and Calder P.C. (1998) Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 67(1): 129-35.

339. Yaqoob P., Newsholme E.A. and Calder P.C. (1994) Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 41(2-3): 241-7.
340. Yin J. and Ferguson T.A. (2009) Identification of an IFN-gamma-producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 182(11): 7069-73.
341. Yog R., Barhoumi R., McMurray D.N. and Chapkin R.S. (2010) n-3 Polyunsaturated fatty acids suppress mitochondrial translocation to the immunologic synapse and modulate calcium signaling in T cells. *J Immunol* 184(10): 5865-73.
342. Zamora-Ardoy MA., Báñez-Sánchez F., Báñez Sánchez C. and Alaminos-García P. (2004) Olive oil: influence and benefits of some pathologies. *An Med Interna* 21(3): 138-42.
343. Zlotnik A., Shimonkevitz R., Kappler J. and Marrack P. (1985) Effect of prostaglandin E2 on the γ -interferon induction of antigen-presenting ability in P388D1 cells and on IL-2 product on by T-cell hybridomas. *Cell Immunol* 90(1): 154-66.
344. Zúñiga J., Cancino M., Medina F., Varela P., Vargas R., Tapia G., Videla L.A. and Fernández V. (2011) N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: Anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 6(12): e28502.
345. Zwirner N.W. and Domaica C.I. (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36(4): 274-88.

7.2. Libros y páginas web.

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pillai S. (2008) *Inmunología celular y molecular*, 6ª edición. Editorial Elsevier-Saunders.
2. Willey J., Sherwood L. and Woolverton C. (2010) *Prescott´s Microbiology* 8ª edición. Editorial McGraw-Hill Higher education.
3. Marcos A. (2011) *Inmunonutrición: En la salud y en la enfermedad*. Editorial médica Panamericana S.A.
4. Calder P.C., Field C.J. and Gill H.S (2002) *Nutrition and immune function*. Editorial CABI publishing.
4. de la Osada García J. (2010) *Aceite de oliva virgen extra y prevención de la aterosclerosis*. Academia de farmacia "Reino de Aragón". Colegio oficial de farmacéuticos de Zaragoza.
5. Mateu de Antonio X. (2013) *Emulsiones lipídicas en nutrición parenteral*. Fresenius-Kabi España S.A.U. (fresenius-kabi.es).
6. Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE) (www.senpe.com).