



UNIVERSIDAD DE JAÉN

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

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LAS FUNCIONES INMUNES EN
RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS
LÍPIDAS. ESPECIAL RELEVANCIA DEL
ACEITE DE OLIVA**

**PRESENTADA POR:
M^a ÁNGELES PUERTOLLANO VACAS**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. MANUEL A. DE PABLO MARTÍNEZ
DR. D. GERARDO ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS LÓPEZ**

JAÉN, 5 DE NOVIEMBRE DE 2004

ISBN 84-8439-278-3

Nombre y apellidos del autor

M^a ANGELES PUERTOLLANO VACAS

Título de la Tesis Doctoral

ANÁLISIS DE LAS FUNCIONES INMUNES EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS LÍPIDAS. ESPECIAL RELEVANCIA DEL ACEITE DE OLIVA

I.S.B.N.

84-8439-278-3

Fecha de Lectura

5 DE NOVIEMBRE DE 2004

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Ciencias de la Salud

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

Dirección de la Tesis	Dr. D. Manuel A. de Pablo Martínez Dr. D. Gerardo Álvarez de Cienfuegos López
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Alfonso Ruiz-Bravo López
Vocales	Dra. Dña. María Jiménez Valera Dra. Dña. Ascensión Marcos Sánchez Dr. D. Antonio Sampedro Martínez
Secretario/a	Dr. D. José Manuel Martínez Martos

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral



Resumen

Una gran cantidad de estudios han descrito en los últimos años que la malnutrición es la principal causa de inmunodeficiencia que existe en el mundo. De esta afirmación se deduce que existen algunos componentes esenciales de nuestra dieta capaces de ejercer una modulación del sistema inmune tanto de humanos como de animales. Por lo tanto, algunas enfermedades de naturaleza infecciosa de gran importancia para el ser humano están íntimamente relacionadas con deficiencias en la nutrición del individuo debido en gran parte a un estado de inmunosupresión.

Dentro del grupo de componentes que forman parte de nuestra dieta y que poseen actividad inmunoreguladora, se encuentran: proteínas; vitaminas como la A, B6, B12, C, D y E; minerales como el zinc y el selenio; y algunos ácidos grasos.

Los lípidos incluidos en la dieta son componentes fundamentales, ya que poseen numerosas funciones que intervienen en el correcto desarrollo del individuo. Entre estas funciones destaca la capacidad de estas moléculas para modificar ciertas funciones del sistema inmune. Las primeras evidencias que existen acerca de la relación de los ácidos grasos de la dieta y la regulación del sistema inmune del individuo, se basan en un estudio epidemiológico llevado a cabo por los investigadores *Kromann y Green* en el año 1980, en una población de esquimales de Groenlandia. Este trabajo de investigación reveló la baja incidencia de enfermedades autoinmunes y cardiovasculares observada en los individuos que forman parte de esta población. Sin embargo, y paralelamente a estos estudios también se detectó una alta incidencia de tuberculosis en estos individuos. Años más tarde algunas investigaciones sugirieron que los resultados observados en la población de Groenlandia se debían principalmente a una masiva ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de la serie $n-3$, contenidos fundamentalmente en el pescado, el cual constituye la base de la dieta en estos individuos. A pesar del papel protector que los ácidos grasos de la serie $n-3$ ejercen sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o de carácter autoinmune y a pesar de las propiedades anti-inflamatorias, la administración de altas dosis de ácidos grasos $n-3$ de cadena larga puede reducir significativamente la resistencia inmune del individuo frente a un agente infeccioso.

Varias van a ser las funciones del sistema inmune moduladas por los ácidos grasos de la dieta. Entre ellas las más destacadas son la proliferación de linfocitos, síntesis de citoquinas, actividad de células natural killer (NK), fagocitosis, presentación de antígenos, y producción de anticuerpos. Para llevar a cabo su función inmunomoduladora, los ácidos grasos van a utilizar diferentes mecanismos, muchos de los cuales no están perfectamente clarificados en la actualidad.

Para la realización del presente estudio se utilizaron como animales de experimentación ratones de la raza Balb/c, y se llevaron a cabo determinaciones *in*

vivo e *in vitro*. El principal objetivo se basó en demostrar que los ácidos grasos ejercen una acción inmunomoduladora sobre el sistema inmune del individuo, y que esta acción inmunosupresora puede tener en algunos casos diferentes efectos perjudiciales sobre la resistencia que el individuo presenta a cualquier desorden de carácter infeccioso.

Según los resultados obtenidos, el aceite de pescado (compuesto principalmente por ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie *n*-3) es el más inmunosupresor, ya que los animales alimentados con esta dieta mostraron una mayor susceptibilidad a la infección por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*. Por otra parte, el aceite de oliva (compuesto principalmente por ácidos grasos monoinsaturados de la serie *n*-9) va ejercer también una acción inmunosupresora sobre el individuo aunque en menor grado que el aceite de pescado, ya que los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva mostraron una mayor resistencia a la infección con *L. monocytogenes*. En ambos grupos experimentales, se observó una reducción significativa en la supervivencia de los animales frente a la infección con este patógeno, así como un incremento sustancial del número de bacterias obtenidas a partir del bazo en los ratones alimentados con ambas dietas lipídicas y sometidos a la infección con la bacteria. También se comprobó en estos grupos experimentales una alteración en la actividad bactericida de las células peritoneales. De hecho, los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva y sometidos a una infección con *L. monocytogenes*, presentaron un incremento en la actividad bactericida de sus células peritoneales, lo que condujo a una reducción de la capacidad invasora de la bacteria. Otro dato destacable es que tanto la dieta rica en aceite de pescado como la dieta rica en aceite de oliva, promueven la formación de aniones superóxido y de especies reactivas del oxígeno (ROS) antes y después de la infección con *L. monocytogenes*. Ambos hechos pueden estar implicados en la reducción de la resistencia del hospedador a la infección por *L. monocytogenes*.

Por otra parte también es interesante hacer referencia a los datos obtenidos en relación al papel que juegan los lípidos de la dieta en el desarrollo de cáncer. Según los resultados obtenidos, la inmunosupresión ejercida en el individuo por el aceite de pescado supone un descenso en la supervivencia de los animales alimentados con dicha dieta experimental y sometidos a un transplante con el linfoma LSTRA. Este hecho puede ser debido, entre otros factores, a la reducción observada en la actividad de las células natural killer (NK) procedentes de los animales alimentados con la dieta de pescado.

En general y teniendo en cuenta todos los datos expuestos anteriormente, se puede concluir que el aceite de pescado y por tanto los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 son los más inmunosupresores; lo que puede suponer un efecto beneficioso en la resolución de los desórdenes inflamatorios. Sin embargo, a pesar de este hecho los procesos de inmunosupresión descritos con anterioridad causan un incremento de la susceptibilidad del individuo a agentes infecciosos dificultando su eliminación pero también un aspecto negativo cuando se trata de desórdenes de origen infeccioso.

Abstract

In the last years, numerous investigations have described that malnutrition is the commonest cause of immunodeficiency on the world. This asseveration leads to the notion that supports a potential action of several dietary components on immune system of both humans and animals. Hence, certain human infectious diseases may be closely related to nutrition deficiencies due mainly to an immunosuppressive state.

Thus, vitamins such as A, B6, B12, C, D and E, as well as minerals (zinc or selenium) and certain fatty acids have been reported to play an important role in the regulation of immune system.

Lipids included in the human diet constitute essential components for the correct development of body. A relevant function of lipids is focused on their capacity to modulate immune system functions. Early epidemiological studies determined that fish and fish oil are able to significantly reduce the incidence of cardiovascular and autoimmune disorders in Greenland Eskimos (Kromann and Green, 1980). Independently, other investigations also revealed a relevant and progressive increase of tuberculosis in this population. On the other hand, other experimental findings have demonstrated that long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids reduce the host immune resistance to infectious microorganisms, in spite of the importance of these nutrients as anti-inflammatory components.

Dietary lipids modulate several immune system functions, such as lymphocyte proliferation, cytokine synthesis, natural killer (NK) cell activity, phagocytosis, antigen presentation and antibody synthesis. Different mechanisms have been proposed in order to explain the modulation of immune system by dietary lipids. However, these mechanisms are fully not clarified.

The main goal in this investigation was based on the demonstration of modulatory action of certain fatty acids on the immune system. In addition, we attempt to demonstrate that the immunosuppressive properties of several dietary fatty acids may produce adverse effects on the host immune resistance after the challenge with a nutrient. Hence, this study was obviously performed with Balb/c mice fed with different dietary lipids.

Fish oil (mainly constituted by long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids) is the most immunosuppressive fatty acid, because mice fed with this diet showed an increase of susceptibility to the infection with a intracellular pathogen as *Listeria monocytogenes*. By a strict contrast, olive oil (mainly constituted by monounsaturated fatty acids) also exerts a suppression of immune system, but these effects are not as relevant as those exerted by fish oil, because animals fed with an olive oil diet

were more resistant to the infection than the group fed a fish oil diet. A significant reduction of survival percentage was observed in both olive oil and fish oil groups after experimental infection with *L. monocytogenes*. Moreover, the number of viable bacteria from spleens was increased. Bactericidal activity was enhanced in the group fed an olive oil diet, whereas this factor was significantly reduced in cells from mice fed a fish oil diet. This fact leads to the inhibition of the invasive capacity of this bacterium. Both fish oil and olive oil promote the generation of reactive superoxide species (ROS), before and after of starting the infectious process. We suggest that this event may be involved in the reduction of resistance against *L. monocytogenes* infection.

In addition, it is important to mention the relationship of dietary lipids and cancer development. In the present study, Balb/c mice were transplanted with a murine lymphoma called LSTRA. Lymphoma transplantation in mice fed a diet containing fish oil reduced significantly the survival. This fact may be attributed in part to a reduction in NK cell activity isolated from mice fed a diet containing fish oil.

Based on the present results, we can conclude that fish oil, namely *n*-3 polyunsaturated fatty acids are the most immunosuppressive. This property produces a beneficial effect in the resolution of inflammatory disorders characterized by an overactivation of immune response, but the immunosuppression exerted by these fatty acids may cause an increase of host susceptibility to infectious microorganisms, which impedes the pathogen elimination. Nevertheless olive which is also involved in a beneficial response in the resolution of autoimmune diseases does not reduce the host immune defense conferring a beneficial protection.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

ANALISIS DE LAS FUNCIONES
INMUNES EN RATONES
ALIMENTADOS CON DIETAS
LIPÍDICAS. ESPECIAL RELEVANCIA
DEL ACEITE DE OLIVA

MARÍA ÁNGELES PUERTOLLANO VACAS

tesis doctoral

Indice

1. Introducción	7
1.1. Deficiencias lipídicas e inmunidad	8
1.2. Familias lipídicas	9
1.3. Consecuencias Biológicas	10
1.3.1. Mecanismos de acción de los ácidos grasos para modular el sistema inmune	11
1.3.1.1. Alteración de la fluidez de membrana	11
1.3.1.2. Formación de peróxidos lipídicos	13
1.3.1.3. Síntesis de eicosanoides	13
1.3.1.4. Regulación de la expresión de genes	14
1.3.2. Funciones del sistema inmune moduladas por los ácidos grasos	17
1.3.2.1. Proliferación de linfocitos	18
1.3.2.2. Producción de citoquinas	21
1.3.2.3. Actividad de las células natural killer (NK)	23
1.3.2.4. Fagocitosis	26
1.3.2.5. Presentación de antígenos	27
1.3.2.6. Producción de anticuerpos	29
1.3.3. Apoptosis y ácidos grasos	31
1.4. Consecuencias clínicas	33
1.4.1. Ácidos grasos, inmunidad e infección	33
1.4.1.1. Bacterias	
1.4.1.2. Virus	
1.4.1.3. Parásitos	
1.4.2. Ácidos grasos y cáncer	39
1.4.3. Dietas ricas en ácidos grasos y desórdenes inflamatorios	40
1.4.3.1. Artritis reumatoide	
1.4.3.2. Psoriasis	
1.4.3.3. Lupus eritematoso	

2. Hipótesis y Objetivos	43
3. Material y Métodos	46
3.1. Ensayos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	47
3.1.1. Animales y dietas de experimentación	47
3.1.2. Preparación de <i>Listeria monocytogenes</i>	48
3.1.3. Preparación de la línea tumoral (LSTRA)	49
3.1.4. Ensayo de supervivencia	49
3.1.4.1. Infección experimental <i>con Listeria monocytogenes</i>	49
3.1.4.2. Infección experimental <i>con Listeria monocytogenes</i> en presencia del antioxidante N-acetyl-L-cysteína (NAC) ..	49
3.1.4.3. Transplante con linfoma murino	50
3.1.5. Recuperación de bacterias viables a partir del bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.1.6. Recuperación de bacterias viables a partir del bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con N-acetyl-L-cysteína (NAC)	50
3.1.7. Preparación de células murinas	51
3.1.7.1. Timocitos	51
3.1.7.2. Esplenocitos	51
3.1.7.3. Peritoneales	52
3.1.8. Viabilidad celular. Ensayo de citotoxicidad	52
3.1.9. Ensayo de proliferación celular	53
3.1.10. Análisis de la actividad bactericida.....	54
3.1.11. Determinación de la adhesión/invasión de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	55
3.1.11.1. Ensayo de adhesión	55
3.1.11.2. Ensayo de invasión	55
3.1.12. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	56
3.1.13. Determinación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS)	57
3.1.14. Actividad de células natural killer (NK)	57
3.1.15. Determinación de la actividad de proteasomas	58
3.1.16. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN.....	59
3.1.17. Actividad de caspasa-3	59
3.2. Ensayos <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Aislamiento y preparación de células	60
3.2.2. Viabilidad celular	60
3.2.2.1. Inhibidor de la fosfolipasa A ₂	60

3.2.2.2. Inhibidor de la ciclooxigenasa	60
3.2.2.3. Inhibidor de la lipooxigenasa	61
3.2.3. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	61
3.2.4. Determinación de la actividad de proteasomas.....	62
3.2.5. Preparación de células YAC-1	62
3.2.6. Medición de la proliferación con Sytox-green	62
3.2.7. Análisis de la acumulación de triacilglicerolos con rojo nilo	63
3.2.8. Determinación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS)	63
3.2.9. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN	64
3.2.10. Actividad de caspasa-3	64
3.3. Análisis estadístico	65
4. Resultados	66
4.1. Ensayos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	67
4.1.1. Ensayos con <i>Listeria monocytogenes</i>	67
4.1.1.1. Peso de los ratones y de los bazos después de la administración de dietas lipídicas y tras la infección con <i>Listeria monocytogenes</i>	67
4.1.1.2. Recuentos de células peritoneales.....	68
4.1.1.3. Ensayos de supervivencia tras una infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i>	68
4.1.1.4. Ensayos de supervivencia tras una infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratamiento con N-acetyl-L-cysteina (NAC)	70
4.1.1.5. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados	71
4.1.1.6. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con N-acetyl-L-cysteina (NAC)	72
4.1.1.7. Viabilidad celular. Ensayo de citotoxicidad	74
4.1.1.8. Proliferación celular	75
4.1.1.9. Análisis de la actividad bactericida	77
4.1.1.10. Determinación de la adhesión/invasión de <i>Listeria monocytogenes</i>	78
4.1.1.10.1. Ensayo de adhesión	
4.1.1.10.2. Ensayo de invasión	
4.1.1.11. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	79

4.1.1.12. Determinación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS).....	80
4.1.1.13. Determinación de la actividad de proteasomas	82
4.1.1.14. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN	82
4.1.1.15. Actividad de caspasa-3	84
4.1.2. Ensayos con LSTRA	85
4.1.2.1. Ensayos de supervivencia tras el trasplante con el linfoma murino LSTRA	85
4.1.2.2. Actividad de células natural killer (NK)	87
4.1.2.3. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de inhibidores de la fosfolipasa y ciclooxigenasa.....	88
4.2. Ensayos <i>in vitro</i>	90
4.2.1. Ensayos de viabilidad celular	90
4.2.1.1. Inhibidor de la fosfolipasa A ₂	
4.2.1.2. Inhibidor de la ciclooxigenasa	
4.2.1.3. Inhibidor de la lipooxigenasa	
4.2.2. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	92
4.2.3. Determinación de la actividad de proteasomas.....	92
4.2.4. Medición de la proliferación con Sytox-green	93
4.2.5. Análisis de la acumulación de triacilgliceroles con rojo nilo	94
4.2.6. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	95
4.2.7. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN	96
4.2.8. Actividad de caspasa-3	96
5. Discusión	98
5.1. Ensayos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	100
5.1.1. Ensayos de supervivencia tras una infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i>	100
5.1.2. Ensayos de supervivencia tras la infección experimental con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratamiento con N-acetyl-L-cysteina (NAC)	102
5.1.3. Recuperación de bacteria viables a partir de bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i>	103
5.1.4. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con N-acetyl-L-cysteina (NAC)	105
5.1.5. Viabilidad celular. Ensayo de citotoxicidad	106

5.1.6. Proliferación celular	107
5.1.7. Análisis de la actividad bactericida	108
5.1.8. Determinación de la adhesión/invasión de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	109
5.1.8.1. Ensayo de adhesión	
5.1.8.2. Ensayo de invasión	
5.1.9. Determinación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS)	110
5.1.10. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	111
5.1.11. Determinación de la actividad de proteasomas	112
5.1.12. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN.....	114
5.1.13. Actividad de caspasa-3	116
5.1.14. Ensayos de supervivencia tras el trasplante con el linfoma murino LSTRA.....	119
5.1.15. Actividad de células natural killer (NK)	120
5.1.16. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	121
5.2. Ensayos <i>in vitro</i>	122
5.2.1. Ensayos de viabilidad celular	122
5.2.1.1. Inhibidor de la fosfolipasa A ₂	
5.2.1.2. Inhibidor de la ciclooxigenasa	
5.2.1.3. Inhibidor de la lipooxigenasa	
5.2.2. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)	123
5.2.3. Determinación de la actividad de proteasomas.....	125
5.2.4. Medición de la proliferación con Sytox-green	126
5.2.5. Análisis de la acumulación de triacilgliceroles con rojo nilo	126
5.2.6. Determinación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS)	127
5.2.7. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN	127
5.2.8. Actividad de caspasa-3	128
6. Conclusiones	130
7. Bibliografía	133

I. Introducción

Numerosas investigaciones de tipo epidemiológico, clínico o experimental reflejan la estrecha interacción existente entre nutrición y sistema inmune (Klasing and Leihchinsky, 2000). Además, desde hace algún tiempo, diferentes estudios han sugerido que para el correcto desarrollo del sistema inmune, así como para su mantenimiento y óptima funcionalidad, es necesaria la administración de una dieta adecuada y equilibrada. Así, está ampliamente establecido que una deficiencia o por el contrario un exceso de determinados nutrientes puede afectar de manera adversa al número, actividad y función de las células del sistema inmune (Kelley, 2001; Marcos, 1997). De este modo, es generalmente asumido que muchas de las infecciones que afectan a determinados individuos de la población humana, están fuertemente asociadas a deficiencias nutricionales (Scrimshaw, 2003; Keusch, 2003; de Pablo *et al.*, 2000a; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000); siendo este hecho una de las causas más comunes responsables de procesos de inmunodeficiencia tanto en animales de experimentación como en humanos (Marcos, 1997, Chandra, 1996a).

Los nutrientes que ejercen un importante papel en la regulación de algunas funciones inmunes son **los ácidos grasos de la dieta**, proteínas, vitaminas (A, B6, B12, C y E) y minerales como el zinc, cobre, selenio, y hierro. Sin embargo van a ser las deficiencias de varios nutrientes, y no las asociadas a la ausencia de un solo nutriente, las que tengan una mayor influencia sobre la alteración de las funciones inmunes del individuo (Kelley, 2001).

1.1. DEFICIENCIAS LIPÍDICAS E INMUNIDAD

Clásicamente, los lípidos son sustancias cruciales para el individuo ya que poseen varias funciones: i) energéticas, los lípidos son una de las principales fuentes de energía para la célula, ii) estructurales, forman parte de los fosfolípidos que integran la membrana plasmática de la célula, iii) segundos mensajeros, participan como señalizadores intracelulares de vital importancia para la célula.

Por otra parte, como componentes esenciales de la dieta, **los lípidos** son sustancias a las que se les atribuye un profundo efecto en la **modulación del sistema inmune**.

Este argumento se ha demostrado en numerosos estudios que han investigado la influencia de los lípidos de la dieta sobre el sistema inmune (revisiones en de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000; Puertollano *et al.*, 2002; Puertollano and de Pablo, 2002; Calder *et al.*, 1998a). Basado en esta hipótesis, en la década de los años 80, un estudio epidemiológico reveló la baja incidencia de enfermedades autoinmunes en esquimales de Groenlandia, población que se caracteriza por consumir en su dieta elevadas cantidades de pescado (Kromann and Green, 1980). Paralelamente, otros estudios experimentales demostraron que las dietas ricas en aceite de pescado modulan algunas de las funciones del sistema inmune (Calder, 1995; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000; Wu and Meydani, 1998; Endres *et al.*, 1989). Del mismo modo, otras investigaciones establecieron que diferentes grasas, administradas en la dieta de humanos o animales o bien cultivos celulares incubados en presencia de ácidos grasos libres participan de manera activa en la modulación de las funciones inmunes (Jeffery *et al.*, 1996a; de Pablo *et al.*, 1998a; de Pablo *et al.*, 1998b; Calder *et al.*, 1994). Dicha modulación supone una alteración de diferentes funciones del sistema inmune como: **reducción de la proliferación de linfocitos, reducción en la síntesis y liberación de citoquinas, incremento de la actividad fagocítica, modificación de la actividad de las células natural killer (NK), alteración en la producción de anticuerpos, alteración de receptores de superficie, etc** (de Pablo *et al.* 2000; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000).

1.2. ÁCIDOS GRASOS: DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA. FAMILIAS LIPÍDICAS.

Antes de introducirnos en los efectos que algunos ácidos grasos ejercen sobre el sistema inmune es importante comentar qué son los ácidos grasos. Los ácidos grasos se pueden definir como compuestos formados por cadenas hidrocarbonadas que presentan un grupo carboxilo. Estas sustancias son clasificadas atendiendo a su grado de saturación (ausencia de dobles o triples enlaces en la molécula), o insaturación (presencia de dobles o triples enlaces). De este modo, los ácidos grasos se dividen en: i) **ácidos grasos saturados**, los que no presentan dobles enlaces, y ii) **ácidos grasos insaturados**. Estos últimos a su vez se subdividen en i) **ácidos grasos monoinsaturados** (constan de un único enlace doble), y ii) **ácidos grasos poliinsaturados** (con múltiples dobles enlaces).

Dentro de los ácidos grasos insaturados, existen tres familias muy importantes que son: ácidos **grasos de la serie n-3, de la serie n-6 y de la serie n-9**, denominados así en función de la posición y del número de dobles enlaces. Todos ellos se caracterizan por la existencia de compuestos con un número variable de dobles

enlaces. Como ejemplo de ácidos grasos importantes podemos destacar: ácido eicosapentaenoico (20: 5n-3), ácido docosahexaenoico (22, 6n-3), ácido linolénico (18: 3n-3), ácido araquidónico (20: 5n-6), ácido linoleico (18: 3n-6), ácido oleico (18: n-9), ácido esteárico (18:0), ácido palmítico (16:0), etc.

Los ácidos grasos procedentes de animales suelen ser de naturaleza saturada en mayor proporción que los ácidos grasos procedentes de vegetales, los cuales son principalmente de naturaleza insaturada.

Algunos ácidos grasos son esenciales para el organismo, esto quiere decir que estos no pueden ser sintetizados *de novo* a partir de otros preexistentes. Dentro de este grupo se encuentran, el ácido linolénico (perteneciente a la serie *n*-3) y el ácido linoleico (perteneciente a la serie *n*-6).

El carácter esencial de los ácidos grasos fue descubierto en el año 1929 por Burr and Burr, estos autores señalaron que las carencias en el organismo de estos ácidos grasos pueden dar lugar a la aparición de graves patologías, tales como afecciones en la piel, crecimiento anormal, etc. Se estima que las recomendaciones mínimas de ingesta de los ácidos grasos esenciales es del 1% diario del total de la dieta; deficiencias en estas cantidades durante un periodo de 6 a 8 semanas dan lugar a la aparición de patologías severas como son: crecimiento anormal, alteraciones dermatológicas (eczema, alopecia y uñas frágiles), infertilidad, problemas renales (necrosis papilar, hematuria e hipertensión), funcionamiento anormal del hígado, incremento de la susceptibilidad a las infecciones, decrecimiento de la contractilidad cardíaca y fragilidad de los eritrocitos que conduce a la hemólisis osmótica.

En ausencia de ácidos grasos esenciales de las series *n*-3 y *n*-6, el organismo puede sustituirlos por ácidos grasos de la serie *n*-9, cuyo principal representante es el ácido oleico, aunque a partir de éste no se pueden sintetizar eicosanoides. Estas sustancias son moléculas complejas derivadas del metabolismo del ácido dihomo- γ -linolénico, del ácido araquidónico y del ácido eicosapentanoico. Esta familia de compuestos oxigenados derivados de los ácidos grasos citados anteriormente, son los precursores de las prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanos (Tx), lipoxinas (Lx), ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HEPES) y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETES). Todos estos compuestos están implicados en numerosos procesos que afectan a la regulación del sistema inmune, a los cuales nos referiremos posteriormente.

1.3. CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS

La cantidad, la naturaleza de los ácidos grasos, y el tiempo de exposición a dichas sustancias, presentes en los aceites contenidos en la dieta y en forma de ácidos

grasos libres en cultivos celulares; van a ser tres puntos esenciales que junto a otros como el sexo, edad y la especie utilizada en los estudios; constituirán importantes aspectos a tener en cuenta en el proceso de modulación del sistema inmune llevado a cabo por dichas sustancias. Algunos mecanismos implicados en la modulación del sistema inmune por los ácidos grasos, son:

- Alteración en la fluidez de la membrana plasmática.
- Peroxidación de los lípidos presentes en la membrana citoplasmática.
- Regulación de los productos derivados del ácido araquidónico o del ácido eicosapentaenoico, como son los eicosanoides.
- Interacción directa con los procesos de la activación celular, mediante interferencia con la expresión genética.

Posiblemente, el proceso de inmunomodulación ocurra no sólo por la acción individual de uno de estos factores, sino mas bien por la actuación conjunta de varios de ellos (de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000). Seguidamente se describirán con mayor detalle cada uno de estos factores.

1.3.1. Mecanismos de acción de los ácidos grasos para modular el sistema inmune

1.3.1.1. Alteración de la fluidez de membrana

Los ácidos grasos son componentes esenciales de la membrana plasmática de las células. De éste modo, es obvio que una alteración en la composición de lípidos provoque cambios en la funcionabilidad de la membrana (Anel *et al.*, 1990a). La adición de ácidos grasos al medio de cultivo, o bien la manipulación de los ácidos grasos suministrados en la dieta, provoca la modificación en la composición de los fosfolípidos de membrana (Anel *et al.*, 1990b; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000; Clamp *et al.*, 1997). Por lo tanto dichas moléculas van a ser fuertemente influenciadas por los tipos de lípidos presentes en la dieta (Yaqoob *et al.*, 1995; Chapkin and Carmichael, 1990).

Los cambios en la composición de los lípidos de la membrana plasmática tienen importantes consecuencias, ya que también se alteran sus características estructurales: inducen cambios en la fluidez de la membrana (Anel *et al.*, 1990a), alteran la actividad de proteínas asociadas a membrana, como receptores celulares, canales de iones, proteínas con función enzimática, etc (Hwang, 1989). Como resultado de esto se altera la unión de citoquinas a sus receptores y por tanto la

señal intracelular que llevará a la célula a ejecutar una respuesta (Stubbs and Smith, 1984; Grimble and Tapia, 1995). Las funciones específicas de los macrófagos también se modifican por los lípidos, debido a cambios en la fluidez de membrana. De hecho, la incorporación de ácidos grasos insaturados se asocia con un incremento en la fagocitosis de partículas de zymosan, existiendo una fuerte correlación entre la fagocitosis y la naturaleza de los fosfolípidos de membrana (Calder *et al.*, 1990). También en cultivos *in vitro* de linfocitos estimulados con mitógenos la adición de ácidos grasos saturados, como el palmítico o el esteárico, provoca una disminución en la fluidez de membrana, mientras que los ácidos grasos insaturados incrementan dicha fluidez (Calder *et al.*, 1994; Peck, 1994).

En cuanto a las proteínas de superficie de la célula, existen investigaciones en las cuales se comprueba que la falta de expresión de las mismas en la superficie celular podría deberse principalmente al desplazamiento vertical de las proteínas de membrana por acción de los lípidos (Muller *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 1996a). Pero por el contrario, también existen otras investigaciones en las que se demuestra que existe un incremento en la expresión de determinadas proteínas de membrana cuando las células son incubadas con ciertos ácidos grasos (Hughes *et al.*, 1996b). Dentro de este capítulo cabe destacar los denominados recientemente «raft» de lípidos (o también denominados microdominios lipídicos) que se pueden definir como microambientes dinámicos en los fosfolípidos de la membrana exoplásmica. Los microdominios lipídicos están caracterizados por una alta concentración de colesterol y esfingolípidos (esfingomielina y glucolípidos), así como residuos de ácidos grasos saturados. Diferentes tipos de proteínas con funciones de transmisión de señales son comúnmente encontradas en los «raft» de lípidos y algunas de estas proteínas se encuentran unidas al ácido palmítico. La distribución de los «raft» de lípidos sobre la superficie de la célula depende del tipo celular, pero en general la superficie membranosa que rodea a un «raft» de lípidos está compuesta por gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y por consiguiente es relativamente fluida. Una de las funciones más importantes de los «raft» de lípidos es la de servir como plataformas lipídicas que faciliten la asociación de moléculas señalizantes y las interacciones entre los diferentes tipos de células. Uno de los métodos empleados para la desestabilización de los «raft» de lípidos es la adición exógena de ácidos grasos poliinsaturados que conducen a la sustitución del ácido palmítico de las proteínas y la disociación de estas de los «raft» de lípidos. Hasta el momento se ha concluido que la alteración de estos microdominios lipídicos por ácidos grasos poliinsaturados modifican la función de las proteínas, lo cual puede ser una de las posibles causas responsables del efecto inmunosupresor de algunos ácidos grasos (Stulnhig *et al.*, 2001; Yaqoob, 2003a; Yaqoob, 2003b).

1.3.1.2. Formación de peróxidos lipídicos.

La presencia de dobles enlaces típicos de los ácidos grasos insaturados, hace que dichas moléculas sean sensibles a la peroxidación. Los lípidos peroxidados son sustancias tóxicas para las células (Horrobin, 1990). Basándonos en esto, se podría afirmar que el efecto inhibitorio que los ácidos grasos insaturados tienen sobre el proceso de proliferación de linfocitos podría estar asociado a la formación de peróxidos tóxicos.

Sin embargo existen algunas referencias en las que al añadir sustancias antioxidantes (que evitan la formación de lípidos peroxidados) a los cultivos celulares los procesos oxidativos de los lípidos no afectan a los procesos de proliferación celular (Calder and Newsholme, 1993; Soyland *et al.*, 1993a). Estos autores llegan a la conclusión de que los ácidos grasos insaturados inhiben el proceso de linfoproliferación a través de un mecanismo independiente de la peroxidación lipídica.

Pero por el contrario, existen otras investigaciones en las que se destaca la importancia de los procesos de peroxidación y su incidencia sobre distintas patologías como por ejemplo cáncer, artritis, aterogénesis y procesos inflamatorios. Estas enfermedades son menos frecuentes en aquellos países en los que la dieta Mediterránea tiene más relevancia, relacionándose este hecho con la presencia de componentes antioxidantes como son las vitaminas C y E, carotenos y polifenoles, procedentes de los productos que integran dicha dieta (Galli *et al.*, 1994).

1.3.1.3. Síntesis de eicosanoides.

Uno de los puntos de mayor influencia en la regulación del sistema inmune, por parte de los ácidos grasos, es el papel que juegan los eicosanoides en estos procesos (Godwin and Ceuppens., 1983).

La regulación del sistema inmune por parte de los eicosanoides va depender principalmente de los niveles de ácido araquidónico presente en la membrana plasmática de las células (endógeno) y de los niveles de dicho ácido suministrado por la dieta (exógeno).

Los metabolitos derivados del ácido araquidónico se dividen en dos grupos:

1. Productos derivados de la ruta de la ciclooxigenasa.

Esta enzima utiliza el ácido araquidónico como sustrato y da lugar a la producción de prostaglandinas, como por ejemplo la prostaglandina de la serie E₂. Dichos derivados van a tener importantes funciones en procesos como:

- Disminución de la proliferación de linfocitos T (Goodwin *et al.*, 1978)

- Producción de linfoquinas (Calder and Newsholme, 1992a; Calder and Newsholme, 1992b)
- Generación de células citotóxicas (Roder and Klein, 1979)
- Disminución de la actividad de las células NK (Yaqoob *et al.*, 1994a)

2. Productos derivados de la ruta de la lipooxigenasa.

Esta enzima utiliza el ácido araquidónico como sustrato para la producción de leucotrienos, ácido 15-hidroxieicosatetraenoico (15-HETE) y lipoxinas (Lx). De todas estas sustancias, va a ser el leucotrieno de la serie B₄ el más activo desde el punto de vista inmunológico, ya que posee propiedades proinflamatorias induciendo:

- Incremento en los niveles de las llamadas interleuquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF) (James *et al.*, 2000)
- Aumento de la proliferación de linfocitos (Rola-Pleszczinski *et al.*, 1983).
- Sin embargo se ha comprobado que el leucotrieno de la serie B₄ no afecta a la actividad de las células NK (Bray and Brahmi, 1986).
- Por el contrario las lipoxinas si se han mostrado eficaces en la reducción de la actividad de las células NK (Ramstedt *et al.*, 1985).

1.3.1.4. Regulación de la expresión de genes.

Además de la participación de los ácidos grasos en la regulación de la síntesis de eicosanoides, y por tanto de manera indirecta, en la modulación de las señales intracelulares; también dichas sustancias pueden intervenir de forma directa en tal regulación, ya que los ácidos grasos liberados de la membrana plasmática de las células y acumulados en el citosol, pueden actuar como segundos mensajeros y por tanto activar o inactivar ciertos factores de transcripción implicados en la expresión de determinados genes encargados de la producción de proteínas relacionadas con la respuesta celular a un determinado estímulo.

Algunos fosfolípidos de membrana como fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PI), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS), por acción de fosfolipasas se hidrolizan dando lugar a la generación de segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol-1,4,5 trifosfato (IP₃). Va a ser el DAG el encargado de la activación de la proteína intracelular protein quinasa C (PKC), responsable de las señales de transducción (Miles and Calder, 1998). El IP₃, actuando sobre los depósitos intracelulares de Ca²⁺, va a producir un rápido incremento citosólico de dicho ión, el cual se une a una proteína llamada calmodulina. Los complejos calcio-calmodulina

activan diversos enzimas importantes para la activación de los factores de transcripción.

Debido a la importancia de las señales de la PKC y del Ca^{2+} para la activación de las células, se puede afirmar que alteraciones a nivel de los fosfolípidos de membrana, bien por modificaciones de los lípidos de la dieta o bien por modificaciones en los lípidos presentes en los medios de cultivo en ensayos *in vitro*, conducen a una marcada alteración de las propiedades de los segundos mensajeros liberados, así como de sus funciones en las señales de transducción en el interior celular de linfocitos (Huang and Fritsche, 1992) y de macrófagos (Marignani and Sebaldt, 1995).

Pero además del efecto que los ácidos grasos puedan tener sobre la composición de los fosfolípidos, también las moléculas que actúan como segundos mensajeros se van a ver afectadas por la acción de enzimas como las fosfolipasas, cuya actividad va a estar influenciada por la presencia de ciertos ácidos grasos como los poliinsaturados de la serie *n*-3, los cuales disminuyen la actividad de dichas enzimas más eficientemente que otros ácidos grasos como los poliinsaturados de la serie *n*-6 (Kishimoto *et al.*, 1980; Bell and Sargent, 1987; Jolly *et al.*, 1997; Marignani and Sebaldt, 1995).

Otros estudios han indicado también que los ácidos grasos por si mismos pueden tener un efecto directo en las rutas de señalización intracelular (Sumida *et al.*, 1993), aunque este efecto modulador directo ha sido más extensivamente documentado en relación a la actividad *in vitro* de la PKC (Shinomura *et al.*, 1991).

Los linfocitos y otras células del sistema inmune, poseen una serie de factores de transcripción como por ejemplo: factor nuclear kappa B (NFκB), factor nuclear de células T activadas, proteína activadora-1 (AP-1), receptores específicos de ciertas interleuquinas (NF-IL-2; NF-IL-6; etc). De todos ellos, es el NFκB el más estudiado. Este tiene importantes funciones en la regulación del sistema inmune, entre otras podemos destacar la regulación de la síntesis de citoquinas entre las que se incluyen la IL-1, IL-2, IL-6, TNFα y el interferon-β; síntesis de receptores de citoquinas como IL-2R; síntesis de moléculas de adhesión (CD54, CD62E), y síntesis de enzimas implicados en la generación de mediadores (Kopp and Ghosh, 1995). NFκB es activado mediante fosforilación y disociación de una de sus subunidades llamada subunidad inhibitoria kappa B. El dímero que queda libre es traslocado directamente al núcleo donde se une de forma directa a los genes diana sobre los que actúa (Figura 1).

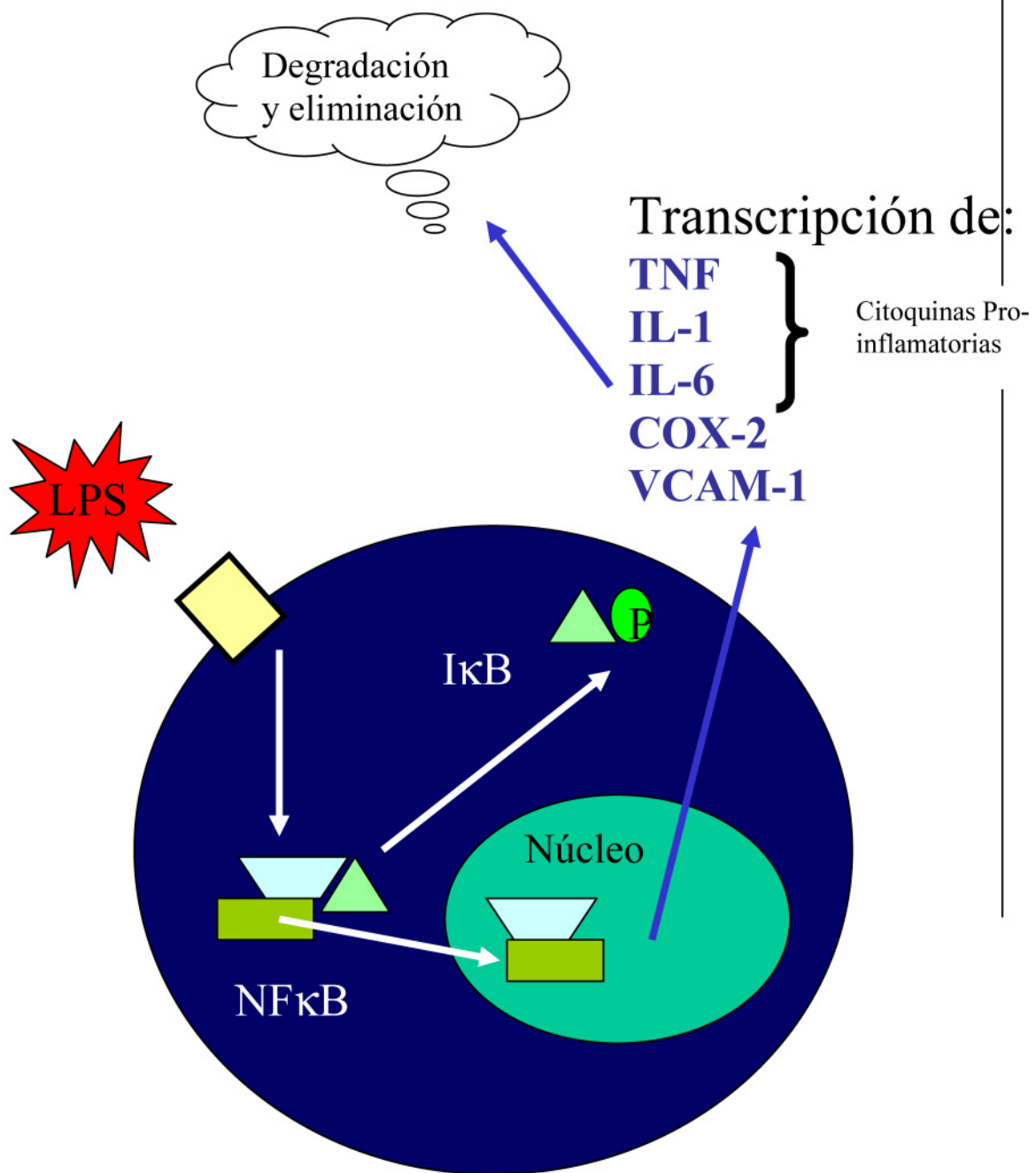


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción de la expresión de genes encargados de la producción de proteínas inflamatorias mediante la activación del factor nuclear κB (NF- κB). NF- κB =factor nuclear κB ; I κB = inhibidor del factor nuclear κB ; LPS= lipopolisacárido; TNF= factor de necrosis tumoral; IL-1= interleuquina-1; IL-6= interleuquina-6; COX-2= ciclooxigenasa-2; VCAM-1= molécula de adhesión vascular-1.

Como se ha comprobado con anterioridad, los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 son capaces de reducir la actividad de enzimas tan importantes como la PKC, los cuales van a ser los responsables de la formación de segundos mensajeros como el DAG y el IP₃. Estos a su vez activan al factor de transcripción para que se una a la secuencia genética responsable de la síntesis de proteínas encargadas de la activación celular. Cuando la actividad de las quinasas responsables de la liberación de segundos mensajeros está disminuida, la cantidad de DAG y de IP₃ en el citosol celular también se reduce. Esto se traduce en una menor actividad de los factores de transcripción y por tanto una menor síntesis de proteínas de activación celular: disminución de la síntesis de citoquinas, de receptores de citoquinas, de moléculas de adhesión, etc (Miles and Calder, 1998).

Sin embargo existen otros estudios en los que sus autores demuestran que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 pueden producir el efecto contrario sobre otros factores de transcripción presentes en la célula. Entre dichos factores se encuentra el receptor PPAR (receptor activado por proliferadores peroxisomales), cuya actividad se ve incrementada por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Jump *et al.*, 1996; Schoonjans *et al.*, 1996). En este sentido se ha demostrado recientemente que los derivados del ácido araquidónico son ligandos del receptor PPAR; así el leucotrieno B₄ se une a PPAR α (Devchand *et al.*, 1996), y la prostaglandina J₂ lo hace a PPAR γ (Forman *et al.*, 1995), demostrando así la existencia de un mecanismo por el cual los ácidos grasos poliinsaturados pueden directamente afectar la actividad de estos factores de transcripción.

1.3.2. Funciones del sistema inmune moduladas por los ácidos grasos.

Existen estudios en los que se demuestran los efectos que sobre las funciones de las células del sistema inmune ejercen el tipo y la cantidad de ácidos grasos contenidos en la dieta o bien en los medios de cultivo celulares. Entre los procesos sobre los que actúan, se encuentran: proliferación de linfocitos, producción de citoquinas, actividad de las células NK, actividad fagocítica, producción de anticuerpos, presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos, etc. Pero no todos los lípidos son capaces de modular la respuesta inmune, o al menos no todos ejercen los efectos inmunomoduladores que se describen a continuación de una forma similar. De éste modo los ácidos grasos insaturados son más inmunosupresores que los ácidos grasos saturados (Calder, 1995), y los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3, contenidos en el aceite de pescado de forma mayoritaria, son los más inmunosupresores. Entre estos últimos se encuentra el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, que han demostrado llevar a cabo una supresión crucial de las funciones inmunes. Sin embargo también el ácido

oleico (ácido graso monoinsaturado perteneciente a la familia de los *n*-9, componente mayoritario del aceite de oliva) se ha demostrado que ejerce funciones inmunomoduladoras (Jeffery *et al.*, 1996b; de Pablo *et al.*, 1998a; de Pablo *et al.*, 1998b, Yaqoob, 2002).

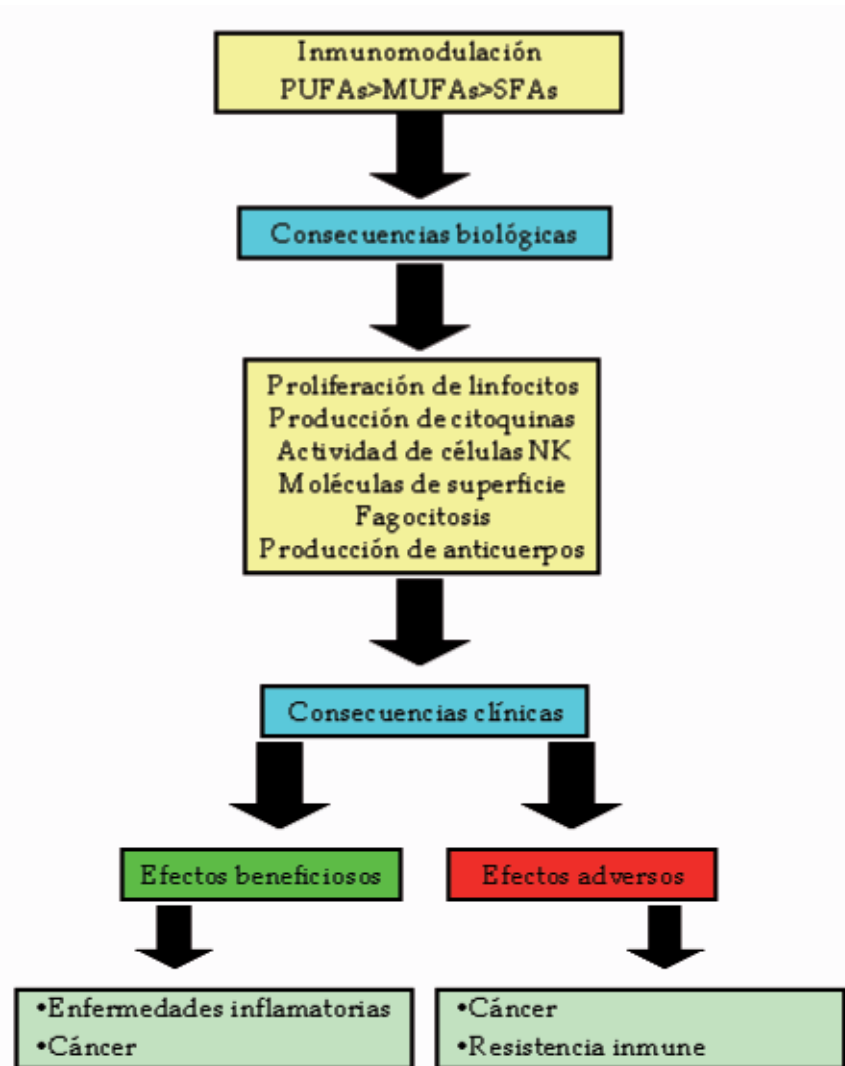


Figura. 2. Representación esquemática de las consecuencias biológicas y clínicas inducidas por la administración de dietas lipídicas. PUFAs, ácidos grasos poliinsaturados; MUFAs, ácidos grasos monoinsaturados; SFAs, ácidos grasos saturados.

1.3.2.1. Influencia de los ácidos grasos en la proliferación de linfocitos.

La proliferación de linfocitos es uno de los parámetros inmunológicos más estudiados, ya que determinados ácidos grasos son capaces de reducir la linfoproliferación.

Para la activación de los linfocitos, es necesaria la existencia de un estímulo. Una de esas señales puede proceder de los mitógenos que poseen la propiedad de generar una activación policlonal. Los mitógenos más frecuentemente utilizados son: concanavalina A (Con A) y fitohemaglutinina (PHA), los cuales estimulan de manera específica a los linfocitos T; lipopolisacárido bacteriano (LPS) procedente de la pared celular de bacterias gram negativas, el cual actúa específicamente sobre los linfocitos B; y pokeweed mitogen (PWM) que activa a ambas poblaciones de linfocitos (T y B).

Algunos estudios han demostrado la eficacia de los ácidos grasos insaturados en la reducción de la proliferación de linfocitos T. Tales estudios se han llevado a cabo tanto en animales de experimentación como en humanos alimentados con dietas lipídicas, o bien en cultivos celulares incubados en presencia de ácidos grasos libres. De estos estudios se concluye que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como ácido eicosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, suprimen la respuesta proliferativa de los linfocitos a los mitógenos más fuertemente que las dietas ricas en ácidos grasos saturados (Calder, 1995). Sin embargo, otros ácidos grasos como el oleico (perteneciente a la familia de los monoinsaturados), también va a jugar un papel muy importante en este proceso (de Pablo *et al.*, 1998a). Aunque el ácido oleico está implicado en procesos de inmunoregulación, el efecto de este ácido graso sobre la proliferación de linfocitos va a ser menor que el ejercido por los ácidos grasos *n*-3, como el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, ambos importantes constituyentes del aceite de pescado (Calder, 1995). Los linfocitos de animales alimentados con dietas ricas en aceite de oliva, poseen una menor actividad proliferativa que aquellos que han sido alimentados con dietas ricas en otros tipos de grasas como aceite de girasol o aceite de coco. Pero esta reducción va a ser menor que la encontrada en aquellos animales alimentados con dietas ricas en aceite de pescado (de Pablo *et al.*, 1998a).

Si tenemos en cuenta que dentro de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico son los más activos en cuanto a la reducción en la proliferación de linfocitos; un estudio importante ha examinado los efectos de una dieta rica en ácido docosahexaenoico (en ausencia de ácido eicosapentaenoico) sobre la respuesta inmunológica de humanos voluntarios. Dicho estudio revela que el consumo de ácido docosahexaenoico no inhibe ciertas funciones del sistema inmune modificadas tras la administración de una dieta rica en aceite de pescado (Kelley *et al.*, 1998). Este hecho indica que una dieta rica en aceite de pescado altera la respuesta inmune debido principalmente a la acción del ácido eicosapentaenoico más que al ácido docosahexaenoico. Esta investigación sugiere que es necesario encontrar el componente lipídico, responsable

de la alteración de las funciones inmunes, en cada una de las dietas constituidas por diferentes ácidos grasos.

El efecto de los lípidos de la dieta sobre la proliferación de linfocitos no solo depende del tipo de ácido graso, sino también de otros factores como las subpoblaciones de linfocitos analizadas, la cantidad de ácidos grasos empleados y en caso de ensayos *in vitro*, del tipo de suero utilizado en el medio de cultivo celular.

En referencia a las subpoblaciones de linfocitos analizadas, existen estudios en los que se demuestra que hay diferencias significativas entre la supresión de linfocitos encontrados en bazo y la supresión observada en los linfocitos de timo de ratas, la cual es mucho menor (Yaqoob *et al.*, 1994b).

Pero los lípidos no solo van a afectar a la composición de los linfocitos que recirculan por el sistema linfático sino que también se va a ver alterada su función inmunológica (Jeffery *et al.*, 1998). Estudios *ex vivo* han sugerido que el efecto de los ácidos grasos sobre el sistema inmune va a ser dependiente de la concentración a la que se empleen dichas sustancias. Respecto a este factor existen diferentes investigaciones en las que se demuestra que la reducción observada en la proliferación de los linfocitos se debe principalmente a la utilización de elevadas concentraciones de ácidos grasos insaturados de las series *n-3* o *n-9* (de Pablo *et al.*, 1998a; Jeffery *et al.*, 1996a; Endres *et al.*, 1989; Yaqoob *et al.*, 1994b; Meydani *et al.*, 1991). De forma preliminar se especulaba que los efectos cuantificados en los animales alimentados con dietas que contenían una elevada concentración de aceite de oliva, podían ser debidos tanto a la acción del ácido oleico como a los otros componentes minoritarios del aceite de oliva. Sin embargo, un importante artículo ha sugerido que los efectos inmunosupresores del aceite de oliva incorporado a las dietas están relacionados principalmente con la acción del ácido oleico más que a la acción de los otros componentes minoritarios que forman parte del aceite de oliva (Jeffery *et al.*, 1996b).

A pesar de todo lo anteriormente descrito y en referencia a la acción de la concentración de los ácidos grasos sobre el sistema inmune, existen resultados contradictorios. Así, algunos estudios llevados a cabo *in vitro* demuestran una similar reducción en la proliferación de los linfocitos llevada a cabo por el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico (ambos pertenecientes a la familia de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n-3*) (Jolly *et al.*, 1997). Estos resultados que en principio son discrepantes con respecto a otros existentes, se deben al suero utilizado en el medio de cultivo celular (Yaqoob *et al.*, 1994b; Yaqoob *et al.*, 1995); ya que los resultados expuestos anteriormente se han evidenciado cuando las células son cultivadas en suero autólogo de rata (Jeffery *et al.*, 1996a); sin embargo cuando las células son incubadas en presencia de suero bovino fetal aparecen resultados contradictorios (Berger *et al.*, 1993).

1.3.2.2. Efectos de los ácidos grasos sobre la producción de citoquinas.

La activación del sistema inmune como consecuencia de un proceso infeccioso, lleva asociado el desarrollo de una serie de alteraciones a nivel metabólico. Ambos fenómenos están muy relacionados y se encaminan a la consecución del principal objetivo que es eliminar el organismo invasor.

Durante la activación del sistema inmune, las células que forman parte del sistema inmune liberan al exterior celular una serie de mediadores solubles (Dinarello, 1988; Beutler and Cerami, 1986; Heinrich *et al.*, 1990; Grimbale, 1998). Entre estos se encuentran las citoquinas, que son un grupo de péptidos y proteínas que están implicados en la señalización intercelular dentro del sistema inmune, y en la modificación del metabolismo. Dentro del grupo de las citoquinas se engloban diferentes moléculas como interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de crecimiento (TGF), factores estimuladores de colonias y factor de necrosis tumoral (TNF).

Un grupo de tres citoquinas, IL-1, IL-6 y TNF- α (denominadas también citoquinas proinflamatorias), no solamente van a llevar a cabo las funciones típicas de estas proteínas, sino que también son mediadores cruciales en el desarrollo de la inflamación. Estas citoquinas pueden ser liberadas por una gran cantidad de células del sistema inmune como: fagocitos, linfocitos T y B, células endoteliales, etc. Una vez que la liberación de IL-1 y TNF es inducida, se estimula la producción de otras citoquinas y de IL-6; es decir, se produce una cascada de citoquinas proinflamatorias que tienen lugar tras el estímulo inicial.

La producción de citoquinas puede ser modulada por diferentes factores entre los que se encuentran los ácidos grasos. Anteriormente se ha descrito que algunos ácidos grasos reducen la proliferación de linfocitos. Dicha alteración linfocitaria parece estar relacionada con la disminución en la producción de citoquinas debido a la presencia de lípidos. Esta hipótesis se basa en el estudio llevado a cabo por Soyland *et al.*, el cual encontró que los ácidos grasos de cadena larga de la serie *n*-3 reducen el proceso de síntesis y liberación de citoquinas debido a una inhibición en la expresión del receptor de superficie CD25, receptor de la IL-2 (Soyland *et al.*, 1994. de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000). Sin embargo, algunos estudios afirman que los mecanismos mediante los cuales los ácidos grasos *n*-3 ejercen su función sobre el sistema inmune permanecen aun sin aclarar.

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, la IL-1 y TNF son importantes mediadores en el proceso inflamatorio. Tomando como base este argumento, existen datos que demuestran que una dieta rica en ácidos grasos de la serie *n*-3 es capaz de reducir la acción de las citoquinas pro-inflamatorias y por lo tanto de disminuir la inflamación (Endres, 1996; de Pablo *et al.*, 1998b; de Pablo and Álvarez de

Cienfuegos, 2000; Grimble, 1998). Estos resultados se relacionaron con la dieta ya que cuando ésta era suprimida, los niveles de estas sustancias biológicas retornaron a valores basales (Endres *et al.*, 1989; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000). Estos resultados contradictorios referentes a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Endres, 1996; de Pablo *et al.*, 1998b; Hardardottir *et al.*, 1991; Blok *et al.*, 1992; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000) pueden tener su explicación si atendemos a las diferentes acciones que los distintos ácidos grasos tienen sobre las poblaciones celulares de varias especies (Blok *et al.*, 1996; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000). Los mecanismos implicados en la síntesis de citoquinas permanecen aun sin resolver, pero adquiere una gran importancia el hecho que la alteración de este factor se lleva a cabo a nivel transcripcional, es decir por acción de los ácidos grasos se produce una reducción en la síntesis de ARNm que codifica para las diferentes citoquinas (Robinson *et al.*, 1996).

Estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que los efectos de los ácidos grasos sobre la producción de citoquinas procedentes de macrófagos van a ser diferentes y dependen de diversos factores como duración de la administración de la dieta, especies animales que intervienen en el estudio, tipo y estado de activación de los macrófagos, etc. Un ejemplo de lo anteriormente expuesto es el siguiente: la producción de IL-1 tras la administración durante cuatro semanas de una dieta rica en aceite de pescado o en aceite de oliva, se ve disminuida. Mientras que tras ocho semanas de administración de una dieta rica en aceite de oliva, la producción de IL-1 se incrementa (Tappia and Grimble, 1994; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000).

Sin embargo en la regulación de la respuesta inmune por ácidos grasos no sólo es importante la alteración a nivel de las citoquinas pro-inflamatorias, sino que también es relevante la modulación en la producción de otras citoquinas. Por ejemplo, la IL-10 suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por LPS. Esto queda suficientemente demostrado en un estudio en el cual se observa la baja producción de TNF en ratones alimentados con una dieta rica en aceite de coco, mientras que la producción de IL-10 se ve incrementada (Sadeghi *et al.*, 1999; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000).

En estudios *in vivo* se ha demostrado que los animales alimentados con una dieta que contenía aceite de pescado e infectados con *Listeria monocytogenes*, presentaban en suero mayor cantidad de IFN- γ que aquellos animales alimentados con otro tipo de grasa (Fritsche *et al.*, 1997). Pero en estudios *in vitro* no se han demostrado cambios significativos en la producción de esta citoquina. Esta discrepancia puede ser explicada por la reducción que sufre la expresión del receptor para esta citoquina en las células procedentes de animales alimentados con dietas ricas en ácidos

grasos de la serie *n*-3 (Feng *et al.*, 1999; de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000).

1.3.2.3. Modulación de la actividad de las células natural killer por acción de los ácidos grasos.

Las células NK, son un tipo de linfocitos que se encuentran de forma prioritaria en sangre y en bazo. Estas células del sistema inmune tienen como función eliminar células invadidas por virus o bien células transformadas. Clásicamente se ha determinado que las células NK pertenecen a la inmunidad natural del individuo y no a la específica, ya que no necesitan ser activadas por ningún antígeno específico, y además no están restringidas por el MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). Otra característica de este tipo de células del sistema inmune, es que su actividad va declinando con la edad, tanto en humanos como en animales de experimentación (Penschow and Mackay, 1980; Kiessling *et al.*, 1975), siendo este hecho importante a la hora de la realización de los estudios acerca de la actividad de dichas células.

Aunque no existe un número considerable de investigaciones basadas en el estudio de la influencia de los ácidos grasos en la actividad de las células NK, si se ha demostrado que existe una relación inversamente proporcional entre el contenido graso de la dieta y la actividad de las células NK; es decir, la disminución en el total del contenido graso ingerido en la dieta incrementa la actividad de las células NK (Barone *et al.*, 1989); este hecho indica que los lípidos de la dieta modulan la actividad de las células NK (Yamashita *et al.*, 1991; Meydani, 1991), al igual que ocurre con otras células del sistema inmune.

Varios estudios han demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 son los que ejercen mayor efectividad sobre la actividad de las células NK. Es decir, conforme incrementa el consumo de aceites ricos en ácidos grasos de la serie *n*-3, disminuye la actividad de las células NK (Meydani *et al.*, 1988; Yaqoob *et al.* 1994a; Jeffery *et al.*, 1997). Por consiguiente, un consumo desproporcionado de aceites ricos en ácidos grasos de la serie *n*-3 puede producir efectos perjudiciales para el individuo ya que disminuye la capacidad de eliminar células invadidas por virus o bien células tumorales. Pero por otra parte puede ser beneficioso para incrementar las probabilidades de éxito en el caso de un transplante de órgano (Hogan, 1992).

Yaqoob *et al.* describieron en un estudio llevado a cabo en animales de experimentación alimentados con diferentes dietas lipídicas, que los valores más bajos de actividad de NK aparecían en células de animales que habían sido alimentados con una dieta rica en aceite de pescado. Este hecho podría ser debido

a que el aceite de pescado está compuesto en gran parte por ácidos grasos de la serie $n-3$, que como se había señalado con antelación van a ser los que lleven a cabo una mayor acción supresora sobre la actividad de las células NK (Yaqoob *et al.*, 1994a). Estos resultados confirmaron otros ya existentes dentro de este mismo campo (Meydani, 1991). El potente efecto inhibitorio de las dietas ricas en aceite de pescado sobre la actividad de las células NK, no fue del todo sorprendente, pues ya había sido sugerido por Yamashita *et al.*, los cuales llegaron a dicha conclusión mediante la realización de estudios *in vitro* con triglicéridos (Yamashita *et al.*, 1991); pero lo realmente novedoso en el estudio del equipo de Calder fue el efecto modulador del aceite de oliva, el cual también es capaz de disminuir la actividad de las células NK aunque con una menor eficiencia que el aceite de pescado (Yaqoob *et al.*, 1994a). Sin embargo, nuestros estudios han demostrado que el aceite de oliva no altera la actividad de células NK (Puertollano *et al.*, 2001a). De hecho, un interesante estudio llevado a cabo en humanos alimentados con una dieta que contenía aceite de oliva demostró que esta grasa no ejerce ningún efecto sobre la actividad de células NK (Yaqoob *et al.*, 1998).

Los mecanismos mediante los cuales los lípidos de la dieta, que contienen diferentes ácidos grasos, ejercen diversas acciones sobre las células NK no son del todo conocidos aunque parecen estar mediados por la síntesis de eicosanoides.

Además de los estudios sobre células NK y ácidos grasos llevados a cabo en animales de experimentación, también existen otros realizados en humanos si bien estos son menos numerosos. En uno de ellos Kelley *et al.* examinan el efecto que tiene la ingesta prolongada de ácido docosahexaenoico en ausencia de ácido eicosapentaenoico, ambos principales ácidos grasos del aceite de pescado, sobre ciertas funciones del sistema inmune; entre ellas; la actividad de las células NK. Así en este estudio se demuestra que el ácido docosahexaenoico tiene funciones inhibitorias sobre la actividad de las células NK, aunque no es el más potente y selectivo inhibidor presente en el aceite de pescado (Kelley *et al.*, 1998). Respecto a estos dos ácidos grasos (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico) también existen estudios contradictorios en los que se demuestran que dentro del aceite de pescado es el ácido eicosapentaenoico el ácido graso responsable de la disminución de la actividad de las células NK en aquellos individuos alimentados con una dieta rica en aceite de pescado (Thies *et al.*, 2001). Este estudio también está confirmado por otra investigación en la cual el consumo de una dieta que contenía un 4,4%, del total de lípidos, de ácido eicosapentaenoico producía una inhibición de la actividad de las células NK; mientras que una dieta que contenía la misma cantidad de ácido docosahexaenoico no tenía el mismo efecto (Peterson *et al.* 1998a).

La aplicación de este tipo de dietas, ricas en ácidos grasos de la serie $n-3$, puede traducirse en una disminución de la capacidad del individuo a la hora de superar una infección vírica (Welsh and Vargas-Cortes, 1992) o a la hora de la supervivencia frente a un cáncer (Lewis and McGee, 1992); de modo que sería inapropiado la aplicación de este tipo de dietas en grupos de riesgo de infecciones virales y ciertos tipos de cáncer.

Una cuestión interesante podría ser la realización de estudios en los cuales se identificara si un incremento en la ingesta de aceite de pescado en la dieta altera el ratio de infección en humanos. Por el contrario, sí existen estudios animales en los que se indica que una elevada ingesta de aceite de pescado, da lugar a un descenso de la resistencia a agentes infecciosos (Mayatepek *et al.*, 1994; Fritsche *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1992; D'Ambola *et al.*, 1991; Byleveld *et al.*, 1999; de Pablo *et al.*, 2000b; Puertollano *et al.*, 2001b; Puertollano *et al.*, 2002), aunque otros estudios llevados a cabo en animales han descrito que las dietas que contienen aceite de pescado no alteran (Rubin *et al.* 1989) o bien aumentan (Blok *et al.*, 1992) la resistencia a algunos patógenos. Dicho riesgo se incrementa conforme aumente el tiempo de ingestión de la dieta, aunque la inhibición de la actividad de las células NK es un proceso fácilmente reversible que se puede recuperar cuando el individuo deja de ingerir la dieta.

Pero a pesar de todo lo anteriormente relatado, existen ciertas situaciones clínicas en las cuales una inhibición de la actividad de las células NK podría resultar beneficiosa. Por ejemplo, en caso de transplantes de órganos o tejidos van a ser las células NK uno de los componentes del sistema inmune que medien en el rechazo de dicho órgano o tejido transplantado (Hogan, 1992). En este caso sería útil la inhibición de la actividad de las células NK tanto inicialmente como posteriormente a la realización del transplante. Por otra parte se ha demostrado que el aceite de pescado prolonga la supervivencia de transplantes cardiacos en ratas (Otto *et al.*, 1990; Grimm *et al.*, 1995; Grimminger *et al.*, 1996); y de transplantes renales y función renal en aquellos pacientes que reciben aceite de pescado (Berthoux *et al.*, 1992; van der Heiden *et al.*, 1993; Bennet *et al.*, 1995; Maachi *et al.*, 1995) frente a los pacientes que no lo reciben. Parte de los efectos beneficiosos demostrados en estos trabajos puede especularse que son debidos a la inhibición que la actividad de las células NK sufre por parte del ácido eicosapentaenoico, aunque realmente en ninguno de ellos se analiza la actividad de las células NK en los pacientes.

Otro aspecto que debe ser subrayado en la supresión que ejerce el aceite de pescado sobre la actividad de las células NK, es el incremento del estrés oxidativo que sufren las células en presencia de grandes cantidades de grasa en la dieta y que podría tener algún efecto sobre la acción de dichas células.

1.3.2.4. Modulación de la fagocitosis por acción de los ácidos grasos

La fagocitosis es un importante mecanismo que poseen algunas células del sistema inmune para la eliminación de microorganismos y partículas foráneas o extrañas, mediante la formación de vesículas endocíticas. Así, uno de los parámetros más relevantes dentro de este mecanismo es la fluidez de membrana. Las células inmunitarias que destacan en esta función son sobre todo los macrófagos, y otras células fagocíticas del sistema inmune.

Como se ha comentado con anterioridad, los lípidos incluidos en la dieta van a alterar la composición, y por tanto la fluidez, de la membrana plasmática de las células del sistema inmune entre ellas la de macrófagos y otras células fagocíticas. De hecho, existen estudios en los que se describe que los ácidos grasos insaturados incrementan la fagocitosis (de Pablo *et al.*, 1998b; Calder *et al.*, 1990). En ambos trabajos se demuestra que aquellos macrófagos estimulados con partículas de zymosan y procedentes de animales que habían sido alimentados con dietas lipídicas, y en concreto con ácidos grasos insaturados (aceite de oliva) (de Pablo *et al.*, 1998b) y poliinsaturados (ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico) (Calder *et al.*, 1990), presentaban un incremento significativo de la fagocitosis.

Por el contrario, también existen ciertos autores que afirman, que el aceite de pescado (compuesto fundamentalmente por ácidos grasos poliinsaturados), puede inhibir (Eicher and Mc Vey, 1995) o no afectar (D'Ambola *et al.*, 1991; Turek *et al.*, 1994) al proceso fagocítico llevado a cabo por macrófagos, aunque estos resultados sólo se han obtenido en estudios animales y no han sido confirmados en humanos.

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar como se produce la modulación de la fagocitosis por la acción de los ácidos grasos. Uno de estos mecanismos implica variaciones en la producción de eicosanoides, y en concreto en los niveles del leucotrieno de la serie E_4 (LTE_4). Chapkin *et al.*, comprobaron que al sustituir los ácidos grasos de la serie $n-6$ por los de la serie $n-3$ se produce una disminución acusada de la concentración del leucotrieno E_4 , el cual se sintetiza por los macrófagos. Por otra parte, estos autores también comprobaron que la disminución en la concentración de dicho leucotrieno origina un aumento significativo de la fagocitosis inducida por partículas de zymosan. Por lo tanto, la regulación en los niveles de leucotrienos de la serie E_4 , también induce la modulación de la fagocitosis (Chapkin *et al.*, 1992). Sin embargo estudios *in vitro* llevados a cabo con inhibidores de eicosanoides, sugirieron que dichos inhibidores no tienen efecto sobre las alteraciones de quimioluminiscencia de macrófagos peritoneales incubados en presencia de ácido araquidónico o ácido eicosapentaenoico (Magrum and Johnston, 1985).

Sin embargo, existen otros autores que sugieren otro mecanismo de regulación, basado en la formación de peróxidos de hidrógeno. Dicho mecanismo consiste en que los ácidos grasos insaturados aumentan los niveles de peróxido de hidrógeno, incrementando de ésta forma la liberación de superóxidos y por tanto induciendo el proceso de fagocitosis (Badwey *et al.*, 1984).

1.3.2.5. Modulación en la presentación de antígenos por acción de los ácidos grasos.

Monocitos y macrófagos van a ser las células del sistema inmune encargadas de iniciar la inmunidad celular; es decir, son las células que tienen como función procesar los antígenos para posteriormente presentarlos en la superficie de su membrana para que sean reconocidos por los linfocitos T. Para que toda esta función sea llevada a cabo, se necesita un requisito previo que consiste en la expresión en la superficie celular de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Esta condición llega a ser tan importante que se ha demostrado que la respuesta proliferativa de los linfocitos T ante la presencia de un antígeno, es proporcional al número de moléculas del MHC presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos (Matis *et al.*, 1983).

Además para que se lleve a cabo la iniciación de la inmunidad celular no sólo es necesario la expresión de moléculas del MHC de clase II, sino también que se lleve a cabo la unión celular, es decir, la unión de una célula a otra. Por tanto también es importante la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión (Springer, 1990). Esta función de las células inmunitarias, y al igual que otras muchas como proliferación de linfocitos, producción de citoquinas, etc; también puede ser modulada por los ácidos grasos presentes en la dieta.

Diversos estudios animales han demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 inhiben la expresión de moléculas del MHC de clase II murino llamado Ia (Kelley *et al.*, 1985; Mosquera *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1992); así como la capacidad de las células dendríticas de ratas (otro tipo de células presentadoras de antígenos) para presentar los antígenos a los propios linfocitos T (Sanderson *et al.*, 1997). En otro trabajo Fujikawa *et al.* demuestran que tanto la suplementación de la dieta con ácido eicosapentaenoico (estudios *in vivo*) como el pretratamiento de esplenocitos con dicho ácido graso en condiciones *in vitro*, conduce a una inhibición de la función de las células presentadoras de antígeno (Fujikawa *et al.* 1992).

Además de todos los estudios llevados a cabo con animales de experimentación; también se han realizado investigaciones en humanos; utilizando monocitos obtenidos de sangre periférica. Hughes y Pinder, utilizaron para sus estudios

monocitos no estimulados y monocitos estimulados con IFN- γ , los cuales tenían mayor expresión de moléculas del MHC de clase II. Ambos tipos celulares fueron tratados con ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico (ácidos grasos con presencia mayoritaria en el aceite de pescado). Estos investigadores concluyeron en este estudio que el aceite de pescado podía inhibir la expresión de moléculas de la superficie celular requeridas para el proceso de presentación de antígenos (Hughes and Pinder, 2000).

También existen estudios humanos en los que las condiciones de experimentación son *in vivo*, es decir, la dieta de los individuos objeto de estudio fue suplementada con ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3. Los resultados de dichas investigaciones coincidían con las anteriormente discutidas (Hughes *et al*, 1996a; Hughes and Pinder, 1997).

Teniendo en cuenta, por tanto, los resultados que se han obtenido en animales y en los estudios llevados a cabo en humanos, se mantiene la hipótesis que señala que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 suprimen la respuesta inmune mediada por células, debido en parte a la inhibición de la función de las células presentadoras de antígenos.

Varios mecanismos han sido propuestos, los cuales podrían estar implicados en el efecto modulador de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 sobre la expresión de moléculas de superficie. Uno de ellos puede ser el incremento en la fluidez que sufren las membranas de las células, y que alteran la expresión de las proteínas de membrana; entre ellas las moléculas pertenecientes al MHC de clase II y las moléculas de adhesión.

Otro de los mecanismos propuestos se basa en que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie *n*-3 (contenidos principalmente en el aceite de pescado) son más susceptibles a sufrir peroxidación lipídica que los ácidos grasos monoinsaturados (contenidos principalmente en el aceite de oliva) y saturados (contenidos en el aceite de coco, en otras grasas vegetales o en grasas animales), por tanto, es posible que un incremento en la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática de los monocitos podría afectar a la expresión de moléculas de superficie. De hecho, se ha demostrado que los radicales libres inhiben la expresión de una de las moléculas pertenecientes al MHC de clase II (Gruner *et al*, 1998); y también que la suplementación de la dieta con antioxidantes como el β -caroteno puede incrementar la expresión de moléculas del MHC II y de moléculas de adhesión en monocitos de sangre periférica en humanos (Hughes *et al*, 1997).

Por último otro posible argumento que podría explicar la razón por la cual los ácidos grasos inhiben la presentación de antígenos podría ser que el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico influyan de manera directa en la expresión del ARNm

perteneciente a varias de las moléculas del MHC, de forma paralela al descenso que sufre el nivel de ARNm perteneciente a dichas moléculas (Khair-El-Din *et al.*, 1995).

1.3.2.6. Modulación en la producción de inmunoglobulinas por acción de los ácidos grasos.

La producción de anticuerpos se lleva a cabo por acción de los linfocitos B. Tal y como es conocido, el papel de los anticuerpos es neutralizar y promover la eliminación de los antígenos que promueven su síntesis. Los anticuerpos producidos pertenecen a diferentes clases de inmunoglobulinas las cuales dependen tanto del tipo de estímulo que activa su formación, como del lugar anatómico en el cual se desarrollan los linfocitos implicados. Las citoquinas también son un factor a tener en cuenta, ya que determinan los tipos de anticuerpos producidos por estimular la proliferación de linfocitos B y por promover de forma selectiva la activación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. De los diferentes tipos de citoquinas que existen van a ser aquellas producidas por los linfocitos T colaboradores (T helper) las más potentes, las cuales están implicadas en la activación de los linfocitos B.

Al igual que otros parámetros inmunitarios, la producción de inmunoglobulinas también se va a ver afectada por la administración de los ácidos grasos de la dieta; aunque no existe un gran número de referencias bibliográficas relacionadas con este aspecto.

Los ácidos grasos saturados no parecen tener gran impacto sobre la producción de anticuerpos, al igual que ocurría con el resto de las funciones de los linfocitos: proliferación, producción de citoquinas, actividad de células NK; y que han sido comentadas con anterioridad (Calder 1995, Calder *et al.*, 1996a, Calder *et al.*, 1998b,c). Estos resultados se han observado exclusivamente en estudios llevados a cabo en humanos (Herbert *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1994).

Estudios con animales de experimentación e investigaciones realizadas en condiciones *in vitro*, demuestran que el ácido linoleico (ácido graso poliinsaturado de la serie *n*-6), administrado en cantidades suficientes, puede parcialmente inhibir la producción de inmunoglobulinas del tipo G o M por parte de los linfocitos B (Calder 1995, Calder *et al.*, 1996a, Calder *et al.*, 1998b,c). Estas observaciones sugieren que elevadas cantidades de ácido linoleico en la dieta interfiere tanto la respuesta inmune mediada por células (inmunidad celular), como la respuesta inmune mediada por anticuerpos (inmunidad humoral). Sin embargo, variaciones más modestas en la cantidad de ácido linoleico en las dietas suministradas a ratas, no afecta de manera relevante otras funciones linfocitarias como la proliferación de linfocitos y la actividad de células NK (Jeffery *et al.*, 1997). Otros estudios llevados a cabo con animales de

experimentación pero que analizan el efecto del ácido γ -linolénico sobre las funciones inmunitarias, concluyen que el ácido γ -linolénico disminuye la respuesta inmune tipo Th1 (Yaqoob *et al*, 1994a,b; Sanderson *et al*, 1995a,b; Sanderson and Calder, 1998; Peterson *et al*, 1999); resultados confirmados en otros trabajos (Matsuo *et al*, 1996) en los que el aceite de onagra, que consta en su composición de un elevado porcentaje de ácido γ -linolénico, incrementó el nivel total de Ig E (Ig sintetizada por los linfocitos B activados por la IL-4 secretada en la respuesta inmune de tipo Th2). En contraste, este mismo aceite disminuye los niveles de Ig G (Ig típica de los linfocitos B cuando estos son activados mediante la ruta Th1 por las interleuquinas IL-2, IFN- γ).

Otro de los ácidos grasos de la serie n -6, que juega un papel muy importante en la síntesis de eicosanoides, es el ácido araquidónico; precursor de los eicosanoides de la familia de las prostaglandinas (PGE₂) y de los leucotrienos (LTB₄). La PGE₂ es un importante inhibidor de la producción de citoquinas del tipo Th1 (IL-2, IFN- γ) (Kinsella *et al*, 1990; Roper and Phipps, 1994), pero por el contrario no parece intervenir de forma directa sobre la respuesta inmune del tipo Th2 promoviendo la producción de Ig E por parte de los linfocitos B (Roper and Phipps, 1994). El leucotrieno B₄, por el contrario, tiene un efecto opuesto a la PGE₂, incrementando la respuesta inmune tipo Th1 y por lo tanto la producción de Ig G por parte de los linfocitos B (Kinsella *et al*, 1990; Lewis *et al*, 1990).

Pero de todos los ácidos grasos de naturaleza poliinsaturada, son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n -3 los que mayor acción tienen sobre los diferentes parámetros inmunológicos. De ellos el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, son los más estudiados. Estudios llevados a cabo con animales de experimentación a los cuales se les administró una dieta rica en aceite de pescado, se demostró que el aceite de pescado da lugar a una disminución de la respuesta inmune del tipo Th1, disminuyendo por tanto la producción de Ig G por parte de los linfocitos B; implicada en la inmunidad celular, inflamación y rechazo de trasplantes. En concordancia con esto el FO da lugar a una elevación en la producción de Ig E en ratas (Prickett *et al*, 1982). En los estudios llevados a cabo en animales el aceite de pescado añadido a la dieta supone un 20% del total de la misma, lo que se traduce en un contenido elevado tanto de ácido eicosapentaenoico como de ácido docosahexaenoico. Pero también existen estudios en ratas y ratones que indican que bajos niveles de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico en la dieta dan lugar a una acción reguladora de la respuesta inmune (Jolly *et al*, 1997; Peterson *et al*, 1998a,b). Por tanto podemos decir que la acción del aceite de pescado sobre el sistema inmune es mucho más relevante que la que ejercen otros aceites como aquellos de la serie n -6 o de la serie n -9 (Calder 1995, Calder *et al*, 1996a, Calder *et al*, 1998b,c).

1.3.3. Apoptosis y ácidos grasos

La muerte celular programada se define como un mecanismo esencial responsable de la regulación de la homeostasis, del desarrollo de tejidos y de las funciones inmunes. De este modo células dañadas, anormales o innecesarias son eliminadas para el correcto funcionamiento y desarrollo de los organismos multicelulares. Pero además de este papel crucial de la apoptosis en el control celular, también este mecanismo lleva a cabo la regulación de procesos patológicos en los cuales se incluyen desórdenes clínicos humanos como el cáncer, patologías o enfermedades de origen autoinmune, infecciones víricas o bacterianas, así como desórdenes de tipo neurodegenerativo. Son muchos y de diversa naturaleza los factores inductores de apoptosis. Factores de origen biológico como algunos virus, bacterias o parásitos; factores químicos como glucocorticoides, ceramidas, etc; y factores físicos como ciertas irradiaciones; van a ser los responsables de la activación de dicho mecanismo en las células (Penninger and Kroemer, 1998).

Existen diversos estudios llevados a cabo tanto en animales de experimentación como en humanos, en condiciones *in vitro* o mediante la administración de dietas lipídicas, en los que se describe el papel crucial de algunos ácidos grasos en la inducción o inhibición de apoptosis. Como resultado de todos estos estudios se han podido identificar ciertos mecanismos que podrían explicar el modo de acción de los ácidos grasos en la modulación de la apoptosis. De este modo ácidos grasos de naturaleza poliinsaturada, como el ácido eicosapentaenoico o el ácido docosahexaenoico; ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico; o ciertas grasas como el aceite de pescado (FO), administrados en la dieta han sido definidas como sustancias capaces de inducir la muerte de la célula o bien mediante un proceso mitocondrial (de Pablo *et al*, 1999) o bien mediante la regulación en la expresión del gen Bcl-2 y del gen Fas-L (Reddy Avula *et al*, 1999).

Por lo tanto, diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar la inducción de apoptosis llevada a cabo por ciertos ácidos grasos. De este modo el ácido palmítico, un ácido graso saturado, añadido a cultivos celulares en ensayos *in vitro* induce apoptosis mediante efecto directo sobre la mitocondria. Esto ocurre debido a que dicho ácido graso causa una disipación del potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\psi_m$), un evento que precede a la apoptosis nuclear (de Pablo *et al*, 1999). En referencia a los efectos de los ácidos grasos sobre la mitocondria existe otro estudio llevado a cabo por Penzo *et al*, 2002, en el cual estos autores analizan la correlación que existe entre los ácidos grasos y su efecto potencial sobre la función de la mitocondria y su papel en la muerte celular. Dichas investigaciones se llevaron a cabo en cultivos celulares *in vitro*, suplementando su medio de cultivo con los ácidos grasos estudiados. Según estos autores los ácidos grasos saturados no tienen

efectos significativos sobre el potencial de membrana mitocondrial y la supervivencia celular. Para que se produzca el proceso de depolarización de membrana mitocondrial y de citotoxicidad se requiere la presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos, aunque el número mínimo de insaturaciones requeridas para observar los efectos incrementa conforme aumenta el número de carbonos que conforman la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos. Estas observaciones pueden ser explicadas por varios mecanismos los cuales no tienen que ser excluyentes entre ellos: (a) los ácidos grasos saturados pueden ser rápidamente esterificados y utilizados como sustrato y/o en rutas biosintéticas (b) la insaturación es requerida para que los ácidos grasos añadidos puedan pasar a la membrana mitocondrial interna; (c) los efectos de los ácidos grasos añadidos sobre la mitocondria y la citotoxicidad dependen además, del metabolismo de los componentes activos obtenidos de forma preferencial de los ácidos grasos insaturados o de la producción de mensajeros intracelulares (Penzo *et al.*, 2002).

Otra posible explicación para la modulación de la apoptosis por ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 es que esta es causada mediante una acción directa de dichas sustancias en las células y por una activación de la cascada de caspasas a través de la liberación de citocromo *c* (cit *c*), acoplada con una modulación de la despolarización de la membrana mitocondrial (Arita *et al.*, 2001).

Pero además de los mecanismos mencionados anteriormente, recientes estudios han determinado también la importancia crucial de los lípidos de la dieta en la reducción de la expresión del gen Bcl-2, así como en el incremento de la expresión del ligando Fas (Fas-L). Teniendo en cuenta este factor, cuando la concentración de ácidos grasos poliinsaturados aumenta, la expresión del gen Bcl-2 se reduce y esto conduce a la célula a entrar en un estado de apoptosis o muerte celular programada (Reddy Avula *et al.*, 1999; Tyurina *et al.*, 1997). En otras palabras podemos decir que los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el aceite de pescado favorecen el proceso apoptótico debido a una supresión en la expresión del gen Bcl-2 (con funciones anti-apoptóticas) y a un incremento en la expresión de Fas-L (con funciones pro-apoptóticas).

También recientemente se ha determinado que la expresión de una proteína denominada Ras que se localiza en la membrana celular y que juega un importante papel en el ciclo celular y en la apoptosis, se reduce tras la administración de una dieta rica en aceite de pescado, lo que indica que dicha dieta podría tener un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de colon (Collet *et al.*, 2001).

En último lugar es importante hacer mención del importante papel que juega la peroxidación lipídica en la inducción de apoptosis. Basándonos en este argumento se puede sugerir que los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados sobre el

desarrollo de apoptosis pueden ser asociados de forma directa a las alteraciones específicas que el proceso de peroxidación lipídica ejerce sobre la alteración en los niveles de expresión de Bcl-2; Fas y Ras (Das, 1999).

Como se puede comprobar muchos son los mecanismos propuestos para dar explicación acerca del efecto de los ácidos grasos sobre el proceso de apoptosis, lo que nos lleva a sugerir que no existe un único mecanismo capaz de conducir a la célula a su muerte, sino que aunque sea uno el que lo inicie va a ser el conjunto de ellos el que de lugar al proceso apoptótico en la célula como resultado final de la adición de todos los efectos llevados a cabo por los ácidos grasos.

1.4. CONSECUENCIAS CLÍNICAS

Como ha sido comentado con anterioridad, la modulación de ciertos parámetros inmunológicos llevados a cabo por los ácidos grasos de la dieta o por el cultivo de células con ácidos grasos libres, sugiere que estas sustancias puedan ser aplicadas en el tratamiento de ciertos desórdenes caracterizados por la existencia de procesos inflamatorios. Sin embargo, estos efectos inmunosupresores pueden dar lugar a un incremento de la susceptibilidad frente a agentes infecciosos, particularmente en el caso de pacientes inmunocomprometidos. También, otra de las consecuencias derivadas de las propiedades de algunos ácidos grasos como moduladores de las funciones inmunes, está relacionada con la promoción o inhibición de los procesos tumorales.

En conjunto es importante resaltar que la inmunosupresión debida a la administración de dietas lipídicas ha de llevarse a cabo de un modo equilibrado, ya que los efectos ejercidos pueden dañar la resistencia del hospedador y por lo tanto se produciría un incremento del riesgo de sufrir un proceso infeccioso.

1.4.1. Ácidos grasos, inmunidad e infección

A lo largo de todas las investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de la nutrición y la inmunidad, ha quedado suficientemente claro que la correcta ingesta de nutrientes es un determinante crítico de la inmunocompetencia que posee un individuo. Algunos investigadores han demostrado las funciones moduladoras ejercidas por los ácidos grasos y los beneficios clínicos de la suplementación de la dieta con aceite de pescado o de oliva, tanto en humanos como en animales de experimentación. Como consecuencia de dicha suplementación, los niveles de ciertos mediadores asociados con el proceso inflamatorio, se reducen. Debido a este hecho, ciertos ácidos grasos (frecuentemente los $n-3$ y $n-9$) de naturaleza insaturada han

sido aplicados en el tratamiento de pacientes que sufren desórdenes inflamatorios asociado a enfermedades autoinmunes como por ejemplo la artritis reumatoide (Kremer *et al.*, 1990; Linos *et al.*, 1991) o psoriasis (Bittiner *et al.*, 1988). Sin embargo el efecto beneficioso en este caso, puede tener un aspecto adverso, ya que puede quedar afectada la inmunidad celular frente a agentes patógenos (de Pablo *et al.*, 2000a).

Hace aproximadamente 30 años se constató un incremento de la incidencia de tuberculosis en Esquimales de Groenlandia (Kaplan *et al.*, 1972). Actualmente se han descubierto las razones por las cuales se producen estos hechos, ya que el consumo de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie $n-3$ (habituales en la dieta de esta población) derivados del aceite de pescado reducen la resistencia frente a enfermedades infecciosas (de Pablo *et al.*, 2002; Anderson and Fritsche, 2002).

Por razones obvias, la alteración de la resistencia frente a una infección bacteriana ha sido analizada en modelos animales, en los cuales la administración de una dieta rica en aceite de pescado incrementa el número de bacterias viables obtenidas a partir del bazo del animal, y reduce de forma notable la supervivencia del animal durante el curso de una infección producida por *Listeria monocytogenes*. Esto tiene lugar porque en estos animales la eliminación de agentes patógenos (bacterias, virus o parásitos) es más difícil.

Diferentes trabajos han descrito hasta el momento las consecuencias clínicas derivadas de la suplementación de la dieta con ácidos grasos de la serie $n-3$, los cuales suprimen la función del sistema inmune. Así, se pone de manifiesto una significativa reducción en el porcentaje de supervivencia tras la alimentación de ratones con una dieta rica en aceite de pescado (de Pablo *et al.*, 2000b; Fritsche *et al.*, 1997), mientras que se observó un incremento en el porcentaje de supervivencia de animales que habían sido infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* y alimentados con dietas ricas en ácidos grasos de naturaleza saturada tales como manteca, aceite de coco, o aceite de palma (Chandra, 1996b, de Pablo *et al.*, 2000b, Fritsche *et al.*, 1997). Estos ratones fueron inoculados con una dosis letal de una cepa virulenta de *L. monocytogenes*, una bacteria facultativa de crecimiento intracelular y que se utiliza en numerosas ocasiones como modelo del proceso infeccioso y patogénico.

Una vez los animales fueron alimentados con la dieta experimental rica en aceite de pescado y además sometidos a la infección experimental con *L. monocytogenes*, los resultados observados fueron los siguientes:

- La recuperación de bacterias viables, es decir la obtención de bacterias, a partir del bazo o del hígado de los animales se vio incrementada (de Pablo *et al.*, 2000b; Fritsche *et al.*, 1997).

- La actividad bactericida de las células peritoneales se redujo significativamente (Puertollano *et al.*, 2001b), y los efectos citotóxicos debidos a la infección bacteriana se incrementaron (Puertollano *et al.*, 2002).
- La susceptibilidad de las células a la adhesión o invasión por la infección de *L. monocytogenes* fue claramente modificada (Puertollano *et al.*, 2002).

Estas observaciones indican la pérdida de capacidad del sistema inmune de los animales alimentados con dietas ricas en aceite de pescado, para destruir y eliminar agentes infecciosos (de Pablo *et al.*, 2000b, Fritsche *et al.*, 1997, Puertollano *et al.*, 2001b, Puertollano *et al.*, 2002), es decir, en otras palabras, las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 incrementan la susceptibilidad del individuo a infecciones promovidas por agentes infecciosos.

Recientes investigaciones han explicado en parte las razones por las cuales los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie *n*-3 reducen la defensa del hospedador frente a *L. monocytogenes*:

- El consumo de ácidos grasos como ácido eicosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, ambos contenidos de forma mayoritaria en el aceite de pescado, va a perjudicar la producción de IL-12 e IFN- γ , citoquinas que juegan un papel esencial en la respuesta del sistema inmune del hospedador; tanto en la respuesta innata como en la adaptativa (Fritsche *et al.*, 2000). Así, la reducción en los niveles de IL-12 podría explicar el efecto que se produce en el aclaramiento bacteriano, así como la reducción de la supervivencia de animales infectados con *L. monocytogenes* (Fritsche *et al.*, 1999).
- Otra posible explicación para la reducción de la resistencia del hospedador se basa en la inhibición de la expresión de moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II (llamado Ia en ratones) que se ve reducido en animales alimentados con dietas que contienen aceite de pescado e infectados con *L. monocytogenes* (Huang *et al.*, 1992, Mosquera *et al.*, 1990).
- También es importante tener en cuenta que los efectos observados en estos animales pueden estar asociados con el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuyos niveles fueron significativamente aumentados en ratones tras infectarlos experimentalmente con esta bacteria y alimentarlos con una dieta rica en aceite de coco (Puertollano *et al.*, 2002). De hecho el papel de los procesos oxidativos celulares requieren una gran atención ya que juegan un importante papel en la eliminación de agentes infecciosos.

Una gran parte de los resultados obtenidos en el presente estudio se basan precisamente en el descubrimiento de algunos mecanismos que participan en la reducción de la resistencia inmune en animales alimentados con algunas dietas lipídicas y su relación con la infección.

Sin embargo, no todos los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de ejercer los mismos efectos, de hecho, existen ciertos estudios que no están de acuerdo con los argumentos descritos previamente. De este modo, una reciente investigación ha determinado que el ácido linoleico conjugado (ácido graso perteneciente al grupo de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3) no altera la resistencia de los ratones tras infectarlos con *L. monocytogenes* (Turnock *et al.*, 2001). Igualmente, un estudio previo indicó que la manipulación de la dieta tenía un efecto irrelevante en la supervivencia de los ratones en dos modelos de peritonitis, uno con *Pseudomonas aeruginosa* y otro con *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* (Clouva-Molyvdas *et al.*, 1992).

Además de estos descubrimientos otros estudios experimentales han demostrado los efectos adversos de los lípidos de la dieta (ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 ó *n*-6) en la alteración de las funciones inmunes de animales sometidos a una infección experimental con diferentes agentes patógenos tales como *S. enterica* serotipo *Typhimurium* (Chang *et al.*, 1992, Eicher and McVey., 1995), *P. aeruginosa* (Peck *et al.*, 1990), *Staphylococcus aureus* (D' Ambola *et al.*, 1991) o *Mycobacterium tuberculosis* (Paul *et al.*, 1997). Por el contrario, se ha demostrado también que la administración de dietas que contienen aceite de pescado incrementa el porcentaje de supervivencia de los ratones tras someterlos a una infección experimental con *Klebsiella pneumoniae* (Bjornsson *et al.*, 1997). De hecho, el incremento en la supervivencia de animales alimentados con esta dieta y sometidos a infección experimental se debe al aumento en la producción de IL-1 y TNF por células peritoneales de ratones (Blok *et al.*, 1996, Blok *et al.*, 1992).

Es probable que las discrepancias que existen entre los resultados de los diferentes estudios se deban a diferentes factores entre los cuales se incluyen la duración del periodo de administración de la dieta suplementada, concentración de ácidos grasos utilizada en la dieta o poblaciones celulares afectadas por la administración de la dieta.

Finalmente las observaciones experimentales con virus demuestran que la infección de animales con el virus influenza y alimentados con dietas ricas en aceite de pescado, también afecta a la resistencia de los ratones debido a un daño en el mecanismo de citotoxicidad de células T específica del virus, pero no altera la citotoxicidad mediada por las células NK (Byleveld *et al.*, 2000, Byleveld *et al.*, 1999).

Tabla 1. Resumen de los efectos promovidos por algunas dietas lipídicas sobre la resistencia inmune de animales de experimentación tras la infección con diferentes patógenos (bacterias, virus y parásitos)

EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA SERIE N-3 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ANIMALES A LA INFECCIÓN POR DIFERENTES MICROORGANISMOS					
Patógeno	Animal	Dietas lipídicas	Duración	Supervivencia	Referencia
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS					
<i>Salmonella typhimurium</i>	Ratones Swiss	Aceite de Pescado, coco o maíz al 40%	4 semanas	Reducción	Chang <i>et al.</i> , 1992
<i>S. typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ratones CF1	MaxEPA, Ácido oleico 5-40%	2-3 semanas	Sin cambios	Clouva-Molyvdas, 1992
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ratones C57BL/6	Aceite de pescado, aceite de maíz, aceite de palma 30%	6 semanas	Incremento	Blok <i>et al.</i> , 1992
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ratones NMRI	Aceite de pescado, aceite de oliva 20-25 %	6 semanas	Incremento	Bjornsson <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ratones Balb/c	MaxEPA al 10 y 40%	2-3 semanas	Reducción	Peck <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ratones (NZBxW)F1	Aceite de pescado y grasa animal al 46%	4-5 semanas	Sin cambios	Rubin <i>et al.</i> , 1989

BACTERIAS GRAM POSITIVAS					
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ratones Balb/c	Aceite de oliva, aceite de pescado, aceite de coco al 20%	4 semanas	Reducción	De Pablo <i>et al.</i> , 2000b
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ratones C3H/HeN	Aceite de pescado, grasa animal y aceite de soja	4-5 semanas	Reducción	Fritsche <i>et al.</i> , 1997
Estreptococos del grupo B	Ratas Sprague-Dawley	Aceite de pescado, aceite de maíz al 22 %	4 semanas	incremento	Rayon <i>et al.</i> , 1997
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Guinea pigs	Dietas que contienen ácidos grasos poliinsaturados <i>n</i> -3 o <i>n</i> -6	13 semanas	Reducción (<i>n</i> -3), ningún efecto (<i>n</i> -6)	Paule <i>et al.</i> , 1997
VIRUS					
Virus Influenza	Ratones Balb/c	Aceite de girasol, aceite de pescado, grasa animal al 34 %	2 semanas	Sin cambios	Byleveld <i>et al.</i> , 1999
Citomegalovirus	Ratones (NZBxW)F1	Aceite de pescado, grasa animal al 34%	4-5 semanas	Sin cambios	Rubin <i>et al.</i> , 1989
PROTOZOOS					
<i>Plasmodium berghei</i>	Ratones C57BL/6	Aceite de maíz, aceite de palma, aceite de pescado al 30%	6 semanas	Incrementa	Blok <i>et al.</i> , 1992

1.4.2. Ácidos grasos y cáncer

Son muchas las evidencias aportadas hasta el momento que indican el papel esencial que el aceite de pescado juega en la incidencia de cáncer (Caygill *et al.*, 1996). Numerosos estudios han sugerido que la ingesta elevada de ácidos grasos de la serie $n-3$ o $n-9$, podría reducir el riesgo de padecer cáncer de mama (Martín-Moreno *et al.*, 1994, Trichopoulou *et al.*, 1995) tanto en humanos como en animales. De este modo, los ácidos grasos poliinsaturados $n-3$ inhiben el cáncer de colon en ratas (Reddy and Maruyama, 1986), así como también reduce el riesgo de desarrollo de cáncer colorectal (Caygill *et al.*, 1996). En contraste con lo anteriormente descrito, los ácidos grasos $n-6$ o bien los ácidos grasos de naturaleza saturada podrían estar implicados en el incremento del proceso tumorigénico tanto en mama como en colon, debido a una alteración en el tipo de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática. De acuerdo con esta hipótesis, el ácido araquidónico se libera de la membrana plasmática produciendo una alteración en la síntesis de prostaglandinas vía ciclooxigenasa (Rao *et al.*, 2001).

Estudios epidemiológicos han determinado el papel protector de los ácidos grasos de la serie $n-3$ frente al cáncer de colon en poblaciones de Alaska y los esquimales de Groenlandia (Blot *et al.*, 1975; Dyeberg and Bang, 1979). Igualmente, otros estudios experimentales demostraron que el aceite de pescado parece ejercer un papel protector frente al cáncer de colon inducido experimentalmente (Reddy *et al.*, 1991). Por otra parte, un estudio reciente ha determinado que el aceite de oliva también ejerce dicho papel protector frente al cáncer colorectal (Stoneham *et al.*, 2000). Aunque los mecanismos que contribuyen a este efecto protector no han sido clarificados hasta el momento, una reciente investigación ha sugerido que las dietas ricas en aceite de pescado son capaces de incrementar el proceso de apoptosis y de diferenciación celular en un proceso tumoral inducido en el colon (Chang *et al.*, 1998). Basado en los conocimientos actuales acerca de este tema, un interesante estudio ha determinado que la dieta típica de países occidentales (la cual consiste principalmente en una mezcla de grasas saturadas, insaturadas y poliinsaturadas) produce lesiones displásicas en el colon, lo que es indicativo de la existencia de un proceso tumoral. De hecho, la administración de una dieta que contenga mezcla de lípidos y elevados niveles de ácidos grasos saturados (similar a los lípidos contenidos en las dietas típicas de los países occidentales), induce carcinogénesis de colon en ratones por un mecanismo desconocido (Risio *et al.*, 1996). Sin embargo, el resultado más interesante de esta investigación revela que una alteración de la actividad de la ciclooxigenasa así como de la supresión del proceso apoptótico parecen jugar un papel crucial en el proceso tumoral inducido por esta dieta en modelos animales (Rao *et al.*, 2001). Además, nuestras observaciones experimentales indican que la supervivencia de ratones alimentados con dietas ricas en aceite de pescado y

transplantados con la línea tumoral LSTRA, se reduce en comparación a los ratones alimentados con una dieta con bajo contenido graso. En nuestro estudio especulamos que este hecho se atribuye a la alteración que tiene lugar en la función de las células T y NK debido a la administración de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales reducen la actividad citotóxica de las células NK (Puertollano *et al.*, 2001a).

Recientemente una interesante investigación ha revelado que los ácidos grasos de la serie *n*-3 alteran la transformación celular de una línea celular de la epidermis de ratones. Esto se debe a que el ácido docosahexaenoico o ácido eicosapentaenoico inhiben la transcripción de la proteína activadora AP-1, mientras que el ácido araquidónico no produce ningún efecto en la actividad de AP-1. Así, este descubrimiento confirma las hipótesis previas acerca del papel quimiopreventivo de las dietas ricas en aceite de pescado (Liu *et al.*, 2001). Por el contrario, la relación más significativa entre ácidos grasos y reducción de incidencia de cáncer se encuentra en la dieta Mediterránea, la cual podría disminuir el desarrollo de cáncer por encima del 10 ó el 15% en las poblaciones más desarrolladas de los países occidentales (Trichopoulou *et al.*, 2000).

Debido a la amplia información disponible en la actualidad, existe cierta controversia en cuanto al papel potencial de los lípidos de la dieta en la etiología del cáncer. De hecho, aunque muchos de los estudios han demostrado que las dietas que contienen ácidos grasos de la serie *n*-3 podrían ser beneficiosas durante el desarrollo de un proceso inflamatorio, sus efectos no están del todo claros ya que este tipo de dieta modula la defensa del hospedador frente a una infección. Por lo tanto, futuros estudios son necesarios para confirmar o rechazar las diferentes hipótesis y argumentos sugeridos hasta el momento.

1.4.3. Dietas ricas en ácidos grasos y desórdenes inflamatorios

Los desórdenes inflamatorios se caracterizan por una respuesta inmune sobreactivada y desregulada por parte de las células T, así como por una inapropiada producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (especialmente PGE₂ y LTB₄).

En cuanto al papel que juega la dieta en este tipo de enfermedades, existen estudios en los cuales individuos que sufren este tipo de desórdenes autoinmunitarios, han sido alimentados con dietas ricas en ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácido oleico. Los resultados obtenidos de estos ensayos, revelan una significativa reducción de los procesos inflamatorios en estos individuos. De hecho, enfermos que padecen artritis reumatoide y que han sido alimentados con ácidos grasos de la serie *n*-3 o con aceite de oliva, demostraron una gran reducción de la sintomatología típica causada por esta enfermedad (Kremer *et al.*, 1990;

Linos *et al.*, 1991). De manera que existen investigaciones que recomiendan el consumo diario, por parte de enfermos afectados por artritis reumatoide, de 3 a 6 g de ácidos grasos de la serie *n*-3 durante al menos 3-4 meses. Con esta suplementación de la dieta, los pacientes no suprimen su tratamiento médico a base de antiinflamatorios no esteroideos, aunque si reducen la dosis consumida bajo supervisión médica (Kremer, 2000). A pesar de los estudios existentes acerca de la influencia del aceite de oliva y de otras grasas insaturadas presentes en la dieta sobre el desarrollo de la artritis reumatoide, no se conocen los mecanismos por medio de los cuales el aceite de oliva lleva a cabo su protección frente al desarrollo de la enfermedad. Linos *et al.*, sugieren en una de sus investigaciones que una de las posibilidades que se atribuyen para explicar el efecto protector del aceite de oliva sería su contenido relativamente alto de ácidos grasos insaturados. De este modo dichos ácidos grasos compiten en la formación de prostaglandinas y leucotrienos derivados de los ácidos grasos de la serie *n*-6 los cuales tienen una potente actividad proinflamatoria. De manera que los metabolitos derivados del ácido oleico y de los ácidos grasos de la serie *n*-3 ejercen un potente efecto antiinflamatorio al inhibir la formación de los anteriores (Linos *et al.*, 1999).

La psoriasis, es otra enfermedad de carácter autoinmune, caracterizada por elevados niveles de ácido araquidónico y productos derivados de la enzima 5-lipooxigenasa. También la suplementación de la dieta, en enfermos de psoriasis, con ácidos grasos *n*-3 poliinsaturados reduce los niveles de estas sustancias, y en particular dentro de la familia de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3, el ácido eicosapentaenoico ha demostrado ser un ácido graso muy efectivo en el tratamiento de la enfermedad (Bittiner *et al.*, 1988; Soyland *et al.*, 1993b).

Sin embargo el potencial terapéutico de algunos ácidos grasos no sólo ha sido investigado en individuos que sufren artritis reumatoide o psoriasis, ya que también existen estudios llevados a cabo con individuos que sufren lupus eritematoso sistémico. En este tipo de enfermos, la suplementación de la dieta con ácidos grasos de la serie *n*-3 también supuso una significativa reducción en la sintomatología típica de la enfermedad (Warrington 1987; Wolf and Brelsford., 1988).

El conocimiento de cómo los ácidos grasos promueven la regulación inmune y la función de las células implicadas en la defensa del hospedador permitirá el desarrollo de tratamientos que podrán ser aplicados a pacientes afectados por desórdenes caracterizados por una sobreactivación del sistema inmunitario. Sin embargo el efecto beneficioso de los ácidos grasos presentes en la dieta debe estar equilibrado con el daño simultáneo que la administración de algunas dietas lipídicas producen en la capacidad del hospedador para eliminar de forma eficiente cualquier microorganismo responsable de una infección, siendo este un factor crucial a tener en cuenta en la administración de algunas dietas lipídicas.

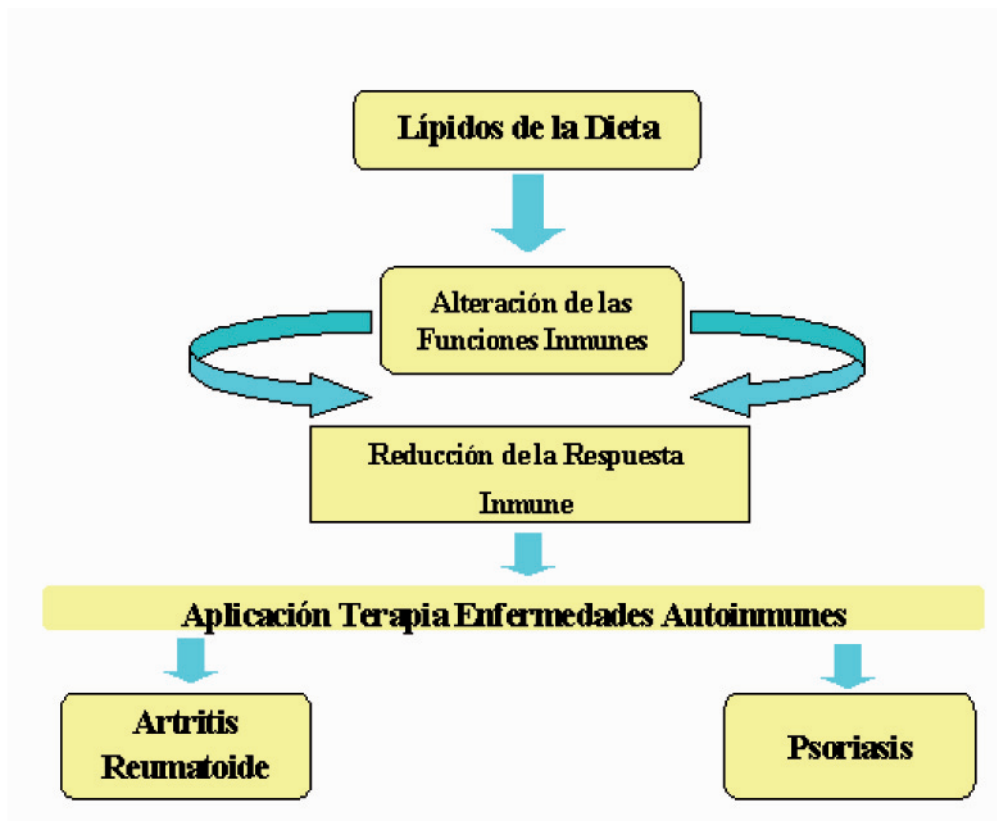


Figura 3. Supresión de las funciones inmunes por lípidos de la dieta. La reducción de la respuesta inmune ha sido aplicada en la resolución de desórdenes de tipo inflamatorio característicos de las enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o psoriasis.

2. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

Algunas dietas lipídicas modulan las funciones inmunes dando lugar a una supresión del sistema inmune. El efecto inmunosupresor inducido por estas dietas lipídicas conduce a una reducción de la resistencia inmune del individuo frente a agentes patógenos impidiendo o dificultando su eliminación.



OBJETIVOS GENERALES

- Demostrar los efectos que ejerce la administración de diferentes dietas lipídicas sobre la resistencia inmune del hospedador tras la infección experimental promovida por *Listeria monocytogenes*.
 - Ordenar las dietas lipídicas en función de sus efectos inmunosupresores.
 - Determinar la eficiencia de una dieta lipídica como agente inmunomodulador tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*.
 - Mostrar los mecanismos por los cuales las dietas lipídicas ejercen un efecto inmunomodulador tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes* en ensayos *ex vivo* o *in vivo*.
 - Examinar los efectos inmunomoduladores de algunas dietas lipídicas en animales a los que se les ha trasplantado un linfoma murino
- Evaluar el papel que juega la apoptosis o muerte celular programada en células procedentes de animales alimentados con dietas lipídicas e infectadas experimentalmente con el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*.
 - Analizar la acción de los ácidos grasos libres en timocitos y en esplenocitos.

Finalmente es importante resaltar la relevancia de este tipo de estudios que tratan principalmente de valorar los efectos de dietas que contienen aceite de oliva como fuente de lípidos y comparar sus efectos con otras grasas caracterizadas también por sus propiedades inmunomoduladoras. Por consiguiente, estas investigaciones adquieren un papel crucial en una provincia y a su vez en una región donde el aceite de oliva es un nutriente de gran importancia económica, social y cultural. Por lo tanto a raíz de nuestras investigaciones y por supuesto de otras que puedan sucederle podemos conseguir un objetivo general de gran relevancia y es que el aceite de oliva adquiera así importancia a nivel científico, abriendo una vía que examine así sus cualidades y propiedades beneficiosas para la salud.

3. Material y métodos

3.1. ENSAYOS IN VIVO Y EX VIVO

3.1.1. Animales y dietas experimentales.

Ratones BALB/c, de 10 semanas de edad y un peso aproximado de 20-25 g, procedentes del animalario de la Universidad de Jaén han sido utilizados en todos los ensayos. Los ratones permanecieron en jaulas y acondicionados a una temperatura de 24°C, con un ciclo de luz - oscuridad de 12 h y fueron alimentados durante 30 días con sus respectivas dietas experimentales. Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*. En todos los casos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical siguiendo estrictamente los protocolos del comité ético para el cuidado y mantenimiento de animales. Los animales se dividieron en tres grupos experimentales en función de tres tipos de dietas experimentales. (I) Dieta rica en aceite de oliva (20% del peso de la dieta); (II) dieta rica en aceite de pescado (20% del peso de la dieta) y (III) dieta rica en aceite de coco (20% del peso de la dieta). Dichas dietas fueron almacenadas en oscuridad a una temperatura de 4°C. Además, se confeccionó un cuarto grupo experimental, formado por ratones alimentados con una dieta estándar (PanLab) con un contenido bajo en lípidos (2.5% del peso de la dieta). La composición de las dietas experimentales es ilustrada en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales

Componentes	g/kg de dieta
Caseína	200
D,L-metionina	3
Almidón de trigo	315
Sacarosa	155
Fibra	80
Grasas^a	200
Mezcla mineral^b	35
Mezcla vitamínica^c	10
Colina	2

^a Los ratones Balb/c fueron alimentados con sus respectivas dietas durante cuatro semanas. Los aceites incorporados en las dietas fueron aceite de oliva, aceite de pescado y aceite de coco. El grupo control fue alimentado con una dieta que contiene 2.5% de lípidos.

^b **Mezcla mineral (g/kg):** 500 fosfato cálcico dibásico (Fluka), 74 cloruro sódico (Panreac), 220 citrato potásico monohidratado (Fluka), 52 sulfato potásico, óxido de magnesio (Merck), 3.5 carbonato de manganeso (Fluka), 6 citrato férrico (Merck), 1.6 carbonato de zinc (Fluka), 0.3 carbonato cúprico (Fluka), 0.01 iodato potásico (Fluka), 0.01 seleniato de sodio pentahidratado (Merck), 0.55 sulfato crómico de potasio dodecahidratado (Fluka) y sacarosa hasta completar 1 kg.

^c **Mezcla vitamínica (g/kg):** 0.6 tiamina hidrocloreuro, 0.6 riboflavina, 0.7 piridoxina hidrocloreuro, 3 ácido nicotínico, 1.6 pantotenato de calcio, 0.2 ácido fólico, 0.02 biotina, 0.001 cianocobalamina, 400000 UI vitamina A, 0.0025 vitamina D₃, 5000 UI vitamina E, 0.005 vitamina K, sacarosa hasta completar 1 kg.

3.1.2. Preparación de *Listeria monocytogenes*

Una cepa virulenta de *L. monocytogenes* se cultivó en medio cerebro corazón (BHI, Scharlau Chemist, Barcelona, España), hasta que el crecimiento bacteriano alcanzó la fase exponencial (densidad óptica [DO] a 550 nm, aproximadamente 1.0). El cultivo se incubó durante 24 h a una temperatura de 37°C. A continuación las bacterias fueron lavadas dos veces con solución salina tamponada (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) y resuspendidas en solución salina al 0.9%. El número de bacterias viables se determinó mediante diluciones seriadas en placas de agar sangre, procediendo a su incubación a 37°C durante 24 h.

3.1.3. Preparación línea tumoral LSTRA

Células de un linfoma murino denominado LSTRA, procedentes del virus del Moloney en forma ascítica, se lavaron varias veces a 1200 rpm (Beckman GS-6R, Palo Alto, CA) en PBS (Sigma). A continuación, dicha línea celular se cultivó en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF, PAA Laboratories GmbH), L-glutamine, penicillin 50 U/ml y 50 mg/ml de estreptomicina (PAA Laboratories GmbH). Finalmente, las células se incubaron en una atmósfera humificada al 98 %, 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

3.1.4. Ensayos de supervivencia

3.1.4.1. Infección experimental con *Listeria monocytogenes*

La bacteria sembrada en medio BHI en fase exponencial de crecimiento, fue cultivada en agar triptona soja (TSA, Scharlau Chemist, Barcelona, España) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid Limited, Hampshire, England). Las bacterias se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente resuspendidas en PBS (Sigma) estéril a una concentración de 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Finalmente 100 µl de esta suspensión (10⁶ UFC) fueron inyectados a los ratones por vía endovenosa a través del seno retroorbital del ojo. Cada grupo experimental constaba de 10 ratones, los cuales habían sido alimentados durante 30 días con sus respectivas dietas y el número de animales muertos fue comprobado cada 8 h. Una cantidad similar de *L. monocytogenes* fue inyectada en el grupo control alimentado con una dieta de bajo contenido en lípidos.

3.1.4.2. Infección experimental con *Listeria monocytogenes* en presencia del antioxidante N-aceyl-L-cisteina (NAC)

La bacteria sembrada en medio BHI en fase exponencial de crecimiento, fue cultivada en agar triptona soja (TSA, Scharlau Chemist) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid) Las bacterias fueron incubadas a 37°C durante 24 h y posteriormente suspendidas en PBS (Sigma) estéril a una concentración de 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Finalmente 100 µl de esta suspensión (10⁶ UFC) fueron inyectados a los ratones por vía endovenosa a través del seno retroorbital del ojo. Además los ratones fueron tratados con N-aceyl-L-cisteina (NAC), inyectando intraperitonealmente 100µl del antioxidante que se encontraba a una concentración de 25 mg/ml. Cada grupo experimental estaba constituido por 15 ratones y el número de ratones muertos se controló cada 8 h. Los ratones alimentados con una dieta de bajo contenido en lípidos (grupo control), se inocularon con la misma cantidad de *L.monocytogenes* y también se trataron con una

concentración similar de NAC. Los datos se expresaron como porcentaje de supervivencia.

3.1.4.3. Transplante con linfoma murino

Las células ascíticas tumorales (LSTRA, un linfoma murino inducido por el virus de Moloney a ratones Balb/c) fueron lavadas tres veces en PBS (Sigma) a 1200 rpm (Beckman GS-6R) y resuspendidas en PBS (Sigma). Las células tumorales se ajustaron a una concentración de 2×10^5 células viables por ratón y se inyectaron por vía intraperitoneal. Para la medida del porcentaje de supervivencia, cada grupo constaba de 20 ratones los cuales fueron alimentados durante 30 días con sus respectivas dietas. El número de ratones muertos se comprobó cada 8 h. El grupo control, alimentado con una dieta con bajo contenido en lípidos, recibió una cantidad similar de células tumorales. Antes de cada ensayo, la viabilidad celular se comprobó mediante exclusión con azul trypan.

3.1.5. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*

Los ratones alimentados durante 30 días con sus respectivas dietas experimentales fueron infectados por inyección de 100 μ l de una suspensión celular de *L. monocytogenes* (10^5 UFC/ ml) a través del seno retroorbital del ojo. La misma cantidad de suspensión bacteriana se inoculó a ratones alimentados con una dieta de bajo contenido graso (grupo control). Las células esplénicas de los animales infectados con *L. monocytogenes* fueron recogidas en PBS (Sigma), lavadas tres veces, y los sobrenadantes se trasladaron en un tubo estéril. El recuento de las UFC en placa se efectuó mediante la realización de seis diluciones seriadas procedentes de las suspensiones de células del bazo de los ratones infectados. Una alícuota (5ml) de cada dilución fue transferida al medio TSA (Scharlau Chemist) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, y pasado este tiempo el número de colonias bacterianas fue recontado a las 0, 24, 48 y 96 h tras la infección experimental de los ratones. Los resultados se expresaron como \log_{10} de bacterias viables.

3.1.6. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con N-aceyl-L-cisteina (NAC)

Los ratones alimentados durante 30 días con sus respectivas dietas experimentales, fueron infectados por inyección de 100 μ l de una suspensión celular de *L.*

monocytogenes (10^5 UFC/ ml) a través del seno retroorbital del ojo. Posteriormente los ratones se trataron mediante la inyección intraperitoneal de 100 μ l de NAC (25 mg/ml) a cada ratón. Transcurridas 48 h tras la infección experimental, las células esplénicas de los ratones infectados con *L. monocytogenes* se recogieron en PBS (Sigma), lavadas tres veces, y los sobrenadantes se trasladaron a un tubo estéril. El recuento de las UFC en placa se efectuó mediante la realización de seis diluciones seriadas procedentes de las suspensiones de células del bazo de los ratones infectados. Una alícuota (5 μ l) de cada dilución se transfirió al medio TSA (Scharlau Chemist) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, y pasado este tiempo se contó el número de colonias bacterianas. Los resultados se expresaron como \log_{10} de bacterias viables.

3.1.7. Preparación de células murinas

3.1.7.1. Aislamiento y preparación de timocitos

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, procediendo posteriormente a la desinfección de la piel con una solución de yodo. A continuación se extrajo el timo, en condiciones estériles, y se depositó en PBS (Sigma). Las células fueron disgregadas y se recogieron en tubos de centrifuga estériles. Las células se mantuvieron durante 5 min a 4°C con una solución lisante de hematíes (Red Buffer Lising Cell, Sigma). Posteriormente se procedió al lavado de las células tres veces a 1200 rpm (Beckman GS-6R) a 4°C durante 5 min. Los recuentos celulares se efectuaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), disponiendo 100 μ l de suspensión celular en 0.9 ml de líquido de Turk (3% ácido acético glacial, 97% de agua destilada milli Q, azul de metileno); ajustando las células a una concentración de 5×10^5 células/ml y siendo resuspendidas en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%.

3.1.7.2. Aislamiento y preparación de esplenocitos

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, procediendo posteriormente a la desinfección de la piel con una solución de yodo. Posteriormente se extrajo el bazo, en condiciones estériles, y se depositó en PBS (Sigma). Las células fueron disgregadas y se recogieron en tubos de centrifuga estériles. Las células se mantuvieron durante 5 min a 4°C con una solución lisante de hematíes (Sigma). A continuación, se procedió al lavado de las células tres veces a 1200 rpm (Beckman GS-6R) a 4°C y durante 5 min. Posteriormente los recuentos celulares se efectuaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), disponiendo 100 μ l de la suspensión

celular en 0.9 ml de líquido de Turk; ajustando las células a una concentración de 5×10^5 células/ml y siendo resuspendidas en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF al 10% (PAA Laboratories GmbH).

3.1.7.3. Aislamiento y preparación de células peritoneales

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, procediendo posteriormente a la desinfección de la piel del animal con una solución de yodo. Todo el proceso de extracción de las células y preparación de las mismas, se llevó a cabo en condiciones estériles. Con una jeringa estéril se inyectaron 3 ml de PBS (Sigma) en la región peritoneal. A continuación se realizó un masaje en la región abdominal y se efectuó la extracción de las células peritoneales con una pipeta Pasteur. Las células se recogieron con PBS, manteniendo la suspensión celular en un baño con hielo. Las células fueron lavadas tres veces con PBS a 1200 rpm (Beckman GS-6R), durante 5 min, a 4°C. A continuación se efectuaron los recuentos celulares en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), ajustando las células a una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%.

3.1.8. Viabilidad celular. Medida colorimétrica con MTT

La medida de la proliferación celular se efectuó siguiendo el ensayo propuesto por Mossman (Mossman, 1983). Para la realización del ensayo se empleó 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma), este compuesto se resuspendió a una concentración stock de 5 mg/ml en PBS (pH= 7,2, Sigma), se esterilizó por filtración (Millipore 0.2 mm) y se conservó a 4°C y en oscuridad hasta su utilización.

El MTT es una sal de tetrazolium que tiene la capacidad de incorporarse a las mitocondrias de las células vivas, y es rota por la actividad deshidrogenasa mitocondrial de células viables produciendo una sal de formazán azul oscuro.

A cada uno de los pocillos que contenían células ajustadas a una concentración de 5×10^5 células/ml, se añadieron 20 μ l de MTT, llevando las placas a incubar durante 4 h a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 1200 rpm (Beckman GS-6R) y se eliminaron los sobrenadantes, los precipitados se solubilizaron mediante la adición de 150 μ l de una solución de ácido clorhídrico 0.04 N en alcohol isopropílico (Panreac), procediendo a una agitación vigorosa con una pipeta, con el objeto de disolver los cristales de MTT formados. La placa se deja a temperatura ambiente 10 min y a continuación se efectuó la lectura en un espectrofotómetro (Whittaker 2001,

Saltzburg), utilizando una longitud de onda de referencia de 620 nm y una longitud de onda de medida de 550 nm. Los valores se expresaron en unidades de densidad óptica (D.O).

Por otra parte, la medida del efecto citotóxico llevado a cabo por las bacterias, se realizó mediante un ensayo colorimétrico descrito por Mossman (Mossman, 1983) aunque con algunas modificaciones. Las células esplénicas se aislaron y se ajustaron a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%, y se dispusieron en placas de 96 pocillos. La suspensión de bacterias en solución salina se preparó mediante el proceso descrito anteriormente (capítulo 3.1.2). Las preparaciones bacterianas (multiplicidad de infección [MOI] 20 bacterias por cada célula) se añadieron a los pocillos de forma inmediata o bien tras haber sufrido un proceso de calentamiento a una temperatura de 95°C durante 30 min (bacterias muertas por calor). Los controles positivos se prepararon añadiendo a los pocillos correspondientes una solución al 1% de Tritón X-100 (Sigma), y a los pocillos de los controles negativos se añadió la misma cantidad de PBS (Sigma). Las placas se incubaron durante 3 y 6 h a una temperatura de 37°C en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂. Tras la incubación se añadieron 20 µl de MTT (5 mg/ml, pH 7,2, Sigma) a cada pocillo. Tras 3 h de incubación, los sobrenadantes fueron decantados y los precipitados de formazan se solubilizaron mediante la adición de 150 µl de una solución 0.04 N de HCl en alcohol isopropílico (Panreac). Se procedió a una agitación vigorosa con la pipeta para favorecer la disolución de los precipitados. El contenido de los pocillos fue examinado espectrofotométricamente a 620 nm (Whittaker 2001). Los resultados se expresaron como porcentaje de citotoxicidad, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 1 - \left(\frac{\text{DO}_{\text{de los pocillos problema}}}{\text{DO}_{\text{de los pocillos control negativo}}} \right) \times 100$$

3.1.9. Ensayo de proliferación celular con mitógenos

El objetivo de este ensayo es el de provocar la activación de los linfocitos procedentes del bazo y del timo, empleando para ello mitógenos específicos y procediendo posteriormente, a la cuantificación de la proliferación celular mediante el método colorimétrico basado en la reducción del MTT, descrito anteriormente (capítulo 3.1.7.)

En placas de microtiter de 96 pocillos se dispusieron 200 µl de suspensión celular ajustadas a 5×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. A continuación a cada pocillo se le añaden cada uno de los mitógenos que previamente fueron resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con SBF al 10%. Los mitógenos utilizados en este

ensayo fueron los siguientes, ajustados a las siguientes concentraciones: concanavalina A (Con A, Sigma) a 20 mg/ml y lipopolisacárido (LPS, Sigma) a 20 mg/ml. Para cada ensayo se dispusieron varios pocillos que contenían 200 μ l de la suspensión celular en ausencia de mitógenos y que actuaron como grupo control. Por último las placas se llevaron a incubar durante 24 h, a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa.

3.1.10. Análisis de la actividad bactericida

Una cepa virulenta de *L. monocytogenes* se cultivó en medio TSA (Scharlau Chemist) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid). Las bacterias se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 h. Pasado este tiempo, las bacterias se resuspendieron en PBS estéril (Sigma) a una concentración de 10⁸ UFC/ml. La eficacia de las células peritoneales para eliminar bacterias en el interior de la célula fue determinada previamente por procedimientos que han sido descritos con anterioridad (Palombo *et al.*, 1999), aunque en este caso se aplicó el protocolo descrito con algunas modificaciones. De este modo las células peritoneales se obtuvieron de los ratones alimentados con sus respectivas dietas, así como de ratones alimentados con la dieta control (bajo contenido en lípidos) y se ajustaron a una densidad de 2x10⁶ células/ml. Dichas células se incubaron en presencia de *L. monocytogenes* a 37°C durante 1 h. La suspensión bacteriana se añadió en MOI de 20 bacterias por cada célula en PBS (Sigma). Pasado el tiempo de incubación, se añadió a cada uno de los pocillos una solución de penicilina-estreptomicina (Sigma, 10.000 UI-10 mg/ml), con el objetivo de eliminar las bacterias que no habían sido fagocitadas. Después de 30 min, las células se lavaron varias veces y se resuspendieron en PBS suplementado con 1 g/l de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Para determinar las UFC de las bacterias internalizadas presentes inicialmente, una alícuota de los macrófagos se sometió a un tratamiento de lisis con digitonina e incubación de la muestra a una temperatura de 4°C durante 15 min, con el fin de liberar las bacterias intracelulares. Posteriormente a partir de la muestra se llevaron a cabo una serie de diluciones seriadas, y una alícuota de cada dilución se dispuso en placas de TSA (Scharlau Chemist) suplementado con un 7% de sangre de caballo (Oxoid); con el objetivo de cuantificar las UFC después de haber incubado la placa durante 24 h a 37°C. Los valores obtenidos en este caso recibieron el nombre de recuento inicial.

El resto de la muestra de macrófagos se incubó durante 2 h a 37°C, y posteriormente los macrófagos se lisaron mediante el mismo procedimiento anteriormente descrito. Las bacterias liberadas fueron cuantificadas por el procedimiento expuesto con anterioridad. Los valores obtenidos en este caso se denominaron recuento final. La

actividad bactericida de las células peritoneales se presentó como porcentaje de bacterias supervivientes y se expresó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Bacterias supervivientes} = (\text{recuento final}[\text{tiempo}=2\text{h}] / \text{recuento inicial}[\text{tiempo}=0\text{h}]) \times 100$$

3.1.11. Determinación de la adhesión/invasión de *Listeria monocytogenes*

3.1.11.1. Ensayo de adhesión

Células esplénicas procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales y con la dieta control (con bajo contenido en grasa), se ajustaron a una concentración de 3×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratory GmbH), se ajustaron a una concentración de 3×10^5 células/pocillo y se dispusieron en placas de 24 pocillos. Para el ensayo de adhesión, las células se infectaron con 100 μ l de cultivo bacteriano (MOI de 20 bacterias por cada célula) seguido de 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 h de incubación a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación de las células, las bacterias fueron retiradas de los sobrenadantes mediante el lavado de las células con RPMI 1640. A continuación, las células se lisaron añadiéndoles 1 ml de una solución al 1% de Tritón X-100 (Sigma) durante 5 min a 37°C. Posteriormente se realizaron 10 diluciones seriadas en 0.9 ml de PBS (Sigma). Después se dispusieron 5 μ l de cada una de las diluciones en placas de agar sangre. Finalmente, se procedió al recuento de las CFU de cada una de las placas pasadas las 24 h de incubación de las mismas a 37°C. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió tres veces. Los resultados se expresaron como log₁₀ bacterias viables.

3.1.11.2. Ensayo de invasión

Para el ensayo de invasión, pasado el tiempo de incubación de las células esplénicas, de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales y con la dieta control en presencia de la suspensión bacteriana de *L. monocytogenes*, a las 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 h, 1 ml de RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH) y 10mg de gentamicina/ml (Sigma) se añadió al cultivo celular infectado para eliminar las bacterias extracelulares. En presencia de la gentamicina, las células se incubaron durante 2 h a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. Posteriormente las células se lavaron varias veces con RPMI 1640, con el objeto de eliminar tanto el medio como los antibióticos añadidos, y se lisaron con 1 ml de Tritón X-100 al 1% durante 5 min a 37°C. Las bacterias viables

se cuantificaron por el método previamente descrito. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió tres veces. Los resultados se expresaron como \log_{10} bacterias viables.

3.1.12. Medición de anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

3.1.12.1. Medición de anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de *Listeria monocytogenes*

Una vez transcurridos los 30 días, en los cuales los ratones se alimentaron con sus respectivas dietas lipídicas, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Las células peritoneales se obtuvieron y se ajustaron a una concentración de 5×10^5 células/ml. Posteriormente se dispusieron en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 2 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 , en presencia de *L. monocytogenes* la cual se encontraba a un MOI de 20 bacterias por célula. Las células se incubaron en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH).

Pasado el periodo de incubación junto con *L. monocytogenes*, se añadió al medio de cultivo de las células nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) a una concentración de 1 mM, dejando de nuevo incubar las células junto con dicha sustancia durante 2 h, para medir la generación de aniones superóxido por parte de las células (Witz and Czerniecki, 1988). A continuación, la reacción se detuvo añadiendo 50 μl de ácido acético glacial (Panreac) a cada uno de los pocillos. Finalmente la liberación de aniones superóxido por parte de las células se midió en un espectrofotómetro (Whittaker 2001) a una longitud de onda de 560 nm. Los resultados se expresaron como unidades de DO.

3.1.12.2. Medición de anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de inhibidores de la fosfolipasa y cyclooxygenasa

Una vez transcurrido el periodo de 30 días en el cual los ratones se alimentaron con sus respectivas dietas, el inhibidor de fosfolipasa A_2 llamado quinacrina (QUIN, Sigma) fue inyectado por vía intraperitoneal a cada uno de los ratones a una concentración de 1 mg/ml. Otro grupo de animales fue inyectado por vía intraperitoneal con el inhibidor de la cyclooxygenasa indometacina (IND, Sigma), también a una concentración de 1 mg/ml. Tras 24 h, los ratones fueron inyectados con zymosan opsonizado (Sigma) a una concentración de 2 mg/ml, 2 h antes de ser sacrificados. Seguidamente las células peritoneales se aislaron y se ajustaron a

una concentración de 10^5 células/ml. Las células se depositaron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 2 h a 37°C en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂, en presencia de NBT (Sigma) a una concentración final de 1mM. De este modo se mide la liberación de aniones superóxido llevada a cabo por las células. Pasado el tiempo de incubación con el NBT, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl de ácido acético glacial (Panreac). Finalmente, la liberación de aniones superóxido se midió en un espectrofotómetro (Whittaker 2001) a una longitud de onda de 560 nm. Los resultados se expresaron como unidades de DO.

3.1.13. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La monitorización de la respuesta oxidativa de las células se llevó a cabo mediante la realización de una prueba de permeabilidad. Para ello se utilizó un compuesto llamado 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Sigma). El H₂DCFDA difunde de forma pasiva al interior celular, donde las esterasas intracelulares liberan los acetatos y la oxidación del 2',7', dichlorodihydrofluorescein por el peróxido de hidrógeno produce fluorescencia. Tras la preincubación de 2×10^6 células/ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10% en presencia o ausencia de *L. monocytogenes* durante 6 ó 12 h (MOI 20 bacterias por cada célula), las células se volvieron a incubar durante 1 h a 37°C en presencia de H₂DCFDA, el cual se dispuso a una concentración de 40 µM en cada pocillo. A continuación las células se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de PBS. Posteriormente las muestras se analizaron fluorométricamente a una longitud de onda de excitación de 480 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm, en un espectrofotómetro de fluorescencia (Cary Eclipse; Varian, Mulgrave, Australia). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades relativas de fluorescencia.

3.1.14. Actividad de células natural killer (NK) mediante liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad de las células natural killer (NK) se determinó mediante la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que se libera en las células esplénicas al medio de cultivo. La citotoxicidad se determinó utilizando un kit (Citotox 96 non-radioactive, Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. De este modo las células esplénicas (células efectoras) se ajustaron a 2×10^6 células/pocillo y las células YAC-1 (células diana) se ajustaron a 10^4 células/pocillo. Ambos tipos celulares se dispusieron en los pocillos de la placa de 96 pocillos a un ratio de células efectoras/diana de 100:1, 50:1 y 25:1; todos ellos por triplicado. La liberación máxima de LDH se determinó mediante la incubación de las células YAC-1 con un

0,8% de Triton-X-100, en ausencia de células efectoras. La liberación espontánea de LDH se midió a partir de la incubación de células YAC-1 en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 5% de SBF (PAA Laboratories GmbH). Las placas se centrifugaron durante 5 min a 700 rpm (Beckman GS-6R) para favorecer la unión de las células efectoras y diana. Posteriormente, las placas se incubaron durante 5 h a 37°C en una atmósfera humificada con un 5% de CO₂. Seguidamente 45 min antes de la finalización del periodo de incubación se añaden a los pocillos correspondientes el tampón de lisis. La mezcla sustrato se añadió a cada pocillo de la placa una vez transcurridas las 5 h de incubación, y posteriormente la placa se incubó 30 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente, la reacción se detuvo con la solución «stop» y los valores de absorbancia a 492 nm se determinaron fotométricamente en un lector de placas (Whittaker 2001). Los valores para cada pocillo fueron expresados como porcentaje de LDH liberada y calculados siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citotoxicidad} = [(DO_{\text{Experimental}} - DO_{\text{Espontánea Efectora}} - DO_{\text{Espontánea Diana}}) / (DO_{\text{Máxima Diana}} - DO_{\text{Espontánea Diana}})] \times 100\%$$

3.1.15. Determinación de la actividad de proteasomas

La actividad de los proteasomas se determinó midiendo la permeabilidad de un sustrato fluorogénico al interior de las células. Dicho sustrato es el N-succinyl-l-leucyl-l-leucyl-l-valyl-l-tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma), de acuerdo con protocolos que se han descrito previamente (Dallaporta *et al.*, 2000). Los timocitos procedentes de ratones que fueron alimentados con sus correspondientes dietas lipídicas, se ajustaron a una concentración de 4x10⁶ células/pocillo. Seguidamente los timocitos se incubaron en presencia de *L. monocytogenes* durante 2 h y a un MOI de 20 bacterias por cada célula en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH). Finalizado el periodo de incubación, las células se lavaron y se incubaron en PBS (Sigma) durante 30 min en presencia del sustrato fluorogénico N-succinyl-l-leucyl-l-leucyl-l-valyl-l-tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin a la concentración de 100 mM, a una temperatura de 37°C y en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂. La medición de la fluorescencia generada debido a la ruptura del sustrato se cuantificó en un espectrofluorímetro (Varian, Cary Eclipse). La longitud de onda de excitación fue de 380 nm y la de emisión de 460 nm. El inhibidor de proteasomas MG132 (CBZ-leucyl-leucyl-leucinal, Sigma) se utilizó como control negativo a una concentración de 30 mM. Los valores obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.1.16. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN

Timocitos procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas lipídicas, se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH). Seguidamente, se incubaron en presencia de *L. monocytogenes* (MOI 20 bacterias por célula) durante 2h. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS (Sigma) y a los precipitados celulares se les añadió 0.5 ml de tampón de lisis (10 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 0,2% Triton-X-100) y se llevaron a centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. A continuación, los sedimentos se resuspendieron en 0.5 ml de tampón de lisis y tanto a estos como a los sobrenadantes se les añadió 0.5 ml de una solución de tricloroacético (TCA, 25%, Fluka). Las muestras se llevaron a incubar a 4°C durante 24h. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min y a los precipitados se les añadió 350 μ l de TCA al 5%. Las células se incubaron a 83°C durante 20 min, y se les añadió 0.7 ml de una solución de difenilamina (DPA, Fluka) [150 mg DPA en 10 ml de ácido acético glacial, 150 μ l de ácido sulfúrico y 50 μ l de acetaldehído (16 mg/ml)]. Las células se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. La cantidad de ADN fragmentado se calculó mediante la lectura de la absorbancia a 600 nm. El porcentaje de ADN fragmentado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ADN fragm} = \left[\frac{(\text{DO}_{\text{sobrenadantes}})}{(\text{DO}_{\text{sobrenadante}} + \text{DO}_{\text{precipitados}})} \right] \times 100$$

3.1.17. Actividad de caspasa-3

Timocitos procedentes de animales alimentados con sus respectivas dietas experimentales se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. Las células se incubaron durante 2 h en presencia de *L. monocytogenes* (MOI 20 bacterias por cada célula). Tras el periodo de incubación las células se lavaron tres veces con PBS (Sigma) y se lisaron. La actividad de la enzima caspasa-3 (CPP32/apopain) fué analizada utilizando un kit (EnzChek Caspase-3 Assay Kit, Molecular Probes), siguiendo el protocolo del fabricante. La placa de ensayo se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió por la rotura del sustrato empleado para este ensayo Z-DEVD-R110 [bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide)], en el cual la rodamina 110 se genera a partir del sustrato por la acción de la caspasa. La actividad de la caspasa-3 se cuantificó en un espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm. Para la

inhibición de la caspasa-3 se utilizó el inhibidor específico de caspasa-3 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO).

3.2. ENSAYOS IN VITRO

3.2.1. Aislamiento y preparación de células

Los tipos celulares aislados (timocitos, esplenocitos y células peritoneales) se prepararon según la metodología descrita en el capítulo 3.1.6.

3.2.2. Viabilidad celular

3.2.2.1. Inhibidor de la fosfolipasa A₂

Los timos murinos fueron diseccionados, homogeneizados y sus células se obtuvieron y se ajustaron a una densidad de 10^5 células/ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. La suspensión celular se dispuso en placas de 96 pocillos, y en los pocillos correspondientes se fueron añadiendo los ácidos grasos siguientes ácido oleico (Sigma), ácido eicosapentaenoico (Sigma) o ácido esteárico (Sigma) a una concentración de 25, 50, 100 y 200 mM. Posteriormente, la placa se llevó a incubar durante 72 h a 37°C, en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂, en presencia del inhibidor de la fosfolipasa QUIN (Sigma) el cual se utilizó a una concentración de 10 mM. Tras el periodo de incubación, la viabilidad de los timocitos se midió mediante un ensayo colorimétrico con MTT (Sigma), de acuerdo con el protocolo descrito por Mossman (capítulo 3.1.8.). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad. La DO del grupo control (cultivos celulares en ausencia de ácidos grasos libres) se consideró como 100% de viabilidad.

3.2.2.2. Inhibidor de la ciclooxigenasa

Los timos procedentes de ratones fueron diseccionados, homogeneizados y sus células se obtuvieron y se ajustaron a una densidad de 10^5 células/ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. La suspensión celular se dispuso en placas de 96 pocillos, y en los pocillos correspondientes se fueron añadiendo los ácidos grasos siguientes ácido oleico, ácido eicosapentaenoico o ácido esteárico (Sigma), a una concentración de 25, 50, 100 y 200 mM. Posteriormente, la placa se llevó a incubar durante 72 h a 37°C, en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂, en presencia del inhibidor de la

cyclooxygenasa IND (Sigma) el cual se utilizó a una concentración de 10 mM. Tras el periodo de incubación, la viabilidad de los timocitos se analizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la utilización MTT (Sigma), según protocolo descrito por Mossmann (capítulo 3.1.7.). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad. La DO del grupo control (cultivos celulares en ausencia de ácidos grasos libres) se consideró como el 100% de viabilidad.

3.2.2.3. Inhibidor de la lipooxigenasa

Los timos procedentes de ratones fueron diseccionados, homogeneizados y sus células se obtuvieron y se ajustaron a una densidad de 10^5 células/ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. La suspensión celular se dispuso en placas de 96 pocillos, y en los pocillos correspondientes se fueron añadiendo los ácidos grasos siguientes ácido oleico, ácido eicosapentaenoico o ácido esteárico (Sigma), a una concentración de 25, 50, 100 y 200 mM. Posteriormente, la placa se llevó a incubar durante 72 h a 37°C, en una atmósfera humificada y con un 5% de CO₂, en presencia del inhibidor de la lipooxigenasa ácido nordihydroxyguarético (NDGA, Sigma), el cual se utilizó a una concentración de 10 mM. Una vez transcurridas las 72 h de incubación, la viabilidad de las células linfocitarias se determinó mediante un ensayo colorimétrico que utiliza el MTT (Sigma) como sustrato, siguiendo el protocolo descrito por Mossmann y expuesto con anterioridad (capítulo 3.1.8.). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad. La DO del grupo control (cultivos celulares en ausencia de ácidos grasos libres) se consideró como el 100% de viabilidad

3.2.3. Medición de anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

La medida de producción de peróxidos lipídicos se llevó a cabo mediante la utilización de una técnica colorimétrica basada en la reducción del NBT (Sigma). El NBT es una sal, que en presencia de superóxidos sufre un proceso de reducción.

En placas de 96 pocillos se dispusieron 200 µl de suspensión celular ajustadas a 5×10^5 cel/ml en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%. Posteriormente la placa se llevó a incubar durante 2-3 h a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa, en presencia de los ácidos grasos oleico, eicosapentaenoico o esteárico que se ajustaron a una concentración de 100 mM. A cada uno de los pocillos que contenía la suspensión celular se añadieron 20 µl de NBT procedente de una solución stock a concentración de 10 mM. La concentración final en cada pocillo fue de 1 mM. A continuación la placa se llevó a incubar durante 2 h a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y 98%

de humedad relativa. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución de ácido acético glacial (Panreac), procediendo a una agitación vigorosa con una pipeta, con el objeto de disolver los cristales de NBT formados. La placa se dejó a temperatura ambiente 10 min aproximadamente y a continuación se efectuó la lectura de la misma en un espectrofotómetro (Whittaker 2001) a una longitud de onda de 560 nm. Finalmente los valores obtenidos fueron expresados como unidades de DO.

3.2.4. Determinación de la actividad de proteasomas

La actividad de los proteasomas se determinó midiendo la permeabilidad de un sustrato fluorigénico al interior de las células. Dicho sustrato es el N-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma), de acuerdo con protocolos que han sido descritos previamente (Dallaporta *et al*, 2000). Los timocitos se ajustaron a una concentración de 4×10^6 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con SBF (PAA Laboratories GmbH) al 10%, y se cultivaron en presencia de los ácidos grasos libres oleico, eicosapentaenoico o esteárico a una concentración de 100 mM, durante 24 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ y una humedad relativa del 98%. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron y se incubaron en 200 µl de PBS (Sigma), y se incubaron en presencia del sustrato fluorigénico N-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin, a una concentración de 100 mM, durante 30 min a 37°C en una atmósfera humificada y con 5% de CO₂. La generación de fluorescencia debido a la disgregación del sustrato se midió en un espectrofluorímetro (Varian, Cary Eclipse). La longitud de onda de excitación fue de 380 nm y la longitud de onda de emisión fue de 460 nm. El inhibidor de proteasomas MG132 (Sigma) se utilizó a una concentración de 30 mM. Los valores obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.2.5. Preparación de células YAC-1

Células procedentes del linfoma murino YAC-1 se cultivaron en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera humificada al 98% y con un 5% de CO₂.

3.2.6. Medición de la proliferación celular con Sytox-green

Células YAC-1 (linfoma murino) a una concentración de 1×10^4 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA

Laboratories GmbH), se cultivaron en presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido oleico y ácido esteárico, Sigma), a una concentración de 150 mM, durante 24 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, las células dispuestas en placas de 96 pocillos se incubaron en presencia de Sytox-Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a una concentración de 1 mM durante 15 min a 37°C. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS (Sigma). Finalmente, la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.2.7. Análisis de la acumulación de tricilgliceroles con rojo nilo

Células YAC-1 a una concentración de 1×10^4 células/pocillo en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH), se cultivaron en presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido oleico y ácido esteárico, Sigma), a una concentración de 150 mM, durante 24 h a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y una humedad relativa del 98%. Pasadas las 24 h de incubación, las células dispuestas en placas de 96 pocillos, se volvieron a incubar en presencia de rojo nilo (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml durante 10 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (Sigma) y la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian) a una longitud de onda de excitación de 488 nm, y a una longitud de onda de emisión de 530 nm. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.2.8. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Células YAC-1 a una concentración de 2×10^6 células/ml en RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10% de SBF (PAA Laboratories GmbH), se cultivaron en presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido oleico y ácido esteárico, Sigma), a una concentración de 150 mM, durante 24 h a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y una humedad relativa del 98%. Pasadas las 24 h de incubación, las células se volvieron a incubar durante 30 min a 37°C junto con H₂DCFDA, el cual se dispuso a una concentración de 10 mM en cada pocillo. A continuación las células se lavaron y se suspendieron en 100 µl de PBS. Posteriormente las muestras se analizaron fluorométricamente a una longitud de onda de excitación de 480 nm y a una longitud de onda de emisión de 535 nm, en un espectrofotómetro de

fluorescencia (Cary Eclipse Varian). Los resultados obtenidos se expresaron como unidades relativas de fluorescencia. La intensidad relativa de fluorescencia se expresó como porcentaje del control. Las células no tratadas se consideraron como el 100%.

3.2.9. Análisis cuantitativo de fragmentación de ADN

Para el análisis cuantitativo de ADN, células YAC-1 se ajustaron a la concentración de 1×10^6 células/pocillo y se incubaron durante 24 h en presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido oleico y ácido esteárico, Sigma) a una concentración de 150 mM. Los precipitados celulares se prepararon por centrifugación a 1200 rpm (Beckman) durante 5 min. Seguidamente se lisaron en 0.5 ml de buffer de lisis que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 0,2% Triton-X-100, y se llevaron a centrifugar a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. Los sedimentos se suspendieron en 0.5 ml de buffer de lisis. Posteriormente 0.5 ml de tricloroacético (TCA, Sigma) al 25% se añadieron a los precipitados y los sobrenadantes, y se incubaron a 4°C durante 24 h. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm y los sedimentos se suspendieron en 80 ml de TCA al 5%. Seguidamente, se incubaron a 83°C durante 20 min. A continuación, 160 μ l de solución de difenilamina (DPA) [150 mg DPA en 10 ml de ácido acético glacial, 150 μ l de ácido sulfúrico y 50 μ l de acetaldehído(16 mg/ml)] se añadieron a cada muestra, y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. La cantidad de ADN fragmentado se calculó mediante la lectura de la absorbancia a 600 nm. El porcentaje de ADN fragmentado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ADN fragm} = \left[\frac{(\text{DO}_{\text{sobrenadantes}})}{(\text{DO}_{\text{sobrenadante}} + \text{DO}_{\text{precipitados}})} \right] \times 100$$

3.2.10. Actividad de caspasa-3

Células YAC-1 ajustadas a una concentración de 1×10^6 células/pocillo, se incubaron durante 24 h en presencia de ácidos grasos libres (ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácido oleico y ácido esteárico, Sigma) a la concentración de 150 mM. Tras el periodo de incubación, las células se recogieron y se lavaron en PBS (Sigma). Posteriormente las células se lisaron y la actividad de la caspasa-3 (CPP32/apopain) fue analizada utilizando un kit (EnzChek Caspase-3 Assay Kit, Molecular Probes), siguiendo el protocolo del fabricante. La placa de ensayo se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió por la rotura del sustrato empleado para este ensayo Z-DEVD-R110 [bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide)], en el cual la rodamina

110 se genera a partir de Z-DEVD-E110 sustrato por la acción de la caspasa. La actividad de la caspasa-3 se cuantificó en un espectrofluorímetro (Cary Eclipse Varian) a una longitud de onda de excitación de 488 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm. Para la inhibición de la caspasa-3 se utilizó el inhibidor específico de caspasa-3 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados son expresados en todos los casos como media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de varianza con el objeto de comparar los efectos de las dietas experimentales con los del grupo control (animales alimentados con la dieta baja en lípidos, dieta LF). Cuando las diferencias fueron significativas, las medias fueron comparadas utilizando el test de Fisher (Fisher's least significant difference (LSD) test). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1. ENSAYOS IN VIVO Y EX VIVO

4.1.1. Ensayos con *Listeria monocytogenes*

4.1.1.1. Peso de los ratones y de los bazos después de la administración de dietas lipídicas y tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

El peso de los ratones en cada uno de los grupos después de la administración de las respectivas dietas experimentales no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en comparación con los valores del peso de los ratones determinados antes de la infección experimental con *L. monocytogenes* dentro de cada grupo experimental (Tabla 3). Por el contrario, el peso del bazo procedente de los grupos alimentados con la dieta control, aceite de pescado y aceite de coco a las 96 h de la infección experimental con *L. monocytogenes* incrementó de manera significativa (Tabla 3).

Tabla 3. Pesos de ratón y de bazo en ratones alimentados con las dietas experimentales

Tiempo después de la infección experimental (h)	Peso de ratón (g)			Peso de bazo (mg)		
	0	48	96	0	48	96
Control	32.5 ± 0.8	30.6 ± 2.5	28.6 ± 5.5	160 ± 4.0	270 ± 60	330 ± 10*
Aceite de oliva	27.6 ± 1.7	26.4 ± 1.5	27.0 ± 1.0	230 ± 20	190 ± 40	290 ± 50
Aceite de pescado	19.0 ± 0.2	20.1 ± 3.0	20.1 ± 1.2	70 ± 10	160 ± 20*	280 ± 50*
Aceite de coco	26.3 ± 0.2	23.1 ± 2.0	23.9 ± 0.4	170 ± 20	210 ± 70	390 ± 80*

P<0.05 comparado con los valores antes de la infección experimental (tiempo 0) dentro de cada grupo experimental.

4.1.1.2. Recuentos de células peritoneales

La Tabla 4 muestra el número de células peritoneales aisladas en los diferentes grupos analizados. Los recuentos de células peritoneales en los grupos alimentados con aceite de oliva o aceite de pescado mostraron valores similares antes de la infección experimental con *L. monocytogenes*. Por el contrario, el número de células peritoneales aisladas de estos grupos después de la infección experimental descendió de manera sustancial a las 48 y 96 h. Por otra parte, los recuentos de células peritoneales de ratones alimentados con una dieta que contenía aceite de coco incrementaron de forma relevante a las 48 y 96 h de la infección experimental con *L. monocytogenes* en comparación con valores de este grupo antes de la infección experimental.

Tabla 4. Recuentos de células peritoneales procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*

Tiempo después de la infección experimental (h)	Recuentos de células peritoneales ($\times 10^5$)		
	0	48	96
Control	12.4 ± 5.5	12.4 ± 5.9	13.6 ± 4.3
Aceite de oliva	25 ± 10.0*	11.0 ± 5.6	13.0 ± 4.3
Aceite de pescado	26.5 ± 12.0*	13.0 ± 7.3	10.0 ± 3.5
Aceite de coco	19.0 ± 8.5	33.0 ± 12.8*	36.0 ± 14.3*

* $P < 0.05$ comparado con los valores del grupo control.

4.1.1.3. Ensayos de supervivencia tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

La Figura 4 muestra el porcentaje de supervivencia en ratones alimentados con dietas lipídicas tras una infección experimental con una dosis letal de una cepa virulenta de *L. monocytogenes* inyectada por vía endovenosa. Los resultados sugieren que aquellos ratones alimentados con una dieta rica en grasas de naturaleza insaturada (aceite de oliva o aceite de pescado), son menos resistentes a la infección promovida por *L. monocytogenes* que el grupo control (alimentado con una dieta de bajo contenido en grasa). Dentro del grupo de ratones alimentados con una dieta de elevado contenido graso, el porcentaje de supervivencia de los animales

alimentados con una dieta rica en aceite de oliva (Figura 4A) o de coco (Figura 4C) fue mayor tras infección experimental con *L. monocytogenes*, el porcentaje de supervivencia observado en aquellos animales alimentados con una dieta rica en aceite de pescado (Figura 4B). De hecho, el 80% de los ratones alimentados con esta dieta murieron tan sólo 48 h después de ser sometidos a la infección experimental con *L. monocytogenes* (Figura 4B).

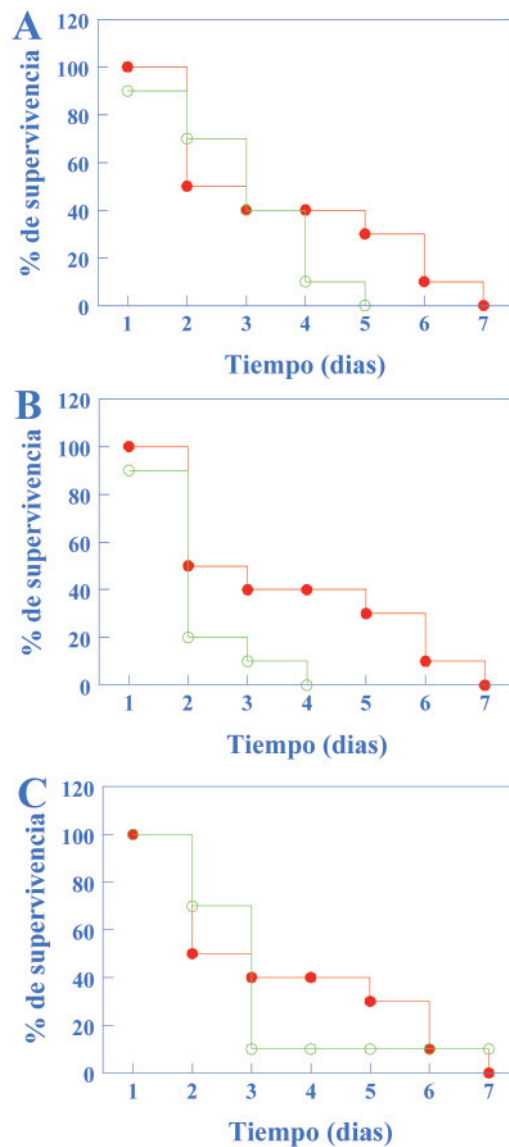


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de los ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. Los ratones ($n=15$ en cada grupo experimental) fueron alimentados con sus respectivas dietas durante treinta días e inoculados con una dosis letal de *L. monocytogenes* a 10^6 UFC. Los círculos cerrados (líneas rojas) representan los porcentajes de supervivencia de ratones alimentados con la dieta control (baja concentración de lípidos). Los círculos abiertos (líneas verdes) representan los porcentajes de supervivencia de ratones alimentados con aceite de oliva (A), aceite de pescado (B) o aceite de coco (C). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

4.1.1.4. Ensayos de supervivencia tras una infección experimental con *Listeria monocytogenes* y tratamiento con N-acetil-L-cisteína (NAC)

Transcurrido el período de administración de las respectivas dietas lipídicas, los ratones fueron sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes* y simultáneamente a un tratamiento mediante inyección intraperitoneal con el antioxidante NAC, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos (capítulo 3.1.4.2).

La Figura 5 muestra los resultados de la supervivencia de los ratones tanto aquellos tratados con NAC como los no tratados con el antioxidante. De acuerdo a los datos experimentales obtenidos, la administración de NAC a los ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva, aceite de pescado o aceite de coco no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de los ratones; ya que el porcentaje de ratones vivos, sometidos al tratamiento con el antioxidante e infectados con la bacteria, no presentó a lo largo del tiempo diferencias significativas con respecto al porcentaje de ratones vivos que solo fueron infectados con *L. monocytogenes* (Figuras 5B-D). Sin embargo, 48 h después del tratamiento con NAC y con *L. monocytogenes*, el porcentaje de ratones muertos en el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido graso (grupo control) se redujo de forma considerable (Figura 5A). De hecho en este último grupo el antioxidante NAC parece mantener la resistencia de los ratones a la infección causada por *L. monocytogenes*, ya que un 25% de los ratones sobrevivieron tras la infección experimental con la bacteria.

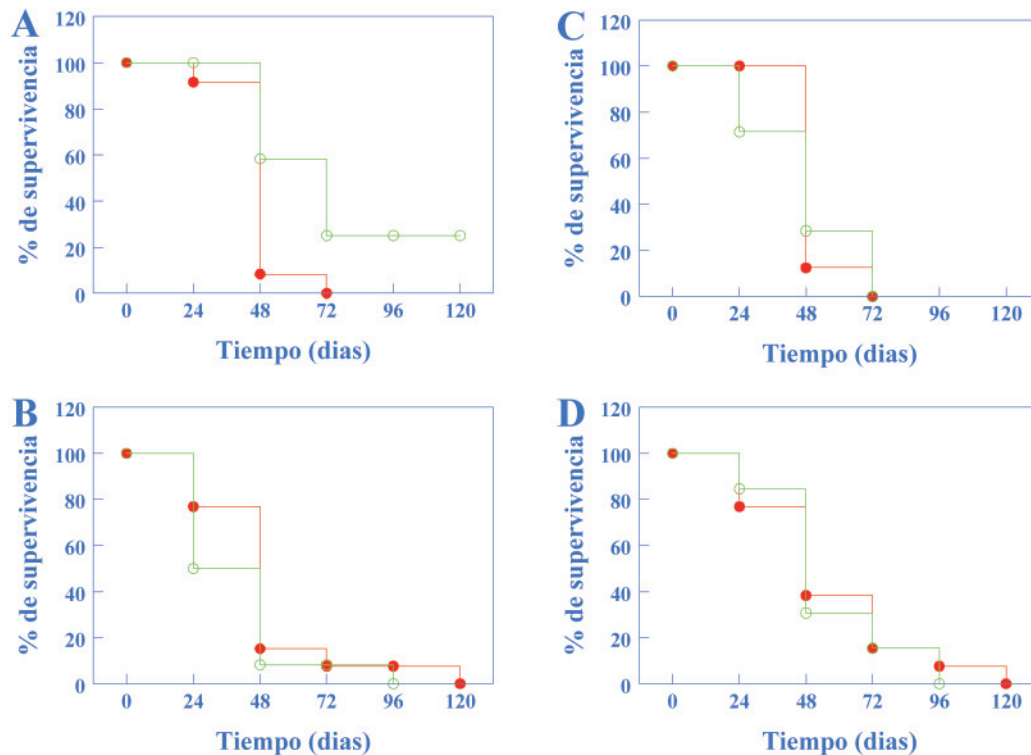


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de ratones después de la infección experimental con *Listeria monocytogenes* y tratados con el antioxidante *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC). Los ratones fueron alimentados con sus respectivas dietas durante cuatro semanas ($n=15$ en cada grupo experimental). Los círculos cerrados (líneas rojas) representan los porcentajes de supervivencia de ratones infectados experimentalmente con *L. monocytogenes*. Los círculos abiertos (líneas verdes) representan el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con *L. monocytogenes* e inyectado por vía intraperitoneal con *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) a una concentración de 25 mg/ml. A) porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con una dieta baja en lípidos (dieta control). B) aceite de oliva. C) aceite de pescado. D) aceite de coco. Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

4.1.1.5. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo tras la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

El número de bacterias viables obtenidas a partir del bazo de ratones infectados con *L. monocytogenes* y alimentados con sus respectivas dietas experimentales, se consideró como una indicación del estado en que se encontraba el sistema inmune de los ratones tras la administración de las dietas lipídicas. Transcurridas 48 h de la infección experimental con *L. monocytogenes*, el número de bacterias viables fue mayor en

ratones alimentados con dietas de elevado contenido graso. De estos grupos, el menor recuento de bacterias viables se encontró en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva. Sin embargo, transcurridos 96 h de la infección experimental, el mayor recuento de bacterias viables se obtuvo en los bazos procedentes de animales alimentados con las dietas ricas tanto en aceite de pescado como en aceite de oliva, mientras que a partir de los bazos procedentes de ratones alimentados con aceite de coco se obtuvieron el menor número de bacterias viables (Tabla 5)

Tabla 5. Número de bacterias recuperadas de bazos de ratones alimentados con dietas lipídicas después de la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

Tiempo después de la infección experimental (h)	Número de bacterias recuperadas (log ₁₀)	
	48	96
Control	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.7
Aceite de oliva	2.7 ± 0.4*	3.6 ± 0.4*
Aceite de pescado	3.7 ± 0.3*	3.6 ± 0.2*
Aceite de coco	3.0 ± 0.2*	1.7 ± 0.4*

Media ± error estándar de la media de tres determinaciones independientes ($n=3$ en cada grupo experimental). $P < 0.05$ comparado con el grupo control (alimentado con una dieta baja en lípidos).

4.1.1.6. Recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con N-acetil-L-cisteína (NAC)

La Figura 6 representa el número de bacterias viables recuperadas a partir del bazo de ratones sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes* y de ratones sometidos a la infección con la bacteria y simultáneamente a un tratamiento con NAC. En ambos casos el número de bacterias viables se obtuvo tras 48 h de haber sometido a los animales al tratamiento correspondiente.

Los resultados que se presentan en la Figura 6, demuestran que la recuperación de *L. monocytogenes* fue superior en los bazos que procedían de ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, comparando estos valores con los obtenidos en otros grupos. Sin embargo, la administración por vía intraperitoneal del NAC no

ejerce ningún efecto sobre la recuperación de bacterias a partir de bazos de ratones alimentados tanto con la dieta rica en aceite de oliva como con la dieta rica en aceite de pescado. Por el contrario, se observó una significativa reducción en el número de bacterias recuperadas a partir de los bazos procedentes de ratones alimentados tanto con una dieta rica en aceite de coco como con una dieta de bajo contenido en lípidos (grupo control), y tratados con el antioxidante NAC ($P < 0.05$).

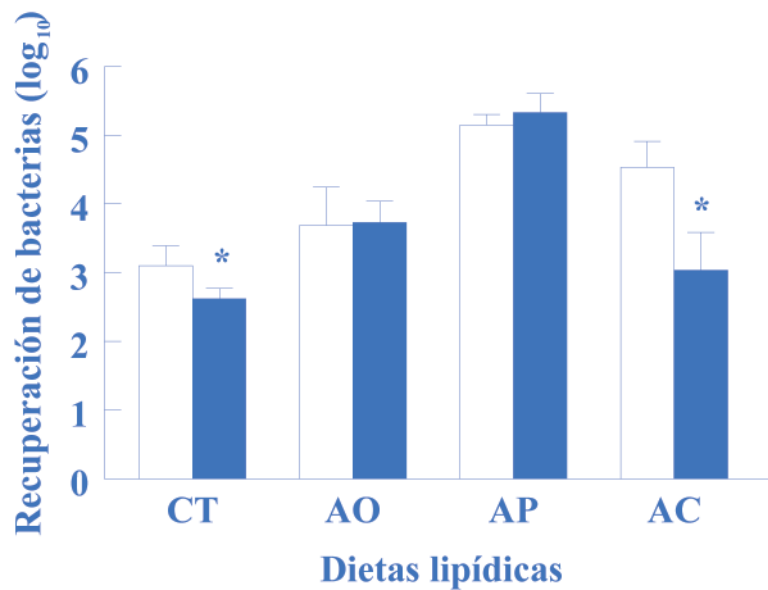


Figura 6. Recuperación de *L. monocytogenes* viables a partir del bazo de ratones alimentados con dietas lipídicas y tratados con N-acetil-L-cisteína (NAC). Los ratones fueron experimentalmente inoculados con NAC por vía intraperitoneal a una concentración de 25 mg/ml durante 48 h. Los bazos fueron aislados y homogenizados en PBS. Los recuentos bacterianos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y métodos. Los ratones fueron infectados con *L. monocytogenes* en ausencia de NAC (barras abiertas) o en presencia de NAC (barras cerradas). El número de las colonias bacterianas fue contado y los resultados han sido expresados como \log_{10} de bacterias viables. Las barras representan la media error \pm estándar de la muestra de tres determinaciones independientes ($n=5$ en cada grupo experimental). * $P < 0.05$ comparado con los valores en ausencia de NAC. CT, control; AO, aceite de oliva; AP, aceite de pescado; AC, aceite de coco.

4.1.1.7. Ensayo de viabilidad celular a la infección por *Listeria monocytogenes*

El efecto citotóxico que *L. monocytogenes* ejerce sobre las células esplénicas del hospedador, se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción del MTT; como se indicó en el apartado de materiales y métodos. La actividad citotóxica debida a la presencia de *L. monocytogenes* se determinó después de 3 y 6 h de incubación. Los resultados más característicos, comparados con el control positivo (células tratadas con Triton X-100), se observaron en los grupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva y de aceite de pescado, en los cuales el porcentaje de citotoxicidad incrementó en un 31 y 38%, respectivamente (Figura 7B y C) después de 6 h de incubación de las células esplénicas en presencia de *L. monocytogenes*, mientras que en los otros grupos este porcentaje fue inferior a un 17%. Por otra parte los grupos alimentados tanto con la dieta de bajo contenido graso (Figura 7A) como con la dieta rica en aceite de coco (Figura 3D), presentaron un reducido porcentaje de citotoxicidad tras 6 h de incubación con la bacteria ($P < 0.05$). El incremento de citotoxicidad producido por *L. monocytogenes* después de 3 a 6 h de incubación celular se mantuvo en todos los grupos, con la excepción del grupo alimentado con aceite de coco, en el cual dicho porcentaje se redujo de forma significativa. Sin embargo, las bacterias muertas por calor no causaron ningún efecto citotóxico apreciable a los cultivos celulares.

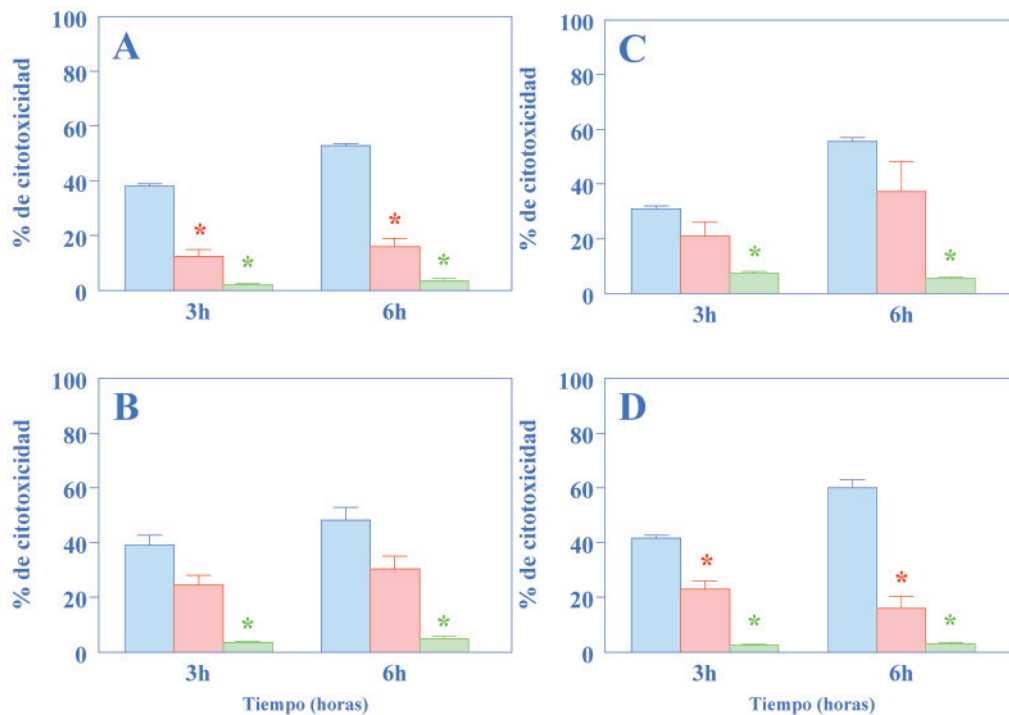


Figura 7. Análisis de citotoxicidad de células esplénicas procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados con *Listeria monocytogenes*. La citotoxicidad fue cuantificada por el ensayo colorimétrico del MTT. Las células fueron incubadas en presencia de un control positivo como Triton X-100 (barras azules), en presencia de *L. monocytogenes* viables (barras rojas) o en presencia de *L. monocytogenes* muertas por calor (barras verdes) durante un período de 3 ó 6 h. Las figuras muestran los porcentajes de citotoxicidad de *L. monocytogenes* en células esplénicas de ratones alimentados con una dieta control (A), dieta que contiene aceite de oliva (B), dieta que contiene aceite de pescado (C) o dieta que contiene aceite de coco (D). Los valores son expresados como media \pm error estándar de la muestra de tres determinaciones independientes ($n=3$ en cada grupo experimental). * $P<0.05$ comparado con el porcentaje del control positivo (células tratadas con Triton X-100) en cada grupo experimental.

4.1.1.8. Proliferación celular

La proliferación de linfocitos aislados del bazo de ratones alimentados con las respectivas dietas experimentales, se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción del MTT, con el objetivo de cuantificar el índice de estimulación de los linfocitos del bazo tras 24 h de incubación. Las células se incubaron en presencia de Con A o de LPS. Como se ilustra en la Figura 8, los resultados revelan

que la proliferación de las células procedentes de aquellos ratones alimentados tanto con la dieta rica en aceite de pescado como con la dieta rica en aceite de coco y estimuladas tanto con Con A como con LPS, fue significativamente reducida en comparación a los valores presentados por el grupo control (alimentado con una dieta de bajo contenido graso) ($P < 0.05$). Por el contrario, es importante señalar que la proliferación de linfocitos procedentes de animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva fue prácticamente similar a la proliferación de linfocitos del grupo control.

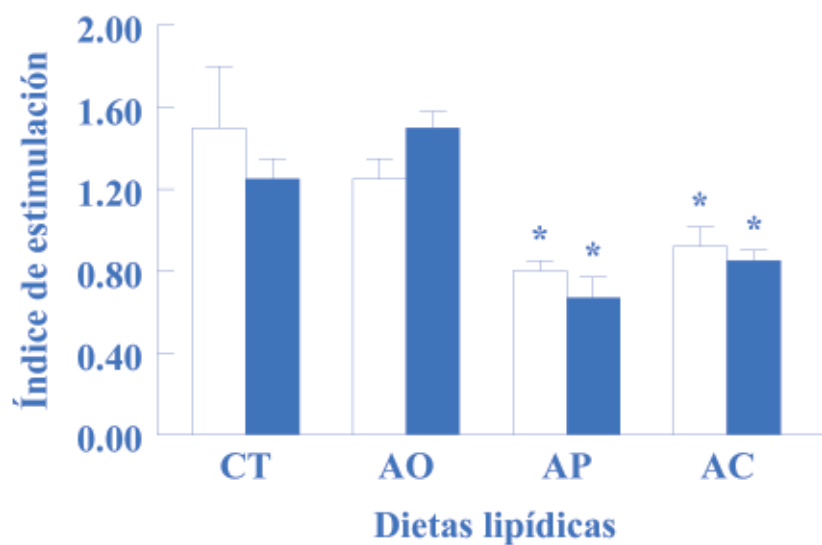


Figura 8. Medición de la proliferación de esplenocitos por mitógenos utilizando el método colorimétrico del MTT. Los esplenocitos se aislaron de ratones alimentados con dietas lipídicas y fueron incubados en presencia de lipopolisacárido (LPS) a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ (barras abiertas) o concanavalina A (Con A) a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ (barras cerradas) durante 24 h. Posteriormente el MTT fue añadido a cada pocillo e incubado durante 3 h. La proliferación de linfocitos fue cuantificada y los valores se expresaron como índice de estimulación ($n=5$ ratones en cada grupo experimental). Los datos son expresados como media error \pm estándar de la muestra de tres determinaciones independientes, calculados como densidad óptica de células tratadas en presencia del mitógeno dividido por la densidad óptica de células incubadas en ausencia del mitógeno. * $P < 0.05$ comparado con los valores del grupo control (alimentado con una dieta baja en lípidos). CT, control; AO, aceite de oliva; AP, aceite de pescado; AC, aceite de coco.

4.1.1.9. Análisis de la actividad bactericida

La eficiencia bactericida de las células peritoneales procedentes de ratones alimentados con las dietas experimentales se investigó mediante el cultivo de las células peritoneales con *L. monocytogenes*. De este modo se intentó demostrar la implicación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el aceite de pescado en la reducción de la capacidad bactericida de las células peritoneales expresada como bacterias supervivientes. Los ensayos llevados a cabo con células peritoneales procedentes de ratones alimentados con las respectivas dietas experimentales, demostraron un significativo incremento del número de bacterias supervivientes en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de pescado cuando estos valores se compararon con los obtenidos del grupo alimentado con la dieta de bajo contenido graso (grupo control) ($P < 0.05$). En otras palabras, la capacidad de estas células para eliminar las bacterias está significativamente reducida (Figura 9).

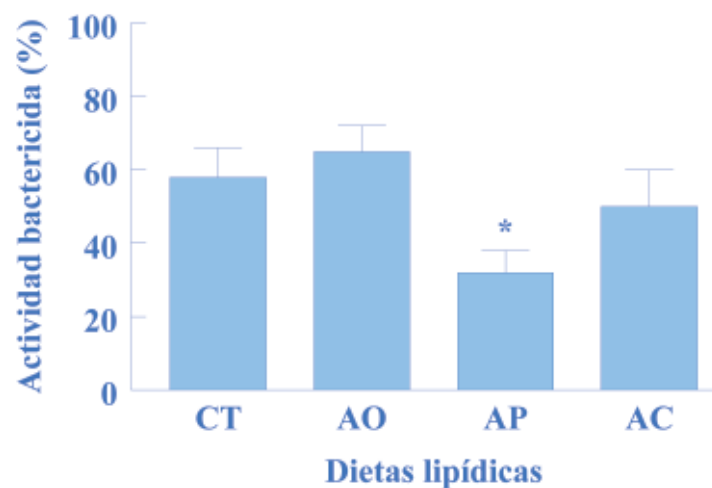


Figura 9. Medición de la actividad bactericida de células peritoneales procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados con *Listeria monocytogenes*. Los resultados representan el número de bacterias recuperadas expresadas como el porcentaje de actividad bactericida. Los valores son expresados como media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes ($n=5$ en cada grupo experimental). * $P < 0.05$ comparado con los valores del grupo control (alimentado con la dieta baja en lípidos). CT, control; AO, aceite de oliva; AP, aceite de pescado; AC, aceite de coco.

4.1.1.10. Determinación de la adhesión/invasión de *Listeria monocytogenes*

La capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse e invadir las células procedentes del bazo de ratones alimentados con las diferentes dietas experimentales, ha sido otro de los parámetros cuantificados en este trabajo de investigación como muestran las Tablas 6 y 7. Todos los grupos alimentados con sus respectivas dietas demostraron un incremento tanto de la adhesión como de la invasión por *L. monocytogenes* durante el curso de la infección desde las 2 h hasta las 12 h. De este modo los valores de adhesión bacteriana en los grupos alimentados tanto con la dieta rica en aceite de oliva como con la dieta control (de bajo contenido en grasa), fueron idénticos y no se diferenciaron de manera sustancial durante el proceso de infección por *L. monocytogenes*. Sin embargo, es importante señalar que la adhesión en células de ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado fue menor que la adhesión en células de ratones alimentados con la dieta control (Tabla 6). De hecho, estos valores fueron significativamente menores respecto a los obtenidos en el grupo control durante el curso de la infección (de 2 a 12 h) ($P < 0.05$). Los niveles de invasión por *L. monocytogenes* en células de ratones alimentados con la dieta rica en aceite de coco fueron significativamente menores que los encontrados en el grupo control tras 10 y 12h de incubación con la bacteria (Tabla 7).

Tabla 6. Alteración del factor de adhesión en células esplénicas de ratones alimentados con dietas lipídicas e incubadas en presencia de *L. monocytogenes*

Grupos Experimentales	Adhesión (\log_{10} de bacterias viables)					
	2 ^a	4	6	8	10	12
Control	6.30 ± 0.12	6.47 ± 0.13	7.18 ± 0.04	7.27 ± 0.03	7.48 ± 0.02	7.49 ± 0.05
Aceite de oliva	6.01 ± 0.03	6.50 ± 0.16	7.19 ± 0.02	7.23 ± 0.05	7.30 ± 0.08	7.35 ± 0.06
Aceite de pescado	5.60 ± 0.15	5.75 ± 0.12	6.02 ± 0.20*	6.43 ± 0.09*	6.62 ± 0.20*	6.96 ± 0.20*
Aceite de coco	6.50 ± 0.18	6.67 ± 0.20	7.28 ± 0.06	7.33 ± 0.10	7.59 ± 0.15	7.91 ± 0.25

^a Horas de incubación en presencia de *L. monocytogenes*. Media ± error estándar de la media de tres determinaciones independientes ($n=3$ en cada grupo experimental). * $P < 0.05$ comparado con el grupo control en el mismo período de tiempo.

Tabla 7. Alteración del factor de invasión en células esplénicas de ratones alimentados con dietas lipídicas e incubadas en presencia de *L. monocytogenes*

Grupos Experimentales	Invasión (log ₁₀ de bacterias viables)					
	2 ^a	4	6	8	10	12
Control	4.21 ± 0.06	4.20 ± 0.03	5.53 ± 0.06	6.00 ± 0.02	6.68 ± 0.02	7.25 ± 0.08
Aceite de oliva	4.90 ± 0.35*	4.60 ± 0.30	5.70 ± 0.17	5.84 ± 0.10	5.93 ± 0.08*	6.30 ± 0.09*
Aceite de pescado	4.32 ± 0.20	4.61 ± 0.20	5.20 ± 0.05*	5.92 ± 0.10	6.45 ± 0.15	7.01 ± 0.12
Aceite de coco	3.91 ± 0.25	4.20 ± 0.04	5.60 ± 0.50	5.80 ± .0.15	5.95 ± 0.20*	6.10 ± 0.20*

^a Horas de incubación en presencia de *L. monocytogenes*. Media ± error estándar de la media de tres determinaciones independientes ($n=3$ en cada grupo experimental). * $P<0.05$ comparado con el grupo control en el mismo período de tiempo.

4.1.1.11. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

La cuantificación de la producción de peróxidos lipídicos se llevó a cabo mediante la utilización de una técnica colorimétrica basada en la reducción del nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma). El NBT es una sal que en presencia de superóxidos sufre un proceso de reducción dando lugar a la producción de una sal insoluble de formazán. Dichas moléculas son liberadas por los macrófagos (Witz and Czerniecki, 1988).

El análisis de la generación de aniones superóxido en células aisladas de ratones alimentados con las diferentes dietas experimentales, se llevó a cabo en células peritoneales de ratón cultivadas tanto en presencia como en ausencia de *L. monocytogenes*.

Los resultados obtenidos demostraron una mayor producción de superóxidos en células infectadas por *L. monocytogenes* procedentes de todos los grupos experimentales (Figura 10). De los grupos experimentales cuyas células se cultivaron en ausencia de *L. monocytogenes*, el mayor aumento en la producción de superóxidos se observó en las células procedentes de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva o aceite de pescado (Figura 10A), comparando estos valores con los obtenidos en el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido en lípidos ($P<0.05$). De forma similar, la generación de aniones superóxido de células procedentes de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y aceite de pescado e incubadas en presencia de *L. monocytogenes*, también se observó

incrementado de manera significativa comparado con los valores obtenidos en el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido en grasa (Figura 10B).

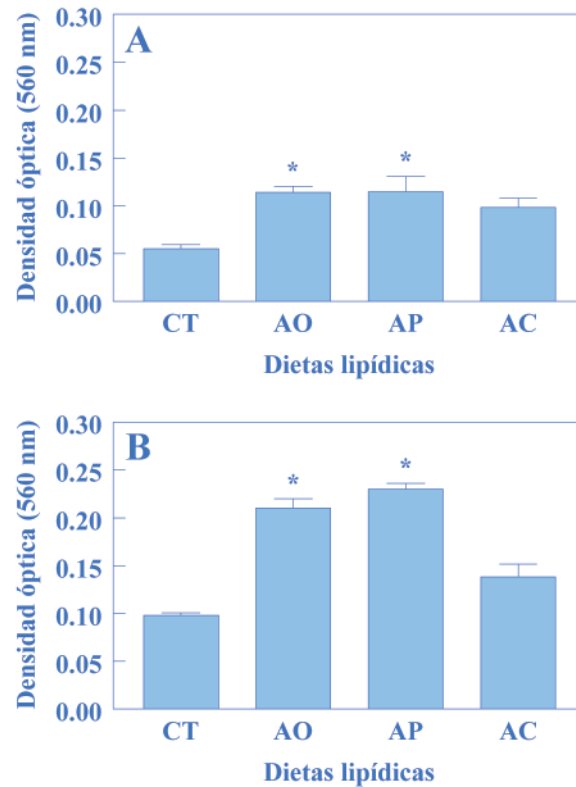


Figura 10. Análisis de la generación de anión superóxido por nitroblue tetrazolium (NBT). A) representa la determinación de radicales superóxido mediante un ensayo de reducción de NBT en células de ratones alimentados con dietas lipídicas durante cuatro semanas en ausencia de *L. monocytogenes* ($n=5$ en cada grupo experimental). B) representa la determinación de radicales superóxido mediante un ensayo de reducción de NBT en células de ratones alimentados con dietas lipídicas durante cuatro semanas en presencia de *L. monocytogenes* ($n=5$ en cada grupo experimental). La medición de anión superóxido fue llevada a cabo en un espectrofotómetro a 560 nm. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ comparado con los valores del grupo control (alimentado con una dieta baja en lípidos). CT, control; AO, aceite de oliva; AP, aceite de pescado; AC, aceite de coco.

4.1.1.12. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

El análisis de la producción de ROS en células esplénicas procedentes de animales alimentados con las dietas lipídicas se llevó a cabo en ausencia y en presencia de *L. monocytogenes*. Las células se incubaron junto con las bacterias durante 6 y 12 h.

Los resultados obtenidos demuestran que existe un marcado efecto de la dieta en la producción de ROS en aquellas células incubadas en presencia de *L. monocytogenes* en comparación con las células incubadas en ausencia de *L. monocytogenes*. Respecto a los resultados obtenidos del grupo alimentado con la dieta control (de bajo contenido en grasa), la producción de ROS en las células cultivadas en presencia de *L. monocytogenes* no incrementó de manera significativa (Figura 11A). Por el contrario, la producción de ROS en células incubadas con *L. monocytogenes* se redujo en los grupos alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva ($P<0.05$) y aceite de pescado (Figuras 11B y 11C). La alteración mas significativa en la producción de ROS se observó en el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de coco, en el cual la producción de estas sustancias reactivas se incrementó en presencia de *L. monocytogenes* tras 12 h de incubación con la bacteria ($P<0.05$) (Figura 11D).

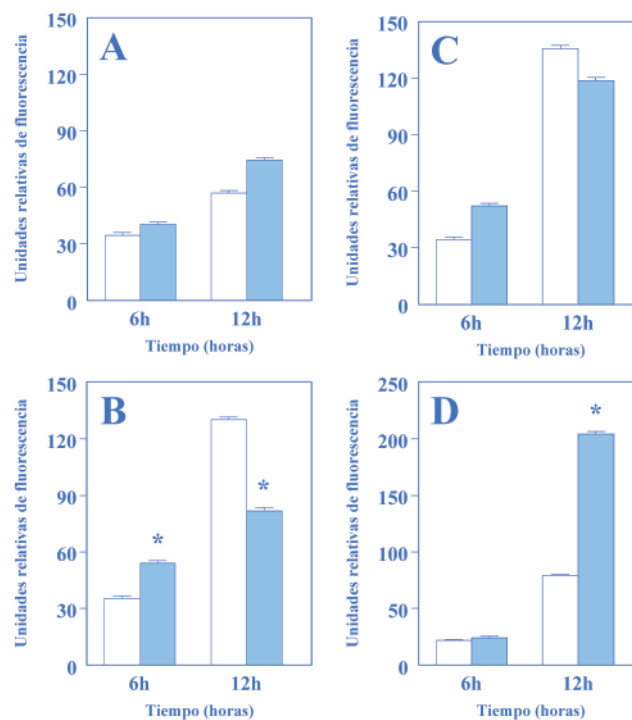


Figura 11. Medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células esplénicas aisladas de ratones alimentados con las dietas lipídicas e infectadas con *Listeria monocytogenes*. La producción de ROS celular fue cuantificada por el método de desacilación intracelular del H_2DCFDA a la sustancia fluorescente 2´7´ diclorodihidrofluoresceína. La medición de la producción de ROS fue llevada a cabo en ausencia (barras abiertas) o en presencia de *L. monocytogenes* (barras cerradas). A) representa la producción de ROS en células de ratones alimentados con la dieta baja en lípidos (dieta control). B) aceite de oliva. C) aceite de pescado. D) aceite de coco. Cada experimento fue llevado a cabo en triplicado y repetido tres veces. Los datos son expresados como media \pm error estándar de la media de tres determinaciones independientes ($n=3$ en cada grupo experimental). * $P<0.05$ comparado con los valores en ausencia de *L. monocytogenes* dentro de cada grupo.

4.1.1.13. Determinación de la actividad de proteasomas

La actividad de proteasomas de células aisladas de ratones alimentados con las respectivas dietas experimentales se midió para establecer el posible efecto de una bacteria intracelular como *L. monocytogenes* en la proteólisis citosólica de células infectadas, así como la posible influencia de los lípidos de la dieta en la función de los proteasomas de timocitos. La actividad de los proteasomas de timocitos aislados de ratones alimentados con las dietas de elevado contenido graso, se redujo en presencia de *L. monocytogenes* a niveles similares a los obtenidos con el inhibidor de proteasomas MG132 ($P < 0.05$). Por el contrario, el inhibidor MG132 no llevó a cabo su función y no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de proteasomas cuando las células de todos los grupos experimentales ensayados se incubaron en presencia de *L. monocytogenes* (Tabla 8).

Tabla 8. Medición de la actividad de proteasomas en timocitos procedentes de animales alimentados con dietas lipídicas e infectados con *Listeria monocytogenes*

Grupos Experimentales	Actividad de proteasomas (Unidades arbitrarias de fluorescencia)			
	Timocitos sin tratar	<i>L. monocytogenes</i>	MG132	<i>L. monocytogenes</i> + MG132
Control	16.0 ± 0.1	12.6 ± 0.2	6.4 ± 0.3	17.0 ± 0.3
Aceite de oliva	12.8 ± 0.3*	11.5 ± 0.2	9.6 ± 0.2	24.4 ± 0.5
Aceite de pescado	14.3 ± 0.3	9.5 ± 0.2	7.5 ± 0.2	11.6 ± 0.3*
Aceite de coco	12.2 ± 0.4*	15.1 ± 0.4	6.0 ± 0.2	15.1 ± 0.2

Los resultados son media ± error estándar de la media de tres determinaciones independientes ($n=5$ en cada grupo experimental)

* $P < 0.05$ comparado con los valores del grupo control dentro de cada columna.

4.1.1.14. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN

Para determinar el efecto de las dietas lipídicas y del tratamiento conjunto de *L. monocytogenes* y de las dietas lipídicas sobre la fragmentación de ADN, y por tanto sobre el proceso de apoptosis, se llevó a cabo el ensayo descrito en la sección de materiales y métodos para cuantificar la fragmentación de ADN. En este estudio se observó un importante incremento de la fragmentación de ADN en timocitos

procedentes de ratones alimentados con dietas ricas en aceite de oliva aceite y de pescado y cultivados en ausencia de *L. monocytogenes*. Por el contrario, la infección con *L. monocytogenes* no causó un significativo incremento en la fragmentación de ADN y los valores obtenidos en células cultivadas en presencia de dicha bacteria fueron prácticamente similares a los valores obtenidos en células incubadas en ausencia de *L. monocytogenes*; con excepción del grupo alimentado con la dieta de bajo contenido graso (dieta control), grupo en el cual el porcentaje de fragmentación de ADN de los timocitos infectados con *L. monocytogenes* fue superior al 38 % (Figura 12).

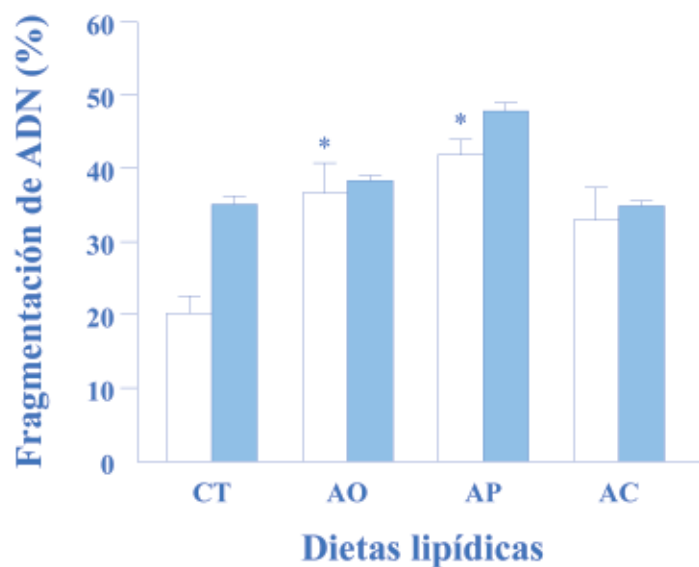


Figura 12. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN en timocitos de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados con *Listeria monocytogenes*. La medición de la fragmentación de ADN se ha llevado a cabo mediante el método de la difenilamina (DPA). El porcentaje de la fragmentación de ADN se ha calculado tal y como se describe en la sección de material y métodos. Los timocitos de los ratones alimentados con las dietas lipídicas fueron incubados en ausencia (barras abiertas) o en presencia de *L. monocytogenes* (barras cerradas). Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la muestra de tres determinaciones independientes ($n=5$ en cada grupo experimental). * $P<0.05$ comparados con los valores del grupo control.

4.1.1.15. Actividad de caspasa-3

La activación de caspasas es uno de los principales eventos que tienen lugar en el proceso de apoptosis. En este estudio se llevó a cabo la cuantificación de la caspasa-3, una proteasa citoplasmática responsable de la degradación del ADN. En el presente estudio, se demostró mediante un ensayo fluorimétrico que los niveles de caspasa-3 se vieron incrementados en las células procedentes de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva o aceite de pescado y cultivadas en ausencia de *L. monocytogenes*, comparándolos con los datos procedentes de los timocitos de ratones alimentados con la dieta de bajo contenido graso (Figura 13). Sin embargo se observó una inhibición en la actividad de caspasa-3 cuando los timocitos de los ratones alimentados con las dietas experimentales se incubaron en presencia de *L. monocytogenes*. Igualmente, la producción de caspasa-3 se redujo en aquellos cultivos de timocitos incubados en presencia del inhibidor de caspasa-3, Ac-DEVD-CHO, aunque los datos más significativos se obtuvieron en aquellos cultivos de timocitos procedentes de ratones alimentados con las dietas experimentales e incubados en presencia tanto del inhibidor de caspasa-3 como de *L. monocytogenes*. En estos grupos se observó que el inhibidor de caspasa-3 no ejerce su función inhibitoria cuando se encuentra en presencia de *L. monocytogenes* (Figura 13).

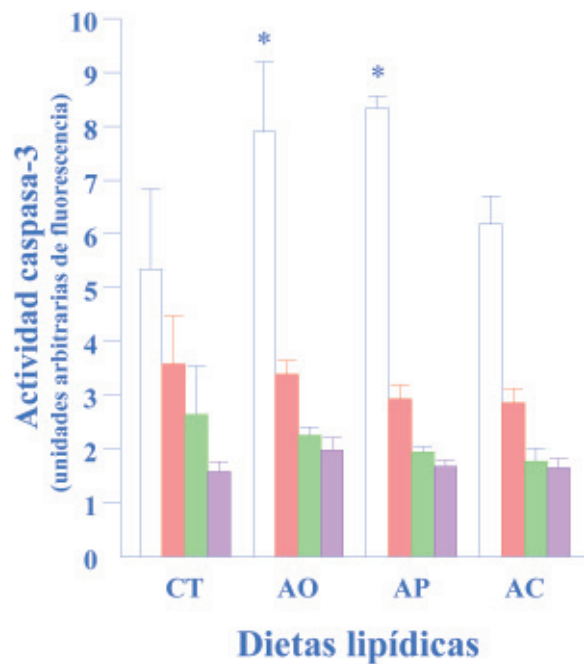


Figura 13. Determinación de la actividad de caspasa-3 en timocitos de ratones alimentados con dietas lipídicas y experimentalmente infectados con *Listeria monocytogenes*. La actividad de caspasa-3 fue determinada mediante la utilización de un EnzCheck Caspase-3 assay kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la inhibición de la caspasa-3 se utilizó el inhibidor específico acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO). Los timocitos de los ratones alimentados con las dietas lipídicas fueron incubados en ausencia de *L. monocytogenes* (barras blancas), en presencia de *L. monocytogenes* (barras rojas), en presencia del inhibidor de caspasa-3 (barras verdes) o en presencia del inhibidor de caspasa-3 y de *L. monocytogenes* (barras violetas). Los datos son expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los valores representan la media \pm error estándar de la media de tres determinaciones independientes. * $P < 0.05$ comparados con sus respectivos valores del grupo control.

4.1.2. Transplante con linfoma murino (LSTRA)

4.1.2.1. Ensayos de supervivencia tras el trasplante con el linfoma murino LSTRA

Tras el periodo de alimentación de los ratones con las correspondientes dietas experimentales, el linfoma murino LSTRA fue trasplantado, tal y como se ha descrito previamente en el capítulo de materiales y métodos.

La Figura 14 demuestra el porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con dietas de elevado contenido graso tras el transplante de un linfoma murino. Los

resultados demuestran una significativa reducción de la supervivencia en aquellos ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado tras el trasplante de LSTRA, comparado con la supervivencia de aquellos ratones alimentados con una dieta baja en lípidos (dieta control) (Figura 14B). En este grupo (animales alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado) el 100 % de los animales murieron a los seis días del trasplante con el linfoma. Por el contrario, los animales alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva (Figura 14A) o aceite de coco (Figura 14C), mostraron un porcentaje de supervivencia similar al observado en el grupo control, en los cuales sobrevivieron al trasplante con el linfoma murino LSTRA un 40 % y un 20 %, respectivamente.

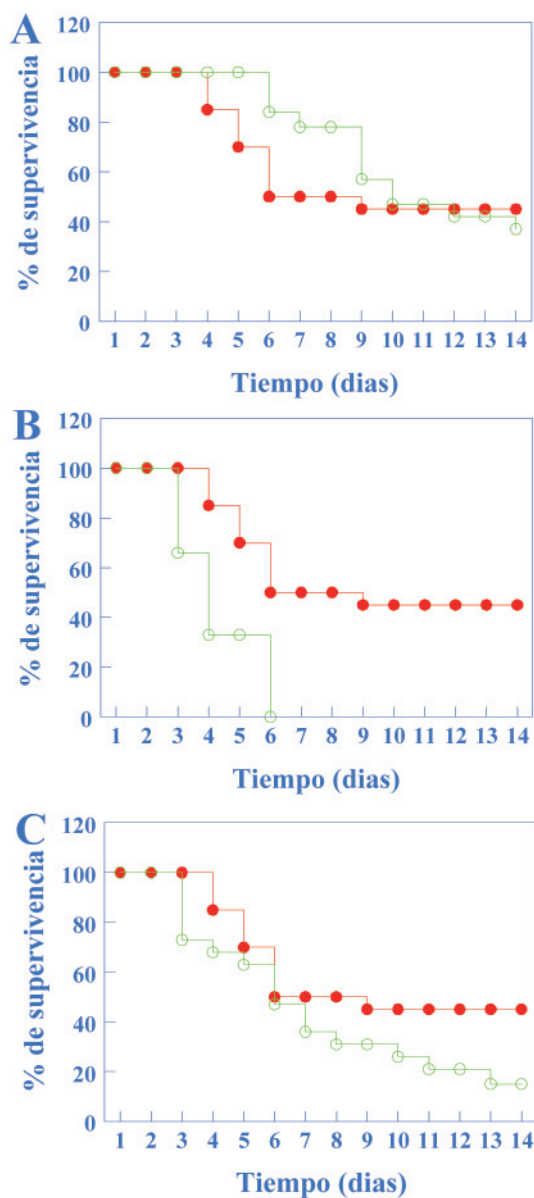


Figura 14. Porcentaje de supervivencia de los ratones alimentados con dietas lipídicas después del trasplante con el linfoma murino LSTRA. Los ratones fueron alimentados con sus respectivas dietas durante treinta días, transcurrido este tiempo fueron trasplantados con un linfoma murino LSTRA ($n=20$ en cada grupo experimental). Los círculos cerrados (líneas rojas) representan los porcentajes de supervivencia de ratones alimentados con la dieta control (baja concentración de lípidos). Los círculos abiertos (líneas verdes) representan los porcentajes de supervivencia de ratones alimentados con aceite de oliva (A), aceite de pescado (B) o aceite de coco (C). Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

4.1.2.2. Actividad de células natural killer (NK)

En el presente estudio, la actividad de las células NK se cuantificó en células esplénicas procedentes de ratones alimentados con las respectivas dietas experimentales antes (Figura 15A) y después (Figura 15B) de proceder al trasplante en estos animales de un linfoma murino. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la actividad de las células NK de los ratones alimentados con las dietas lipídicas se redujo de manera significativa tras el trasplante del tumor, sobre todo en aquellos animales alimentados con la dieta rica en aceite de pescado en comparación con los valores obtenidos en el grupo alimentado con la dieta control (de bajo contenido en grasa) (Figura 15B).

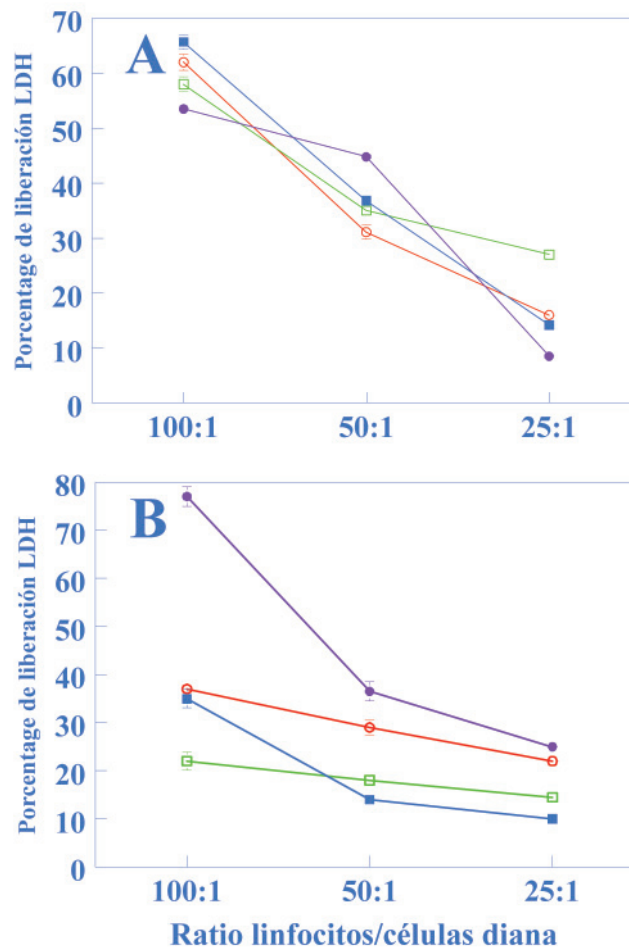


Figura 15. Efecto de dietas lipídicas sobre la actividad de células natural killer (NK) de esplenocitos antes A) y después B) del trasplante con el tumor murino LSTRA. Las células esplénicas fueron preparadas tal y como se describe en la sección de material y métodos y la citotoxicidad fue cuantificada mediante la liberación de LDH, siguiendo el protocolo del fabricante. Control (líneas violetas), aceite de oliva (líneas rojas), aceite de pescado (líneas verdes), aceite de coco (líneas azules). Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media de tres experimentos diferentes ($n=5$ en cada grupo experimental).

4.1.2.3. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de inhibidores de la fosfolipasa y ciclooxigenasa

La generación de aniones superóxido por reducción del NBT se ha utilizado para determinar los efectos que tanto del inhibidor de la fosfolipasa como del inhibidor de la ciclooxigenasa ejercen sobre la producción de peróxidos lipídicos en células peritoneales estimuladas con zymosan (compuesto por residuos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*).

Los ensayos *in vivo* llevados a cabo utilizando el inhibidor de la fosfolipasa quinacrina (QUIN) indicaron una significativa reducción de la generación de aniones superóxidos en células estimuladas con zymosan procedentes de ratones alimentados tanto con la dieta rica en aceite de oliva (Figura 16B) como con la dieta rica en aceite de coco (Figura 16D), en comparación con los valores obtenidos en el grupo control (alimentado con una dieta de bajo contenido en grasa) (Figuras 16A). En general, las dietas experimentales, con elevado contenido en grasa, incrementaron el efecto inhibitorio tanto de la QUIN como del inhibidor de ciclooxigenasa indometacina (IND), el cual ejercen sobre la producción de peróxidos lipídicos por parte de las células peritoneales (Figuras 17B y 17D), en comparación a los resultados obtenidos de los animales alimentados con la dieta control (Figura 17A).

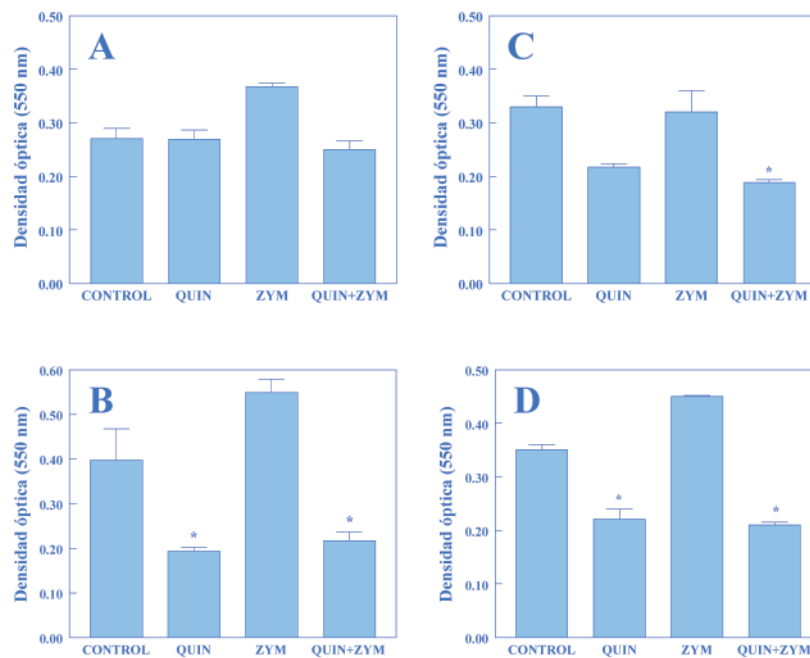


Figura 16. Determinación de la reducción de nitroblue tetrazolium (NBT) en células peritoneales tratadas con quinacrina (QUIN). El inhibidor de fosfolipasa quinacrina fue inyectado intraperitonealmente a una concentración de 1 mg/ml. Los ratones fueron tratados con zymosan sin opsonizar (procedente de *Saccharomyces cerevisiae*) a una concentración de 2 mg/ml, dos horas antes de ser sacrificados ($n=5$ en cada grupo experimental). La peroxidación lipídica fue determinada por reducción del NBT tal y como se describe en la sección de material y métodos. A) Representa las células peritoneales de animales alimentados con una dieta control, B) aceite de oliva, C) aceite de pescado, D) aceite de coco. Los resultados son expresados en valores de densidad óptica como media \pm error estándar de la media de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

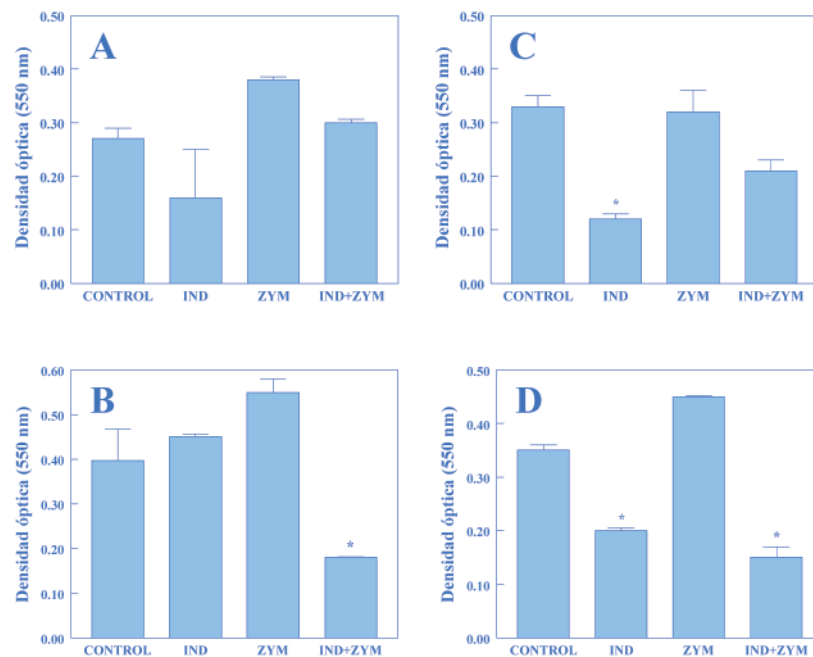


Figura 17. Determinación de la reducción de nitroblue tetrazolium (NBT) en células peritoneales tratadas con indometacina (IND). El inhibidor de la ciclooxigenasa indometacina fue inyectado intraperitonealmente a una concentración de 1 mg/ml. Los ratones fueron tratados con zymosan sin opsonizar (procedente de *Saccharomyces cerevisiae*) a una concentración de 2 mg/ml, dos horas antes de ser sacrificados ($n=5$ en cada grupo experimental). La peroxidación lipídica fue determinada por reducción del NBT tal y como se describe en la sección de material y métodos. A) Representa las células peritoneales de animales alimentados con una dieta control, B) aceite de oliva, C) aceite de pescado, D) aceite de coco. Los resultados son expresados en valores de densidad óptica como media \pm error estándar de la media de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4.2. ENSAYOS IN VITRO

4.2.1. Ensayos de viabilidad celular en presencia de inhibidores de la fosfolipasa, ciclooxigenasa o lipooxigenasa

Para llevar a cabo el estudio sobre los efectos potenciales de ciertos ácidos grasos en la funcionalidad de timocitos tras 72 h de incubación en presencia de diferentes inhibidores, se examinó la acción de los inhibidores de la fosfolipasa (quinacrina, QUIN), ciclooxigenasa (indometacina, IND) y lipooxigenasa (ácido nordihidroxiquirético, NDGA) en la viabilidad de timocitos murinos mediante el

ensayo colorimétrico con MTT. La Figura 18 representa la acción que los diferentes inhibidores ensayados ejercen sobre células tratadas con los ácidos grasos libres oleico (ácido graso monoinsaturado), eicosapentaenoico (ácido graso poliinsaturado) y esteárico (ácido graso saturado). Los datos mas significativos se obtuvieron en el grupo tratado con ácido eicosapentaenoico, en el cual se observó una relevante reducción de la viabilidad celular tras la incubación de las células durante 72 h en ausencia de los inhibidores de la fosfolipasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa ($P < 0.05$). Sin embargo, estos inhibidores suprimieron la pérdida de viabilidad celular cuando las células se incubaron en presencia de ellos. Además, sólo el inhibidor de la lipooxigenasa NDGA ejerció un efecto significativo en la recuperación de la viabilidad celular promovida por el ácido oleico y esteárico ($P < 0.05$).

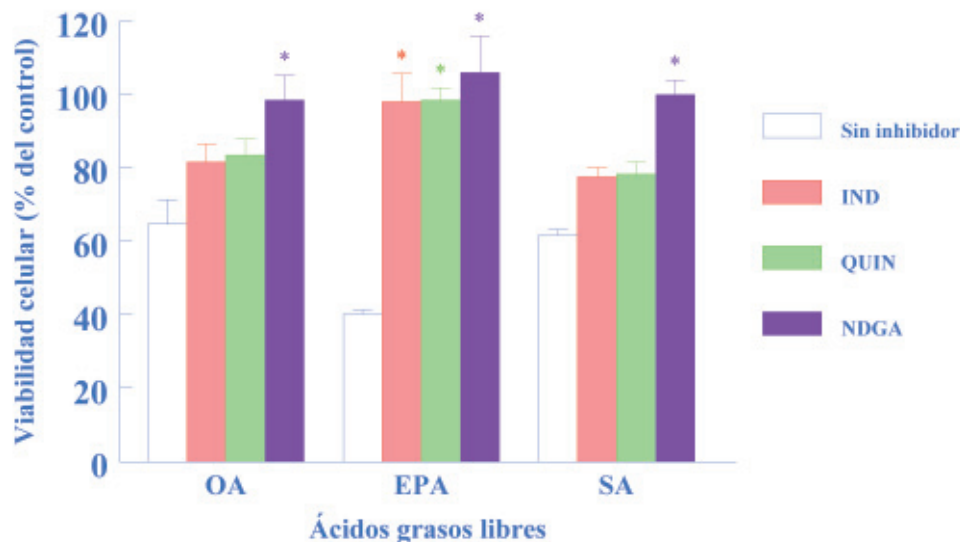


Figura 18. Acción de los inhibidores de fosfolipasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa sobre la viabilidad de linfocitos murinos tratados en presencia de ácidos grasos libres. La viabilidad celular fue determinada mediante la técnica colorimétrica del MTT después de la incubación de timocitos durante 72 h en presencia de ácidos grasos libres a una concentración final de 100 μ M y en presencia de inhibidores de fosfolipasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa; quinacrina (QUIN), indometacina (IND) y ácido nordihidroxiiguairético (NDGA), respectivamente a una concentración final de 10 μ M. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media de cinco determinaciones, obtenidos como porcentaje de inhibición relativa a las células control (células incubadas en ausencia de ácidos grasos libres o inhibidores). * $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. OA, ácido oleico; EPA, ácido eicosapentaenoico; SA, ácido esteárico.

4.2.2. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

Los aniones superóxido liberados por los macrófagos, reducen el NBT para producir cristales insolubles de formazán. La Figura 19 muestra la generación de aniones superóxido en células incubadas con ácidos grasos libres (oleico, eicosapentaenoico y esteárico). De los ácidos grasos ensayados es el eicosapentaenoico que causó un marcado incremento de la formación de superóxidos en comparación con células incubadas en ausencia de ácidos grasos libres (grupo control) ($P < 0.05$). Por el contrario los ácidos grasos oleico y esteárico no modificaron la formación de superóxidos con respecto al grupo control.

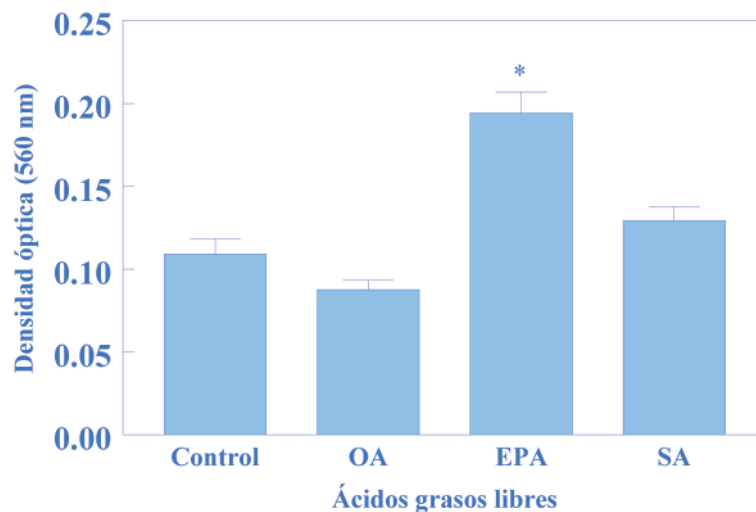


Figura 19. Análisis de la generación de anión superóxido por reducción de nitroblue tetrazolium (NBT). Determinación de la formación de anión superóxido en células incubadas con ácidos grasos libres a una concentración final de $100 \mu\text{M}$. Las células peritoneales fueron incubadas con ácidos grasos libres durante 24 h. El NBT fue añadido a los cultivos celulares a una concentración final de 1 mM e incubado durante 2 h. La cuantificación de la formación de anión superóxido se llevó a cabo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm . Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo comparado con los valores del grupo control. OA, ácido oleico; EPA, ácido eicosapentaenoico; SA, ácido esteárico.

4.2.3. Determinación de la actividad de proteasomas

La actividad de los proteasomas de células cultivadas en presencia de ácidos grasos libres se cuantificó para establecer el estado de los proteasomas tras el tratamiento

de las células con los ácidos grasos. Para evaluar la actividad de proteasomas, el inhibidor de proteasomas MG132 se utilizó como control positivo. Según los resultados obtenidos la actividad de proteasomas no se vio modificada en células tratadas con los ácidos grasos en comparación de aquellas células que no habían sido tratadas y que actuaban como grupo control. Aunque sí cabe señalar que la incorporación a los cultivos celulares de ácido esteárico, produjo una irrelevante reducción de la actividad de proteasomas en comparación con el grupo control. Además, la incorporación de ácidos grasos libres no afecta a la actividad inhibitoria del MG132 (Figura 20).

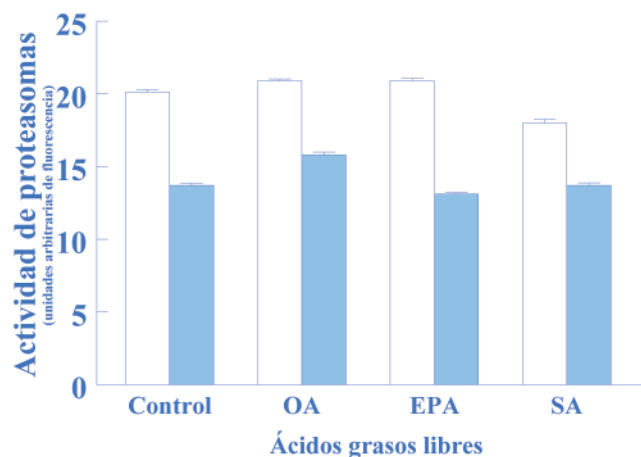


Figura 20. Determinación de la actividad de proteasomas en timocitos tratados en presencia de ácidos grasos libres. Los timocitos murinos fueron incubados durante 5 h en presencia de los ácidos grasos mencionados y el inhibidor de proteasomas MG132 fue añadido a una concentración de 30 μ M. Después de la incubación de timocitos, la células fueron incubadas en presencia del sustrato de proteasomas *N*-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine-4-methylcoumarin y la actividad de proteasomas fue determinada en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los experimentos fueron repetidos dos veces con resultados similares. OA, ácido oleico; EPA, ácido eicosapentaenoico; SA, ácido esteárico.

4.2.4. Medición de la proliferación con Sytox-green en células YAC-1

La inhibición de la proliferación celular por acción de diferentes ácidos grasos se confirmó mediante la utilización del marcador de ácido nucleico Sytox-green, el cual tiñe el ADN de las células viables. Los resultados de este ensayo indican que la proliferación celular se reduce debido a la acción de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3, como por ejemplo el ácido eicosapentaenoico, el cual es el que

ejerce una mayor acción inhibitoria sobre el parámetro estudiado. Comparando estos valores con los obtenidos en el grupo control (células incubadas en ausencia de ácidos grasos) (Tabla 9).

4.2.5. Análisis de la acumulación de triacilgliceroles con rojo nilo

La acumulación de triacilgliceroles en el citoplasma celular, tras la incubación de las células en presencia de ácidos grasos libres, fue otro de los parámetros cuantificados en este trabajo de investigación. La determinación de gotas lipídicas («lipid droplets») se llevó a cabo mediante la utilización de un marcador lipofílico (rojo nilo) que sirve para detectar la presencia de triacilgliceroles en el citoplasma celular. Los resultados obtenidos indican que los ácidos grasos poliinsaturados tanto de la serie *n*-3 como de la serie *n*-6, como por ejemplo ácido eicosapentaenoico, ácido linolénico o ácido araquidónico, incrementan de manera significativa la incorporación de gotas lipídicas en el interior de células YAC-1. De este modo, el número de gotas lipídicas fue mayor en células incubadas en presencia de ácido eicosapentaenoico que en aquellas que se incubaron en presencia de ácido oleico (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de diferentes ácidos grasos libres sobre la proliferación celular y la acumulación de triacilgliceroles en forma de gotas lipídicas en células tumorales YAC-1

Ácidos grasos	Unidades arbitrarias de fluorescencia	
	Sytox green	Rojo nilo
Control	3129 ± 995	1302 ± 697
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	1480 ± 618*	2492 ± 317*
Ácido linolénico (LNA)	2518 ± 589	2304 ± 324*
Ácido araquidónico (AA)	3110 ± 643	2458 ± 128*
Ácido linoleico (LA)	2493 ± 716	2071 ± 285
Ácido oleico (OA)	3051 ± 526	1772 ± 234
Ácido esteárico (SA)	2845 ± 789	1600 ± 92

Las células fueron incubadas en presencia de ácidos grasos libres a una concentración de 150 µM durante 24 h. Los resultados expresan la media ± error estándar de la media de tres experimentos en triplicado. Los valores son expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia. **P*<0.05 es considerado un valor estadísticamente significativo comparado con los valores de las células control (incubadas en ausencia de ácidos grasos libres).

4.2.6. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de las células YAC-1 debido a la presencia de determinados ácidos grasos libres, se llevó a cabo mediante una prueba de fluorescencia. En este ensayo se utilizó una sustancia llamada DCFH-DA que difunde de forma pasiva al interior celular donde las esterasas del citoplasma de las células liberan los acetatos y la oxidación del resto de la molécula (DCFH) por parte del peróxido de hidrógeno da lugar a una respuesta fluorescente.

Los resultados referentes a la cuantificación de ROS en células YAC-1 incubadas en presencia de diferentes ácidos grasos (Figura 21), demuestra un importante incremento de estas sustancias en células tratadas con los ácidos grasos linoleico y esteárico. Sin embargo el ácido eicosapentaenoico y el ácido araquidónico no dan lugar a una relevante producción de ROS en células YAC-1 tras 24 h de incubación con estos ácidos grasos libres.

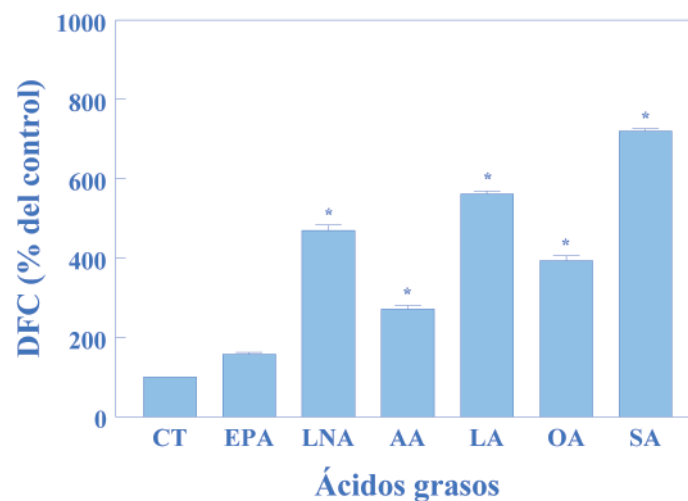


Figura 21. Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células YAC-1. Las células YAC-1 fueron tratadas en presencia de ácidos grasos a una concentración final de 150 μ M durante 24 h. La cantidad de especies reactivas de DCFH fue determinada. La cantidad de DCF fue expresada como porcentaje del control el cual fue considerado como 100 %. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes en triplicado. Un valor de $*P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. CT, control; EPA, ácido eicosapentaenoico; LNA, ácido linoleico; AA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; OA, ácido oleico; SA, ácido esteárico.

4.2.7. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN

La incubación de células de la línea tumoral YAC-1 en presencia de diferentes ácidos grasos a una concentración final de 150 μ M incrementó la fragmentación de ADN, parámetro cuantificado mediante el método de TCA (Figura 22). Cuando las células se trataron con el ácido graso linoleico, la fragmentación de ADN fue más marcada que la inducida por el ácido graso eicosapentaenoico, el linolénico o el araquidónico. Además, es importante señalar que oleico o esteárico también promueven un porcentaje de fragmentación de ADN más elevado que el ácido graso eicosapentaenoico, el linolénico o el araquidónico.

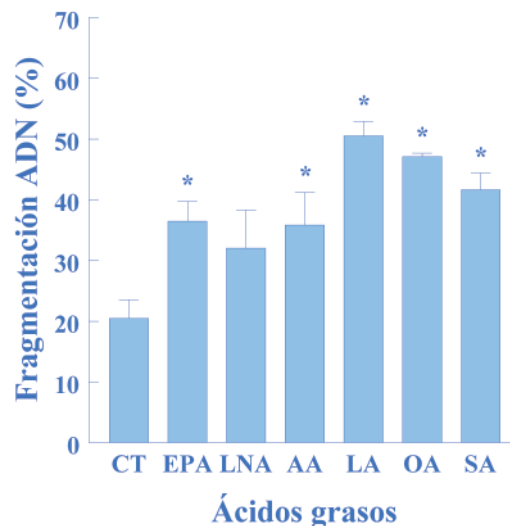


Figura 22. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN. Las células YAC-1 fueron incubadas en presencia de ácidos grasos libres a una concentración de 150 μ M durante 24 h. La fragmentación de ADN fue determinada por el ensayo de la difenilamina (DPA). Las células control fueron incubadas en ausencia de ácidos grasos libres. El porcentaje de la fragmentación de ADN fue calculado tal y como se definió en la sección de material y métodos. Los datos representan la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes por triplicado. Un valor de $*P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. CT, control; EPA, ácido eicosapentaenoico; LNA, ácido linoleico; AA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; OA, ácido oleico; SA, ácido esteárico.

4.2.8. Actividad de caspasa-3

En este estudio se evaluó la actividad de caspasa-3 en células YAC-1 cultivadas en presencia de ácidos grasos libres (Figura 23). Atendiendo a los resultados obtenidos,

la producción de caspasa-3 en células YAC-1 incubadas en presencia de ácido eicosapentaenoico o ácido araquidónico fue similar a la producción de caspasa-3 en células control (cultivadas en ausencia de ácidos grasos libres). Por el contrario, la producción de caspasa-3 incrementó en aquellas células que fueron incubadas en presencia de ácido linoleico, oleico o esteárico, en comparación de los valores obtenidos por otros ácidos grasos, mientras que la inhibición promovida por Ac-DEVD-CHO fue similar en todos los grupos analizados.

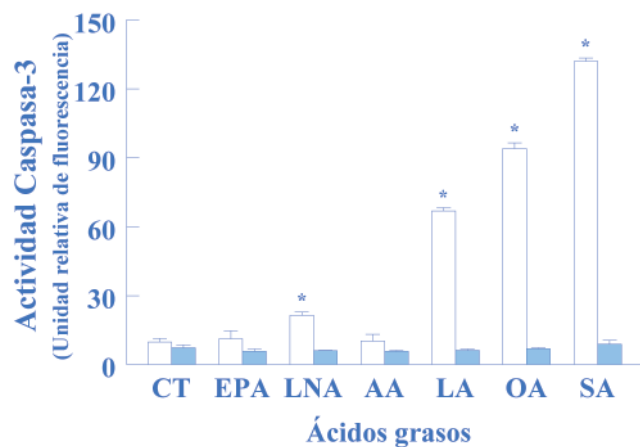


Figura 23. Determinación de la actividad de caspasa-3. Las células YAC-1 fueron incubadas en presencia de ácidos grasos libres a una concentración de 150 μ M durante 24 h. La actividad de la caspasa-3 (barras abiertas) fue cuantificada mediante la utilización de un kit (EnzCheck Caspase-3 Assay) siguiendo las instrucciones del fabricante. El inhibidor de caspasa-3 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (Ac-DEVD-CHO) fue utilizado para la inhibición de la actividad de caspasa-3 (barras cerradas). Los datos representan la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes en triplicado. Los resultados son expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia. Un valor de $*P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. CT, control; EPA, ácido eicosapentaenoico; LNA, ácido linoleico; AA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; OA, ácido oleico; SA, ácido esteárico.

5. Discusión

El estado nutricional del individuo es un factor crítico que influye directamente en la susceptibilidad del individuo frente a enfermedades de tipo infeccioso (Chandra, 1996a). Uno de los nuevos conceptos acuñados en los últimos años, la *Inmunonutrición*, hace referencia a la potencialidad de algunos nutrientes para modular la actividad del sistema inmune, y específicamente este término tiene como objetivo el de optimizar el estado clínico de un enfermo mediante la administración exógena de nutrientes a través de la ruta enteral o parenteral.

En los últimos años, numerosos estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han investigado el papel que algunos lípidos de la dieta desempeñan en la modulación del sistema inmune. Por lo tanto, los lípidos no sólo adquieren una gran relevancia como sustratos para la producción de energía o como componentes estructurales de la membrana plasmática, sino que también amplifican aun más sus funciones como participantes directos en la transmisión de señales intracelulares o bien como moduladores de las funciones del sistema inmune.

A principios de los años 80 algunos estudios epidemiológicos determinaron el papel que desempeña la ingesta de grandes cantidades de pescado en la alteración del sistema inmune. Estas investigaciones se llevaron a cabo en esquimales de Groenlandia, población que consumen habitualmente en su dieta grandes cantidades de pescado y aceite de pescado constituido principalmente por ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie $n-3$. A raíz de estos estudios se pudo determinar que en esta población la incidencia de enfermedades de naturaleza autoinmune era muy reducida. Este tipo de enfermedades están caracterizadas por una exacerbada respuesta inflamatoria y por consiguiente por una sobreactivación del sistema inmune. Por lo tanto, se logró establecer una interrelación nutrición-sistema inmune, y concretamente determinaron que las dietas que contienen ácidos grasos de la serie $n-3$ producen una supresión de este sistema. Estudios paralelos a estos también demostraron que si bien la incidencia de enfermedades de tipo autoinmune era muy reducida en esta población, la incidencia de tuberculosis era muy alta. Estos resultados sugirieron que probablemente la supresión del sistema inmune por la administración de ácidos grasos de la serie $n-3$ conducía a un aumento de la susceptibilidad del individuo frente a enfermedades de tipo infeccioso. Más

tarde otros estudios de tipo clínico y experimental comprobaron como los ácidos grasos de la serie *n*-3 reducen la resistencia inmune del individuo a agentes de tipo infeccioso.

En la actualidad la gran mayoría de estudios existentes en la literatura científica se han centrado fundamentalmente en la investigación de los efectos promovidos por el aceite de pescado sobre el sistema inmune y por la exploración de su posible aplicación como un nutriente beneficioso para la salud en humanos. Estudios más recientes han determinado que el aceite de oliva muestra además propiedades muy beneficiosas para la salud, no sólo por reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, sino también por disminuir la incidencia de cáncer y de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, el aceite de oliva al igual que el aceite de pescado se confirma como otro nutriente capaz de modular el sistema inmune de animales y de humanos y de modular la resistencia del individuo frente a enfermedades infecciosas.

En el presente estudio hemos trabajado con un modelo murino al cual se le ha administrado las dietas experimentales y posteriormente ha sido sometido a una infección experimental con *L. monocytogenes*. Este microorganismo ha sido elegido por ser una bacteria Gram positiva, que se transmite principalmente a través de alimentos contaminados, de crecimiento intracelular que produce grandes efectos citopáticos e infecciones en cortos períodos de tiempo. La utilización de listeriosis murina en modelos experimentales ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento sobre células y mediadores responsables de la inmunidad innata o no específica o de la inmunidad adquirida o específica.

5.1. ENSAYOS *IN VIVO* Y *EX VIVO*

5.1.1. Supervivencia de ratones a la infección experimental con *Listeria monocytogenes*

Investigaciones previas llevadas a cabo en el campo de la inmunonutrición sugieren que los lípidos de la dieta modulan las funciones del sistema inmune (de Pablo *et al.*, 2000a; Calder, 1998a). Los ácidos grasos de naturaleza insaturada están implicados en la alteración de numerosos parámetros que afectan de forma directa al sistema inmune (de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000). Algunas investigaciones han demostrado que la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 modula la proliferación de linfocitos (Endres *et al.*, 1989; Calder, 1995), síntesis de citoquinas (Endres *et al.*, 1989; Meydani, 1991), alteración de la actividad fagocítica (de Pablo *et al.*, 1998b; Calder *et al.*, 1990), actividad de células NK (Yaqoob, 1994a), expresión de moléculas de superficie (Hughes *et al.*, 1996),

etc. Como resultado de estos efectos moduladores, algunas dietas ricas en lípidos se han aplicado en la resolución de enfermedades de carácter autoinmune, que se caracterizan por una sobreactivación del sistema inmune del individuo. Esta aplicación se debe a las propiedades antiinflamatorias atribuidas a los lípidos presentes en la dieta (Kremer *et al*, 1990). Sin embargo, tal y como hemos mencionado con anterioridad, esta acción inmunosupresora asociada a los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 puede producir efectos perjudiciales ya que tiene lugar una reducción de la resistencia inmune del individuo, disminuyendo la defensa frente a enfermedades de tipo infecciosos promovidas por bacterias, virus o parásitos.

Pocos estudios se han llevado a cabo hasta el momento que demuestren la acción de algunas dietas en animales sometidos a una infección experimental con un agente patógeno. Incluso entre los trabajos existentes en este ámbito han aparecido ciertos resultados discrepantes. Así, algunos autores sugieren que los ácidos grasos poliinsaturados reducen la resistencia inmune en animales sometidos a una infección experimental con *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Salmonella typhimurium* (Fritsche *et al*, 1997; Paul *et al*, 1997; Chang *et al*, 1992), mientras que otros por el contrario indican que los ácidos grasos de naturaleza poliinsaturada son capaces de modular la respuesta inmune y como consecuencia, disminuyen el proceso infeccioso, ya que reducen la actividad inflamatoria y un posible shock anafiláctico (Björsson *et al*, 1997), o bien otros estudios sugieren que la administración de algunas dietas lipídicas no afectan a la supervivencia en dos modelos murinos infectados con *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella typhimurium* (Clouva-Molyvdas *et al.*, 1992).

De esta forma los aspectos beneficiosos que ostenta la manipulación de los lípidos de la dieta en la reducción de desórdenes inflamatorios deben de estar equilibrados con los efectos que ejercen estas dietas lipídicas sobre la resistencia inmune del individuo que será un factor crucial para la eliminación de microorganismos infecciosos.

El presente estudio revela que la supervivencia de animales alimentados durante 30 días con las dietas ricas en aceite de oliva o aceite de coco, es mayor que la supervivencia de los ratones alimentados con las dietas de bajo contenido en grasa (dieta control) o la dieta rica en aceite de pescado. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Peck *et al.* (Peck *et al*, 1990), quien demostró que los animales alimentados con una dieta rica en aceite de pescado mostraban una menor resistencia a una infección con *Pseudomonas aeruginosa*. También nuestros resultados son similares a los obtenidos por Fritsche *et al.* (Fritsche *et al*, 1997) en animales alimentados con dietas que contienen aceite de pescado y sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes*. En este trabajo se muestra que la supervivencia

de ratones alimentados con dietas que contienen grasas animales (compuesta fundamentalmente por ácidos grasos de naturaleza saturada), es mayor que la supervivencia de animales en otros grupos alimentados con dietas ricas en aceite de soja o de sardina (compuestos fundamentalmente por ácidos grasos de la serie $n-6$ y $n-3$, respectivamente). Sin embargo, existen otros estudios recientes que sugieren que la supervivencia de ratones alimentados con dietas que contienen aceite de pescado, es mayor que en aquellos grupos alimentados con dietas ricas en aceite de oliva, girasol o maíz (Björnsson *et al.*, 1997; Blok, *et al.*, 1992; Mascioli *et al.*, 1988). Estas discrepancias se deben probablemente no sólo a las diferentes acciones que sobre el sistema inmune ejercen los ácidos grasos poliinsaturados, sino también a las diferencias que existen entre poblaciones celulares y diferentes metodologías empleadas en la fase experimental (Blok *et al.*, 1996; Netea *et al.*, 1999). Algunos de estos autores sugieren que los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de reducir los efectos de la endotoxina, al reducir las dietas lipídicas la producción de citoquinas de tipo inflamatorio, así incrementan la supervivencia de los animales de experimentación. En cambio, otros estudios indican que el aumento de las citoquinas de tipo inflamatorio por la acción de lagunas dietas lipídicas es responsable de un aumento en la eficiencia del sistema inmune del animal para eliminar al agente infeccioso. Independientemente de estos estudios, nuestros resultados y otras investigaciones corroboran que las dietas lipídicas de naturaleza poliinsaturada (concretamente aquellas compuestas por ácidos grasos de la serie $n-3$) están implicadas en una reducción significativa de la resistencia inmune, siendo este hecho responsable en parte de una reducción de la supervivencia frente a la infección promovida por una dosis letal de *L. monocytogenes*. En cambio, la administración de una dieta que contiene aceite de oliva ejerce un efecto inmunosupresor menor que la promovida por el aceite de pescado y esto redundaría en una mayor supervivencia de los animales frente a la infección inducida por *L. monocytogenes*.

5.1.2. Supervivencia con *Listeria monocytogenes* y N-acetil-L-cisteína (NAC)

Tal y como se ha comentado con anterioridad, numerosos estudios han determinado que los ácidos grasos poliinsaturados son más inmunosupresores que los ácidos grasos monoinsaturados o saturados. Este hecho puede estar asociado a un proceso de oxidación ya que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie $n-3$ poseen propiedades pro-oxidantes. De hecho, diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que los ácidos grasos de la serie $n-3$ que se encuentran en sangre y tejidos, reducen los niveles de antioxidantes como la vitamina E en comparación con los ácidos grasos de la serie $n-6$ (Fritsche *et al.*, 1992). De este modo el efecto

perjudicial que la reducción en los niveles de vitamina E ejerce sobre los tejidos, se ha asociado a la acción de los ácidos grasos de la serie *n*-3 que están contenidos en el aceite de pescado mas que a otros factores.

Con el objeto de demostrar la acción de los antioxidantes sobre la función inmune en animales alimentados con dietas lipídicas, hemos utilizado la N-acetil-L-cisteína (NAC), un compuesto que actúa como fuente de cisteína y que permite la síntesis del antioxidante glutatión. Concretamente se estudió el efecto que tiene el NAC sobre la supervivencia de ratones alimentados con dietas lipídicas e infectados con *L. monocytogenes*, para intentar demostrar el posible papel de los procesos de oxidación en el incremento de la susceptibilidad del hospedador alimentado con dietas lipídicas frente a una infección experimental con este patógeno. Recientes estudios han demostrado que NAC mejora el estado inmunológico de pacientes con avanzada inmunodeficiencia (Muller *et al.*, 2000). La acción potencial de NAC podría explicarse porque es una sustancia que incrementa su protección frente al estrés oxidativo mejorando de esta forma las funciones del sistema inmune (De Rosa *et al.*, 2000). En el presente estudio es importante señalar el efecto protector que el antioxidante NAC ejerce sobre la supervivencia del grupo de animales alimentados con una dieta de bajo contenido en grasa (dieta control). Sin embargo también es importante considerar la ineficiente acción de esta sustancia en los grupos alimentados con dietas lipídicas, a pesar de la existencia de otros resultados que sugieren que NAC mejora la supervivencia en modelos murinos de sepsis microbiana. De este modo dichos resultados revelan que el antioxidante aumenta la infiltración de neutrófilos en el peritoneo permitiendo este hecho el incremento de la supervivencia de los ratones debido a una reducción del número de colonias bacterianas (Villa and Ghezzi, 1995; Villa *et al.*, 2002).

5.1.3. Recuperación de bacterias viables a partir del bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*

Para llevar a cabo este estudio partimos de ratones alimentados con sus respectivas dietas lipídicas y que fueron sometidos posteriormente a una infección experimental con el patógeno intracelular *L. monocytogenes*. A partir de este momento, fuimos obteniendo en diferentes períodos de tiempo los bazos de los ratones y a partir de ellos recuperamos las bacterias viables. Este parámetro nos dio información acerca del estado inmunológico del individuo y de la capacidad del mismo para eliminar la bacteria del organismo del hospedador.

De los ratones alimentados con las diferentes dietas experimentales, fue el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de coco el mas eficiente a la hora de eliminar las bacterias procedentes del bazo. Por el contrario, se aislaron un mayor número

de bacterias viables procedentes del bazo de los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de oliva y pescado. Las diferencias existentes entre los grupos de animales en cuanto a supervivencia y recuperación de bacterias viables del bazo, pueden deberse probablemente a los efectos que las dietas ricas en aceite de coco ejercen sobre el sistema inmune. Estudios recientes, demuestran que en los ratones alimentados con una dieta rica en aceite de coco durante 3 meses se ve incrementada de manera significativa la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos (de Pablo *et al.*, 1998a). Además está ampliamente aceptado que los ácidos grasos saturados no promueven supresión de las funciones inmunes como las llevadas a cabo por los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados (Calder, 1995). También existen otros parámetros relacionados con el aclaramiento bacteriano en ratones alimentados con dietas lipídicas y sometidos a una infección experimental, como por ejemplo la actividad fagocítica de las células peritoneales del ratón o la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. En cuanto a la actividad fagocítica, el número de células peritoneales de ratones alimentados con una dieta rica en aceite de coco se ve incrementado cuando el animal es sometido a una infección con *L. monocytogenes* (de Pablo *et al.* 2000b). Este hecho podría favorecer la eliminación de bacterias y la menor presencia de las mismas en el bazo de estos ratones. Sin embargo, Fritsche *et al.*, sugiere que la correlación entre recuperación de bacterias y supervivencia no es directa, puesto que en animales alimentados con la dieta que contenía aceite de pescado, el número de bacterias recuperadas del bazo incrementó, mientras que las bacterias recuperadas a partir del hígado de esos mismos animales fue prácticamente nulo (Fritsche *et al.*, 1997). De hecho, muchos factores parecen contribuir a la determinación de los efectos letales producidos por una infección bacteriana y si unimos además las diferentes discrepancias mencionadas con anterioridad, podemos así establecer tres categorías: *i) modelos animales, ii) agente infeccioso y iii) consideraciones de tipo nutricional.* En el primer caso hay que tener presente que la susceptibilidad genética a diferentes patógenos varía entre las distintas cepas de ratones (Rubin *et al.*, 1989). En segundo lugar, un hecho crucial es la diferencia que existe entre los distintos patógenos en cuanto a su naturaleza, por ejemplo, si se requiere una respuesta humoral o celular para la eliminación del microorganismo, ya que numerosas investigaciones han indicado que los ácidos grasos afectan principalmente a la inmunidad celular más que a la inmunidad humoral (Bennett *et al.*, 1987; Peck, 1994). Finalmente, entre las diferentes consideraciones nutricionales, el tipo de dieta lipídica es quizás el factor más importante en el diseño del estudio; la administración de dietas suplementadas con vitaminas o carentes de ácidos grasos esenciales pueden ser argumentos suficientes para que estos factores alteren la respuesta inmune independientemente de la capacidad inmunomoduladora de algunos ácidos grasos incluidos en las dietas lipídicas.

También es posible que la reducción de la resistencia de los ratones a la infección de *L. monocytogenes* pueda deberse a los efectos que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 ejercen sobre el complejo murino Ia (equivalente del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en humanos) (Hughes *et al.*, 1996). La expresión de esta molécula en células fagocíticas procedentes de ratones alimentados con dietas ricas en aceite de pescado está reducida después de la administración de una dieta que contiene aceite de pescado en ratones experimentalmente infectados con *L. monocytogenes* (Fritsche *et al.*, 1992).

5.1.4. Recuperación de bacterias viables del bazo de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* y tratados con N-acetil-L-cisteína (NAC)

La recuperación de bacterias viables a partir de bazo de ratones infectados con *L. monocytogenes*, está íntimamente relacionado con la supervivencia que presentan dichos ratones a una infección experimental con dicha bacteria.

Como consecuencia de la administración de dietas ricas en ácidos grasos de la serie *n*-3, es bien sabido que se produce una reducción de ciertas funciones del sistema inmune. Como resultado de todo esto, es beneficiosa la aplicación de dietas ricas en ácidos grasos de la serie *n*-3 en el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por una sobreactivación del sistema inmune. Pero este efecto positivo, puede no serlo tanto si tenemos en cuenta el comportamiento del individuo frente a una enfermedad de carácter infeccioso. En este caso, al estar disminuidas ciertas funciones inmunes, la resistencia del individuo frente al microorganismo responsable de la infección se ve igualmente reducida. Este hecho se encuentra bien documentado por la existencia de numerosos trabajos que han sido mencionados con anterioridad, en los cuales animales de investigación alimentados con dietas lipídicas son sometidos posteriormente a una infección experimental con *Mycobacterium tuberculosis* (Paul *et al.*, 1997), *Listeria monocytogenes* (Fritsche *et al.*, 1997), *Salmonella typhimurium* (Chang *et al.*, 1992). En todas estas investigaciones, los animales alimentados con dietas ricas en ácidos grasos de la serie *n*-3 presentan una menor supervivencia a la infección experimental con el microorganismo, y además la recuperación de bacterias viables a partir del bazo de los animales experimentalmente infectados es mayor.

En el presente estudio, analizamos la acción que el antioxidante NAC ejerce sobre la recuperación de bacterias a partir de bazo de ratones alimentados con diferentes dietas experimentales y sometidos además a una infección experimental con *L. monocytogenes* y a un tratamiento con NAC. Según los resultados obtenidos el antioxidante tiene un marcado efecto sobre el grupo alimentado con la dieta control (de bajo contenido en grasa). Los ratones

pertenecientes a este grupo que fueron tratados con el antioxidante además de presentar un mayor índice de supervivencia que los no tratados; también presentan una reducción en la recuperación de bacterias viables a partir de bazo. Por el contrario es importante señalar también la ineficiente acción que el antioxidante ejerce sobre aquellos ratones alimentados con el resto de las dietas experimentales. En estos grupos, la obtención de bacterias viables del bazo no disminuyó con respecto a los valores observados en aquellos ratones alimentados con las dietas lipídicas, infectados con *L. monocytogenes* pero no tratados con el antioxidante NAC. Sin embargo, existen otros resultados que sugieren que el tratamiento con NAC disminuye el número de colonias obtenidas a partir del bazo de ratones infectados e incrementa la supervivencia de los animales en caso de sepsis (Villa and Ghezzi, 1995; Villa *et al.*, 2002). Según estos autores, el antioxidante NAC incrementa la infiltración de neutrófilos en el peritoneo lo que permite la reducción del número de colonias bacterianas presentes en el bazo del ratón.

5.1.5. Viabilidad celular. Citotoxicidad

El objetivo perseguido con la determinación de este parámetro inmunitario, fue analizar la toxicidad que para las células del sistema inmune supone el crecimiento de *L. monocytogenes*, y como influyen los lípidos de la dieta en el comportamiento que las células pertenecientes a este sistema presentan frente a la infección promovida por dicha bacteria. Para ello los ratones fueron alimentados durante 4 semanas con sus respectivas dietas experimentales y pasado este tiempo se obtuvieron las células esplénicas de los ratones tratados. Dichas células se incubaron en presencia de una suspensión de *L. monocytogenes*, analizándose la viabilidad celular tras ser sometidas a la infección experimental con la bacteria.

Los resultados obtenidos en el presente estudio han revelado que la citotoxicidad asociada al crecimiento de *L. monocytogenes* se vio incrementada en aquellos ratones alimentados con la dieta rica en aceite de oliva (ácidos grasos monoinsaturados) y con la dieta que contenía una elevada proporción de aceite de pescado (ácidos grasos poliinsaturados). Por el contrario, se observó una significativa reducción de los efectos citotóxicos de la bacteria en aquellos ratones alimentados con la dieta rica en aceite de coco (ácidos grasos saturados) y con la dieta de bajo contenido en grasa. Estos datos fueron significativos tras 6 h de incubación de las células en presencia de la bacteria *L. monocytogenes*. Estos datos sugieren que el efecto potencial de la dieta rica en aceite de pescado sobre la citotoxicidad podría relacionarse con la reducción descrita previamente en la supervivencia de los ratones tras una infección experimental con *L. monocytogenes* y también a la ineficiente

capacidad para la eliminación de las bacterias presentes en bazo e hígado (de Pablo *et al.*, 2000b; Fritsche *et al.*, 1997). De este modo, un incremento en la citotoxicidad producida por la bacteria en los esplenocitos supondría un descenso en la resistencia de los ratones a una infección experimental y por tanto una menor supervivencia de los mismos tras ser sometidos al proceso infeccioso. De igual forma los efectos producidos por una dieta rica en aceite de coco sobre la citotoxicidad de *L. monocytogenes* puede estar asociada con la acción beneficiosa de esta dieta sobre la supervivencia de los ratones a una infección experimental con *L. monocytogenes*, así como sobre la recuperación de bacterias procedentes del bazo (de Pablo *et al.*, 2000b).

De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que el efecto citotóxico de *L. monocytogenes*, se ve incrementado en aquellos animales alimentados con la dieta rica en aceite de pescado (ácidos grasos de la serie *n*-3) que a su vez son el grupo de ratones que mayor mortalidad presenta tras una infección experimental con *L. monocytogenes*.

Por el contrario en ratones alimentados con la dieta rica en aceite de coco (constituida principalmente por ácidos grasos saturados), la citotoxicidad debida a la bacteria se ve disminuida y por tanto son animales que presentan un mayor índice de supervivencia tras la infección experimental. Sin embargo existe un trabajo cuyos resultados indican que la administración en la dieta de ácido linoleico conjugado (ácido graso de la serie *n*-3) no modifica la resistencia inmunológica de ratones a la infección con *L. monocytogenes*, ya que este tratamiento disminuye la liberación de factor de necrosis tumoral y otras citoquinas inflamatorias (Turnock *et al.*, 2001), responsables de reducir la resistencia a la listeriosis en ratones (Czuprynski and Haak-Frendscho, 1997). Parece claro por tanto, que el efecto citotóxico de *L. monocytogenes* sobre células de ratones alimentados con dietas ricas en lípidos podría ser diferente dependiendo del tipo de grasa presente en la dieta

5.1.6. Proliferación celular

Es ampliamente conocido que la proliferación celular es uno de los parámetros de la función inmune que se ve afectada por la acción de los lípidos presentes en la dieta, sobre todo por acción de los ácidos grasos de la serie *n*-3 los cuales actúan favoreciendo la disminución en la proliferación de los linfocitos (Calder *et al.*, 1994). Recientemente algunos estudios han indicado que el cultivo de monocitos en presencia tanto de ácido eicosapentaenoico como de ácido docosahexaenoico reduce la expresión en la superficie celular de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) así como de otras moléculas de adhesión de monocitos en humanos (Hughes and Pinder, 2000; Hughes *et al.*, 1996). Estos

resultados parecen indicar que los ácidos grasos, contenidos en el aceite de pescado, podrían dañar la interacción que tiene lugar entre células T y las células presentadoras de antígenos durante el proceso de reconocimiento antigénico. Como consecuencia de este hecho puede existir un efecto perjudicial sobre el individuo ya que la defensa frente a bacterias y otros antígenos se encuentra alterada (Sanderson *et al.*, 1997). Del mismo modo se observó una reducción en la expresión de las moléculas de superficie CD4 y CD8 en la superficie celular tras una suplementación con ácido docosahexaenoico (Sasaki *et al.*, 2000).

Los resultados del presente trabajo han confirmado que algunos lípidos contenidos en la dieta están relacionados con una reducción en la proliferación de linfocitos estimulados con Con A o LPS. De este modo, las dietas ricas en aceite de pescado (con elevado contenido en ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico) y en aceite de coco (rico en ácidos grasos saturados) van a ser responsables de la significativa reducción observada en la proliferación de linfocitos, comparando estos valores con los obtenidos en el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido en grasa, mientras que el aceite de oliva no suprime la proliferación de linfocitos, a pesar de que algunas investigaciones han sugerido que el aceite de oliva reduce la proliferación de linfocitos procedentes de animales alimentados con estas dietas (Yaqoob *et al.*, 1994b), mientras que en humanos el aceite de oliva no promueve ningún efecto supresor en la proliferación de linfocitos (Yaqoob *et al.*, 1998), tan sólo reduce los niveles de algunas moléculas de adhesión, lo cual puede tener una importante implicación en la reducción de enfermedades cardiovasculares (Yaqoob *et al.*, 1998; Yaqoob, 2002). Lo que sí está claro es que el aceite de oliva produce acciones inmunomoduladoras en ratones y ratas y que estos efectos son ejercidos por el ácido oleico más que por otros componentes que forman parte de esta grasa (Jeffery *et al.*, 1996b).

5.1.7. Análisis de la actividad bactericida

Como ha sido comentado con anterioridad la administración de una dieta rica en aceite de pescado (compuesto de forma mayoritaria por ácidos grasos de la serie *n*-3), supone una reducción en la supervivencia de los animales de experimentación a una infección con *L. monocytogenes* (de Pablo *et al.*, 2000b; Fritsche *et al.*, 1997) así como una disminución de la viabilidad de células del sistema inmune, en presencia de dicha bacteria. Todo esto por tanto supone que exista un incremento en el número de bacterias viables obtenidas del bazo de los ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado y sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes* (de Pablo *et al.*, 2000b).

Ambos parámetros, supervivencia de ratones y recuperación de bacterias viables, están íntimamente relacionados con la actividad bactericida que las células peritoneales del hospedador presentan tras la ingesta de una dieta rica en lípidos y la infección experimental con *L. monocytogenes*. Para llevar a cabo la determinación de este último parámetro las células peritoneales procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales se incubaron en presencia de una suspensión de *L. monocytogenes*. Tras el tiempo de incubación correspondiente se determinó el número de bacterias que habían sido fagocitadas por las células peritoneales del ratón. De este modo se analizó la acción que los diferentes lípidos de la dieta ejercen sobre la actividad fagocítica de las células peritoneales.

Nuestros resultados indican que aquellas células peritoneales procedentes de ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado, presentan una menor capacidad para eliminar las bacterias que las células procedentes de animales alimentados con otra cualquier dieta. Estos resultados se encuentran en concordancia con los aportados en otros trabajos de investigación en los cuales se observa una reducción en la capacidad para eliminar las bacterias tras una suplementación por vía oral de una dieta rica en aceite de pescado (D'Ambola *et al.*, 1991; Eicher *et al.*, 1995).

5.1.8. Determinación de la adhesión/invasión de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria de crecimiento intracelular. Esto significa que para poder llevar a cabo su ciclo de vida *L. monocytogenes* tiene que adherirse a las células del hospedador y posteriormente invadirlas. En el proceso de adhesión e invasión de las células por parte de la bacteria, juega un papel primordial la membrana plasmática de dichas células, cuya fluidez puede verse alterada debido a la manipulación de los lípidos presentes en la dieta. Todo esto nos hace pensar que si la fluidez de la membrana de las células se encuentra alterada, esto suponga una modificación en el proceso infectivo de la bacteria.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demuestran que tanto la adhesión como la invasión por *L. monocytogenes* no dependen de forma directa de la composición de los lípidos de la dieta, ya que en ambos parámetros el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva obtuvo los mismos resultados que el grupo alimentado con la dieta rica en aceite de coco. Estos resultados son opuestos a otros existentes en los cuales se afirma que una manipulación de los lípidos de membrana supone una alteración en la fluidez de membrana de las células que podría contribuir a un incremento de la susceptibilidad de las células a la infección (Calder *et al.*, 1994; Calder *et al.*, 1990). Sin embargo es importante resaltar que en nuestro trabajo tras la administración de la dieta rica en aceite de pescado (la más inmunosupresora), se determinaron menores niveles de adhesión. De este

modo estos resultados contradictorios indican que otros factores aparte de la adhesión e invasión, dan lugar a la reducción de la resistencia inmune a la infección por *L. monocytogenes* en células procedentes de ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado.

5.1.9. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) no son más que un tipo de radicales libres que son sintetizados por las células mediante procesos de oxidación derivados del metabolismo aeróbico. Dentro de los ROS se incluyen cuatro especies de radicales libres: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los más reactivos que son el radical hidroxilo (OH) y el radical peroxilo (ROO^\cdot). Los radicales libres juegan un importante papel en el desarrollo de la vida ya que intervienen en procesos críticos como la transducción de señales, transcripción genética y regulación de la actividad de determinados enzimas. Pero sin embargo también poseen ciertos efectos perjudiciales para la viabilidad celular ya que pueden causar la oxidación de algunas biomoléculas como proteínas, lípidos, aminoácidos y ADN; suponiendo este hecho un daño para la célula y por tanto la muerte de la misma. De este modo se puede afirmar que existen dos acciones distintas de los radicales libres en biología. Por una parte desempeñan el papel de moléculas reguladoras y de señalización a niveles fisiológicos, y por otra parte a niveles patológicos se convierten en oxidantes altamente dañinos y con un elevado efecto citotóxico.

El objetivo de la determinación de este parámetro en el presente trabajo de investigación fue monitorizar la actividad oxidativa de células procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas y que habían sido incubadas en presencia de *L. monocytogenes*, comprobando de este modo que efecto tienen los lípidos de la dieta en la capacidad oxidativa de las células y de que manera participa la bacteria en este proceso. Para ello se obtuvieron las células del bazo de ratones que habían sido alimentados con las dietas durante 4 semanas. Posteriormente estas células se incubaron durante 6 y 12 horas tanto en presencia como en ausencia de *L. monocytogenes*, y se trataron con un compuesto que difunde de manera pasiva al interior de las células, donde el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) oxida parte del componente dando lugar a un producto fluorescente. De este modo cuanto mayor sea la cantidad de H_2O_2 presente en el interior celular mayor será la fluorescencia detectada.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la producción de ROS se incrementó en todos los grupos de dietas ensayados con excepción del grupo alimentado con la dieta rica en aceite de oliva y el grupo alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, tras 12 h de infección con *L. monocytogenes*. En dichos grupos

experimentales la menor producción de ROS se debió probablemente al incremento de la citotoxicidad observada en ambos grupos, teniendo este hecho como consecuencia un marcado descenso de la viabilidad celular observada en los grupos alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y en aceite de pescado. Sin embargo en células procedentes de ratones alimentados con la dieta rica en aceite de coco e incubadas en ausencia de *L. monocytogenes* se observó una baja producción de ROS. Por el contrario las mismas células incubadas en presencia de la bacteria durante 12 h dieron lugar a una elevada producción de ROS. No obstante, existen estudios previos que determinan que no existe una relación directa entre la producción de ROS y la eliminación de *Listeria*, ya que se ha demostrado que ROS es relativamente inefectivo en la destrucción de esta bacteria en macrófagos activados (Godfrey and Wilder, 1984). De hecho un estudio reciente ha aportado que la liberación de ROS no juega un papel crucial en la erradicación de *L. monocytogenes*, aunque es interesante el hecho de que ROS pudiera estar implicado en la puesta en marcha de la respuesta celular (Ogawa *et al.*, 2001). De manera general, los niveles de citotoxicidad y la capacidad de las células para producir ROS, son dos factores que no afectan a la predisposición que las células presentan para ser invadidas por *L. monocytogenes*, de modo que estas propiedades de las células son independientes.

5.1.10. Medición de la generación de anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

Dentro del grupo de especies reactivas del oxígeno (ROS), existe un tipo de radical más reactivo que el H_2O_2 . Se trata del radical superóxido (O_2^-). El anión superóxido se forma por el escape de electrones procedentes de la cadena transportadora de electrones situada en la mitocondria, y la posterior reducción del oxígeno molecular (O_2). El radical superóxido, junto con el resto de las especies de radicales pertenecientes a la familia del ROS, es el responsable de la peroxidación lipídica. Proceso mediante el cual se podría promover la modulación de las funciones del sistema inmune (Allard *et al.*, 1997). El mecanismo de peroxidación lipídica es una forma de daño oxidativo que ocurre en membranas celulares cuando los ácidos grasos insaturados reaccionan con los niveles excesivos de ROS, para formar radicales de ácidos grasos e hidroperóxidos lipídicos. Ambos tipos de moléculas sintetizadas mediante este proceso causan alteraciones reversibles en la estructura y función de la membrana celular lo que puede suponer una modificación de las funciones de las células, incluidas las pertenecientes al sistema inmune. Contrariamente a esto, otros estudios han indicado que el proceso de peroxidación lipídica no parece constituir un factor importante capaz de modular las funciones del sistema inmune (Soyland *et al.*, 1993a).

El objetivo que se persiguió con la determinación de este factor, era el de evaluar si los lípidos presentes en las diferentes dietas experimentales daban lugar a un incremento en la producción de aniones superóxido por parte de las células del sistema inmune, y si este proceso se podía relacionar con la infección por *L. monocytogenes* y con la pérdida de resistencia del hospedador a una infección ocasionada por dicha bacteria. Para llevar a cabo este estudio, células peritoneales procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales, se incubaron durante 2 h en presencia y ausencia de *L. monocytogenes*. Pasado el tiempo de incubación se adicionó el reactivo NBT a cada uno de los pocillos para cuantificar la generación de anión superóxido. Posteriormente la reacción se detuvo y se midió la liberación de dicho radical mediante espectrofotometría.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la producción de anión superóxido se incrementó en células procedentes de animales alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y en aceite de pescado, y cultivadas en presencia de *L. monocytogenes*. De manera que la elevada generación del radical superóxido no solo se debe a la presencia de los lípidos administrados en la dieta, sino que también es una consecuencia del proceso infeccioso promovido por la bacteria; el cual produce un efecto sinérgico. Estos resultados indican que variaciones en la producción de radicales libres del oxígeno debido a la administración de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, no es un factor esencial para la eliminación de *L. monocytogenes*. De este modo se puede afirmar que la resistencia del hospedador a una infección por *L. monocytogenes* se ve disminuida, tanto por los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la dieta (de Pablo *et al.*, 2000b; Fritsche *et al.*, 1997; Paul *et al.* 1997; Chang *et al.*, 1992; Peck *et al.*, 1990), como por la incrementada generación de radicales superóxido. A pesar de todo lo anteriormente expuesto, otros autores afirman que la peroxidación lipídica no es un factor importante que afecte a la proliferación de linfocitos, y por tanto no es responsable de la modulación de las funciones de las células del sistema inmune por los ácidos grasos (Calder and Newsholme, 1993). Un posible hecho que explique la menor resistencia de los animales alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, sería la inhibición de dos citoquinas que juegan un papel muy importante en la defensa del hospedador frente a *L. monocytogenes* como son el interferón- γ (IFN- γ) y la interleukina 12 (IL-12) (Fritsche *et al.*, 2000).

5.1.11. Determinación de la actividad de proteasomas

El proteasoma es un complejo con actividad proteolítica que se localiza en el citosol de la mayoría de las células de mamíferos. Su función consiste en la generación de péptidos derivados de las proteínas intracelulares, sobre todo de aquellas sintetizadas

por virus y bacterias, que llevan a cabo su ciclo de vida en el interior de la célula. De esta forma el proteasoma es el responsable de la generación de más del 70% de las proteínas celulares y de la mayoría de los péptidos antigénicos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC de clase I) a los linfocitos T citotóxicos (Rock *et al.*, 1994). Como consecuencia de la relación existente entre proteasomas y presentación de antígenos, se puede afirmar que cuando concurre una modulación de la actividad de proteasomas tiene lugar una modificación de manera indirecta de la presentación de antígenos por parte del MHC de clase I. Esta afirmación está corroborada por York *et al.* (York *et al.*, 1999), los cuales afirman que la citoquina IFN- γ incrementa la actividad de proteasomas favoreciendo la presentación antigénica a los linfocitos T citotóxicos.

L. monocytogenes es una bacteria de crecimiento intracelular cuya participación en el transcurso de una infección ha sido ampliamente investigada en modelos murinos. En estos estudios se ha aportado que esta bacteria es capaz de sintetizar una serie de proteínas en el citosol celular, que son rápidamente degradadas por proteasomas utilizando el extremo amino terminal de las mismas para determinar el índice de degradación al cual deben ser sometidas. Como resultado de este proceso se obtienen una serie de péptidos antigénicos que son presentados a los linfocitos T citotóxicos (Finelli *et al.*, 1999).

El objetivo que se persiguió con la determinación de la actividad de proteasomas en este trabajo de investigación, fue comprobar si los lípidos presentes en la dieta eran capaces de modular la actividad de proteasomas y por lo tanto la presentación antigénica, tanto en animales sometidos a una infección experimental con *L. monocytogenes* como en animales sanos. Para ello partimos de timocitos de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales, los cuales se incubaron en presencia y ausencia de *L. monocytogenes* durante 2 h. Posteriormente, las células se incubaron junto con un sustrato fluorogénico y tras el periodo de incubación se midió la actividad de los proteasomas en un espectrofluorímetro. Se utilizó un inhibidor de la actividad de proteasomas (MG 132) como control negativo.

Según los resultados obtenidos, los lípidos de la dieta no parecen tener un marcado efecto sobre la actividad de proteasomas. Aunque dicha actividad se vio reducida en todos los grupos analizados debido a la presencia de *Listeria monocytogenes*; esta reducción fue similar a la que presentaban las células tratadas con el inhibidor de la actividad de proteasomas MG 132. Sin embargo la acción inhibitoria de la bacteria desapareció cuando las células además de ser sometidas a una infección por *L. monocytogenes* fueron tratadas con el inhibidor MG132. Estos resultados sugieren que la interacción entre la bacteria y el inhibidor de proteasomas implica un mecanismo capaz de desacoplar la acción inhibitoria ejercida por *L.*

monocytogenes o por MG132. En este punto es importante señalar que este proceso descrito con anterioridad ocurre de manera independiente de la inmunomodulación ejercida por los diferentes lípidos de la dieta examinados en este estudio, de manera que dicho proceso no puede ser relacionado con la inmunosupresión ejercida por los lípidos presentes en la dieta.

A pesar de lo anteriormente comentado, existen investigaciones en las cuales se demuestra que una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 estimulan tanto la actividad como los niveles de proteasomas presentes en las células de tres clases de músculo esquelético (Vigouroux *et al.*, 2003). Estos investigadores defienden la hipótesis de que este incremento, tanto en la actividad como en la cantidad de proteasomas presentes en dichas células, se debe a la necesidad que éstas presentan para eliminar las proteínas dañadas debido al proceso de peroxidación lipídica, muy importante en los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 (Sugihara *et al.*, 1994). Aunque también observaron los mismos efectos en los animales alimentados con dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados, los resultados no fueron tan llamativos. Ya que los ácidos grasos monoinsaturados presentan una mejor resistencia a la oxidación, debido a la presencia de gran cantidad de sustancias con propiedades antioxidantes (Ochoa *et al.*, 2002).

La existencia de tales resultados en principio contradictorios pueden deberse a diferentes factores como por ejemplo las poblaciones celulares sobre las que se realiza la cuantificación de la actividad de proteasomas (células de músculo esquelético y timocitos), las diferencias existentes entre los animales de experimentación (ratas Wistar y ratones de la raza Balb/c), heterogeneidad en cuanto a la composición de las dietas experimentales suministradas, así como el tiempo que los animales están ingiriendo las respectivas dietas (2 semanas frente a 4 semanas).

5.1.12. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN

La apoptosis o muerte celular programada es un acontecimiento celular que generalmente se activa de manera natural para erradicar células dañadas, mutadas, envejecidas y superfluas. Han sido muchos los avances que se han llevado a cabo en la investigación de este proceso esencial para el desarrollo y la homeostasis de tejidos adultos en todos los metazoos. Debido a lo anteriormente expuesto, una desregulación del proceso apoptótico implica la aparición de ciertas patologías. Así, una inhibición anormal de este proceso da lugar a la aparición de neoplasias, mientras que una apoptosis masiva está relacionada con la aparición de desórdenes agudos, así como patologías crónicas como por ejemplo enfermedades degenerativas. Cuando una célula entra en apoptosis, adquiere una serie de características morfológicas

especiales como por ejemplo alteración de los fosfolípidos de la membrana plasmática (exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática), aparición de cuerpos apoptóticos en el citoplasma celular, condensación de la cromatina nuclear, reducción del volumen celular, y en último lugar se produce la fragmentación del ADN de la célula y la fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos sin verter su contenido al exterior y sin producir un proceso de inflamación.

Dentro de las investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de la apoptosis, son muchos los autores que han estudiado el papel que los componentes de la dieta ejercen sobre diferentes tipos celulares en relación con su muerte programada. En este sentido son numerosas las investigaciones existentes acerca de la implicación de los lípidos de la dieta y de los ácidos grasos en la inducción o inhibición de la apoptosis (de Pablo *et al.* 1999; Heimli *et al.*, 2002; Reddy Avula *et al.*, 1999; Ruemmele *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1997). En estos trabajos de investigación se pone de manifiesto que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 están relacionados con la inducción del proceso apoptótico, mientras que van a ser los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-6 los responsables de la inhibición de dicho proceso. De hecho una reciente investigación (Reddy Avula *et al.*, 1999) aportó que la administración de ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 disminuye la expresión del gen Bcl-2 (un potente inhibidor de apoptosis) y aumenta la expresión del gen Fas (un inductor de apoptosis).

El objetivo que se persiguió con la determinación de este parámetro en este trabajo de investigación, fue comprobar si los lípidos presentes en cada una de las dietas experimentales actuaban en el proceso de apoptosis celular en células inmunes procedentes de ratones alimentados con su respectiva dieta rica en lípidos, e incubadas en presencia y ausencia de *L. monocytogenes*. Para ello partimos de timocitos de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales, los cuales se incubaron en presencia y ausencia de *L. monocytogenes* durante 2 h. Posteriormente las células se lisaron y se sometieron al tratamiento expuesto anteriormente en el apartado 3.1.16, con el objetivo de cuantificar la fragmentación de ADN.

Según los resultados obtenidos, la fragmentación de ADN fue mayor en aquellas células procedentes de ratones que habían sido alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva o aceite de pescado, y que habían sido incubadas en ausencia de *L. monocytogenes*. Esto estaría en concordancia con los resultados obtenidos por otros investigadores en los cuales los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 (que se encuentran mayoritariamente en el aceite de pescado) están relacionados con la inducción de apoptosis (Heimli *et al.*, 2002, Reddy Avula *et al.*, 1999). En el caso del aceite de oliva, aunque la fragmentación de ADN no es tan elevada como

en las células procedentes de ratones alimentados con aceite de pescado, si se observa un incremento del ADN fragmentado en comparación con los valores obtenidos en células procedentes de ratones alimentados con la dieta de bajo contenido en grasa (dieta control). Mientras que son numerosos los estudios acerca de la influencia del aceite de pescado, y sus principales ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, en el proceso de apoptosis; poco se conoce sobre los efectos en este mismo proceso del aceite de oliva y el ácido oleico y linoleico, como ácidos grasos mayoritarios en la composición del aceite de oliva. A pesar de esto, existe una reciente publicación (Llor *et al.*, 2002) cuyos resultados ponen de manifiesto que la suplementación de la dieta con aceite de oliva da lugar a un descenso en la regulación de la enzima ciclooxigenasa-2 (enzima que participa en el metabolismo lipídico del ácido araquidónico) seguido de una reducción en la expresión del gen Bcl-2 (potente inhibidor de la apoptosis). Los mismos resultados se obtuvieron con el uso del ácido oleico y ácido linoleico. Estos datos apoyarían los obtenidos en nuestro trabajo de investigación, ya que una baja expresión del gen Bcl-2 supondría un incremento de apoptosis debido a la ingesta de aceite de oliva.

Respecto a la infección de las células con *L. monocytogenes*, la fragmentación del ADN de las células no se vio alterada por la presencia de la bacteria y los valores obtenidos en este caso fueron similares a los observados en los cultivos celulares incubados en ausencia de la bacteria. Debido a esto se puede afirmar que *L. monocytogenes* no está asociada con la fragmentación de ADN en timocitos procedentes de ratones alimentados con dietas lipídicas. En otras palabras, no existe un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis en timocitos procedentes de animales alimentados con las dietas lipídicas experimentales, entre los lípidos presentes en la dieta y la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes*.

5.1.13. Actividad de caspasa-3

Las caspasas son una familia de proteasas que están implicadas en el proceso de la apoptosis. Las caspasas son sintetizadas en forma de precursores inactivos y tras un proceso de maduración proteolítica dan lugar a la inducción del proceso de apoptosis. Dependiendo de la caspasa iniciadora de dicho proceso en respuesta a diferentes estímulos podemos distinguir dos rutas o vías apoptóticas en células de mamíferos. Por un lado existe una «ruta extrínseca» mediada por receptores apoptóticos («death receptors»), y por otro lado una «ruta intrínseca» regulada predominantemente a nivel mitocondrial. La activación de la ruta extrínseca requiere la unión de un ligando apoptótico («death ligand») a su receptor, situado en la superficie de la membrana plasmática de la célula. Esta unión supone la adhesión de DISC (complejo señalizante de muerte inducida) a la parte intracelular del receptor.

DISC es un complejo proteico el cual porta al precursor inactivo de la caspasa-8 (procaspasa-8); la unión de dicho complejo proteico al receptor celular (death receptor) provoca la proteólisis de la procaspasa-8 dando lugar a la caspasa-8 activa. La caspasa-8, activa de manera directa a una caspasa efectora (caspasa-3) o bien provoca la escisión del miembro de la familia de Bcl-2, Bid, dando lugar a tBid. tBid se transloca al interior de la mitocondria donde actúa con los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, Bak y Bax, favoreciendo la liberación al citoplasma de citocromo *c* (cit *c*).

Por otro lado la ruta intrínseca está inducida en las células tras someter a éstas a diferentes tratamientos (drogas, radiación ultravioleta, falta de alimento, entre otros). Ante estas condiciones la mitocondria de las células responde con la liberación de cit *c* al citoplasma celular. Como se puede comprobar, ambas rutas apoptóticas convergen en el mismo punto, liberación de cit *c*, lo que requiere una implicación de la mitocondria en la apoptosis.

El cit *c* es sintetizado en forma de precursor inactivo, el cual es transportado al interior de la mitocondria donde mediante una serie de reacciones madura para ser liberado al citoplasma celular como cit *c* activo. Una vez en el citosol, el cit *c* se asocia con Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas) y con el precursor inactivo procaspasa-9, dando lugar a la formación de un complejo llamado apoptosoma que permite la activación de la caspasa-9. Una vez activa, la caspasa-9 promueve la activación de otra caspasa efectora (caspasa-3). Pero a parte de la activación de la cascada de caspasas, en la inducción de apoptosis también intervienen otros factores que son liberados por la mitocondria como la proteína endo G, las proteínas Smac/DIABLO, el factor inductor de apoptosis (AIF) entre otros; y que actúan a diferentes niveles dentro de la célula (Petit *et al.*, 2003; Ravagnan *et al.*, 2002).

El objetivo que se persiguió con la determinación de la actividad de caspasa-3 en este trabajo de investigación fue comprobar si los lípidos presentes en cada una de las dietas experimentales modulaban la actividad de dicha caspasa efectora en células procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas ricas en lípidos, y que papel jugaría la infección con *L. monocytogenes* en la inducción de apoptosis mediante la activación de esta vía en células inmunes murinas.

Para ello partimos de timocitos de ratones alimentados con cada una de las dietas experimentales, incubados en presencia y ausencia de *L. monocytogenes* durante 2 h. Posteriormente las células fueron procesadas siguiendo el protocolo del kit EnzChek Caspase-3 Assay Kit, como se expuso anteriormente en el apartado 3.1.17, con el fin de cuantificar la actividad de la caspasa-3.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, el ensayo fluorimétrico de caspasa-3 en timocitos de ratones alimentados con las dietas ricas en lípidos reveló un significativo incremento en los grupos alimentados con las dietas que contenían aceite de oliva o aceite de pescado en comparación con los valores obtenidos en células de ratones alimentados con la dieta de bajo contenido en grasa (dieta control). Sin embargo se observó una inhibición en la actividad de caspasa-3 en aquellas células, procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas lipídicas, y que habían sido sometidas a una infección experimental con *L. monocytogenes*.

Pocos son los estudios que cuantifican la actividad de caspasa-3 en modelos murinos alimentados con dietas ricas en lípidos, aunque si son más numerosos los estudios realizados en condiciones *in vitro*. En una reciente investigación llevada a cabo con células cultivadas en presencia de ácido eicosapentaenoico (ácido graso poliinsaturado contenido en el aceite de pescado), se detectó un incremento en los niveles de caspasa-3 así como en los niveles de caspasa-9, pero no se obtuvo ese incremento en los niveles de caspasa-8. Estos datos sugieren que el ácido eicosapentaenoico induce apoptosis en células en cultivo mediante la ruta intrínseca (Heimli *et al.*, 2002).

En el presente trabajo de investigación, la incubación de timocitos procedentes de ratones alimentados con las respectivas dietas experimentales en presencia del inhibidor de caspasa-3, Ac-DEVD-CHO, redujo la producción de caspasa-3. Sin embargo cuando las células se incubaron en presencia tanto de *L. monocytogenes* como de AC-DEVD-CHO, este no ejerció su acción inhibitoria. De manera que estos datos sugieren que los lípidos presentes en la dieta (particularmente aceite de oliva y aceite de pescado) están implicados en uno de los principales eventos que tienen lugar durante el proceso de apoptosis como es la actividad de caspasa-3. Pero la infección por *L. monocytogenes* no parece jugar un importante papel en la inducción de apoptosis en timocitos. Este hecho podría ser considerado como un mecanismo de evasión del sistema inmune por parte de la bacteria *L. monocytogenes* para evitar su destrucción. En un reciente estudio llevado a cabo con células T infectadas con *L. monocytogenes*, se ha demostrado que la viabilidad de dichas células tras ser sometidas a una infección con la bacteria intracelular anteriormente citada, se ve reducida debido no tanto a la acción de la bacteria propiamente dicha y/o a la toxicidad de la listeriolisina O, sino a la acción que la elevada expresión de Fas-L en las células infectadas ejerce sobre aquellas células del sistema inmune que expresan el receptor para Fas. En dichas células la unión del receptor para Fas con su ligando Fas-L, presente en las células infectadas por *L. monocytogenes*, provoca una cascada de eventos que dirigen a la célula hacia el proceso de apoptosis (Zenewicz *et al.*, 2004).

5.1.14. Supervivencia con LSTRA

La línea celular LSTRA es un linfoma murino muy utilizada en la investigación del desarrollo de tumores en modelos murinos.

El objetivo de este ensayo fue comprobar el efecto que la manipulación de los ácidos grasos contenidos en la dieta ejercen sobre el proceso de la carcinogénesis mediante la cuantificación de los ratones supervivientes tras el trasplante con el linfoma murino LSTRA.

Como consecuencia del efecto inmunosupresor que los lípidos presentes en la dieta ejercen sobre el individuo, estudios previos indican el importante papel de los lípidos de la dieta como agentes quimiopreventivos o como sustancias capaces de inducir procesos tumorales (Fay *et al.*, 1997; Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 2000; Trichopoulou *et al.*, 2000). De hecho, estudios llevados a cabo con animales de investigación han puesto de manifiesto que la administración de ácidos grasos de la serie *n*-3, o bien de la serie *n*-9, son capaces de disminuir el riesgo de desarrollo de cáncer de mama y cáncer de colon (Takahashi *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 1997; Owen *et al.*, 2000; Trichopoulou *et al.*, 2000). Por el contrario, estudios realizados con ácidos grasos de la serie *n*-6 han indicado un incremento en el desarrollo de tumores mamarios y metástasis tras su incorporación en la dieta (Fay *et al.*, 1997; Hilakivi-Clarke *et al.*, 1996). De este modo el tipo de grasa presente en la dieta parece estar directamente implicada en la promoción del proceso de carcinogénesis o bien puede tener efectos inhibitorios sobre el desarrollo de tumores (Lee and Lin, 2000; Rose, 1997; Wynder *et al.*, 1997).

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, la supervivencia de ratones que habían sido alimentados con aceite de pescado y posteriormente transplantados con un linfoma murino fue menor, comparado con el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido en grasa (dieta control), que la supervivencia de los ratones alimentados con el resto de las dietas experimentales, los cuales demostraron unos valores similares a los obtenidos en el grupo control. Este hecho puede deberse a los efectos inducidos por el aceite de pescado, el cual promueve una fuerte supresión del sistema inmune (Calder, 1998c). Sin embargo, existen datos procedentes de un reciente estudio los cuales se contradicen con los obtenidos en el presente trabajo de investigación. En dicho estudio se pone de manifiesto que en aquellos animales alimentados con dietas suplementadas con ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico y sometidos posteriormente a un trasplante con un timoma, se observa un incremento de la supervivencia de los animales así como una reducción en el porcentaje de células tumorales proliferativas (Calviello *et al.*, 2000). Estos

resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en cuanto a concentración de lípidos presentes en la dieta, metodología experimental utilizada, línea tumoral transplantada, etc.

5.1.15. Actividad de células natural killer (NK) tras el transplante del linfoma murino LSTRA

Las células NK son un tipo de células que junto con los linfocitos T citotóxicos conforman la principal barrera inmunológica frente al desarrollo de tumores. Se ha comprobado en estudios desarrollados *in vitro* que las células NK pueden ejercer su efecto citolítico en células invadidas por virus y ciertas líneas celulares tumorales; especialmente aquellas células que tienen una reducida expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC de clase I) y que pueden escapar a la lisis llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos.

Teniendo en cuenta las premisas anteriormente expuestas, el objetivo del ensayo llevado a cabo en este estudio fue determinar si los lípidos presentes en la dieta ejercían alguna función en la actividad de las células NK tras el transplante de un linfoma murino al animal; y cual de las grasas empleadas en las diferentes dietas experimentales tenía un mayor papel inmunomodulador en el desarrollo de un proceso tumoral.

Según la literatura científica existente, los lípidos de la dieta pueden modular la actividad de las células NK (de Pablo and Álvarez de Cienfuegos, 2000; Calder, 1998a; Yaqoob *et al.*, 1994a; de Pablo *et al.*, 1998a; Kelley *et al.*, 1999). En concreto, se ha demostrado que de todos los lípidos incluidos en la dieta son los ácidos grasos insaturados que administrados a animales de experimentación (Yaqoob *et al.*, 1994a; de Pablo *et al.*, 1998a) o a humanos (Kelley *et al.*, 1999) reducen la actividad de las células NK. Una posible aplicación de estos hallazgos podría emplearse en la modulación de los procesos tumorales. De este modo, estos efectos podrían explicar, en parte, la influencia de los lípidos de la dieta sobre el desarrollo de tumores. De hecho, en un reciente trabajo de investigación se ha observado que las células tumorales son más susceptibles a la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos cuando los ratones utilizados en el ensayo son alimentados con dietas ricas en aceite de pescado (Jenski *et al.*, 1993).

Según los resultados obtenidos en el presente ensayo la actividad de las células NK procedentes de ratones alimentados con sus respectivas dietas experimentales, se redujo de forma considerable tras someter al animal a un transplante del linfoma murino LSTRA. Esta disminución fue más notable en aquellos animales que habían sido alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, comparando dichos valores

con los obtenidos en animales alimentados con la dieta de bajo contenido en grasa o dieta control. De forma general se puede considerar la posibilidad de que la pérdida de actividad de las células NK encontrada en el presente estudio puede ser debida no solamente a los lípidos presentes en cada una de las dietas, sino también al proceso tumoral que se indujo en el animal; ya que la actividad de las células NK fue notablemente superior en cada uno de los grupos experimentales previamente al trasplante del tumor. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación están de acuerdo con los aportados por Fritsche and Johnston (Fritsche and Johnston, 1990). Estos investigadores encontraron que el aceite de pescado reduce la citotoxicidad de los macrófagos peritoneales frente a células tumorales invadidas por virus. De este modo, como se ha comentado con anterioridad, la presencia en la dieta tanto en animales como en humanos de ciertos lípidos tiene como resultado una significativa inhibición de la actividad de células NK. Sin embargo, y a pesar de conocer el resultado, los mecanismos responsables de dichos efectos permanecen hoy en día desconocidos; aunque se sugiere que la síntesis de productos derivados de eicosanoides podrían estar implicados en este proceso (Yaqoob *et al.*, 1994a).

5.1.16. Medición del anión superóxido mediante nitro blue tetrazolium (NBT) en presencia de inhibidores de fosfolipasa o ciclooxigenasa

Son numerosos los estudios que aseguran que los ácidos grasos, en particular los ácidos grasos insaturados, ejercen ciertas funciones dentro del metabolismo celular actuando como segundos mensajeros (Graber *et al.*, 1994). Este hecho sugiere que dichas moléculas son capaces de modular la actividad de diferentes enzimas como por ejemplo la enzima fosfolipasa (Sumida *et al.*, 1993). Desde hace algún tiempo se conoce que las células fagocíticas son unas importantes productoras de ácido araquidónico, y como consecuencia de este proceso, dicho ácido graso y sus metabolitos van a dar lugar a la alteración de numerosas funciones de los macrófagos (Scott *et al.*, 1980). De este modo recientemente se ha sugerido que uno de los principales mecanismos por los cuales los ácidos grasos regulan las funciones del sistema inmune es a través de alteraciones en la producción de eicosanoides, así como de interacciones con la actividad de la enzima fosfolipasa (Graber *et al.*, 1994).

Una de las principales funciones de los macrófagos es la fagocitosis tanto de bacterias, como de células tumorales o invadidas por virus. En el proceso fagocítico, los macrófagos liberan una gran cantidad de radicales libres que tienen como objetivo la destrucción del agente extraño o de la célula transformada. De todos los radicales libres liberados, van a ser los radicales superóxido unos de los más activos en el

proceso de peroxidación lipídica llevado a cabo por dichas moléculas activas. Este mecanismo es un modo de daño oxidativo que ocurre a nivel de las membranas celulares, y que puede jugar un importante papel en la modulación de las funciones del sistema inmune (Allard *et al.*, 1997).

El objetivo perseguido en el presente trabajo de investigación consistió en utilizar la generación del anión superóxido, mediante la reducción del NBT, para determinar el efecto que tanto el inhibidor de la fosfolipasa (QUIN) como el inhibidor de la ciclooxigenasa (IND) ejercen en la producción de peróxidos lipídicos en células peritoneales estimuladas con zymosan opsonizado. Según los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* se observó que en general los lípidos de la dieta incrementaron la acción inhibitoria tanto de QUIN como de IND, en comparación de los valores obtenidos en el grupo control. Pero sin embargo, los ensayos llevados a cabo utilizando el inhibidor de la fosfolipasa (QUIN) indicaron una significativa reducción de la generación de anión superóxido en células peritoneales estimuladas con zymosan procedentes de ratones alimentados con las dietas ricas en aceite de oliva y en aceite de coco; en comparación de los valores obtenidos en el grupo alimentado con la dieta de bajo contenido en grasa o dieta control. Estos hechos implican que los efectos promovidos por los lípidos presentes en la dieta, que han sido descritos anteriormente, no parecen estar relacionados con el proceso de peroxidación lipídica. Es posible que la reducción en la respuesta inflamatoria debida a las dietas con elevado contenido en ácidos grasos de la serie *n*-3 pueda ser la responsable del efecto antitumoral ejercido por los lípidos de la dieta en el colon (Kuratko, 2000). De manera similar, son numerosos los estudios que establecen el papel esencial que el aceite de oliva ejerce sobre la salud teniendo importantes efectos sobre el desarrollo de tumores mamarios inducidos por N-methylnitrosurea (Cohen *et al.*, 2000). Pero aparte de inducir diferentes efectos sobre las funciones del sistema inmune, los ácidos grasos de cadena larga inducen apoptosis por incrementar el proceso de peroxidación lipídica y suprimir la expresión del gen bcl-2 (Das, 1999; Llor *et al.*, 2003). Desde hace algún tiempo existen evidencias acerca del importante papel que los ácidos grasos juegan en el proceso de apoptosis, pudiendo explicar este hecho algunas de las funciones de los lípidos como sustancias inmunomoduladoras.

5.2. ENSAYOS *IN VITRO*

5.2.1. Ensayos de viabilidad celular

Uno de los principales factores relacionados con la acción moduladora que los lípidos de la dieta o los ácidos grasos libres ejercen sobre el sistema inmune, es la proliferación de linfocitos. Son numerosos los estudios que demuestran que la proliferación de linfocitos sufre una reducción tanto en animales alimentados con

dietas ricas en lípidos como en células cultivadas en presencia de ácidos grasos libres (De Pablo and Álvarez de Cienfuegos., 2000; Calder *et al.*, 1998b; Calder *et al.*, 1991). A pesar de esto, no está del todo claro cuáles son los mecanismos que llevan a esta reducción en la viabilidad celular. Si bien es cierto lo anteriormente dicho, no es del todo menos conocido que la producción de eicosanoides juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios y de respuesta inmune, y que dicha producción puede verse regulada por la administración tanto de dietas lipídicas como de ácidos grasos libres (Goodwin and Ceupens, 1983).

El objetivo del presente trabajo de investigación consistió en el estudio de algunos de los mecanismos implicados en la alteración de la viabilidad celular, y que es promovida por diferentes ácidos grasos presentes en el medio de cultivo de las células. Según los resultados obtenidos se observó una significativa reducción en la viabilidad celular en células que habían sido tratadas con ácido eicosapentaenoico e incubadas en ausencia de los inhibidores tras 72 h de incubación, mientras que no se observó efecto alguno en la viabilidad celular en presencia de inhibidores de la fosfolipasa, ciclooxigenasa o lipooxigenasa. Este hecho indica que la acción del ácido eicosapentaenoico sobre la viabilidad celular se ejerce a través de la vía de la producción de eicosanoides, ya que los inhibidores de las enzimas que participan en dicho proceso son capaces de prevenir la pérdida de viabilidad celular.

Son numerosos los estudios que han descrito la influencia de algunos ácidos grasos en la producción de eicosanoides como uno de los factores principales responsables de la reducción en la proliferación de linfocitos (Whelan *et al.*, 1997). Aunque existen resultados discrepantes a este respecto, ya que también constan en la literatura científica trabajos de investigación en los que se demuestra que los efectos inhibitorios ejercidos por los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, así como por dietas que contienen aceite de pescado son independientes o no se asocian a la incrementada producción de prostaglandinas y leucotrienos (Calder *et al.*, 1992c; Soyland *et al.*, 1993a; Kelley *et al.*, 1999).

A pesar de la existencia de resultados contrapuestos se puede concluir que ciertas funciones del sistema inmune tales como la reducción en la proliferación de linfocitos o la síntesis de citoquinas, están implicadas en la reducción de la resistencia inmune natural del hospedador; aunque realmente los mecanismos responsables de tales acciones todavía no están del todo claros.

5.2.2. Medición del anión superóxido mediante nitroblue tetrazolium (NBT)

Uno de los mecanismos mas importante, mediante el cual los ácidos grasos modulan las funciones del sistema inmune es el proceso de peroxidación lipídica (Allard *et*

al., 1997). Aunque existen trabajos de investigación en los cuales se demuestra que el proceso de peroxidación lipídica no parece ser un factor demasiado importante como para llevar a cabo, en parte, la modulación de las funciones de las células que forman parte del sistema inmune (Soyland *et al.*, 1993a).

Desde hace tiempo se conoce que los lípidos ingeridos a través de la dieta promueven una alteración de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de la membrana plasmática, hasta tal punto que la composición de la membrana plasmática refleja fielmente los ácidos grasos presentes en la dieta (Clamp *et al.*, 1997). Esto supone que una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, va a dar lugar a la incorporación de estos en los fosfolípidos de la membrana plasmática de las células reemplazando al ácido araquidónico presente (Jump, 2002). Este hecho supone una alteración en las propiedades biofísicas de la membrana plasmática, ya que disminuye la microviscosidad de la misma dando lugar a una modificación en la función y movilidad de las proteínas de membrana (Stulning *et al.*, 2001).

Por otra parte, la incorporación de los ácidos grasos poliinsaturados a la membrana celular supone un incremento en el proceso de peroxidación lipídica llevado a cabo por las células. Esto repercute en un descenso en mecanismos tan importantes para la célula como la replicación y la viabilidad celular. De hecho, existen estudios en los que se demuestra que la generación del proceso de peroxidación lipídica supone un incremento en la muerte de células tumorales (Begin *et al.*, 1988; Das., 1999; Rose and Conolly, 1999; Sauer *et al.*, 2000; Stoll, 2002).

Debido a todo lo anteriormente expuesto, el proceso de peroxidación lipídica supone un importante mecanismo que afecta al sistema inmune, siendo responsable en parte de su modulación.

El objetivo del presente trabajo era demostrar como influye el tratamiento de células pertenecientes a la línea celular YAC-1, con diferentes ácidos grasos libres en la generación de anión superóxido. Atendiendo a los resultados obtenidos se observó un incremento en la generación del anión superóxido en aquellas células que habían sido incubadas en presencia de ácido eicosapentaenoico. Demostrándose así, la importante implicación que los ácidos grasos poliinsaturados ejercen sobre la generación del proceso oxidativo, sobre todo aquellos pertenecientes a la serie *n*-3.

A pesar de lo anteriormente comentado, existen otros estudios cuyos resultados no concuerdan con los obtenidos en la presente investigación. Estos autores indican que si bien es cierto que los lípidos presentes en la dieta llevan a cabo una modificación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, estos acontecimientos no suponen ninguna modificación en la generación de aniones superóxido (Guarini *et al.*, 1998).

5.2.3. Determinación de la actividad de proteasomas

Como ha sido comentado anteriormente, los proteasomas son un complejo con actividad proteolítica que se encargan de la degradación de las proteínas intracelulares. Debido a su función, los proteasomas son los responsables de la eliminación de numerosos agentes biológicos (Rock *et al.* 1994), como por ejemplo bacterias de crecimiento intracelular como *L. monocytogenes* (Finelli *et al.*, 1999). También estos complejos enzimáticos juegan un papel muy importante en la degradación de algunos reguladores principales de la proliferación celular como el factor nuclear NF- κ B que comienza a ser activo tras el procesamiento que sufre por acción de los proteasomas (Palombella *et al.*, 1994).

Pero los proteasomas no sólo ejercen una acción reguladora sobre ciertos factores nucleares, sino que también es conocida la función moduladora de ciertos ácidos grasos sobre la actividad de algunos factores nucleares, incluido el factor NF- κ B (Camandola *et al.*, 1996). A pesar de esto, la relación que existe entre los ácidos grasos y la función de los proteasomas no es muy conocida. Sin embargo en un reciente trabajo de investigación se pone de manifiesto la correlación que existe entre las células pertenecientes a la línea celular HT-29 (cáncer de colon humano), y el ácido butírico. Según los resultados obtenidos en dicho trabajo, como consecuencia del tratamiento de las células con ácido butírico se produce una inhibición del crecimiento celular y un incremento del proceso de apoptosis. Según los autores del trabajo esto se debe a que el tratamiento con el mencionado ácido graso saturado, da lugar a una expresión alterada de ciertos componentes del complejo del proteasoma en el interior celular. Estos resultados indican que a través del proceso de proteólisis, el ácido butírico podría regular la expresión de ciertas proteínas con función crucial en los procesos de apoptosis, diferenciación y ciclo celular (Tan *et al.*, 2002).

El objetivo de la determinación de este parámetro en el presente trabajo de investigación, se basa en analizar el estado en el que se encuentran los proteasomas de las células tras someter a estas a un tratamiento con diferentes ácidos grasos libres. Según los resultados obtenidos los ácidos grasos libres no parecen inhibir la actividad de los proteasomas en timocitos, ya que los valores obtenidos en células incubadas en presencia de ácidos grasos libres fueron muy similares a los obtenidos en células cultivadas en ausencia de dichas sustancias.

Estos resultados corroboran los obtenidos en nuestro laboratorio en ratones alimentados con dietas lipídicas, en los cuales los lípidos presentes en la dieta tampoco parecen ejercer un papel primordial en la regulación de la actividad de proteasomas (Puertollano *et al.*, 2001b).

5.2.4. Medición de la proliferación con Sytox-green

El sytox-green es un marcador que se adhiere a la cromatina de las células vivas. Por este motivo es otro de los métodos utilizados para la determinación de la viabilidad celular.

El objetivo del presente ensayo fue comprobar como respondían las células en cultivo ante la presencia de diferentes concentraciones de ácidos grasos libres. De este modo y atendiendo a los resultados obtenidos se puede concluir que los ácidos grasos reducen la viabilidad celular de un modo dosis dependiente. De todos los ácidos grasos ensayados van a ser los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 los que ejercen un mayor efecto sobre la viabilidad celular. Así el ácido eicosapentaenoico, ácido linolénico, ácido araquidónico o ácido linoleico, van a ser más efectivos a la hora de inhibir el crecimiento de células YAC-1, que los ácidos grasos moninsaturados (ácido oleico) o saturados (ácido esteárico).

Estos resultados confirman aquellos obtenidos por otros autores, los cuales también demostraron que ciertos ácidos grasos inhiben la proliferación celular dependiendo de la dosis empleada (Arita *et al.*, 2001; Kurita-ochiai *et al.*, 2001; Colquhoun and Schumacher, 2001). Pero a pesar de esto también es cierto que la efectividad que los ácidos grasos ejercen sobre la viabilidad celular va a depender además del tipo de línea celular tumoral utilizada (Das, 1999).

5.2.5. Análisis de la acumulación de triacilgliceroles con rojo nilo.

El rojo nilo es un marcador lipofílico muy sensible que sirve para detectar la presencia de triacilgliceroles en el citoplasma celular (Greenspan *et al.*, 1985). El objetivo perseguido con la determinación de este parámetro fue comprobar si los ácidos grasos analizados daban lugar a la formación de gotas lipídicas (lipid droplets) o acumulación de triacilgliceroles en el citoplasma celular y cuáles de los ácidos grasos tenía una mayor efectividad sobre dicho parámetro.

Según los resultados obtenidos, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pertenecientes tanto a la serie *n*-3 como a la serie *n*-6 (ácido eicosapentaenoico, ácido linolénico o ácido araquidónico) incrementaron de forma significativa la incorporación de gotas lipídicas en el interior de las células YAC-1.

De estos resultados se puede deducir que la apoptosis inducida por ciertos ácidos grasos está relacionada con la acumulación de triacilgliceroles en forma de gotas lipídicas en el citoplasma celular, tal y como ha sido demostrado actualmente (Al-Saffar *et al.*, 2002).

Es importante destacar que la incorporación de gotas lipídicas en el interior del citoplasma celular se produce de manera dosis dependiente, es decir atendiendo a

la concentración a la que el ácido graso es incorporado al cultivo celular. Finstad et al., en un trabajo de investigación, han señalado que las células pertenecientes a la línea celular U937-1 expuestas a ácido eicosapentaenoico acumulan triacilglicérolos en su citoplasma de un modo reversible, de modo que cuando las células son incubadas junto con el ácido graso pero dispuesto a menor concentración la acumulación de triacilglicérolos disminuye de forma proporcional. También se ha comprobado que el número de gotas lipídicas por célula es mayor en células expuestas a ácido eicosapentaenoico que en células incubadas en presencia de ácido oleico (Finstad *et al.*, 1998).

5.2.6. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Uno de los principales inconvenientes que puede presentar para las células el proceso de peroxidación lipídica, es la generación de una serie de moléculas perjudiciales para la viabilidad de las mismas entre las que se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ROS). Son varios los estudios en los cuales se señala que los ácidos grasos poliinsaturados juegan un importante papel en la generación de ROS y que estas están íntimamente relacionadas con la inducción de apoptosis (Arita *et al.*, 2001; Colquhoun and Schumacher, 2001).

El objetivo que se perseguía con la determinación de dicho parámetro era comprobar cuales de los ácidos grasos analizados daban lugar a una mayor generación de ROS, y si este era el mecanismo mediante el cual los ácidos grasos inducían en las células el proceso de apoptosis.

Según los resultados obtenidos los ácidos grasos linoleico y esteárico, son capaces de generar una mayor producción de ROS por parte de las células. Sin embargo los ácidos eicosapentaenoico y araquidónico no provocan una relevante generación de ROS. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por otros investigadores (Arita *et al.*, 2001; Colquhoun and Schumacher, 2001), y nos llevan a pensar que aunque la generación de ROS es un hecho muy importante en la inducción de apoptosis por parte de los ácidos grasos poliinsaturados, sin embargo no es el único factor implicado en el proceso apoptótico. Así existen otras causas, no relacionadas con la producción de ROS, que están asociadas con los mecanismos de apoptosis generada por ácidos grasos y que no son demasiado conocidas hasta el momento.

5.2.7. Análisis cuantitativo de la fragmentación de ADN

Uno de los parámetros que se utilizan para la determinación de la existencia de un proceso de apoptosis tardía en todos los tipos celulares es la fragmentación de ADN, ya que cuando la célula entra en el proceso de muerte celular programada, la

fase final de este mecanismo consiste en la rotura del material genético en fragmentos de menor tamaño.

El objetivo de la determinación de este parámetro era comprobar cuál de los ácidos grasos ensayados promovía una mayor fragmentación del ADN celular, y si dicho parámetro podía ser utilizado como único criterio para evaluar la muerte de la célula, utilizando el método del tricloroacético.

Atendiendo a los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de fragmentación del ADN se alcanzó en aquellas células que habían sido incubadas en presencia de ácido linoleico. La fragmentación fue más marcada que la obtenida en células en presencia de los ácidos grasos eicosapentaenoico, linolénico o araquidónico. Todos los ácidos grasos ensayados se dispusieron a una concentración final de 150 μ M.

Estudios previos han indicado que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3, tales como el ácido eicosapentaenoico o el ácido docosahexaenoico, producían fragmentación en el ADN de las células que habían sido incubadas en presencia de ellos a una concentración de 60-120 μ M durante 12 h (Arita *et al.*, 2001). Por otra parte otros ácidos grasos como el butírico y el palmítico también producían fragmentación del material genético celular tras 6 h o 21 h de incubación respectivamente (Kurita-ochiai *et al.*, 2001; de Pablo *et al.*, 1999). Estos resultados podían considerarse como contradictorios con los obtenidos en el presente trabajo de investigación, pero es importante señalar que existen una serie de diferencias referentes tanto a la concentración a la que se disponen los ácidos grasos como al tiempo de incubación de las células en presencia de los diferentes ácidos grasos. Sin embargo y contrariamente a lo comentado con anterioridad, existen resultados en los que se indica que ni el ácido eicosapentaenoico ni el ácido araquidónico inducen fragmentación del ADN, a pesar de la implicación de tales ácidos grasos en el proceso de apoptosis. Por ello es importante señalar que la determinación de la fragmentación de ADN no puede ser utilizado como criterio único en la evaluación de la muerte celular inducida por ácidos grasos (Chiu *et al.*, 2000).

5.2.8. Actividad de caspasa-3

Uno de los criterios utilizados habitualmente para discernir entre el proceso de apoptosis y de necrosis es la detección de actividad de diferentes tipos de caspasas (Köhler *et al.*, 2002). Tal y como se ha comentado con anterioridad, las caspasas son una serie de enzimas con actividad proteasa que se activan en cascada en el proceso apoptótico.

El objetivo de la determinación de este parámetro en el presente trabajo de investigación era comprobar si los ácidos grasos ensayados eran capaces de promover

la activación de caspasa, en concreto de caspasa-3; y cual de ellos originaba una mayor actividad de la enzima.

Según los resultados obtenidos la producción de caspasa-3 en células YAC-1 en presencia de los ácidos grasos eicosapentaenoico o araquidónico fue muy similar a la obtenida en aquellas células incubadas en ausencia de ácidos grasos y que actuaban como control y menor que la obtenida en células incubadas en presencia de ácido linoleico, ácido oleico y ácido esteárico. De este modo se pueden explicar los resultados obtenidos teniendo en cuenta la posibilidad de que los ácidos grasos pueden inducir apoptosis mediante un mecanismo independiente de caspasa-3. Sin embargo, existen referencias bibliográficas que argumentan que los ácidos grasos eicosapentaenoico, linolénico y araquidónico pueden incrementar la actividad de caspasa-3 en diferentes líneas tumorales a la estudiada en el presente trabajo de investigación (Arita *et al.*, 2001; Colquhoun and Schumacher, 2001).

6. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Algunos ácidos grasos presentes en las dietas lipídicas modulan el sistema inmune y como consecuencia de esta propiedad alteran la resistencia inmune de los animales a la infección con un agente patógeno.
2. El aceite de pescado compuesto principalmente por ácidos grasos poliinsaturados de la serie *n*-3 es el más inmunosupresor y por lo tanto los animales alimentados con esta dieta mostraron una mayor susceptibilidad a la infección con *Listeria monocytogenes*.
3. El aceite de oliva compuesto principalmente por ácidos grasos monoinsaturados de la serie *n*-9 ejerce igualmente un efecto supresor de las funciones inmunes, pero en menor grado que la ejercida por el aceite de pescado. Esta propiedad hace que la resistencia inmune de los animales alimentados con el aceite de oliva sea ligeramente superior a la mostrada por los animales alimentados con aceite de pescado.
4. Las propiedades inmunomoduladoras de algunos lípidos presentes en la dieta, especialmente del aceite de pescado y también del aceite de oliva reducen la supervivencia, e incrementan la recuperación de bacterias viables procedentes del bazo, así como alteran la actividad bactericida de las células peritoneales frente a una infección experimental inducida por *Listeria monocytogenes*.
5. La reducción de la capacidad invasora de *Listeria monocytogenes* en células esplénicas procedentes de animales alimentados con una dieta rica en aceite de oliva se puede deber posiblemente a un aumento de la actividad bactericida observado en las células peritoneales de animales alimentados con esta dieta.
6. El antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) no ejerce ningún efecto inmunosupresor ni inmunomodulador en animales alimentados con dietas lipídicas y experimentalmente infectados con *Listeria monocytogenes*.
7. La administración de dietas que contienen aceite de oliva o aceite de pescado incrementan la formación de anión superóxido antes y después de la infección con *Listeria monocytogenes*. Igualmente la administración de estas dietas

promueve un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), hechos que pueden estar implicados en la reducción de la resistencia inmune frente a *Listeria monocytogenes*.

8. La administración de dietas que contienen aceite de oliva o aceite de pescado incrementan algunos parámetros apoptóticos como la fragmentación de ADN o la actividad de caspasa-3. Sin embargo, la infección experimental de estas células con *Listeria monocytogenes* no produce efectos sinérgicos en la inducción de apoptosis.
9. La mencionada supresión del sistema inmune por acción principalmente del aceite de pescado reduce igualmente la resistencia inmune de los animales trasplantados con linfoma murino LSTRA, reduciendo la supervivencia de los animales y la actividad de las células «natural killer» (NK).
10. La incubación de un linfoma murino (YAC-1) en presencia de ácido oleico incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fragmentación de ADN y la actividad de caspasa-3, sin embargo el cultivo de células YAC-1 en presencia de ácido eicosapentaenoico afecta solamente a la fragmentación de ADN.

7. Bibliografía

1. **Allard J. P., Kurian R., Aghdassi E., Muggli R. and Royall D.** 1997. Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* **32**: 535-541.
2. **Al-Saffar N. M. S., Titley J. C., Robertson D., Clarke P. A., Jackson L. E., Leach M. O. and Ronen S. M.** 2002. Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br. J. Cancer* **86**: 963-970.
3. **Anderson M. and Fritsche K. L.** 2002. (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *J. Nutr.* **132**: 3566-3576.
4. **Anel A., Naval J., González B., Torres J. M., Misal Z., Uriel J. and Pineiro A.** 1990a. Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1044**: 323-331.
5. **Anel A., Naval J., Gonzalez B., Uriel J. and Pineiro A.** 1990b. Fatty acid metabolism in human lymphocytes. II. Activation of fatty acid desaturase-elongase system during blastic transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1044**: 332-337.
6. **Arita K., Kobuchic H., Utsumia T., Takeharab Y., Akiyamad J., Hortone A. A. and Utsumib K.** 2001. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 821-828.
7. **Badwey J. A., Curnutte J. T., Robinson J. M., Berede C. B., Karnovsky M. J. and Karnowsky M. L.** 1984. Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **259**: 7870-7877.
8. **Barone J., Herbert J. R. and Reddy M. M.** 1989. Dietary fat and natural-killer-cell activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**: 861-867.
9. **Begin M. E., Ells G. and Horrobin D. F.** 1988. Polyunsaturated fatty acid-

- induced cytotoxicity against tumor cells and relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer* **80**: 188-194.
10. **Bell M. V. and Sargent J. R.** 1987. Effects of the fatty acid composition of phosphatidylserine and diacylglycerol on the in vitro activity of protein kinase C form rat spleen: influences of (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**: 227-232.
 11. **Bennett M., Uauy R. and Grundy S. M.** 1987. Dietary fatty acid effects on T-cell-mediated immunity in mice infected with *Mycoplasma pulmonis* or given carcinogens by injection. *Am. J. Pathol.* **126**:103-113.
 12. **Bennett W. M., Carpenter C. B., Shapiro M. E., Strom T. B., Tillm M., Abrams J., Ryan D. and Kelley V. R.** 1995. Delayed omega-3 fatty acid supplements in renal transplantation. A double-blind, placebo-controlled study. *Transplantation* **59**: 352-356.
 13. **Berger A., German J. B., Chiang B. L., Ansari A. A., Keen C. L., Fletcher M. P. and Gershwin M. E.** 1993. Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *J. Nutr.* **123**: 225-233.
 14. **Berthoux F. C., Guerin C., Berthoux P., Burgard G. and Alamartine E.** 1992. One-year randomized controlled trial with omega-3 fatty acid-rich fish oil in clinical renal transplant. *Transplant. Proc.* **24**: 2578-2582.
 15. **Beutler B. and Cerami A.** 1986. Tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**: 584-588.
 16. **Bittiner S. B., Tucker W. F. G., Cartwright I. and Bleehen S. S.** 1988. A double blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* **i**: 378-380.
 17. **Björnsson S., Hardardottir I., Gunnarsson E. and Haraldsson A.** 1997. Dietary fish oil supplementation increases survival in mice following *Klebsiella pneumoniae* infection. *Scand. J. Infect. Dis.* **29**: 491-493.
 18. **Blok W. L., Vogels M. T. E., Curfs J. H. A. J., Eling W. M. C., Buurmann W. A. and van der Meer J. M. W.** 1992. Dietary fish oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J. Infect. Dis.* **165**: 898-903.
 19. **Blok W. L., Katan M. B. and van der Meer J. W. M.** 1996. Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* **126**: 1515-1533.
 20. **Blot W. J., Lanier A., Fraumeni J. F. Jr. and Bender T. R.** 1975. Cancer mortality among Alaskan natives. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**: 547-554.

- 21. Bray R. A. and Brahmí Z.** 1986. Role of lipooxygenation in Natural Killer cell activation. *J. Immunol.* **136**: 1783-1790.
- 22. Byleveld P. M., Pang G. T., Clancy R. L. and Roberts D.C. K.** 1999. Fish oil feeding delays influenza virus clearance and impairs production of interferon- γ and virus-specific immunoglobulin A in the lungs of mice. *J. Nutr.* **129**: 328-335.
- 23. Byleveld M., Pang G. T., Clancy R. L. and Roberts C. K.** 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**: 287-292.
- 24. Calder P. C., Bond J. A., Harvey S. J., Gordon S. and Newsholme E. A.** 1990. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem. J.* **269**: 807-814.
- 25. Calder P. C., Bond J.A., Bevan S.J., Hunt S.V. and Newsholme E.A.** 1991. Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *Int. J. Biochem.* **23**: 579-588.
- 26. Calder P. C. and Newsholme E. A.** 1992a. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and Interleukin-2 production. *Clin. Sci.* **82**: 695-700.
- 27. Calder P. C. and Newsholme E. A.** 1992b. Unsaturated fatty acids suppress interleukin-2 production and transferrin receptor expression by Concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. *Med. Inflamm.* **1**: 107-112.
- 28. Calder P. C., Bevan S. J. and Newsholme E. A.** 1992c. The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology* **75**: 108-115.
- 29. Calder P. C. and Newsholme E. A.** 1993. Influence of antioxidant vitamins on fatty acid inhibition of lymphocyte proliferation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**: 175-183.
- 30. Calder P. C., Yaqoob P., Harvey D. J., Watts A. and Newsholme E. A.** 1994. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acids composition and membrane fluidity. *Biochem. J.* **300**: 509-518.
- 31. Calder P. C.** 1995. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 302-309.

32. **Calder P. C.** 1996a. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* **55**: 737-774.
33. **Calder P. C.** 1996b. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **55**: 127-150.
34. **Calder P. C.** 1998a. Fat chance of immunomodulation. *Immunol. Today* **19**: 244-247.
35. **Calder P. C.** 1998b. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 487-502.
36. **Calder P. C.** 1998c. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr. Rev.* **56**: S70-S83.
37. **Calviello G., Palozza P., Di Nicuolo F., Maggiano M. and Bartoli G.** 2000. N-3 PUFA dietary supplementation inhibits proliferation and store-operated calcium influx in thymoma cells growing in Balb/c mice. *J. Lipid Res.* **41**: 182-189.
38. **Camandola S., Leonarduzzi G., Musso T., Varesio L., Carini R., Scavazza A., Chiarpotto E., Baeuerle P. A. and Poli G.** 1996. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 643-647.
39. **Caygill C. P., Charlett A. and Hill M. J.** 1996. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br. J. Cancer* **74**: 159-164.
40. **Chandra R. K.** 1996a. 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. U S A* **93**: 14304-14307.
41. **Chandra R. K.** 1996b. Influence of palm oil on immune response and susceptibility to infection in a mouse model. *Nutr. Res.* **16**: 61-68.
42. **Chang H. R., Dulloo A. G., Vladoianu I. R., Piguet P. F., Arsenijevi D., Girardier L. and Pechère J. C.** 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* **41**: 1-2.
43. **Chang W. L., Chapkin R. S. and Lupton J. R.** 1998. Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. *J. Nutr.* **128**: 491-497.
44. **Chapkin R. S. and Carmichael S. L.** 1990. Effects of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid on macrophage phospholipids classes and subclasses. *Lipids* **25**: 827-834.

45. **Chapkin R. S., Akoh C. C. and Lewis R. E.** 1992. Dietary fish oil modulation of in vivo peritoneal macrophage leukotriene production and phagocytosis. *J. Nutr. Biochem.* **3**: 599-604.
46. **Chiu L. C., Wan J. M. and Ooi V. E.** 2000. Induction of apoptosis by dietary polyunsaturated fatty acids in human leukemic cells is not associated with DNA fragmentation. *Int. J. Oncol.* **17**: 789-796.
47. **Clamp A. G., Ladha S., Clark D. C., Grimble R. F. and Lund E. K.** 1997. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids* **32**: 179-184.
48. **Clouva-Molyvdas P., Peck M. D. and Alexander J. W.** 1992. Short-term dietary lipid manipulation does not affect survival in two models of murine sepsis. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **16**: 343-347.
49. **Cohen L. A., Epstein M., Pittman B. and Rivenson A.** 2000. The influence of different varieties of olive oil on N-Methylnitrosourea (NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* **20**: 2307-2312.
50. **Collett E. D., Davidson L. A., Fan Y. Y., Lupton J. R. and Chapkin R. S.** 2001. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am. J. Physiol.* **280**: 1066-1075.
51. **Colquhoun A. and Schumacher R. I.** 2001. g-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1533**: 207-219.
52. **Czuprynski C. J. and Haak-Frendscho M.** 1997. Non specific resistance mechanism to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. *Immunol. Rev.* **158**: 47-56.
53. **D'Ambola J. B., Aeberhard E. E., Trang N., Gaffar S., Barrett C. T. and Sherman M. P.** 1991. Effect of dietary (n-3) and (n-6) fatty acids on in vitro pulmonary bacterial clearance by neonatal rabbits. *J. Nutr.* **121**: 1261-1269.
54. **Dallaporta B., de Pablo M., Maise C., Daugas E., Loeffler M., Zamzami N. and Kroemer G.** 2000. Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis. *Cell Death Differ.* **7**: 368-373.
55. **Das U. N.** 1999. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **61**: 157-163.
56. **de Pablo M.A., Ortega E., Gallego A. M., Álvarez C., Pancorbo P. L. and Álvarez de Cienfuegos G.** 1998a. Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **25**: 11-23.

57. **de Pablo M. A., Ortega E., Gallego A. M., Álvarez C., Pancorbo P. L. and Álvarez de Cienfuegos G.** 1998b. The effect of dietary fatty acids manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **44**: 57-67.
58. **De Pablo M. A., Susin S. A., Jacotot E., Larochette N., Constantini P., Ravagnan L., Zamzami N and Kroemer G.** 1999. Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis* **4**: 81-87.
59. **de Pablo M. A. and Álvarez de Cienfuegos G.** 2000. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol.* **78**: 31-39.
60. **de Pablo M. A., Puertollano M. A. and Álvarez de Cienfuegos G.** 2000a. Immune cells functions, lipids and host natural resistance. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**: 323-328.
61. **de Pablo M. A., Puertollano M. A., Gálvez A., Ortega E., Gaforio J. J. and Álvarez de Cienfuegos G.** 2000b. Determination of natural resistance of mice fed dietary lipids to experimental infection induced by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**: 127-133.
62. **de Pablo M. A., Puertollano M. A. and Álvarez de Cienfuegos G.** 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 945-950.
63. **De Rosa S. C., Zarestky M. D., Dubs J. G., Roeder M., Anderson M., Green A., Mitr D., Watanabe N., Nakamura H., Tjoe I., Deresinski S. C., Moore W. A., Ela S. W., Parks D., Herzenberg L. A. and Herzenberg L. A.** 2000. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**: 915-929.
64. **Devchand P. R., Keller H., Peters J. M., Vazquez M., Gonzalez F. J. and Wahli W.** 1996. The PPAR α -leucotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* **384**: 39-43.
65. **Dinarello C. A.** 1988. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* **1**: 108-115.
66. **Dyeberg J. and Bang H. O.** 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* **2**: 433-435.
67. **Eicher S. D and McVey D. S.** 1995. Dietary modulation of Kupffer cell and splenocyte function during a *Salmonella typhimurium* challenge in mice. *J. Leukoc. Biol.* **58**: 32-39.
68. **Endres S., Ghorbani R., Kelley V. E., Georgilis K., Lonnemann G., Van der Meer J. W. M., Cannon J. G., Rogers T. S., Klempner M. S., Weber P. C., Schaefer E. F., Wolff S. M. and Dinarello C. A.** 1989. The effect of

- dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med.* **320**: 265-271.
- 69. Endres S.** 1996. N-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Lipids* **31**: S239-S242.
- 70. Fay M. P., Freedman L. S., Clifford C. K. and Midthune D. N.** 1997. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.* **57**: 3979-3988.
- 71. Feng C., Keisler D. H. and Fritsche K. L.** 1999. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce IFN-g receptor expression in mice *J. Interferon Cytokine Res.* **19**: 41-48.
- 72. Finelli A., Kerksiek K. M., Allen S. E., Marshall N., Mercado R., Pilip I., Busch D. H. and Pamer E. G.** 1999. MHC class I restricted T cell responses to *Listeria monocytogenes*, an intracellular bacterial pathogen. *Immunol. Res.* **19**: 211-223.
- 73. Finstad H. S., Drevon C. A., Kulseth M. A., Synstad A. V., Knudsen E. and Kolset S. O.** 1998. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.* **336**: 451-459.
- 74. Forman B. N., Tontonoz P., Chen J., Brun R. P., Spiegelman B. M. and Evans R. M.** 1995. 15-Deoxy-D12, 14 prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**: 803-812.
- 75. Fritsche K.L. and Johnston P. V.** 1990. Effect of dietary omega-3 fatty acids on cell-mediated cytotoxic activity in BALB/c mice. *Nutr. Res.* **10**: 577-588.
- 76. Fritsche K. L., Cassity N. A. and Huang S. C.** 1992. Dietary (n-3) fatty acid and vitamin E interaction in rats: effects on vitamin E status, immune cell prostaglandin E production and primary antibody response. *J. Nutr.* **122**: 1009-1018.
- 77. Fritsche K. L., Shahbazian L. M., Feng C. and Berg J. N.** 1997. Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Sci.* **92**: 95-101.
- 78. Fritsche K. L., Byrge M. and Feng C.** 1999. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice. *Immunol. Lett.* **65**: 167-173.

79. **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**: S54-S61.
80. **Fujikawa M., Yamashita N., Yamazaki K., Sugiyama E., Suzuki H. and Hamazaki T.** 1992. Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology* **75**: 330-335.
81. **Galli C., Petroni A. and Visioli F.** 1994. Natural antioxidants, with special reference to those in olive oil and cell protection. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**: 67-68.
82. **Godfrey R. W. and Wilder M. S.** 1984. Relationships between oxidative metabolism, macrophage activation, and antilisterial activity. *J. Leukoc. Biol.* **36**: 533-543.
83. **Goodwin J. S., Messner R. P. and Peake G. T.** 1978. Prostaglandin suppression of mitogen stimulated T cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **62**: 753-764.
84. **Goodwin J. S. and Ceuppens J.** 1983. The regulation of immune responses by prostaglandins. *J. Clin. Immunol.* **3**: 295-308.
85. **Graber R., Sumida C. and Nuñez E. A.** 1994. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Mediat. Cell Sign.* **9**: 91-116.
86. **Greenspan P., Mayer E. P. and Fowler S. D.** 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* **100**: 965-970.
87. **Grimble R. F. and Tapia P. S.** 1995. The modulatory influence of unsaturated fatty acid on the biology of tumor necrosis factor. *Biochem. Soc. Trans.* **287**: 282-286.
88. **Grimble R. F.** 1998. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* **14**: 634-640.
89. **Grimm H., Tibell A., Norrlind B., Schott J. and Bohle R. A.** 1995. Nutrition and allojection impact of lipids. *Transplant. Immunol.* **3**: 62-67.
90. **Grimminger F., Grimm H., Fuhrer D., Papavassilis C., Lindemann G., Blecher C., Mayer K., Tabesch F., Krämer H. J., Stevens J. and Seeger W.** 1996. Omega 3 lipid infusion in a heart allotransplant model: shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival. *Circulation* **93**: 365-371.
91. **Gruner S., Volk H-D., Falck P. and Baehr R. V.** 1986. The influence of phagocytic stimuli on the expression of HLA-DR antigens; role of reactive oxygen intermediates. *Eur. J. Immunol.* **16**: 212-215.

92. **Guarini P., Bellavite P., Biasi D., Carletto A., Galvani S., Camaraschi P., Bambara L. M. and Corrocher R.** 1998. Effects of dietary fish oil and soy phosphatidylcholine on neutrophil fatty acid composition, superoxide release, and adhesion. *Inflammation* **22**: 381-391.
93. **Hardardottir I. and Kinsella J. E.** 1991. Tumor Necrosis Factor production by murine resident peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1095**: 187-195.
94. **Heimli H., Giske C., Naderi S., Drevon C. A. and Hollung K.** 2002. Eicosapentaenoic acid promotes apoptosis in Ramos cells via activation of caspase-3 and -9. *Lipids* **37**: 797-802.
95. **Heinrich P. C., Castell J. V. and Andus T.** 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**: 621-636.
96. **Herbert J. R., Barone J., Reddy M. and Blacklund J. Y.** 1990. Natural killer cell activity in a longitudinal dietary fat intervention trial. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **54**: 103-116.
97. **Hilakivi-Clarke L., Clarke R., Onojafe I., Raygada M., Cho E. and Lippman M. E.** 1996. Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1821-1827.
98. **Hogan P. G.** 1992. Natural killer cells in transplantation. *In* C. E. Lewis, and J. O'D. Mc Gee (ed.), *The Natural Killer Cell*. Oxford University Press, Oxford. 152-175
99. **Horrobin D. F.** 1990. Essential fatty acids, lipid peroxidation and cancer. *In* Horrobin D. F. (ed.), *Omega-6 Essential Fatty Acids: Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine*. Wiley-Liss, New York. 351-377.
100. **Huang S. C., Misfeld M. L. and Fritsche K. L.** 1992. Dietary fat influences Ia expression and immune cell populations in the murine peritoneum and spleen. *J. Nutr.* **122**: 1219-1231.
101. **Huang S. C. and Fritsche K. L.** 1992. Alteration in mouse splenic phospholipids fatty acid composition and lymphoid cell populations by dietary fat. *Lipids* **27**: 25-32.
102. **Hubbard N. E., Lim D. and Erickson K. L.** 1998. Alteration of murine mammary tumorigenesis by dietary enrichment with n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Lett.* **124**: 1-7.
103. **Hughes D. A., Pinder A. C., Piper Z., Johnson I. T. and Lund E. K.** 1996a. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility

- complex class II molecules on human monocytes and adhesion molecules on human monocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**: 267-272.
- 104. Hughes D. A., Southon S. and Pinder A. C.** 1996b. (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J. Nutr.* **126**: 603-610.
- 105. 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**: 516-523.
- 106. Hughes D. A., Wright A. J. A., Finglas P. M., Peerless A. C. J., Bailey A. L., Astley S. B., Pinder A. C. and Southon S.** 1997. The effect of beta-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male non-smokers. *J. Lab. Clin. Med.* **129**: 309-317.
- 107. Hughes D. A. and Pinder A. C.** 2000. n-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 357S-360S.
- 108. Hwang D.** 1989 Essential fatty acids and the immune response. *FASEB J.* **2**: 2053-2061.
- 109. James M. J., Gibson R.A. and Cleland L. G.** 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory media production. *Am.J. Clin. Nutr.* **71**: 343S-348S.
- 110. Jeffery N. M., Sanderson P., Sherrington E. J., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1996a. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* **31**: 737-745.
- 111. Jeffery N. M., Yaqoob P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1996b. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann. Nutr. Metab.* **40**: 71-80.
- 112. Jeffery N. M., Newsholme E. A and Calder P. C.** 1997. The level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet both affect serum lipid levels and lymphocyte functions. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **57**: 149-160.
- 113. Jeffery N. M., Sanderson P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1998. Characteristic of lipid and lymphocytes collected from the lymph of rats fed a low fat diet or high fat diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Nutr. Res.* **18**: 299-308.

- 114. Jencki L. J., Sturdevant L. K., Ehringer W. D. and Stillwell W.** 1993. Omega-3 fatty acid modification of membrane structure and function. I. Dietary manipulation of tumor cell susceptibility to cell- and complement-mediated lysis. *Nutr. Cancer* **19**: 135-146.
- 115. Jolly C. A., Jiang Y-H., Chapkin R. S. and McMurray D. N.** 1997. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J. Nutr.* **127**: 37-43.
- 116. Jump D. B., Clarke S. D., Thelan A., Liimatta M., Ren B. and Badin M.** 1996. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog. Lipid Res.* **35**: 227-241.
- 117. Jump D. B.** 2002. The biochemistry of N3-polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **277**: 8755-8758.
- 118. Kaplan G. J., Fraser R. I. and Comstock G. W.** 1972. Tuberculosis in Alaska, 1970. The continued decline of the tuberculosis epidemic. *Am. Rev. Respir. Dis.* **105**: 920-926.
- 119. Kelley V. E., Ferreti A., Izui S. and Strom T. B.** 1985. A fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid reduces cyclooxygenase metabolites, and suppresses lupus in MRL-1pr mice. *J. Immunol.* **134**: 1914-1919.
- 120. Kelley D. S., Taylor P. C., Nelson G. J. and Mackey B. E.** 1998. Dietary docosahexaenoic acid and immunocompetence in young healthy men. *Lipids* **33**: 559-566.
- 121. Kelley D. S., Taylor P. C., Nelson G. J., Schmidt P C., Feretti A., Erickson 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**: 317-324.
- 122. Kelley D. S.** 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* **17**: 669-673.
- 123. Keusch G. T.** 2003. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J. Nutr.* **133**: 336S-340S.
- 124. Khair-El-Din T. A., Sicher S. C., Vazquez M. A., Wright W. J. and Lu C. Y.** 1995. Docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal calf serum and fish oil diets, inhibits IFN-g-induced Ia-expression by murine macrophages *in vitro*. *J. Immunol.* **154**: 1296-1306.
- 125. Kiessling R. B., Kein E. and Wigzell H.** 1975. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells.

- Specificity and distribution according to phenotype. *Eur. J. Immunol.* **5**: 112-117.
- 126. Kinsella J. E., Lokesh B., Brouhton S. and Whelan J.** 1990. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* **6**: 24-44.
- 127. Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U. and Nishizuka Y.** 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol: Its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **255**: 2273-2276.
- 128. Klasing K. C. and Leshchinsky T. V.** 2000. Interactions between nutrition and immunity. In Gershwin M. E (ed.), *Nutrition and Immunology: Principles and Practice*, vol. 30. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Pp. 363-373.
- 129. Köhler C., Orrenius S. and Zhivotovsky B.** 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J. Immunol. Methods* **265**: 97-110.
- 130. Kopp E. B. and Ghosh S.** 1995. NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58**: 1-27.
- 131. Kremer J. M., Lawrence D. A., Jubiz W., DiGiacomo R., Rynes R., Bartholomew L. E. and Sherman M.** 1990. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis: clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* **33**: 810-820.
- 132. Kremer J. L.** 2000. n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 349S-351S.
- 133. Kromann N. and Green A.** 1980. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med. Scand.* **208**: 401-406.
- 134. Kuratko C. N.** 2000. Proliferation of colonic lymphocytes in response to inflammatory cytokines is lower in mice fed fish oil than in mice fed corn oil. *Cancer Lett.* **148**: 27-32.
- 135. Kurita-ochiai T., Ochiai K. and Fukushima K.** 2001. Butiric acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and -9 activation in a Fas-independent manner. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 325-332.
- 136. Lee M. M. and Lin S. S.** 2000. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 221-248.
- 137. Lewis R. A., Austen K. F. and Soberman R. J.** 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: Biochemistry and relation to pathobiology in human disease. *N. Eng. J. Med.* **323**: 645-655.

- 138. Lewis C. E. and McGee J. O'D.** 1992. Natural killer cells in tumor biology. *In* C. E. Lewis and J. O'D. McGee (ed.), *The natural killer cell*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 175-203.
- 139. Linos A., Kaklamani E., Kontomerkos A., Koumantaki Y., Gazi S., Vaiopoulos G., Tsokos G. C. and Kaklamani P.** 1991. The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis-a case control study. *Scand. J. Rheumatol.* **20**: 419-426.
- 140. Linos A., Kaklamani V. G., Kaklamani E., Koumantaki Y., Giziaki E., Papazoglou S. and Mantzoros C. S.** 1999. Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables?. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**: 1077-1082.
- 141. Liu G., Bibus D. M., Bode A. M., Ma W. Y., Hoalm R. T. and Dong Z.** 2001. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7610-7515.
- 142. Llor X., Pons E., Roca A., Álvarez M., Mañé J., Fernández-Bañares F. and Gassull M. A.** 2003. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin. Nutr.* **22**: 71-79.
- 143. Maachi K., Berthoux P., Burgard G., Alamartine E. and Berthoux F.** 1995. Results of a 1-year randomized controlled trial with omega-3 fatty acid fish oil in renal transplantation under triple immunosuppressive therapy. *Transplant. Proc.* **27**: 846-849.
- 144. Magrum L. J. and Johnston P. V.** 1985. Effect of culture in vitro with eicosatetraenoic (20:4(n-6)) and eicosapentaenoic (20:5(n-3)) acids on fatty acid composition, prostaglandin synthesis and chemoluminescence of rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **792**: 141-148.
- 145. Marcos A.** 1997. The immune system in eating disorders: an overview. *Nutrition* **13**: 853-862.
- 146. Marignani P. A. and Sebaldt R. J.** 1995. Formation of second messenger diradylglycerol in murine peritoneal macrophages is altered after in vivo (n-3) polyunsaturated fatty acid supplementation. *J. Nutr.* **125**: 3030-3040.
- 147. Martín-Moreno J. M., Willett W. C. and Gorgojo L.** 1994. Dietary fat, olive intake and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* **58**: 774-780.
- 148. Mascioli E., Leader L., Flores E., Trimbo S., Bistrrian B. and Blackburn G.** 1988. Enhanced survival to endotoxin in guinea pigs fed IV fish oil emulsion. *Lipids* **23**:623-625.

- 149. Matis L. A., Glimcher L. H., Paul W. E. and Schwartz R. H.** 1983. Magnitude of response of histocompatibility-restricted T-cell clones is a function of the product of the concentration of antigen and Ia molecules. *Proc. Nat. Aca. Sciences USA* **80**: 6019-6023.
- 150. Matsuo N., Osada K., Kodama T, Lim B. O., Nakao A., Yamada K. and Sugano M.** 1996. Effects of g-linolenic acid and its positional isomer pinolenic acid on immune parameters of Brown Norway rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **55**: 223-229.
- 151. Mayatepek E., Paul K., Leichsenring M., Pfisterer M., Wagner D., Domann M., Sonntag H. G. and Bremer H. J.** 1994. Influence of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ synthesis and the time course of experimental tuberculosis in guinea pigs. *Infection* **22**: 106-112.
- 152. Meydani S. N., Yogeewaran 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**: 1245-1252.
- 153. Meydani S. N.** 1991. Health Effects of Dietary Fatty Acids. In J. Nelson (ed.), American Oil Chemist's Society, Champaign, I. L. 167-183.
- 154. Meydani S. N., Endres S., Woods M. M., Goldin B. R., Soo C., Morrill-Labrode A., Dinarello C. A. and Gorbach S. L.** 1991. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J. Nutr.* **121**: 547-555.
- 155. Miles E. A. and Calder P. C.** 1998. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 277-292.
- 156. Mosquera J., Rodríguez-Iturbe B. and Parra G.** 1990. Fish oil dietary supplementation reduces Ia expression in rat and mouse peritoneal macrophages. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **56**: 124-129.
- 157. Mossman T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
- 158. Muller C. P., Stephany D. A., Shinitzky M. and Wunderlich J. R.** 1983. Changes in cell-surface expresión of MHC and Thy-1-2 determinants following treatment with lipid modulating agents. *J. Immunol.* **131**: 1356-1362.
- 159. Muller F., Svardal A. M., Nordoy I., Berge R. K., Aukrust P. and Froland S. S.** 2000. Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**: 905-914.

- 160. Netea M. G., Kullberg B. J., Blok W. L. and van der Meer J. W. M.** 1999. Immunomodulation by *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol. Today* **20**: 103.
- 161. Ochoa J., Quiles J., Ramírez-Tortosa M. C., Mataix J. and Huertas J. R.** 2002. Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition* **18**: 60-65.
- 162. Ogawa R., Pacelli R., Espey M. G., Miranda K. M., Friedman N., Kim S. M., Cox G., Mitchell J. B., Wink D. A. and Russo A.** 2001. Comparison of control of *Listeria* by nitric oxide redox chemistry from murine macrophages and NO donors: insights into listericidal activity of oxidative and nitrosative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 268-276.
- 163. Otto D. A., Kahn D. R., Hamm M. W., Forrest D. E. and Wooten J. T.** 1990. Improved survival of heterotopic cardiac allografts in rats with dietary *n*-3 polyunsaturated fatty acids. *Transplantation* **50**: 193-198.
- 164. Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Wurtele G., Spiegelhalder B. and Bartsch H.** 2000. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* **1**: 107-112.
- 165. Palombella V. J., Rando O. J., Goldberg A. L. and Maniatis T.** 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**: 773-785.
- 166. Palombo J. D., De Michele S. J., Boyce P. J., Lydon E. E., Liu J. W., Huang Y. S., Forse R. A., Mizgerd J. P. and Bistrrian B. R.** 1999. Effect of short-term enteral feeding with eicosapentaenoic and γ -linoleic acids on alveolar macrophage eicosanoid synthesis and bactericidal function in rats. *Crit. Care Med.* **27**: 1908-1915.
- 167. Paul K. P., Leichsenring M., Pfisterer M., Mayatepek E., Wagner D., Domann M., Sonntag H. G. and Bremer H. J.** 1997. Influence of *n*-6 and *n*-3 polyunsaturated fatty acids on the resistance to experimental tuberculosis. *Metabolism* **46**: 619-624.
- 168. Peck M. D., Alexander J. W., Ogle C. K. and Badcock G. F.** 1990. The effect of dietary fatty acids on response to *Pseudomonas* infection in burned mice. *J. Trauma.* **30**: 445-452.
- 169. Peck M. D.** 1994. Interaction of lipids with immune function I: Biochemical effects of dietary lipids on plasma membranes. *J. Nutr. Biochem.* **5**: 446-478.

- 170. Penninger J. M. and Kroemer G.** 1998. Molecular and cellular mechanism of T lymphocyte apoptosis. *Adv. Immunol.* **68**: 51-144.
- 171. Penschow J. and Mackay I. R.** 1980. NK and K cell activity of human blood: differences according to sex, age, and disease. *Ann. Rheum. Dis.* **39**: 82-86.
- 172. Penzo D., Tagliapetra C., Colonna R., Petronilli V. and Benardi P.** 2002. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**: 160-165.
- 173. Peterson L. D., Jeffery N. M., Thies F., Sanderson P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1998a. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E₂ production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids* **33**: 171-180.
- 174. Peterson L. D., Thies F., Sanderson P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1998b. Low levels of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids mimic the effects of fish oil upon rat lymphocytes. *Life Sci.* **62**: 2209-2217.
- 175. Peterson L. D., Thies F. and Calder P. C.** 1999. Dose-dependent effects of dietary g-linolenic acid on rat spleen lymphocyte functions. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **61**: 19-24.
- 176. Petit F., Arnoult D., Viollet L. and Estaquier J.** 2003. Intrinsic and extrinsic pathways signalling during HIV-1 mediated cell death. *Biochimie* **85**: 795-811.
- 177. Prickett J. D., Robinson D. R. and Bloch K. J.** 1982. Enhanced production of Ig E and Ig G antibodies associated with a diet enriched in eicosapentaenoic acid. *Immunology* **46**: 819-826.
- 178. Puertollano M. A., Algarra I., Ortega E., de Pablo M. A. and Álvarez de Cienfuegos G.** 2001a. Loss of cell natural killer cell activity after murine tumor transplantation appears as a consequence of dietary lipid administration. *Anticancer Res.* **21**: 2697-2702.
- 179. 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**: 47-52.
- 180. 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**: 352-357.

- 181. Puertollano M. A. and de Pablo M. A.** 2002. Aplicación clínica de los ácidos grasos como agentes moduladores de las funciones inmunes. *Rev. Clin. Esp.* **202**: 215-216.
- 182. Ramstedt U., Ng J., Wigzell H., Serhan C. N. and Samuelsson B.** 1985. Action of novel eicosanoids lipoxin A and B on human Natural Killer cell cytotoxicity. Effects on intracellular cAMP and target cell binding. *J. Immunol.* **135**: 3434-3438.
- 183. Rao C. V., Hirose Y., Indranie C. and Reddy B. S.** 2001. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* **61**: 1927-1933.
- 184. Rasmussen L. B., Kiens B., Pedersen B. K. and Richter E. A.** 1994. Effect of diet and plasma fatty acid composition on immune status in elderly males. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**: 572-577.
- 185. Ravagnan L., Roumier T. and Kroemer G.** 2002. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.* **192**: 131-137.
- 186. Rayon J. I., Carver J. D., Wyble L. E., Wiener D., Dickey S. S., Bendford V. J., Chen L. T. and Lim D. V.** 1997. The fatty acids composition of maternal diet affects lung prostaglandin E2 levels and survival from group B streptococcal sepsis in neonatal rat pups. *J. Nutr.* **127**: 1989-1992.
- 187. Reddy Avula C. P., Zaman A. K., Lawrence R. and Fernandes G.** 1999. Induction of apoptotic mediators in Balb/c splenic lymphocytes by dietary n-3 and n-6 fatty acids. *Lipids* **34**: 921-927.
- 188. Reddy B. S. and Maruyama H.** 1986. Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced clon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.* **46**: 3367-3370.
- 189. Reddy B. S., Burill C. and Rigotty J.** 1991. Effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**: 487-491.
- 190. Risio M., Lipkin M., Newmark H., Yang K., Rossini F. P., Steele V. E., Boone C. W. and Kelloff G. J.** 1996. Apoptosis, cell replication, and Western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Res.* **56**: 4910-4916.
- 191. Robinson D. R., Urakaze M., Huang R., Taki H., Sugiyama E., Knoell C. T., Xu L., Yeh E. T. H. and Auron P. E.** 1996. Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1b gene expression. *Lipids* **31**: S23-S31.
- 192. Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D. and Goldberg A. L.** 1994. Inhibitors of the proteasome block the

- degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-771.
- 193. Roder J. C. and Klein M.** 1979. Target-effector interaction in the natural killer cell system. *J. Immunol.* **123**: 2785-2790.
- 194. Rola-Pleszczinski M., Gagnon L. and Sirois P.** 1983. Leukotriene B4 augments human natural cytotoxic cell activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**: 531-537.
- 195. Roper R. L. and Phipps R. P.** 1994. Prostaglandin E2 regulation of the immune response. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **22**: 101-111.
- 196. Rose D. P.** 1997. Dietary fatty acids and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 998S-1003S.
- 197. Rose D. P. and Connolly J. M.** 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Therap.* **83**: 217-244.
- 198. Rubin R. H., Wilkinson R.A., Xu L. and Robinson D. R.** 1989. Dietary marine lipid does not alter susceptibility of (NZB x NZW) F1 mice to pathogenic microorganisms. *Prostaglandins* **38**: 251-262.
- 199. Ruemmele F. M., Dionne S., Qureshi I., Sarma D. S., Levy E. and Seidman E. G.** 1999. Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ.* **6**: 729-735.
- 200. Sadeghi S., Wallace F. A. and Calder P. C.** 1999. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* **96**: 404-410.
- 201. Sanderson P., Yaqoob P. and Calder P. C.** 1995a. Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *J. Nutr. Env. Med.* **5**: 119-132.
- 202. Sanderson P., Yaqoob P. and Calder P. C.** 1995b. Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs. host and host vs. graft responses in the rat. *Cell. Immunol.* **164**: 240-247.
- 203. 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**: 771-777.
- 204. Sanderson P. and Calder P. C.** 1998. Dietary fish oil diminishes lymphocyte adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunology* **94**: 79-87.

- 205. Sasaki T., Kanke Y., Nagashaki M., Toyokawa M., Matsuda M., Shimizu J., Misawa Y. and Takita T.** 2000. Dietary docosahexaenoic acid can alter the surface expression of CD4 and CD8 on T cells in peripheral blood. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1047-1049.
- 206. Sauer L. A., Dauchy R. T. and Blask D. E.** 2000. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res.* **60**: 5289-5295.
- 207. Scott W. A., Zrike J. M., Hamil A. L., Kempe J. and Cohn Z. A.** 1980. Regulation of arachidonic acid metabolism in macrophages. *J. Exp. Med.* **152**: 324-335.
- 208. Scrimshaw N. S.** 2003. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J. Nutr.* **133**: 316S-321S.
- 209. Shinomura T., Asoaka Y., Oka M., Yoshida K. and Nishizuka Y.** 1991. Synergistic actino of diacylglycerol and unsaturated fatty acids for protein kinase C activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5149-5153.
- 210. Schoonjans K., Staels B. and Aurwerx J.** 1996. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids in gene expression. *J. Lipid Res.* **37**: 907-925.
- 211. Soyland E., Nenseter M. S., Braathen L. and Drevon C. A.** 1993a. Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**: 112-121.
- 212. Soyland E., Funk J., Rajka G., Sandberg M., Thune P., Rustad L., Helland S., Middelfart K., Odu S., Falk E. S., Solvoll K., Bjorneboe G. E. A. and Drevon C. A.** 1993b. Effect of dietary supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids in patients with psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1812-1816.
- 213. Soyland E., Lea T., Sandstad B. and Drevon A.** 1994. Dietary supplementation with very long-chain n-3 fatty acids in man decreases expression of the interleukin-2 receptor (CD25) on mitogen-stimulated lymphocytes from patients with inflammatory skin diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**: 236-242.
- 214. Springer T. A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434.
- 215. Stoll B. A.** 2002. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br. J. Nutr.* **87**: 193-198.
- 216. Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V. and Gill L.** 2000. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J. Epidemiol. Community Health* **54**: 765-760.

- 217. Stubbs C. D. and Smith A. D.** 1984. The modification of mammalian polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* **779**: 89-137.
- 218. Stulnig T. M., Huber J., Leitinger N., Imre E. M., Angelisova P., Nowotny P. and Waldhausl W.** 2001. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J. Biol. Chem.* **276**: 37335-37340.
- 219. Sugihara N., Tsuruta Y., Date Y., Furuno K. and Kohashi K.** 1994. High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultures rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**: 124-128.
- 220. Sumida C., Graber R. and Nunez E.** 1993. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messenger. *Prostag. Leukot. Essent. Fatty Acids* **48**: 117-122.
- 221. Takahashi M., Fukutake M., Fukuda K., Ohata T., Yazawa K., Sugimura T. and Wakabayashi K.** 1997. Suppression of rat colon carcinogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **38**: 109.
- 222. Takeshita M., Ueda H., Shirabe K., Higuci Y. and Yoshida S.** 1997. Lack of promotion of colon carcinogenesis by high-oleic safflower oil. *Cancer* **79**: 1497-1493.
- 223. Tan S., Seow T. K., Liang R. C., Koh S., Lee C. P., Chaung M. C. and Hooi S. C.** 2002. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int. J. Cancer* **98**: 523-531.
- 224. Tang D. G., Guan K. L., Li I., Honn K. V., Chen Y. Q., Rice R. L., Taylor J. D. and Porter A. T.** 1997. Suppression of W256 carcinosarcoma cell apoptosis by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids. *Int. J. Cancer* **72**: 1078-1087.
- 225. Tappia P. S. and Grimble R. F.** 1994. Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumor necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition. *Clin. Sci.* **87**: 173-178.
- 226. 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**: 539-548.
- 227. Trichopoulou A., Katsouyanni K., Stuver S., Tzala L., Gnardellis C., Rimm E. and Trichopoulos D.** 1995. Consumption of olive oil and specific

- food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 110-116.
- 228. Trichopoulou A. Lagiou P., Kuper H. and Trchopoulos D.** 2000. Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **9**: 869-873.
- 229. Turek J. J., Schoenlein I. A., Clark L. K. and van Alstine W. G.** 1994. Dietary polyunsaturated fatty acid effects on immune cells of the porcine lung. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 599-604.
- 230. Turnock L., Cook M., Steinberg M. and Czuprynski C.** 2001. Dietary supplementation with conjugated linoleic acid does not alter the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Lipids* **36**: 135-138.
- 231. Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Carta G., Quinn P. J., Schor N. F. and Kagan V. E.** 1997. Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**: 413-423.
- 232. van der Heide H. J. J., Bilo H. J. G., Donker J. M., Wilmink J. M. and Tegzess A. M.** 1993. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplant. *N. Engl. J. Med.* **329**: 769-773.
- 233. Vigouroux S., Farout L., Clavel S., Briand Y. and Briand M.** 2003. Increased muscle proteasome activities in rats fed a polyunsaturated fatty acid supplement diet. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 749-755.
- 234. Villa P. and Ghezzi P.** 1995. Effect of N-acetyl-L-cysteine on sepsis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **292**: 341-344.
- 235. Villa P., Sacconi A. and Sica A.** 2002. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J. Infect. Dis.* **185**: 1115-1120.
- 236. Warrington R. J.** 1987. Interleukin-2 abnormalities in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. A role for overproduction of interleukin-2 in human autoimmunity? *J. Rheumatol.* **15**: 616-620.
- 237. Welsh R. M. and Vargas-Cortes M.** 1992. Natural killer cells in viral infection. In C. E. Lewis and J. O'D. McGee (ed.), *The natural killer cell*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 107-150
- 238. Whelan J., Li B. and Birdwell C.** 1997. Dietary arachidonic acid increases eicosanoid production in the presence of equal amounts of dietary eicosapentaenoic acid. *Adv. Exp. Med. Biol.* **400**: 897-904.

- 239. Witz G. and Czerniecki B. J.** 1988. Tumor promoters differ in their production by murine peritoneal exudate cells following in vivo administration. *Carcinogenesis* **10**: 807-811.
- 240. Wolf R. E., Brelsford W. G.** 1988. Soluble interleukin-2 receptors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **31**: 729-735.
- 241. Wu D. and Meydani S. N.** 1998. n-3 polyunsaturated fatty acids and immune function. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 503-509.
- 242. Wynder E. L., Cohen L. A., Muscat J. E., Winster B., Dwyer J. T. and Blackburn G.** 1997. Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 766-775.
- 243. 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**: 335-345.
- 244. Yaqoob P., Newsholme E. A. and Calder P.** 1994a. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol. Lett.* **41**: 241-247.
- 245. Yaqoob P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1994b. The effect of dietary lipids manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* **82**: 603-610.
- 246. Yaqoob P., Newsholme E. A. and Calder P. C.** 1995. Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1255**: 333-340.
- 247. 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**: 129-135.
- 248. Yaqoob P.** 2002. Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**: S9-S13.
- 249. Yaqoob, P.** 2003a. Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications. *Curr. Op. Clin. Nutr. Metab. Care* **6**: 133-150.
- 250. Yaqoob, P.** 2003b. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol.* **24**: 639-645.
- 251. York I. A., Goldberg A. L., Mo X. Y. and Rock K. L.** 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.* **172**: 49-66.

- 252. Zenewicz L. A., Skinner J. A., Goldfine H. and Shen H.** 2004. *Listeria monocytogenes* virulence proteins induce surface expression of Fas ligand on T lymphocytes. *Mol. Microbiol.* **51**: 1483-1492.