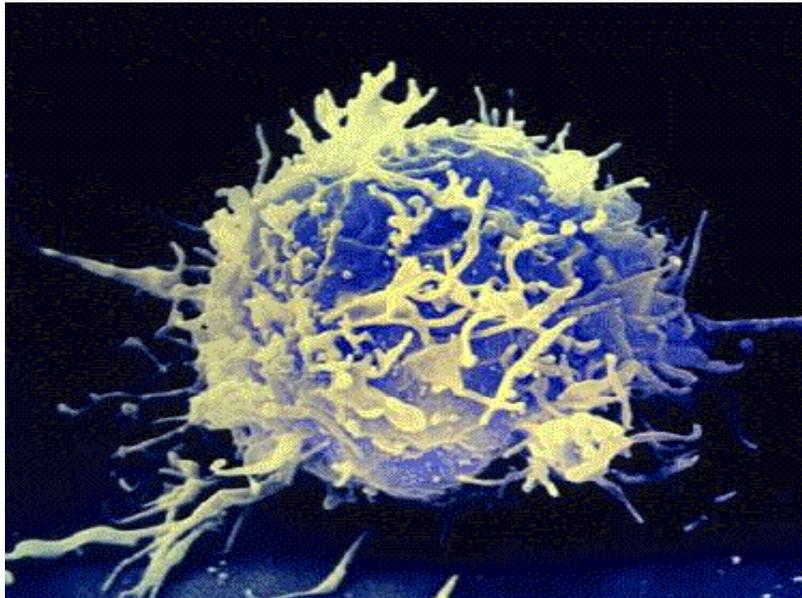


**TESIS DOCTORAL**

**CÓMO ENGRASAR CORRECTAMENTE EL ORGANISMO:  
“EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA RESPUESTA  
INMUNITARIA”**

**Saleta Sierra Ávila  
Granada, 2006**



Universidad de Granada  
Dept. Bioquímica y Biología  
Molecular III e Inmunología.



Puleva Biotech SA  
Dept. Biomedicina

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Saleta Sierra Ávila  
D.L.: Gr. 1217 - 2006  
ISBN: 978-84-338-4008-0

## **COMO ENGRASAR CORRECTAMENTE EL ORGANISMO. EFECTO DE LA GRASA SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA**

Memoria que presenta la Farmacéutica Saleta Sierra Ávila para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada.

Fdo. Saleta Sierra Ávila

Los directores de esta Tesis Doctoral, Dr. Jordi Xaus Pey, Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona, y de la Dra. Mónica Olivares Martín, Doctora en Farmacia por la Universidad de Granada

CERTIFICAN que los trabajos que se exponen en esta Tesis Doctoral: “Como engrasar correctamente el organismo: Efecto de la grasa sobre la respuesta inmunitaria” han sido realizados en el Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech, bajo la tutela del Dr. Enrique García Olivares, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología de la Universidad de Granada y en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Granada y el Departamento de Neuroinmunología Clínica del Hospital Universitario de Vall d’Hebron, Barcelona. La presente memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Farmacia por el tribunal que en su día se designe.

Dr. Jordi Xaus Pey

Dra. Mónica Olivares Martín



## Índice

---



---

ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	
1. El sistema inmunitario	3
1.1. Clasificación de la respuesta inmunitaria	3
1.2. La respuesta inflamatoria	6
1.3. La respuesta alérgica	7
1.4. Las células del sistema inmunitario	10
1.5. Papel de las citocinas en la respuesta inmunitaria	13
1.5.1. Propiedades de las citocinas	13
1.5.2. Clasificación de las citocinas	13
2. Dieta y respuesta inmunitaria	19
2.1. Efectos inmunitarios de los nutrientes	20
2.1.1. Hidratos de carbono	20
2.1.2. Aminoácidos y proteínas	21
2.1.3. Grasas	22
2.1.4. Vitaminas y minerales	22
2.2. Concepto de alimento funcional	23
2.3. Concepto de inmunonutrición	26
3. Propiedades y metabolismo de la grasa	29
3.1. Definición de lípido, grasa y aceite	29
3.2. Clasificación de los lípidos según diversos criterios	29
3.3. Papel fisiológico de los lípidos	30
3.4. Los ácidos grasos de la dieta	31
3.4.1. Fuentes alimentarias de ácidos grasos	32
3.4.2. Digestión y absorción de las grasas	32
3.4.3. Oxidación de los ácidos grasos y glicerol	33
3.4.4. Biosíntesis de ácidos grasos	34
3.5. El colesterol de la dieta	36
3.6. Grasas importantes desde el punto de vista alimentario	37
4. Grasa y sistema inmunitario	43
4.1. La dieta en la actualidad	44
4.2. Mecanismos de acción de los ácidos grasos	46
4.3. Efectos de los ácidos grasos sobre la respuesta inmunitaria	54
4.3.1. Efectos de los ácidos grasos de cadena corta	54

4.3.2.	Efectos de los ácidos grasos de cadena media	54
4.3.3.	Efectos de los ácidos grasos monoinsaturados	55
4.3.4.	Efectos de los ácidos grasos poliinsaturados	56
4.4.	Efectos de los ácidos grasos sobre enfermedades	63
OBJETIVOS		75
MATERIAL Y MÉTODOS		
5.	Animales de experimentación y elaboración de dietas	79
6.	Modelos animales y experimentación <i>in vitro</i>	81
6.1.	Modelos animales	81
6.2.	Experimentos <i>in vitro</i>	93
7.	Determinación de parámetros en muestras biológicas	95
RESULTADOS		
8.	Efectos inmunitarios del aceite de oliva	113
8.1.	Efectos inmunitarios derivados de la incorporación de ácido oleico a la grasa de la dieta en roedores sanos	113
8.2.	Efectos inmunitarios de la fracción insaponificable del aceite de oliva	117
8.2.1.	Efectos inmunitarios del hidroxitirosol	118
8.2.2.	Efecto del hidroxitirosol sobre un modelo de esclerosis múltiple	122
8.3.	Efectos beneficiosos del aceite de oliva en un proceso inflamatorio intestinal inducido en ratas	126
9.	Modulación de la respuesta inmunitaria ejercida por el aceite de salvado de arroz	133
9.1.	Efectos inmunitarios del aceite de salvado de arroz en ratones sanos oleico a la grasa de la dieta en roedores sanos	133
9.2.	Efecto inmunitario ejercido por la fracción insaponificable del aceite de salvado de arroz	138
9.3.	Efectos inmunitarios del $\gamma$ -orizanól incorporado en la dieta de los Roedores	140
9.4.	Efecto de una dieta enriquecida en aceite de salvado de arroz sobre un modelo de esclerosis múltiple	142
10.	Efectos inmunitarios del aceite de pescado	
10.1.	Efecto inmunitario de una dieta enriquecida en aceite de pescado	

---

en ratones sanos	145
10.2.Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de dermatitis de contacto en ratones	154
10.3.Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de inflamación intestinal en ratas	157
10.4.Efectos de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un fenómeno de dermatitis alérgica en ratones	159
10.5.Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de esclerosis múltiple en ratones	163
10.6. Efectos de los ácidos grasos n-3 sobre salud cardiovascular, alteraciones metabólicas y obesidad	
10.6.1.Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de obesidad inducido por la ingesta de una dieta de cafetería	167
10.6.2.Efectos de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre cambios genéticos ocurridos tras una ingesta rica en grasa saturada	172
10.7. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de infección en ratones	174
10.8.Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de <i>shock</i> anafiláctico en ratones	177
10.9.Efectos inmunomoduladores de dietas ricas en EPA o DHA en ratones	179
10.10. Interconversión de EPA en DHA	186
10.11.Efecto anti-inflamatorio del EPA y DHA en triglicéridos estructurados	189
10.12.Efecto anti-inflamatorio derivado de la posición del ácido graso	192
DISCUSIÓN	197
COCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFÍA	229
ANEXO	c



## **Abreviaturas**

---



---

<b>2-AG</b>	2-araquidonilglicerol
<b>Ac</b>	Anticuerpos
<b>AG</b>	Ácido Graso
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AGCC</b>	Acidos grasos de cadena corta
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AHA</b>	Sociedad Americana del Corazón ( <i>American Heart Association</i> )
<b>AINE</b>	Anti-inflamatorio no esteroídico
<b>ALA</b>	Ácido $\alpha$ -linolénico ( <i>alpha-linolenic acid</i> )
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1 ( <i>Activator Protein-1</i> )
<b>APC</b>	Células presentadores de antígeno ( <i>Antigen presenting cell</i> )
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>AS</b>	Aceite de soja
<b>ATCC</b>	Asociación Americana de Cultivos Tipo ( <i>Association Tissue Culture Collection</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BMDM</b>	Macrófagos derivados de médula ósea ( <i>Bone marrow derived macrophage</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero fetal bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CB</b>	Cannabinoide
<b>CE</b>	Colesterol esterificado
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>CLA</b>	Ácido linoleico conjugado ( <i>Conjugated linoleic acid</i> )
<b>CML</b>	Células del músculo liso
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CSF</b>	Factores estimulantes de colonias ( <i>Colony Stimulating Factor</i> )
<b>CTL</b>	Linfocito citotóxico o citolítico ( <i>Citotoxic T Lymphocyte</i> )
<b>DA</b>	Dermatitis atópica o alérgica
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAI</b>	Índice de severidad de la enfermedad ( <i>Disease Assesment Index</i> )

<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DGLA</b>	Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico ( <i>Dihomo-gamma-linoleic acid</i> )
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico ( <i>Docosahexaenoic acid</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNFB</b>	1-Fluoro-2,4-dinitrobenceno
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>DPA</b>	Ácido docosapentaenoico ( <i>Docosopentaenoic acid</i> )
<b>DSS</b>	Sulfato sódico de dextrano ( <i>Dextran Sodium Sulfate</i> )
<b>EAE</b>	Encefalitis autoinmune experimental
<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>EDTA</b>	Acido etilen diaminotetraacetico ( <i>Etilen diaminotetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	Enzimainmunoensayo
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico ( <i>Eicosapentaenoic acid</i> )
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación ( <i>Food and Agriculture Organization of The United Nations</i> )
<b>FasL</b>	Ligando de Fas ( <i>Fas Ligand</i> )
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Serum Bovine</i> )
<b>FID</b>	Detector por ionización de llama ( <i>Flame Ionización Detector</i> )
<b>FOO</b>	Aceite de oliva con aceite de pescado incorporado
<b>FUFOSE</b>	<i>Functional Food Science in Europe</i>
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado a mucosa ( <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i> )
<b>GAO</b>	Aceite Girasol alto oleico
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos ( <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocíticas-macrofágicas ( <i>Granulocyte-macrophage-Colony Stimulating Factor</i> )
<b>GSH</b>	Glutation
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad ( <i>Hihg Density Lipoprotein</i> )
<b>HETE</b>	Ácido hidroxieicosatetraenoico
<b>HLA</b>	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Human Leucocyte Antigen</i> )

---

<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas ( <i>High Performance Liquid Chromatography Mass</i> )
<b>HRE</b>	Elemento de respuesta a hormona ( <i>Hormona Response Element</i> )
<b>HT</b>	Hidroxitirosol
<b>HTAB</b>	Hexadecil trimetilamonio
<b>IBD</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal ( <i>Inflammatory Bowel Disease</i> )
<b>ICAM</b>	Moléculas de adhesión intracelular de clase I ( <i>Intracellular Adhesion Molecule Class I</i> )
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>IκB</b>	Subunidad Inhibitoria de NFκB
<b>IKK</b>	IκB kinasa
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa ( <i>Inducible Nitric Oxid Synthase</i> )
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>ISSFAL</b>	Sociedad Internacional para el estudio de Ácidos Grasos y Lípidos ( <i>Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids</i> )
<b>JHCI</b>	Iniciativa de reclamo en salud cardiovascular ( <i>Joint Health Claim Initiative</i> )
<b>LA</b>	Ácido linoleico ( <i>Linoleic Acid</i> )
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LBD</b>	Dominio de unión al ligando ( <i>Ligand Binding Protein</i> )
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a function linfocitaria ( <i>Leukocyte Function Associated Antigen</i> )
<b>LOX</b>	Lipoxigenasa
<b>LPL</b>	Lipoprotein Lipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>LXR</b>	Receptor de hígado X ( <i>Liver X Receptor</i> )
<b>MAPK</b>	Proteínas Kinasas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )

<b>MCFA</b>	Ácidos grasos de cadena media ( <i>Médium Chain Fatty Acid</i> )
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 ( <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )
<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos ( <i>Macrophage- Colony Stimulating Factor</i> )
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Proteína inflamatoria macrfágica ( <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> )
<b>MMP</b>	Matriz metaloproteinasa
<b>MO</b>	Macrófago
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>MUFA</b>	Ácidos grasos monoinsaturados ( <i>Monounsaturated Fatty Acids</i> )
<b>Nd</b>	No detectado
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas ( <i>Nuclear Factor of Activated T Cell</i> )
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa b ( <i>Nuclear Factor kappa b</i> )
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NMR</b>	Resonancia magnética nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>OO</b>	Aceite de oliva
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PCK</b>	Protein Kinasa K
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PKA</b>	Protein Kinasa A
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>PPAR</b>	Receptor activado de proliferación de peroxisomas ( <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i> )
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados ( <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
<b>QM</b>	Quilimicrón
<b>RBO</b>	Aceite de arroz ( <i>Rice Bran Oil</i> )
<b>RN</b>	Receptores nucleares

---

<b>RT-PCR</b>	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>SD</b>	Desviación estándar ( <i>Standard Deviation</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico ( <i>Sodium Dodecil Sulfate</i> )
<b>SENC</b>	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SPSS</b>	Sistema Estadístico para ciencias sociales ( <i>Statistical Package for Social Science</i> )
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico ( <i>Tiobarbituric Acid</i> )
<b>TCA</b>	Ácido tricloro-acético ( <i>Trichloroacetic Acid</i> )
<b>TCR</b>	Receptor de la célula T ( <i>T Cell Receptor</i> )
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGFβ</b>	Factor transformador del crecimiento ( <i>Transforming Growth Factor</i> )
<b>THC</b>	Tetrahidrocannabinol
<b>TMB</b>	3,3'-5,5'-tetrametil-bencidina
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
<b>TSB</b>	Broth Triptona-Soja ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )
<b>TSA</b>	Agar Tristona Soja ( <i>Tryptic Soy Agar</i> )
<b>VCAM I</b>	Moléculas de adhesión vascular de clase I ( <i>Vascular Adhesion Molecule Class I</i> )
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad ( <i>Very Low Density Protein</i> )
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )



## **Introducción**

---



## 1. EL SISTEMA INMUNITARIO

La inmunología es la ciencia que estudia los procesos moleculares y celulares implicados en la defensa de la integridad biológica del organismo, a través de la identificación de sustancias propias, detección de las sustancias extrañas y destrucción de estas últimas. Células y moléculas interactúan entre sí para mantener el equilibrio interno constituyendo el sistema inmunitario. Los mecanismos de defensa son muy diversos y heterogéneos, existiendo siempre una actuación integrada de todos ellos, en lo que se denomina respuesta inmunitaria (Harbige LS, 2003).

### 1.1 Clasificación de la respuesta inmunitaria

La función del sistema inmunitario es la defensa de la integridad biológica del individuo, para lo cual éste se vale de dos tipos de respuesta inmunitaria, la inespecífica o natural, y la específica o adquirida (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Características de la inmunidad inespecífica y específica (Adaptada de Abbas AK y col.)

	Natural	Adquirida
<b>Barreras físico-químicas</b>	Piel, mucosa	Sistema inmunitario cutáneo y mucoso Ac en las secreciones mucosas
<b>Moléculas circulantes</b>	Complemento	Anticuerpos
<b>Células</b>	Fagocitos, células agresoras naturales	Linfocitos
<b>Mediadores solubles activos en otras células</b>	Citocinas derivadas de macrófagos	Citocinas derivadas de linfocitos

#### a) Respuesta inmunitaria específica versus inespecífica

La **respuesta inmunitaria inespecífica**, también conocida como natural o innata, está constituida por diversos mecanismos de defensa los cuales no aumentan por las exposiciones repetitivas con la sustancia que los induce, y no discriminan entre la mayor parte de las sustancias extrañas. Es la primera barrera defensiva del organismo. Las células de la inmunidad innata no reconocen a cada patógeno o molécula extraña en particular,

sino que reconocen una serie de patrones moleculares altamente conservados entre familias enteras de patógenos o moléculas extrañas gracias a receptores de membrana. Por el contrario, en la **respuesta inmunitaria específica** o adquirida (Figura 1.1), los mecanismos de defensa son inducidos por la exposición a sustancias extrañas, son específicos y aumentan en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición. Las sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica se denominan antígenos (Ag) (O'Shea y col, 2004).

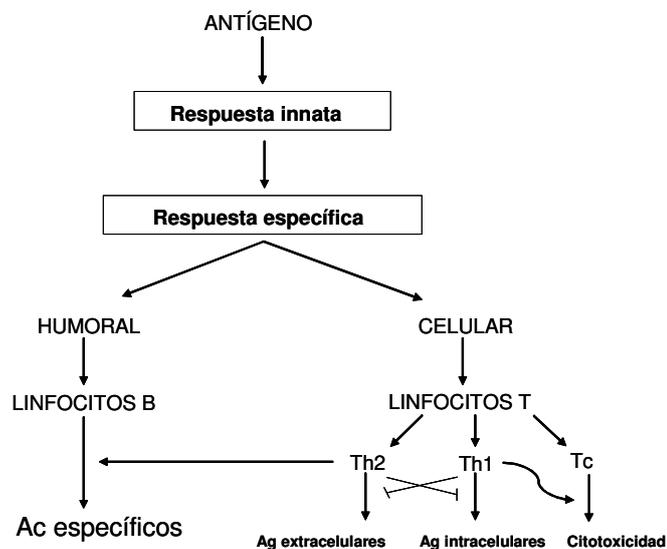


Figura 1.1. Respuesta del sistema inmunitario ante la entrada de antígenos

Dentro de la respuesta específica hay que distinguir entre respuesta humoral y celular. La **respuesta humoral** está mediada por los linfocitos B, que reconocen al antígeno por medio de las inmunoglobulinas de la membrana. Estas células son estimuladas por determinadas citocinas (IL-4, IL-5, IL-6), promoviendo su activación, proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas, que darán lugar a la síntesis de inmunoglobulinas (Igs) que se unirán al Ag propiciando su destrucción. Esta respuesta es responsable de la destrucción de microorganismos extracelulares y de sus toxinas. En la **respuesta celular** participan los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), que lisan las células que portan el Ag que indujo su activación; y los linfocitos T colaboradores CD4+ o *helper*, encargados de producir citocinas para regular el tipo de respuesta que se va a producir. Estos últimos pueden diferenciarse desde Th0 hacia Th1, linfocitos de carácter

inflamatorio, o hacia Th2, linfocitos que median una respuesta por medio de anticuerpos (Ac). Se dan así dos tipos de respuesta, existiendo siempre un equilibrio entre ambas (Figura 1.1). Los linfocitos T reconocen al Ag mediante el receptor T (TCR) sólo cuando éste es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células, en el seno de una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). En el proceso de presentación del Ag, intervienen las llamadas moléculas accesorias situadas en los linfocitos T y en las APC. Su misión es reforzar la unión entre el TCR y el complejo MHC-péptido. Tras el reconocimiento, tiene lugar la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T (Calder PC y col, 2002).

La respuesta inmunitaria específica posee una serie de características comunes que la convierten en un sistema de defensa de elevada eficacia (Peña J, 1994):

- **Especificidad:** Es específica para Ag distintos, es decir, que está dirigida sólo frente al Ag que la induce. El epítipo es la porción de Ag que se reconoce.
- **Clonalidad:** Cuando un linfocito reconoce al Ag, éste se activa, prolifera y diferencia, dando lugar a múltiples células derivadas con idénticos receptores de superficie.
- **Diversidad:** Se calcula que el sistema inmunitario de los mamíferos posee la capacidad de reconocer  $10^9$  epítipos.
- **Memoria:** La exposición del sistema inmunitario a un Ag extraño aumenta su capacidad para responder de nuevo frente a ese antígeno.
- **Autoregulación:** Este tipo de respuesta dispone de mecanismos internos de control, de modo que la intensidad de la misma se regula por acción de Igs y citocinas.
- **Discriminación entre lo propio y lo ajeno:** La autotolerancia es aprendida por los linfocitos de cada individuo, lo que les permite no responder frente a sustancias propias potencialmente antigénicas. Alteraciones de este mecanismo dan lugar a enfermedades autoinmunes.

#### b) Respuesta inmunitaria primaria o secundaria

Cuando por primera vez un Ag se pone en contacto con el organismo se produce **una respuesta inmunitaria primaria**. Por el contrario, cuando al cabo de un tiempo el mismo Ag vuelve a activar al sistema inmunitario, se produce una **respuesta inmunitaria secundaria**. En la respuesta primaria los niveles máximos de Igs se alcanzan tras un periodo de latencia, es de menor intensidad y predomina la IgM; la respuesta secundaria se

da de inmediato tras el contacto antigénico, es más intensa y predomina la IgG, responsable de su acción más permanente debido a su larga vida media (Peña J, 1994).

## 1.2 **La respuesta inflamatoria**

Consiste en una respuesta del organismo frente a una infección o un daño, que debe llevarse a cabo de modo controlado. Es una reacción compleja del tejido conjuntivo vascularizado, que se caracteriza por la acumulación de fluido y leucocitos en los tejidos extravasculares. La inflamación es útil para localizar, diluir y destruir al agente causante de la lesión, e iniciar una serie de acontecimientos que contribuyen a reconstruir y curar el tejido lesionado. Sin embargo, los procesos de reparación pueden ser perjudiciales si se cronifican. Esta es la razón de la existencia de numerosos fármacos antiinflamatorios, cuyo efecto ideal es el de potenciar los efectos saludables de la inflamación controlando al mismo tiempo sus secuelas nocivas (Male D y Roitt I, 1991).

### a) **Respuesta inflamatoria aguda**

Es la respuesta inflamatoria inmediata que se produce en el organismo frente al agente lesivo. Tiene tres componentes principales: cambio en el flujo y calibre vascular, aumento de la permeabilidad vascular y del exudado inflamatorio y por último el paso de leucocitos del espacio vascular al extravascular. Todos estos acontecimientos llevan al acúmulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. El origen de estas alteraciones se debe a la liberación de mediadores químicos como TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-1, PGE<sub>2</sub> y NO (óxido nítrico). Éstos, además, participan en la activación de los leucocitos, lo que induce la fagocitosis y lisis de bacterias. La activación del sistema de coagulación, la fibrinólisis y el complemento aumentan el proceso inflamatorio. Se incrementa la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, como ICAM (Moléculas de adhesión intracelular de clase I), VCAM (Moléculas de adhesión vascular de clase I o selectina E que facilitan la diapédesis (migración de células del sistema inmunitario al foco inflamatorio). En las primeras 24 horas predominan los leucocitos. Pasado este tiempo se acumulan los monocitos y los macrófagos. Estos tipos celulares son responsables de fagocitar microorganismos vivos, células alteradas y trozos de tejidos, función que se realiza más fácilmente si el material está opsonizado, es decir, unido a anticuerpos y/o moléculas del complemento.

### b) Respuesta inflamatoria crónica

La inflamación aguda puede evolucionar hacia la resolución completa, la cicatrización mediante sustitución por tejido conjuntivo, la formación de abscesos, o bien a la progresión de la respuesta tisular hacia una inflamación crónica. La inflamación crónica se caracteriza porque el infiltrado celular está compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, prevaleciendo la formación de tejido fibroso sobre el exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas razones: a) Progresión desde una inflamación aguda, b) episodios recurrentes de inflamación aguda y c) inflamación crónica desde el comienzo asociado frecuentemente a infecciones intracelulares.

Los macrófagos desempeñan un papel clave por la gran cantidad de sustancias biológicamente activas que pueden producir, y que pueden resultar destructivos si se producen de modo descontrolado. Los linfocitos también están presentes, utilizando para su migración sustancias producidas por los macrófagos. A su vez, segregan  $IFN\gamma$ , activador de los macrófagos, estableciéndose de esta forma las bases de la persistencia de la reacción inflamatoria. Por otra parte, las células plasmáticas elaboran Ac frente a los Ag que persisten en la zona inflamada o contra los componentes tisulares alterados. La acumulación de los macrófagos persiste en la inflamación crónica por el reclutamiento continuado de los monocitos procedentes de la circulación sanguínea, por la proliferación local de los macrófagos tras su migración, y por la inmovilización de éstos en la zona inflamada.

### **1.3 La respuesta alérgica**

La homeostasis del sistema inmunitario se basa en el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 liberan citocinas pro-inflamatorias (IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ) mientras que los Th2 liberan otras citocinas (IL-4, IL-5, IL-13) implicadas en la activación de linfocitos B para la producción de Igs como IgE e implicadas en la activación de mastocitos y eosinófilos. El desencadenamiento de esta respuesta de tipo Th2 frente a antígenos inocuos provoca el fenómeno de la alergia (Harbige LS, 2003).

La respuesta Th1 inhibe a la respuesta Th2 y viceversa (Figura 1.1). En los países occidentales, en los que las condiciones higiénicas son mejores que en los países menos desarrollados, el contacto con microorganismos es menos frecuente, por lo que la respuesta Th1 está reducida, de manera que se rompe el equilibrio hacia la respuesta Th2. Según la

llamada “hipótesis de la higiene”, este desequilibrio sería la razón del aumento de la incidencia de alergias en países occidentales.

Por tanto, una reacción alérgica o de hipersensibilidad, es una respuesta inmunitaria inapropiada a determinados Acs medioambientales, a los que se denominan alérgenos (componentes de comida, drogas, polen) (Galli SJ y col, 1999). La hipersensibilidad puede ser de cuatro tipos (Coombs RRA, Gell PGH, 1963):

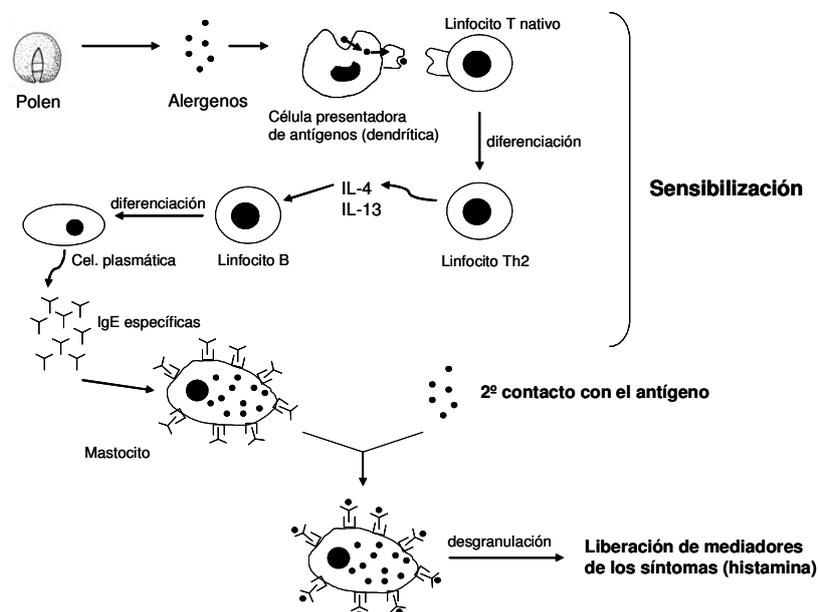
-Tipo I: Hipersensibilidad mediada por IgE. El alérgeno entra en contacto con las células que han sido pasivamente sensibilizadas con Acs específicos, lo que lleva a liberación de mediadores activos de inflamación. Lo que diferencia este tipo de respuesta de la respuesta humoral normal, es que las células plasmáticas secretan IgE. Este Ac se une con gran afinidad a la superficie de mastocitos y basófilos. Una nueva exposición al mismo alérgeno, lleva a la unión del mismo a las IgE de los mastocitos y basófilos sensibilizados, de modo que se induce su degranulación, liberándose compuestos, con diferentes acciones biológicas, principalmente vasoactivas (Kuby J, 1994). Es realmente a este tipo de hipersensibilidad a la que se denomina de manera habitual alergia (Figura 1.2).

-Tipo II: Hipersensibilidad citotóxica mediada por anticuerpos. Se trata de reacciones citotóxicas en las que los Acs reaccionan con Ag expuestos en la superficie de las células propias activando al sistema del complemento, y por tanto, generando daños. Los alimentos no suelen inducir este tipo de reacciones.

-Tipo III: Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos (Con implicación de IgG o IgM). Los complejos Ag-Ac se depositan en los tejidos (paredes de vasos, pulmón, riñón, etc) induciendo la activación del complemento y la consecuente respuesta inflamatoria. Destacamos el fenómeno de *Arthus*, una reacción alérgica dependiente de anticuerpos que consiste en una respuesta temprana, casi indetectable, seguida de una respuesta localizada al cabo de varias semanas

-Tipo IV: Hipersensibilidad retardada. Las células T sensibilizadas reaccionan con los alérgenos sin existir una implicación importante de los Acs. Estas células liberan citocinas que actúan sobre macrófagos o CTL, que son los causantes del daño.

Otro de los fenómenos a tener en cuenta es la respuesta inmunitaria a alimentos, que engloban procesos de alergia y tolerancia. La Tolerancia oral es un proceso activo inducido por proteínas intactas, que conduce a una hiporrespuesta antígeno-específica, es decir, el sistema inmunitario “aprende” a no reaccionar frente a estos antígenos inofensivos, evitando así posteriores problemas de rechazo a éstas y a otras proteínas de la dieta del niño. Se trata de un fenómeno importante para el desarrollo de la inmunidad intestinal del recién nacido. Durante los 2 primeros años de vida en los que se produce la maduración intestinal, la permeabilidad intestinal es más elevada por lo que el paso de antígenos alimentarios es más frecuente y, como el sistema inmunitario tampoco es totalmente maduro, hay antígenos que escapan del proceso de tolerancia y provocan fenómenos de alergia. Este problema se suele solucionar a partir del segundo año, cuando la madurez intestinal e inmunitaria es prácticamente completa. El problema es que si durante estos contactos con antígenos alimentarios, el niño se pone muy en contacto con otro tipo de alérgenos (polen, ácaros, etc...) como su sistema inmunitario está desplazado hacia Th2 tiene mayor probabilidad de desarrollar alergia a estos otros antígenos, y estos fenómenos de alergia ya no remiten tan fácilmente con la edad porque no son antígenos alimentarios sino respiratorios.



**Figura 1.2.** Desencadenamiento del proceso alérgico de tipo I.

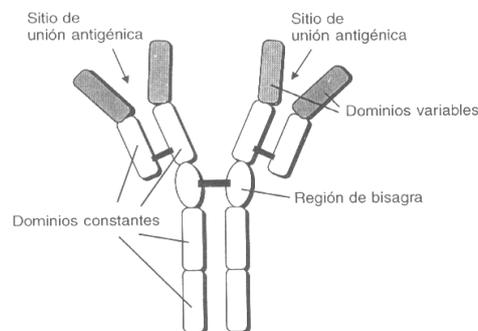
## 1.4 Las células del sistema inmunitario

Las células del sistema inmunitario están presentes normalmente como células circulantes en la sangre y linfa, como grupos anatómicamente definidos de órganos linfoides, y como células dispersas en casi todos los tejidos. La acción del sistema inmunitario es posible gracias a la participación e interrelación de diferentes poblaciones celulares, conocidas como células inmunocompetentes, entre las que destacan los linfocitos (Linfocitos B, Linfocitos T y NK), los macrófagos y los granulocitos.

### 1.4.1. Linfocitos

Los linfocitos son células de tamaño pequeño, con un núcleo voluminoso y provistas de una membrana citoplasmática de especial importancia en la regulación de su funcionalidad. A medida que maduran, comienzan a expresar receptores de Ag, se hacen sensibles a la estimulación antigénica y evolucionan a diferentes clases funcionales.

**Linfocitos B.** Así llamados porque en los pájaros se vio inicialmente que maduraban en un órgano denominado bolsa de Fabricio. En los mamíferos lo hacen en la médula ósea. Son las únicas células capaces de producir anticuerpos como las Igs. Los receptores de Ag de los linfocitos B son formas de Ac unidas a su membrana. La célula B al ser activada, sufre ciertos cambios que culminan con en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos. Unidas a la membrana de los linfocitos B, las Igs actúan como receptores antigénicos. Una vez secretadas, se unen por su fracción constante a macrófagos, células NK, neutrófilos o componentes del complemento, colaborando en la destrucción del Ag. En la Figura 1.3 se detalla la estructura de las inmunoglobulinas.



**Figura 1.3.** Estructura de las inmunoglobulinas

En la Tabla 1.2. se detallan las características más significativas de las inmunoglobulinas detectadas en humanos.

**Tabla 1.2.** Propiedades de la inmunoglobulinas detectadas en humanos

<b>Propiedades de las inmunoglobulina</b>	
<b>Ig G</b>	<p>La más abundante en suero</p> <p>Existen diferentes subtipo: IgG1&gt;IgG2&gt;IgG3=IgG4</p> <p>Neutralizante, precipitante, fija complemento, unión a macrófagos y a NK</p> <p>Atraviesa membranas: actúa en todo el organismo</p> <p>Atraviesa la placenta: Defensa del feto y del neonato</p> <p>Problemas por incompatibilidad Rh madre e hijo</p> <p>Se sintetiza tardíamente tras el contacto con el Ag</p> <p>En un segundo contacto es mayoritaria</p>
<b>IgM</b>	<p>Los más rápidos formados frente a Ag</p> <p>Neutralizante, precipitante, aglutinante, fija complemento, activa respuesta inmunitaria</p> <p>No atraviesa membranas: acción intravascular</p> <p>Es la más frecuente encontrada en membrana de los linfocitos</p>
<b>IgA</b>	<p>Neutralizante y precipitante, unión a neutrófilos, no a macrófagos</p> <p>Es secretada por las mucosas y glándulas exocrinas: función en mucosas y líquidos biológicos</p> <p>Presente en leche materna: protección del neonato</p>
<b>IgD</b>	<p>Concentración escasa en suero</p> <p>Puede ser importante en activación y maduración de linfocitos B</p>
<b>IgE</b>	<p>En individuos alérgicos está aumentada. También en determinados parasitismos</p> <p>No atraviesa placenta: no transferencia de reacciones de hipersensibilidad al feto</p> <p>Libre en sangre y líquidos biológicos, y unida a basófilos y mastocitos</p>

**Linfocitos T.** Su síntesis se inicia en la médula ósea y maduran en el timo. Los linfocitos T colaboradores o *helper* reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas sintetizadas del MHC que se expresan en diferentes APCs. Tras el reconocimiento liberan citocinas que regulan la respuesta inmunitaria. Los CTL lisan a las células que producen Ags extraños, como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares.

**Células *Natural Killer* o NK.** En los setenta se descubrió que existían unas células que eran capaces de destruir células tumorales sin la necesidad de sensibilización previa. A esta capacidad se la denominó citotoxicidad natural y a las células que la desarrollaban, se las llamó *Natural Killer*. Constituyen el 10% de las células mononucleares sanguíneas, no poseen marcadores de linfocitos T o B y no requieren la expresión de MHC para su acción citolítica. Derivan del hígado fetal o de la médula ósea en adultos, madurando fuera del

timo en órganos linfoides periféricos. Las células NK son las más eficaces en la defensa frente a células infectadas por virus, bacterias hongos o parásitos, pero su misión fundamental es la de actuar frente al crecimiento de células tumorales impidiendo su expansión y la formación de metástasis. También poseen acción reguladora al liberar distintos tipos de citocinas como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  o IL-2 entre otras.

#### **1.4.2. Macrófagos**

La denominación de macrófagos engloba una serie de células con características ligeramente distintas y con funciones similares, distribuidas en varios lugares del organismo. De este modo, los monocitos son los macrófagos sanguíneos. Según el tejido reciben nombres diferentes como células de Langerhans en la piel o células de Kupffer en el hígado. Se trata de células grandes uninucleadas con gran cantidad de lisosomas ricos en enzimas como lipasas, proteasas y peroxidasas. Tienen la capacidad de fagocitar, de adherirse a tejidos y de moverse fácilmente por los mismos (quimiotaxis). Poseen diferentes tipos de receptores con gran importancia funcional, responsables de su actuación como células presentadoras de antígeno.

#### **1.4.3. Granulocitos**

Se trata de leucocitos sanguíneos con abundantes gránulos citoplasmáticos que participan en la fase efectora de las respuestas inmunitarias. Dentro de este grupo se distinguen tres tipos celulares:

**Neutrófilos.** También llamados leucocitos polimorfonucleares (PMN), por su núcleo multiglobulado. Responden con rapidez al estímulo quimiotáctico, fagocitan y destruyen partículas extrañas.

**Eosinófilos.** Actúan en la defensa frente a ciertos tipos de agentes infecciosos. Presenta receptores para IgE y se une a partículas cubiertas por esta Ig. Abundan en reacciones alérgicas, contribuyendo a la lesión e inflamación de los tejidos.

**Basófilos.** Son el equivalente circulante a los mastocitos tisulares. Son los mediadores de la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.

## **1.5 Papel de las citocinas en la respuesta inmunitaria**

El desarrollo de una correcta respuesta inmunitaria requiere la participación de múltiples tipos celulares, cuyas interacciones están mediadas por un grupo de proteínas de bajo peso molecular denominadas citocinas. Son los segundos mensajeros del sistema inmunitario (Grimble RF, 1998).

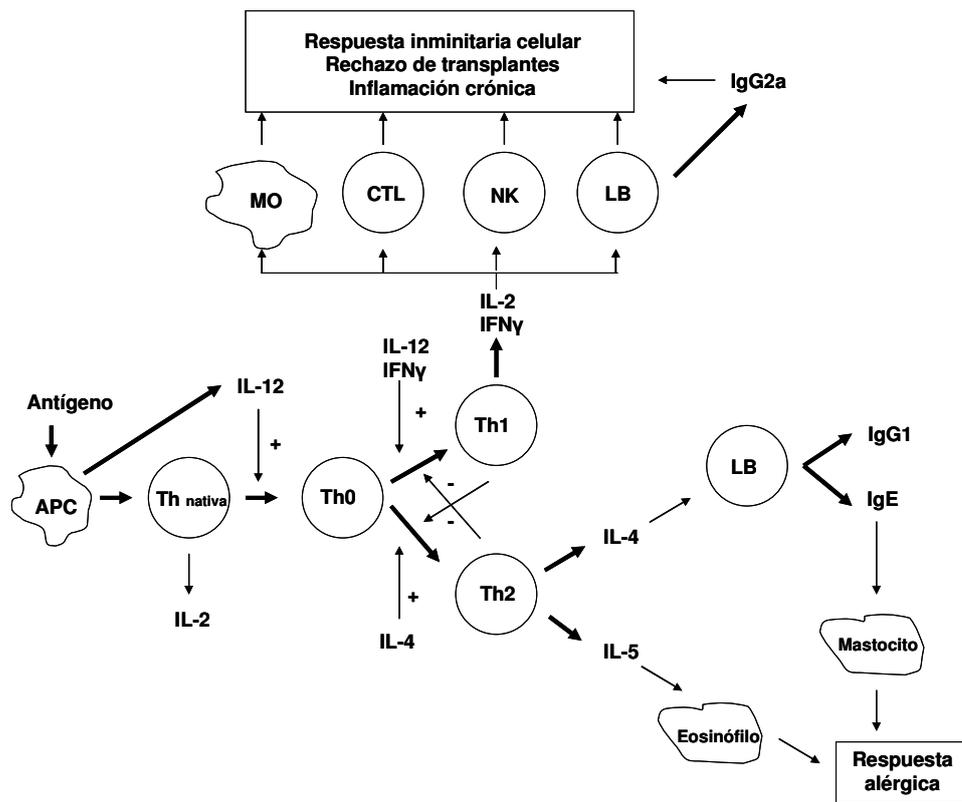
### **1.5.1. Propiedades de las citocinas**

Estos mediadores se producen durante las fases efectoras de la respuesta inmunitaria natural y específica, y sirven para regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Son secretadas por diversos tipos celulares de manera breve y autolimitada, no almacenándose como moléculas preformadas. Ellas mismas influyen en su propia síntesis y en la de otras citocinas, afectando además la acción de las mismas. Actúan sobre distintas células y a menudo tienen efectos múltiples sobre la misma célula diana. Inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de las células diana, cuya expresión está regulada por señales específicas. Esta puede ser la misma célula que secreta la citocina (acción autocrina), una célula cercana (acción paracrina), o una célula distante que se estimula a través de las citocinas secretadas a la circulación (acción endocrina). En algunos casos, estas citocinas sirven como factores de proliferación en las células sobre las que actúan. La mayor parte de las respuestas celulares a las citocinas precisan mRNA nuevo y la síntesis proteica (Algarra A y Garrido F, 1994).

La función de una citocina viene dada por su concentración en el tejido, la naturaleza de la célula diana, la señal de activación, el tiempo de la exposición a la citocina o el modelo experimental donde se analiza el efecto de la citocina entre otros factores (Cavallion JM, 2001).

### **1.5.2. Clasificación de las citocinas**

Las citocinas pueden clasificarse en función de diferentes conceptos. En este caso la clasificación se basa en las que parecen ser sus principales acciones biológicas, si bien, muchas citocinas pueden actuar en más de una clase. En la Figura 1.4 se muestra un esquema donde se resumen las principales acciones de las diversas citocinas.



**Figura 1.4.** Diferenciación y papeles de los linfocitos Th1 y Th2. (Calder PC, 2002). La flecha gruesa indica “produce” y la línea fina indica “regula”. LB, linfocito B; MO, macrófago; CTL, células citotóxicas y NK, *natural Killer*.

Las citocinas se pueden dividir en cuatro clases de función amplia (Algarra A y Garrido F, 1994; Kuby J, 1994):

a) Citocinas que median la respuesta inmunitaria natural

**-TNF $\alpha$ :** Producida principalmente por macrófagos activados, induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales vasculares, facilitando el acúmulo de leucocitos en el foco inflamatorio. Activa a éstas y a otras células para que destruyan microorganismos y estimula a los fagocitos mononucleares para que produzcan citocinas como IL-1, IL-6 y el propio TNF $\alpha$ . Ejerce un efecto protector frente a los virus potenciando la lisis de las células infectadas ya que aumenta la expresión de moléculas MHC tipo I. Es capaz de estimular la proliferación de células T y B (Le J y col, 1987).

Si el estímulo que genera la producción de TNF $\alpha$  es fuerte, se producen mayores cantidades de esta citocina, pudiendo el TNF $\alpha$  entrar en el torrente circulatorio donde actúa

como hormona endocrina. En este marco, el TNF produce fiebre, induce la denominada respuesta de fase aguda con el aumento de proteína A amiloide, activa el sistema de coagulación, produce alteraciones metabólicas o caquexia y suprime la división de las células madre de la médula ósea.  $IFN\gamma$ , IL-1 e IL-2 inducen la expresión del receptor de  $TNF\alpha$  potenciando su efecto.

**-IL-1:** Esta citocina funciona al igual que el  $TNF\alpha$  como mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped y en parte como co-estimulador de las células T. De nuevo son los macrófagos activados la fuente principal de IL-1 pero la pueden producir casi todas las células del organismo en determinadas condiciones. La IL-1 puede incluso estimular su síntesis por un proceso de retroalimentación negativa.

Existen dos formas de IL-1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que interactúan con un receptor común, de ahí la semejanza de sus acciones biológicas. A concentraciones bajas, los principales efectos biológicos son como mediador local de la inflamación. No activa directamente a los leucocitos inflamatorios pero hace que se sinteticen quimiocinas que los activen. Cuando se secreta en grandes cantidades, la IL-1 entra en el torrente circulatorio y lleva a cabo funciones endocrinas. En este sentido existen diferencias importantes con respecto al  $TNF\alpha$  en cuanto a que no produce lesión tisular por si misma pero potencia la que produce el  $TNF\alpha$ , no aumenta la expresión de MHC pero en su lugar potencia la acción de los factores estimulantes de colonias (CSF) sobre las células de la médula ósea (Dinarello CA, 1988).

**-IFN tipo I:** Este grupo está constituido por  $IFN\alpha$  (producido por leucocitos) e  $IFN\beta$  (producido por fibroblastos), que interactuando sobre un receptor común llevan a cabo actividades antivirales, inhibidoras del crecimiento celular, inmunomoduladoras (aumenta expresión de moléculas MHC de tipo I e inhibe la expresión de las de tipo II) y antitumorales (aumenta actividad lítica de las células *natural killer* o NK).

**-IL-6:** La producen fagocitos mononucleares, fibroblastos, células endoteliales y otras células en respuesta a IL-1 y  $TNF\alpha$ . La IL-6 hace que los hepatocitos sinteticen varias proteínas plasmáticas que contribuyen a la respuesta de fase aguda. Sirve como factor de proliferación para células B activadas en fases avanzadas de su diferenciación. También se piensa que podría actuar como co-estimulador de células T y timocitos y como co-factor de otras citocinas para la proliferación precoz de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (Heinrich PC y col, 1986).

b) Citocinas que regulan la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria

**-IL-2:** Producida por los linfocitos T, e inducida por IL-1, tras la activación por Ags. Es responsable de la progresión de los linfocitos T desde la fase G1 hasta la S del ciclo celular. Actúa sobre la célula que la produce y sobre células cercanas, siendo determinante de la magnitud de las respuestas inmunitarias que dependen de las células T. Estimula la síntesis de IFN $\gamma$ ; estimula la proliferación de las células NK y aumenta su función citolítica; actúa sobre las células B como factor de proliferación y como estímulo para la síntesis de anticuerpos.

**-IL-4:** Es producida por linfocitos especialmente los Th2, además de por mastocitos y basófilos activados. Es la responsable de la regulación de las reacciones alérgicas. La IL-4 es necesaria para la síntesis de IgE y es la principal citocina que estimula el *switching* (cambio de isotipo). Inhibe la activación del macrófago y bloquea la mayor parte de los efectos del IFN $\gamma$  sobre el mismo. Actúa como factor de proliferación y diferenciación de células del grupo Th2, estimula la expresión de moléculas de adhesión y la proliferación de mastocitos y de linfocitos B activados. La IL-13 es otra citocina Th2 cuyas acciones se superponen con las de la IL-4.

**-TGF- $\beta$ :** Se trata de una citocina reguladora producida por linfocitos T y monocitos. Puede inhibir o estimular la proliferación de una misma célula en función de las condiciones. Antagoniza los efectos de citocinas pro-inflamatorias sobre fagocitos o células endoteliales. Induce en células B del cambio al isotipo para la síntesis de IgA, pudiendo mediar así respuestas inmunitarias en las mucosas.

c) Citocinas que regulan la inflamación

**-IFN $\gamma$ :** Es producido por linfocitos y células NK. Es un potente activador de fagocitos mononucleares. Aumenta la expresión de las moléculas de clase I y II del MHC, ampliando la fase de reconocimiento que permite aumentar la respuesta humoral. Promueve la diferenciación de linfocitos T y B, modula la síntesis de citocinas e inmunoglobulinas, estimula la actividad citolítica de los NK y activa las células endoteliales vasculares, promoviendo la adhesión de los linfocitos y los cambios morfológicos necesarios para facilitar su extravasación. El efecto neto del IFN $\gamma$  es promover las acciones inflamatorias ricas en Th1 y macrófagos a la vez que suprimen las acciones ricas en Th2 y eosinófilos (Moissec P y Ziff M, 1986).

**-IL-10:** Esta citocina reguladora es secretada por linfocitos reguladores y por macrófagos activados. Las dos actividades principales de la IL-10 son inhibir la producción de citocinas por macrófagos (TNF $\alpha$ , IL-1 e IFN $\gamma$ ), y las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de la célula T (inhiben la maduración de APC y antagonizan la expresión de moléculas co-estimuladoras), inhibiéndose así la inflamación mediada por la célula T. Junto con esta función inmunosupresora, la IL-10 parece promover mecanismos locales efectores como la activación de células NK o el incremento de la expresión de moléculas citotóxicas, que contribuyen a la eliminación de patógenos (Moncellin S y col, 2003).

**-IL-5:** Es producida por células Th2 y su principal acción es la de estimular la proliferación y diferenciación de los eosinófilos maduros para la defensa frente a helmintos, complementando la actividad de la IL-4 y contribuyendo a las reacciones alérgicas mediadas por linfocitos Th2.

**-IL-12:** Es secretada por monocitos activados y células B. Es el más potente activador de las células NK, potenciando su actividad citolítica y su producción de IFN $\gamma$ . Estimula la diferenciación hacia de células T CD4+ a Th1 y las CD8+ a CTL activos y maduros.

d) Citocinas que estimulan la hematopoyesis

Las citocinas que estimulan la expansión y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea, se denominan factores estimulantes de colonias (CSF). Diferentes CSF actúan sobre células de la médula ósea en diferentes estadios de maduración y promueven de forma preferencial el desarrollo de colonias de diferentes líneas. TNF, linfotóxina, TGF $\beta$  e IFN $\beta$  inhiben la proliferación de células progenitoras de médula ósea, mientras que IL-1 e IL-6 aumentan la respuesta a los CSF. Algunos ejemplos de estas citocinas son la IL-3, G-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos) o M-CSF (Factor estimulador de colonias de monocito-macrófagos).



## 2. DIETA Y RESPUESTA INMUNITARIA

Desde la antigüedad se ha reconocido que la dieta ejercía algún tipo de influencia sobre la resistencia a la enfermedad y que el déficit alimentario estaba especialmente involucrado en la incidencia de infecciones y tumores (Chandra RK, 1996). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos inmunológicos subyacentes y el papel que determinados nutrientes pudieran desempeñar en la respuesta inmunitaria ha sido un hallazgo reciente, por lo que constituye un campo en el que aún queda una amplia investigación por realizar.

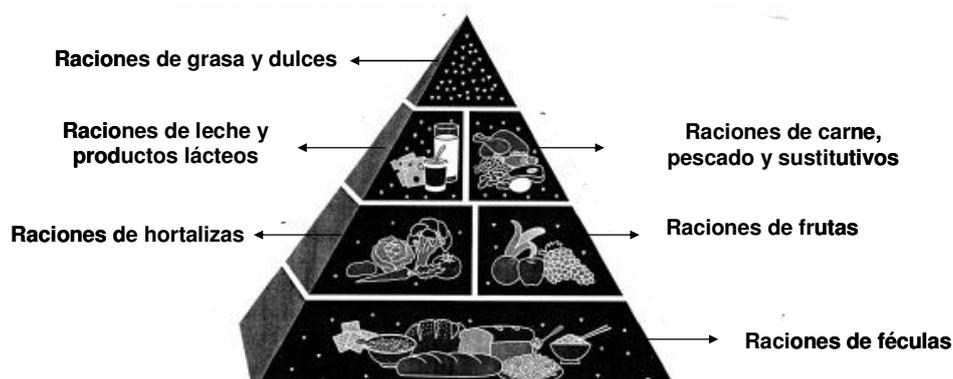
Son numerosos los factores que participan en la regulación de la respuesta inmunitaria. Entre ellos, la alimentación se ha convertido en un factor crítico, siendo la propia respuesta inmunitaria un índice muy sensitivo del estado de nutrición. La integración entre nutrición e inmunidad es un fenómeno complejo donde los alimentos en conjunto y sus componentes en particular, ejercen un papel importante en el desarrollo y preservación del sistema inmunitario; las deficiencias marginales, los excesos crónicos o el desequilibrio entre nutrientes pueden dañarlo, pudiendo incluso contribuir a la aparición y gravedad de determinados estados patológicos.

El efecto de cada nutriente, macro o micronutriente, depende de la concentración, de interacciones con otros nutrientes, de la genética, de la edad y de condiciones internas y/o ambientales (Hirve S y col, 1997). Puesto que una nutrición óptima permitirá el correcto funcionamiento del sistema inmunitario y teniendo en cuenta todos estos aspectos, hay que plantearse qué nutrientes y qué dosis de los mismos hay que ingerir para obtener una respuesta de máximo beneficio en cada situación.

Es importante hacer referencia a estados de malnutrición “leves” inaparentes, ocasionados por las dietas consideradas “normales”, como la occidental, cuyas características podrían propiciar la aparición de enfermedades inmunitarias como arteriosclerosis, cáncer o enfermedades autoinmunes. El incremento en la práctica de regímenes de adelgazamiento también da lugar a dietas carentes en diversos nutrientes que dificultan el correcto funcionamiento del sistema inmunitario.

## 2.1 Efectos inmunitarios de los nutrientes

El desarrollo, mantenimiento y óptimo funcionamiento del sistema inmunitario depende de una dieta adecuada y equilibrada, de modo que tanto la deficiencia como el exceso de muchos de los nutrientes afectan el número y la actividad de las células inmunitarias (Kelley DS, 2001). En la Figura 2.1 se observa la llamada “pirámide alimenticia” donde se indica la relación que debe existir entre los diversos nutrientes.



**Figura 2.1.** Pirámide alimenticia. Desde la base de la pirámide hasta la punta se debe ir reduciendo la ingesta de los alimentos indicados.

### 2.1.1. Hidratos de carbono

El papel principal de los hidratos de carbono en la dieta es la producción de energía para el organismo. Están además involucrados en el metabolismo lipídico puesto que a partir de ellos se puede producir la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Entre los diferentes tipos de hidratos de carbono, en los últimos años han alcanzado gran importancia aquellos que constituyen la fibra debido a su poder protector frente a algunas enfermedades (Cummings JH, 1978). Se trata de un conjunto de sustancias con diferentes propiedades fisiológicas y efectos. Su característica principal es ser resistentes a la hidrólisis enzimática en el tracto digestivo pero pueden ser hidrolizadas y fermentadas por la flora gastrointestinal (Tropel H y col, 1976). La fibra puede clasificarse en tres categorías según su solubilidad, característica de la que dependen sus efectos; la fibra soluble (gomas y pectinas), totalmente fermentada en colon; la fibra insoluble (celulosa), mínimamente degradada por las bacterias del colon y por último las fibras mixtas. Dentro de las fibras solubles, aquellas capaces de inducir el crecimiento de poblaciones

específicas de bacterias intestinales beneficiosas, también reciben el nombre de “prebióticos”, y entre sus efectos parecen retrasar el vaciamiento gástrico y el tiempo de tránsito intestinal, de modo que afecta al metabolismo, incluyendo una mejora en la tolerancia a la glucosa. Puesto que poseen la capacidad de secuestrar sales biliares, la fibra soluble puede afectar también la absorción de lípidos. Constituyen una importante fuente para la fermentación bacteriana, de donde se producen numerosos compuestos entre los que destacan los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), responsables en gran medida de los efectos beneficiosos de la fibra. Esta fermentación influye en el metabolismo de la glucosa y de la grasa, reduciendo la glucemia postprandial y las concentraciones séricas de ácidos grasos y colesterol. Como consecuencia del consumo de fibra se observa también proliferación de la mucosa intestinal y una reducción del pH intraluminal, jugando un papel fundamental en la respuesta inmunitaria intestinal ya que además estimula el crecimiento de Lactobacilos y Bifidobacterias beneficiosas (Bengmark S, 1998).

### **2.1.2. Aminoácidos y proteínas**

Las proteínas son elementos básicos del organismo, constituyendo el 75% en peso seco del mismo, además de ser esenciales para el metabolismo. Las proteínas están constituidas por veinte aminoácidos de los cuales ocho deben ser administrados por medio de la dieta y son denominados esenciales. Las proteínas de la dieta se necesitan para reparar y mantener los tejidos del organismo, el crecimiento y desarrollo, la producción de leche materna, de ciertas hormonas y enzimas. Son componentes importantes del sistema inmunitario y ayudan a transportar los nutrientes en la sangre.

Los aminoácidos juegan un papel esencial en la respuesta a infección, lesiones y en la síntesis de proteínas o de moléculas bioactivas (Grimble RF y col, 1998). Cuando se produce una herida, trauma o proceso patológico se produce un catabolismo proteico que afecta principalmente al músculo y que permite la síntesis de proteínas en el foco de la lesión; en el hígado, se sintetiza glutatión y proteínas de fase aguda y el sistema inmunitario requiere de numerosos mediadores para una actuación eficaz (Grimble RF y col, 1998; Soeters PB y col, 2004). Así mismo, el catabolismo proteico a nivel muscular favorece la formación de glutamina, principal donador de nitrógeno para la síntesis proteica a nivel de las células del sistema inmunitario. Todo ello sugiere la importancia del aporte proteico para la resolución del problema. Es tal la influencia de las proteínas sobre la respuesta inmunitaria que en casos de malnutrición proteico-energética se observa atrofia de tejido linfoide con una notable disminución de la respuesta inmunitaria celular,

se afecta la fagocitosis, el sistema del complemento, la inmunidad de las mucosas, disminuye la producción de citocinas y de proteínas de fase aguda y solo la manipulación dietética en estos casos es capaz de lograr resultados alentadores (Sánchez VM, 1999).

Cada aminoácido tiene unas funciones específicas a nivel inmunitario y todos ellos son importantes, pero numerosos estudios en clínica a nivel de nutrición parenteral y enteral, han demostrado la especial relevancia de la arginina y la glutamina como inmunomoduladores. La arginina estimula la inmunidad celular potenciando la función de linfocitos T y aumentando su número además de acelerar la curación de heridas. También interviene en la inmunidad a través de la síntesis de óxido nítrico. La deficiencia de arginina está ligada a la supresión del receptor CD3, a un incremento en la síntesis de citocinas proinflamatorias o a la inmadurez en la función inmunológica de las mucosas (Evoy D, 1998; Grimbale RF, 2005). La glutamina no solo es considerada un nutriente inmunoestimulante, muy útil en pacientes con infección, post-traumáticos, quemados o en cuidados intensivos, sino que ejerce múltiples acciones biológicas de importancia para el organismo. Es importante para la rápida división de las células inmunológicas, mantiene el funcionamiento de la barrera intestinal, estimula la inmunidad celular, aumenta los MHC de clase II y potencia la actividad fagocítica de macrófagos y la capacidad de lisis de los neutrófilos así como los fenómenos de opsonización. Sin embargo, una de sus funciones más destacadas es la síntesis de glutatión, compuesto endógeno necesario para el mantenimiento de las defensas antioxidantes (Standen y col, 2000; Wilmore DW, 1998).

### **2.1.3. Grasas**

Las **grasas** y sus principales componentes, los **ácidos grasos**, son capaces de modular la respuesta inmunitaria a distintos niveles y a través de múltiples mecanismos. Los ácidos grasos de la dieta se incorporan en las membranas de las células y desde ahí, repercuten sobre las respuestas biológicas. Este tema será abordado ampliamente en el capítulo siguiente por ser la base de la presente Tesis doctoral.

### **2.1.4. Vitaminas y minerales**

A pesar de que está ampliamente reconocido el papel de los micronutrientes en el desarrollo, activación y actuación de las células del sistema inmunitario, los papeles específicos de estos compuestos permanecen sin definir. Las investigaciones de finales del siglo XX revelan la importancia de estos nutrientes en la protección frente a infecciones.

En la Tabla 2.1 se muestran algunas de las acciones inmunitarias de los principales compuestos minoritarios.

Cambios en el ambiente intracelular inducidos por alteraciones de micronutrientes pueden afectar la virulencia de microorganismos y causar disfunción del sistema inmunitario (Beck MA, 2001). El déficit de los mismos lleva a alteraciones en la actividad y el número de las células del sistema inmunitario produciendo un incremento de la mortalidad y morbilidad. La inmunocompetencia se reestablece con la administración del nutriente en concreto (Failla ML, 2003). No solo el déficit de micronutrientes lleva a inmunosupresión sino también el exceso de los mismos, de ahí la necesidad de que la ingesta de los mismos sea equilibrada.

**Tabla 2.1.** Funciones de algunos minerales y vitaminas

	<b>Efectos observados</b>
<b>Zinc</b>	Su déficit produce disminución en respuesta de hipersensibilidad retardada, en producción de Ac, en respuesta linfocitos T, en citotoxicidad NK
<b>Hierro</b>	Su déficit produce disminución de respuesta de hipersensibilidad retardada, de capacidad quimiotáctica de neutrófilos, de producción de IL-1 e IFN $\gamma$ y de tamaño del timo
<b>Cobre</b>	Su déficit produce disminución de respuesta NK y de producción de IgG.
<b>Selenio</b>	Su déficit produce disminución de capacidad defensora de los neutrófilos y de la síntesis de Ac. Actúa como cofactor de GSH peroxidasa y es necesario para producción de leucotrienos
<b>Magnesio</b>	Su déficit produce disminución de la respuesta humoral y celular así como del sistema del complemento.
<b>Vit. E</b>	Su déficit provoca disminución en la síntesis de Acs. Propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes. Regulador de eicosanoides y linfocinas. Modifica virulencia de infecciones virales.
<b>Vit. A</b>	Su déficit disminuye la respuesta a Ac. Es eficaz en la defensa frente a tumores, aumenta la respuesta proliferativa y citotóxica de linfocitos T, NK y macrófagos. Incrementa los niveles de IgA y disminuye los de citocinas inflamatorias
<b>Vit. C</b>	Regula la activación y supervivencia de células inmunológicas por su poder antioxidante. Aumenta la fagocitosis y estimula la respuesta inmunitaria celular.

Fuentes: Baynes y col, 1990; Cunningham-Rundles S y col, 2005; Keen y col, 1990; Singh y col, 2005.

## **2.2 Concepto de alimento funcional**

En las últimas décadas, el concepto clásico de “nutrición adecuada”, es decir aquella que aporta los nutrientes suficientes para satisfacer las necesidades orgánicas,

tiende a ser sustituido por el de “nutrición óptima”, que incluye además, la potencialidad de los alimentos para promocionar la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades. Los alimentos funcionales han introducido el concepto de considerar que los alimentos podían ejercer un papel adicional a los ya existentes. Se trata de un concepto aún en evolución. El término alimento funcional es oficial para la Unión Europea, y fue creado por la Comisión de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (FUFOSE, *Functional Food Science in Europe*), organismo que también aportó la definición para el mismo (Diplock AT y col, 1999), la cual se indica en la Figura 2.2.

Numerosos estudios confirman los múltiples efectos de los alimentos funcionales. En relación con el sistema inmunitario, se sabe que muchos de estos tienen la capacidad de modularlo. A continuación se comenta la capacidad inmunomoduladora que presentan determinados ingredientes, que aunque no esenciales en ocasiones, interactúan con el sistema inmunitario. Los componentes más aptos para su inclusión en un alimento funcional son los prebióticos y probióticos, así como ciertos aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos, ácidos nucleicos y otros. Las razones que llevan a tener en cuenta algunos de estos componentes para su participación en un alimento funcional, han sido descritas anteriormente por lo que nos centraremos en el resto de compuestos.

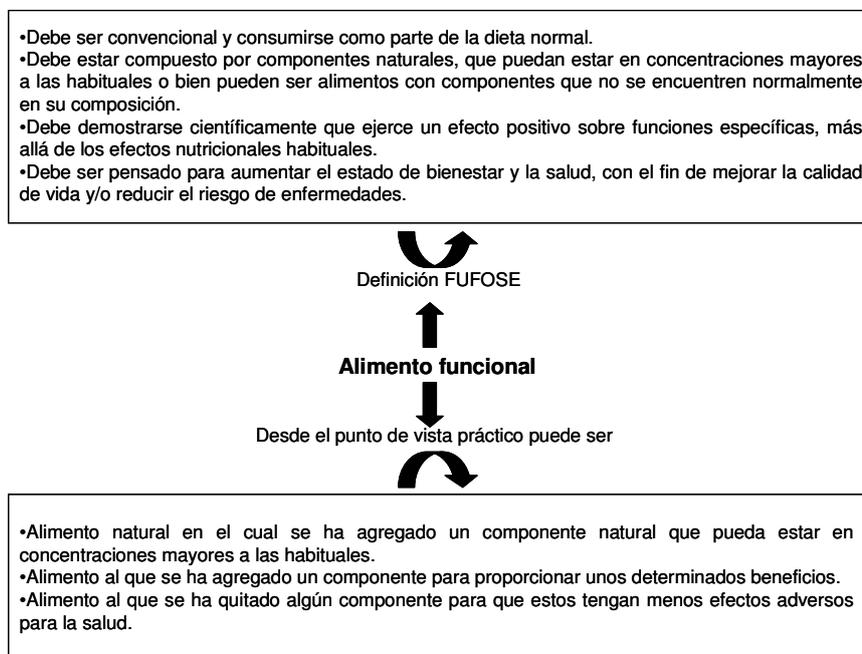


Figura 2.2. Definición y características de alimento funcional.

*Probióticos:* Se trata de microorganismos vivos que producen un efecto beneficioso en la salud al ser ingeridos. Su uso se ha asociado con un gran número de efectos beneficiosos como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales y la reducción de hipercolestolemia e hipertensión (de Roos NM y Katan MB, 2000).

*Prebióticos:* Ingredientes no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado grupo de bacterias del colon. Suelen ser hidratos de carbono entre los que se puede citar la fibra dietética. Dicha fibra tiene un papel fundamental en el mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana intestinal, factores importantes en los mecanismos de defensa del individuo. Incrementan los niveles de bacterias beneficiosas para la salud tales como, Bifidobacterias y Lactobacilos, al tiempo que disminuyen Clostridios, Bacteroides o Coliformes, grupos con potencial efecto perjudicial; se aumenta la producción de AGCC que se absorben rápidamente, estimulan la absorción de agua y sal, proporcionan una fuente de energía para el colon y favorecen a la microbiota (Gibson GR y col, 1995).

*Fitoquímicos:* Los fitoesteroles o esteroides de las plantas son compuestos parecidos al colesterol. El interés por estos compuestos ha surgido debido a su efectividad para reducir la absorción de colesterol y así proteger frente a enfermedades cardiovasculares (Fernández ML, Vega-López S, 2005), aunque numerosos estudios sugieren otras interesantes actividades biológicas como que podrían proteger de los cánceres de mayor prevalencia del mundo occidental (colon, próstata y mama) (González-Gross M y col, 2003). También se ha visto que el  $\beta$ -sitosterol presenta actividad antiinflamatoria, antipirética y anti-opsonizante. Se requiere mayor investigación para establecer el efecto de estos componentes sobre el sistema inmunitario (Bouic PJ, 2001).

*Nucleótidos:* Estos compuestos son beneficiosos para el ser humano, especialmente durante la infancia, ya que modulan la microbiota intestinal, aumentando el número de bifidobacterias y limitando el de enterobacterias, regulan procesos del metabolismo lipídico y lipoproteico, intervienen en el desarrollo del sistema inmunitario y en el crecimiento, desarrollo y reparación de tejidos de crecimiento rápido, como es el inmunitario (Gil A, 2001; Gil A y col, 2002). Los nucleótidos de la dieta influyen en la maduración, activación y proliferación de los linfocitos, estimulan la función fagocítica de los macrófagos, modulan la respuesta de hipersensibilidad retardada, las respuestas a injertos y tumores, la producción de inmunoglobulinas y la respuesta a infección (Gil A, 2002).

*Oligosacáridos:* Compuestos que forman parte de la leche fundamentalmente, especialmente de la materna. En los últimos años, han cobrado interés debido a su papel como prebióticos, favoreciendo el crecimiento de sustancias probióticas. Otro de sus papeles relevantes para la respuesta inmunitaria, es su actuación como receptores de patógenos. Al ser sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de glucolípidos y glucoproteínas de las células intestinales, los oligosacáridos presentan una similitud estructural con los carbohidratos de la superficie de las células intestinales. Así, estos compuestos podrían actuar como receptores de microorganismos patógenos, constituyendo un mecanismo de defensa adicional sobre todo para el recién nacido, cuyo sistema inmunitario no es aún maduro (Kunz C y col, 2000). Además, recientemente se han detectado efectos anti-inflamatorios para estos compuestos en modelos de IBD (Lara-Villoslada F y col, 2005).

*Otros compuestos:* En la actualidad son numerosas las empresas de alimentación que se proponen como objetivo principal la búsqueda de nuevos ingredientes para la fabricación de alimentos funcionales que puedan mejorar las defensas del organismo entre otras actividades. Se estudia así la inclusión de compuestos como la curcumina, que inhibe la actividad de NF $\kappa$ B, aumenta los niveles de linfocitos T y B y actúa como antioxidante (Jobin C y col, 1999); o flavonoides o lactonas terpénicas, pertenecientes al *Ginkgo biloba* capaces de disminuir la expresión de VCAM (Mancini L y col, 1994); polifenoles del aceite de oliva o del vino, como la oleuropeína o el hidroxitirosol, poseen potentes actividades antioxidantes además de inhibir la expresión de VCAM (Carluccio MA y col, 2003). El espectro de actuación es grande y la aparición de alimentos funcionales en el mercado es cada vez más frecuente.

### **2.3 Concepto de inmunonutrición**

La capacidad de modular la actividad del sistema inmunitario interviniendo con nutrientes específicos se denomina inmunonutrición. Sin embargo, este concepto se ha asociado con los intentos de mejorar el curso clínico de enfermos críticos o pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas, que normalmente requieren un suplemento exógeno de nutrientes por vía parenteral o enteral (Calder PC, 2003).

La recuperación de una intervención quirúrgica o una infección depende de una compleja interacción entre patógenos, el sistema inmunitario y la homeostasis del organismo. Antes de la llegada de los antibióticos y de las nuevas tecnologías médicas, la supervivencia dependía de la “constitución” del propio organismo. Salvados hoy gran parte de los obstáculos, la inmunonutrición podría ayudar a superar algunos de los

inconvenientes de la nombrada “constitución” del individuo, como puedan ser la vejez o un estado de inmunosupresión (Grimble RF, 2005).

Durante la inmunonutrición a los pacientes se les administran nutrientes en cantidades muy superiores a las recomendadas con el fin de obtener un efecto farmacológico. Entre los nutrientes que se suministran en regímenes de inmunonutrición destacan los ácidos grasos n-3, glutamina, arginina o nucleótidos. Actualmente se sigue estudiando cual es más adecuado en cada caso, si la administración debe ser enteral o parenteral o el tiempo que estos deben ser administrados. La mejora en el uso de los nutrientes en clínica supone un descenso de la morbilidad y mortalidad, además de un aumento de la calidad de vida del paciente (Grimble RF, 2005).



### 3. PROPIEDADES Y METABOLISMO DE LA GRASA

En la actualidad el interés por la grasa existe desde los niveles más elevados de la ciencia nutricional hasta los estratos más populares, lo que ha motivado un profundo estudio de sus diversas propiedades y de las rutas metabólicas en las que participa.

#### 3.1 Definición de lípido, grasa y aceite

*Lípidos:* Conjunto de sustancias que no tienen uniformidad química o fisiológica, únicamente presentan una solubilidad común, consecuencia de su hidrofobicidad. Es el material resultante de la extracción de tejidos biológicos con disolventes orgánicos.

*Grasas:* Se pueden considerar una subclase de lípidos, pero en la práctica, lípidos y grasas son términos intercambiables. El término grasa se reserva generalmente para referirse al componente mayoritario de los lípidos, los triglicéridos, que suponen el 95% de

*Aceites:* La diferenciación de grasas y aceites radica en sus puntos de fusión. Se aplica la denominación de aceites a los productos grasos líquidos a la temperatura de 20°C y el término grasas (sebos o mantecas) a los productos sólidos o semi-sólidos a la temperatura de referencia.

#### 3.2 Clasificaciones de lípidos según diversos criterios

a) *Por su origen:* Grasas vegetales y animales. La mayoría de los aceites son de origen vegetal, salvo los de pescado, mientras que las grasas sólidas se asocian a un origen animal, aunque hay excepciones como las mantecas de coco o palma.

b) *Por sus funciones biológicas:* Grasas de almacenamiento y estructurales. Las grasas de almacenamiento son de reserva energética y se acumulan en sitios específicos. La dieta altera su composición. Son materia prima fundamental para la Industria Alimentaria. Las grasas estructurales forman parte de la célula, y su composición es específica para cada tejido y para cada especie.

c) *Desde el punto de vista alimentario:* Grasas visibles e invisibles. Las visibles son grasas de consumo directo, como la mantequilla, mientras que las invisibles van asociadas al consumo de los alimentos que las contienen, como la grasa de la leche.

d) *Por las manipulaciones que han sufrido:* Grasas naturales, transformadas y sintéticas. Grasa natural es la que no ha recibido manipulación alguna salvo operaciones de refinación; grasa transformada es aquella que ha sido sometida a operaciones que modifica

su composición química y por tanto, sus propiedades físicas; la grasa sintética se obtiene por la esterificación de ácidos grasos y glicerina o glicéridos parciales.

e) Por sus propiedades químicas. Los lípidos pueden ser saponificables o insaponificables. Dentro del grupo de saponificables se encuentran los lípidos simples (ceras y acilglicéridos) y lípidos complejos (glicerofosfolípidos y glucolípidos); entre los insaponificables están los esteroides, terpenos y prostaglandinas. Estas propiedades químicas vienen dadas por su estructura, la cual se indica en la Figura 3.1.

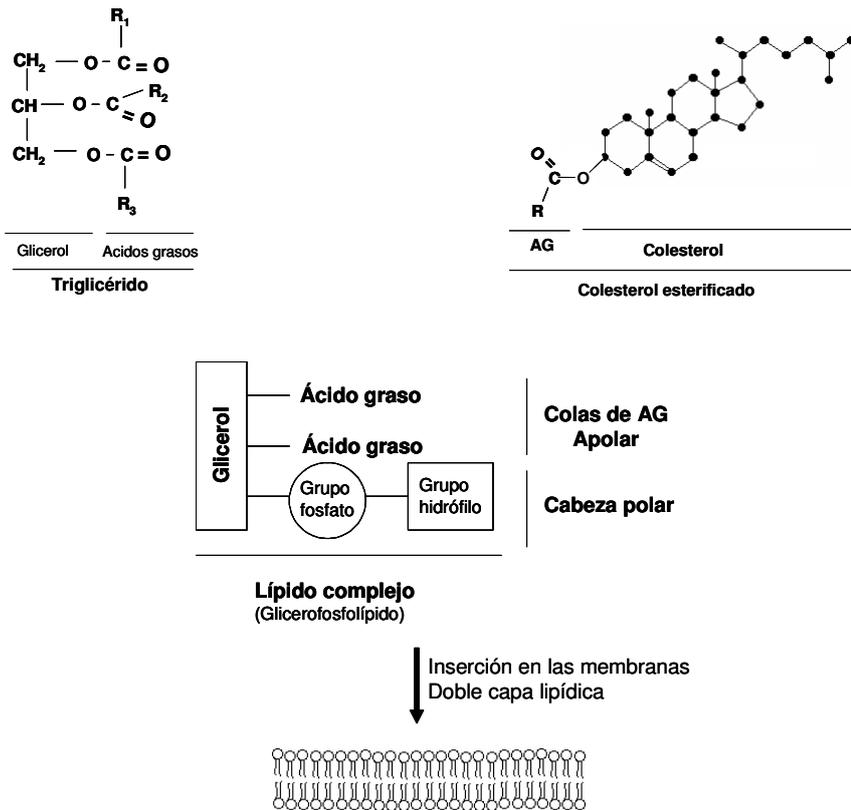


Figura 3.1. Estructura química de los lípidos constituyentes de las membrana celulares. (AG, ácido graso)

### 3.3 Papel fisiológico de los lípidos

Los lípidos son un grupo de nutrientes esenciales que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y que participan en múltiples funciones necesarias para la supervivencia del ser vivo. Entre ellas destacan cabe destacar las siguientes:

- La mayor contribución energética procede de las grasas presentes en los alimentos, 9 kcal/g de triglicérido.
- Los lípidos complejos, glicerofosfolípidos y esfingolípidos, son constituyentes fundamentales de la célula, participando en la estructura, composición y

permeabilidad de las membranas y paredes celulares. El colesterol también forma parte de las membranas, desde donde es precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares o vitamina D.

- Parte principal del tejido adiposo, con funciones de reserva energética, aislamiento térmico del organismo y protección de los órganos internos.
- Fuentes de ácidos grasos esenciales.
- Vehículo de vitaminas liposolubles. A, D, E y K.

(Linder MC, 1988)

### **3.4 Los ácidos grasos de la dieta**

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de longitud de cadena variable de entre 4 y 24 átomos de carbono, saturados o conteniendo dobles enlaces (monoinsaturados, (MUFA) o poliinsaturados, (PUFA)). Pueden formar parte de triglicéridos, lípidos complejos y colesterol (Kelley DS, 2001).

En los ácidos grasos naturales, la disposición espacial de los hidrógenos en los enlaces simples suele ser trans, mientras que en los dobles suele ser cis, llevando a un acodamiento de la molécula, hecho que le confiere sus propiedades biológicas. Por tanto, los ácidos grasos trans aunque aporten la misma energía, no pueden sustituir a los cis desde el punto de vista nutricional.

Se clasifican en función del número de átomos de carbono:

- a. AG de cadena corta (AGCC): 4-6 átomos de C
- b. AG de cadena media (MCFA): 8-12 átomos de C
- c. AG de cadena larga: 14-18 átomos de C
- d. AG de cadena muy larga: 20 o más átomos de C

Los ácidos grasos poseen un nombre común y una nomenclatura sistemática. Cuando existen dobles enlaces, la nomenclatura sistemática indica el carácter cis o trans y su posición contando a partir del grupo carboxílico. Sin embargo, atendiendo a razones fisiológicas, resulta más útil indicar el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la posición del primero de ellos contando a partir del carbono terminal no carboxílico. A partir del primer doble enlace, el resto se sitúan de manera no conjugada, quedando un grupo metileno entre ambos.

### 3.4.1 Fuentes alimentarias de ácidos grasos

Numerosos productos naturales son ricos en lípidos, lo que permite cubrir fácilmente los requerimientos nutricionales de los mismos. Los ácidos grasos saturados abundan en animales terrestres y en aceites de coco y palma. El resto de aceites vegetales, son sin embargo ricos en PUFA n-6. Los PUFA n-3 están presentes sobre todo en aceite de pescado. Los MUFA, con su principal representante, el ácido oleico, abundan en el aceite de oliva y en el de colza (Mataix J y col, 2002). En la Tabla 3.1 se detallan las fuentes de los principales ácidos grasos más característicos de los alimentos.

**Tabla 3.1.** Estructura, nombre común y localización de los ácidos grasos más frecuentes de los alimentos

Estructura	Nombre común	Se encuentra en
<b>Ácidos grasos saturados</b>		
C4:0	Butírico	Leche de rumiantes
C6:0	Caproico	Leche de rumiantes
C8:0	caprílico	Leche de rumiantes y aceite de coco
C10:0	Cáprico	Leche de rumiantes y aceite de coco
C12:0	Laúrico	Aceite de coco y aceite de nuez de palma
C14:0	Mirístico	Aceite de coco, de nuez de palma y otros aceites vegetales
C16:0	Palmítico	Abundante en todas las grasas
C18:0	Estearico	Grasas animales, cacao
C20:0	Aráquico	Aceite de cacahuete
C22:0	Behénico	Ceras
<b>Ácidos grasos monoinsaturados</b>		
C:10 n-1	Caproleico	Leche de rumiantes
C12:1 n-3	Lauroleico	Leche de vaca
C16:1 n-7	Palmitoleico	Nuez de macadamia y aceite de pescado
C16:1 n-9	Oleico	Aceites vegetales
C18:1 n-7	Vaccenico	Grasas de rumiantes
C20:1 n-11	Gadoleico	Aceite de pescado
C22:1 n-9	Erúcico	Aceite de colza
C22:1 n-11	Cetoléico	Aceite de pescado
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>		
18:2 n-6	Linoleico	Aceites vegetales
C18:3 n-3	alpha-Linolénico	Soja, otros aceites vegetales
C18:3 n-6	gamma linolenico	Aceite de onagra y borraja
C18:4 n-3	Estearidónico	Aceite de pescado, borraja y onagra
C20:4 n-6	Araquidónico	Aceites de pescado
C20:5 n-3	Eicosapentaenoico (EPA)	Aceite de pescado
C22:5 n-3	Clupanodónico	Aceite de pescado
C22:6 n-3	Docosahexaenoico (DHA)	Aceite de pescado

### 3.4.2. Digestión y absorción de las grasas

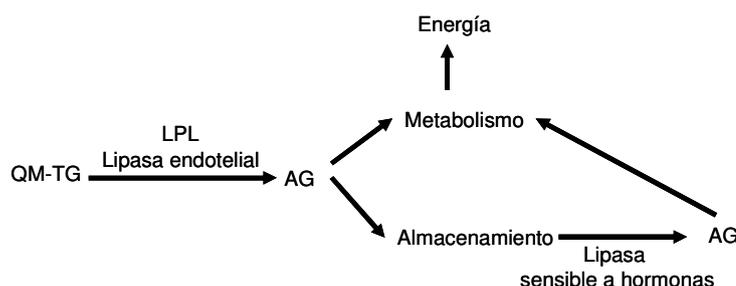
Tras la ingesta de alimentos que contienen grasas se inician dos procesos fisiológicos, digestión y absorción, que culminan con la formación de partículas ricas en triglicéridos (quilomicrones), susceptibles de ser asimiladas por las células del organismo.

La digestión comienza en la boca, donde como respuesta a la masticación y a estímulos nerviosos, se segrega junto a la saliva, la lipasa lingual. Esta enzima, junto con la

lipasa gástrica, hidroliza los enlaces ésteres de los ácidos grasos de cadena corta y media (preferentemente de las posiciones 1 y 3) de los triglicéridos. La emulsión grosera que se forma en el estómago pasa al duodeno donde aumenta el pH hasta alcanzar la neutralidad, se liberan sales biliares desde el hígado favoreciendo la microemulsión, a lo que ayuda también la lipasa pancreática, que además cataliza la transformación en ácidos grasos libres y 2-monoglicéridos. El jugo pancreático contiene además fosfolipasa A2, colesterol esterasa y colipasa que hidrolizan otros lípidos de la dieta. Todos los productos de la digestión de los triglicéridos participan en la formación de micelas que llegan al citoplasma del enterocito. Allí tiene lugar la reconversión secuencial de ácidos grasos y 2-monoglicéridos en triglicéridos. Éstos, junto con otros lípidos resintetizados, migran de la región apical a la basal del enterocitos, tránsito donde se incorpora la apolipoproteína B-48, hasta formar los quilomicrones. Los quilomicrones pasan al sistema linfático y de ahí finalmente al torrente circulatorio (Jones PJH y Papamandjaris AA, 2001).

### 3.4.3. Oxidación de los ácidos grasos y glicerol

La principal función de los triglicéridos es el aporte de energía. Una vez que se ha escindido en sus componentes, glicerol y ácidos grasos, la células los incorporan a su metabolismo, sufriendo ambos compuestos un serie de reacciones hasta la obtención de energía en forma de ATP. Los ácidos grasos que no se utilizan inmediatamente se almacenan para la posterior obtención de energía (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Utilización de los ácidos grasos en el organismo. QM, quilomicrón; AG, ácido graso. Los QM liberan los ácidos grasos que son empleado por las células o almacenados.

Aproximadamente, el 95% de la energía disponible de los triglicéridos reside en sus ácidos grasos, y el 5% restante se obtiene de la molécula de glicerol. En la Figura 3.3 se describe el proceso de obtención de energía a partir de los triglicéridos.

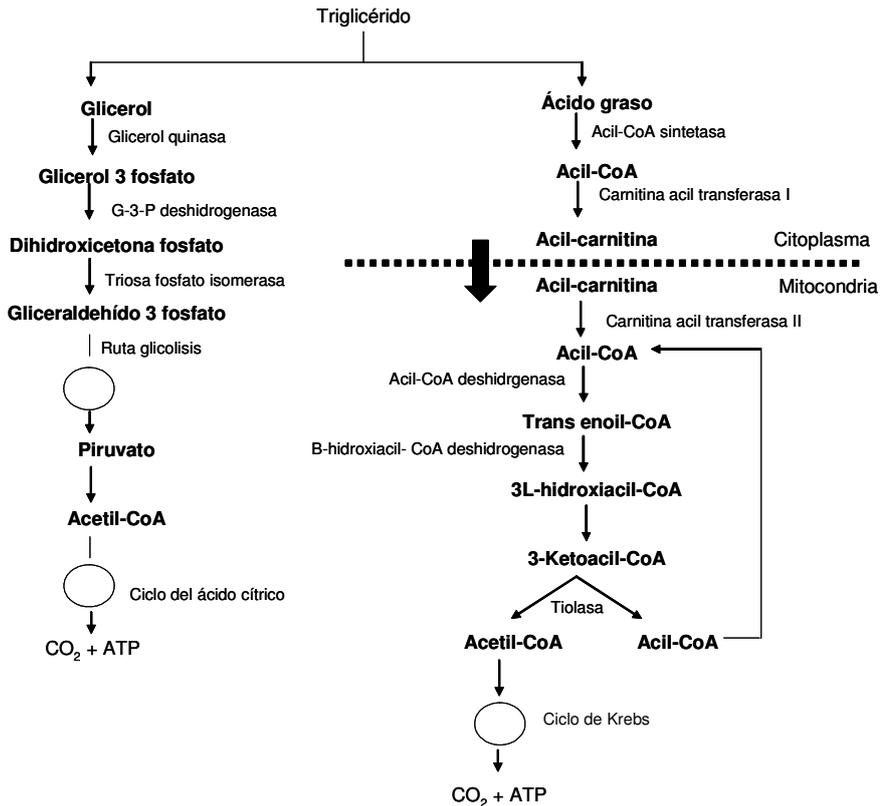


Figura 3.3. Metabolismo de los ácidos grasos y del glicerol en las células

### 3.4.4. Biosíntesis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se sintetizan en el citoplasma de las células, de manera que así se mantienen separados los procesos biosintéticos de los degradativos.

La *acetil CoA carboxilasa* transforma el acetil CoA en malonil CoA. Este compuesto es sustrato de la *ácido graso sintasa*, complejo enzimático que detiene su acción cuando el ácido graso formado contiene 16 carbonos. Esto implica la participación del ácido palmítico en diversas rutas metabólicas de elongación y saturación.

La elongación del ácido palmítico tiene lugar en el retículo endoplasmático principalmente y en las mitocondrias. Actúan *ácido graso elongasas*, que utilizan acetil CoA o malonil CoA como donador de carbonos en función de si la elongación se lleva a cabo en las mitocondrias o en el retículo endoplasmático respectivamente (Figura 3.4).

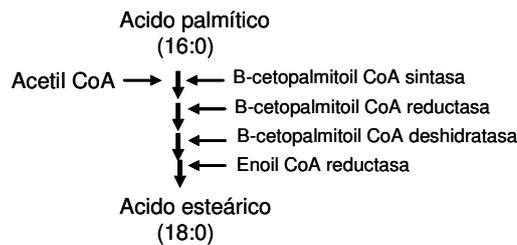
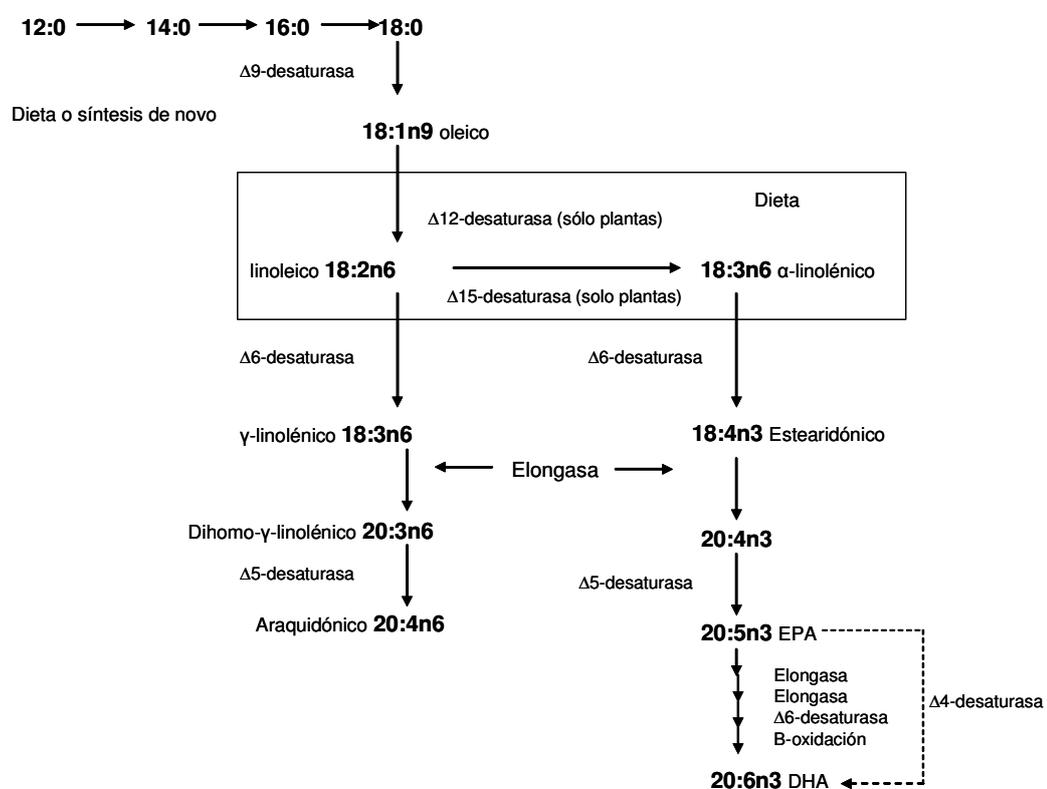


Figura 3.4. Elongación de ácidos grasos.

La desaturación se cataliza por acil-CoA desaturasas en una reacción donde intervienen el ácido graso correspondiente como acil CoA y NADPH que son oxidados con una molécula de oxígeno. A partir de aquí se dan diferentes reacciones que dan lugar a los diferentes ácidos grasos saturados e insaturados. En la Figura 3.5 se muestra el esquema de síntesis de unos ácidos grasos a partir de otros, bien en células vegetales o bien en animales.

Sin embargo, la biosíntesis de unos ácidos grasos a partir de otros no siempre es eficaz. La conversión de ALA (ácido  $\alpha$ -linolénico) hacia EPA (ácido eicosapentaenoico) y de EPA hacia DHA (ácido docosahexaenoico) son limitadas (Horrocks LA y col, 1999), lo que supone que estos compuestos deban ser administrados con la dieta para cubrir sus necesidades. Parece que la conversión de ALA en estos ácidos grasos es mayor en mujeres que en hombres debido a la modulación que ejercen los estrógenos (Burdge GC y col, 2005). También se ha sugerido que existe una retroconversión de DHA en EPA del 8% aproximadamente por  $\beta$ -oxidación parcial (Thies F y col, 2001). Se ha llegado a proponer que los efectos de altas cantidades de DHA pudiesen ser debidos a esta retroconversión en EPA, que sería el responsable de los efectos (Wainwright PE y col, 1997).



**Figura 3.5.** Biosíntesis de ácidos grasos. La desaturasas 5 y 6 aumentan su actividad con una dieta rica en proteínas y la disminuyen con etanol, PUFA, ayuno u hormonas tales como adrenalina, glucagón, tiroxina o glucocorticoides (Yaqoob P, 2003).

### 3.5 El colesterol de la dieta

Una persona adulta debe consumir diariamente colesterol suficiente para que forme parte estructural de sus membranas celulares y para servir como precursor en la síntesis de determinadas biomoléculas como los ácidos biliares, hormonas esteroideas (gestágenos, hormonas sexuales, glucocorticoides y mineralocorticoides) y vitamina D. Aunque necesario para la funcionalidad del organismo, el exceso de colesterol está relacionado con diferentes procesos patológicos, como la aterosclerosis, consecuencia de la acumulación del mismo en las paredes arteriales. El elevado consumo de colesterol está asociado a un deterioro cognitivo, a un mayor riesgo de demencia, entre otros motivos porque acelera el envejecimiento celular como consecuencia de un mayor estrés oxidativo (Kalmijn S y col, 1997; Ortega RM y col, 1997). Por este mismo motivo, la aterosclerosis se caracteriza por un estado inflamatorio (Mullenix PS, 2005). El colesterol afecta además otros aspectos de la respuesta inmunitaria al formar parte de los “*lipid rafts*” involucrados en la respuesta de los linfocitos T, en su muerte y en la función de las moléculas MHC (Gombos I y col, 2006).

El colesterol se sintetiza principalmente en el hígado y parte en el intestino delgado. En la Figura 3.6 se indica la ruta de biosíntesis de colesterol en el hígado de manera simplificada, puesto que la biosíntesis del colesterol implica más de 19 reacciones enzimáticas diferentes.

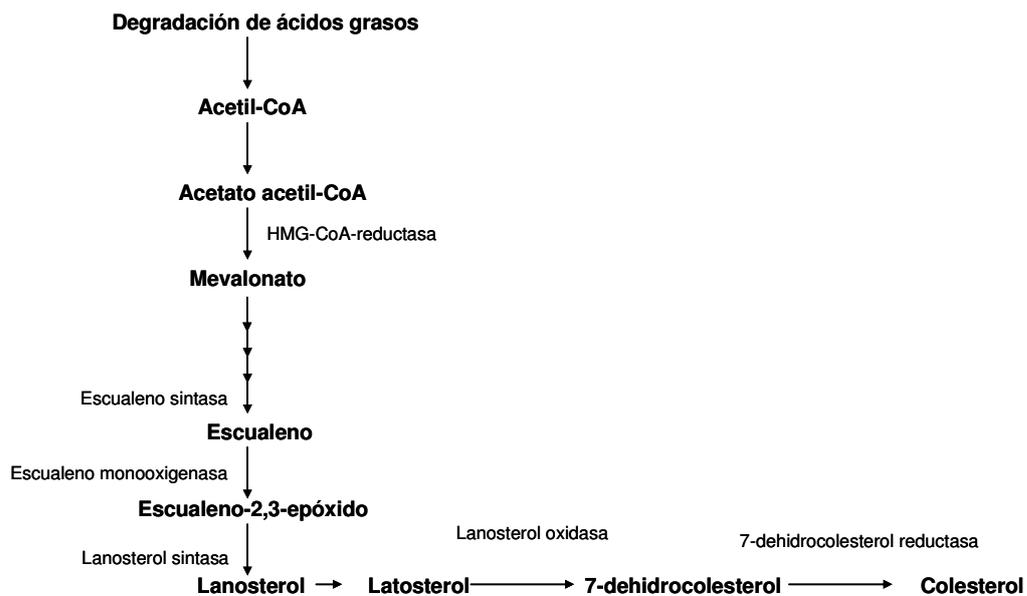


Figura 3.6. Ruta biosintética del colesterol.

Su síntesis se regula por retroalimentación, de modo que cuanto menos colesterol se ingiera, mayor será su biosíntesis. Por este motivo, para que existan cambios en los niveles séricos de colesterol, debe disminuirse de manera drástica su ingesta. Su eliminación, sin embargo, es sencilla y está asegurada a través de los ácidos biliares por la secreción biliar.

### 3.6 Grasas importantes desde el punto de vista alimentario

Las grasas están constituidas por una fracción saponificable mayoritaria, formada por los ácidos grasos en sus distintas formas (libres o esterificados en triglicéridos sobre todo, o bien en colesterol o fosfolípidos). Además contienen un 0.2-2 % de compuestos insaponificables que después de la saponificación pueden extraerse con disolventes orgánicos. Estos compuestos se pierden en gran medida tras el proceso de refinado.

**Aceite de oliva.** Procedente de los frutos del olivo *Olea europea L.* El aceite de oliva virgen es el obtenido por procedimientos mecánicos (lavado, decantación, centrifugación y filtrado), en condiciones térmicas que no produzcan alteración del aceite. El producto obtenido es un zumo de aceitunas totalmente natural, que conserva el sabor, aroma, vitaminas y demás microelementos del fruto del cual procede. Cuando las características no son idóneas para el consumo directo, se llevan a cabo determinados procedimientos con los que se obtiene el aceite de oliva refinado.

El componente mayoritario del aceite de oliva es el ácido oleico (57-82%), MUFA al que se han atribuido multitud de efectos (Figura 3.7). Le siguen en cantidad los ácidos grasos saturados (13-20%), en especial palmítico y esteárico. Su proporción de ácido linoleico gira en torno al 3-21%, con lo cual también los PUFA forman parte de su composición, convirtiéndolo en un alimento de gran riqueza nutricional.



**Figura 3.7.** Estructura química del ácido oleico

Otra de sus principales cualidades es su riqueza en antioxidantes. Aunque la concentración de  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) es menor que en otros aceites, el aceite de oliva posee elevadas concentraciones de escualeno, fenoles simples (oleuropeína, ácido elenólico, tirosol, hidroxitirosol, ácido caféico y vanílico, apigenina, terpenos, ligtosido-aglicona entre otros), secoiridoides y lignanos (acetoxipinoesinol y pinoresinol) (Owen

RW y col, 2000). Estos compuestos minoritarios suponen de 500-800 mg/kg de aceite de oliva, fracción que varía en función de la producción o el modo de almacenaje (Tsimidou M, 1992). La dieta mediterránea, rica en aceite de oliva, proporciona de 10-20 mg de esta mezcla de compuestos fenólicos al día, una de las características que la convierte en una de las dietas más saludables (Wahle KWJ y col, 2004). Cuanto menos manipulado esté el aceite, mayor será el contenido de estos compuestos de actividad biológica, como se indica en la Tabla 3.2.

Se han atribuido numerosos efectos biológicos a la fracción insaponificable del aceite de oliva. Parece que inhiben la oxidación de las LDL; presentan propiedades inmunológicas al disminuir citocinas inflamatorias, reducir la expresión de VCAM, ICAM o selectina E, defienden al hospedador frente a la invasión por parásitos; presentan propiedades antimutagénicas, anticarcinogénicas y antiglicémicas (Visioli F, 1998; Wahle KWJ y col, 2004). Todas estas propiedades atribuidas a sus componentes, hacen del aceite de oliva un alimento de gran impacto sobre la salud.

La estructura de los compuestos fenólicos, formados por anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, es especialmente adecuada para ejercer una actividad antioxidante por donación de hidrógeno o electrones, captación de radicales libres o efecto quelante de metales.

**Tabla 3.2.** Concentración (ppm) de los componentes minoritarios del aceite de oliva (Ryan y col, 1998).

Componentes	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva refinado
Alcoholes terpénicos	3500	2500
Esteroles	2500	1500
Hidrocarburos	2000	120
Escualeno	1500	100
Compuestos fenólicos	350	80
β-caroteno	300	120
Alcoholes alifáticos	200	100
Tocoferoles	1250	100
Ésteres	100	30
Aldehídos y cetonas	40	10

Entre estos compuestos cabe destacar al hidroxitirosol (3, 4-dihidroxifeniletanol), procedente de la hidrólisis de la oleuropeína, un glucósido amargo que puede llegar a constituir más del 14 % del peso de la aceituna. En el transcurso de la maduración del fruto y durante el proceso de elaboración de las aceitunas de mesa, la oleuropeína se hidroliza

dando lugar a oleuropeína aglicona, hidroxitirosol y ácido elenólico. El contenido de hidroxitirosol en el aceite de oliva virgen extra oscila entre 113.7-381.2 mg/kg. Se ha calculado así que en España se consume una media de 5.5 mg/día de este compuesto, lo que hace imprescindible la investigación de las repercusiones de la ingesta del mismo para el organismo (Brenes M y col, 2000; Ryan D, 1998). De hecho, existen multitud de trabajos que versan sobre el hidroxitirosol y sus efectos antioxidantes, antimicrobianos e inmunomoduladores (Palmerini CA y col, 2005).

**Aceite de arroz.** Se trata de un aceite vegetal extraído de la cáscara de arroz (*Oryza sativa*), poco convencional, y cuyo uso se está incrementando sobre todo en países asiáticos debido a los efectos beneficiosos que parece ejercer sobre la salud. Su principal productor es la India, que lo obtiene como subproducto en la industria arrocera. Su fracción saponificable está compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados, oleico (38%) y linoleico (34%), cuya estructura se observa en la Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Estructura química del ácido linoleico (LA)

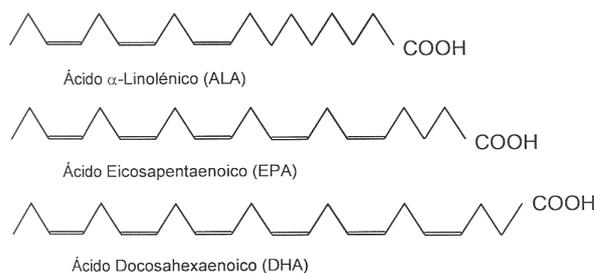
La fracción no saponificable supone un 4.2% y está constituida por escualeno, tocoferoles, tocotrienoles, fitoesteroles y  $\gamma$ -orizanol, su componente más significativo. El orizanol es una mezcla de alcoholes terpénicos esterificados con ácido ferúlico a los que se han atribuido múltiples efectos biológicos, especialmente a nivel cardiovascular, donde se ha demostrado su poder hipolipemiente. Otros efectos son la modulación de la secreción pituitaria, inhibición de la secreción gástrica, acción antioxidante o inhibición de la agregación plaquetaria (Sierra y col, 2005). La amplia gama de efectos ha hecho pensar en la aplicación terapéutica de este aceite y en su inclusión en productos como un ingrediente funcional. En Japón, donde el consumo de este aceite está más generalizado, su fracción no saponificable ya se adiciona a comidas, bebidas y cosméticos como antioxidantes naturales.

**Aceite de girasol.** Procede de las semillas del girasol (*Helianthus agnus L*). En Europa ocupa el primer lugar entre los aceites vegetales. El aceite de girasol de primer prensado es amarillo claro, tiene sabor suave y decolorado mecánicamente sirve

directamente para el consumo. Sirve también como materia prima para la elaboración de margarinas vegetales.

Se trata de un aceite rico en PUFA de la serie n-6 (69% de ácido linoleico), necesarios para el correcto funcionamiento del organismo. Su fracción insaponificable es rica en vitamina E, lo que le otorga un gran efecto antioxidante (Meydani SN y col, 1991). Como consecuencia de su composición, el aceite de girasol presenta propiedades biológicas entre las que se incluyen la regulación del metabolismo del colesterol, LDL y triglicéridos lo que permite que ayude a reducir el riesgo de sufrir problemas circulatorios o infartos (Binkoski AE, 2005).

***Aceite de pescado.*** Este tipo de aceites se extrae del cuerpo de pescados de aguas frías (atún, salmón, sardinas, caballa, arenque) o de hígados de pescados de aguas templadas (bacalao). Se han enriquecido en ácidos grasos n-3, sobre todo EPA y DHA, debido al plancton que consumen, que es rico en los mismos (Tabla 3.2). Estos vegetales pueden sobrevivir en aguas muy frías y a elevadas concentraciones salinas gracias a la incorporación de estos ácidos grasos, del mismo modo que lo hacen los pescados. Por ello, la instauración y la longitud de los ácidos grasos incorporados aumenta en dichas condiciones, permitiendo la vida de quienes lo contienen, pues no se alteran sus ácidos grasos a la Tª del medio acuático en el que viven (López Huertas y col, 2003). La estructura de los PUFA presentes en el aceite de pescado se aprecia en la Figura 3.9.



**Figura 3.9.** Estructura química de los ácidos grasos n-3.

La riqueza de estos peces en EPA y DHA depende de varios factores como la estación del año, la localización o la accesibilidad al fitoplancton. Los aceites de pescado contienen aproximadamente un 15-30% de ácidos grasos n-3, hecho en el que radica su potencial biológico (Calder PC, 2001). Al ser ácidos grasos poliinsaturados son muy

susceptibles de ser oxidados, por lo que normalmente el aceite de pescado está suplementado con vitamina E y otros antioxidantes naturales para prevenir la oxidación que llevaría a enranciamiento, alteración del sabor y a la pérdida de sus funciones biológicas (Trautwein EA, 2001). En la actualidad, la avanzada tecnología alimentaria permite incorporar el aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos n-3, a alimentos de consumo habitual (leche, pan, pastelería, helados, pasta, zumo), con el fin de influir en la salud del consumidor; también están siendo testados como componentes de fórmulas enterales y parenterales (Lasztity N, 2005) o para alimentar a animales y obtener productos enriquecidos de ellos.

**Tabla. 3.2.** Contenido de PUFA n-3 y n-6 en diversas especies de pescado y aceites de pescado (g/100 g).

	PUFA n-6	PUFA n-3
<b>Alimento</b>		
<b>Pescado</b>		
Anchoa	0.1	1.47
Rodaballo	0.03	0.52
Perca	0.01	2.6
Merluza de Alaska	0.17	1.67
Pargo	0.02	0.2
Lenguado	0	0.1
Pez espada	0.03	0.44
Caviar	0.99	3.74
<b>Aceite de pescado</b>		
Hígado de bacalo	0.94	19.75
Arenque	12	11.86
Lacha	2.15	28.14
Salmón	1.06	35.3



#### 4. GRASA Y SISTEMA INMUNITARIO

Durante las últimas décadas, se han llevado a cabo múltiples estudios nutricionales en los que la grasa se ha convertido en protagonista por el efecto beneficioso que era capaz de ejercer sobre la salud. Son la calidad o tipo de grasa, más que la cantidad de la misma, los que constituyen la clave para convertir a los lípidos y a sus constituyentes en instrumentos para la mejora de la salud y la calidad de vida (Calder PC y Deckelbaum RJ, 2003).

De entre los sistemas que forman parte del organismo, el sistema inmunitario es especialmente sensible a la acción de las grasas, hecho demostrado tanto a nivel humano y animal como en experimentos *in vitro* (de Pablo MA y Álvarez de Cienfuegos G, 2000). Los ácidos grasos procedentes de la dieta se incorporan en los fosfolípidos de membrana de las células del sistema inmunitario, lugar desde donde ejercen su efecto. Esta sustitución de unos ácidos grasos por otros depende de factores como la cantidad, el tipo o el tiempo durante el cual se administra un tipo de ácido graso o dieta; el sexo o la especie animal (Tiwarý RK y col, 1987). Todo ello llevará a la modulación de la respuesta inmunitaria en un sentido u otro.

La evidencia epidemiológica llegó a relacionar en los años 80 la baja incidencia de desórdenes inflamatorios en los esquimales de Groenlandia con el alto consumo de pescado rico en ácidos grasos n-3 en dicha población (Horrobin DF, 1987). Desde entonces y hasta ahora la comunidad científica no ha frenado su interés por determinar los principales procesos y los mecanismos involucrados en la inmunoregulación ejercida por los PUFA y los MUFA .

Los PUFA son los principales responsables del efecto inmunomodulador de la grasa. A estos ácidos grasos los dividimos en dos grandes familias cuyos precursores son esenciales, y deben ser ingeridos con la dieta; la serie n-6, derivada del ácido linoleico, y la serie n-3 derivada del ácido  $\alpha$ -linolénico. Ambos PUFAs no son interconvertibles en animales y se metabolizan en el organismo dando lugar a otros ácidos grasos esenciales y de gran importancia como el EPA, DHA o ácido araquidónico (ARA) entre otros. Otra familia de ácidos grasos que juega un papel importante en los procesos inmunomodulatorios, es la serie n-9, con el ácido oleico a la cabeza, al cual se han atribuido numerosas propiedades biológicas (de Pablo MA y col, 1998).

#### **4.1 La dieta en la actualidad**

Durante la evolución del individuo, se han producido cambios dietéticos que han ido afectando a lo largo de los tiempos al ser humano y a su salud. De hecho, las dietas de hace unos 100-150 años proporcionaban cantidades semejantes de PUFAs n-3 y n-6 al tiempo que se reducía la ingesta de ácidos grasos saturados y trans. El cambio hacia el patrón dietético actual, parece haber condicionado la aparición de ciertas enfermedades como las cardiovasculares, las inflamatorias o el cáncer (Eaton SB y col, 1985).

La dieta occidental actual, propia de los países del norte de Europa, se caracteriza por ser pobre en frutas, verduras frescas, legumbres y granos integrales; rica en harinas y azúcares refinados (privados de la fibra y sus micronutrientes), excesiva en proteínas animales, grasas saturadas y en aceites alterados químicamente. Así, aproximadamente el 40% de las calorías derivan de la grasa, el 40% de los carbohidratos y el 20% restante de las proteínas. El ácido graso más consumido es el linoleico con valores de 10-15 g/día, seguido del  $\alpha$ -linolénico, cuyo consumo es de 0.6-2.5 g/día. El consumo de ARA varía entre 50-300 mg/día en adultos frente al consumo de EPA y DHA que se estima en menos de 250 mg/día (Calder PC, 2005). Con este comportamiento dietético el ratio n-6:n-3 es de 15-20:1, no alcanzándose el ratio n-6:n-3 de 5-10:1 recomendado por la FAO (Food Agriculture Organization). Normalmente, este hecho es debido al bajo consumo de pescado y otros productos ricos en ácidos grasos n-3 y a la alta ingesta de productos ricos en n-6 como el aceite de semillas, productos de bajo coste y fácil disponibilidad (Meharban S, 2005). En países como Japón, donde el consumo de pescado es muy elevado, se ingieren del orden de 2g/día de EPA y DHA (Sugano y col, 2000), alcanzando un ratio n-6:n-3 de 2-4:1 muy beneficioso para la salud.

Frente a este tipo de dieta occidental poco saludable, nos encontramos la denominada Dieta Mediterránea, de gran interés para nutricionistas por sus importantes efectos beneficiosos sobre la salud.

El primer estudio que estableció los efectos beneficiosos producidos por el patrón dietético mediterráneo fue el denominado “Estudio de los siete países”, llevado a cabo en la década de los 50 por Keys (Keys A, 1970). En este estudio se observó que los países de la cuenca mediterránea (Grecia, Italia y Yugoslavia) presentaban mucha menor tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y mejor calidad de vida que el resto de los países estudiados (Finlandia, Estados Unidos, Japón y Holanda), hecho que se atribuyó al diferente comportamiento dietético. Más adelante, estudios epidemiológicos y de intervención han demostrado que en estas regiones mediterráneas existe además una menor

incidencia de otras enfermedades como cáncer o de tipo inflamatorio como la artritis reumatoide además de una mayor esperanza de vida (Trichopoulou A, 1995).

En la actualidad, el término “dieta mediterránea” se refiere a los hábitos alimenticios de algunas regiones mediterráneas asociadas al cultivo del olivo. Aunque dicho patrón dietético varía según las regiones geográficas, se pueden identificar algunas características comunes al mismo: baja en grasas saturadas, alta en grasas monoinsaturadas procedentes del aceite de oliva, balanceada en ácidos grasos n-6 y n-3, baja en proteína animal y rica en antioxidantes (Calder PC, 1998; Trichopoulou A, 2000). Además, este tipo de dieta aportaba en forma de grasa la misma energía de la dieta occidental, hecho que sugirió la importancia de la calidad de la grasa para la mejora de la salud.

### **Necesidades y recomendaciones nutricionales**

Con el fin de obtener un máximo beneficio de los lípidos alimentarios, la ingesta de grasa debería suponer entre un 30-35% de la energía total de la dieta. La grasa saturada debería suponer menos del 10% y el colesterol no debería sobrepasar los 300 mg/día. Aproximadamente un 15% de la energía total debería ser aportado por MUFA (ácido oleico) y un 3% por ácidos grasos esenciales. Con el fin de cubrir estos requerimientos, diferentes comités de expertos como la FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization), el Comité Científico para los Alimentos o la Fundación Británica de Nutrición, se han pronunciado al respecto. La Sociedad Internacional para el estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL) aconseja ingerir 0.65g de EPA+DHA/día y 1 g del ácido  $\alpha$ -linolénico, cantidad correspondiente aproximadamente a una o dos raciones de pescado (Gerster H, 1998; Simopoulos AP y col, 1999). Las recomendaciones de la JHCI (Joint Health Claim Initiative) son de 0.45 g/día de PUFAs n-3, equivalente a tres raciones de pescado azul por semana. La Sociedad Americana del Corazón (AHA) aconseja la ingesta de 1 g/día de EPA+DHA en pacientes con enfermedad cardíaca crónica y de 2-4 g/día de EPA+DHA en individuos con hipertrigliceridemia. Ello supone que para cubrir los requerimientos diarios habrá que recurrir a otras fuentes de ácidos grasos n-3 diferentes del pescado pero también accesibles, como los alimentos funcionales enriquecidos en los mismos. En la Tabla 4.1 se indican algunas de las ingestas recomendadas de ácidos grasos n-3. En madres embarazadas y lactantes se aconseja incrementar la ingesta a aproximadamente 2.6 g de ácidos grasos n-3, al menos 300 mg/día de DHA, con el fin de cubrir sus necesidades y las del feto o recién nacido (Singh M, 2005).

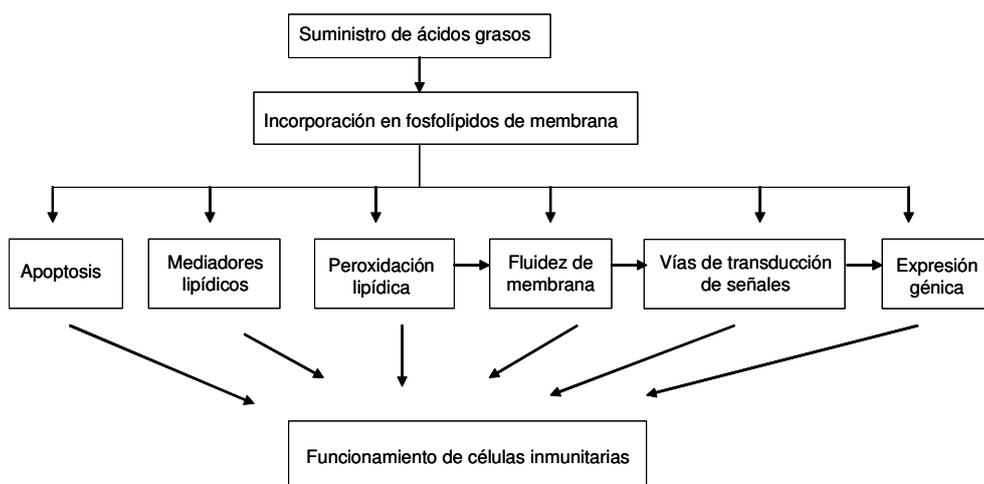
**Tabla 4.1.** Ingestas recomendados de ácidos grasos.

Ácido graso	ISSFAL	SENC
Ácido linoleico	2-3	4
Ácido $\alpha$ -linolénico	1	1
EPA+DHA	0,3	0,1

Valores expresados como porcentajes de energía. ISSFAL, International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (Scientific committee for food, 1993); SENC, Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (Mataix J y col, 1995).

#### 4.2 Mecanismos de acción de los ácidos grasos

En la actualidad, son muchos los progresos que se hacen para determinar la naturaleza y el potencial de los efectos ejercidos por los ácidos grasos sobre la respuesta inmunitaria. Puesto que existe una gran variedad de efectos, un solo mecanismo no puede explicar la inmunomodulación ejercida por los ácidos grasos. Múltiples estudios han arrojado diferentes posibilidades que hoy se consideran como ciertas aunque aún quede mucha investigación por delante (de Pablo MA y col, 2002). En la Figura 4.1 se resumen los mecanismos implicados en la acción inmunitaria de los ácidos grasos n-3.



**Figura 4.1.** Mecanismos por medio de los cuales los ácidos grasos regulan la función inmunitaria

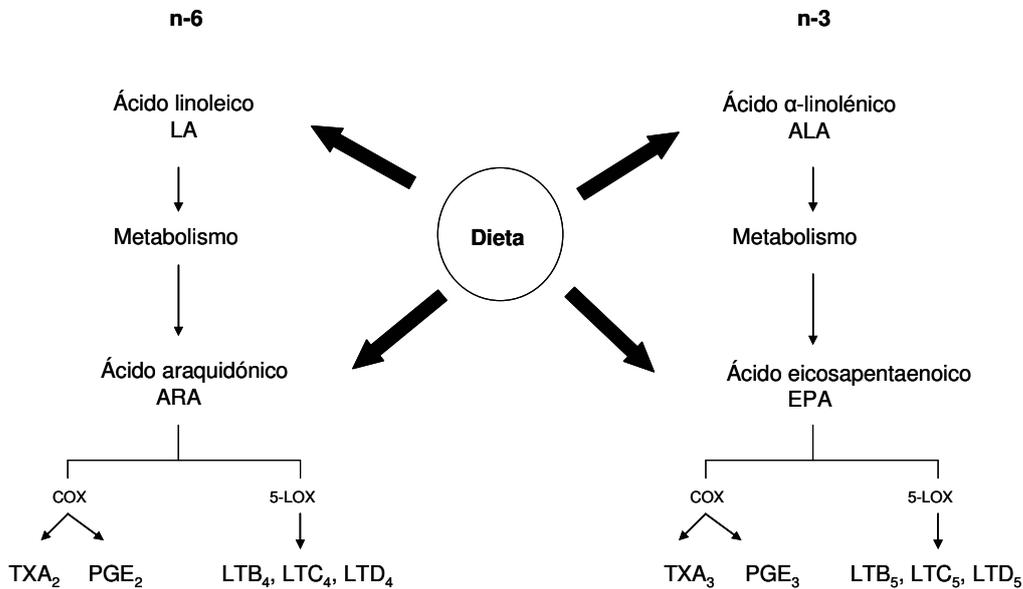
**Fluidez de membrana.** Según la biodisponibilidad de los ácidos grasos, éstos se incorporan en los fosfolípidos de membrana alterando sus características. De este modo se producen cambios en la actividad de proteínas asociadas a la membrana, que actúan como receptores, como canales iónicos o que están relacionados con actividades enzimáticas. Ello puede llevar a cambios en la unión de citocinas a sus receptores, en la modulación de la fagocitosis o en la alteración en la expresión de moléculas HLA entre otros efectos. En este entorno situamos el concepto de “*lipid raft*”. Se trata de microdominios situados en la zona exoplásmica de la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas, que reúnen grupos de proteínas transmembrana según su función. Suelen ser proteínas unidas a ácidos grasos saturados (palmítico) e implicadas en la transducción de señales, insertadas en un entorno enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados y por tanto en un entorno fluido. Estas estructuras facilitan el contacto entre células y la consecuente transmisión de señales, de modo que la alteración de este ambiente traerá consecuencias funcionales para la célula. Es el caso de la activación de los linfocitos T, evento ampliamente afectado por los ácidos grasos de las membranas (Stulnig TM y Zeyda M, 2004; Yaqoob P, 2003).

**Peroxidación lipídica.** Los ácidos grasos son susceptibles de oxidación, en mayor medida cuantos más dobles enlaces contienen. Los productos resultantes de la peroxidación lipídica son nocivos para las células, hecho que podría ser responsable de la alteración en la proliferación de linfocitos u otras células. Además, la peroxidación producida altera la expresión de moléculas de superficie, afectando la presentación del antígeno y otros eventos inmunológicos (de Pablo M y Álvarez de Cienfuegos G, 2000).

**Producción de Eicosanoides.** Los ácidos grasos son liberados de los fosfolípidos de membrana y son sometidos a degradación enzimática hasta la formación de eicosanoides, mediadores lipídicos que modulan funciones como la proliferación linfocitaria, la citotoxicidad o la producción de citocinas entre otras. Esta liberación de mediadores se suma a la que ocurre durante la inflamación, como consecuencia de la mayor degradación enzimática.

Los eicosanoides derivados de los ácidos grasos n-3 presentan propiedades diferentes a los derivados de la serie n-6, siendo los primeros menos potentes biológicamente. En la Figura 4.2 se observa el proceso de síntesis de eicosanoides. El EPA incorporado en las membranas inhibe competitivamente la conversión de ARA a eicosanoides al actuar como sustrato de la COX y la 5-LOX; este hecho se acompaña de una disminución en la capacidad de las células inflamatorias de producir eicosanoides a

partir del ARA (Calder PC, 1998). De este modo, primarán eicosanoides de las series 3 y 5, que además de ser menos inflamatorios son capaces de modular otros aspectos inmunológicos como por ejemplo disminuir la proliferación linfocitaria (Shapiro AC y col, 1993).



**Figura 4.2.** Cascada de formación de Eicosanoides. **PGE<sub>2</sub>**: prostaglandina E2, potentes efectos inflamatorios que incluyen fiebre, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, aumento del dolor y edema por otros agentes como bradiquinina e histamina; estimula la producción de IgE por linfocitos B y suprime la producción de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1; **LTB<sub>4</sub>**: leucotrieno B4, aumenta la permeabilidad vascular, potente agente quimiotáctico, induce liberación de enzimas lisosómicas y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y de citocinas inflamatorias; **TXA<sub>2</sub>**: tromboxano A2, vasoconstrictor y proagregante plaquetario (Harbige LS, 2003; Calder PC, 2005).

**Apoptosis.** Diferentes estudios han descrito el importante papel de los ácidos grasos en la inducción o supresión de la apoptosis. Algunos autores piensan que los PUFA n-3 además de inhibir la proliferación de linfocitos son capaces de inducir la apoptosis de éstos, llevando a la muerte celular por despolarización de la membrana mitocondrial, por reducción en la expresión del oncogen Bcl-2 o NF $\kappa$ B o por aumento de Fas-L (Ligando de Fas) (Reddy Avula CP, 1999).

**Regulación de genes y transducción de señales.** Muchos de los efectos sobre la inflamación de los ácidos grasos son llevados a cabo a través de la modulación de la expresión génica. Este efecto se consigue por interacción directa con receptores nucleares que actúan sobre factores de transcripción, como PPAR (*peroxisome proliferator – activated receptor*) o LXR (*Liver X receptor*), o por interacción con vías de transmisión de señales como la de MAPK (Mitogen activated protein kinase). Sin embargo, estas acciones

han sido demostradas en un número limitado de ocasiones y normalmente *in vitro*, por lo que los efectos *in vivo* no están suficientemente claros (Calder PC, 2005).

El hecho de que un gen se exprese más o menos influenciado por multitud de factores. El proceso es complejo, implicando vías de señalización y factores de transcripción que podrán actuar los unos sobre los otros. A continuación se detallan algunos de los mecanismos más estudiados que pueden emplear los ácidos grasos en la regulación de la expresión génica.

a) Receptores nucleares (RN). Los RN son miembros de una superfamilia de factores de transcripción ligando-dependientes que regulan diversos aspectos de la reproducción, el desarrollo, la homeostasis o la respuesta inmunitaria. Esta superfamilia incluye receptores que interaccionan con hormonas esteroideas, tiroideas, glucocorticoides o con productos del metabolismo lipídico como los PPAR o LXR.

Los miembros de esta superfamilia poseen una estructura común; en la región N-terminal existe una zona conservada de unión a DNA, conocido como elementos de respuesta a hormona (HREs). En la región C-terminal existe el dominio de unión al ligando (LBD). Los RN están unidos a un co-represor, y cuando son activados se liberan del mismo, y se unen a un co-activador que migra desde el citoplasma y que permite su funcionamiento. La mayoría de estos receptores son capaces de actuar sobre la transcripción como dímeros, normalmente unidos al ácido retinoico (Valledor AF, 2004).

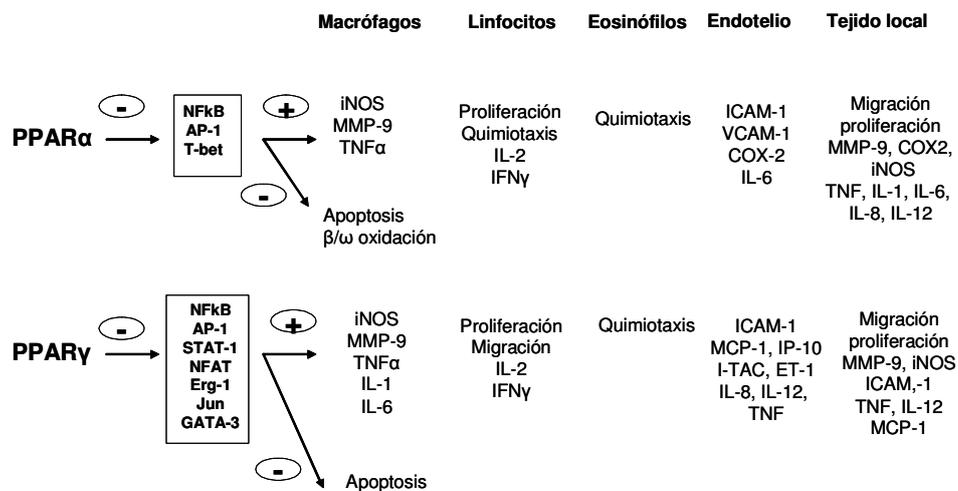
**PPAR:** Hace aproximadamente una década se descubrieron los PPAR, de los que existen tres isoformas diferentes, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta/\delta$  que se describen en la Tabla 4.2. Se trata de receptores diferentes en cuanto a cantidad, distribución y actividad. Existen diferentes mecanismos por los cuales los PPAR actúan sobre la transcripción: a) secuestro de coactivadores compartidos por otros factores de transcripción, b) unión a factores de transcripción como NF $\kappa$ B o AP-1 (Activator Protein-1) y c) inhibición de la fosforilación y activación de MAPK (Daynes RA y col, 2002).

**Tabla 4.2.** Localización, posibles ligandos y funciones de los tres subtipos de PPAR identificados (Moraes LA y col, 2005).

Subtipo	Tejido o célula	Ligandos	Función
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Hígado, músculo esquelético y liso tejido adiposo marrón, corazón, vasos, monocitos, macrófagos, cels.endoteliales, linfocitos	LTB4, HETES, DHA, ARA, LA, fibratos, otros	Mediadores metabolismo lipídico, antiinflamatorios cardioprotectores, homeostasis lipídica en macrófagos
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	En todas las células	Prostaciclina, DHA, ARA, LA compuestos sintéticos, otros	Regulación metabolismo lipídico, proliferación celular, respuesta inflamatoria
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Tejido adiposo blanco y marrón, colon, bazo, retina, monocitos, macrófagos, células dendríticas, plaquetas, megacariocitos, linfocitos, músculo liso	ARA, DHA, LDL oxidada, HETES, glitazonas antidiabéticas, otros	Diferenciación de preadipocitos a adipocitos, metabolismo lipídico, modulación acción insulina, homeostasis lipídica de macrófagos, trombosis, propiedades antiinflamatorias

Su papel regulatorio sobre el sistema inmunitario tiene gran importancia. Según el tejido y el receptor implicado, la respuesta inflamatoria podrá variar en intensidad, duración o consecuencias. Se han llevado a cabo múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, que confirman el poder anti-inflamatorio de los ligandos que activan a estos RN (Tabla 4.3).

**LXR:** Esta subfamilia comprende dos subtipos, LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . Mientras que LXR $\beta$  está localizado en todo el organismo, LXR $\alpha$  está sobre todo en tejidos relacionados con el metabolismo lipídico como el hígado. Son activados por oxisteroles o por compuestos intermediarios en la biosíntesis del colesterol (Ricote M y col, 2004). Los genes diana para LXR son los involucrados en procesos como absorción de colesterol, eliminación de colesterol celular, transporte inverso de colesterol, metabolismo de lipoproteínas, conversión del exceso de colesterol a ácidos biliares o síntesis y esterificación de ácidos grasos (Valledor AF, 2005). A parte de su misión en la homeostasis lipídica, los LXR median efectos anti-inflamatorios. Se ha demostrado que los agonistas de LXR inhiben genes proinflamatorios en macrófagos que incluyen iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, MCP-1 y 3, MIP-1 $\beta$  o IP-10. Este efecto antiinflamatorio ha sido demostrado en modelos animales (Joseph SB y col, 2003). Parece ser que actúa bloqueando la vía NF $\kappa$ B. También actúan sobre genes que modulan el desarrollo de respuestas inmunológicas mediadas por macrófagos. Así, la activación de LXR en estas células aumenta la capacidad de las mismas para sobrevivir a infecciones junto con una limitada respuesta pro-inflamatoria, hechos que ayudarían a potenciar el papel del macrófago en la resolución de la inflamación (Valledor AF, 2005).



**Tabla 4.3.** Efectos que se derivan de la activación de los PPAR a nivel de diferentes vías de señalización y sus consecuencias finales (Moraes LA y col, 2005).

b) Receptores de cannabinoides (CB). El uso del cannabis como agente terapéutico data de miles de años atrás. Este compuesto era usado para inducir alteraciones en el comportamiento, en la función cognitiva, en la memoria y en la percepción del que lo consumía (Vicent BJ y col, 1983). Sin embargo, hasta el descubrimiento del sistema endocannabinoide, no existió evidencia científica de su poder terapéutico.

Se identificaron dos formas diferentes de receptores pertenecientes a este sistema; el CB1, abundante sobre todo en sistema nervioso y presente en otros muchos tejidos; y CB2, situado a nivel periférico, especialmente en las células del sistema inmunitario (Walter L y col, 2004).

Con estos receptores interaccionan sus ligandos endógenos, la anandamida y el 2-araquidonilglicerol; también los derivados de plantas, como el tetrahidrocannabinol (THC) presente en la marihuana, o compuestos de síntesis. Los receptores CB son proteínas de siete dominios transmembrana que están asociados a proteínas G, de modo que regulan la adenil ciclasa (Croxford JL y col, 2005). Actúan a nivel de otras vías de señalización inhibiendo PKA y regulando la expresión de AP-1 y NFAT. También pueden activar o bloquear la actividad de MAPK en función del tipo de célula y ligando estudiado.

Su papel a nivel del sistema inmunitario no está muy claro, aunque la mayoría de los estudios realizados coinciden en observar un efecto inmunosupresor, en general dependiente de la activación de los receptores CB2 (Roth MD y col, 2002).

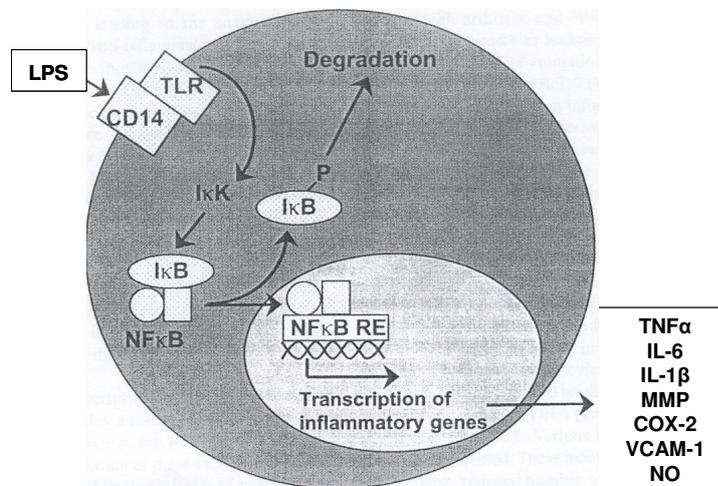
En animales se ha comprobado que la activación de CB produce la ruptura del equilibrio Th1/Th2 apreciándose una disminución de citocinas proinflamatorias (IL-12 e IFN $\gamma$ ) y un incremento de IL-4. Estos efectos parecen ser debidos a la sobreexpresión de la citocinas reguladoras IL-10 y TGF $\beta$ . En células humanas se han corroborado los mismos resultados. Además, en individuos consumidores de marihuana se ha observado una reducción de la proliferación de linfocitos T junto a la dificultad de producir IL-6, GM-CSF, TNF $\alpha$ , problemas en la fagocitosis y en la capacidad de sobreexpresar iNOS y llevar a cabo una correcta respuesta antimicrobiana (Roth MD y col, 2002).

A la vista de estos resultados, este tipo de compuestos están siendo testados en diversas patologías. Así, en modelos animales de neuroinflamación, han resultado ser eficaces, llegando incluso a evitar la instauración de enfermedades como la encefalomiелitis autoinmune experimental (Walter L y col, 2004); o en modelos de IBD donde se ha demostrado su capacidad de protección (Massa F y col, 2004).

c) Vías de señalización: Existen diversas vías de señalización implicadas en fenómenos de inflamación y en la respuesta inmunitaria. Sin embargo, las vías NF $\kappa$ B y MAPK son las

más profundamente implicadas a este nivel y también las más susceptibles de ser reguladas por los ácidos grasos de la dieta.

- Vía NFκB. El NFκB es un factor de transcripción implicado en la inducción de numerosos genes inflamatorios en respuesta a estímulos. NFκB es un heterotrímero inactivo que está en el citosol de las células inflamatorias en estado de reposo. Una de sus subunidades se denomina subunidad inhibitoria de NFκB (IκB); bajo estimulación, una cascada de señalización activa a un complejo de proteínas conocido como IκB kinasa (IκK). Este complejo fosforila IκB, causando su disociación del resto del trímero. IκB fosforilado es degradado, y el heterodímero de NFκB restante se transloca al núcleo donde se une a elementos de respuesta en genes diana, regulando así su transcripción (Figura 4.3). Existen evidencias de que los ácidos grasos n-3 son capaces de inactivar la vía NFκB inhibiendo la fosforilación o la translocación de IκB, o pueden incluso reducir sus niveles de expresión en el núcleo (Denis a y col, 2005; Xi S y col, 2001).

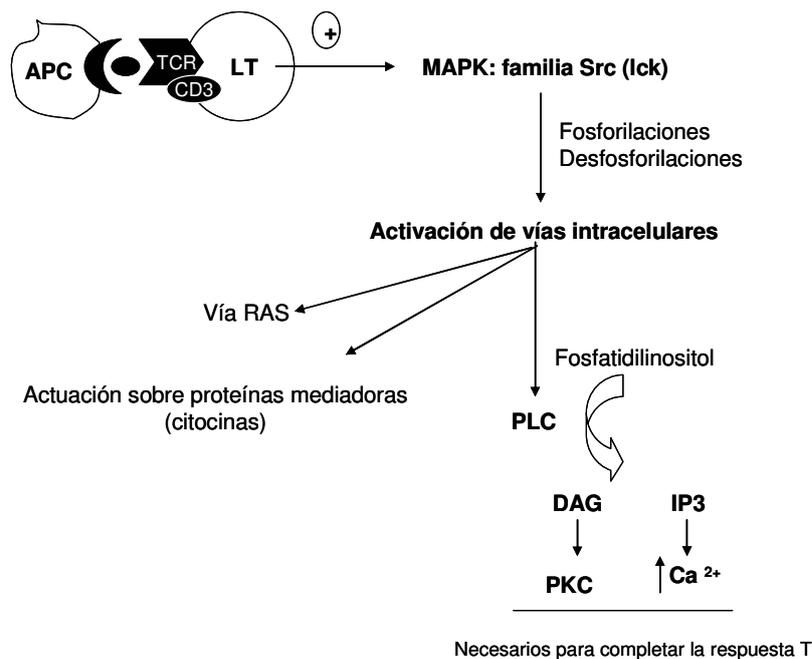


**Figura 4.3.** Vía de regulación de genes inflamatorios a través de NFκB. LPS, lipopolisacárido; TLR, toll like receptor; IκK IκB kinasa; IκB, inhibidor de NFκB; NFκB, factor nuclear κB (Fuente: Calder PC, 2003).

- Vía MAPK. Esta es una vía compleja constituida por cascadas de kinasas, enzimas que fosforilan y que se activan al ser fosforiladas. Tras su activación, una kinasa fosforila a la siguiente, produciendo una ampliación de la señal que culmina con la fosforilación de proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares, que de este modo se activan. Por este motivo, están implicadas en

multitud de procesos biológicos, constituyendo la base molecular de los mismos. Como en muchos otros sistemas, esta vía está involucrada en la regulación del sistema inmunitario, por lo que cualquier factor que la afecte, modificará la respuesta inmunitaria.

Parece ser que los ácidos grasos son capaces de actuar a nivel de señalización de MAPK. Se ha visto que el ácido araquidónico es capaz de aumentar la fosforilación de MAPK en varios tipos de células (Hii CST y col, 1995), mientras que los PUFA n-3, EPA y DHA parecen inhibir esta vía en células como linfocitos o células endoteliales (Denys A y col, 2001; Yang SP y col, 1998). La vía MAPK está implicada en la señalización responsable de la activación de los linfocitos T, ya que tras el reconocimiento antigénico se activa dando lugar a los eventos moleculares que se describen en la Figura 4.4 y que concluyen con el éxito de la respuesta linfocitaria (Denys A y col, 2001).



**Figura 4.4.** Actuación de las MAPK tras el reconocimiento antigénico por las células T.

Según la implicación de las MAPK en la respuesta inmunitaria, el hecho de que el EPA y DHA inhiban la cascada MAPK se corresponde con el efecto anti-inflamatorio observado para los PUFA n-3, por lo que éste es considerado uno de los mecanismos de acción por medio de los que actúan.

### 4.3 Efectos de los ácidos grasos sobre la respuesta inmunitaria

#### 4.3.1. Efectos de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC se producen por fermentación de la fibra soluble llevada a cabo por bacterias anaerobias en el tubo digestivo. Entre ellos destacan los ácidos acético, propiónico y butírico. Son la principal fuente de energía para el colonocito, regulan la maduración, motilidad y funciones intestinales, reducen el pH intestinal aumentando así la absorción de minerales y dificultando el crecimiento de enterobacterias y otros patógenos además de intervenir en el metabolismo lipídico y glucídico. Múltiples estudios han sugerido la eficacia de los AGCC producidos a partir de la fibra en la enfermedad inflamatoria intestinal debido a todo este conjunto de actividades que ejercen y que tienen como consecuencias la regulación de la homeostasis del colon (Gálvez J y col, 2005). Además, estos productos son capaces de modular la respuesta inmunitaria en el lugar donde son liberados y una vez que pasan al torrente sanguíneo, benefician el curso de enfermedades de carácter inflamatorio (Cavaglieri CR y col, 2000). Destaca su efecto sobre la actividad de leucocitos y parece ser el butirato el que presenta acciones más potentes. En la Tabla 4.4 se describen algunos de los efectos inmunitarios descritos para los AGCC.

**Tabla 4.4.** Algunos de los efectos inmunitarios llevados a cabo por los AGCC

<b>Efectos inmunitarios observados</b>	
Activación y diferenciación de leucocitos por interacción con receptores GPR	Le Polu E y col, 2003
Modulan la localización de células: acumulación de Linfocitos T CD8+ y NK en el colon	Ishizuka S y col, 2004
Regulan liberación de chemoatrayentes y citocinas:	
butirato modula la expresión de MCP-1 y IL-8 en las células intestinales	Snderson IR, 2004
butirato inhibe proliferación linfocitaria y producción de IL-2 e IFN $\gamma$ :inhibe respuesta Th1	Cavaglieri CR y col, 2003
butirato y propionato inhiben la producción de TNF $\alpha$	Rodríguez-Cabezas ME y col, 2003
Acetato y propionato aumenta producción de IL-10	Cavaglieri CR y col, 2003
Butirato disminuye la colonización por Salmonella	Van Immerseel F y col, 2004
Producen incremento de bacterias probióticas	Forchielli ML y Walter WA

#### 4.3.2. Efectos de los ácidos grasos de cadena media (MCFA)

Los MCFA, tales como el ácido caprílico o cáprico, presentan propiedades físico-químicas especiales como el bajo peso molecular y la baja tensión interfacial con el agua,

además de ser solubles en fluidos biológicos. Esto supone que estos ácidos grasos presentan una digestión y vías metabólicas más rápidas que otros ácidos grasos (Bach AC y col, 1988). Los MCFA son triglicéridos esterificados con ácidos grasos de cadena media. Estos compuestos son empleados en nutrición clínica (enteral y parenteral) por ser fácilmente combustibles y proporcionar energía de manera rápida, de una fuente diferente a los carbohidratos (Babayán VK, 1987). De ahí que hayan sido aplicados en malabsorción lipídica, en deficiencia de lipoproteinlipasa o incluso para la reducción de peso corporal (Bach AC y col, 1996). Sin embargo, la dificultad para introducir los aceites ricos en MCFA en la cocina a consecuencia de sus propiedades, hacen que la dieta pueda difícilmente ser enriquecida en ellos (Shinohara H y col, 2005). También presentan la capacidad de modular la respuesta inmunitaria, sobre todo se ha estudiado su efecto sobre la inmunología intestinal. En modelos experimentales de endotoxemia se ha observado que disminuyen la mortalidad, protegen la mucosa intestinal, disminuyen la actividad mieloperoxida (MPO) en ella, evitan hemorragias, aumentan la IgA tanto en suero como en el intestino, disminuyen citocinas proinflamatorias en el mismo y aumentan la IL-10 (Kono H y col, 2004). Su acción parece ser bastante potente a este nivel incluso más eficaces que los PUFA.

#### **4.3.3. Efectos de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). Serie n-9.**

Los estudios en animales sugieren la idea de que el aceite de oliva es capaz de modular la función inmunitaria (Yaqoob P, 1998). Existe cierta disparidad en los estudios realizados pudiendo ser debido al uso de diferentes protocolos, especies animales o tipos de medidas. Los efectos son similares a los mostrados por el aceite de pescado aunque no tan intensos, y se encuentra en debate la responsabilidad de los mismos. De hecho, recientemente se han llevado a cabo estudios que atribuyen los efectos beneficiosos del aceite de oliva al conjunto de elementos traza y antioxidantes y al ácido oleico por igual (Wahle KWJ y col, 2004). Se ha demostrado especialmente su capacidad para inhibir la proliferación linfocitaria y la actividad sobre las células NK (Yaqoob P y col, 1994). Dietas ricas en aceite de oliva han resultado ser eficaces en la modulación de respuestas inmunitarias *in vivo* como se ha observado en modelos experimentales de endotoxemia donde se apreció disminución en la susceptibilidad a los efectos letales (Besler HT y col, 1995), o en modelos experimentales de rechazo del huésped por transplante, indicando un efecto sobre los linfocitos B (Sanderson P y col, 1995). Por el contrario, el consumo de dietas ricas en MUFA por humanos no parece ejercer el efecto inmunosupresor observado

en animales. Aunque se ha observado cierta tendencia a la disminución de la proliferación de linfocitos y de la actividad de NK, sus principales efectos en humanos son la reducción en la expresión de moléculas de adhesión en polimorfonucleares (Yaqoob P y col, 1998) así como la disminución de la adhesión y oxidación de las LDL (Mata P y col, 1996), hechos que podrían ser responsables de la baja incidencia de aterosclerosis y desórdenes inflamatorios en la población mediterránea. Además también se ha demostrado que son capaces de inhibir la expresión de genes como 5-LOX implicados en la respuesta inflamatoria (Walhe KWJ y col, 2004). La falta de un efecto claro en humanos de los MUFA puede ser debida a las altas concentraciones usadas de los mismos en los estudios animales, concentraciones que no se alcanzan en los estudios en humanos donde se pretende emplear ingestas de aceite de oliva que se correspondan con las reales de la dieta mediterránea. Tampoco está claro si los efectos observados se deben al incremento de ácido oleico o al descenso que, como consecuencia, experimentan otros ácidos grasos como el ácido linoleico o ácidos grasos saturados.

A pesar de la controversia, la comunidad científica coincide en atribuir al aceite de oliva numerosos efectos beneficiosos para la salud aunque no queden claros los mecanismos por los cuales actúa.

#### **4.3.4. Efectos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)**

Ya hemos comentado que los PUFA n-6 y n-3, y en especial sus cabezas de serie, son esenciales, hecho que ha permitido más fácilmente determinar las consecuencias de su déficit para el organismo. Al estudiar el efecto de estos ácidos grasos sobre la respuesta inmunitaria observamos que la interpretación de los resultados es complicada. Por ejemplo, en una situación en la que exista deficiencia de un ácido graso esencial podemos apreciar descenso de una función inmunitaria en particular, al tiempo que el incremento de otra función diferente. Esto nos indica que para sacar conclusiones no debe estudiarse una función inmunitaria aislada, sino el conjunto de ellas, teniendo en cuenta, además, las diferentes variables por las que se ven afectadas.

Durante la generación de una respuesta inmunitaria se aumentan los requerimientos de PUFA debido al aumento en la proliferación y división celular. Ello además se confirma *in vitro*, donde las células del sistema inmunitario al ser estimuladas prefieren incorporar ácido linoleico o araquidónico en vez de otros ácidos grasos no esenciales (Calder PC, 1994). Por otro lado, al suministrar al individuo o al añadir a cultivos celulares PUFA n-3, las células incorporan éstos a sus membranas en detrimento

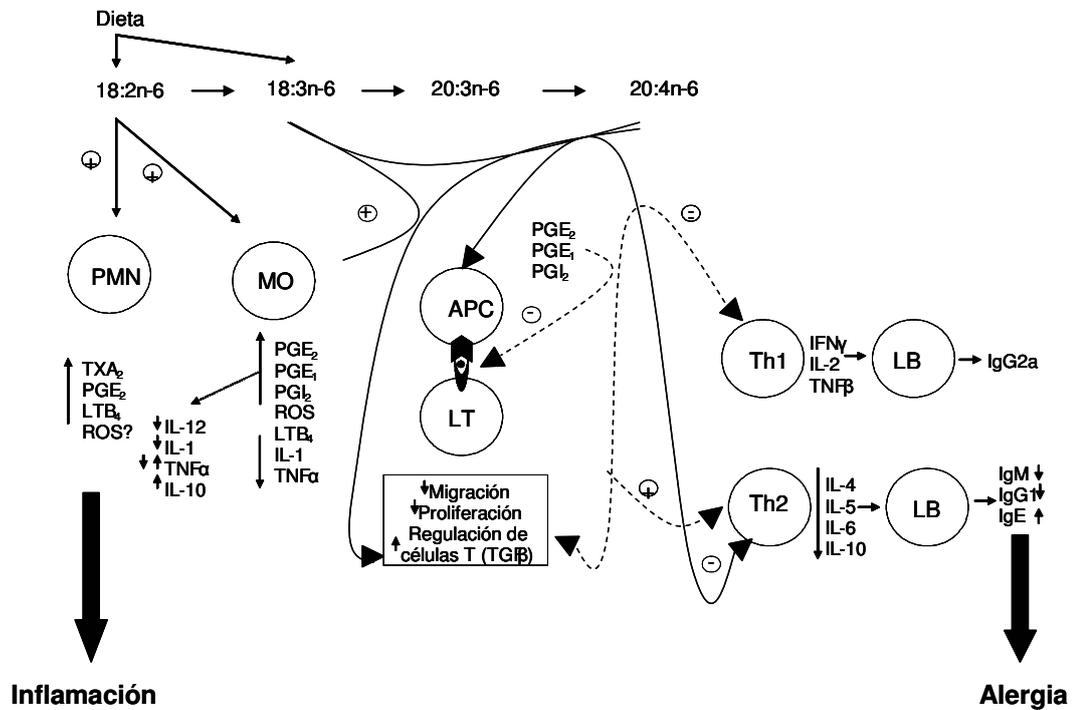
de los PUFA n-6, especialmente de ARA (Endres S y col, 1989). Este reemplazamiento de ácidos grasos n-6 por n-3 es especialmente patente en eritrocitos, neutrófilos, monocitos y células hepáticas (Simopoulos AP, 1999). Estos datos sugieren que los PUFA son indispensables para la consecución de la respuesta inmunitaria, ya que las células responsables de la misma los necesitan para su supervivencia. La incorporación de uno u otro tipo de ácido graso, ya sea de la familia n-6 o n-3, determinará que la respuesta curse en una u otra dirección.

#### **4.3.4.1. Efectos de los ácidos grasos poliinsaturados n-6.**

Los PUFA n-6, especialmente ARA y LA, son los principales componentes de las células del sistema inmunitario, constituyendo el ARA hasta el 25% de los ácidos grasos totales de las mismas, frente a un 4% de DHA. Esta alta concentración de ARA en las células inmunitarias sugiere el importante papel que deben cumplir en las mismas. En macrófagos, está ligada en su mayor parte a su gran capacidad para producir eicosanoides. En los linfocitos parece destacar su importancia en la sinapsis inmunológica, responsable de la naturaleza y magnitud de la respuesta inmunitaria. Además, los metabolitos del ARA regulan el desarrollo y funciones de las células inmunológicas como la proliferación y diferenciación de monocitos y timocitos, la proliferación y migración de células T, la respuesta Th1/Th2, la presentación de antígenos o la inducción de las células T supresoras entre otras (Harbige LS, 2003).

En general se ha atribuido siempre un papel proinflamatorio a los ácidos grasos n-6 por tres razones: a) su alto consumo está asociado al incremento en la incidencia de ciertas enfermedades autoinmunes, b) el incremento en plasma de los niveles de PUFA n-6 en el transcurso de determinadas enfermedades inflamatorias y c) el clásico papel del ARA que incorporado en los fosfolípidos de membrana de células inmunitarias es capaz de producir mediadores con potentes propiedades vasoactivas, quimiotácticas e inflamatorias (Harbige LS, 2003). Sin embargo, ciertos estudios han arrojado la posibilidad de que estos ácidos grasos presenten un papel protector en las enfermedades inflamatorias (Harbige LS y col, 1995). En el estudio de su papel inmunitario se aprecia tanto *in vivo* como *in vitro*, que bajas concentraciones de PUFA n-6 incrementan determinadas funciones inmunológicas como la linfoproliferación o la respuesta de hipersensibilidad retardada, mientras que altas concentraciones inhiben dichas funciones (Erickson KL y col, 1983). Todos estos datos, son un indicio de que no se puede afirmar rotundamente un papel proinflamatorio para los PUFA n-6; son muchos los factores a tener en cuenta, empezando por

la diversidad de compuestos que constituye la familia n-6, los cuales presentan efectos diferentes; así LA y ARA parecen ser más pro-inflamatorios que el ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) (Kelley DS, 2001). En la Figura 4.5 se esquematizan los efectos inmunitarios ejercidos por los PUFA n-6.



**Figura 4.5.** Funciones inmunitarias de los PUFA n-6 (Harbige LS, 2003). LB, linfocito B; LT, linfocito T, MO, macrófago; PMN, polimorfonucleares.

#### Un ácido graso n-6 especial: CLA

CLA, ácido linoleico conjugado, hace referencia a un conjunto de isómeros de posición y geométricos del ácido linoleico, entre los que abundan especialmente el c9, t11 y el t10, c12. Están presentes de manera natural en la leche y en la carne de rumiantes, y se pueden producir industrialmente por hidrogenación parcial del ácido linoleico (LA). El promedio diario de ingesta de CLA a partir de estas fuentes se estima de 0.19-1.5 g/día. Sus efectos fisiológicos se observaron al ser administrados mezclas de estos dos isómeros a animales, viéndose que eran capaces de modular la respuesta inmunitaria o de alterar otros parámetros como la concentración del factor de crecimiento parecido a la insulina en

tejido óseo, lo que llevaba a un incremento en la formación de hueso y masa muscular y a un descenso de grasa subcutánea, existiendo incluso un producto comercial que lo contiene, Tonalin, para el tratamiento de la obesidad. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos eran eficaces contra el cáncer, la aterosclerosis o diabetes (O'Shea M y col, 2004).

CLA, a pesar de ser un PUFA n-6, parece alterar la producción de citocinas y eicosanoides de la misma manera que lo hacen los PUFA n-3. Incluso, la administración de CLA en la dieta, lleva a un aumento de ácidos n-3 en las membranas celulares. CLA regula el balance entre las respuestas Th1 y Th2; disminuye las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias, reduce los valores de PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub>, aumenta la IL-10, incrementa IgA, IgG e IgM al tiempo que disminuye IgE, hechos que hacen pensar que podría ser beneficioso para desórdenes alérgicos, inflamatorios e infecciosos. Se ha testado su poder como antialérgico a nivel tópico o como adyuvante de vacunas, viéndose que funciona. Es además importante su acción como agente inmunoterapéutico para contrarrestar efectos perjudiciales de una respuesta inmunitaria deprimida, consecuencia del estrés, del ejercicio o de la edad (O'Shea M y col, 2004).

Aunque no se conoce demasiado acerca de sus mecanismos de acción, parece que la actuación sobre la vía de los eicosanoides (Pariza MW y col, 2000) y de los receptores PPAR (Moya-Camarena SM y col, 1999), son los responsables de sus efectos.

#### **4.3.4.2. Efectos de los ácidos grasos poliinsaturados n-3.**

En general, el efecto anti-inflamatorio de los PUFA n-3 está ampliamente demostrado. La cantidad de ácidos grasos n-3 incorporados en las membranas necesaria para obtener efectos beneficiosos depende de la ingesta de otros ácidos grasos. Las cantidades de LA ingeridas parecen estar estrechamente relacionadas con el metabolismo de ALA para la formación de EPA y DHA (Simopoulos AP, 1999).

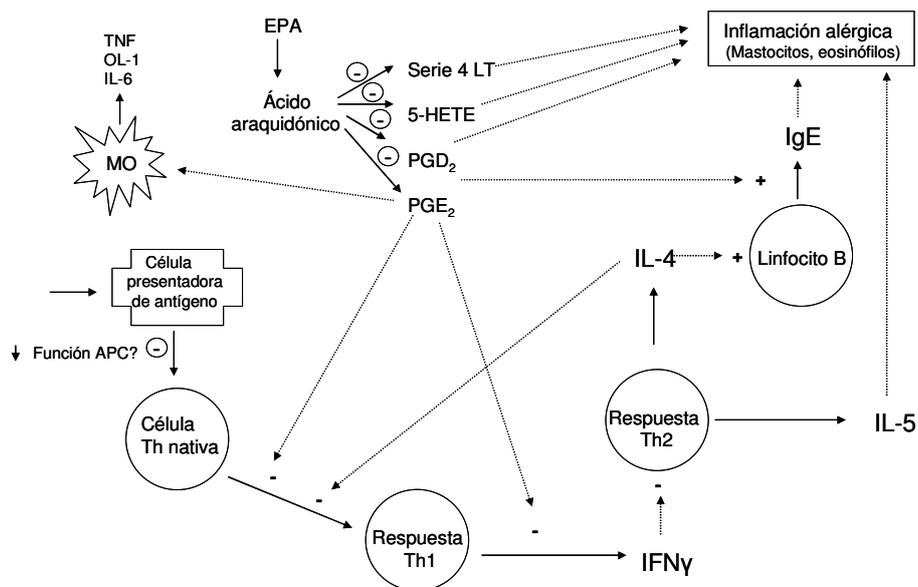
Las acciones ejercidas por los ácidos grasos n-3 abarcan diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria, entre los que se destacan los siguientes:

*Influencia en la proliferación.* Se ha demostrado que las dietas ricas en aceite de pescado inhiben la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos (Calder PC y col, 2002). También son capaces de reducir la proliferación de leucocitos en sangre periférica (Calder PC, 1998).

*Influencia en la producción de citocinas y otros mediadores.* Los PUFA n-3 poseen poder inmunosupresor al inhibir la expresión de CD25 (receptor de IL-2), CD2,

ICAM-1, VCAM-1, selectina E, MHC II o LFA-1 (Calder PC, 1998; Calder PC, 2005). Reducen la producción de IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 o IFN $\gamma$  por parte de distintos tipos celulares (Calder PC, 1998; de Pablo MA, 2002; Prescott SL y col, 2004). También son capaces de inhibir y de suprimir la expresión de COX-2 (Prescott SL y col, 2004).

*Efectos anti-alérgicos.* La PGE<sub>2</sub> promueve el desplazamiento hacia una respuesta Th2 e incrementa la producción de IL-4 e IL-6, al tiempo que inhibe la respuesta Th1. También facilita el intercambio de cadena de Ig hacia IgE al actuar sobre las células B. Esta cascada de acontecimientos es frenada o reducida cuando se disminuye el contenido celular de ácido araquidónico, hecho que se consigue incrementando la ingesta de PUFA n-3, que compiten con ARA o que inhiben su metabolismo al suprimir y disminuir la expresión de la COX-2 (Prescott LS y col, 2004). En la Figura 4.6 se describe el efecto inmunomodulador de los PUFA n-3, utilizando una inflamación alérgica como modelo.

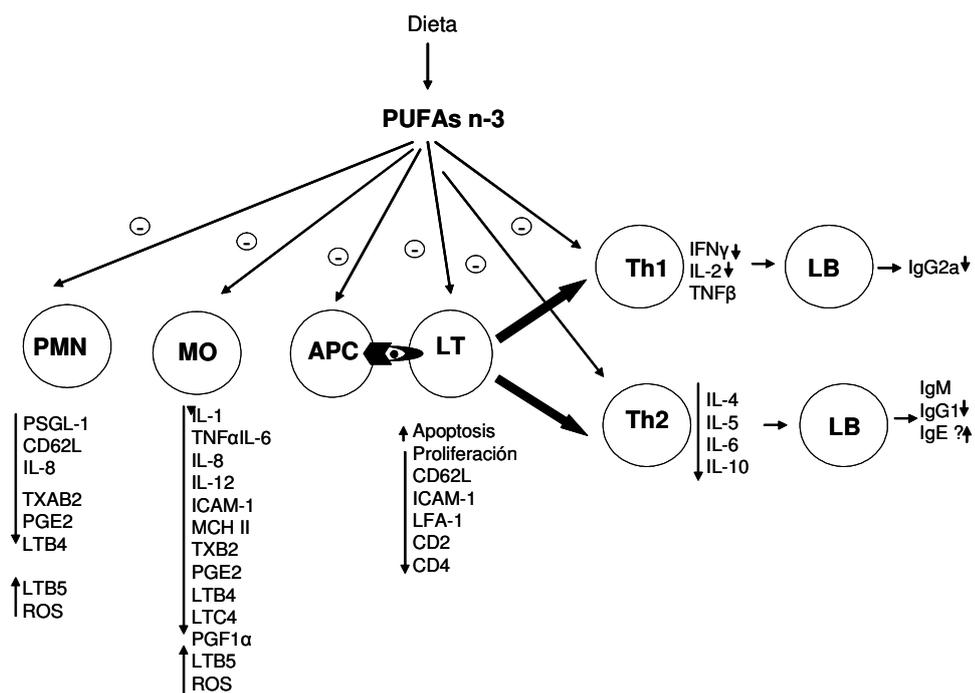


**Figura 4.6.** Efecto inmunomodulador de los PUFA n-3. Papel de PGE<sub>2</sub>. Con el símbolo ⊖ se indican los pasos que se bloquean al sustituir ARA por EPA en las membranas. → significa produce y .....→ significa regula. Adaptación de Calder PC y col, 2002.

*Influencia en la actividad de células NK.* Los PUFA n-3 inhiben la actividad de las células NK tanto en animales como humanos. Parece ser que este efecto es mediado por la regulación que ejercen estos ácidos grasos sobre la producción de eicosanoides (Yaqoob P y col, 1994).

*Influencia en la actividad fagocítica y en la respuesta inflamatoria.* Se ha comprobado que dietas enriquecidas en aceite de pescado administradas durante periodos continuados de tiempo, son capaces de disminuir la quimiotaxis (Schmidt EB y col, 1996) e incluso se ha llegado a apreciar una reducción en la fagocitosis (Eicher SD y col, 1995), aunque este hecho no se ha comprobado en humanos (de Pablo MA y col, 2000).

En la Figura 4.7 se interrelacionan los diversos efectos inmunitarios ejercidos por los PUFA n-3, apreciándose la amplitud de aspectos que abarca.



**Figura 4.7.** Funciones inmunitarias de los PUFA n-3. Efectos de los PUFA n-3 de la dieta sobre las células inmunitarias propuestos por Harbige LS, 2003. LB, linfocito B; LT, linfocito T, MO, macrófago; PMN, polimorfonucleares.

#### Diferencias entre EPA y DHA

Existe poca información acerca de qué ácido graso n-3, EPA o DHA, es responsable de los efectos inmunológicos atribuidos al aceite de pescado. Tampoco se sabe mucho acerca de las diferencias existentes en sus mecanismos de actuación, potencia o eficacia.

Numerosas investigaciones están tratando de solventar estas incógnitas con el fin de determinar el ratio EPA:DHA necesario para obtener el máximo beneficio del consumo de estos compuestos. Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso.

Puesto que es el EPA el sustrato de la COX y 5-LOX, el DHA deberá actuar por mecanismos diferentes a los derivados de la producción de eicosanoides. Así, la actuación a nivel genético se convierte en uno de los principales candidatos. De hecho, estudios de expresión génica por tecnología de *microarrays* han demostrado que la modulación de la expresión génica llevada a cabo por EPA o DHA, es muy diferente (Verlengia R y col, 2004). Probablemente este hecho sea responsable en la diferencia de efectos encontrados para uno y otro ácido graso. De este modo, analizando parámetros independientes de la respuesta inmunitaria, siempre apreciaremos diferencias, como se observa en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Diferencias entre las funciones ejercidas por EPA y DHA.

Estudios comparando EPA y DHA		
<b>EPA</b>	EPA capaz de actuar sobre la producción de IL-10 y la actividad de células NK Mayor efecto antialérgico de EPA: producción menor de IgE, histamina y LTB4 ( $< n^{\circ}$ insaturaciones = $<$ capacidad de producción de IgE) EPA y no DHA aumenta la concentración de glucosa en ayunas EPA y no DHA efectivo en la supresión de la inflamación en modelos de artritis reumatoide	Peterson y col, 1998 Hung P y col, 1999 Hung P y col, 1997 Mori TA y col, 2000 Volker DH y col, 2000
<b>DHA</b>	Efecto antiinflamatorio del DHA y no del EPA en modelos de dermatitis de contacto Más eficaz DHA que EPA en modelos de ECV (supresión de arritmias, retrasar desarrollo hipertensión) DHA mayor capacidad para inhibir proliferación linfocitaria ( $> n^{\circ}$ insaturaciones= $<$ efecto sobre proliferación) DHA y no EPA disminuye presión sanguínea y ritmo cardiaco en pacientes hipercolesterolémico y con sobrepeso	Tomobe YI y col, 2000 McLennan PL y col, 1996 Verlengia R y col, 2004 Pompéia C y col, 2000 Mori TA y col, 1999

EPA y DHA no siempre realizan funciones semejantes. En la tabla se muestran ejemplos de diversos estudios donde se administra EPA o DHA de manera independiente para determinar sus efectos sobre el sistema inmunitario y cardiovascular (ECV, Enfermedad cardiovascular)

#### 4.3.4.3. Importancia de los PUFA en el sistema nervioso

DHA y ARA son los principales componentes de la corteza cerebral y del sistema visual, lugares donde juegan papeles fundamentales para el correcto desarrollo neuronal (Diau GY y col, 2005). Entre sus funciones destacan la modulación de las propiedades biofísicas de la membrana, la liberación de neurotransmisores, síntesis de derivados biológicamente activos o transcripción de genes en respuesta a ácidos grasos o a sus derivados (Alessandri JM y col, 2004). En consecuencia, cantidades adecuadas de los mismos son requeridas para el crecimiento y desarrollo funcional del cerebro y retina de acuerdo con la ISSFAL (Deyberg J y col, 1995). Por tanto, desde el inicio del desarrollo

hasta el envejecimiento, el tejido nervioso debe presentar contenidos adecuados de estos ácidos grasos a fin de asegurar su buen funcionamiento.

Tanto la integridad como la función neuronal pueden afectarse por los déficit de ácidos grasos esenciales n-6 y n-3 durante el desarrollo fetal y neonatal (Horrocks LA y Yeo IK, 1999). Durante el embarazo, el feto recibe DHA y ARA por medio de la placenta. Las conversiones en el cerebro del feto de LA y ALA a ARA y DHA respectivamente son muy limitadas, y la síntesis hepática de los mismos también es escasa, por lo que la madre debería tener una dieta rica en DHA y ARA para así poder transmitirlos de manera directa a sus hijos. Una vez nacidos, los neonatos reciben DHA y ARA a través de la leche materna, cuya composición también dependerá de la dieta. El contenido de DHA en la leche humana es de 30 mg por cada 100 g, mientras que en la leche de otros mamíferos es prácticamente inexistente. Ello sugiere la importancia que para el ser humano tiene. Los niveles de DHA y ARA en la leche no aumentan con la ingesta de LA y ALA, por lo que de nuevo observamos la necesidad de enriquecer las dietas de las madres con estos ácidos grasos directamente (Ratnayake WMN y col, 1997). Especial atención debe prestarse a niños prematuros, donde existen deficiencia de estos ácidos grasos, por lo que se recomiendan fórmulas infantiles enriquecidas en DHA y ARA para prevenir estas deficiencias (Boehm G y col, 1996).

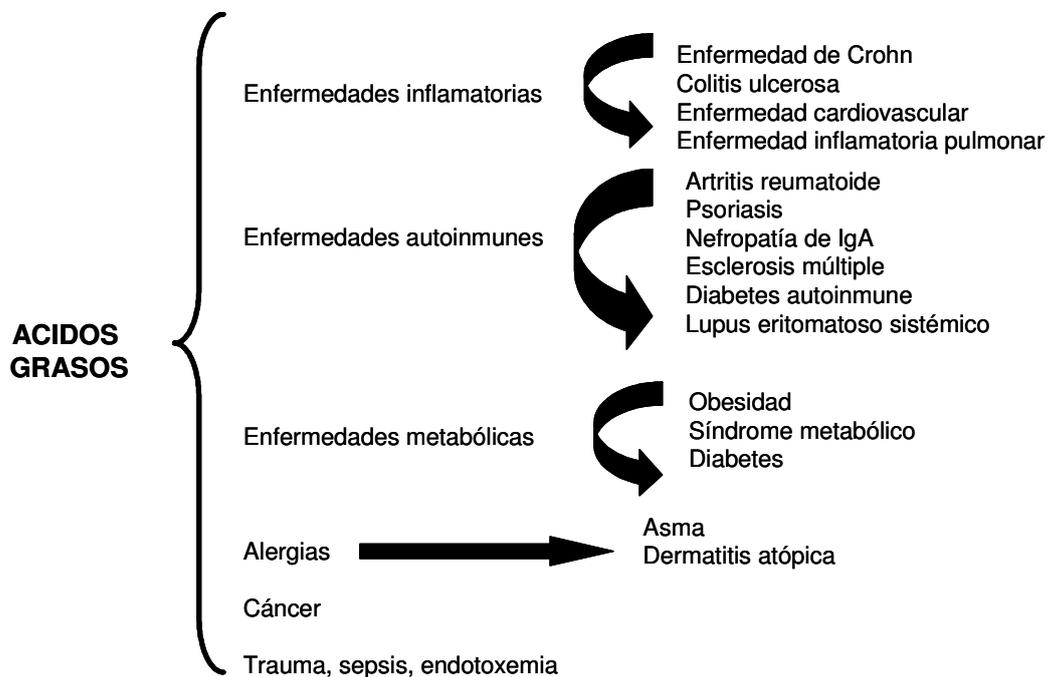
Durante la edad adulta, también se ha confirmado la importancia del consumo de ARA y DHA para el sistema nervioso. Sociedades donde el consumo de pescado es alto, y por tanto el consumo de DHA, los índices de depresión mayor son significativamente menores a los de otras sociedades (Hibbeln JR y col, 1998). Bajos niveles de DHA están relacionados con mayor incidencia de demencia senil y esquizofrenia; la depresión post-parto se ha relacionado con la depleción de DHA de la madre durante el embarazo; el consumo crónico de alcohol lleva a una pérdida de DHA que parece ser la responsable de las frecuentes depresiones secundarias manifestadas en alcohólicos (Hibbeln JR y col, 1995). Todas estas evidencias epidemiológicas confirman la necesidad de incluir DHA y ARA en las dietas en las proporciones adecuadas con el objetivo de mejorar la calidad de vida del individuo.

#### **4.4. Efectos de los ácidos grasos sobre enfermedades**

Debido a la capacidad inmunomoduladora de los ácidos grasos, estos podrían ser aplicados en clínica para mejorar el curso de numerosas enfermedades donde la respuesta inmunitaria está afectada. Así, en casos donde exista inmunosupresión se aplicarían

aquellos ácidos grasos capaces de estimular al sistema inmunitario; por el contrario, en enfermedades que cursen con inflamación o en procesos autoinmunes, se aplicarían ácidos grasos con efecto inmunosupresivo y antiinflamatorio, lo que contribuiría a una mejora de la patología. Puesto que los ácidos grasos están además implicados en la regulación del metabolismo, su inclusión en la dieta podría ayudar a paliar determinados desequilibrios que caracterizan a algunas enfermedades metabólicas. Los ácidos grasos no son medicamentos, por lo que no se plantea la sustitución de los mismos; hablamos de que estos nutrientes poseen propiedades que los convierten en coadyuvantes de los medicamentos, pudiendo disminuirse las dosis de los mismos y evitar así muchos de los efectos adversos que su administración conlleva. Además, su uso como preventivos podría evitar en muchos casos la instauración de enfermedades.

A continuación se describen varias enfermedades donde los ácidos grasos, especialmente los n-3, están siendo aplicados con éxito. Los efectos observados dependen de las dosis, el tiempo de administración, la gravedad de la enfermedad o las características del sujeto entre otros factores, por lo que a menudo aparecen resultados contradictorios. La figura 4.8 resume estos desórdenes.



**Figura 4.8.** Enfermedades en las que pueden intervenir los ácidos grasos

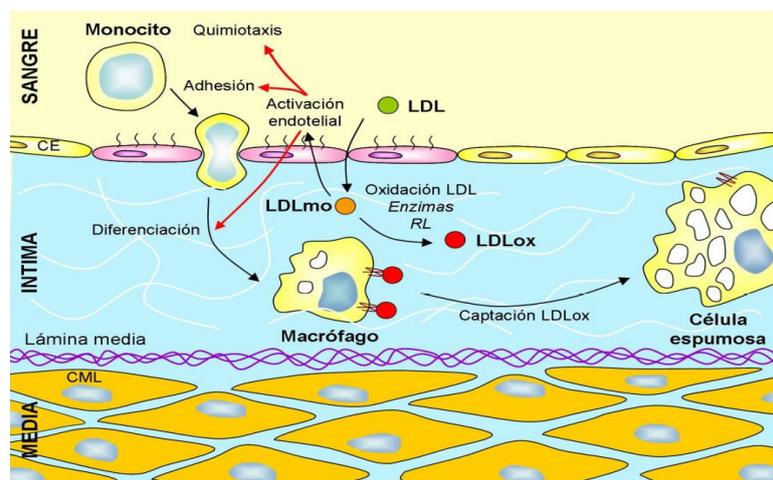
- **Enfermedad inflamatoria intestinal.** La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se manifiesta de dos formas diferentes: como enfermedad de Crohn o como colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn es una inflamación crónica de segmentos del tracto gastrointestinal que suceden de manera discontinua; la colitis ulcerosa es una enfermedad crónica recurrente que afecta a la mucosa del colon y recto. Ambas se caracterizan por existir valores elevados de LTB<sub>4</sub> e IL-1 $\beta$  en la zona dañada.

Hay algunas evidencias que indican que la ingesta de ácidos grasos n-3 podría tener efectos beneficiosos sobre procesos de IBD (Belluzi A y col, 2000). Sin embargo, y a pesar de los resultados esperanzadores en modelos animales, en humanos no se dispone de resultados tan claros (Teitelbaum JE y col, 2001). Se han realizado estudios clínicos donde se ha observado en algunos casos una mejora de la sintomatología y de la histología de la mucosa intestinal así como una disminución de LTB<sub>4</sub> (Stenson WF y col, 1992) o de la recurrencia (Belluzi a y col, 1996). También se han publicado datos sobre los efectos anti-inflamatorios de los MUFA a este nivel (Gonzalez-Huiz F y col, 1993) o de la acción dañina que puede ejercer el ácido linoleico sobre las células intestinales (Yoshida H y col, 2001).

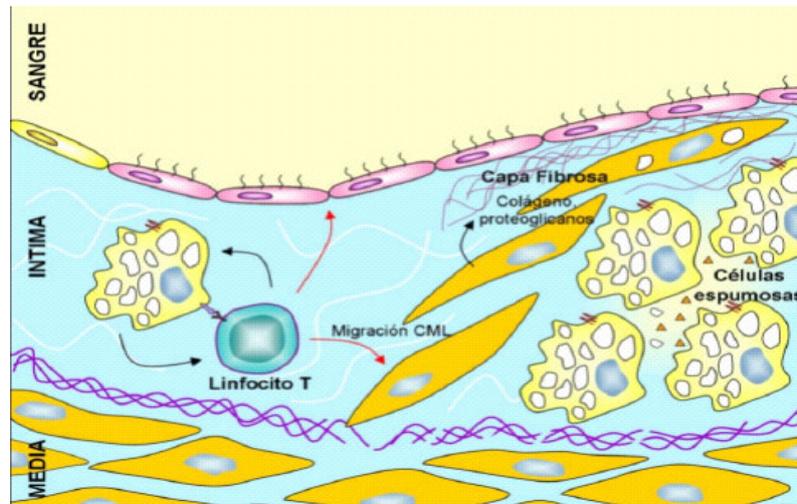
- **Enfermedad inflamatoria pulmonar.** El síndrome de estrés respiratorio en adultos es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en pacientes en cuidados intensivos, y se caracteriza por la infiltración de neutrófilos activados en los pulmones. Los ácidos grasos de la dieta, que posteriormente pasan al plasma, son capaces de cambiar la composición del surfactante pulmonar y así poder modular la función respiratoria (Wolfe RR y col, 2002). Diferentes estudios demostraron que los ácidos grasos n-3 eran capaces de mejorar la micropermeabilidad vascular en los pulmones así como la oxigenación y la función cardiopulmonar en pacientes que padecían este síndrome (Gadek JE y col, 1999). Sin embargo, no se ha llegado a un consenso e incluso hay autores que citan el efecto negativo de los PUFA n-6 y n-3 a este nivel (Wolfe RR y col, 2002).
- **Enfermedad cardiovascular.** Constituye la principal causa de mortalidad en Europa, Estados Unidos y la mayor parte de Asia. Se inicia con el proceso inflamatorio de la aterosclerosis, que suele complicarse y derivar en diferentes

patologías según la arteria donde se desarrolle. Se trata de enfermedades de un marcado componente genético y afectadas por múltiples factores ambientales, entre los que destaca la dieta. Durante los fenómenos que tienen lugar existe un marcado estado inflamatorio, aunque no está claro si es causa o consecuencia del proceso (Chait A y col, 2005). Numerosos estudios epidemiológicos y clínicos indican cómo el consumo de ácidos grasos saturados favorece la formación de la placa de ateroma mientras que los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente los n-3, favorecen la salud cardiovascular. Se ha visto como el incremento en la ingesta de PUFA n-3 reduce la mortalidad en enfermedad coronaria, el riesgo de padecer un ataque al corazón, la progresión de la aterosclerosis, o como incluso pueden reducir los niveles de factores de riesgo, como los triglicéridos postprandiales (López-Huertas E y col, 2003); se ha visto también que disminuyen la presión arterial, la trombosis y aumentan la tasa cardiaca. El ácido oleico también ha demostrado ser bastante eficaz a este respecto por sus propiedades inmunosupresivas. De hecho, la administración conjunta de ácidos grasos n-3 y ácido oleico ha resultado muy beneficiosa en pacientes con hiperlipidemia, donde se ha observado reducción del colesterol total, de los triglicéridos, de las LDL, de la homocisteína y de la expresión de VCAM-1 (Carrero JJ y col, 2004).

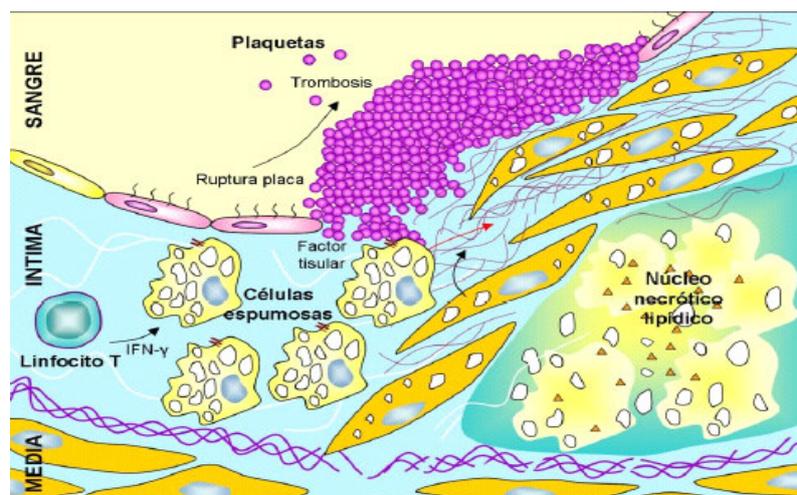
Los efectos de los ácidos grasos n-3 derivan de su capacidad de actuar como anti-inflamatorios como se muestra en las Figuras 9A 9B y 9C:



**Figura 4.9.A.** Inicio de la formación de la estría grasa: a) aumento de la entrada de monocitos, aumento de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM, P-selectina, fibronectina), aumento en la producción de factores quimiotácticos (MCP-1), y aumento de factores de diferenciación de monocitos (M-CSF, IL-8, GM-CSF); b) formación de células espumosas, alteración de lipoproteínas, captación de lipoproteínas modificadas por receptores "scavenger" de macrófagos, acumulación de colesterol en los macrófagos. RL: radicales libres.



**Figura 4.9.B.** Formación de la placa fibrosa: aumento de la proliferación y quimiotaxis de CML, rotura de la membrana basal por metaloproteininas, aumento de síntesis de proteínas de la matriz por CML, muerte de células espumosas por necrosis, apoptosis, y formación de núcleo necrótico. CML: células del músculo liso.



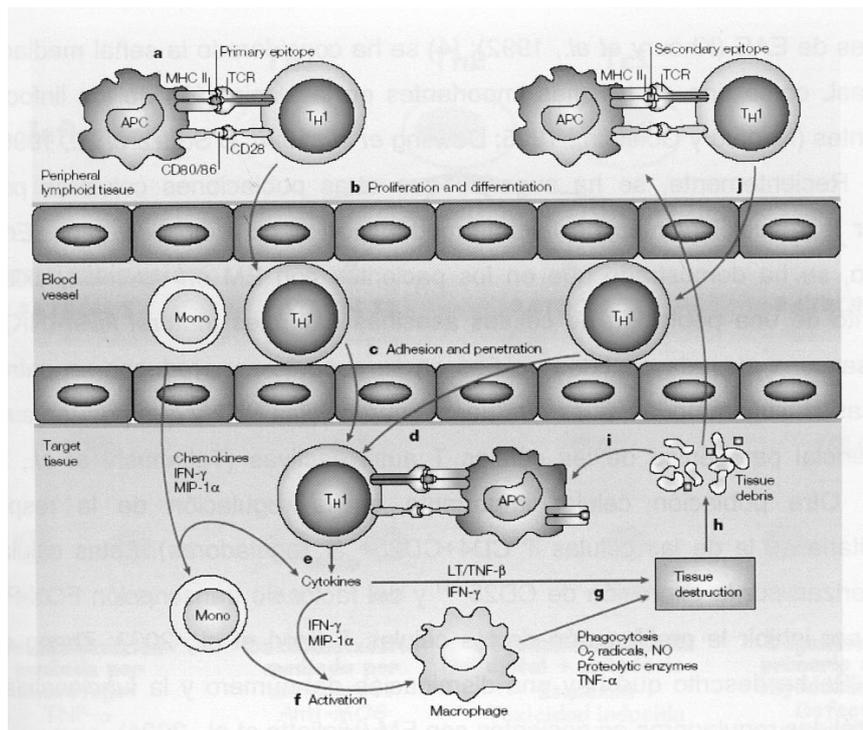
**Figura 4.9.C.** Lesiones avanzadas y trombosis: aumento de las señales pro-trombóticas de las células endoteliales, aumento de la expresión de moléculas pro-trombóticas por parte de macrófagos y CML, reducción de la luz arterial, placa inestable, ruptura del trombo, isquemia y ruptura del vaso sanguíneo. Adaptación de Grundy SM, 1997.

Los PUFA n-3 son capaces de interrumpir gran parte de los acontecimientos que tienen lugar durante la formación de la placa de ateroma, como por ejemplo disminuir la infiltración de macrófagos en la pared del vaso, la producción de moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión,

eicosanoides y citocinas inflamatorias; por este motivo su inclusión en la dieta supone un mecanismo preventivo frente a las patologías cardiovasculares.

- **Artritis reumatoide.** Se trata de una enfermedad inflamatoria, crónica y sistémica, producida por la liberación en el líquido sinovial de mediadores inflamatorios, que van dañando progresivamente las articulaciones hasta la destrucción del cartílago. Hasta la fecha se han realizado al menos 15 estudios clínicos y 2 meta-análisis que consiguen resultados positivos con pacientes de artritis reumatoide al ser tratados con aceite de pescado (Robert Ob, 2005). Tanto DHA y EPA como el ácido  $\alpha$ -linolénico parecen ser efectivos (Yaqoob P, 2003). En general se ha observado una modesta mejora del individuo y una reducción en la dosis de fármacos antiinflamatorios (AINES). Con la administración de estos ácidos grasos n-3, se ha observado una disminución del dolor, de la duración de la rigidez matinal, del número de articulaciones afectadas, en general de la artritis en global (Kremer JM y col, 1995). Algunos estudios apuntaban también la conveniencia de disminuir las dosis de ácidos grasos n-6 (Volver D y col, 2000). Este efecto beneficioso parece ser debido a la capacidad de los ácidos grasos n-3 de disminuir la producción de citocinas inflamatorias; éstas, además de ser dañinas en sí sobre el cartílago, estimulan su propia producción y a las enzimas que degradan dicho tejido (Curtis CL y col, 2000). Posiblemente los estudios con ácidos grasos n-3 y artritis reumatoide son los más esperanzadores de los realizados en el campo de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes.
- **Psoriasis.** Se trata de una enfermedad inflamatoria de la piel caracterizada por brotes frecuentes de erupción que surgen especialmente en situaciones de estrés. Los estudios realizados con PUFA han llevado a resultados conflictivos, pero en algunos casos se ha observado una ligera mejora de la enfermedad con la ingesta de ácidos grasos n-6 y una mejora más significativa con los n-3 (Mayser P y col, 2002). Parece que la eficacia es mayor si la administración es intravenosa que si es oral o tópica. Puesto que el metabolismo del ácido araquidónico se altera durante la enfermedad, también se ha visto que el suministro a pacientes de ácidos grasos n-3, disminuye LTB<sub>4</sub> y 12-HETE, hecho que beneficia al individuo (Simopoulos AP, 2002).

- **Asma.** Se trata de un proceso inflamatorio de origen alérgico en los pulmones que constituye la condición crónica más severa en niños. Los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub> o LTE<sub>4</sub>) son los principales responsables de dicha inflamación, edema, secreción de mucus y de la broncoconstricción, también característicos de este desorden. Las enfermedades de índole alérgica parecen estar especialmente influenciadas por parámetros ambientales, siendo la nutrición uno de los factores que más afecta (Prescott SL y Calder PC, 2004). Se ha postulado que el incremento en la ingesta de ácido linoleico a partir de los 60 fue el responsable de la alta incidencia de la enfermedad en los últimos cuarenta años (Black PN y col, 1997). Como los ácidos grasos n-3 son capaces de antagonizar al ácido araquidónico, se pensó que podrían aplicarse en el tratamiento del asma, de lo cual existen algunas evidencias epidemiológicas (Calder PC y col, 2000). Mientras que en algunos estudios no se observaron efectos, en otros se apreciaron cambios bioquímicos (reducción de leucotrienos) o incluso una mejora en la clínica, con disminución de los síntomas y de las dosis de fármacos (Hodge L y col, 1998). Puesto que se le atribuía cierto papel antialérgico a los PUFA n-3, también fueron estudiados en otras patologías como la dermatitis atópica, encontrándose buenos resultados en múltiples casos (Mayser P y col, 2002). De todas formas, parece que a nivel de este tipo de enfermedades alérgicas, los PUFA n-3 son más eficaces cuando se suministran antes de que haya aparecido el desorden, actuando como preventivos (Mihrahi S y col, 2003).
- **Esclerosis múltiple.** La Esclerosis Múltiple (EM) se define como una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central mediada por clones autorreactivos de células T frente a componentes de la mielina, que actuarían como autoantígenos. Parece que exista relación entre el riesgo asociado a padecer EM y la ingesta elevada de ácidos grasos saturados (Agnello E y col, 2004). En estos pacientes se observan bajos niveles celulares de PUFAs y en modelos animales de encefalitis mieloide experimental (EAE) se ha apreciado una reducción de los síntomas clínicos de la enfermedad al administrarse PUFA n-3, lo que hace pensar en el posible potencial de estos compuestos para la mejora del desorden (Van Meerten ME y col, 2005). De hecho, estudios clínicos con pacientes de EM mejoraron tras recibir suplementos de aceite de pescado (Laeger U, 2000).



**Figura 4.10.** Esquema resumen del proceso patológico que ocurre en la esclerosis múltiple. a) La presentación del epítipo primario tiene lugar en los ganglios linfáticos, b) provocando la activación y diferenciación de las células autorreactivas. c) Los linfocitos T activados migran al SNC, d) donde vuelven a reconocer a un antígeno que les será presentado por las APC. e) Tras la reestimulación, los linfocitos T autorreactivos producen una serie de citocinas y quimiocinas f) que median el reclutamiento de fagocitos de sangre periférica que se activarán al igual que las APC residentes. g) Las células activadas inician la destrucción del tejido h) mediante mecanismos fagocíticos, producción de  $TNF\alpha$ , enzimas proteolíticas, óxido nítrico y radicales de oxígeno. i) Los restos titulares son procesados y presentados por las APC, j) provocando la activación y diferenciación de una segunda remesa de linfocitos T que iniciarán una nueva respuesta inmunitaria (Tomado de Vanderlugt CL y Millar SE, 2002).

- **Endotoxemia, sepsis y trauma.** El trauma suele evolucionar hacia sepsis, respuesta hiperinflamatoria caracterizada por el aumento de  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $IL-8$ . También se incrementan los eicosanoides derivados del ácido araquidónico en trauma y quemaduras. Numerosos estudios en animales donde se indujo sepsis muestran cómo la administración de ácido araquidónico incrementa la mortalidad (Cook JA y col, 1981), y cómo una alimentación rica en aceite de pescado aumentaba la supervivencia, disminuía los niveles de mediadores proinflamatorios y sugería tener un efecto letal sobre las bacterias patógenas (Sadeghi S y col; 1999; Pscheidl E y col, 2000). Estos descubrimientos instigaron las investigaciones clínicas administrando los PUFA n-3 via parenteral o enteral a pacientes en cuidados intensivos o sometidos a intervención quirúrgica. La mayoría de ellos

parecían eficaces, observándose cómo disminuía el número de infecciones y la severidad de las mismas, la necesidad de ventilación asistida, el tiempo en cuidados intensivos, el número de días en el hospital (Beale RJ y col, 1999) así como se reducían los niveles circulatorios de citocinas proinflamatorias (Wu GH y col, 2001). Sin embargo, en este tipo de estudios no queda claro si el efecto es debido a algún otro ingrediente de las fórmulas administradas o a la combinación de los mismos. Además, algunos grupos de investigación señalan el peligro que conlleva la administración de estos ácidos grasos n-3 por su poder inmunosupresor, que podría dejar al organismo desprotegido en caso de infección (Puertollano MA y col, 2004).

- **Cáncer.** A pesar del efecto inmunosupresivo observado para los PUFA n-3, se ha visto que en animales protege frente a distintos tipos de cáncer, caquexia, angiogénesis y metástasis (Cave WT, 1991). En humanos se ha comprobado que son capaces de aumentar la eficacia de la quimio y la radioterapia, sugiriéndose incluso que podrían servir como única alternativa para pacientes que no soportasen las terapias tóxicas standard (Hardman WE, 2004). Son numerosos los mecanismos que están involucrados en este efecto anticancerígeno, y son el conjunto de ellos lo que contribuye a la supresión del tumor. Entre los mecanismos de acción destacan el efecto apoptótico, la supresión de oncogenes como ras y AP-1 y la reducción en las células de los derivados del ARA, productos capaces de estimular el crecimiento celular (Hardman WE, 2004).
- **Transplante de tejidos.** El proceso de rechazo de transplantes se caracteriza por la acumulación de células T y mononucleares en el injerto. Parece que la administración de PUFA n-3 disminuye la infiltración de dichas células y la producción de citocinas inflamatorias por las mismas, sustancias que complican el proceso. LTB<sub>5</sub> resulta mucho menos quimiotáctico que LTB<sub>4</sub>, y TXA<sub>3</sub>, es más leve como vasoconstrictor y proagregantes, lo que permite que el injerto evolucione favorablemente (Grima H y col, 2002). Sin embargo, los estudios en clínica son contradictorios, y aunque en algunos se observa la disminución en los episodios de rechazo, la mejora en las medidas de la función del órgano en cuestión (Heide JJ y col, 1993) o la disminución de citocinas proinflamatorias, los más recientes no aprecian diferencias tan evidentes (Hernandez D y col, 2002).

Como se ha podido observar, los estudios en humanos para establecer la relación entre los ácidos grasos y la respuesta inmunitaria no son siempre plenamente consistentes. Probablemente, los diversos mecanismos en los que los ácidos grasos participan así como los genotipos de los individuos involucrados en los estudios, sean en parte responsables de la diferencia en los resultados obtenidos. Aunque se han hecho muchos avances sobre los papeles de los ácidos grasos a nivel molecular y celular, todavía es necesaria mucha investigación para concretar su verdadero papel sobre la salud humana y la mejor forma de obtener el máximo partido de ellos.

## **Objetivos**

---



El papel de la grasa ha sido extensamente estudiado por sus repercusiones sobre la salud, sobre todo en lo que se refiere a la calidad de la misma y de manera más exhaustiva desde la aparición de la dieta mediterránea. Normalmente, el objetivo de estos estudios ha sido tratar de evaluar los efectos de la grasa dietética, con el fin de asegurar un correcto estado de salud y prevenir y mejorar diversas patologías, principalmente enfermedades cardiovasculares. En la última década se ha sido consciente del importante papel del sistema inmunitario en estas enfermedades, de modo que se ha empezado a estudiar el efecto de la grasa sobre el mismo. Los avances han sido espectaculares, de modo que existen multitud de trabajos que versan sobre el impacto de las grasas sobre el sistema inmunitario, especialmente del papel de los ácidos grasos n-3.

El objetivo principal de este trabajo es ofrecer una visión global e integrada del efecto de los diversos tipos de grasa a nivel inmunitario, así como de sus componentes de manera independiente, con el propósito de demostrar como el intercambio de un tipo de grasa por otro en la dieta, podría beneficiar a un individuo en concreto y según sus circunstancias.

Con este fin, los objetivos planificados para la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Determinación y comparación de los efectos inmunitarios de dietas con elevado contenido de ácidos grasos n-9, n-6 o n-3:
  - 1.1. Análisis de parámetros inmunitarios generales en animales sanos tras la administración de las diferentes dietas.
  - 1.2. Análisis de la evolución de diversas enfermedades de índole inflamatoria, autoinmune, metabólica o alérgica, tras la administración de las diferentes dietas.
  - 1.3. Análisis y comparación de las funciones inmunitarias de los principales PUFA n-3, EPA y DHA.
  - 1.4. Estudio de la incorporación de los ácidos grasos de la dieta en los tejidos. Análisis de los procesos de interconversión de los ácidos grasos, en especial EPA y DHA, en el organismo murino.
  - 1.5. Determinación de la importancia de la estructura de los triglicéridos de la dieta para la respuesta inmunitaria.
2. Evaluación del papel de la fracción insaponificable de los aceites sobre la respuesta inmunitaria.



## **Material y Métodos**

---



## 5. Animales de experimentación y elaboración de dietas

Los animales utilizados en los diferentes estudios fueron proporcionados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada. En todos los casos se siguieron las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el protocolo de Helsinki. Los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

En todos los estudios, los animales fueron mantenidos en un ambiente de temperatura y luz controladas (ciclo 12 horas de luz/oscuridad a 22 °C), con acceso libre a agua y comida.

La duración de los estudios fue variable, concluyendo en todos los casos con el sacrificio de los roedores con pentotal sódico (50mg/Kg de peso corporal), por medio de inyección intraperitoneal. Concluido el experimento se llevaron a cabo diversas medidas de parámetros biológicos. La mayoría de reactivos utilizados descritos en el presente trabajo fueron proporcionados por *Sigma Chemical Co.* En el caso de reactivos suministrados por otras casas comerciales, éstas se indican entre paréntesis.

Todas las dietas cumplieron los requisitos establecidos por el Instituto Americano de Nutrición para ratones o bien para ratas (AIN93) (Reeves PG y col, 1995). En todos los casos se emplearon dietas semisintéticas elaboradas en Puleva Biotech. La composición de las mismas fue idéntica, con excepción de la fuente de grasa incorporada, componente de la dieta normalmente objeto de estudio. La cantidad de grasa incluida en las dietas fue siempre del 5% del total de la dieta. A continuación se exponen las dietas empleadas y los nombres con los que a ellas nos referimos durante este trabajo. En la Tabla 5.1 se indican los componentes de la dieta base así como las diferentes formas de grasa incorporada.

- Dieta Girasol: Dieta a base de aceite de girasol
- Dieta W3: Dieta a base de aceite de girasol enriquecida con aceite de pescado. El porcentaje de aceite de pescado incluido depende del modelo. En función del control que se utilice, con esta denominación también se puede encontrar una dieta que en vez de aceite de girasol contenga Girasol alto oleico como base.
- Dieta GAO: Dieta a base de aceite de girasol alto oleico
- Dieta OO: Dieta a base de aceite de oliva virgen
- Dieta AS: Dieta a base de aceite de soja
- Dieta RBO: Dieta a base de aceite de arroz
- Dieta RBO refinado: Dieta a base de aceite de arroz refinado
- Dieta  $\gamma$ -orizanol: Dieta a base de aceite girasol alto oleico con 0.1 % de  $\gamma$ -orizanol

- Dieta FOO: Dieta a base de aceite de oliva virgen (95%) enriquecido en aceite de pescado (5%).
- Dieta mantequilla: La grasa fue incorporada en forma de mantequilla
- Dieta mantequilla-W3: Dieta a base de mantequilla (85% del total de la grasa) y enriquecida con aceite de pescado (15% del total de la grasa).
- Dieta DHA: Dieta a base de aceite de girasol (85% del total de la grasa) y enriquecida en aceite de pescado alto en DHA, EUPOLY-DHA. (15% del total de la grasa)
- Dieta EPA: Dieta a base de aceite de girasol (85% del total de la grasa) y enriquecida en aceite de pescado alto en EPA, EUPOLY-EPA, Puleva Biotech (15% del total de la grasa).
- Dieta SES: Dieta a base de aceite de girasol (88.7%) a la que se incorporó triglicéridos estructurados con EPA en posición 2 y ácido esteárico en las posiciones 1 y 3 (11.3%)
- Dieta SDS: Dieta a base de aceite de girasol (88.7%) a la que se incorporaron triglicéridos estructurados con DHA en posición 2 y ácido esteárico en las posiciones 1 y 3 (11.3%).
- Dieta ESS: Dieta a base de aceite de girasol (88.7%) a la que se incorporaron triglicéridos estructurados con EPA en las posiciones 1 o 3 y con ácido esteárico ocupando el resto de posiciones (11.3%). Todos los triglicéridos estructurales fueron sintetizados por vía química en Puleva Biotech.

	<b>g/kg de dieta</b>
<b>Proteínas y aminoácidos</b>	
Caseína (Arla Foods)	258
L-metionina (Sigma)	3
<b>Lípidos</b>	
Aceite	50
<b>Vitaminas/Minerales</b>	
Mezcla vitaminas/minerales (Panlab)	10
<b>Carbohidratos</b>	
Almidón de maíz (Cerestar)	579
Sacarosa (Azucarera Ebro)	50
Celulosa (Sigma)	50

**Tabla 5.1.** Composición base de las diversas dietas empleadas en los estudios animales.

Las dietas una vez preparadas fueron gaseadas con argón para evitar su oxidación, embasadas y almacenadas a -20 °C hasta su uso. Las dietas fueron suministradas bien en

forma de polvo o en forma de *pellets*. La peletización se llevó a cabo a mano, incorporando al polvo la mitad de agua destilada y eliminándola posteriormente por un proceso de liofilización (Telstar, Lioalfa 20. Programa semiautomático con un primer secado de 12-20h con T<sup>a</sup> de fluido 10 °C y con un segundo secado de 3-5h a igual temperatura y 0.4 mb de vacío).

## **6. Modelos animales y experimentación *in vitro***

A lo largo de este trabajo se describen diferentes modelos animales y ensayos *in vitro* que fueron empleados para determinar los efectos biológicos de diversos tipos de grasa y de sus componentes. A continuación se detallan las características de cada experimento llevado a cabo.

### **6.1. Modelo animales**

Los estudios iniciales se realizaron en animales sanos a los que se administraron determinadas dietas con el fin de estudiar los efectos de las mismas a nivel inmunitario, y en ocasiones a nivel metabólico. Posteriormente también se evaluaron diversos modelos de patologías. A continuación se describen dichos modelos en el mismo orden de aparición que en el capítulo de Resultados.

**6.1.1. Efectos inmunitarios derivados de la incorporación de ácido oleico a la grasa de la dieta en roedores sanos:** Ratones Balb/c machos adultos (20-25g) (n=10/grupo) fueron alimentados *ad libitum* durante un mes con una dieta a base de aceite de girasol (Dieta Girasol) o bien a base de aceite girasol alto oleico (Dieta GAO). Tras el sacrificio se analizaron la proliferación de linfocitos y macrófagos. Se estudió la producción de citocinas por estas células así como los niveles de Igs en plasma por técnicas de ELISA. Se llevó a cabo el análisis del perfil lipídico de las dietas.

**6.1.2. Efectos inmunitarios de la fracción insaponificable del aceite de oliva (hidroxitirosol:** Por procesos de extracción complejos llevados a cabo en Puleva Biotech, se obtuvo del alpeorajo, uno de los componentes mayoritarios de la fracción insaponificable del aceite de oliva, el hidroxitirosol (HT). Se trató hasta obtener una pureza de al menos el 95%. El experimento se dividió en dos grupos de ratones Balb/c machos y adultos (n =10/grupo) que fueron sondados diariamente durante un mes, bien con HT

(0.5g/kg de ratón) disuelto en agua o bien con dicho vehículo únicamente. En este tiempo a los animales se les proporcionó dieta chow (Panlab S.L.) *ad libitum*. Tras el sacrificio se llevaron a cabo ensayos de proliferación de linfocitos y macrófagos y se analizaron niveles de citocinas producidas por estas células por medio de técnicas de ELISA.

**6.1.3. Efectos del hidroxitirosol sobre un modelo de esclerosis múltiple:** Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de Neuroinmunología Clínica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, España. Dos grupos de ratones SJL/J Rj hembras de 8-10 semanas de edad fueron obtenidos de Janvier (Le Genest-St Isle, Francia) (n = 12/grupo) alimentados durante 42 días con una dieta a base de aceite de girasol. Los ratones de uno de los grupos recibieron además una dosis de HT diaria de 10 mg/ratón/día. Después de llevar a cabo el sondaje durante 21 días, a nueve ratones de cada grupo, se les indujo la encefalitis autoinmune experimental (EAE) según el protocolo propuesto por Espejo C (Espejo C y col, 2005). Hasta el final del estudio no se conoció a qué tres ratones de cada grupo no se les había inmunizado. Los animales fueron inmunizados con una inyección subcutánea de cloruro sódico al 0.9 % que contenía 50 µg de un péptido, PLP<sub>139-151</sub> que actuaba como antígeno. Este péptido fue administrado junto con el adyuvante de Freund (9:11 v/v), el cual contenía además 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. A los animales que funcionaron como control se les inmunizó de igual modo pero sin incluir el péptido PLP. Los ratones recibieron subcutáneamente 0.05 ml de la emulsión resultante en las cuatro almohadillas plantares. A día 0 y 2 después de la inmunización cada ratón recibió 0.2 ml (2 IU/ml) de *Bordetella pertusis*. Durante 21 días más los animales siguieron recibiendo el HT diariamente por vía oral. En este tiempo se analizó diariamente la variación de peso, la consistencia de las heces, el aspecto de los animales y sobre todo su comportamiento. Se examinaron los síntomas neurológicos y se evaluaron siguiendo el criterio empleado por Brocke (Brocke y col, 1994). En la Tabla 6.1 se presenta el *score* asociado a cada sintomatología.

Transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados y la proliferación linfocitaria analizada.

**Tabla 6.1.** Criterio empleado por Brocke y col. para evaluar el estado neurológico de los animales tras la inmunización.

Score	Sintomatología
0	No existen síntomas clínicos
0,5	Pérdida parcial del tono de la cola durante dos días consecutivos
1	Parálisis de la cola completa
2	Paraparesis de una o dos patas
3	Paraplegia
4	Tetraparesis
5	Tetraplegia
6	Muerte

Se analizaron los datos obtenidos en su conjunto y se crearon ciertos parámetros clínicos que ayudaron a determinar el efecto de las dietas o componentes testados sobre la enfermedad. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

**Incidencia:** Número de ratones con algún síntoma de la enfermedad en cualquier momento del estudio.

**Mortalidad:** Número de ratones fallecidos a consecuencia de la enfermedad

**Inicio:** Día de inicio de la enfermedad desde el momento de la inmunización (media del grupo, solo animales enfermos)

**Cronicidad:** Sumatoria de los *scores* diarios (media del grupo, todos los animales inmunizados, valor 0 para los no enfermos)

**Duración:** Número de días con signos de la enfermedad (media del grupo, solo animales enfermos)

**Gravedad:** *Score* máximo (media del grupo, todos los animales enfermos)

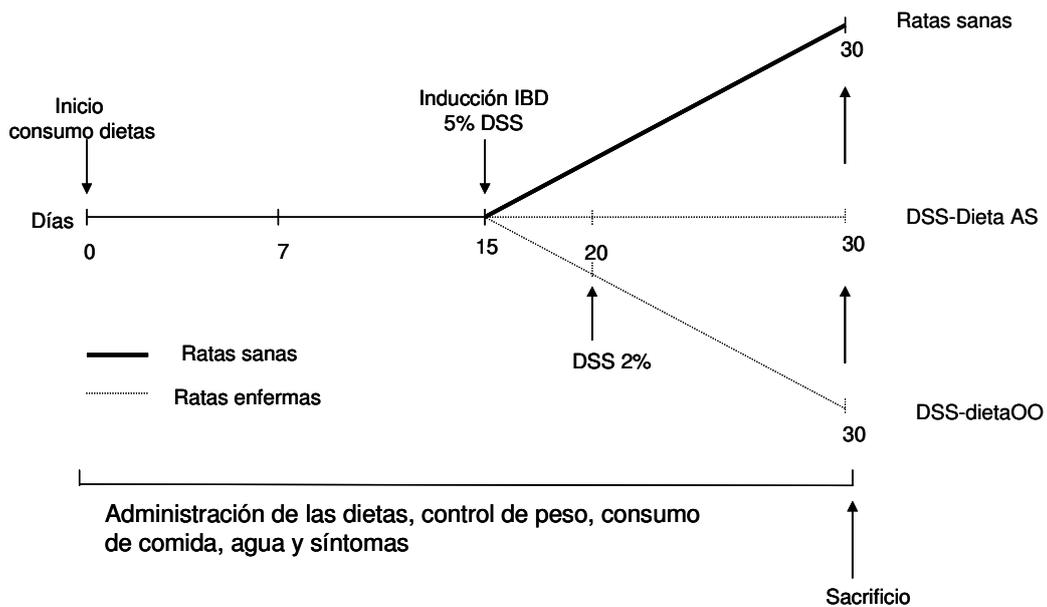
**Morbilidad:** Número de días con pérdida de peso del 10% (Media del grupo, todos los animales enfermos)

**Recuperación:** *Score* residual (media del grupo, todos los animales enfermos)

#### **6.1.4. Efectos beneficiosos del aceite de oliva en un proceso inflamatorio intestinal**

**inducido en ratas:** Este estudio fue llevado a cabo en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, España. Ratas Wistar hembra de 180-200 g fueron divididas en tres grupos (n=10/grupo); uno de ellos constituyó el control sano, recibiendo una dieta a base de aceite de soja (Dieta AS). Los otros dos grupos consumieron durante quince días esta misma dieta AS o bien otra a base de aceite de oliva (Dieta OO). Tras este periodo se indujo un proceso de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (Stucchi AF y col, 2000) en estos dos grupos sustituyendo el agua de bebida por agua destilada con un 5% de sulfato de dextrano sódico (DSS) durante

los siguientes cinco días (cada día se preparaba la disolución y se ponía nueva). Pasado este tiempo, esta solución se reemplazó por agua destilada con un 2% de DSS, preparado que fue administrado durante diez días sucesivos (Figura 6.1). Durante el mes que duró el experimento, los animales de los tres grupos siempre tuvieron su correspondiente dieta disponible y podían ingerirla *ad libitum*. Durante el estudio se estudió el comportamiento, aspecto y peso de los animales.



**Figura 6.1.** Esquema del diseño experimental del estudio de evaluación del aceite de oliva en un modelo animal de IBD por administración de DSS.

Otro parámetro que se observó, es el relacionado con la consistencia de las heces. Por lo general, aproximadamente la mitad de las ratas sufren un reblandecimiento de sus heces desde el momento en que empiezan a beber agua con DSS. En la mayoría de los casos aparece diarrea al cuarto o quinto día. Por último, sobre el día siete y hasta el final del experimento, suele apreciarse sangre en las heces, signo definitivo de la gravedad del proceso. Teniendo en cuenta todos estos parámetros se establece el denominado Índice de Severidad de la Enfermedad (DAI). El establecimiento de este *score* se lleva a cabo en función del criterio propuesto por Cooper (Cooper HS y col, 1993) y viene indicado en la siguiente tabla (Tabla 6.2).

**Tabla 6.2.** Índice de severidad de la enfermedad (DAI), basado en la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia de sangre en heces. Adaptación de Cooper y col.

Score	Pérdida de peso	Consistencia de heces	Sangrado rectal
0	ninguna	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Blandas	
3	10-20%		
4	>20%	Diarrea	Abundante

La asignación del DAI tuvo lugar durante el estudio de manera diaria. A tiempo final las ratas fueron sacrificadas y diferentes muestras fueron recolectadas con el fin de analizar parámetros que fueran útiles para estudiar el curso de la enfermedad. Se analizaron los acidogramas de dieta y tejidos (colon, plasma e hígado). Se determinó el daño estudiando la relación peso/longitud del intestino, actividades enzimáticas como MPO (Mieloperoxidas), niveles de GSH total (Glutation) y mediadores inflamatorios en el foco de la lesión (TNF $\alpha$  y LTB $_4$ ). Se realizaron cortes histológicos del colon.

**6.1.5. Efectos inmunitarios del aceite de salvado de arroz (RBO) en ratones:** Se administró una dieta control a base de aceite de girasol alto oleico (Grupo GAO) frente a una dieta a base de aceite de arroz crudo (Grupo RBO) a dos grupos de ratones machos Balb/c adultos (n = 10/grupo) durante un mes. Tras el sacrificio se midieron diversos parámetros como proliferación linfocitaria, niveles de citocinas y de otros mediadores en plasma y sobrenadantes de bazo y macrófagos. Estos datos se confirmaron por RT-PCR. Se analizó el perfil lipídico de las dietas.

**6.1.6. Efecto inmunitario ejercido por la fracción insaponificable del aceite de salvado de arroz:** Se repitió el estudio anterior añadiendo un grupo más donde la fuente de grasa fue aceite de salvado de arroz refinado (Grupo RBO refinado). De este modo, la única diferencia entre ambas dietas fue la presencia o no de la fracción insaponificable. Se determinaron los mismos parámetros que en el estudio anterior.

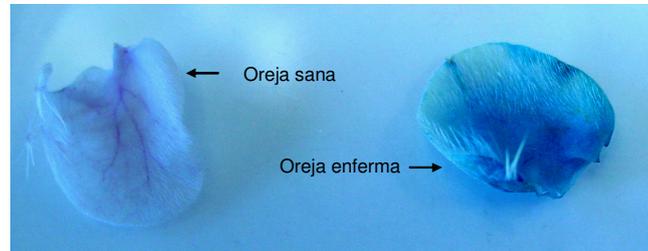
**6.1.7. Efectos inmunitarios del  $\gamma$ -oryzanol incorporado en la dieta de los ratones:** El último experimento de la serie n-6 comparó una dieta control (GAO) con una dieta semejante a la que se añadió 0.1% de  $\gamma$ -oryzanol (Tokio Kasei). De nuevo, los parámetros analizados fueron los mismos.

**6.1.8. Efectos de una dieta enriquecida en aceite de salvado de arroz sobre un modelo de esclerosis múltiple:** Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de Neuroinmunología Clínica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, España. Dos grupos de ratones SJL/J Rj hembras de 8-10 semanas de edad fueron obtenidos de Janvier (Le Genest-St Isle, Francia) (n = 12/grupo) fueron alimentados durante 42 días, uno con una dieta a base de aceite de girasol alto oleico (Grupo GAO), y el otro con una dieta a base de aceite de salvado de arroz. A los 21 días de alimentación de los dos grupos, se indujo la EAE y todo el proceso continuó de igual forma a la que se indica en el apartado 6.1.3 del Material y Métodos.

**6.1.9. Efectos inmunitarios de una dieta enriquecida en aceite de pescado en ratones sanos:** Se tomaron dos grupos de ratones Balb/c (n = 10/grupo) machos al destete (3 semanas de edad) y se alimentaron durante un mes con una dieta a base de aceite de girasol (Grupo girasol) o bien con una dieta idéntica en la que el 15% del aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado (Grupo W3). Tras el sacrificio se analizaron diferentes parámetros como perfil de ácidos grasos de dieta, plasma e hígado, proliferación linfocitaria y de macrófagos, medida de citocinas en plasma, en el sobrenadante de linfocitos y en macrófagos, determinación de inmunoglobulinas e histamina en plasma o análisis de la expresión de citocinas u otros mediadores en células del sistema inmunitario por RT-PCR. Se realizaron medidas de actividad fagocítica de macrófagos y de niveles de malondialdehído (MDA) en plasma.

**6.1.10. Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de dermatitis de contacto en ratones:** Dos grupos de ratones Balb/c machos (n = 10/grupo) al destete fueron alimentados durante dos semanas con una dieta a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) o bien con una dieta idéntica en la que el 15% del aceite de girasol fue sustituida por aceite de pescado (Grupo W3). Doce horas antes del sacrificio se indujo en la oreja izquierda de cada uno de los animales una dermatitis de contacto que cursó con inflamación aguda (Tomobe YI y col, 2000). Para ello, se aplicó en la superficie de la oreja 80 µl de una solución al 0.5% de 1-Fluoro-2, 4-dinitronenceno (DNFB), dosis capaz de generar el citado proceso inflamatorio. El vehículo en el que se disolvió el compuesto estaba constituido por una mezcla de acetona:aceite de oliva 4:1. A las doce horas, los animales fueron sacrificados y las orejas extraídas para el análisis de peso, contenido de agua, actividad MPO y contenido de GSH y citocinas en las mismas. En la Figura 6.2 se presenta el aspecto de la oreja sana con respecto a la dañada tras la inyección

en la cola del reactivo coloreado *evans blue* después de aplicar el DNFB. Cuanto mayor es la inflamación, mayor la intensidad de color adquirida.



**Figura 6.2.** Aspecto de las orejas sana y enferma transcurridas 12 h de la aplicación de DNFB. Tras dicha aplicación se inyectaron 200  $\mu$ l de una solución de *evans blue* (20 g/l) en la cola de todos los ratones, que incluido en el torrente circulatorio alcanza la zona dañada, donde se extravasa (Boza JJ y col, 1994).

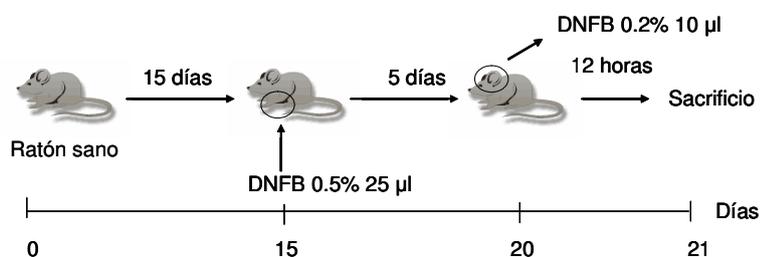
#### **6.1.11. Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo**

**de inflamación intestinal en ratas:** Este estudio se realizó en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, España. El estudio constaba de tres grupos de ratas hembras Wistar de 180-200 g de peso; dos de los grupos recibieron una dieta a base de aceite de oliva (Grupo OO) mientras que el tercer grupo recibió una dieta idéntica en la que el 5% del aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado (Grupo FOO). Uno de los grupos que consumía la dieta OO fue usado como control sano, mientras que en las ratas de los grupos restantes se indujo una inflamación intestinal con DSS, tal y como se explica en el apartado 6.1.4 del Material y Métodos (Stucchi AF y col, 2000). La duración del estudio fue de un mes y tras el sacrificio se analizaron contenido de ácidos grasos en tejidos y dietas, medidas enzimáticas como MPO, determinación de parámetros inmunitarios como la producción de  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{LTB}_4$  en colon entre otros.

#### **6.1.12. Efectos de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de dermatitis**

**alérgica en ratones:** Se tomaron dos grupos de ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ) Balb/c hembras al destete y se les administró a uno de ellos la dieta control a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) y a otro la dieta W3 donde un 15% del aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado (Grupo W3) durante 21 días. Durante este tiempo se indujo una dermatitis alérgica o atópica según el protocolo propuesto por Piltz (Piltz T y col, 2003). Después de quince días de administración de dietas a los roedores, se llevó a cabo una primera

sensibilización en el abdomen de los mismos con 25  $\mu$ l de una solución de DNFB al 0.5% en una mezcla de acetona:aceite de oliva 4:1. A partir de este momento los ratones empiezan a manifestar en el abdomen un fenómeno de hipersensibilidad retardada que se presenta con pérdida de pelo en la zona tratada con DNFB y una úlcera. Transcurridos cinco días desde la sensibilización, se aplicó en la oreja izquierda de cada animal 10 $\mu$ l de una solución de DNFB al 0.2% en el mismo vehículo. Esta dosis no es inflamatoria al administrarse en animales previamente inmunizados. Doce horas después de esta dosis de choque, los animales fueron sacrificados (Figura 6.3). En las orejas se analizó peso, grosor, niveles de MPO, GSH y citocinas. En plasma se determinaron Igs y se evaluó la producción de citocinas por linfocitos de bazo y macrófagos.



**Figura 6.3.** Esquema del modelo de dermatitis alérgica inducida en ratones.

**6.1.13. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de esclerosis múltiple en ratones:** Este estudio se realizó en colaboración con el Departamento de Neuroinmunología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, España. Dos grupos de ratones SJL/J Rj hembras de 8-10 semanas de edad fueron obtenidos de Janvier (Le Genest-St Isle, Francia) (n = 12/grupo) y alimentados durante 42 días con una dieta a base de aceite de girasol alto oleico (Grupo GAO) o bien con una dieta semejante enriquecida en aceite de pescado (15 % del total de la grasa) (Grupo W3). La inducción de la EAE y el posterior análisis de los resultados fueron llevados a cabo del mismo modo que en el apartado 6.1.3 del Material y Métodos (Espejo C y col, 2005).

**6.1.14. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de obesidad inducido por la ingesta de una dieta de cafetería:** Se tomaron 30 ratas Wistar hembra entre 80-100 g de peso y se dividieron en tres grupos (n = 10/grupo). Un grupo control consumió únicamente dieta a base de aceite de girasol (Grupo girasol). Los otros dos

grupos consumieron bien esa misma dieta, o bien una dieta idéntica en la que un 15% del aceite de girasol fue sustituido por en aceite de pescado (Grupo W3). Estos dos grupos consumieron además diariamente una dieta de cafetería dividida a su vez en tres dietas, compuestas por los siguientes ingredientes:

- Dieta A: 8 g/rata de leche condensada (La Lechera, Nestlé) y 8 g/rata de pan de molde (Bimbo).
- Dieta B: 3 g/rata de chocolate con leche (Nestlé), 6 g/rata de galletas (Fontaneda) y 6 g/rata de coco seco (Borges).
- Dieta C: 8 g/rata de queso *gruyere* y 5 g/rata de patatas cocidas.

Cada día se ponía una dieta diferente de manera consecutiva durante los 34 días que duró el experimento en los dos grupos donde lo que se pretendía era alterar parámetros metabólicos, alejando al sujeto de un estado óptimo de salud. Transcurrido el sacrificio, se determinó en plasma niveles de glucosa, triglicéridos, LDL, HDL y colesterol total, se midió GSH y ácidos grasos en hígado y se analizó por RT-PCR la expresión de diversos receptores nucleares en hígado y tejido adiposo.

**6.1.15. Efectos de una dieta enriquecida en ácidos grasos n-3 sobre cambios genéticos ocurridos tras una ingesta rica en grasa saturada:** Se planteó un experimento con dos grupos de ratones Balb/c adultos y machos (n = 10/grupo). Uno de ellos consumía una dieta a base de mantequilla (Grupo Mantequilla) (15% de grasa en vez de 5%) y al otro grupo se le administró una dieta idéntica en la que un 15% del aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado (15% del total de la grasa) (Grupo mantequilla-W3). Estas dietas se caracterizaron por su alto contenido en ácidos grasos saturados, con la intención de potenciar determinados procesos metabólicos que permitiesen aclarar el efectos de los ácidos grasos n-3 a este nivel.

Tras alimentar a los roedores durante un mes, se sacrificaron y se extrajo su hígado para análisis de la expresión génica por tecnología de *microarrays*.

**6.1.16. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de infección en ratones:** Se tomaron cuatro grupos de ratones, dos de los cuales fueron alimentados con una dieta a base de aceite de girasol (Grupo Girasol), mientras que los dos grupos restantes fueron alimentados con una dieta enriquecida en aceite de pescado (15% del total de la grasa) (Grupo W3). En dos de los grupos que consumían dietas diferentes, se indujo una infección por medio de una inyección intraperitoneal con *Salmonella choleraesuis*

CECT4155 de 0.2 ml ( $10^6$  CFU en total), después de haber ingerido las dietas correspondientes durante quince días (Olivares M y col, 2006). Los otros dos grupos no infectados sirvieron de control. La bacteria fue crecida en medio TSB (*Triptic Soy Broth*) durante 12 horas. Se centrifugó 5 minutos a 7000 g y el *pellet* se resuspendió en cloruro sódico.

Desde el momento de la infección, se observó detenidamente el comportamiento, aspecto, síntomas y mortalidad de los animales hasta quince días después, fecha en la que se dio por concluido el experimento y se hizo balance del mismo con los datos obtenidos a lo largo del experimento y por la detección de *Salmonella* en bazo, hígado, plasma y heces en un medio específico. El modelo viene representado en la Figura 6.4.

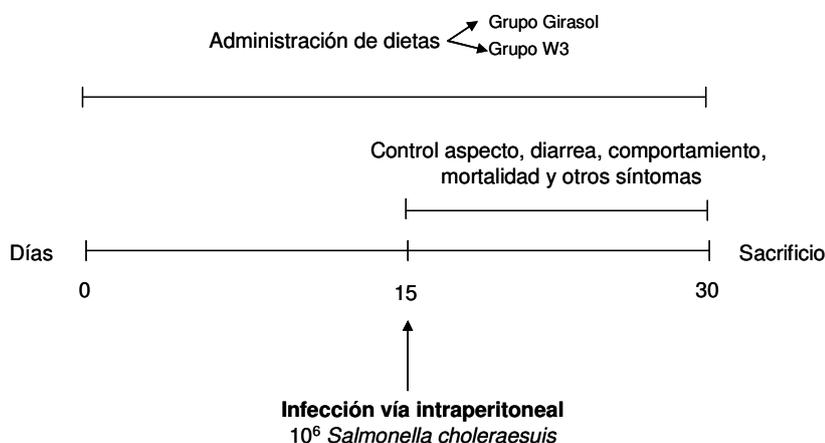
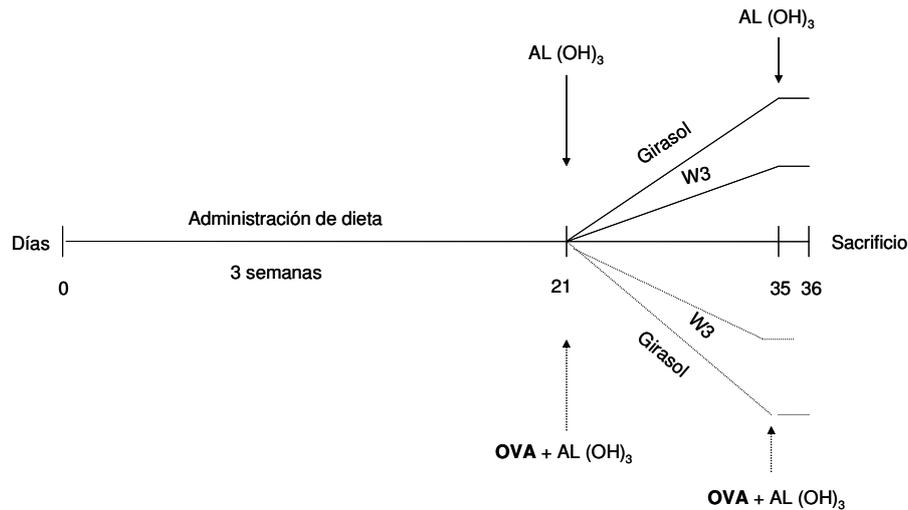


Figura 6.4. Esquema del modelo animal de infección por *Salmonella*

#### 6.1.17. Efecto de una dieta enriquecida en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de

**shock anafiláctico:** Se tomaron cuatro grupos de ratones hembras Balb/c ( $n = 10$ /grupos). Dos de ellos fueron alimentados con una dieta a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) y los otros dos grupos con dieta idéntica en la que un 15% del aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado. (Grupo W3) durante cinco semanas. Dos de los grupos, uno consumiendo la dieta girasol y otro la dieta W3, se utilizaron como controles y durante el tiempo de estudio únicamente consumieron sus respectivas dietas. En los dos grupos restantes se indujo el shock anafiláctico al tiempo que consumían sus dietas. Tras tres semanas de consumo de la dieta se sensibilizó a estos ratones frente a ovoalbumina (OVA) por medio de una inyección intraperitoneal de OVA (10 mg/ml) disuelta en una solución de hidróxido de aluminio 0.1M que funcionaría como adyuvante. Se inyectó 100  $\mu$ l de la mezcla por ratón, que equivalía a 1 mg de proteína. A los grupos control se les inyectó

100µl del adyuvante únicamente. Transcurridas dos semanas, se repitió la misma operación. Una vez recibido este segundo *challenge*, se observó a los ratones detenidamente durante la hora posterior para apreciar la ausencia o presencia de picores, convulsiones, falta de coordinación del movimiento, aspecto, etc. Veinticuatro horas más tarde, los animales fueron sacrificados llevándose a cabo ensayos de proliferación, medida de citocinas en diversas muestras y determinación en plasma de Igs en general e Igs antígenoespecíficas. En la Figura 6.5 se describe el modelo.



**Figura 6.5.** Esquema del modelo experimental en ratones de *shock* anafiláctico

Para facilitar la evaluación de los resultados, se creó un *score* que permitiese evaluar los síntomas de los ratones sensibilizados frente a OVA. En la Tabla 6.3 se indica la sintomatología asociada a cada *score*.

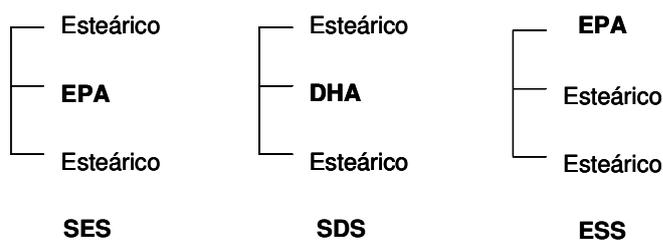
**Tabla 6.3.** *Score* asociado a la sintomatología que aparece en ratones tras una dosis de choque con OVA previa sensibilización (Lara-Villoslada F y col, 2004).

Score	Sintomatología
0	No síntomas.
1	Picor y enrojecimiento alrededor de la nariz y cabeza.
2	Ojos llorosos y pelo erizado.
3	Actividad disminuida y ritmo respiratorio ligeramente acelerado.
4	Respiración forzada y ruidosa. Cianosis
5	Muerte.

**6.1.18. Efectos inmunomoduladores de dietas ricas en EPA o DHA:** El estudio consistió en tres grupos de ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ) Balb/c machos al destete que fueron alimentados con una dieta rica en aceite de girasol (Grupo Girasol) o bien con una dieta

idéntica en la que un 15% de aceite de girasol fue sustituido por aceite de pescado alto en DHA (Grupo DHA) o alto en EPA (Grupo EPA). Los animales fueron alimentados durante 14 días. Doce horas antes del sacrificio se indujo una dermatitis de contacto tal y como se explica en el apartado 6.1.12. del Material y Métodos. Se analizó el curso de la inflamación en las orejas así como se determinaron citocinas e Igs producidas por linfocitos, macrófagos y sus niveles en plasma, donde también se midió MDA (malondialdehído). Se analizó la composición de ácidos grasos en diversos tejidos y se estudió su incorporación en las diferentes fracciones lipídicas.

**6.1.19. Efecto anti-inflamatorio del EPA y DHA en triglicéridos estructurados:** En el Departamento de Química de Puleva Biotech se sintetizaron triglicéridos (TG) estructurados siguiendo la metodología sintética propuesta por Haraldsson (Haraldsson GG y col, 2000). La caracterización de cada TG estructurado sintetizado fue llevada a cabo usando  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -NMR (resonancia magnética nuclear) (Wollenberg KF, 1990; Haraldsson GG, 1995) y la posición que ocupó cada ácido graso en el TG fue confirmada por HPLC-APCI-MS (Mottram HR y Evershed RP, 1996) (Columna *Spherisorb* ODS-2 250x4.6mm (3 $\mu\text{m}$ ). Equipo *Water Alliance* 2695 acoplado con detector de masas modelo ZQ de *Micromass*). De entre los TG estructurados sintetizados, unos contenían EPA o DHA en la posición 2 del TG. El ácido graso que ocupaba las posiciones restantes del TG fue el ácido esteárico (Figura 6.6). Estos TGs fueron incorporados en diferentes dietas, siendo el aceite de girasol la grasa base (88.7% del total de la grasa) a la que se adicionó el TG estructurado (11.3% del total de la grasa). De este modo, se obtuvieron dos dietas diferentes: la dieta SES, con el TG estructurado con EPA en posición 2; y la dieta SDS, con el TG estructurado con DHA en posición 2. Estas dietas junto con otra a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) fueron administradas a 3 grupos de ratones Balb/c machos al destete respectivamente (n = 10/grupo) durante un mes. Doce horas antes del sacrificio se indujo en las orejas de los animales una dermatitis de contacto tal y como se explica en el apartado 6.1.12. del Material y Métodos. Posteriormente se analizó el curso de la inflamación así como la incorporación de ácidos grasos a tejidos.



**Figura 6.6.** Estructura de los diferentes triglicéridos estructurados sintetizados.

**6.1.20. Efecto anti-inflamatorio derivado de la posición del ácido graso:** Dos de las dietas empleadas en el estudio anterior, la dieta Girasol y la dieta SES fueron utilizadas junto con la dieta ESS, también sintetizada con TG estructurados en Puleva Biotech. Esta dieta fue elaborada con aceite de girasol (88.7% del total de la grasa) y un TG estructurado que contenía EPA en posición 1 o 3 y con ácido esteárico en las posiciones restantes (Figura 6.6). Las tres dietas fueron administradas respectivamente a tres grupos de ratones machos Balb/c al destete (n = 10/grupo) durante un mes. Doce horas antes del sacrificio se indujo en las orejas de los animales una dermatitis de contacto tal y como se explica en el apartado 6.1.12. del Material y Métodos. Posteriormente se analizó el curso de la inflamación así como la incorporación de ácidos grasos a tejidos.

## **6.2. Experimentos *in vitro***

**6.2.1. Ensayo de inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos:** Para analizar el efecto de diferentes ácidos grasos sobre la adhesión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal, se llevó a cabo un experimento consistente en marcar bacterias patógenas con [<sup>3</sup>H]-timidina e incubar células intestinales con los correspondientes ácidos grasos y las bacterias marcadas. Tras un tiempo de incubación se cuantificó la cantidad de bacterias adheridas (contaje de [<sup>3</sup>H]-timidina). Los ácidos grasos empleados fueron ácido estárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, EPA y DHA, que se añadieron a la concentración de 50 µg/ml.

### *Marcaje de bacterias patógenas con [<sup>3</sup>H]-timidina*

Se utilizaron tres bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis thyphi* y *Listeria monocytogenes* subespecie Ohio. Partimos de un cultivo de cada una de estas bacterias en fase estacionaria, del que se adicionan 10µl a 1ml de medio Tryptic Soy Broth (TSB) al que previamente se ha añadido [<sup>3</sup>H]-timidina (*Amersham*) a una concentración final de 1µCi/ml. La mezcla anterior se incubó durante 12h a 37°C.

Los cultivos se centrifugaron (6800 g, 5min), se lavaron 2 veces con PBS y finalmente se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se midió la radioactividad incorporada calculándose el valor de cpm/ml de cada suspensión bacteriana.

### *Ensayo de adhesión en presencia de ácidos grasos libres*

Para este ensayo se utilizaron células caco, una línea celular estable derivada de adenocarcinoma de colon proporcionada por la Asociación Americana de Cultivos Tipo

(ATCC). El medio de cultivo de estas células se compone de: DMEM alto en glucosa, 10% de plasma fetal bovino, 0,3 mg/ml de glutamina y 1% de una mezcla comercial de aminoácidos no esenciales (PAA *Laboratories*).

Las células Caco-2 se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta 21 días post-confluencia. Se añadieron los diferentes ácidos grasos (50 µg/ml disueltos en DMSO) y las bacterias (50µl de cada suspensión) y se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2h. Existió un control sin bacteria y un control donde no se incluyó ningún ácido graso, solamente DMSO en la misma proporción a la que estaban disueltos los ácidos grasos comerciales. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las placas (1350 g, 5min) para eliminar el sobrenadante en el que estarían las bacterias no adheridas. A continuación los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y finalmente se adicionaron 200µl/pocillo de una solución de ácido tricloro-acético al 10% a 4°C. Transcurridos 20 minutos de incubación a 4°C, se volvieron a hacer 2 lavados con la misma solución de ácido tricloro-acético. Finalmente las células se resuspendieron en 100µl de PBS y se añadieron a 2ml de líquido de centelleo (*ICN laboratories*) para medir la radioactividad adherida a las células.

**6.2.2. Cultivo de linfocitos procedentes del bazo de ratón:** El bazo de los ratones fue extraído tras su sacrificio y homogenizado en medio de cultivo completo (DMEM alto en glucosa, adicionado de 10% de plasma fetal bovino (FBS), 1% de una mezcla de penicilina y estreptomycin y 0.1% de anfotericina). Después de centrifugar el homogenado (1350 g, 5 minutos, 4°C), los eritrocitos fueron eliminados mediante la incubación en una solución de lisis (NH<sub>4</sub>Cl 1,7M; KHCO<sub>3</sub> 0,12M; EDTA 0,009M) durante 15 minutos a 4°C. El resto de células, principalmente linfocitos, se cultivaron en diferentes condiciones para analizar su proliferación y el perfil de citocinas que producían (la determinación del efecto del ácido oleico *in vitro* se llevó a cabo añadiendo este ácido graso disuelto en DMSO a la concentración de 50 µg/ml). Para ello se utilizó el mismo medio anterior y se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> como se indica más adelante.

**6.2.3. Cultivo de macrófagos procedentes de médula ósea de ratón (BMDM):** Se extrajo la médula ósea de los huesos de las patas traseras del ratón por inyección de medio en los mismos. Una vez sacrificado el animal, se tomaron las dos tibias y los dos fémures de cada ratón, de los que se obtuvieron las células totales de la médula ósea del mismo. Estas células fueron cultivadas durante 7 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en un medio selectivo compuesto por: DMEM alto en glucosa, 20% de FBS y 30% de sobrenadante de células L-

929 (fibroblastos de ratón), denominado *L-cell*, como fuente de factor estimulante del crecimiento de macrófagos (M-CSF). Durante estos 7 días los precursores de los macrófagos existentes en la médula ósea se desarrollaron, de manera que transcurrido este tiempo se obtuvo un cultivo confluyente de macrófagos de ratón listos para su uso (Comalada M y col, 2003).

#### *Producción de L-cell (Sobrenadante de células L-929)*

Células L-929 conservadas en nitrógeno líquido fueron cultivadas durante siete días a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en un medio compuesto por DMEM alto en glucosa con 10% FBS en un frasco de cultivo hasta alcanzar la confluencia. Se partió de 750.000 células, las cuales se añadieron en una placa de 15 cm de diámetro con 40 ml de medio. Transcurridos los siete días, se recogió el sobrenadante y centrifugó a 1350 g cinco minutos. El sobrenadante fue almacenado a -20° C para el posterior cultivo de macrófagos. Este procedimiento se llevó a cabo numerosas veces para obtener grandes cantidades de *L-cell* para el total de estudios realizados.

## **7. Determinación de parámetros en muestras biológicas**

### Extracción de sangre

La sangre se extrae por punción cardiaca justo después de ser anestesiado el animal, mientras aún existe latido, y se vierte en tubos que contienen ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) a la concentración de 60mg/ml para evitar su coagulación. Se centrifuga a 1855 g, 4°C, 10 minutos, y el plasma se congela a -80 °C para su posterior análisis.

### Recuentos de células

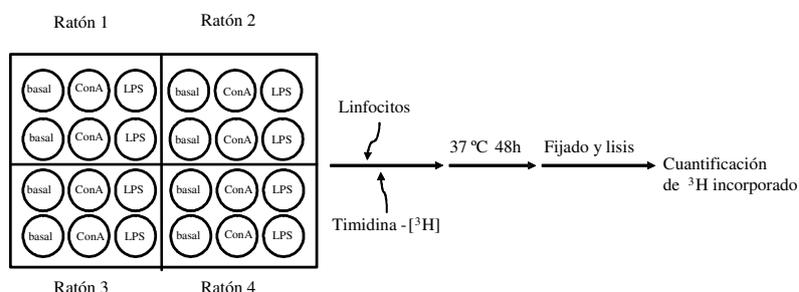
Para llevar a cabo los diversos tipos de ensayos es necesario cultivar en cada caso un número concreto de células, y siempre el mismo para todos los pozos de cada experimento. Por ello, una vez obtenidas las células, se hace una dilución 1/20 de las mismas en *Tripan blue*. Para contar la cantidad de células existente se emplea una Cámara de Neubauer, por medio de la cual se cuentan las células no teñidas. En el caso del conteo de linfocitos es necesario lisar previamente las células procedentes del bazo según se indica en el apartado 6.2.3. del Material y Métodos.

Ensayo de proliferación de linfocitos

Este tipo de ensayo se basa en la necesidad de incorporar nucleótidos por parte de las células que se encuentran en división. Así, las células se cultivan en presencia de un agente que induce la proliferación, y de timidina tritiada (timidina-<sup>3</sup>H), para posteriormente cuantificar la cantidad de radioactividad incorporada por las células. Los linfocitos que incorporasen mayor radioactividad, habrían proliferado más.

Las células procedentes del bazo se cultivan en placas de 24 pocillos (2x10<sup>6</sup> células/pocillo) con 1 ml de medio de cultivo/pocillo. Los linfocitos procedentes de cada ratón se dividen en 3 pocillos en las siguientes condiciones (Figura 7.1):

- basal: ausencia de estímulo
- Concanavalina A (ConA): en presencia de Con A (5µg/ml), mitógeno específico de los linfocitos T.
- Lipopolisacarido (LPS): en presencia de LPS (50µg/ml), mitógeno de linfocitos B.
- En algunos casos también se ha evaluado al agente inductor de enfermedad: OVA (100 µg/ml) en estudios de *shock* anafiláctico o PLP (10 µg/ml) en estudios de EAE.

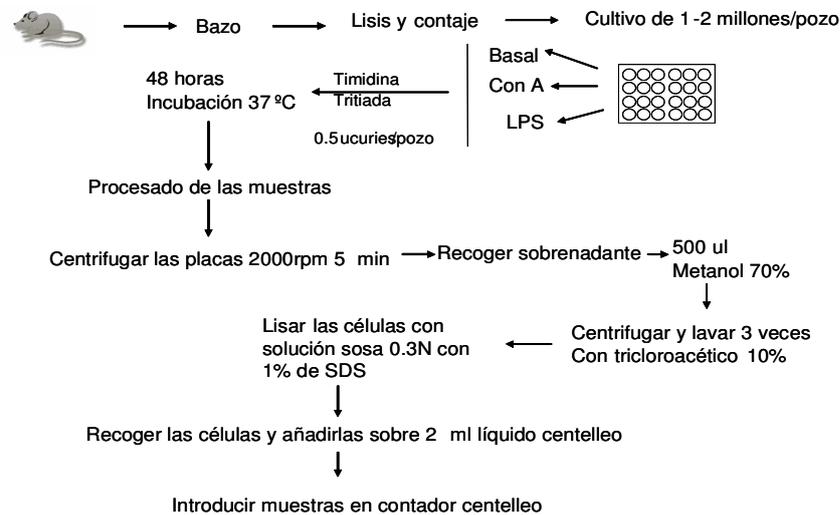


**Figura 7.1.** Esquema de la estimulación de los linfocitos para el ensayo de proliferación.

Tras añadir timidina tritiada a cada pocillo (1µCi/ml), la placa se incuba durante 48h a 37° C en una atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo las células se centrifugan (1000 g, 5 minutos) para eliminar los sobrenadantes. A continuación las células se fijan con 500µl de metanol 70% a 4°C durante 1hora. Finalmente, tras 3 lavados con ácido tricloroacético (TCA) al 10% en frío, las células se lisan con una solución de dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 1% y 0,3M de

NaOH a temperatura ambiente. La radioactividad se mide en un contador de centelleo 2100 Tri-Carb Packard. En el siguiente esquema se detalla el proceso (Figura 7.2).



**Figura 7.2.** Esquema del ensayo de proliferación de linfocitos obtenidos del bazo de los ratones

### Ensayo de estimulación en linfocitos

Para este tipo de ensayo los linfocitos de cada ratón se obtienen tal y como se indica en el apartado 6.2.3 del Material y Métodos. Se cultivan en placas de 6 pozos ( $5 \times 10^6$  células/ml) en 5 ml de medio y se incuban durante 48h en presencia de concanavalina A (ConA),  $5 \mu\text{g/ml}$ . Transcurrido el tiempo de incubación, se recogen los cultivos y se centrifugan a  $1350 \text{ g}$  5 minutos. El sobrenadante se alicuota y conserva a  $-80^\circ\text{C}$  para el posterior análisis de citocinas u otros mediadores; el *pellet* se resuspende en 1ml de *Trizol* (Invitrogen) y se guarda a  $-80^\circ\text{C}$ , para la extracción de RNA.

### Ensayo de proliferación de macrófagos

El sistema empleado para medir la proliferación de macrófagos fue semejante al empleado para linfocitos (Comalada M y col, 2004). La diferencia radica en la manera de proceder según se trate de un tipo celular u otro. En este caso se añaden 100000 células por pozo en placas de 24 pozos. Los macrófagos deben permanecer durante 12 horas en quiescencia antes de realizarse el ensayo, por lo que las células fueron cultivadas en ausencia de *L-cell*. Transcurrido este tiempo, se añade *L-cell* (30%) a la mitad de los

pozos. El resto de los pozos se consideran basales. De cada punto se hace un triplicado. Las placas se incuban 24 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Seis horas antes de que las 24 horas transcurran, se añade timidina tritiada (1 µcuries/ml). Transcurridas las seis horas de incubación con tritio se procede de manera semejante a la proliferación de linfocitos. En la Figura 7.3 se resume el proceso completo.

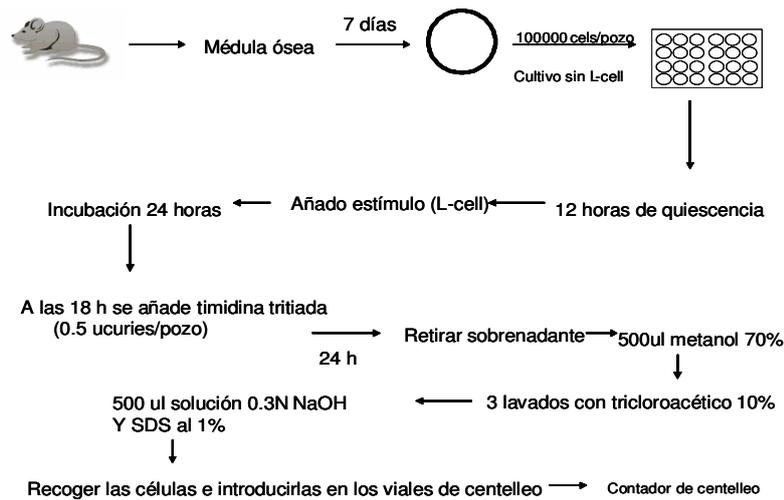


Figura 7.3. Resumen del ensayo de proliferación de macrófagos de ratón.

### Ensayo de estimulación de los macrófagos

Una vez diferenciados y despegados se distribuyen en placas de 6 pozos, añadiendo  $3 \times 10^6$  células/pozo en el medio propio de macrófagos descrito anteriormente. Se deja transcurrir entre 6-12 horas antes de la estimulación. Tras este tiempo se estimula con LPS (100ng/ml) durante 24 horas. Se recoge el sobrenadante que se conserva a -80° C para la posterior determinación de citocinas y otros mediadores. Se añade a los pozos 1ml de *Trizol* (Invitrogen) para recoger las células de las que posteriormente se extrae el RNA.

### Determinación de citocinas en muestras biológicas

Los niveles de citocinas son determinados por medio de sistemas de enzaimmunoensayo (ELISA) comerciales específicos para ratón (Biosource). En nuestros estudios analizamos los niveles de citocinas en sobrenadantes de linfocitos, de macrófagos, en plasma, en homogenado de oreja y en homogenado de colon.

En todos los casos se procede de manera semejante salvo en el caso de homogenado de colon donde se emplea un Kit de ELISA diferente (Amersham-Pharmacia).

100 µl de la muestra se añaden sobre una placa a la que previamente se ha añadido un anticuerpo primario capaz de reconocer una citocina específica. Tras bloquear la placa con albúmina, se añade un anticuerpo biotinilado que reconoce la citocina por un lugar diferente al reconocido por el anticuerpo primario. La biotina es reconocida por la estreptavidina, que está unida a una peroxidasa, que al añadirse se une. Al poner el 3,3'-5,5'-tetrametil-bencidina (TMB) se da una reacción que produce color. Como el azul obtenido no es estable, la reacción se para con ácido sulfúrico 2 N, adquiriéndose un color amarillo del cual se puede determinar la densidad óptica a 450 nm con un filtro de referencia de 620 nm. En la Figura 7.4 se describe el protocolo de actuación.

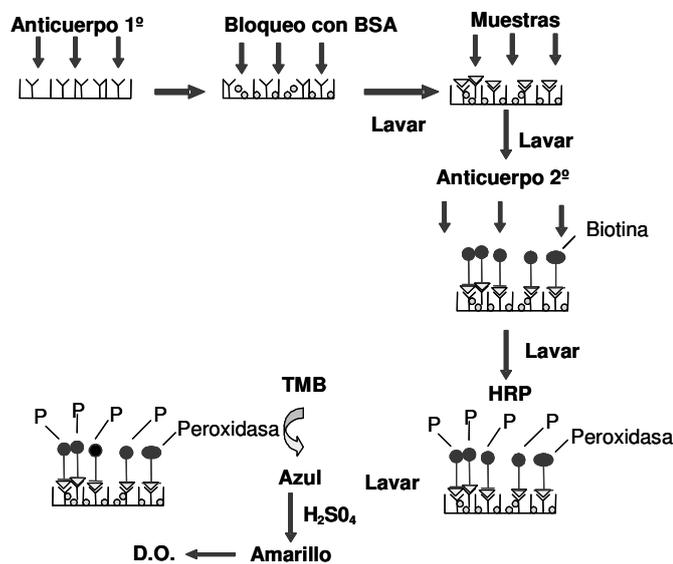


Figura 7.4. Método de ELISA comercial para detección de citocinas

En la Tabla 7.1 se indican las diluciones de las muestras y de los diferentes anticuerpos utilizadas en la detección de cada una de las citocinas.

Tabla 7.1. Diluciones de las diferentes muestras, anticuerpos primario y secundario y estreptavidina empleadas.

	Muestra				Anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º	Estreptavidina
	Linfocitos	Macrófagos	Suero	Orejas			
TNFα	1	1/10	1	1	1/800	1/1000	1/3000
IFNγ	1	1	1	1	1/800	1/1400	1/3000
IL-2	1		1	1	1/800	1/4000	1/3000
IL-12	1	1/4	1	1	1/800	1/1600	1/3000
IL-4	1		1	1	1/800	1/10000	1/3000
IL-1β	1	1	1	1	1/800	1/8000	1/3000
IL-10	1	1	1	1	1/800	1/3000	1/1500
TGFβ	1	1	1	1	1/500	1/625	1/3000

En el caso de los sobrenadantes de linfocitos y macrófagos, estos se añaden directamente sobre la placa, previa dilución o no en los tampones recomendados por el *kit*. Las orejas se homogenizan en tampón hexadecil-trimetilamonio (HTAB) al 0.25% (pH = 6) con una dilución 1/20.

En el caso de las medidas en colon se sigue un protocolo especial. El colon completo de cada rata se homogeniza sobre hielo y se hace con él una dilución 1/5 en tampón fosfato sódico 10 mM (pH=7.4). Se incuba 20 minutos a 37° C y se centrifuga a 7400 g 20 minutos. El sobrenadante es almacenado a -80° C para su posterior análisis. Se miden TNF $\alpha$  y LTB $_4$  en estos sobrenadantes, empleando los *kits* correspondientes para ratas de *Amersham Biosciences* y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En el caso de la medida de LTB $_4$  se hace una dilución ¼ del homogenado.

Determinación de inmunoglobulinas en muestras biológicas

En las diversas experiencias se midieron a menudo Igs tanto en plasma como en heces. En este caso se empleó un *kit* de ELISA comercial diferente al anterior (Bethyl) pero siendo el protocolo bastante similar. Varían las diluciones de las muestras y los anticuerpos. Esta información se contempla en la siguiente tabla (Tabla 7.2).

**Tabla 7.2.** Dilución de las muestras y de los anticuerpos primario y secundario para la detección de inmunoglobulinas.

	Muestras		Anticuerpo 1º	Anticuerpo 2º
	Suero	Heces		
IgG	1/100000		1/100	1/100000
IgG $_1$	1/10000		1/100	1/100000
IgE	1/2		1/100	1/100000
IgA	1/1000	1/200	1/100	1/100000

Medida de IgG1 antígeno-específicas

Para la determinación de las IgG1 antígeno-específicas se utiliza la técnica de ELISA tal y como se describe a continuación.

Una placa de 96 pocillos se cubre con una solución a 20 µg/ml de ovoalbumina disuelta en una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5M a pH=9,6. Después de 12 horas de incubación a 4° C los pocillos se lavan 3 veces con un tampón de lavado (50mM Tris, 0,14M NaCl, 0,05% Tween 20, pH=8,0) y se bloquea con la solución compuesta por: 50mM Tris, 0,14M NaCl, 1% de albúmina bovina sérica (BSA), pH=8,0. A continuación, las alícuotas de plasma, previamente diluidas 1/10, se adicionan a los pocillos y se incuba la placa 1h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan de nuevo, se añade el anticuerpo de captura, anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (*Bethyl laboratories*) diluido 1/4000 en el tampón de lavado adicionado de 1% de BSA y se incuba 1 hora más a temperatura ambiente. Tras un último lavado se añaden 100µl/pocillo TMB y se incuba la placa 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para parar la reacción se utiliza H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N. La absorbancia se lee a 450 nm con un filtro de referencia de 620nm.

#### Determinación de los niveles de histamina, PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub>

Los niveles de estos mediadores en plasma o sobrenadantes de linfocitos y macrófagos se determinaron mediante un método de ELISA de competición, siguiendo las instrucciones del fabricante (*IBL laboratorios* en el caso de la histamina y *Oxford laboratorios* en el caso de LTB<sub>4</sub> y PGE<sub>2</sub>). No fue necesaria la dilución de las muestras.

#### Análisis de la expresión génica por RT-PCR

El ARNm total de las células o tejidos se aísla utilizando *Trizol* (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa (síntesis de ADNc a partir de ARNm) se lleva a cabo con la Transcriptasa Reversa AMV (*Roche*) siguiendo un método previamente publicado (Soler C y col, 2001). El cDNA resultante se usa para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el mismo método (Soler C y col, 2001). Una vez amplificado, 25 µl del producto fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas de ADN se visualizan por tinción con bromuro de etidio e irradiación ultravioleta.

La secuencia de los cebadores de ratón utilizados (*MGW-Biotech*) está recogida en la Tabla 7.3 junto con las temperaturas que se emplean durante la reacción.

**Tabla 7.3.** Secuencias de los cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por RT-PCR y temperatura empleada para la reacción.

	Sentido	Antisentido	Tª extensión
<b>β-actina</b>	5'-TGAATCCTGTGGCATCC-3'	5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	60°C
<b>iNOS</b>	5'-GTTGAAGACTGAGACTCTGG-3'	5'-GACTAGGCTACTCCGTGGA-3'	55°C
<b>TNFα</b>	5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3'	5'-CTTCACAGAGCAATGACTCC-3'	56°C
<b>IFNγ</b>	5'-TGGAGGAATGGCAAAAGGATGGT-3'	5'-ITGGGACAATCTTCCCCAC-3'	60°C
<b>IL-2</b>	5'-TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGA-3'	5'-GAGTCAAATCCACAACATGCCGCA-3'	60°C
<b>IL-4</b>	5'-ACGAGGTCACAGGAGAAGGGAC-3'	5'-GGAGCAGCTTATCGATGAATCC-3'	60°C
<b>IL-1β</b>	5'-TGATGAGAATGACCTGTCT-3'	5'-CTTCTCAAAGATGAAGGAAA-3'	55°C
<b>IL-10</b>	5'-TCCTTAATGCAGGACTTTAAGGG-3'	5'-GGTCTTGGAGCTTATTAATAA-3'	55°C
<b>PPARα</b>	5'-CTGCAGAGCAACCATCCGGAT-3'	5'-TTGCTGAATCCTACTAGCC-3'	55°C
<b>PPARγ</b>	5'-ATGCCAAAAATATCCCTGGTTTC-3'	5'-CTTGGATGTCCTCGATGGGC-3'	57°C
<b>LXRα</b>	5'-GGGGCCAGCCCCAAAATGCTG-3'	5'-GCATCCGTGGGAACATCAGTCG-3'	60°C
<b>LXRβ</b>	5'-GCAACGCTTTGCCCACTTAC-3'	5'-GCGGCAGCTTCTGCTCGG-3'	60°C
<b>CB1</b>	5'-ATGAAGTCGATCCTAGATGG-3'	5'-GGCCTGTGAATGGATATGA-3'	60°C
<b>CB2</b>	5'-AGCGAATTCATGGAGGGATGCCGGGAGACAG-3'	5'-GCAGCAGGCTGCCACAGAGGC-3'	60°C

Estudio de la expresión génica mediante la utilización de *microarrays* del genoma de ratón

Con la información encontrado en varios artículos científicos, se seleccionaron aproximadamente 1800 genes de interés nutricional. Los 1800 genes seleccionados fueron representados en un *microarray* de Affymetrix (Custom Express Design de Affymetrix).

A partir del ARN de las muestras de hígado, se sintetiza ARNc que se hibrida con el chip, de manera que los genes de la muestra hibridan con los del chip dando lugar a señales fluorescentes cuya intensidad determina el nivel de expresión del gen (Figura 7.4).

a) Preparación del RNAc:

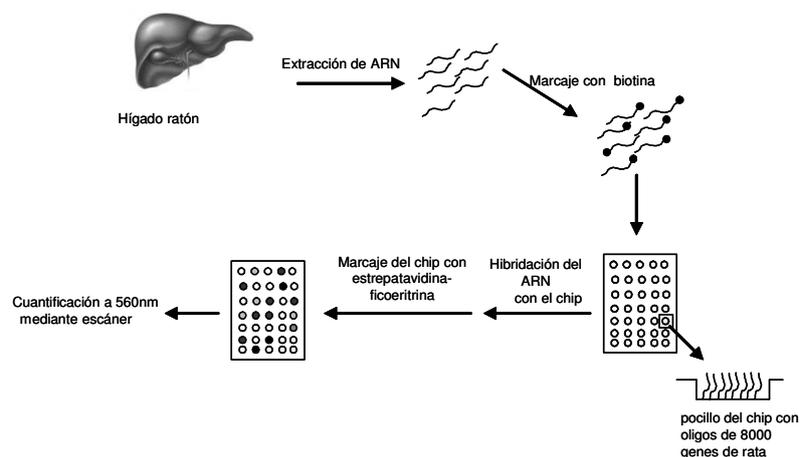
Se extrae el RNA de las muestras por el método del *Trizol*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se hibridaron con el chip de Affymetrix.

Una vez extraído el ARN se convierte en ARNc biotinilado. Para ello se utiliza un método comercial (*SuperScript Choice System, Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utiliza un oligo-dT con un sitio de unión para una T7-ARN polimerasa. Una vez sintetizado el ARNc, el marcaje con biotina se realiza mediante otro método comercial (*MEGAscript In vitro Transcription kit, Ambion*), utilizando CTP y UTP biotinilados, junto con dNTPs no marcados. Los nucleótidos no incorporados se eliminan con columnas *RNeasy (Quiagen)*.

b) Hibridación y visualización:

10µg de cada ARNc se fragmentan a 94°C durante 35 minutos en un tampón de la siguiente composición: Tris-acetato pH 8,1 40mM, KOAc 100mM, MgOAc 30mM. Antes de la hibridación el ARNc fragmentado se calienta a 95°C durante 5 minutos en un tampón de hibridación 6X SSPE-T (6X: NaCl 1M, Tris pH 7,6 10mM, Triton 0,005%). A continuación el ARNc se enfría a 40° C y finalmente se hibrida con el chip de *Affymetrix* durante 16h a 40° C y en rotación constante a 60 rpm.

Una vez finalizada la hibridación el chip se lava 10 veces con el tampón SSPE-T. El ARNc hibridado en el chip se tiñe con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina a 10mg/ml (*Molecular Probes*) en tampón SSPE-T durante 30 minutos a 25° C. Finalmente, los chips se leen a 560 nm usando un escáner (*Agilent Gene Array Scanner, Affymetrix*). Las lecturas se analizan con un programa informático (*Affymetrix Gene Expresión Analysis Software*).



**Figura 7.4.** Análisis de la expresión génica mediante el empleo de un chip de genoma de ratón.

### Ensayo de actividad fagocítica

Este ensayo se basa en la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacterias. Si éstas están marcadas por fluorescencia, los macrófagos que las fagocitan pueden detectarse fácilmente por citometría de flujo (Gill HS, 2000).

Por inyección de 5 ml de PBS en la cavidad peritoneal se extraen macrófagos intraperitoneales que se utilizan en el ensayo.

Se utiliza una cepa de *Escherichia coli* no patógena transformada con el vector que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). 1ml de un cultivo en fase estacionaria de esta

bacteria se lava con 1ml de PBS. Posteriormente las bacterias se resuspendieron en 500µl de PBS, de ahí se añaden 10 µl a las 500000 células de cada pozo y se incuban 10min a 37°C. Transcurrido este tiempo se centrifugan las muestras (1060 g, 5min) y tras 2 lavados con PBS, se añaden 100µl de formaldehído al 4% en PBS para fijar las células. Finalmente las muestras se analizan por citometría de flujo, con objeto de cuantificar el número de células que habían fagocitado.

#### Extracción de ácidos grasos de tejidos o dietas

En un tubo pirex, resistente a la evaporación y a la ebullición, se vierten 300 µl de muestra (plasma, homogenado de hígado, cerebro, bazo y ojo) y se le añade 2 ml de una mezcla de metanol:tolueno 4:1. Tras agitar la muestra durante un minuto con *vortex*, se adicionan 200 µl de cloruro de acetilo en continua agitación. Los tubos se gasean con nitrógeno y se llevan a calefacción (100°C) durante una hora. Transcurrido este tiempo los tubos se enfrían y se le añade 5 ml de carbonato potásico al 6%. Las muestras se centrifugan a 2700 g diez minutos. El sobrenadante se analiza por cromatografía de gases acoplada con FID (Flame Ionization Detector) (Columna SP2380 Supelco, 60mx0.25mm (0.25µm). Equipo Varian 3800).

#### Aislamiento de fosfolípidos, ésteres de colesterol, ácidos grasos no esterificados y triglicéridos en muestras biológicas por extracción en fase sólida

Los ácidos grasos podrían encontrarse libres (AGL), como colesterol esterificado (CE), eterificando triglicéridos (TG) o formando parte de fosfolípidos (PL). Para su cuantificación se sigue el protocolo de Folch (Folch JL y col, 1957).

Se toman aproximadamente 100 mg de tejido. Sobre él se añaden 0.8 ml de NaCl al 0.9% frío y se homogeniza con un sistema de trituración por cuchillas (*ultraturrax*). Sobre el homogenado se añaden los patrones internos (30 µg 17:0 NEFA *Standard*, 70 µg PC *Standard* PC17:0/17:0, 100 µg tri-17:0 TAG *Standard* y 500 µg 17:0 CE). Los patrones se disuelven en cloroformo:metanol 2:1 a la concentración de 1mg/ml.

Se añade a cada muestra 5 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1) con 20 µl de una solución de butilhidroxitolueno (BHT) en metanol (50 mg/l) como antioxidante y se mezcla. A continuación se añade 1 ml de NaCl, se mezcla y se centrifuga a 1800 g diez minutos. Se toma la fase inferior a la que se extrae el agua en el *speed-vac*. Posteriormente este extracto se disuelve en 1 ml de cloroformo.

Se utilizan columnas de aminopropil-silicagel para extracción en fase sólida (Supelco, Bellefonte PA), que se tratan previamente con 1 ml x 2 de cloroformo, 1 ml x 2 de metanol y 1 ml x 2 de cloroformo de nuevo, todo ello en condiciones de vacío. Una vez lavadas las columnas, se añade la muestra disuelta en cloroformo que debe caer por gravedad. Se lava dos veces con cloroformo (1ml) y se recoge todo el conjunto, que contiene los TG y CE. Se elimina el disolvente con el *speed-vac*. La fracción de PL se eluye añadiendo 1 ml de una mezcla de cloroformo:metanol 60:40 en vacío y se deseca la muestra en *speed-vac*. Se lava la columna con 1 ml de metanol para eliminar los restos de PL. A la columna se le añaden 2 ml de cloroformo:metanol:ácido acético (100:2:2) y se obtiene la fracción de AGL, que se seca de nuevo en el *speed-vac*. Las fracciones obtenidas se congelan a -20°C. Se toma una nueva columna que se lava con 1ml de hexano cuatro veces. Se coge el conjunto de TG y CE y se resuspende en 1 ml de hexano. Se vierte sobre la columna y se deja caer por gravedad. Se lava dos veces con 1 ml de hexano, lavado que también se recogen, constituyéndose la fracción de CE. La fracción de TG finalmente se obtiene eluyendo con 2 ml de una mezcla de hexano:cloroformo:acetato de etilo 100:5:5 con vacío. Estas dos últimas fracciones se desecan también en el *speed-vac* y almacenadas a -20 °C.

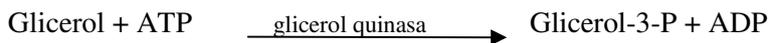
Para la metilación se añade a cada fracción 1 ml de tolueno. A cada muestra se añaden 2 ml de metanol con 2% de ácido sulfúrico al 98% de pureza y se agita. Las muestras se calientan a 50° C *overnight*. Para neutralizar, se añaden 2 ml de una solución 0.25 M KHCO<sub>3</sub> y 0.5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tras agitar, se adicionan 2 ml de hexano y se centrifuga a 1800 g diez minutos. Se toma la fase superior que se deseca en *speed-vac*. Tras resuspender cada muestra en 75 µl de hexano, se pasa a un vial con inserto para su medida por cromatografía de gases acoplada con FID (Flame Ionization Detector) (Columna SP2380 Supelco, 60mx0.25mm (0.25µm). Equipo Varian 3800).

#### Determinación de grasa total en tejidos

A 1 g de tejido se añaden 10 ml de una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 y se lleva a cabo una homogenización con un sistema de cuchillas. Se añaden de nuevo 10 ml de la mezcla de disolventes y se agitan los tubos durante 10 minutos. Se centrifugan 8 minutos a 5800 g y se recogen los infranadantes. Por medio del *speed-vac* se evapora el contenido quedando únicamente la grasa que se cuantifica.

#### Determinación de triglicéridos en plasma

Para su determinación se usa el *Kit* para triglicéridos de la casa Biosystems (*Reagents and Instruments*) de la que se siguen sus instrucciones. Este protocolo se basa en que los triglicéridos presentes en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría:



#### Determinación de colesterol total en plasma

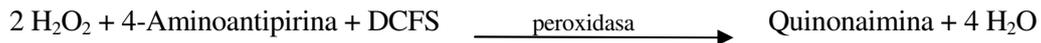
Para su determinación se usa el *kit* para colesterol de la casa Biosystems (*Reagents and Instruments*) de la que se siguen las instrucciones. El protocolo se basa en que el colesterol presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría:



#### Determinación de colesterol HDL en plasma

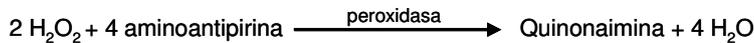
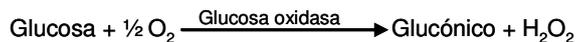
Para su determinación se usó el *kit* para colesterol HDL de la casa Biosystems (*Reagents and Instruments*) de la que se siguen las instrucciones. El protocolo se basa en que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia del fosfotungstato e iones magnesio. El sobrenadante

contiene las lipoproteínas de levada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación :



#### Medida de glucosa en plasma

Para su determinación se usó el *kit* para glucosa de la casa Biosystems (*Reagents and Instruments*) de la que se siguen las instrucciones. El protocolo se basa en que la glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



#### Determinación del contenido de glutatión total

Para la determinación del contenido tisular de glutatión total se utiliza el método descrito por Anderson ME (Anderson ME, 1985). Este método se basa en la oxidación total del glutatión de la muestra, de manera que se genera la forma oxidada (GSSG). Esta oxidación provoca a su vez la reducción del ácido ditío-nitrobenzoico (DTNB), lo cual supone un aumento de la absorbancia de este compuesto.

Las muestras (colon u orejas) se homogenizan en ácido TCA al 5% en proporción 1:20 (p/v) y los homogenados se centrifugan (5300 g, 5min, 4° C). Los sobrenadantes obtenidos se incuban en placas de 96 pocillos junto con los siguientes reactivos:

- 20µl del sobrenadante obtenido tras la homogenización del tejido.
- 5 µl de una solución de EDTA en PBS a 6,3mM.
- 140 µl de NADPH a 0,289mM.

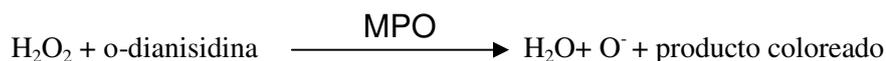
Tras incubar 5 minutos a 30° C se añaden 150µl de glutatión reductasa (*Boehringer Ingelheim*) en PBS-EDTA a 4UI/ml. Finalmente se mide el incremento de absorbancia a 412 nm.

La cantidad de glutatión total presente en las muestras se calcula en función de la pendiente de la curva obtenida, por interpolación en una curva patrón realizada con glutatión oxidado. Los resultados se expresaron en nmol/g de tejido.

#### Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima presente mayoritariamente en los neutrófilos. Su actividad refleja el grado de inflamación de los tejidos analizados, ya que es un indicador de la infiltración intestinal de neutrófilos a causa de dicha inflamación.

La actividad MPO se midió de acuerdo con el método descrito por Krawisz (Krawisz JE y col. (1984) Este método se basa en la reacción de reducción del agua oxigenada por la MPO en presencia de o-dianisidina:



Las muestras (orejas o colon) se homogenizan haciendo una dilución 1/20 de las mismas en una solución HTAB al 0,05% en tampón fosfato sódico 20mM a pH=6. Las muestras a continuación se someten a un triple proceso de congelación-descongelación y se sonicen durante diez segundos. Se centrifugan (5300 4°C, 15 min) y se recoge el sobrenadante, donde se encuentra el enzima.

A continuación 50µl del sobrenadante se incuban con 150µl del tampón de reacción (o-dianisidina 167µg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,005%, tampón fosfato sódico 50mM a pH=6). Finalmente se mide la absorbancia a 450 nm durante 2 minutos.

Los resultados se expresan como U/g de tejido, sabiendo que 1U de actividad MPO es la cantidad de enzima que degrada 1mmol/min de peróxido de hidrógeno.

#### Cuantificación del contenido de agua de las orejas

Una vez extraídas las orejas se pesan en balanza de precisión y se introducen en una estufa a 60° C. Transcurridas 24 horas, las oreja se pesan de nuevo y se calcula el porcentaje de agua presente en las mismas.

#### Determinación del grosor de las orejas

Justo después del sacrificio de los ratones y antes de cortar las orejas, se empleó un *micrometer* para determinar el grosor.

#### Procesamiento de las heces

En diversos experimentos se recogen heces para determinar concentraciones de inmunoglobulinas en sus sobrenadantes. Las heces se homogenizan en PBS a 50 mg/ml y se centrifugan 10 minutos a 1800 g. Los sobrenadantes se conservan a -80 °C.

#### Determinación de MDA en plasma

La medida de este parámetros sirve para determinar el grado de peroxidación lipídica en el plasma. El método se basa en la derivatización del malondialdehido con ácido tiobarbitúrico a pH 3.5 y a alta temperatura, para originar un compuesto altamente fluorescente.

En tubos *Eppendorf*, se añaden 20 µL de patrón o de la muestra respectiva, 500 µL de un tampón AcONa (2M, pH 3,5) que contiene a su vez un 0,2% (Peso/Volumen) de TBA (Ácido tiobarbitúrico) y se agita vigorosamente. Se incuba en el bloque calefactor a 95° C durante 1 hora y se centrifuga a 5300 g. durante 2 min. a 4° C para condensar vapores. Se adicionan 500 µL de del tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM pH 6,8) y se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 6800 g en frío (4° C). A continuación se toman 600 µL del sobrenadante y se mezclan con otros 600 µL de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50mM pH 3,5). La medida se lleva a cabo por HPLC con detección por fluorescencia (excitación: 515nm; emisión: 543nm. Columna LichroCart 250-4 (Supersheper 100 RP-18) 250x4.6mm (5µm). Equipo *Waters Alliance 2695, Software Millenium*).

#### Análisis histológico de colon

El colon se introduce en un tampón fosfato salino frío. Se abre longitudinalmente y una sección de la parte distal de la zona dañada se fija inmediatamente en formaldehído al 4% y se embebe en parafina para su análisis histológico.

Las secciones de colon de 5 µm de grosor se tiñen con hematoxilina y eosina. Las microfotografías se hacen con un microscopio Leika DM 5000B. El criterio empleado para determinar el daño microscópico en el colon se especifica en la Tabla 7.4.

**Tabla 7.4.** Criterio para el establecimiento el daño microscópico sufrido en el colon de ratas a las que se indujo IBD.

<b>Score para determinación de daño macroscópico en el colon</b>	
Mucosa epitelial	Ulceración: nada (0); leve y superficial (1); moderada (2); extensa y profunda (3)
Criptas	Deplección de mucus: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3)
Lámina propia	Infiltrado mononuclear: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Infiltrado granulocítico: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Vascularidad: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3)
Submucosa	Infiltrado mononuclear: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Infiltrado granulocítico: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3) Edema: nada (0); leve (1); moderado (2); severo (3)

#### Detección de *Salmonella* en órganos y heces

Bazo, hígado y heces se homogenizan en esterilidad en agua de peptona y se siembran en placas elaboradas con el medio específico *Salmonella-Sigella* (Oxoid).

#### Análisis estadístico

La significación estadística ( $p < 0,05$ ) se calculó mediante el método del análisis de varianzas (ANOVA) de una vía y los *test a posteriori* adecuados a cada parámetro: *test* de Fisher para los valores paramétricos (concentración de citoquinas, proliferación de linfocitos) y *test* de Mann-Whitney para los no paramétricos (puntuación de los síntomas). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versión 12.0. Los análisis de las diferentes muestras se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE).

## **Resultados**

---



## **8. EFECTOS INMUNITARIOS DEL ACEITE DE OLIVA**

El aceite de oliva se caracteriza por poseer numerosos efectos beneficiosos para el organismo. Destaca su papel a nivel cardiovascular, aunque su capacidad de modulación de la respuesta inmunitaria es importante a pesar de estar menos estudiada. El aceite de oliva está compuesto por una fracción saponificable, donde el principal componente es el ácido oleico, y de una fracción insaponificable, rica en compuestos de elevada capacidad antioxidante, entre los que destaca el hidroxitirosol. Muchas de las propiedades del aceite de oliva, especialmente las inmunitarias, como es su efecto anti-inflamatorio, son atribuidas al ácido oleico (Yaqoob P, 2002), si bien múltiples estudios demuestran la importancia biológica de la fracción minoritaria de dicho aceite (Wahle KWJ y col, 2004). Los siguientes estudios tratan de aclarar el papel del aceite de oliva y de sus componentes en la respuesta inmunitaria.

### **8.1 Efectos inmunitarios derivados de la incorporación de ácido oleico a la grasa de la dieta en roedores sanos**

Para demostrar los efectos inmunitarios del ácido oleico y determinar en que grado participan del efecto inmunomodulador del aceite de oliva, se diseñó un estudio en el que ratones Balb/c machos y adultos (n = 10/grupo) fueron alimentados durante un mes con dietas a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) o a base de girasol alto oleico (Grupo GAO) como se indica en el apartado 6.1.1. del Material y Métodos.

La principal diferencia entre ambas dietas era el mayor contenido de ácido oleico en la dieta GAO, lo cual nos permitiría evaluar los efectos de este ácido graso monoinsaturado (MUFA). En la Tabla 8.1 se muestran los contenidos de ácidos grasos de ambas dietas, siendo la cantidad de ácido oleico tres veces superior en la dieta GAO con respecto a la dieta Girasol, incremento que se produce a expensas de disminuir la cantidad de ácido linoleico.

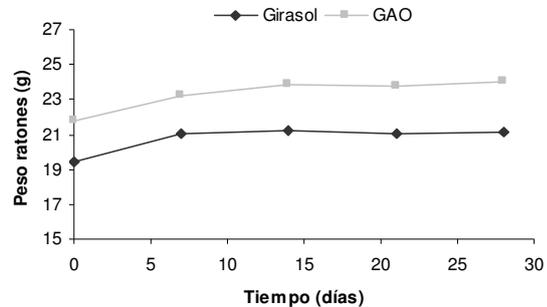
La cantidad de ácido oleico incorporada a la dieta GAO fue semejante a la existente en el aceite de oliva. De este modo, el efecto inmunitario detectado para el ácido oleico en la dieta GAO podría referirse al efecto que ejerciese el ácido oleico en una dieta a base de aceite de oliva, sin tener en cuenta su fracción insaponificable. Además, mientras en la dieta GAO se produce un cambio muy importante en la relación n6/n9, que disminuye, la relación n6/n3 permanece constante, de modo que en los efectos observados no estarían involucrados los PUFA n-3.

**Tabla 8.1** Composición en ácidos grasos de las dietas expresada en g/100 g grasa. Nd, no detectado.

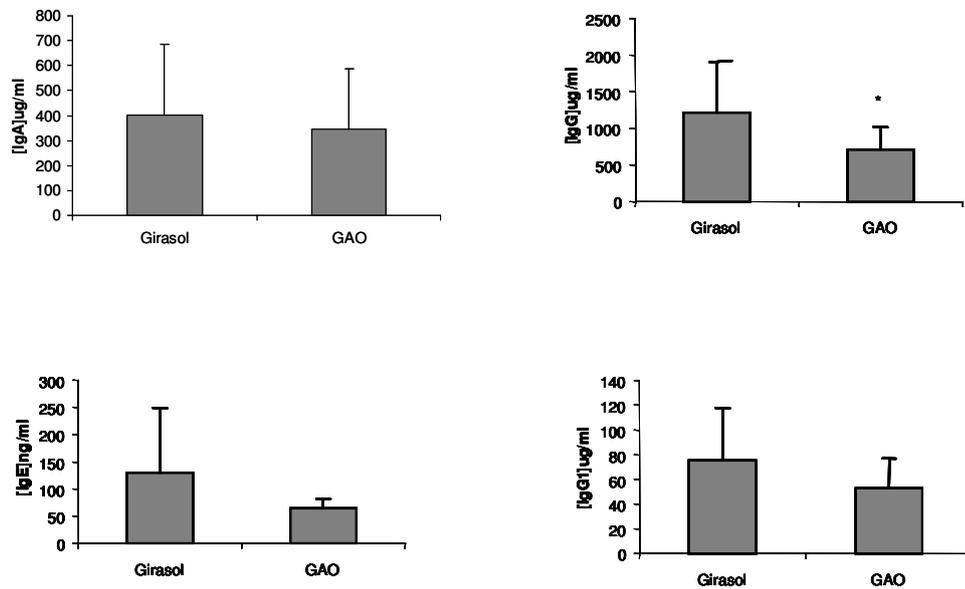
	Girasol	GAO
C10:0	nd	0.11
C12:0	nd	0.05
C14:0	2.91	0.07
C14:1	0.15	nd
C16:0	10.03	5.14
C16:1	0.32	0.12
C16:2n4	0.08	nd
C17:0	0.11	0.04
C18:0	5.45	4.04
<b>Oleico C18:1n9c</b>	<b>25.35</b>	<b>75.14</b>
C18:1n7	0.33	nd
C18:2n6tt	0.03	0.51
C18:2n6ct	0.24	nd
<b><math>\alpha</math>-linoleico C18:2n6c</b>	<b>51.41</b>	<b>12.98</b>
C18:3n4	0.30	0.05
$\gamma$ -linolénico C18:3n6 (gamma)	nd	0.05
$\alpha$ -Linolénico C18:3n3	0.17	0.15
C18:4n3	0.07	nd
C20:1n9	0.08	0.23
C21:0	0.08	0.04
C20:2	0.06	nd
Araquidónico C20:4n6c	0.82	nd
C20:5n3	0.24	nd
C22:0	0.75	nd
C24:0	0.37	0.2
C22:5n3	0.09	nd
Otros	0.57	1.08
<b>MUFA</b>	<b>26.15</b>	<b>75.26</b>
<b>PUFA</b>	<b>53.45</b>	<b>14.07</b>
<b>n-6</b>	<b>52.50</b>	<b>13.54</b>
<b>n-3</b>	<b>0.57</b>	<b>0.15</b>
<b>n-9</b>	<b>25.35</b>	<b>75.14</b>
<b>n6/n9</b>	<b>2.071</b>	<b>0.180</b>
<b>n6/n3</b>	<b>92.267</b>	<b>90.267</b>

Los animales fueron observados durante el tiempo que duró el estudio sin que se encontrasen cambios en el comportamiento de los mismos. También se evaluaron los pesos de los animales, comprobándose que en ambos grupos la evolución era semejante (Figura 8.1).

**Figura 8.1.** Evolución de los pesos de los ratones desde el momento en que empiezan a ingerir las dietas Girasol y GAO hasta su sacrificio. El resultado es la media de los valores de cada grupo (n =10/grupo).

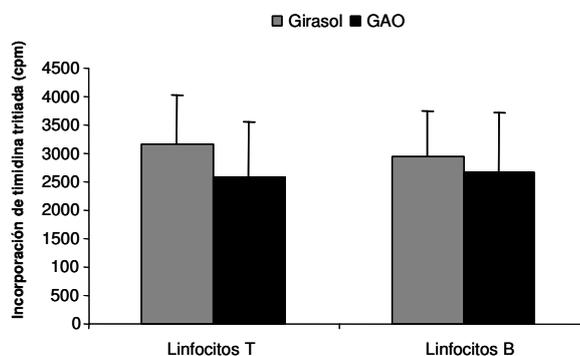


La mayor cantidad de ácido oleico incorporada en la dieta GAO produjo una disminución en plasma de inmunoglobulinas, como la IgG, IgA, IgG<sub>1</sub> e IgE (Figura 8.2), aunque solo llegó a alcanzar significación estadística la IgG.



**Figura 8.2. El ácido oleico disminuye los niveles séricos de Igs.** Niveles de IgG, IgG<sub>1</sub> e IgE, determinados por ELISA en plasma de ratones alimentados con dietas Girasol y GAO. Los resultados están expresados como la media ± DE. \* p < 0.05 entre Girasol y GAO (n = 10/grupo).

Al analizar el efecto del ácido oleico sobre el bazo, se observa que dicho órgano no se afectó como consecuencia del consumo de dieta, puesto que no se modificaron ni el tamaño ni el número de células del bazo (datos nos mostrados), ni tampoco existió efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos T o B, aunque si que se apreció una tendencia de la dieta GAO hacia la disminución de la misma (Figura 8.3).



**Figura 8.3. El ácido oleico no afecta la proliferación de linfocitos.** Proliferación de linfocitos T y B medida por incorporación de timidina tritiada y expresada como cpm. Los resultados son expresados como la media ± DE (n = 10/grupo).

Del mismo modo, los niveles de citocinas producidos por los linfocitos cultivados a partir del bazo fueron bastante semejantes en ambos grupos. El efecto del ácido oleico incluido en la dieta tampoco afectó de manera importante a los macrófagos. En la tabla 8.2 se pueden apreciar diferentes parámetros inmunitarios referentes a los linfocitos de bazo y a los macrófagos de médula ósea estudiados, donde se observa la ausencia de efecto por parte del ácido oleico.

**Tabla 8.2.** Parámetros inmunitarios analizados en animales que ingirieron ácido oleico.

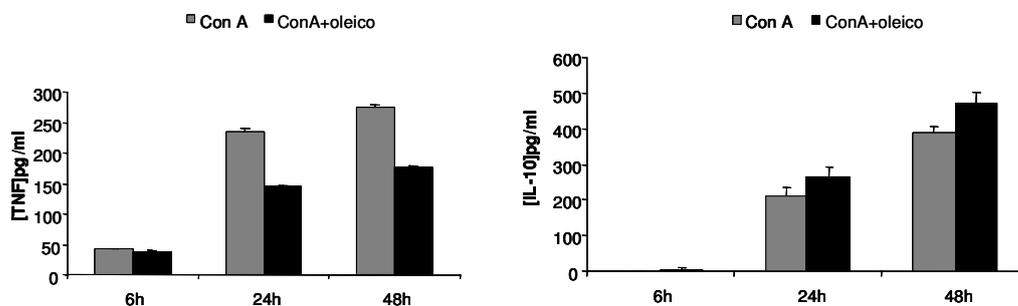
		<b>Girasol</b>	<b>GAO</b>
<b>Linfocitos</b>	<b>Número células/mg bazo</b>	0.8±0.3	0.84±0.2
	<b>mg bazo/g ratón</b>	3.4±0.4	3.25±0.8
	<b>[IL-2] pg/ml</b>	270.7±209.1	298.9±206.7
	<b>[IL-10] pg/ml</b>	6.7±4.5	10.2±8.9
<b>Macrófagos</b>	<b>[TNFα] pg/ml</b>	144±97.1	119.6±73.2
	<b>[IL-10] pg/ml</b>	72.2±72.1	55.4±56.1
	<b>[TNFα] / [IL-10]</b>	4.5±3.1	3.7±1.3

Tamaño y contenido de células del bazo de los ratones. Concentración de diversas citocinas producidas por linfocitos procedentes de bazo que fueron cultivados en presencia de Con A durante 48h. Concentración de diversas citocinas producidas por BMDM cultivados tras su diferenciación en presencia de LPS durante 24h.

Los resultados son expresados como la media ± DE. (n = 10/grupo).

Según estos resultados y aunque se haya descrito el papel del aceite de oliva sobre el sistema inmunitario, el ácido oleico, principal componente del aceite de oliva, tiene un efecto leve sobre la respuesta inmunitaria, que se traduce en un ligero descenso de las inmunoglobulinas en plasma, pero no se ha detectado un efecto anti-inflamatorio propiamente dicho. La disminución de IgE e IgG<sub>1</sub> podría resultar beneficiosa en casos donde se indujese un proceso alérgico, ya que en ratones ambas Igs son mediadores de alergia. Probablemente, el hecho de estudiar parámetros inmunitarios sobre individuos sanos, sea uno de los factores responsables de la no apreciación de un efecto claro. Es posible que la duración del estudio no sea suficiente para que se produzca el cambio en la composición lipídica de las membranas, motivo por el cual el efecto que se aprecia no es muy importante. O bien, podría suceder también, que sean otros componentes del aceite de oliva, como los antioxidantes de su fracción insaponificable, los responsables de un efecto más marcado, posibilidad que se analiza posteriormente de este capítulo.

En experimentos *in vitro*, sin embargo, si se ha observado un ligero efecto anti-inflamatorio del ácido oleico y cursado a través de la modulación en la síntesis de citocinas. Linfocitos procedentes de ratón fueron estimulados con ácido oleico libre a la concentración de 50 $\mu$ g/ml según se indica en el apartado 6.2.2. del Material y Métodos. Se midió la concentración de TNF $\alpha$  y de IL-10 en los sobrenadantes de las células a distintos tiempos, observándose que en aquellos donde existió incubación con ácido oleico, disminuían los niveles de la citocina proinflamatoria, TNF $\alpha$ , al tiempo que aumentaban los de la citocina de carácter anti-inflamatorio IL-10. Estos efectos se incrementaban conforme aumentaba el tiempo de incubación con el ácido graso como se muestra en la Figura 8.4.



**Figura 8.4.** El ácido oleico inhibe la activación de los linfocitos *in vitro* estimulados con ConA. Concentraciones de TNF $\alpha$  y de IL-10 expresadas como la media $\pm$ DE. La cuantificación se llevó a cabo por triplicado por ELISA.

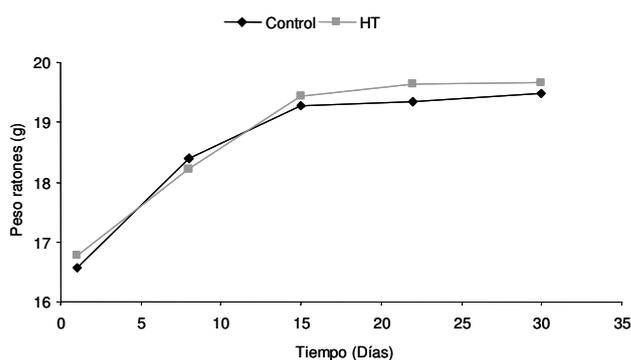
## 8.2 Efectos inmunitarios de la fracción insaponificable del aceite de oliva

Una vez analizado el efecto inmunitario del ácido oleico sobre un animal sano, resultó imprescindible evaluar la acción inmunitaria de los compuestos minoritarios que constituyen la fracción insaponificable del aceite de oliva, para comprobar si eran éstos los responsables de los efectos de este aceite sobre el sistema inmunitario. La bibliografía dispone de múltiples evidencias acerca de la importante misión de esta pequeña fracción, especialmente por el carácter antioxidante de sus componentes, atribuyéndosele en numerosos casos muchos de los efectos beneficiosos del aceite de oliva. Puesto que estos compuestos son de elevada actividad biológica, probablemente no sólo sean capaces de actuar como antioxidantes, sino que también pueden presentar otras propiedades que hagan ampliar sus aplicaciones. En este sentido, se decidió investigar como afectaba la fracción insaponificable del aceite de oliva a los sistemas de defensa en ratones.

### 8.2.1. Efectos inmunitarios del hidroxitirosol

La fracción insaponificable del aceite de oliva está constituida por diversos tipos de compuestos, entre los que destacan los de naturaleza fenólica. Un fenol simple, el hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifeniletanol)), es el componente mayoritario de esta fracción fenólica (Petroni A y col, 1997). Dada la importancia cuantitativa y cualitativa del hidroxitirosol presente en el aceite de oliva, se decidió estudiar *in vivo* sus funciones inmunitarias, y poder así tener una idea general del efecto de la fracción insaponificable de este aceite.

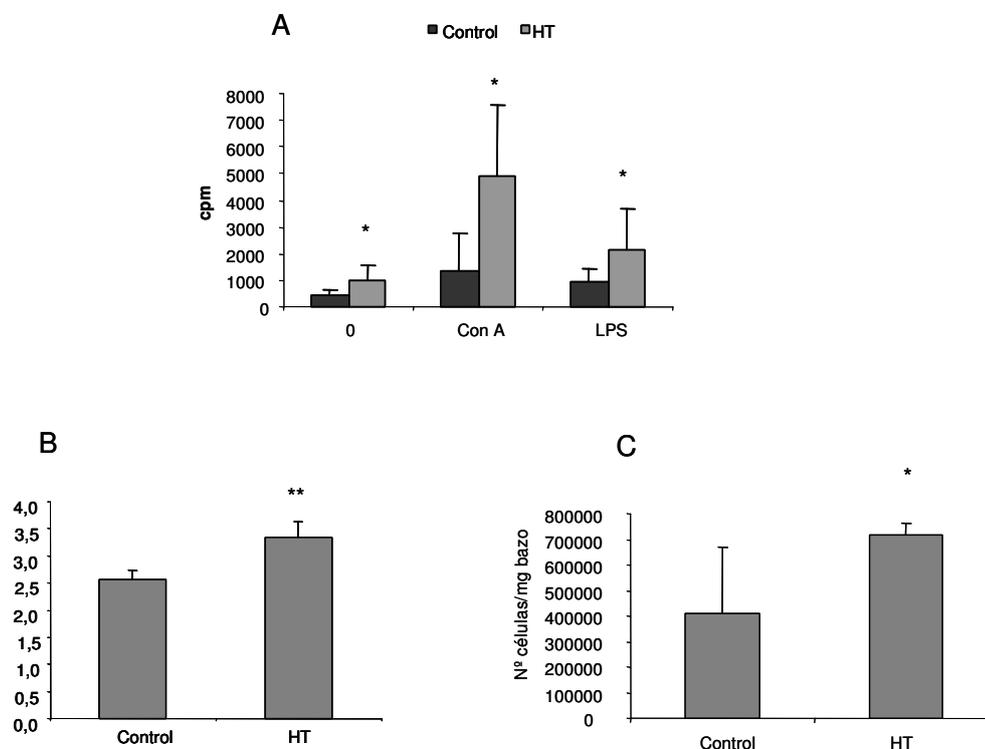
Por diversos procesos de extracción que no son el objeto de esta Tesis Doctoral, se obtuvo este compuesto a partir del alpeourujo procedente del manipulado industrial de las aceitunas para la producción de aceite y se purificó en columna cromatográfica hasta una pureza de al menos el 95%. El hidroxitirosol (HT) obtenido era soluble en agua, disolvente que utilizamos para su administración por sonda a un grupo de ratones Balb/c machos adultos. Al mismo tiempo, otro grupo de igual número de ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ) recibía un volumen idéntico del vehículo. Se utilizó una concentración de hidroxitirosol de 0.5g/Kg de peso de ratón y día, habiendo demostrado previamente la inocuidad de esta dosis. El sondaje se llevó a cabo diariamente durante un mes, tiempo tras el cual se sacrificó a los animales y se analizaron diversos parámetros inmunitarios (Material y Métodos, apartado 6.1.2.). En este periodo no se observaron cambios en el aspecto o en la conducta de los animales además de presentar evoluciones semejantes en su crecimiento (Figura 8.5).



**Figura 8.5.** Evolución de los pesos de los ratones desde el momento en que empiezan a ser sondados con HT. Los resultados son la media de los individuos de cada grupo ( $n = 10/\text{grupo}$ ).

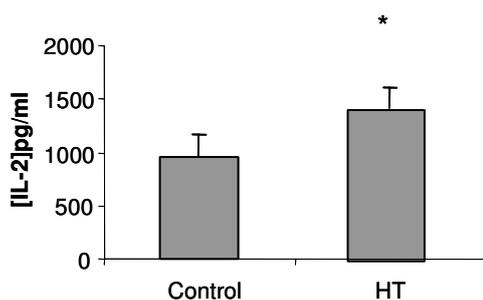
Entre los resultados obtenidos cabe destacar el incremento significativo de la proliferación de linfocitos T y B procedentes del bazo de ratones tratados con hidroxitirosol (Figura 8.6A). La mayor proliferación linfocitaria en el grupo HT se reflejó

también en el tamaño del bazo y en el número de células del mismo, parámetros que estaban aumentados en el grupo de animales tratados con HT (Figuras 8.6B y 8.6C).



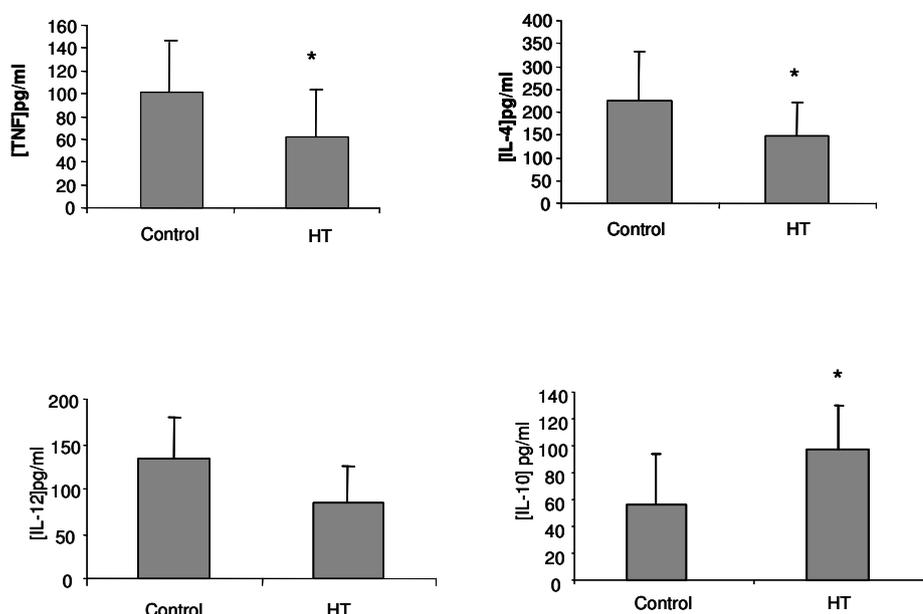
**Figura 8.6. El HT incrementa la proliferación de linfocitos y el tamaño del bazo y número de células del mismo.** A) Proliferación de linfocitos medida por incorporación de timidina tritiada tras la incubación con Con A durante 24 horas. Los resultados vienen dados en cuentas por minuto (cpm). B) Tamaño del bazo expresado como mg de bazo por g de ratón. C) Contenido de células del bazo dado por el nº de esplenocitos por mg bazo. Los resultados son la media±DE. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre el grupo HT y el control ( $n = 10$ /grupo).

De acuerdo con la mayor proliferación de linfocitos, los niveles de IL-2 en el sobrenadante de los mismos, fueron significativamente mayores en el grupo HT (Figura 8.7). Sin embargo, ésta era la única citocina Th1 de las analizadas cuya producción fue aumentada por los linfocitos de ratones que habían consumido HT.



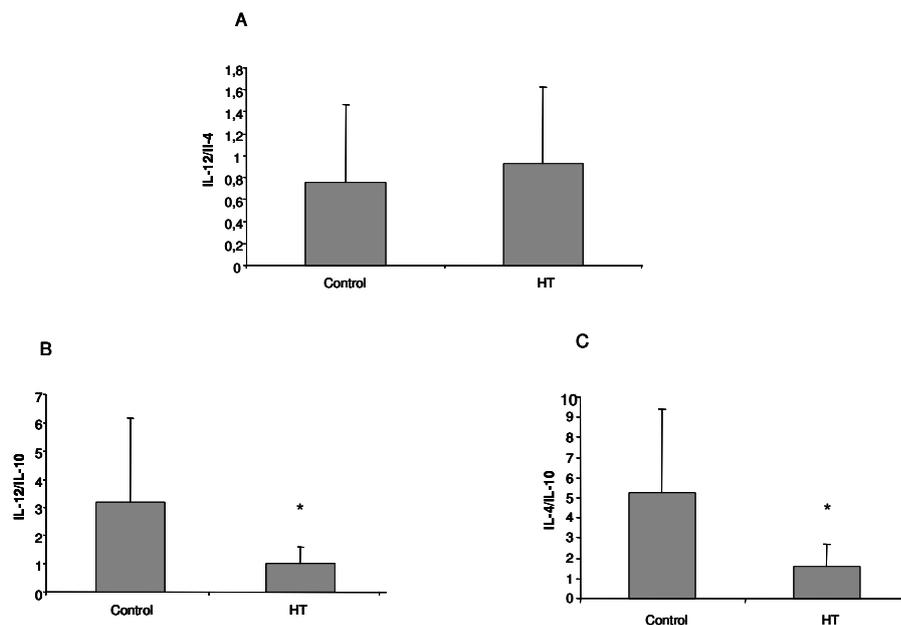
**Figura 8.7. El HT aumenta la producción de IL-2 por los linfocitos.** Medida de la concentración de IL-2 por ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A durante 48h y expresada en pg/ml. ( $n = 10$ /grupo). Los resultados son expresados como la media±DE, \*  $p < 0.05$  entre el grupo HT y control.

Los niveles de otras citocinas Th1 como IL-12 y TNF $\alpha$  (Figura 8.8) fueron también disminuidos por el consumo de hidroxitirosol, resultado que sugiere un claro papel antiinflamatorio de este compuesto antioxidante. La respuesta Th2 también fue analizada, observándose que la secreción de IL-4 por parte de linfocitos estimulados era menor en los ratones que recibieron hidroxitirosol (Figura 8.8). Además de estos resultados, en los mismos cultivos de linfocitos del grupo HT, se apreció un incremento de la citocina inmunoreguladora IL-10 comparado con los cultivos del grupo control (Figura 8.8). Este aumento de IL-10 podría explicar el mecanismo por el cual el hidroxitirosol disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias al tiempo que inhibe la secreción de citocinas Th2.



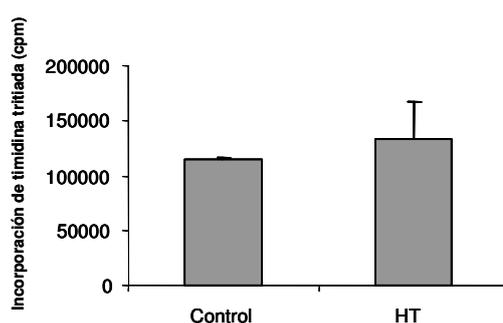
**Figura 8.8. El HT disminuye las respuestas Th1 y Th2.** Concentración de citocinas medida por ELISA, en los sobrenadantes de linfocitos cultivados en presencia de ConA. Los resultados vienen dados en pg/ml y son la media $\pm$ DE. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre los grupos control y HT (n = 10/grupo).

Al analizar las relaciones entre las concentraciones de citocinas obtenidas en los sobrenadantes de los linfocitos cultivados, se observa que la relación IL-12/IL-4 muestra un equilibrio en la respuesta Th1-Th2 (Figura 8.9A); El ratio IL-12/IL-10 disminuyó significativamente en el grupo HT, sugiriendo el predominio de un estado anti-inflamatorio (Figura 8.9B); por último, el ratio IL-4/IL-10 indica el efecto inmunosupresor ejercido por el HT, llevando a la reducción también de la respuesta Th2 (Figura 9C).



**Figura 8.9.** Las relaciones entre la concentración de citocinas muestran el efecto inmunosupresor del HT. A) IL-12/IL-4; B) IL-12/IL-10 y C) IL-4/IL-10. Los resultados son la media ± DE. \* $p < 0.05$  entre el grupo control y el HT (n = 10/grupo).

El efecto del hidroxitirosol como potenciador de la proliferación, solo ocurrió a nivel de los linfocitos del bazo, ya que en los BMDM en presencia de M-CSF como factor de crecimiento, no se observó cambio en la proliferación (Figura 8.10).



**Figura 8.10.** El HT no modifica la proliferación de BMDM. Proliferación de macrófagos estimulados con L-cell, portador de M-CSF y medida por incorporación de timidina tritiada y expresada en cpm. Los resultados vienen expresados como la media ± DE. (n = 10/grupo).

También se analizó el perfil de citocinas producidos por los macrófagos derivados de los ratones de uno u otro grupo, descubriendo que el HT en este caso no modificaba los niveles de citocinas proinflamatorias (Tabla 8.3). Sin embargo, al mismo tiempo se observó que los macrófagos procedentes de ratones del grupo HT, secretaban

cantidades de IL-10 significativamente mayores a la producidas por macrófagos del grupo control (Tabla 8.3). Aunque en este caso, dicha IL-10 parece que no sea capaz de actuar sobre los macrófagos para inhibir la producción de mediadores inflamatorios, su presencia debe estar colaborando en general para la creación del ambiente antiinflamatorio propio de los ratones que consumieron HT.

**Tabla 8.3.** Concentración de citocinas en sobrenadante de macrófagos

	Control	HT
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	2586.6 $\pm$ 243.1	2255.1 $\pm$ 210.9
<b>IL-12</b>	2210.03 $\pm$ 266	2453.03 $\pm$ 241.8
<b>IL-10</b>	96.7 $\pm$ 23.9	126.3 $\pm$ 66.4*

Los macrófagos fueron estimulados con LPS durante 24 horas y las determinaciones se llevaron a cabo por ELISA. Los resultados son la media $\pm$ DE; \*p<0.05 entre el grupo control y el grupo HT. (n = 10/grupo).

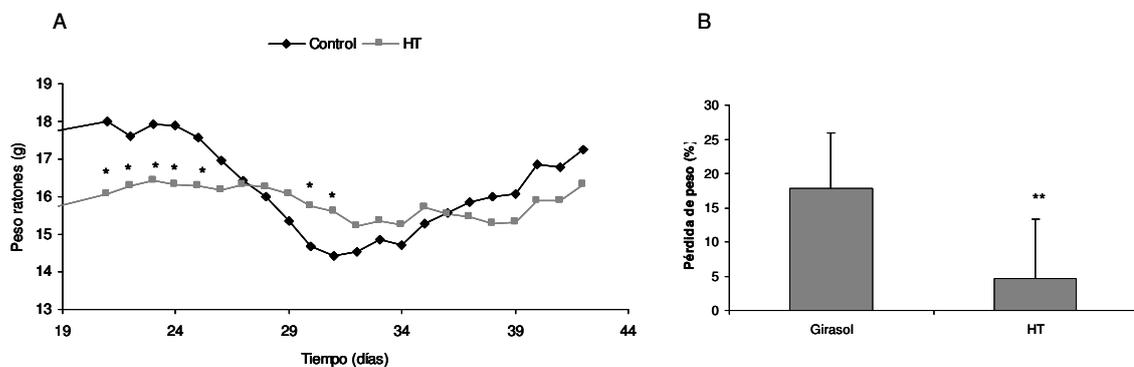
Por último, se estudió como afectaba el HT a las defensas antioxidantes del organismo por medio de la medida en plasma de MDA (malondialdehído). Se observó como el HT era capaz de disminuir los niveles de MDA en plasma, aunque dicho descenso no fue significativo, a pesar de la capacidad antioxidante ampliamente descrita para el HT. Probablemente el leve efecto observado a este nivel sea debido a que no existe un estrés oxidativo en ese momento sobre el que el HT pueda actuar, puesto que el estudio se realizó en animales sanos.

### 8.2.2. Efecto del hidroxitirosol sobre un modelo de esclerosis múltiple

Debido al papel antiinflamatorio observado y al papel fundamental que poseen los antioxidantes sobre los desórdenes ocurridos durante la esclerosis múltiple, se decidió probar el hidroxitirosol en un modelo animal de encefalitis autoinmune experimental recurrente (EAE). Los animales fueron alimentados con dieta a base de aceite de girasol durante los 42 días que duró el experimento al tiempo que se les suministraba una dosis de hidroxitirosol de 10mg/ratón/día en el agua de bebida (n = 12/grupo). Otro grupo semejante, usado como control, recibía el agua de bebida sin ningún añadido. A los 21 días de que se les empezase a suministrar HT, se les indujo la enfermedad según el protocolo indicado en Material y Métodos (apartado 6.1.3.). El compuesto se administró hasta dos

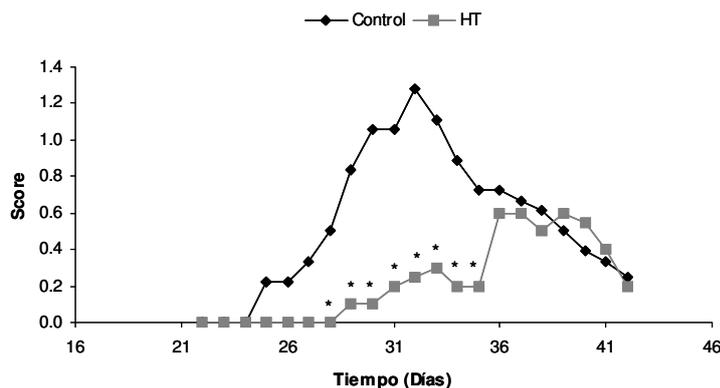
semanas después. Cuando los animales fueron sacrificados. Durante todo el estudio se analizó detenidamente la pérdida de peso, la conducta, el aspecto y se asignó un *score* diario en función de los síntomas que fuesen manifestando, según se explica en el Material y Métodos (apartado 6.1.3.).

Aunque existían diferencias entre los pesos de los que partieron los roedores y éstas se mantuvieron durante los días previos a la inmunización ya que el HT no alteraba el crecimiento normal de los animales, se apreció como desde la inmunización, la caída de peso fue más brusca en los ratones del grupo control, mientras que en los ratones del grupo HT el peso apenas disminuyó (Figura 8.11A). En la Figura 8.11B se representa la pérdida de peso sufrida por los animales de ambos grupos desde el día de la inmunización hasta dos semanas después, momento en que los roedores empezaron a recuperarse del primer brote.



**Figura 8.11. El HT previene la caída brusca de peso de los ratones durante el proceso de EAE.** A) Evolución del peso de los ratones inmunizados. B) Pérdida de peso experimentada entre los días 21 y 34 del experimento, es decir desde la inmunización hasta el inicio de la recuperación. Los resultados son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre el grupo control y el grupo HT ( $n = 9/\text{grupo}$ ).

Si se analizan los *scores* asignados durante la enfermedad, se observa como tres días después de la inmunización ya empiezan a observarse síntomas de la enfermedad en el grupo control, mientras que la manifestación de síntomas se retrasa cinco días en el grupo HT, siendo éstos bastante más leves que en el grupo control durante prácticamente todo el curso de la enfermedad. Este aumento brusco de los *scores* en el grupo control coincide con el llamativo descenso de peso observado, al igual que la escasa variación de peso en el grupo HT coincide con una mayor levedad de la patología (Figura 8.12).



**Figura 8.13. El HT disminuye la gravedad de la EAE.** Media de los *scores* asignados a cada animal, cada día desde la inmunización. \*  $p < 0.05$  entre los animales inmunizados de los grupos control y HT ( $n = 9/\text{grupo}$ ).

Diversos parámetros clínicos fueron analizados a lo largo del estudio con el fin de valorar el curso de la enfermedad y el posible efecto del hidroxitirosol (Tabla 8.4).

**Tabla 8.4.** Parámetros clínicos determinados en los ratones del grupo HT y de su control a los que se indujo EAE.

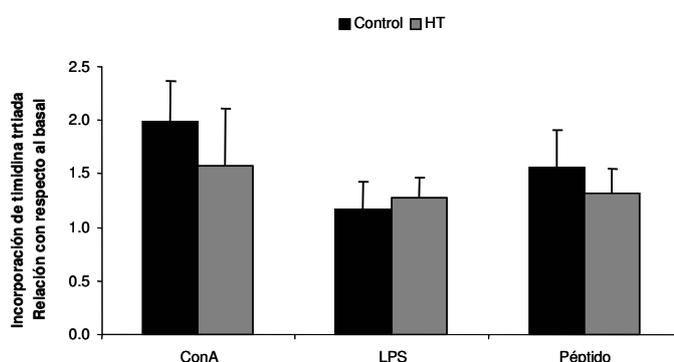
	Control	HT
<b>Incidencia</b>	8/9	5/9
<b>Mortalidad</b>	0/9	0/9
<b>Inicio</b>	13.71±1.8	19.4±3.91**
<b>Cronicidad</b>	11.69	5.33*
<b>Duración</b>	11.25±3.9	7.8±3.1
<b>Gravedad</b>	2.01±0.9	1.4±0.5
<b>Morbilidad</b>	9.3±4.3	4.09±4.5 *
<b>Recuperación</b>	0.29±0.2	0.22±0.4

$p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre los grupos control y HT;  
En el Material y Métodos se definen los parámetros estudiados.

Según estos datos existe un efecto claro del HT, que disminuyó la instauración de la enfermedad, reduciendo así la incidencia en este grupo. Además, se observa como el HT fue capaz de retrasar el inicio de la patología de manera significativa con respecto al control, y como consecuencia su duración y su cronicidad son menores. La gravedad fue bastante menor en el grupo HT aunque la significación estadística no se alcanzó ( $p = 0.08$ ). Sin embargo, sí que fue significativo el descenso de la morbilidad con HT, ya que como se había comentado antes la pérdida de peso en los ratones inmunizados fue inferior a los animales tratados con HT. En ambos grupos los ratones se habían recuperado

prácticamente en el momento del sacrificio, y por dicho motivo no se realizaron estudios histológicos de los cerebros o columnas vertebrales de estos animales en búsqueda de signos característicos de esta enfermedad.

Por último, también se analizó la proliferación de linfocitos. En este caso, la proliferación general no específica de linfocitos T así como la proliferación antígeno-específica frente al péptido inductor de la enfermedad, disminuyó en los ratones enfermos tratados con HT, aunque en ningún caso alcanzó significación estadística (Figura 8.13). La proliferación de células B no se afectó, probablemente por su escasa implicación en el proceso patológico.



**Figura 8.13. El HT tiende a disminuir la proliferación de linfocitos.** Medida de la proliferación linfocitaria realizada por incorporación de timidina tritiada en linfocitos cultivados 24 horas en presencia de ConA, LPS o PLP<sub>139-151</sub>. Los resultados vienen expresados como el cociente: cpm en linfocitos estimulados/cpm en linfocitos no estimulados, y son la media±DE (n = 10/grupo).

Según estos datos, el hidroxitirosol parece ser un compuesto útil en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Su descrita capacidad antioxidante, así como los efectos anti-inflamatorios que produce, podrían ser los responsables de su eficacia en el tratamiento de la EAE. Sería necesario llevar a cabo más experimentación animal, usando diversas concentraciones del compuesto, y llevando a cabo diferentes medidas bioquímicas e inmunológicas que nos permitan obtener datos más certeros. El alargamiento en el tiempo de los estudios y el uso de un modelo de EAE crónico resultarían de gran utilidad para continuar con éxito estas investigaciones.

### **8.3. Efectos beneficiosos del aceite de oliva en un proceso inflamatorio intestinal inducido en ratas.**

Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los efectos anti-inflamatorios descritos para el aceite de oliva a nivel del sistema inmunitario parecen estar mediados más por su fracción insaponificable que por el propio contenido del ácido oleico, aunque este hubiera mostrado un ligero carácter inmunosupresor.

Para completar estos estudios, finalmente se analizó el efecto de un aceite de oliva extra virgen (rico en la fracción insaponificable) en un modelo inflamatorio puesto que los resultados anteriores se habían obtenido principalmente en animales sanos. Este estudio permitiría comprobar el efecto anti-inflamatorio del aceite de oliva y sus constituyentes.

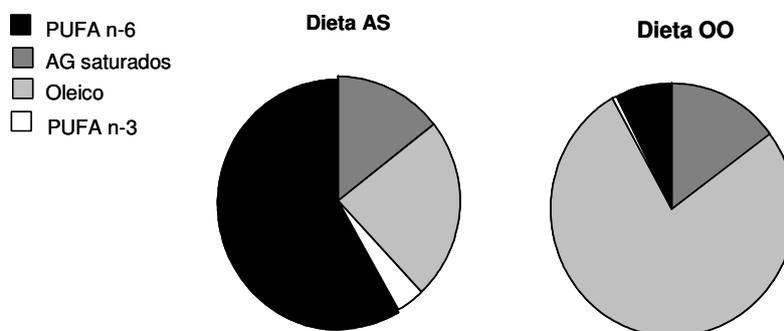
Para ello, se decidió analizar el posible efecto terapéutico de una dieta rica en aceite de oliva extra virgen en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) en ratas. Aunque poco se sabe del papel del aceite de oliva en la inflamación intestinal, recientemente se ha publicado la capacidad del ácido oleico de proteger células del músculo liso intestinal frente a radicales libres (Alzoghaibi MA y col, 2003), lo que nos hizo pensar que nuestras dietas ricas en aceite de oliva podrían mejorar el curso de la enfermedad inducida en los roedores.

Se utilizó un modelo de IBD donde se producían cambios histológicos y bioquímicos semejantes a los que ocurren en la variante humana de la enfermedad (Gaudio E y col, 1999 y Kullmann F y col, 2001). Así, el experimento constó de tres grupos de ratas (n = 10/grupo); en uno de ellos no se indujo la enfermedad y recibió una dieta rica en aceite de soja refinado (Dieta AS) durante todo el estudio; a los otros dos grupos, que recibieron dieta AS o bien dieta rica en aceite de oliva (Dieta OO), se les indujo la inflamación intestinal según se indica en el Material y Métodos (apartado 6.1.4.). Tras el sacrificio después de un mes de estudio, las ratas fueron sacrificadas y diferentes muestras fueron analizadas.

El análisis en la composición de ácidos grasos de las dietas muestra que la principal diferencia entre las dos dietas suministradas era el contenido de ácido oleico, que pasa de un 22% en la dieta AS a un 73% en la dieta OO. En la dieta AS el ácido oleico es sustituido por ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico, hecho que supone el incremento del ratio n-6/n-9 pero sin embargo no del ratio n-6/n-3 en esta dieta en comparación con la dieta OO. Por tanto, los efectos observados tras la administración de la dieta OO serán debidos principalmente a la actuación del ácido oleico y a su fracción no saponificable (Tabla 8.5).

**Tabla 8.5.** Composición de ácidos grasos de las dietas AS y OO suministradas a las ratas para probar su eficacia en un modelo de inflamación intestinal. Los resultados vienen expresados en g/100 g de grasa.

	<b>Dieta AS</b>	<b>Dieta OO</b>
Palmítico (C16:0)	12.5	11.8
Palmitoléico (C16:1 n-7)	nd	0.9
Estearico (C18:0)	2.1	3.0
<b>Oleico (C18:1 n-9)</b>	<b>22.0</b>	<b>73.2</b>
Octadecaenoico (C18:1 n-7)	1.1	2.3
<b>Linoleico (C18:2 n-6)</b>	<b>58.0</b>	<b>7.5</b>
Ábico (C18:3 n-3)	3.7	0.5
Araquidónico (C20:4 n-6)	nd	nd
Eicosapentaenoico (C20:5 n-3)	nd	nd
Docosahexanoico (C22:6 n-3)	nd	nd
<b>ratio n-6/n-9</b>	<b>2.6</b>	<b>0.1</b>
<b>ratio n-6/n-3</b>	<b>15.7</b>	<b>14.0</b>



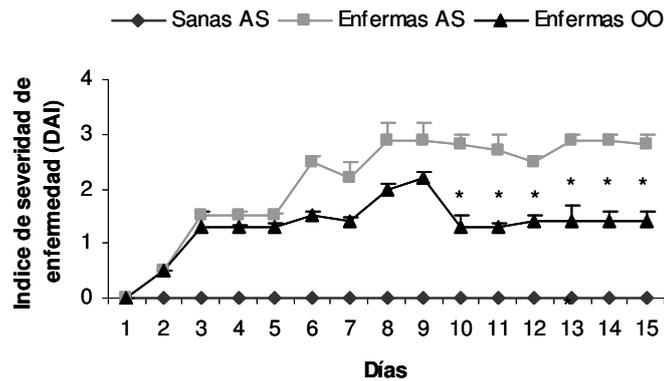
Al llevar a cabo el acidograma del plasma y de tejidos como hígado y colon, el primer dato que llamó la atención es que no se produjeron cambios significativos en la composición de ácidos grasos de los mismos al inducir la enfermedad. Los cambios que habíamos detectado antes en la composición de las dietas se tradujeron de igual modo en cambios en la composición lipídica de los tejidos. En consecuencia, los tejidos procedentes de ratas del grupo AS poseían mayor contenido de PUFAs por la presencia de linoleico y  $\alpha$ -linoléico, así como una reducción del ratio n-6/n-9 en los del grupo OO debido a la acumulación de ácido oleico (Tabla 8.6).

**Tabla 8.6.** Composición de ácidos grasos de plasma, hígado y colon procedentes de ratas en las que se indujo IBD y que fueron alimentadas con las dietas AS o OO.

	Plasma		Hígado		Colon	
	AS	OO	AS	OO	AS	OO
Palmitico (C16:0)	21,1±2,6	18,8±2,1	19,2±1,3	21,1±2,6	22,5±1,3	21,8±1,6
Esteárico (C18:0)	16,3±3,5	18,5±2,6	21,8±1,1	23,4±1,4*	11,8±4,2	12,5±3,1
Oleico (C18:1 n-9)	10,6±2,1	22,2±8,1 *	7,4±2,1	14,1±2,1*	19,5±4,6	27,4±4,1*
Linoleico (C18:2 n-6)	23,9±6,3	5,4±4,1 *	12,8±2,3	5,0±0,6*	18,5±5,4	10,0±3,1*
A-Linolénico (C18:3 n-3)	0,9±2,4	1,0±2,0	0,1±0,2	nd	0,7±0,5	0,8±0,9
Araquidónico (C20:4 n-6)	18,0±6,9	21,4±6,2	21,4±2,6	22,9±1,2	10,9±4,9	11,3±4,1
Eicosapentaenoico (C20:5 n-3)	0,2±0,2	0,3±0,3	0,2±0,1	0,1±0,2	0,2±0,3	0,1±0,1*
Docosahexaenoico (C22:6 n-3)	3,2±0,7	2,4±0,3	7,0±1,3	6,6±0,5	1,4±0,6	1,3±0,4
Total Saturados	38,4±6,1	38,5±2,3	42,0±2,5	41,9±1,3	36,1±3,6	35,9±2,9
Total MUFA	13,7±2,9	27,7±10,6 *	12,0±3,4	19,8±1,8*	27,0±5,4	35,7±4,9*
Total PUFA	46,4±8,3	30,5±2,7 *	42,9±4,1	35,4±1,3*	33,3±1,6	24,7±2,6*
Total n-3	4,3±2,2	3,7±2,0	8,2±1,5	6,9±0,4*	2,6±0,9	2,4±1,4
Total n-6	42,1±8,7	26,8±3,0 *	34,6±3,4	28,5±1,1*	30,3±1,4	22,0±2,5*
Total n-9	11,3±2,5	22,7±7,5 *	7,7±2,7	14,1±2,1*	19,5±4,6	28,0±4,3*
Ratio n-6/n-9	3,9±1,2	1,3±0,4 *	5,0±1,8	2,1±0,4*	1,6±0,5	0,8±0,2*
Ratio n-6/n-3	11,4±4,1	8,8±3,8	4,4±1,1	4,1±0,3	12,8±4,9	11,7±6,7

Los valores representan el % de ácidos grasos en los diferentes tejidos y se expresan como la media±DE. La significación estadística entre los grupos AS y OO se expresa como \* p<0.05 (n = 10/grupo).

Una de las ventajas de este modelo es que permite evaluar externamente los daños causados de modo sencillo. Para ello se llevó a cabo un control exhaustivo de la evolución de los animales, asignando un DAI (Índice de severidad de enfermedad) a cada día en función de los síntomas observados. De esta forma, se obtuvo una gráfica que nos permitió comparar la evolución de la enfermedad entre los diferentes grupos (Figura 8.14). A partir del día tres de administración de DSS, los DAI de los grupos de ratas enfermas fueron significativamente mayores a los de las ratas sanas. Se observa como las ratas que se alimentaron a base de dieta rica en aceite de oliva presentaron síntomas más leves que aquellas que lo hicieron a base de aceite de soja, alcanzándose a tiempo final un DAI de 2.8 en el grupo AS frente a un 1.4 en el grupo OO, dato que fue estadísticamente significativo.



**Figura 8.14. Menor gravedad del proceso inflamatorio en las ratas del grupo OO.** Evolución del DAI (Índice de severidad de la enfermedad) a lo largo de los 15 días que dura el estudio tras la inducción de la enfermedad (n = 10/grupo). Cada punto se expresa como la media±DE de los DAI diarios. \* p<0.05 entre los grupos AS y OO.

Una vez llevado a cabo el sacrificio de los animales, se observó que el intestino de las ratas sufría un incremento en grosor con la enfermedad que se midió como el incremento de la relación peso/longitud. El hecho de que en el grupo OO este incremento no fuese tan importante sugiere de nuevo el papel protector del aceite de oliva (Tabla 8.7).

Con el fin de comprobar el estado del tejido tanto sano como dañado, se llevaron a cabo cortes histológicos del colon, la porción del intestino más afectada por el tratamiento con DSS. En función del daño observado a nivel microscópico en las secciones de colon, se asignó un *score* (Material y Métodos, Tabla 7.4.), que permitió analizar el efecto ejercido por la dieta OO.

En comparación con las ratas sanas, el tejido procedente de ratas enfermas y alimentadas con dieta AS, estaba profundamente dañado, apreciándose ulceración y una severa infiltración de células inflamatorias en la lámina propia y la submucosa. En el tejido derivado de las ratas que consumían la dieta OO, la lesión inflamatoria era bastante menor. En este grupo, solo dos de las ratas presentaron ulceración de la mucosa, afectando al 50% de la superficie y acompañado de una importante infiltración de macrófagos, granulocitos e incluso de linfocitos. En el resto de las ratas se observó una restauración casi completa del tejido dañado, mostrando una infiltración celular más moderada y focalizada (datos no mostrados). En la Tabla 8.7 se muestran los datos de este *score* asignados a las diferentes regiones analizadas del colon, observándose que en general, la dieta OO reduce el daño, aunque solo existieron diferencias significativas a nivel de submucosa.

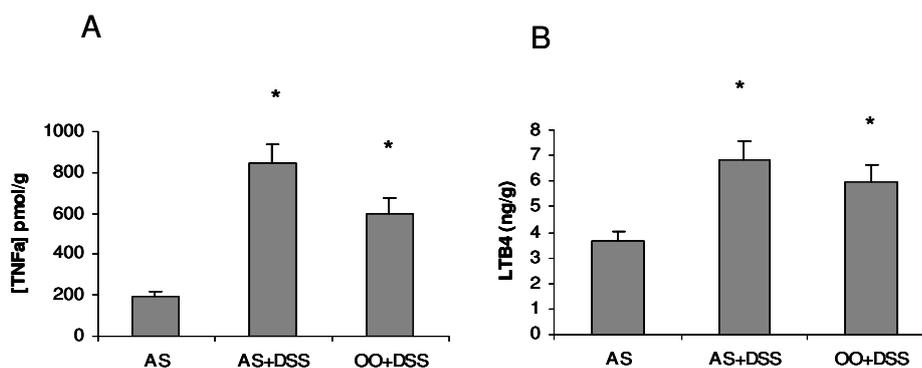
Para valorar la gravedad del desorden inflamatorio desencadenado por el DSS, se midieron diversos parámetros bioquímico e inmunitarios. En este sentido, la actividad MPO estaba significativamente incrementada en los intestinos procedentes de ratas que padecieron IBD, demostrándose, por tanto, el correcto funcionamiento del modelo, ya que indica que durante el proceso inflamatorio, los leucocitos habían acudido masivamente al foco del daño. Los animales enfermos que ingirieron la dieta OO presentaron valores de esta actividad menores a los animales enfermos del grupo AS, aunque la diferencia no fue significativa (Tabla 8.7).

**Tabla 8.7.** Parámetros analizados para medir el daño ejercido por el DSS: relación peso/longitud del colon, MPO en colon y *scores* asignados tras el estudio microscópico de los cortes histológicos.

	<b>Sanas AS</b>	<b>Enfermas AS</b>	<b>Enfermas OO</b>
<b>Peso/longitud colon (mg/cm)</b>	64.9±1.6	100.6±6.01**	84.2±5.7
<b>MPO (U MPO/g)</b>	15.1±4.1	130.9±6.7**	115.3±21.1**
<b>Score microscópico del colon</b>			
Mucosa epitelial	0	1.7±0.3	0.7±0.4
Criptas	0	4.7±0.7	3.9±0.7
Lámina propia	0	4.1±0.6	3.6±0.5
Submucosa	0	4.7±0.5	21.1±0.5#

Los resultados son la media±DE, \*\* p<0.01 con respecto al grupo AS sanas; # p<0.05 con respecto al grupo AS enfermas (n = 10/grupo).

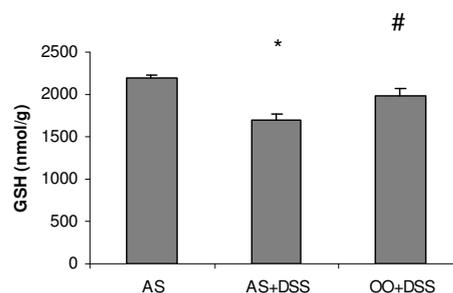
Los mediadores inmunitarios propios de la inflamación también aumentaron en el tejido lesionado al final del experimento, fenómeno que habrá contribuido a agravar la enfermedad intestinal. En respuesta a la lesión generada se disparó la producción de TNF $\alpha$ , que sin embargo, no fue tan elevada en el caso de ratas que ingirieron dieta OO (Figura 8.15A). También se comprobó que en los intestinos inflamados de las ratas enfermas existían contenidos elevados de LTB $_4$ , eicosanoide de marcado poder inflamatorio. Sin embargo, en los animales que consumieron la dieta OO, la síntesis de este mediador se vio disminuida, aunque de nuevo, dicha disminución no alcanzó significación estadística (Figura 8.15B).



**Figura 8.15. La dieta OO reduce la inflamación por medio de la disminución de mediadores inflamatorios.** A) Medida de TNF $\alpha$  en colon expresada como pmol/ g tejido. B) Medida de LTB $_4$  en colon expresado como ng/g de tejido (n =10/grupo). \* p<0.05 entre los valores del grupo de ratas sanas y las enfermas (n = 10/grupo).

Otra de las ventajas que la dieta OO aportó a las ratas enfermas fue el restablecimiento de los niveles de GSH, que disminuyeron durante el proceso inflamatorio como consecuencia de un mayor consumo. En este caso, se trató de un efecto bastante marcado, que alcanzó significación estadística respecto a la dieta AS enfermas (Figura 8.16) y que apunta a un posible efecto antioxidante para el aceite de oliva.

**Figura 8.16. La dieta OO restablece los niveles de GSH en el colon de ratas enfermas.** Niveles de GSH en colon expresado como nmol/g tejido. \* p<0.05 entre las ratas sanas y los dos grupos de ratas enfermas; # p <0.05 entre ratas enfermas ( n = 10/grupo).



A pesar del efecto beneficioso observado para el aceite de oliva en el modelo de IBD y la reducción de la mayoría de los parámetros inflamatorios analizados, solo en el caso de los niveles de GSH se observa una diferencia significativa con respecto a los animales tratados con la dieta AS.

Estos resultados sugieren que quizás, y tal y como se habían observado en los estudios con animales sanos, el ácido oleico *per se* no es capaz de ejercer un potente efecto sobre la respuesta inflamatoria, mientras que es la fracción insaponificable aquella que tiene un papel principal en este aspecto. A pesar de que en el estudio de IBD el aceite de oliva virgen contenía esta fracción insaponificable y así se demuestra por su efecto sobre las defensas antioxidantes (GSH), quizás su concentración no es suficiente para poder alcanzar resultados con significación estadística en un modelo de inflamación agresiva como es este caso.



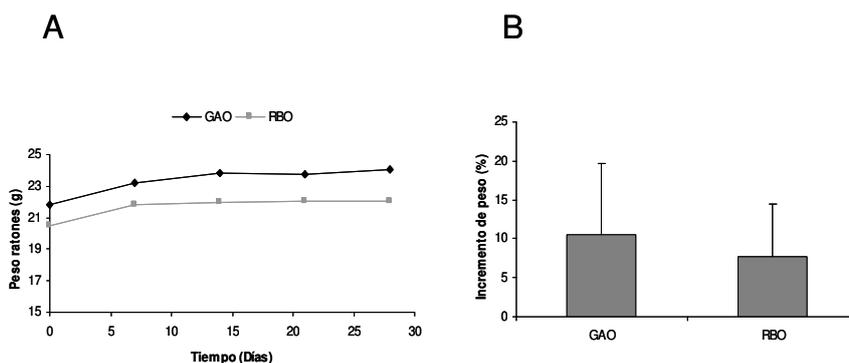
## **9. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EJERCIDA POR EL ACEITE DE SALVADO DE ARROZ**

El aceite de salvado de arroz (RBO) es rico en PUFAs, especialmente en ácido linoleico, precursor de la familia de ácidos grasos n-6. También se caracteriza, al igual que el aceite de oliva, por poseer una compleja fracción insaponificable, donde el principal componente es el  $\gamma$ -orizanol, un conjunto de antioxidantes al que se han atribuido numerosas propiedades, entre ellas la capacidad de reducir en sangre colesterol y triglicéridos (Sugano M y col, 1999). Por este motivo, algunas poblaciones incluyen en sus dietas aceite de salvado de arroz con el objeto de beneficiarse de los diversos efectos que ejerce sobre la salud. Sin embargo, nada se ha descrito hasta ahora sobre los efectos del aceite de salvado de arroz y de sus múltiples componentes sobre el sistema inmununitario. Tanto los ácidos grasos que constituyen la fracción saponificable, como el conjunto de moléculas capaces de actuar sobre el estrés oxidativo que forman su fracción no saponificable, podrían ejercer un efecto regulador sobre los sistemas de defensa del organismo. Con el objetivo de profundizar en estos aspectos, se plantearon una serie de experimentos donde se determinaron los efectos inmunitarios del aceite de salvado de arroz, así como la intervención de sus diversos componentes en dicho efecto.

### **9.1 Efectos inmunitarios del aceite de salvado de arroz en ratones sanos**

Se diseñó un estudio experimental donde dos grupos de ratones machos Balb/c (n = 10/grupo) fueron alimentados durante un mes con dietas semejantes, en las que la única diferencia radicó en la fuente de grasa empleada para su elaboración. Un grupo se alimentó con una dieta que incluía aceite de girasol alto oleico (GAO), usado como control, mientras que el otro grupo ingirió una dieta donde la grasa incluida fue aceite de salvado de arroz crudo (RBO) (Material y Métodos, apartado 6.1.5.).

Durante el estudio no se observó diferencia en la conducta o aspecto de los animales. Del mismo modo, el crecimiento de los animales fue similar en ambos grupos y el adecuado según sus características (Figura 9.1). Además del peso de los animales, se controló la cantidad de dieta que consumieron diariamente, no encontrándose diferencias entre los dos grupos. Este consumo diario fue de  $6.2 \pm 0.8$  g/día de dieta por ratón.

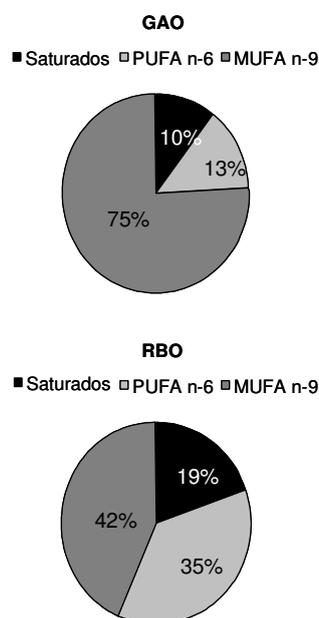


**Figura 9.1.** A) Evolución de la ganancia de peso. B) Incremento de peso de los animales. Los resultados son la media $\pm$ DE (n = 10/grupo). No existe diferencia estadística.

En la Tabla 9.1 se detallan los resultados del análisis del perfil de ácidos grasos de cada una de las dietas tras su elaboración. Como se puede observar, las principales diferencias radicaron en los contenidos de ácidos oleico y linoleico, que determinaron una diferencia importante en el ratio n-9/n-6 (5.6 vs 1.2, GAO vs RBO) Otra dato relevante fue la mayor cantidad de ácido palmítico en la dieta RBO.

**Tabla 9.1.** Composición en ácidos grasos de las dietas expresado en g/100 g de grasa. Nd, no detectado.

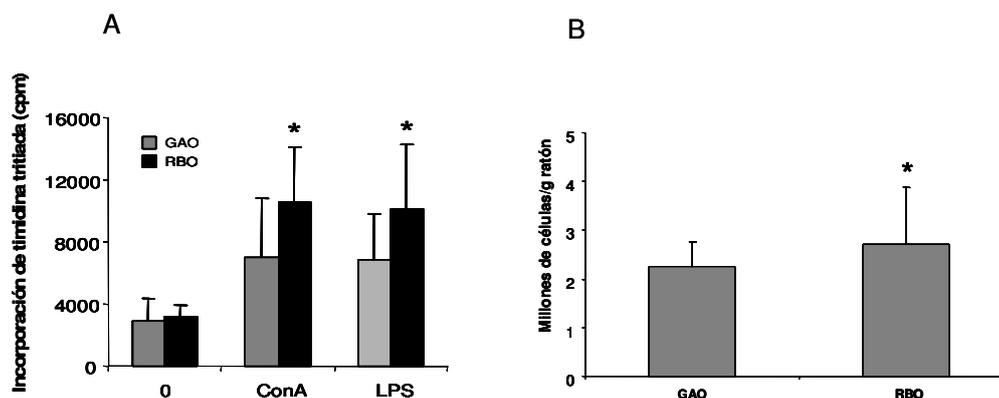
	GAO	RBO
C10:0	0.11	0.07
C12:0	0.05	nd
C14:0	0.07	0.43
C16:0	5.14	16.27
C16:1	0.12	0.21
C17:0	0.04	nd
C18:0	4.04	1.84
<b>Ac. oleico C18:1n9c</b>	<b>75.14</b>	<b>41.92</b>
C18:1n7	nd	0.89
C18:2n6it	0.51	nd
<b>Ac. Linoleico C18:2n6c</b>	<b>12.98</b>	<b>35.44</b>
C18:3n6 (gamma)	0.05	nd
C18:3n3 (alpha)	0.15	1.24
C18:3n4	0.05	nd
C20:1n9	0.23	0.49
C21:0	0.04	nd
C22:0	0.75	0.17
C24:0	0.2	0.36
C22:5n6	nd	0.05



Basándonos en el acidograma y en los valores de la ingesta diaria, se pudo calcular la cantidad de ácido oleico y linoleico que consumía un animal, observándose que los ratones pertenecientes al grupo GAO consumieron de media  $40\pm 0.5$  mg/día de ácido

linoleico frente a los  $110 \pm 1.5$  mg/día de dicho ácido que consumieron los ratones del grupo RBO. La ingesta de ácido oleico, por el contrario, fue superior en el grupo GAO ( $235 \pm 4.5$  mg/día), en comparación con el grupo RBO donde el consumo fue de  $130 \pm 2.5$  mg/día. Con estos datos podemos concluir que el grupo GAO estaba consumiendo una dieta rica en MUFA mientras que el grupo RBO consumía una dieta rica especialmente en PUFAs de la serie n-6, con un alto contenido de ácidos grasos saturados.

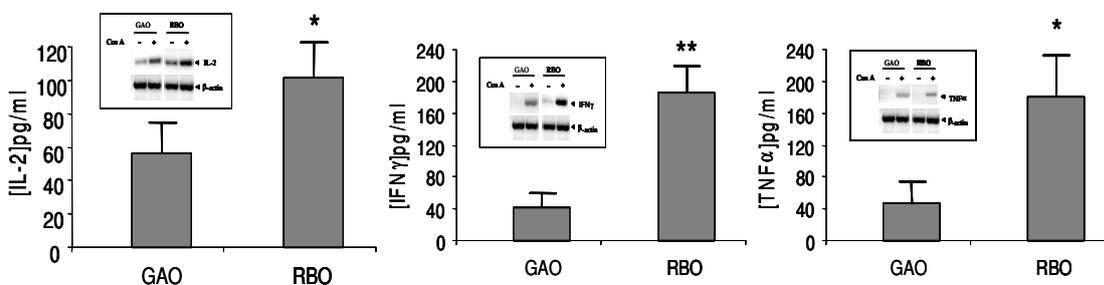
Tras estimar las diferencias entre las dietas, se determinó el efecto inmunitario que producía su consumo. Se llevó a cabo un ensayo de proliferación de linfocitos de bazo donde se apreció la mayor proliferación de linfocitos, tanto T como B, procedentes de los ratones que habían ingerido la dieta rica en aceite de salvado de arroz (Figura 9.2A). Este resultado fue confirmado por un incremento de esplenocitos por ratón en ese mismo grupo (Figura 9.2B).



**Figura 9.2 A) La dieta RBO incrementa la proliferación de linfocitos.** Proliferación de linfocitos T y B medida por incorporación de timidina tritiada y expresada en cpm. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  entre los grupos GAO y RBO. **B) El aceite de arroz incrementa el número de linfocitos.** Contaje de células del bazo por medio de cámara de Neubauer previa lisis de eritrocitos. Los resultados son expresados en función de la masa del ratón y son la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  entre los grupos GAO y RBO ( $n = 10$ /grupo).

Se estudió la correlación entre la proliferación y la activación de linfocitos para comprobar si la dieta rica en aceite de salvado de arroz era capaz de modificar la expresión y la producción de citocinas por estas células. De este modo y de acuerdo con el incremento en proliferación linfocitaria hallado, se apreció una mayor producción de IL-2 en los sobrenadantes de los linfocitos que habían consumido la dieta RBO. Esta no era la única citocina Th1 cuya producción era aumentada por los linfocitos, sino que además otras citocinas Th1 presentaron niveles superiores en el grupo RBO, como fue el caso de IFN- $\gamma$  o

TNF- $\alpha$ . Estos resultados obtenidos por ELISA fueron confirmados por RT-PCR (Figura 9.3). También se apreció un incremento de los niveles de IL-1 $\beta$  (23.29 $\pm$ 8.01 vs 76.1 $\pm$ 12.6 pg/ml, GAO vs RBO) y de IL-12 (199.1 $\pm$ 8.4 vs 266.9 $\pm$ 12.9 pg/ml, GAO vs RBO) que no alcanzaron significación estadística.

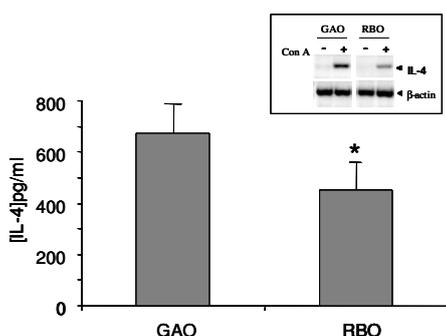


**Figura 9.3. La dieta RBO incrementa la producción y la expresión de citocinas Th1 por linfocitos.** Medida por ELISA de IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en sobrenadante de linfocitos estimulados con ConA durante 48h. Los resultados son la media $\pm$ DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 entre los dos grupos (n = 10/grupo). Medida de las expresión de las mismas citocinas por RT-PCR en linfocitos usando  $\beta$ -actina como control.

También hay que resaltar que la dieta RBO fue capaz de disminuir la producción de la citocina reguladora IL-10 (9.1 $\pm$ 8.8 vs 5.25 $\pm$ 4.3 pg/ml, GAO vs RBO). Debido a que la IL-10 es una citocina inmunosupresora (Kehlen A y col, 2004), esta disminución podría ser responsable del incremento en la expresión de las citocinas inflamatorias analizadas.

Esta exacerbación de la respuesta Th1 producida tras la ingesta de la dieta rica en aceite de salvado de arroz, no solo se percibió a nivel de los linfocitos sino que también en plasma se observó un incremento de estas mismas citocinas, como es el caso de los niveles de TNF $\alpha$  (192.38 $\pm$ 5.4 vs 244.13 $\pm$ 62.8 pg/ml; GAO vs RBO, p<0.05), que aumentaron de manera significativa.

Los linfocitos pertenecientes de ratones que ingirieron la dieta RBO producen menos cantidad de la citocina Th2 IL-4 en comparación con los que fueron alimentados con la dieta GAO (Figura 9.4).



**Figura 9.4. El aceite de arroz disminuye la producción y la expresión de IL-4 por linfocitos.** Medida por ELISA de IL-4 en sobrenadante de linfocitos estimulados con ConA durante 48h. Los resultados expresados en pg/ml son la media $\pm$ DE, \* p<0.05 entre los dos grupos (n = 10/grupo). Medida de las expresión de IL-4 por RT-PCR en linfocitos usando  $\beta$ -actina como control.

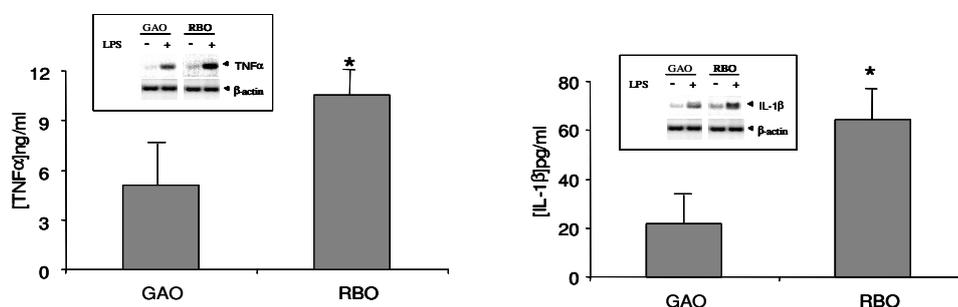
En plasma también se observó como los mediadores propios de la respuesta Th2 alérgica disminuyeron, como se indica en la Tabla 9.2, aunque solo en el caso de la IL-4 se alcanzó significación estadística.

**Tabla 9.2. La dieta RBO deprime la respuesta Th2.**  
Niveles de mediadores de la respuesta alérgica en plasma.

	GAO	RBO
<b>IL-5</b>	30.3±6.2	10.5±2.1
<b>IL-4</b>	7.6±2.3	4.1±1.7*
<b>IgE</b>	57.7±32.6	39.2±30.2
<b>IgG<sub>1</sub></b>	75.18±39.8	50.43±24.18
<b>Histamina</b>	10.32±2.2	3.11±0.9

Parámetros determinados mediante ELISA. Los resultados vienen expresados en pg/ml en las citocinas y en ng/ml en el caso de las inmunoglobulinas y la histamina, y son la media±DE, \* p<0.05 entre los grupos GAO y RBO (n = 10/grupo).

Por tanto, la dieta RBO modificó el comportamiento de linfocitos y alteró la respuesta inmunitaria, pero su efecto no acabó aquí. Su acción inmunoestimulante también se reflejó en los macrófagos, los cuales liberaron mayores cantidades de citocinas proinflamatorias como son el TNF- $\alpha$  o la IL-1 $\beta$  que los macrófagos procedentes de los ratones del grupo control (Figura 9.5). Incluso se observó una tendencia al aumento en la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de los macrófagos derivados de ratones que ingirieron la dieta RBO (8.2±2.2 vs 9.2±1.2 ng/ml; GAO vs RBO, p = 0.08). El hecho de que aumentase la PGE<sub>2</sub> sugiere que podría existir una elevada incorporación de ácidos grasos n-6 en los fosfolípidos de membrana de estas células, lo que podría llevar a un aumento en la producción de eicosanoides de las series 2 y 4, de marcado poder inflamatorio.



**Figura 9.5. Los macrófagos de ratones que consumieron la dieta RBO producen elevadas cantidades de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .** Medida de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mediante ELISA en sobrenadante de BMDM estimulados durante 24h con LPS. Los resultados son la media±DE, \* p<0.05 entre el grupo GAO y RBO (n = 10/grupo). Medida de la expresión de dichas citocinas por RT-PCR usando  $\beta$ -actina como control.

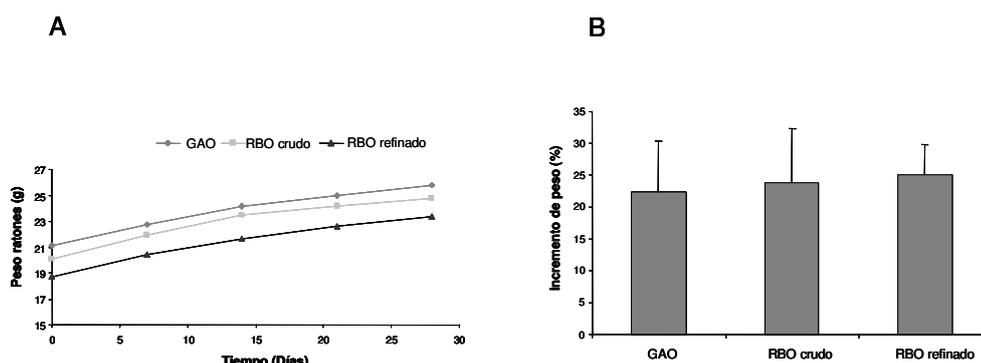
El análisis de las heces de los roedores de estos dos grupos, corrobora de nuevo la capacidad de la dieta RBO para estimular al sistema inmunitario. Se encontraron así valores de  $0.6 \pm 0.2$   $\mu\text{g}$  IgA/mg heces en los ratones del grupo GAO frente a  $2.6 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  IgA/mg heces en los animales del grupo RBO ( $p < 0.05$ ), a pesar de la disminución de la IL-10 y de la reducción de la respuesta Th2 necesaria para el *switching* de inmunoglobulinas.

Tomando el conjunto de los resultados obtenidos a lo largo de este experimento, parece que aceite de salvado de arroz incorporado en la dieta pueda potenciar la respuesta inmunitaria. Este aceite es capaz de estimular parámetros tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la específica sin la existencia de un agente externo que la induzca.

## **9.2 Efecto inmunitario ejercido por la fracción insaponificable del aceite de salvado de arroz**

Una vez definido el poder inmunorregulador del aceite de salvado de arroz, se consideró interesante averiguar que componente o componentes del mismo eran los responsables de dicho efecto, tal y como anteriormente habíamos también realizado para el aceite de oliva. El aceite de arroz se caracteriza por un alto contenido de ácido oleico y ácido  $\alpha$ -linoleico. Sin embargo, su fracción insaponificable, aquella que contiene los elementos minoritarios, es también en este caso de gran importancia, además de constituir un porcentaje superior al de otros aceites (Rukmini C y Raghuram TC, 1991). Se trata de una fracción compleja constituida principalmente por compuestos de actividad antioxidante. Puesto que el efecto beneficioso del aceite de salvado de arroz podía ser debido bien a su componente lipídico, bien a su fracción insaponificable o bien al conjunto de ambas, se planteó un estudio donde se comparó el aceite de salvado de arroz crudo empleado en el estudio anterior, con el mismo aceite de salvado de arroz pero refinado, es decir, que había sido desprovisto, en parte, de la fracción minoritaria. Durante el proceso de refinamiento se produce una gran pérdida de la fracción insaponificable, aproximadamente un 85% del total de la misma (Krishna AGG y col, 2001). Este hecho permite, en principio, atribuir a esta fracción, las diferencias entre los resultados obtenidos entre el grupo RBO crudo y el grupo RBO refinado, aunque siempre habrá que tener en cuenta que la dieta a base de RBO refinado no está exenta por completo del insaponificable.

En este experimento, cuyo diseño se indica en el apartado 6.1.6. del Material y Métodos, tampoco existieron diferencias entre los grupos de animales con respecto al crecimiento a lo largo del tiempo, al aspecto y al comportamiento de los roedores (Figura 9.10).



**Figura 9.10.** Evolución del crecimiento de los ratones alimentados con RBO aceite de arroz crudo o refinado. Incremento del peso expresado en porcentaje. Los resultados son la media $\pm$ DE (n = 10/grupo).

A pesar de que múltiples efectos se han atribuido a los componentes antioxidantes, como es el caso de su efecto beneficioso sobre el metabolismo lipídico, en este caso la acción inmunoestimulante que caracteriza al aceite de salvado de arroz parece ser debida, en mayor medida, a su composición en ácidos grasos, como se pudo deducir de las diversas medidas realizadas, a diferencia de lo que se observa en el aceite de oliva, donde los efectos inmunomoduladores parecen estar más asociados a la fracción insaponificable. En la Tabla 9.3 se resumen las medidas más interesantes llevadas a cabo, donde se aprecia que se repiten los resultados hallados en el experimento anterior que apuntan a una acción inmunoestimulante del aceite de salvado de arroz

**Tabla 9.3. La fracción insaponificable del aceite de salvado arroz no es la principal responsable de la inmunoestimulación.** Niveles de diversos parámetros relacionados con la respuesta inmunitaria.

	GAO	RBO crudo	RBO refinado
<b>Linfocitos</b>			
Proliferación	2833,2 $\pm$ 1291,2	3777,8 $\pm$ 1549,6 *	3922,9 $\pm$ 1683,6 *
Millones células/mg bazo	0,532 $\pm$ 0,2	0,744 $\pm$ 0,3 *	0,703 $\pm$ 0,1 *
IL-2	495,9 $\pm$ 138,3	549,4 $\pm$ 63,4	540,6 $\pm$ 88,9
IL-12	199,06 $\pm$ 60,1	266,87 $\pm$ 73,2	246,5 $\pm$ 80,3
TNF $\alpha$	49,12 $\pm$ 38,6	114,8 $\pm$ 68,4 *	210,3 $\pm$ 63,8 * #
<b>Macrófagos</b>			
IL-10	77,57 $\pm$ 12,1	61,02 $\pm$ 20,3	73,87 $\pm$ 7,9
TNF $\alpha$	5380 $\pm$ 1203	5887 $\pm$ 872	6318 $\pm$ 2138
<b>Suero</b>			
PGE <sub>2</sub>	7,5 $\pm$ 0,9	9,85 $\pm$ 2,2	7,9 $\pm$ 2,1
<b>Heces</b>			
IgA	11,62 $\pm$ 0,98	45,32 $\pm$ 15,8	44,8 $\pm$ 14,7 *

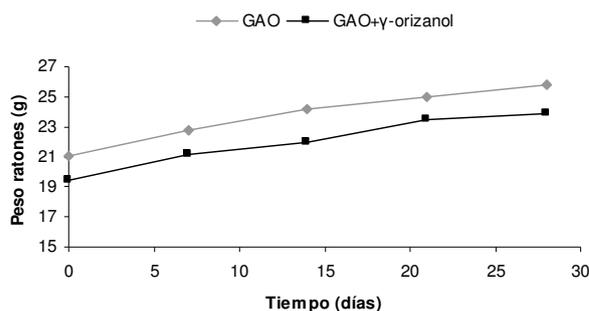
Las medidas fueron realizadas mediante ELISA y los resultados son la media $\pm$ DE, \* p<0.05 entre los grupos con respecto a GAO; # p<0.05 con respecto a RBO crudo (n = 10/grupo). Los resultados vienen dados en pg/ml, salvo en el caso de la IgA ( $\mu$ g/ml), PGE<sub>2</sub> (ng/ml) y la proliferación en cpm.

Al analizar los resultados obtenidos al eliminar en el aceite de salvado de arroz la mayor parte de su fracción insaponificable, y quedarnos con la fracción lipídica rica en ácidos grasos n-6 y saturados, los efectos inmunitarios obtenidos fueron en general semejantes a los del RBO crudo, hecho que sugiere que el papel de los componentes minoritarios sobre la respuesta inmunitaria no debe ser muy relevante, siendo la fracción saponificable la principal responsable de los efectos.

### 9.3 Efectos inmunitarios del $\gamma$ -orizanol incorporado en la dieta de ratones

Según los estudios descritos anteriormente, la fracción minoritaria que forma parte del aceite de salvado de arroz no ejerce un efecto importante sobre la respuesta inmunitaria. Sin embargo, hay que tener en cuenta varios factores: a) la dieta a base de aceite de salvado de arroz refinado no está exenta de compuestos no lipídicos, ya que aproximadamente el 15% de la fracción insaponificable se mantiene tras el refinamiento, lo cual quiere decir que ese pequeño conjunto de componentes podría participar en menor medida en la modulación de la respuesta y b) el efecto ejercido por los ácidos grasos es tan potente que pudiera enmascarar el realizado por dichos compuestos minoritarios en el aceite de salvado de arroz crudo, no apreciándose su acción inmunitaria.

Puesto que uno de los principales componentes de la fracción insaponificable del aceite de salvado de arroz es el conocido como  $\gamma$ -orizanol, que comprende compuestos diversos y al que se han atribuido multitud de efectos, se decidió testar este antioxidante sobre la respuesta inmunitaria en animales sanos. Para ello se suministró una dieta control a base de girasol alto oleico (Grupo GAO) a un grupo de ratones (n =10 ratones/grupo) y el grupo restante recibió una dieta semejante a la que se había incorporado un 2% de  $\gamma$ -orizanol comercial al total de la grasa (Material y Métodos, apartado 6.1.7.). Es decir, el  $\gamma$ -orizanol constituía el 0.1% del total de la dieta. Se procedió de la misma manera que en los estudios anteriores, observándose que el peso, aspecto y comportamiento de los animales de los dos grupos eran normales y similares (Figura 9.11).



**Figura 9.11.** A) Evolución del crecimiento de los animales que ingirieron  $\gamma$ -orizanol. B) Incremento de peso de dichos animales. Los resultados son la media $\pm$ DE.

El análisis de los parámetros inmunitarios en este estudio fue más complejo que en el resto de los casos. Mientras que cuando se administraba aceite de salvado de arroz se apreciaba un incremento de la respuesta inmunitaria que se traducía en un desplazamiento hacia la respuesta Th1, el comportamiento inmunitario no fue tan claro cuando se les suministró  $\gamma$ -orizanol. La tabla 9.4 muestra diferentes parámetros relacionados con el bazo y las células que de él se derivan.

**Tabla 9.4.** Parámetros linfocitarios modificados por el  $\gamma$ -orizanol

	GAO	$\gamma$ -orizanol
Proliferación de linfocitos T	2737.1±2088.3	2319.5±717.4
Proliferación de linfocitos B	2439.07±1505.1	1913.85±754.2
Células/mg bazo (millones)	0.53±0.2	0.53±0.1
IL-2	495.6±138.3	643.8±100.6 *
IFN $\gamma$	204.3±135	286.01±78.01
TNF $\alpha$	49.12±38.06	199.8±58.4 **
IL-12	199.06±60.1	185.01±86.2
IL-4	965.6±302.9	1190.1±589.3

Proliferación de linfocitos medida por incorporación de timidina tritiada y expresada en cpm. Número de células del bazo expresado como millones de células por mg bazo. Concentración de citocinas en los sobrenadantes de linfocitos cultivados durante 48h en presencia de Con A expresados en pg/ml. Los resultados vienen dados por la media±DE, \* p<0.05, \*\*p<0.01 con respecto al control.

Se puede observar que el  $\gamma$ -orizanol no modificó la proliferación de linfocitos, hecho que se correlaciona con que tampoco fuese capaz de alterar el número de células del bazo. Sin embargo, en contra de este resultado, si que existió un incremento significativo de IL-2, sugiriendo un posible desplazamiento de la respuesta hacia Th1. Esta citocina junto con IFN $\gamma$ , también aumentó en el sobrenadante de linfocitos, propiciando el desplazamiento de la respuesta inflamatoria, y en consecuencia con ello también se observa un incremento en la producción linfocitaria de TNF $\alpha$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias en la producción linfocitaria de IL-12, por lo que no se puede hablar de un claro balance hacia la respuesta Th1.

Por tanto, si bien el  $\gamma$ -orizanol induce un cierto aumento en la respuesta inflamatoria, el efecto es en conjunto menor al inducido por el aceite de salvado de arroz refinado, por lo que de acuerdo con el estudio anterior, el efecto de dicho aceite sobre el sistema inmunitario parece ser llevado a cabo en mayor medida por el componente saponificable, rico en ácidos grasos n-6. Probablemente esté influyendo también la mayor cantidad existente de ácidos grasos saturados, de los que se ha descrito que estimula vías inflamatorias (Plat J, Mensink RP, 2005). Además, hay que tener en cuenta que el  $\gamma$ -

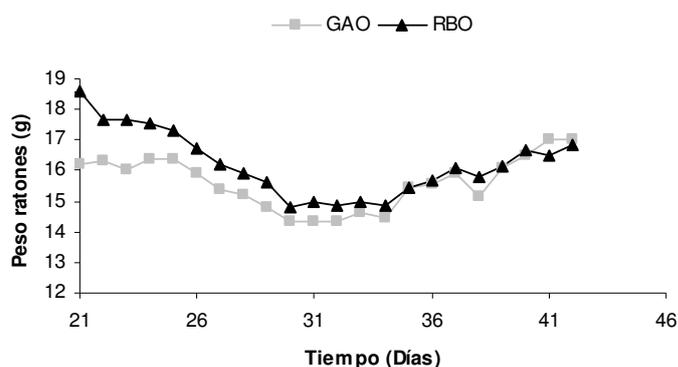
orizanol no es el único componente de la fracción insaponificable del RBO, sino que en esta fracción existen otros compuestos con actividad propia, que podrían alterar el efecto final.

#### 9.4 Efecto de una dieta enriquecida en aceite de salvado de arroz sobre un modelo de esclerosis múltiple

A pesar de las posibilidades que ofrece el aceite de arroz en terapéutica, no todo son ventajas, puesto que existen condiciones para las que una estimulación inmunitaria podría resultar perjudicial. Es el caso de desórdenes inflamatorios o autoinmunes, que requieren poner freno a la respuesta inmunitaria exacerbada que las origina. Para determinar los posibles efectos negativos del aceite de salvado de arroz sobre la salud en caso de que exista una de estas condiciones de inflamación exagerada, se decidió testar la misma dieta a base de aceite de arroz (RBO), en un modelo de encefalitis experimental autoinmune (EAE) recurrente o intermitente, equivalente a la esclerosis múltiple en humanos.

Dos grupos de ratones ( $n = 12/\text{grupo}$ ) fueron alimentados durante 42 días con dietas diferentes, bien a base de aceite de girasol alto oleico (Grupo GAO) o a base de aceite de salvado de arroz (RBO). A las tres semanas de alimentación con dichas dietas, 9 de los ratones de cada grupo fueron inmunizados en un proceso ciego con el fin de instaurar la enfermedad, según el protocolo planteado en el Material y Métodos (apartado 6.1.8.). Durante el curso de la enfermedad se observó la evolución de los ratones de los grupos en cuanto a crecimiento, aspecto y comportamiento, dándose un *score* en función de la gravedad de la enfermedad (la medida del *score* viene indicada en el Material y Métodos 6.1.3.).

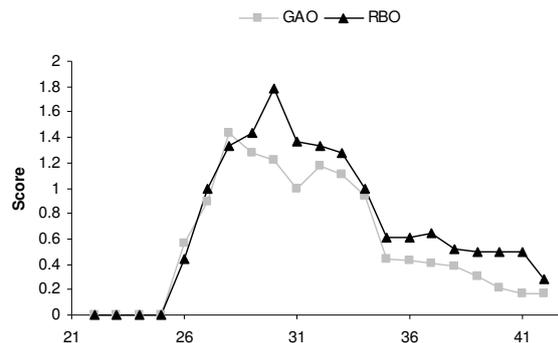
Se observó una caída del peso de los animales enfermos desde el mismo día de la inmunización, caída que se fue recuperando con el tiempo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos GAO y RBO (Figura 9.12).



**Figura 9.12.** Evolución de los pesos de los animales donde se indujo EAE que estaban siendo alimentados con dieta GAO o RBO. Los resultados son la media $\pm$ DE. ( $n = 9/\text{grupo}$ ).

El análisis del *score* diario permitió determinar el efecto que ejercía el aceite de salvado de arroz sobre el curso de la enfermedad, observándose un empeoramiento de los animales que lo consumían. En la Figura 9.13 se observa como la enfermedad se inició de igual modo en ambos grupos de animales, con un incremento del *score* rápido tras la inmunización. Sin embargo, en el grupo GAO la mejora empezó a observarse con antelación al grupo RBO, y desde el día 8 de la instauración de enfermedad, hasta el final del primer brote, los *scores* en los animales del grupo GAO se mantuvieron ligeramente por debajo del grupo RBO, aunque en ningún caso esta diferencia fue estadísticamente significativa

**Figura 9.13.** La dieta RBO agrava el curso de EAE al presentar *scores* más elevados que el grupo control. Los resultados son la media de los *scores* de cada ratón en su grupo correspondiente. (n = 19/grupo).

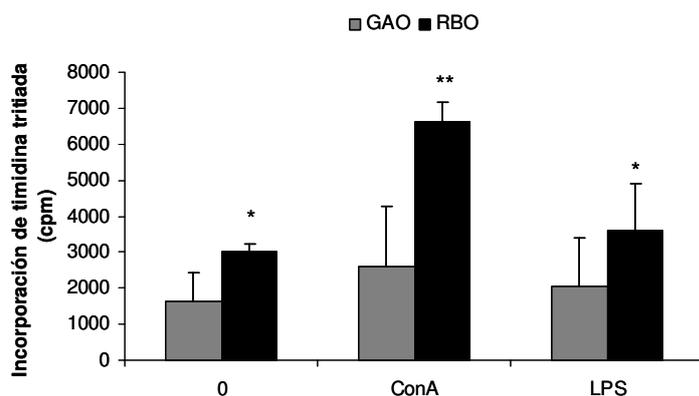


En la Tabla 9.5 se contemplan los datos obtenidos a partir de los diversos parámetros clínicos derivados del *score* diario o el peso. Como se puede observar en el grupo GAO enfermaron el 66.6 % de los ratones mientras que en el grupo RBO el 77.7 %, aunque dicha diferencia es despreciable. En ninguno de los grupos hubo mortalidad de alguno de los animales. El primer brote de la enfermedad comenzó al mismo tiempo en ambos grupos y duró un tiempo semejante, aunque algo mayor en el grupo RBO. La gravedad es mayor también en este grupo, como ya se había comentado antes al observar la evolución de los *scores* diarios. El proceso fue más crónico en el grupo RBO, ratones a los que les resultó más difícil recuperarse, y la morbilidad fue ligeramente mayor en el grupo RBO, con datos cercanos a la significación estadística. Por último, cabe destacar que el *score* residual también quedó ligeramente por encima en el grupo RBO, sugiriendo de nuevo una menor capacidad de recuperación.

**Tabla 9.5.** Parámetros clínicos determinados en los ratones de los grupos GAO y RBO a los que se indujo EAE. +  $p < 0.05$  con respecto al grupo GAO; †  $p = 0.06$  (n = 9/grupo).

	GAO	RBO
<b>Incidencia</b>	6/9	7/9
<b>Mortalidad</b>	0/9	0/9
<b>Inicio</b>	12.8±1.2	12.5±1.7
<b>Cronicidad</b>	11.9	16.42*
<b>Duración</b>	13.16±3.9	12.14±3.07
<b>Gravedad</b>	2.91±1.6	3.14±1.06
<b>Morbilidad</b>	8±2.4	10.7±3.3 †
<b>Recuperación</b>	0.25±0.2	0.36±0.3

Al determinar el efecto de las dietas sobre la proliferación de linfocitos (Figura 9.14) se observa que el incremento de proliferación es semejante al que ya se detectó en animales sanos y que pudo ser responsable, en cierta medida, del empeoramiento que sufrieron los ratones de este grupo durante el curso de la enfermedad ya que son los linfocitos T autorreactivos los responsables de la destrucción de la mielina propia, reconociéndola como extraña, hecho que da lugar a todos los síntomas observados en la patología.



**Figura 9.14. La dieta RBO incrementa la proliferación de linfocitos en ratones que padecen EAE.** Proliferación de linfocitos medida por incorporación de timidina tritiada tras incubación con ConA o LPS durante 24 horas. Los resultados son la media $\pm$ DE; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  del grupo RBO con respecto al grupo GAO.

Teniendo en cuenta todos estos resultados y los obtenidos en experimentos anteriores acerca del efecto inmunoestimulante del aceite de arroz, es lógico que el aceite de arroz no contribuya a la mejora de los ratones enfermos de EAE. De hecho, el aceite de arroz parece empeorar a los animales que lo consumen, debido probablemente a la activación que ejerce sobre el sistema inmunitario, que es el que está originando el desorden autoinmune. Tanto el efecto inmunoestimulante observado para el aceite de salvado de arroz, como la ligera acción pro-inflamatoria encontrada para el  $\gamma$ -orizanol, estarán seguramente interviniendo en el agravamiento observado en el curso de la enfermedad.

## 10. EFECTOS INMUNITARIOS DEL ACEITE DE PESCADO

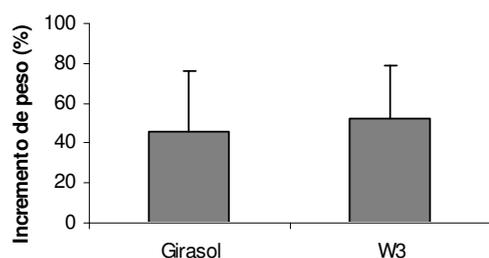
El aceite de pescado se caracteriza por su alto contenido en PUFAs de la serie n-3, entre los que destacan el EPA y el DHA. A estos ácidos grasos se les atribuyen multitud de propiedades beneficiosas para el organismo, como la capacidad de mejorar el perfil lipídico y disminuir así el riesgo cardiovascular (Mori TA y Woodman RJ, 2006). El poder anti-inflamatorio de los PUFA n-3, efecto algo más desconocido para la población en general, es otra de las características que los convierten en objetos de estudio para la comunidad científica debido a su enorme repercusión biológica. De este modo, son muchas las aplicaciones de estos compuestos en el campo de la salud, pudiendo ser empleadas para mejorar el curso de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o autoinmunes.

### EFECTOS INMUNITARIOS DE LOS ACIDOS GRASOS n-3 EN ANIMALES SANOS

#### 10.1 Efecto inmunitario de una dieta enriquecida en aceite de pescado sobre ratones sanos

Con el propósito de determinar los efectos inmunitarios de estos ácidos n-3 sobre sujetos sanos, se puso en marcha un experimento consistente de dos grupos de ratones (n = 10/grupo); uno de ellos consumió una dieta control a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) mientras que al otro grupo se le administró una dieta enriquecida en aceite de pescado (Grupo W3) según se explica en el capítulo 6.1.9. del Material y Métodos. Tras administrar las dietas durante un mes, se analizaron diversos parámetros relacionados con la respuesta inmunitaria.

Los animales fueron controlados durante el tiempo que duró el experimento, observándose una conducta y aspecto normales. Se comprobó que la evolución en el crecimiento era la adecuada, sin existir diferencias entre los dos grupos (Figura 10.1). Tampoco hubo diferencias con respecto al consumo de dieta ( $4.1 \pm 0.5$  vs  $3.7 \pm 0.9$  g/día; Girasol vs W3).



**Figura 10.1.** Incremento de peso de los ratones que consumieron dieta Girasol y dieta W3 expresado en porcentaje. El resultado es la media  $\pm$  DE. (n = 10/grupo).

No existió tampoco ningún tipo de anomalías con respecto a la cantidad, consistencia y aspecto de las heces, siendo el contenido de agua de las mismas similar en ambos grupos (datos no mostrados).

El análisis de las dietas confirmó el enriquecimiento de las mismas en ácidos grasos n-3 como consecuencia de la incorporación de aceite de pescado. La Tabla 10.1A muestra la composición en ácidos grasos de las dietas administradas.

Las cantidades diarias aproximadas de ácido oleico, linoleico, EPA y DHA ingeridas por los ratones que consumieron la dieta W3 fueron  $45\pm 5.1$  mg,  $87\pm 6$  mg,  $2.75\pm 0.5$  mg y  $2.65\pm 0.4$  mg respectivamente mientras que los animales del grupo control tomaron  $50.5\pm 5$  mg,  $102.5\pm 10.1$  mg y  $0.48\pm 0.06$  mg de ácido oleico, linoleico y EPA al día respectivamente. Por lo tanto, la dieta W3 proporcionaba una cantidad muy superior de ácidos grasos n-3, con un ratio n3/n6 más elevado (0.01 vs 0.08; Girasol vs W3).

La incorporación *in vivo* de los ácidos grasos de la dieta se verificó en tejidos como hígado y plasma (Tabla 10.1B).

A

	Dieta	
	Girasol	W3
Ac. Mirístico C14:0	2.91	4.01
Ac. Palmítico C16:0	10.02	11.26
Ac. Esteárico C18:0	5.45	5.55
Ac. Oleico C18:1 n-9c	<b>25.35</b>	<b>23.61</b>
Ac. Linoleico C18:2 n-6c	<b>51.40</b>	<b>45.70</b>
Ac. $\alpha$ -linolénico C18:3 n-3	0.17	0.26
Ac. Araquidónico C20:4 n-6c	<b>0.82</b>	<b>0.81</b>
EPA C20:5 n-3	<b>0.24</b>	<b>1.45</b>
DHA C22:6 n-3	nd	<b>1.42</b>
Saturados	20.02	22.85
MUFA	26.24	25.95
PUFA	53.74	51.20
n-6	45.54	39.28
n-3	0.63	3.04
n-3/n-6	0.01	0.08

**Tabla 10.1.** A) Composición en ácidos grasos de las dietas administradas a los grupos Girasol y W3 (expresado como g/100 g de grasa); B) Perfil de ácidos grasos de plasma e hígados de los ratones de dichos grupos. Los resultados, expresados en porcentaje, son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$  entre el grupo Girasol y el W3 (n = 10/grupos)

B

	Suero		Hígado	
	Girasol	W3	Girasol	W3
Ac. Mirístico C14:0	1.9 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.3
Ac. Palmítico C16:0	13.8 $\pm$ 2.6	16.8 $\pm$ 0.8*	22.8 $\pm$ 1.6	23.5 $\pm$ 0.7
Ac. Esteárico C18:0	9.4 $\pm$ 0.6	8.6 $\pm$ 1.6	7.9 $\pm$ 4.6	9.6 $\pm$ 1.7
Ac. Oleico C18:1 n-9c	5.4 $\pm$ 1.4	8.9 $\pm$ 1.3*	23.1 $\pm$ 4.1	20.1 $\pm$ 2.7
Ac. Linoleico C18:2 n-6c	9.2 $\pm$ 3.8	15.2 $\pm$ 2.2*	19.6 $\pm$ 1.6	18.9 $\pm$ 0.4
Ac. $\alpha$ -linolénico C18:3 n-3	0.1 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.1	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01*
Ac. Araquidónico C20:4 n-6c	3.9 $\pm$ 2.9	2.5 $\pm$ 2.8	8.7 $\pm$ 5.1	8.9 $\pm$ 1.3
$\gamma$ -linolénico C18:3 n-6	nd	nd	0.07 $\pm$ 0.04	0.1 $\pm$ 0.01*
EPA C20:5 n-3	<b>0.1<math>\pm</math>0.1</b>	<b>1.02<math>\pm</math>0.3*</b>	<b>0.03<math>\pm</math>0.01</b>	<b>0.4<math>\pm</math>0.08*</b>
DHA C22:6 n-3	<b>0.5<math>\pm</math>0.2</b>	<b>3.5<math>\pm</math>0.6*</b>	<b>1.6<math>\pm</math>0.3</b>	<b>8.4<math>\pm</math>1.7*</b>
Saturados	77.9 $\pm$ 9.7	61.5 $\pm$ 6.76*	32.5 $\pm$ 6.1	34.8 $\pm$ 1.5
MUFA	8.5 $\pm$ 2.7	14.2 $\pm$ 3.6*	35.01 $\pm$ 7.3	26.6 $\pm$ 5.2*
PUFA	13.5 $\pm$ 7.2	24.2 $\pm$ 5.2*	32.4 $\pm$ 3.7	38.6 $\pm$ 3.7
n-6	11.1 $\pm$ 6.4	14.8 $\pm$ 2.01	28.6 $\pm$ 3.8	27.6 $\pm$ 2.08
n-3	<b>0.7<math>\pm</math>0.5</b>	<b>7.6<math>\pm</math>3.3*</b>	<b>2.5<math>\pm</math>0.4</b>	<b>9.3<math>\pm</math>1.8*</b>
n-3/n-6	<b>0.1<math>\pm</math>0.08</b>	<b>0.5<math>\pm</math>0.2*</b>	<b>0.09<math>\pm</math>0.02</b>	<b>0.3<math>\pm</math>0.05*</b>

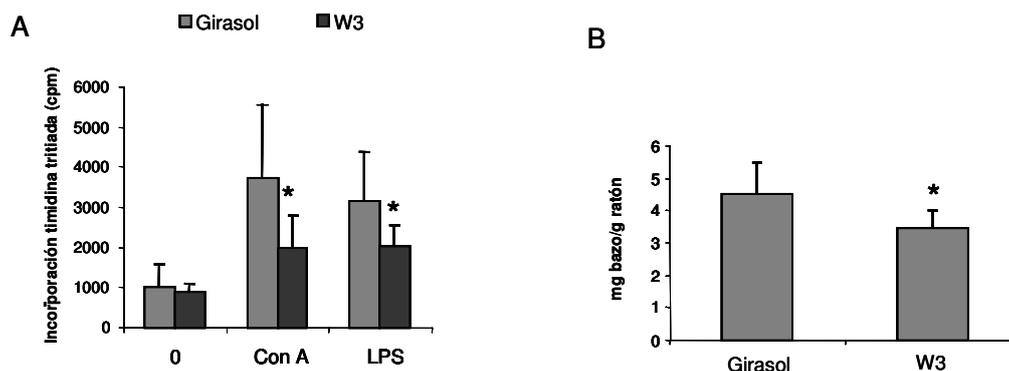
En estos tejidos, el aceite de pescado incrementó significativamente los niveles de EPA y DHA. En las muestras analizadas se encontró más DHA que EPA, a pesar de que en la dieta hubiese cantidades similares de dichos ácidos grasos. Este hecho ya sugiere que el DHA se incorpora más fácilmente o bien que se está produciendo una conversión del EPA en DHA, hecho que se estudiará más a fondo en el Capítulo 10.9. El aumento de ácidos grasos n-3 en los tejidos de los ratones del grupo W3 tuvo lugar sin afectar la cantidad de ácidos grasos n-6. En el caso de las muestras de plasma se apreció también un incremento de EPA y DHA con la dieta W3 aunque en este caso no se modificaron los niveles totales de ácidos grasos n-6, observándose variaciones en las concentraciones de ácido oleico y linoleico, que aumentaron. Sin embargo, ese incremento en ácidos grasos n-6 pudo ser debido a cambios en el metabolismo lipídico. En general, las muestras procedentes de animales que consumieron la dieta rica en aceite de pescado poseían mayor cantidad de PUFAs aunque las diferencias alcanzadas fueron solo significativas en el caso de plasma.

Los niveles de PGE<sub>2</sub> encontrados en los sobrenadantes de linfocitos ( $4.1 \pm 0.2$  vs  $2. \pm 0.9$  ng/ml Girasol vs W3,  $p < 0.05$ ) y de macrófagos ( $8 \pm 0.2$  vs  $5 \pm 0.6$  ng/ml, Girasol vs W3,  $p < 0.05$ ) fueron menores en el grupo W3 que en el control, hecho que confirmaba la incorporación de los ácidos grasos n-3 en las membranas de las células del sistema inmunitario, además de sugerir ya la tendencia anti-inflamatoria de estos ácidos grasos.

Se estudiaron diversos parámetros con el fin de obtener información acerca de cómo los ácidos grasos n-3 administrados modulan el sistema inmunitario y por tanto, poder aclarar sus posibles mecanismos de acción.

En este sentido, se analizó la respuesta a mitógenos de los linfocitos obtenidos del bazo, observándose una menor proliferación tanto de linfocitos T como B en los ratones de grupo W3 (Figura 10.2A). De acuerdo con estos resultados, se apreció también una reducción del tamaño del bazo en los ratones del mismo grupo (Figura 10.2B).

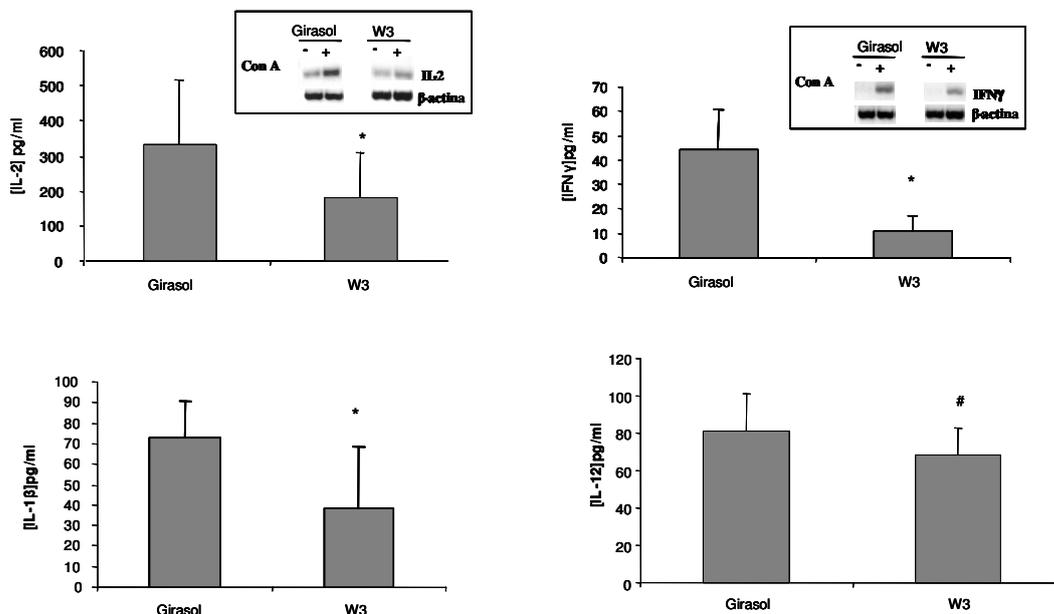
También se estudió el efecto de la dieta sobre la proliferación de macrófagos inducidos por M-CSF pero no se encontraron diferencias entre los dos grupos ( $81073 \pm 15574$  vs  $91530 \pm 15724$  cpm, Girasol vs W3).



**Figura 10.2** La dieta a base de aceite de pescado disminuye la proliferación de linfocitos y el tamaño del bazo. A) Proliferación de linfocitos estimulados con LPS o ConA durante 24h y determinada por la incorporación de timidina tritiada. B) Tamaño del bazo expresado como mg bazo/g ratón. En ambos casos los resultados son la media±DE, \* p<0.05 ente los dos grupos. (n =10/grupo).

En concordancia con la menor proliferación encontrada en los linfocitos derivados de los ratones del grupo W3, se observó también que la citocina IL-2, principal inductora de proliferación linfocitaria, estaba también disminuida en los sobrenadantes de los linfocitos del grupo W3. En esos mismos sobrenadante se apreció además el descenso en los niveles de IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-12, todas ellas citocinas Th1 (Figura 10.3).

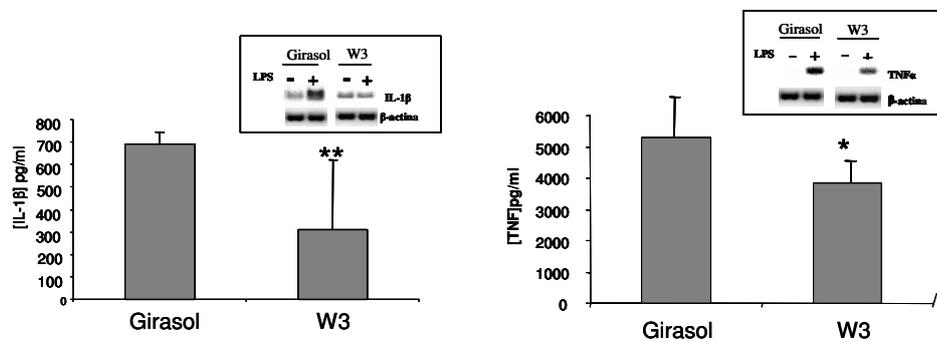
A pesar de esta tendencia tan evidente de los ácidos grasos n-3 hacia la reducción de parámetros inflamatorios, éstos no fueron capaces de modificar demasiado la producción de TNF $\alpha$  por los linfocitos, si bien se observa cierta tendencia a la baja (368.5±81.4 vs 342.7±109.8).



**Figura 10.3.** La dieta W3 modula a la baja la respuesta Th1. Niveles de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 determinados por ELISA en sobrenadantes de linfocitos de bazo estimulados durante 48h con ConA. IL-2 e IFN- $\gamma$  fueron determinados además por RT-PCR usando  $\beta$ -actina como control. Los resultados son la media±DE, \* p<0.05 entre el grupo Girasol y W3; # p=0.06. (n = 10/grupo).

Aunque el aceite de pescado no fue capaz de modificar la proliferación de macrófagos, si que ejerció un efecto anti-inflamatorio semejante al observado en linfocitos a nivel de estas células. La dieta W3 produjo la disminución de citocinas pro-inflamatorias producidas por macrófagos, como el caso de la IL-1 $\beta$  y en este caso también del TNF $\alpha$  (Figura 10.4) pero no alteró, sin embargo, los valores de la IL-12 ( $681.6 \pm 295.9$  vs  $679.6 \pm 305.7$  pg/ml, Girasol vs W3).

A nivel sistémico, sin embargo, no se aprecian diferencias en la respuesta Th1 en los animales de ambos grupos, presentando valores en plasma de citocinas proinflamatorias semejantes, como es el caso de la IL-12 ( $64.52 \pm 20.2$  vs  $81.2 \pm 23.8$  pg/ml, Girasol vs W3) o del TNF $\alpha$  ( $212.5 \pm 99.8$  vs  $242.3 \pm 58.7$  pg/ml, Girasol vs W3).



**Figura 10.4. La dieta rica en aceite de pescado disminuye las citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos.** Determinación por ELISA de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  producidos por macrófagos tras ser estimulados 24h con LPS. Los resultados son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre el grupo Girasol y W3. Se ratificó por RT-PCR usando  $\beta$ -actina como control. (n = 10/grupo).

También se analizó la respuesta Th2 para determinar el efecto que ejercía el aceite de pescado sobre la misma. En la Tabla 10.2 se puede apreciar como los diferentes parámetros de la respuesta Th2 analizados en plasma disminuyen con el consumo de la dieta rica en ácidos grasos n-3, hecho que apunta a un posible efecto antialérgico. Es importante resaltar que la dieta W3 fue capaz de modificar la respuesta Th2 en plasma, mientras que a este nivel la respuesta Th1 no fue modificada.

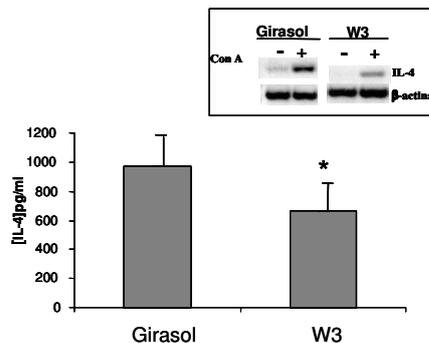
**Tabla 10.2. La dieta W3 disminuye la respuesta Th2.** Niveles de mediadores de la respuesta Th2 determinados por ELISA en plasma.

	Girasol	W3
IL-4	1.97±0.65	1.74±0.25 *
IL-5	32.4±2.6	25.7±6.1
IgE	152.53±120.36	78.76±7.43
IgG1	75.18±39.87	61.6±23.59
Histamina	10.01±2.6	3.03±0.9 *

Los resultados son la media±DE, \* p<0.05. IL-4 e IL-5 vienen expresados en pg/ml y histamina e IgE en ng/ml e IgG<sub>1</sub> en µg/ml (n = 10/grupo).

La reducción de la respuesta Th2 mediada por los ácidos grasos n-3 también se estudió a nivel de linfocitos, apreciándose un descenso en la producción de IL-4 (Figura 10.5).

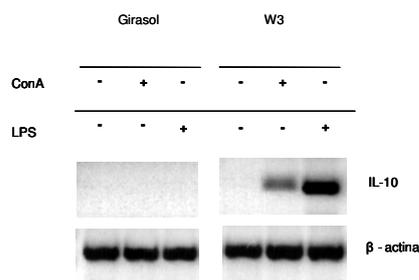
**Figura 10.5. La dieta W3 disminuyó la producción de IL-4 por linfocitos.** Niveles de IL-4 determinados por ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A durante 48h. Los resultados son la media±DE, \* p<0.05 entre los dos grupos. Los resultados fueron confirmados por RT-PCR usando β-actina como control.



Buscando una explicación para el efecto inmunomodulatorio ejercido por la dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre ambas respuestas Th1 y Th2, se estudió la producción de citocinas reguladoras, capaces de inhibir en determinadas circunstancias ambos tipos de respuesta.

En la Tabla 10.3 se expone un resumen de los resultados obtenidos sobre dichas citocinas reguladoras, observándose cómo se incrementaron sus niveles con la administración de la dieta rica en aceite de pescado. Puesto que se caracterizan por ser inmunosupresoras, este incremento podría ser el responsable de la supresión de las respuestas Th1 y Th2. En la Figura 10.6 se observa como además la dieta rica en aceite de pescado indujo la expresión de la IL-10 en los linfocitos.

**Figura 10.6. Los ácidos grasos n-3 inducen la expresión de IL-10 en linfocitos.** Análisis llevado a cabo por RT-PCR, usando como control β-actina.

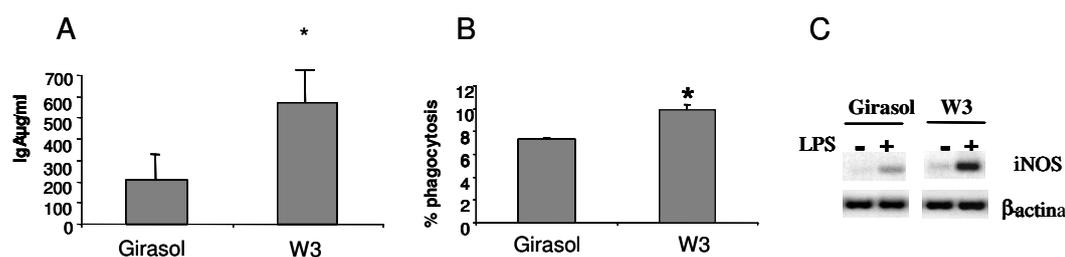


**Tabla 10.3. La dieta W3 incrementa los niveles de citocinas reguladoras.** Niveles de IL-10 y TGF- $\beta$  determinados por ELISA plasma y sobrenadante de linfocitos y macrófagos.

	Girasol	W3
<b>Plasma</b>		
IL-10	24.58 $\pm$ 15.68	33.01 $\pm$ 10.5
<b>Linfocitos</b>		
IL-10	31.56 $\pm$ 5.5	61.29 $\pm$ 29.08 *
TGF- $\beta$	20.59 $\pm$ 9.4	27.8 $\pm$ 13
<b>Macrófagos</b>		
IL-10	34.64 $\pm$ 1.7	116.79 $\pm$ 69.6*
TGF- $\beta$	56.47 $\pm$ 0.4	98.68 $\pm$ 11.2 *

Los linfocitos fueron estimulados 48h con ConA y los macrófagos con LPS 24h. Los resultados son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$  entre ambos grupos. (n =10/Grupo).

Aunque con los resultados mostrados hasta el momento podría parecer que los ácidos grasos n-3 podrían inducir una supresión generalizada del sistema inmunitario debido al espectacular aumento de las citocinas inmunomoduladoras IL-10 y TGF $\beta$ , se observó que los ratones alimentados con la dieta rica en aceite de pescado, no sufrieron síntomas de debilidad ni susceptibilidad a infección, concepto que se amplía en el apartado 10.6 de los resultados. Tal vez esto sea debido al incremento que se observa en estos animales de algunas de las defensas naturales, como fue el caso de la IgA en plasma y la actividad fagocítica o el incremento de la expresión de iNOS en macrófagos (Figura 10.7). Los niveles de IgG en suero no fueron alterados por el consumo de las dietas (628.5 $\pm$ 83.5 vs 667.5 $\pm$ 30.8  $\mu$ g/ml; Girasol vs W3).

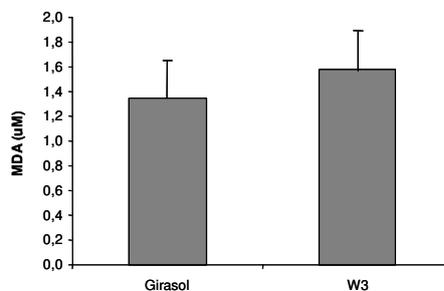


**Figura 10.7. Algunas defensas naturales son incrementadas por los ácidos grasos n-3.** A) Niveles de IgA en plasma medidos por ELISA. B) Porcentaje de actividad fagocítica en macrófagos medido por citometría. En ambos casos los resultados son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$  entre los dos grupos. (n = 10/grupo). C) RT-PCR de macrófagos estimulados con LPS durante 24h usando  $\beta$ -actina como control.

Debido a que se ha asociado a los PUFA con ácidos grasos fácilmente peroxidables y que ello podría reducir las defensas antioxidantes del organismo, quisimos comprobar

este aspecto. Para ello, se midieron los niveles de malondialdehído (MDA), un producto de peroxidación lipídica, en los plasmas de los ratones alimentados con dieta W3, comprobándose que la administración de ácidos grasos n-3 no comprometía las defensas antioxidantes puesto que no existieron diferencias significativas entre los grupos (Figura 10.8).

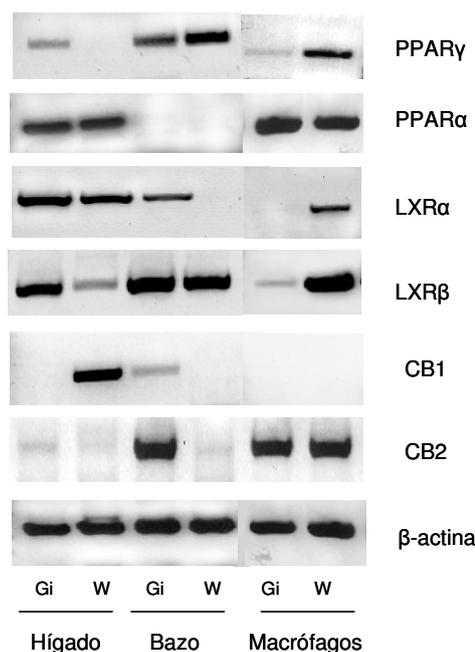
**Figura 10.8. La dieta W3 no perjudica las defensas antioxidantes en ratones sanos.** Niveles de MDA medidos en plasma por HPLC. Los resultados son la media $\pm$ DE,  $p < 0.05$  con respecto al grupo Girasol. (n = 10/grupo).



Puesto que también se ha descrito el papel de los ácidos grasos en la modulación directa de la expresión génica a través de la regulación y actividad de factores de transcripción, se decidió estudiar la modulación que ejercían los ácidos grasos n-3 de la dieta a este nivel.

Para ello se seleccionaron determinados receptores nucleares o factores de transcripción que pudiesen estar implicados en los fenómenos de inflamación y responsables de la regulación de la transcripción génica. Entre ellos se eligieron un grupo de receptores nucleares que son actualmente objeto de interés por ser posibles dianas terapéuticas en enfermedades inflamatorias y metabólicas. Por RT-PCR se analizó la expresión de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  y de receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) en bazo, macrófagos e hígado, obteniendo los resultados que se exponen en la Figura 10.9.

Se puede observar que tanto en linfocitos como en macrófagos de los ratones que tomaron la dieta W3 aumentó la expresión de PPAR $\gamma$ , lo que nos sugería un incremento en la actividad antiinflamatoria de la dieta. Dicha regulación no se ejerce de igual modo a nivel de PPAR $\alpha$ , receptores que no sufrieron modificación alguna en su expresión. De hecho, estos receptores PPAR $\alpha$  están más relacionados con el metabolismo lipídico que con la respuesta inmunitaria, con lo cual podría ser lógico que no se alterase su expresión en células inmunitarias. También aumentó la expresión en macrófagos de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , hecho que de nuevo supuso una posible activación de vías que podrían llevar a la mejora de la inflamación. En linfocitos la expresión de receptores LXR no es tan característica o estudiada como en el caso de los macrófagos. Es por ello que quizás no se observaron modificaciones en la expresión de LXR $\beta$ , aunque si que se observa una disminución de la expresión de LXR $\alpha$ .



**Figura 10.9.** Expresión de diversos genes en hígado, bazo y macrófagos por RT-PCR usando  $\beta$ -actina como control.

Por el gran parecido estructural entre los ligandos endógenos de los receptores de los cannabinoides, y los PUFA de nuestra dieta, se decidió determinar la expresión de los mismos. Los receptores de los cannabinoides en macrófagos no se modificaron con la administración de la dieta W3. Sin embargo, la expresión de CB1 y CB2, genes protectores frente a la inflamación, se suprimieron en el bazo de ratones del grupo W3. Debido a que este dato parecía ir en contra de los resultados observados previamente, se pensó que quizás este hecho podía ser consecuencia de una sobre-activación de los receptores, que llevaron a un efecto *down-regulador*, de ahí que se anule la expresión de los mismos. Sin embargo, la dieta W3 estaría siendo la responsable de esa sobreexpresión, resultado que si se comprobase y fuera cierto con nuevos estudios, coincidiría con el carácter antiinflamatorio de la misma.

Estos resultados en su conjunto no solo permitieron corroborar el efecto antiinflamatorio de los ácidos grasos n-3, sino que si se analiza la modulación de la dieta ejercida sobre los macrófagos, se observa que el incremento de expresión de PPAR $\gamma$  y LXRs en ellos, también llevaría a una mejora del metabolismo lipídico por su capacidad de eliminar el exceso de lípidos, pudiendo ser beneficioso en casos de enfermedades cardiovasculares o diabetes.

Puesto que resultó interesante el efecto modulador de la dieta W3 sobre el metabolismo lipídico y ya que obesidad y enfermedad cardiovascular son desórdenes de carácter inflamatorio, se analizaron estos mismos genes en hígado, principal órgano metabólico (Figura 10.9). PPAR $\gamma$  y LXR tendieron a disminuir la expresión en hígados del grupo W3, hecho beneficioso a este nivel para evitar la lipogénesis que cursa en hígado con la activación de estos RN, y que trae graves consecuencias para la salud. Este hecho podría contrarrestar el incremento de expresión en hígado de CB1, mediador también de lipogénesis. La expresión de CB2 no se modificó con la dieta W3 puesto que en hígado este receptor no se expresa a menos que exista algún tipo de daño. El efecto de los ácidos grasos n-3 sobre parámetros metabólicos será estudiado más ampliamente en el Capítulo 10.6 de los Resultados.

Todos estos resultados muestran el poder antiinflamatorio de los ácidos grasos n-3 al ser incorporados en la dieta, al tiempo que se sugiere un posible efecto antialérgico, en ambos casos sin desproteger al organismo. Parece ser que estos efectos son mediados por el incremento de IL-10, capaz de disminuir las repuestas Th1 y Th2, y entre los posibles mecanismos implicados encontramos la regulación en la producción de eicosanoides o la regulación de la expresión génica a través de receptores nucleares. Ambos efectos beneficiosos para la salud implican la posible utilización de los ácidos grasos n-3 para la mejora de diversas patologías que cursen con procesos inflamatorios o con reacciones de hipersensibilidad. Además, también ejercen un efecto modulador del metabolismo lipídico que sería beneficioso para la prevención de enfermedades cardiovasculares y obesidad.

Con el objetivo de demostrar la utilidad de los ácidos grasos n-3 en este tipo de procesos patológicos se pusieron a punto diversos modelos animales, en rata o ratón, a los que se administraron las dietas ricas en aceite de pescado.

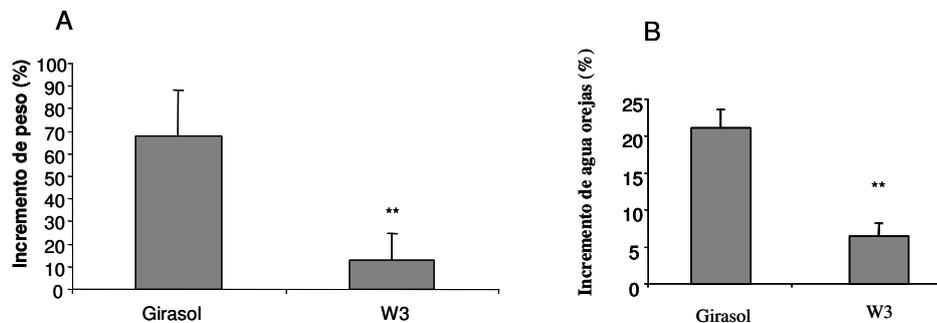
## **EFECTOS DE LOS ACIDOS GRASOS n-3 EN MODELOS DE ENFERMEDAD**

### **10.2 Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de dermatitis de contacto en ratones**

Partimos de la hipótesis de que si la dieta W3 es capaz de modular la respuesta inmunitaria en ratones sanos llevando al descenso de diferentes mediadores de la inflamación, en animales que padeciesen una enfermedad con carácter inflamatorio podría producirse una mejora con la administración de dicha dieta. Los siguientes experimentos

tratan de demostrar el efecto antiinflamatorio de una dieta enriquecida en aceite de pescado, dieta de las mismas características que la empleada en el estudio de animales sanos.

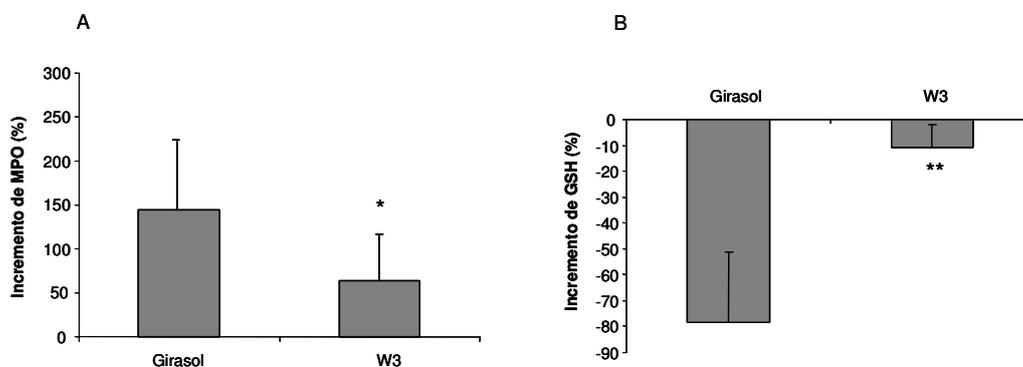
Para llevar a cabo este propósito, se empleó un modelo de dermatitis de contacto en ratones que cursaba con una inflamación aguda. Tras dos semanas de administración de las dietas Girasol y W3 a los ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ), se indujo una dermatitis de contacto en una de las orejas de cada animal sano como se indica en el apartado 6.1.10. del Material y Métodos. Tras doce horas, los animales se sacrificaron y las orejas se analizaron, observándose que tanto el incremento de peso como el de agua en las orejas, consecuencia del edema producido en éstas, fueron significativamente menores en el grupo que consumió la dieta W3 (Figura 10.10).



**Figura 10.10 La dieta W3 mejora el curso de la inflamación disminuyendo el peso de las orejas y la extravasación de líquidos.** A) Incremento de peso de la oreja enferma con respecto a la sana; B) Incremento del contenido de agua de la oreja enferma con respecto a la sana; resultados expresados en porcentaje y obtenidos tras haber sido expuesta la oreja a DNFB. Los resultados son la media $\pm$ DE, \*\*  $p < 0.01$  entre los grupos Girasol y W3. ( $n = 10/\text{grupo}$ ).

Se observó también la disminución de la infiltración leucocitaria, ya que en ratones que habían consumido la dieta rica en aceite de pescado se apreciaba una disminución de la actividad MPO en las orejas enfermas con respecto a las sanas (Figura 10.11A). Durante un proceso inflamatorio, la producción de radicales libres supone un gasto de las defensas locales antioxidantes del organismo, como es el caso del glutatión (GSH). En este sentido, el efecto anti-inflamatorio de los ácidos grasos n-3, se observó también, puesto que en las orejas dañadas de los ratones que consumieron la dieta W3 incrementaron los niveles de GSH. Ello pudo ser debido bien a que la dieta fue capaz de restaurar los niveles de GSH que habían disminuido durante el proceso inflamatorio o bien porque se produjo un menor

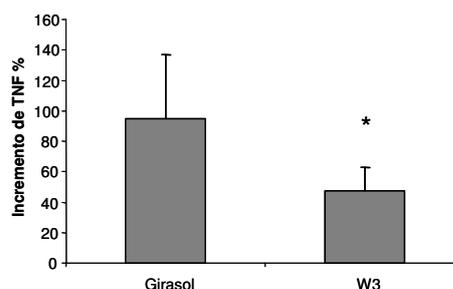
gasto como consecuencia de una inflamación más leve propiciada por la dieta (Figura 10.11B).



**Figura 10.11. La dieta W3 disminuye la infiltración leucocitaria y aumenta las defensas antioxidantes en las orejas dañadas.** A) Incremento de MPO de las orejas enfermas con respecto a las sanas. B) Incremento de GSH de las orejas enfermas con respecto a las sanas. Los resultados son la media±DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 entre ambos grupos (n = 10/grupo).

De acuerdo con estos resultados, el análisis de los homogenados de las orejas reveló una disminución en los mediadores de la inflamación, como sucede con los niveles de TNF $\alpha$  en los homogenados procedentes de orejas del grupo de ratones W3 con respecto a los del grupo control (Figura 10.12).

**Figura 10.12. La dieta W3 disminuye mediadores inflamatorios en el foco de inflamación.** Incremento de TNF $\alpha$  expresado en porcentaje en los homogenados de las orejas enfermas con respecto a los de las sanas. Los resultados obtenidos por ELISA son la media±DE, \* p<0.05 entre el grupo control y el grupo W3. (n =10/grupo).



Los efectos de la inflamación aguda inducida en la oreja no se reflejaron a nivel sistémico, de manera que no se apreciaron diferencias entre los animales enfermos de este modelo y los animales sanos donde no se indujo inflamación alguna y que fueron estudiados en el capítulo anterior. Además, la dieta W3 indujo los mismos cambios a nivel sistémico que los descritos en el apartado anterior, por lo que no hemos incorporado los datos de este estudio, al no aportar nueva información.

Por lo tanto, los ácidos grasos n-3 fueron capaces de frenar el conjunto de fenómenos que tienen lugar durante una inflamación aguda, por medio de la modulación de parámetros inflamatorios y actuando directamente sobre el foco de la lesión.

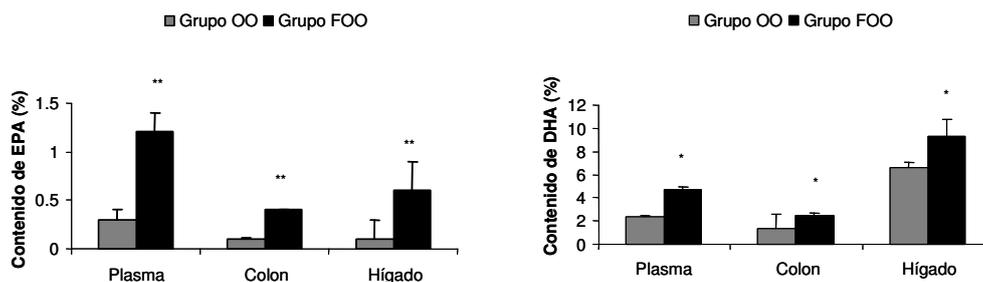
### **10.3 Efecto anti-inflamatorio de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un modelo de inflamación intestinal en ratas**

Debido al efecto anti-inflamatorio observado para los ácidos grasos n-3 tanto en individuos sanos como en el caso de un proceso inflamatorio local, se decidió comprobar si estos PUFAs tenían efecto en enfermedades inflamatorias de tipo más crónico, donde se produce una afectación del organismo más generalizada y no solamente a nivel local. Con el fin de cumplir este objetivo se eligió un modelo en ratas de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), que podría ser extrapolable a la Enfermedad de Crohn o a la colitis ulcerosa en humanos.

Puesto que ya se había observado un efecto ligeramente positivo del aceite de oliva sobre un modelo semejante (Ver apartado 8.3 de los Resultados), como control se usó una dieta a base de aceite de oliva (Grupo OO) frente a otra semejante enriquecida en aceite de pescado (FOO), con el fin de determinar si el aceite de pescado reforzaba o aportaba nuevos beneficios en el modelo de IBD que los ejercidos por el aceite de oliva. Las dietas fueron administradas a tres grupos de ratas ( $n = 10/\text{grupo}$ ), uno de los cuales no enfermó y sirvió como control sano. En los apartados 6.1.11. y 6.1.4. del Material y Métodos se indican la elaboración de las dietas y cómo se indujo la enfermedad.

El análisis de las dietas reveló que la única diferencia importante entre las mismas consistió en el descenso del ratio  $n6/n3$ , que pasó de 14.0 en la dieta OO a 4.5 en la dieta FOO. Este aumento de ácidos grasos n-3 se produjo gracias al incremento de EPA y DHA especialmente en la dieta FOO, siendo doble la cantidad de EPA que DHA (0.8 vs 0.4 g/100 g de grasa, EPA vs DHA). La dieta OO se caracterizó por la ausencia de ambos ácidos grasos.

Se analizaron diversos tejidos procedentes de las ratas afectadas por el proceso de IBD y que habían consumido los dos tipos de dieta. Dicho análisis se contempla en Figura 10.13, observándose el incremento significativo que se produce de EPA y DHA en los tejidos procedentes de ratas que consumieron la dieta FOO. La incorporación del resto de ácidos grasos ocurrió de manera semejante entre ambos grupos, no existiendo ningún otro dato significativo como se aprecia en la Tabla 10.4.



**Figura 10.13. La dieta FOO incrementa en tejidos las cantidades de EPA y DHA.** Porcentajes de EPA y DHA incorporados en plasma, colon e hígado de ratas enfermas de IBD. Los valores son la media±DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 entre el grupo OO y FOO (n = 10/grupo).

En la Tabla 10.4 también se observa cómo ese aumento en EPA y DHA en los tejidos del grupo FOO, hizo disminuir de manera significativa el ratio n6/n3 a diferencia de lo que se observaba previamente al analizar la dieta OO (Ver apartado 8.3 de los Resultados). Con estos resultados, se podría atribuir al EPA y al DHA los cambios que se apreciaban a nivel de plasma, colon e hígado en las ratas del grupo FOO durante el proceso inflamatorio.

**Tabla 10.4.** Composición de ácidos grasos de tejidos en ratas con IBD.

	Plasma		Colon		Hígado	
	OO	FOO	OO	FOO	OO	FOO
Saturados	38.5±2.3	41.0±7.4	35.9±2.9	36.2±4.1	41.9±1.3	42.7±1.3
Total n-9	22.7±2.3	19.5±1.5	28.0±1.4	30.6±2.3	14.1±2.1	13.5±4.5
Total n-6	26.8±0.9	28±3.1	20.8±0.8	19.8±1.7	28.5±1.1	27.1±3.3
Total n-3	3.7±0.6	6.2±0.1 *	2.4±0.5	4.1±0.2 *	6.9±0.4	10.1±1.6 *
n6/n3	8.8±3.8	4.5±1.5 *	11.7±6.7	5.2±1.9 *	8.8±3.8	4.5±1.5 *

Los valores representan el porcentaje de los ácidos grasos en plasma, colon e hígado de ratas con IBD que consumieron las dietas OO o FOO y son la media±DE, con \* p<0.05 entre ambos grupos. (n = 10/grupo).

El progreso de la enfermedad se determinó por medio de medidas de diversa índole como la inmunitaria o la bioquímica. En la Tabla 10.5 se exponen los resultados obtenidos. La evolución de la enfermedad se determinó asignando un DAI (Índice de severidad de la enfermedad) diario en función de diversos factores como se indica en la Tabla 6.2. del Material y Métodos. En el caso de las ratas del grupo FOO, su DAI se mantuvo por debajo del de las ratas del grupo OO desde la inducción hasta el sacrificio (datos no mostrados). A tiempo final, el DAI fue significativamente menor en el grupo

FOO, lo que indica una mejora más importante del proceso de IBD con el aceite de pescado que con el aceite de oliva (Tabla 10.5).

Parámetros inmunitarios como las concentraciones de TNF $\alpha$  o LTB $_4$  en el colon así como la infiltración leucocitaria en el mismo, disminuyeron en las ratas del grupo FOO. Sin embargo, los niveles de GSH se mantuvieron en los dos grupos (Tabla 10.5).

**Tabla 10.5. Parámetros analizados en ratas que padecieron IBD.**  
Los resultados son la media $\pm$ DE, \*p<0.05 entre los grupos OO y FOO (n = 10/7grupo).

	Grupo OO	Grupo FOO
DAI final	1.86 $\pm$ 0.4	0.77 $\pm$ 0.3*
peso/longitud colon (mg/cm)	84.2 $\pm$ 5.7	81.7 $\pm$ 3.6
TNF $\alpha$ (pmol/g)	596.9 $\pm$ 74.3	408.3 $\pm$ 52.4*
LTB $_4$ (ng/g)	5.98 $\pm$ 0.63	4.48 $\pm$ 0.33*
MPO UMPO/g)	115.3 $\pm$ 21.1	102.1 $\pm$ 9.8*
GSH (nmol/g)	1985 $\pm$ 84	1958 $\pm$ 59

Todos estos datos sugieren una mejora del proceso inflamatorio al incorporar ácidos grasos n-3 en la dieta elaborada a base de aceite de oliva. Estas conclusiones coinciden con los resultados obtenidos en los experimentos con animales sanos, donde el ácido oleico mostraba una ligera tendencia inmunosupresora mientras que el efecto anti-inflamatorio era bastante patente al emplear ácidos grasos n-3.

Puesto que los ácidos grasos n-3 incorporados en una dieta a base de aceite de oliva resultaron bastante eficaces como anti-inflamatorios, se estimó importante el comprobar que estos PUFAs n-3 también podrían ser eficaces incorporados en una dieta elaborada a base de aceite de girasol, donde estarían acompañados por ácidos grasos n-6 de carácter más pro-inflamatorio y en ausencia tanto de los elevados niveles de ácido oleico como del conjunto de antioxidantes propios del aceite de oliva.

#### **10.4 Efectos de una dieta rica en ácidos grasos n-3 en un fenómeno de dermatitis alérgica en ratones**

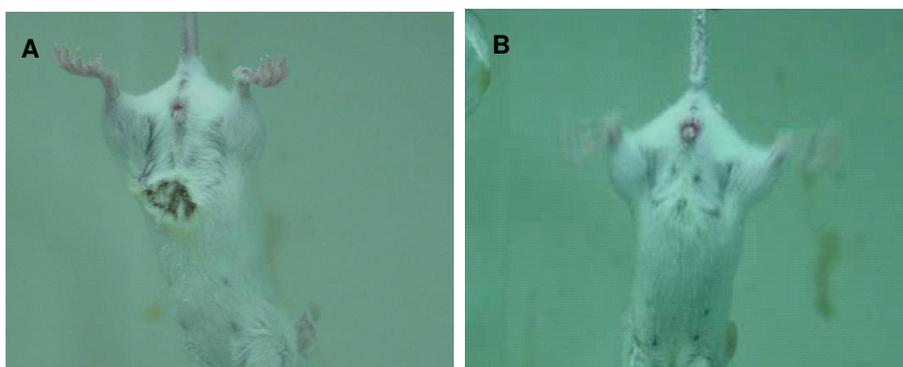
Para testar el posible efecto antialérgico de nuestra dieta W3 se decidió hacer uso de un modelo de dermatitis atópica, enfermedad creciente en niños durante los últimos años (Calder PC y Prescott SL, 2004). Esta patología se caracteriza por que en ella se

alteran tanto la respuesta Th1 como la Th2, motivo por el cual el aceite de pescado podría resultar especialmente beneficioso.

Se tomaron dos grupos de ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ) y se le administró a uno de ellos la dieta control a base de aceite de girasol y al otro la dieta W3 enriquecida en aceite de pescado durante 21 días. Se indujo una dermatitis alérgica (DA) en los ratones de ambos grupos tal como se explica en la sección Material y métodos (apartado 6.1.12.); transcurrido el tiempo de estudio se sacrificaron los animales.

Durante el estudio se controlaron peso, aspecto y comportamiento de los animales, viéndose que no variaba entre los dos grupos, observándose perfiles de crecimiento semejantes a los obtenidos en el caso de animales sanos ( $45.7 \pm 29.9$  vs  $52.5 \pm 26.8$  % de incremento de peso; Girasol vs W3).

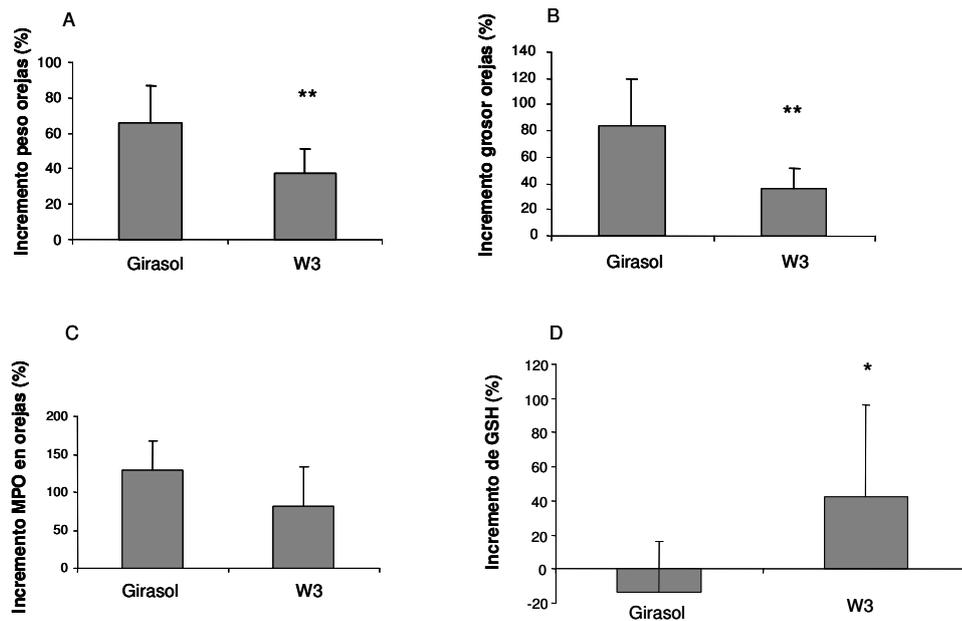
La primera mejora que se apreció con la administración de la dieta W3 fue el hecho de que en los ratones que la ingirieron no se produjo el fenómeno de hipersensibilidad retardada propio del modelo tras el primer *challenge*. En la Figura 10.14 se aprecia este fenómeno; mientras que en los ratones del grupo control se observa una llaga bastante agresiva en la zona de administración del DNFB, en los ratones del grupo W3 no se produce. Probablemente este efecto sea posible gracias a la capacidad de los ácidos grasos n-3 de disminuir la respuesta Th1 responsable de esta respuesta inmunitaria.



**Figura 10.14. La dieta W3 protege del fenómeno de hipersensibilidad retardada característico de este modelo de dermatitis alérgica. A) Grupo Girasol; B) Grupo W3.**

Se analizaron las orejas de los ratones, zona de contacto de la segunda administración del alérgeno, observando que tanto el peso, como el grosor disminuían en los ratones que habían consumido la dieta rica en aceite de pescado (Figura 10.15A y B). Estos resultados sugirieron una mejora que ya era visible y que se confirmó con la medida

de parámetros más específicos. De este modo, se observó que en las orejas del grupo W3 disminuía la MPO (Figura 10.15C), evidenciando la disminución de la infiltración de leucocitos en la zona dañada, al tiempo que se incrementaban los niveles de GSH, confiriendo protección en la zona de la lesión y propiciado así la mejora. En este caso, la dieta W3 no sólo no disminuye los niveles de GSH de las orejas dañadas con respecto a las sanas, sino que además los incrementa (Figura 10.15D).



**Figura 10.15. Los ácidos grasos n-3 mejoran el proceso alérgico a nivel local disminuyendo peso, grosor y actividad MPO y aumentando los niveles de GSH en las orejas enfermas.** A) Incremento de peso de la oreja enferma con respecto a la sana. B) Incremento de grosor de la oreja enferma con respecto a la sana. C) Incremento de MPO de la oreja enferma con respecto a la sana. D) Incremento de GSH de la oreja enferma con respecto a la sana. Los datos son la media±DE y vienen expresados en porcentaje. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  entre los grupos. (n = 10/grupo).

En esas mismas orejas se analizaron diversas citocinas observándose el descenso significativo de IL-4 en las orejas enfermas de los ratones del grupo W3, sugiriendo un posible efecto antialérgico a nivel local al reducirse la respuesta Th2 (Tabla 10.6). El resto de citocinas no se modificaron apenas.

**Tabla 10.6. La dieta W3 disminuye los niveles de IL-4 en el lugar de la lesión.** Incremento de citocinas de la oreja enferma con respecto a la sana (%).

	<b>Girasol</b>	<b>W3</b>
<b>IL-10</b>	101.3±36.6	90.8±21.2
<b>IL-12</b>	145.5±58.1	121±25.1
<b>IL-4</b>	153.05±83.3	107.5±26.2*
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	140.8±23.5	140.2±36.5

Los valores mostrados son el resultado obtenido del cociente entre las concentraciones de citocinas encontradas en la oreja enferma con respecto a la sana expresado en porcentaje. Los resultados se obtuvieron por ELISA en homogenado de orejas y son la media±DE; \*p<0.05 entre el grupo control y el grupo W3. (n = 10/grupo)

Para comprobar si esta respuesta antialérgica se extendía más allá del foco de lesión, se decidió analizar otros componentes del sistema inmunitario que pudieran haberse visto afectados. Por problemas técnicos los bazos de los ratones de ambos grupos tuvieron que ser descartados. Sin embargo, sí que se estudió el efecto de los ácidos grasos n-3 sobre los macrófagos en este modelo de alergia. El perfil de citocinas coincidía con el encontrado en animales sanos, de modo que el efecto anti-inflamatorio de estos compuestos seguramente medió la resolución del proceso alérgico, especialmente de la hipersensibilidad retardada, ya que las reacciones que transcurren en este modelo suelen involucrar a macrófagos (Tabla 10.7).

**Tabla 10.7. La dieta W3 disminuye citocinas inflamatorias mejorando el curso de la DA.** Niveles de IL-12, TNF $\alpha$  e IL-10 producidos por macrófagos.

	<b>Girasol</b>	<b>W3</b>
<b>IL-12</b>	257,8±3,4	155,5±5,9**
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	13981,5±5332	8908,9±976,3
<b>IL-10</b>	142,7±72,7	228,33±113,1*

La concentración de citocinas viene dada en pg/ml y se determinó por ELISA en sobrenadante de macrófagos que habían estado cultivados 24h en presencia de LPS. Los resultados son la media±DE, \*\* p<0.01 entre el grupo control y el grupo W3; # p=0.08 (n = 10/grupo).

A nivel plasmático también se apreció el efecto de los ácidos grasos n-3 como se observa en la Tabla 10.8. Existió una disminución en plasma de IgG<sub>1</sub> e IgE en los ratones

que consumieron la dieta W3, datos que revelan un efecto directo del aceite de pescado sobre el desarrollo de la respuesta Th2, frenándolo. Además, durante la puesta a punto del modelo, se apreció el incremento en suero de ambas Igs, de modo que no se trató de una mera disminución de IgG1 e IgE, como sucedía en animales sanos, sino que la dieta W3 estaba contrarrestando los síntomas alérgicos inducidos. La disminución de IL-12 e IL-4, y el incremento de IL-10 en plasma, sugieren de nuevo una regulación a la baja de las respuesta Th1 y Th2, efecto característico ejercido por la dieta W3 que ya se había observado en los animales sanos mediado por esta citocina reguladora (Tabla 10.8). El hecho de que la IgA aumente en plasma supone un factor importante si se tiene en cuenta que este tipo de desorden inmunitario se caracteriza por una incrementada susceptibilidad a padecer infecciones de la piel (Nombra I y col, 2003).

Como se ha podido observar, la capacidad de los ácidos grasos n-3 de disminuir las respuesta Th1 y Th2 supone un beneficio en patologías como la dermatitis alérgica donde intervienen ambos tipos de respuesta, resultando beneficiosa en el paliamiento de los síntomas más característicos.

**Tabla 10.8. La dieta W3 reduce los mediadores de la respuesta Th1 y Th2 en plasma de animales que padecen DA.** Niveles de citocinas e inmunoglobulinas en plasma de ratones con DA.

	Girasol	W3
<b>IgG</b>	853,1±111,1	858,4±483,9
<b>IgG<sub>1</sub></b>	284,3±39,4	117,3±62,6 **
<b>IgE</b>	69,9±14,3	56,53±0,1 *
<b>IgA</b>	137.9±62.7	194.6±42.8*
<b>IL-12</b>	85,9±34,03	48,6±30,7 *
<b>IL-4</b>	3,1±0,5	1,9±1,1
<b>IL-10</b>	181,1±172,1	295,6±223

Medidas realizadas por ELISA. Los resultados son la media±DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 entre los grupos Girasol y W3. IgG, IgG<sub>1</sub> e IgA vienen expresadas en µg/ml, IgE en ng/ml y las interleucinas en pg/ml.

### **10.5 Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de esclerosis múltiple en ratones**

Puesto que los ácidos grasos n-3 parecen tener cierto papel inmunosupresor, también deberían ser útiles en procesos autoinmunes en los que el propio sistema

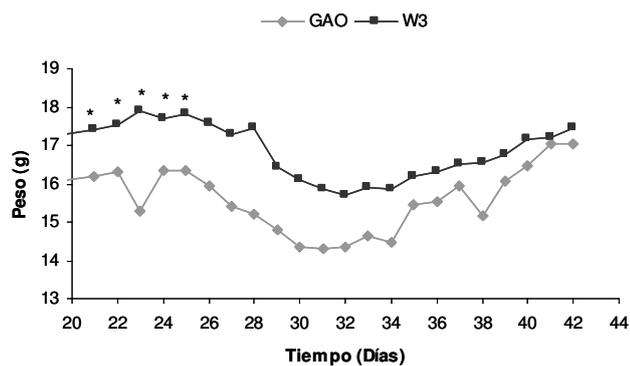
inmunitario reacciona frente a estructuras del organismo, reconociéndolas como extrañas. Es lo que sucede en el caso de la esclerosis múltiple, donde las células inmunitarias atacan a la mielina del sistema nervioso. El proceso se agrava además con una inflamación generalizada que dificulta aún más la transmisión del impulso nervioso.

Para testar la eficacia del aceite de pescado en esta enfermedad, se indujo un proceso de encefalitis autoinmune experimental (EAE), en ratones a los que se había estado alimentando con Dieta GAO o bien Dieta W3 según se indica en el Material y Métodos (apartado 6.1.13.). Puesto que la única diferencia entre las dietas era la incorporación de EPA y DHA a las mismas, como se aprecia en la Tabla 10.9, el efecto observado podría ser atribuido directamente a estos dos ácidos grasos n-3.

**Tabla 10.9. Composición de ácidos grasos de las dietas GAO y W3.** Los resultados vienen expresados en g/100 g de grasa.

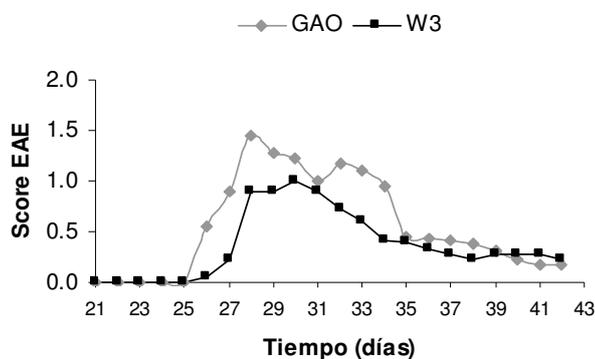
	<b>GAO</b>	<b>W3</b>
<b>Ac. Mirisítico C14:0</b>	0.1	0.5
<b>Ac. Palmítico C16:0</b>	5.1	5.7
<b>Ac. Palmítico C16:1</b>	0.1	0.4
<b>Ac. Esteárico C18:0</b>	4.0	4.0
<b>Oleico C18:1n9c</b>	<b>75.1</b>	<b>71.3</b>
<b>α-linoleico C18:2n6c</b>	<b>13.0</b>	<b>11.5</b>
<b>α-Linolénico C18:3n3</b>	0.2	0.2
<b>Araquidónico C20:4n6c</b>	<b>nd</b>	<b>0.0</b>
<b>EPA C20:5n3</b>	<b>nd</b>	<b>1.5</b>
<b>DHA C22:6n3</b>	<b>nd</b>	<b>2.0</b>
<b>MUFA</b>	75.5	68.0
<b>PUFA</b>	13.1	15.2
<b>n-6</b>	13.5	15.2
<b>n-3</b>	<b>0.2</b>	<b>3.6</b>
<b>n-6/n-3</b>	<b>90.3</b>	<b>4.2</b>

A lo largo del estudio se fueron obteniendo diferentes datos que dieron una idea del papel de los ácidos grasos n-3 sobre esta enfermedad autoinmune. El primer parámetro analizado fue la evolución del crecimiento de los animales. En ambos grupos se produjo un descenso paulatino del peso a lo largo del tiempo desde el momento de la inmunización, que se va recuperando tras unos diez días de enfermedad. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre ambos grupos, como se observa en la Figura 10.16, ya que la diferencias existentes son fruto de una diferencia de peso inicial entre los animales de ambos grupos.



**Figura 10.16. Evolución del peso de los ratones que sufren EAE.** Los resultados son la media $\pm$ DE; \*  $p < 0.05$  entre los grupos GAO y W3. (n = 9/grupo).

Para evaluar el curso clínico de la enfermedad en este modelo, se fue asignando un *score* diario en función del grado de gravedad de ese momento. En la Figura 10.17 se observa la evolución del *score* en los animales de ambos grupos. Durante el primer brote de la enfermedad los animales del grupo W3 estaban menos afectados que los del grupo control, llegando a los últimos días del primer brote con *scores* semejantes.



**Figura 10.17. Los ácidos grasos n-3 mejoran el curso de la EAE.** *Score* diario asignado a los animales durante el primer brote. Los resultados son la media $\pm$ DE. (n = 9/grupo).

Para completar esta información se analizaron diferentes datos obtenidos a partir del modelo que nos permitieron comparar la evolución de los ratones durante el proceso. En la Tabla 10.10 se contemplan algunos de estos parámetros clínicos. Aunque la mayor parte de los datos no son significativos, se puede apreciar la eficacia de la dieta rica en aceite de pescado sobre los distintos factores relacionados con la patología.

**Tabla 10.10.** Parámetros clínicos estudiados en ratones que padecen EAE a los que se incrementa su ingesta de ácidos grasos n-3.

	<b>GAO</b>	<b>W3</b>
<b>Incidencia</b>	6/9	6/9
<b>Mortalidad</b>	0/9	0/9
<b>Inicio</b>	12.83±1.2	15.1±3.9 *
<b>Cronicidad</b>	11.9	8.01
<b>Duración</b>	13.16±3.9	10.3±4.3
<b>Gravedad</b>	2.91±1.6	1.9±11.2
<b>Morbilidad</b>	8±2.4	7.01±4.0
<b>Recuperación</b>	0.25±0.2	0.33±0.4

Los datos son la media±DE, \*p<0.05 entre los grupos GAO y W3 (n = 9/grupo). La definición de los parámetros se halla en el Material y Métodos (6.1.3.).

Como se puede observar, no se produjo la muerte de ningún animal y los animales enfermaron (en número) por igual en un grupo que en otro. La aparición de los primeros síntomas se retrasó en el grupo W3, llevando así a una menor duración del primer brote. La enfermedad se hizo más crónica en el grupo control, hecho que se suma a una mayor gravedad y morbilidad en los animales de este mismo grupo. Sin embargo, en cuanto a la recuperación, no se aprecia una mejora con la administración de los ácidos grasos n-3, ya que los animales de este grupo finalizaron el primer brote con un *score* incluso un poco mayor que en el grupo control.

No solo se estudió la clínica de la EAE si no que también se quiso determinar los posibles efectos inmunitarios de la dieta a este nivel, a pesar de que encontrar un mecanismo inmunitario para explicar los efectos del aceite de pescado sería difícil, puesto que en el momento del sacrificio los animales estaban todos en el mismo estadio. Sin éxito, se analizó la proliferación de linfocitos, ya que no se observaron diferencias entre ambos grupos (datos no mostrados). Como era esperable, no se apreció efecto alguno, motivo por el cual decidimos no continuar analizando el resto de muestras recogidas.

El efecto anti-inflamatorio encontrado para los ácidos grasos n-3 se confirma en un modelo autoinmune. Probablemente los mecanismos sugeridos en los estudios anteriores son también responsables de la mejora clínica de los ratones enfermos de EAE que tomaron la dieta W3. Aunque en este caso el efecto observado no es muy potente, sí que se observa una mejoría en los roedores, por lo que el consumo de estos PUFA n-3 podría resultar beneficioso en esta enfermedad y otras de carácter semejante.

## **10.6 Efecto de los ácidos grasos n-3 sobre salud cardiovascular, alteraciones metabólicas y obesidad**

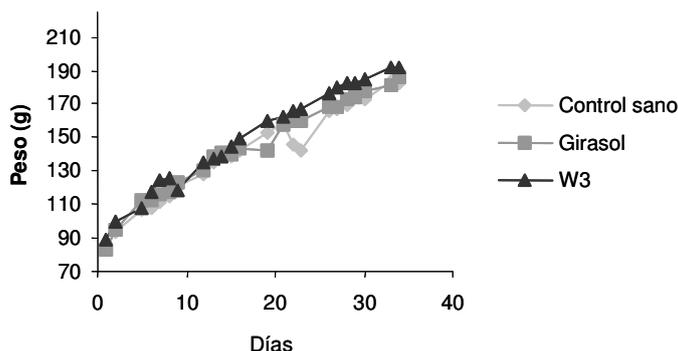
Estos tres conceptos, enfermedad cardiovascular, alteraciones metabólicas y obesidad, están estrechamente relacionados, no apareciendo normalmente aislados sino siendo unos consecuencia de los otros. En muchas ocasiones, estos problemas se generan entre otras causas por el consumo de una dieta inadecuada, rica en grasas saturadas y pobre en PUFAs, con un ratio n-6/n-3 lejano de las recomendaciones. Por lo tanto, la propia dieta puede prevenir la aparición de los mismos o incluso colaborar en la resolución del problema una vez instaurado. Puesto que nuestros estudios han confirmado el importante papel anti-inflamatorio y estos desórdenes se caracterizan por un marcado estado inflamatorio que agrava la situación, se decidió testar nuestra dieta rica en aceite de pescado en modelos donde existiesen este tipo de alteraciones, con el fin de vislumbrar nuevos mecanismos de acción a este nivel. Además, los estudios de los ácidos grasos n-3 sobre ratones sanos ya revelaron un importante efecto a nivel génico que repercutía de manera directa sobre el metabolismo lipídico, que alterado, es origen de enfermedades cardiovasculares.

### **10.6.1. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de obesidad inducido por la ingesta de una dieta de cafetería.**

Con el propósito de determinar la repercusión de los ácidos grasos n-3 sobre factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular, se diseñó un experimento que constó de tres grupos ( $n = 8/\text{grupo}$ ) de ratas. Uno de los grupos sería el control sano, que ingirió la dieta Girasol; las ratas de los otros dos grupos consumieron una dieta Girasol o bien una dieta W3, en ambos casos junto con la administración de una dieta de cafetería hipercalórica que debería inducir la obesidad y cambios metabólicos. El objetivo era simular los acontecimientos que tienen lugar en un individuo que consume una dieta poco equilibrada, rica en grasa saturada, pobre en vegetales y frutas y excesiva en hidratos de carbono. El estudio duró 35 días tal y como se indica en el Material y Métodos (apartado 6.1.14.).

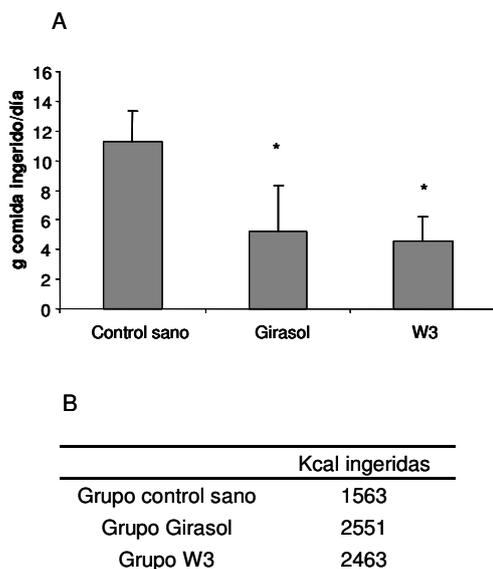
Al estudiar la evolución del crecimiento de las ratas (Figura 10.18), se observó que no existía diferencia en el crecimiento experimentado por las ratas de los tres grupos.

**Figura 10.18.** Evolución de los pesos de las ratas a lo largo del tiempo. Los resultados son la media del grupo (n = 8/grupo).



Este hecho nos sorprendió, ya que el aporte calórico era bastante más elevado en los grupos que ingerían dieta de cafetería que en el grupo control. En la Figura 10.20A se indica el contenido de grasa de las diferentes dietas. También se analizó la cantidad ingerida de la dieta Girasol y W3 que consumían los diferentes grupos, y lógicamente se observó que el grupo que no tomaba dieta de cafetería ingería el doble de dieta semisintética que los otros dos grupos (Figura 10.19A). Sin embargo, entre estos dos grupos que consumían dieta de cafetería, el consumo de las dietas girasol y W3 fue semejante, hecho que facilitaría el análisis de los resultados.

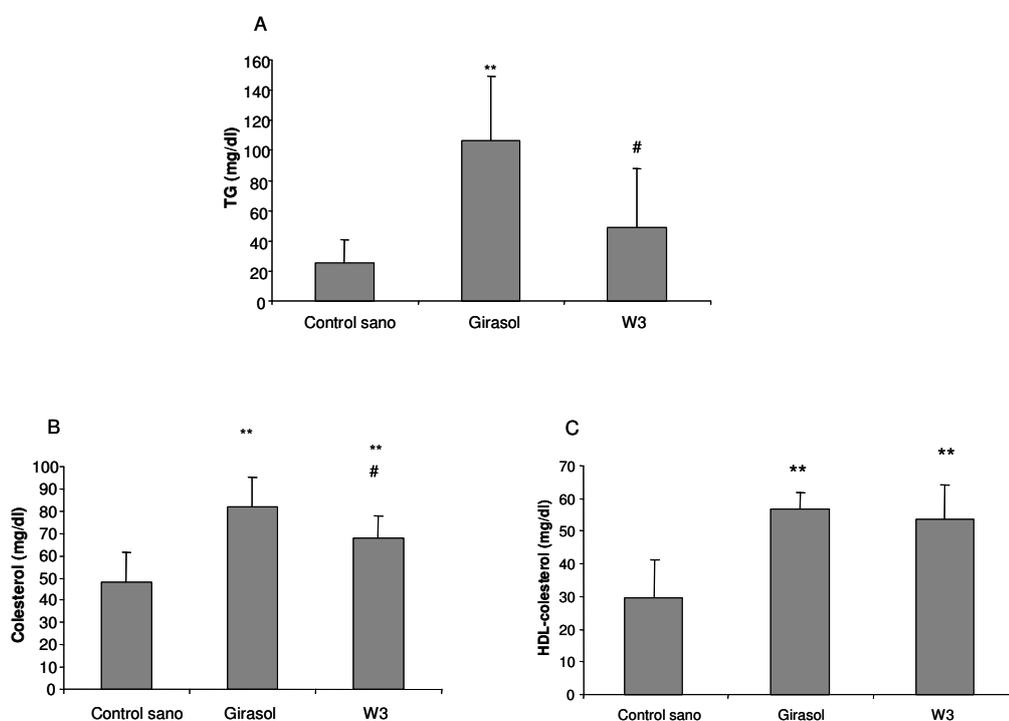
Con los datos del consumo de dieta, tanto semisintética como de cafetería, se pudo calcular que cantidad de Kcals consumidas por las ratas durante todo el estudio. (Figura 10.19B). Se trata de datos aproximados, ya no siempre fue posible controlar la ingesta total de la dieta de cafetería. Como se puede apreciar, la ingesta total de Kcals totales administradas a las ratas que tomaron la dieta de cafetería, fue muy superior a la del grupo control, por lo que resulta difícil explicar que no se produjese un incremento de peso superior en las ratas que consumieron la dieta de cafetería. Quizás la duración del estudio no fue suficiente para poder observar este efecto.



**Figura 10.19.** A) Consumo diario de dieta semisintética por las ratas B) Cantidad de Kcal totales derivadas del consumo de las dietas correspondientes durante la totalidad del estudio. Los resultados son la media±DE. \*p<0.05 con respecto al grupo de ratas sanas. (n = 8/grupo).

Sin embargo, la dieta sí que alteró el perfil lipídico debido a la gran cantidad de grasa ingerida y a la mala calidad de la misma (el ácido graso presente en mayor proporción en las dietas A, B y C fue el ácido palmítico, aproximadamente en un porcentaje del 32%). Se analizaron las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos, observando que con la dieta de cafetería se incrementaban los niveles de ambas formas lipídicas. Sin embargo, la dieta W3 fue capaz de disminuir dichos niveles con respecto al grupo Girasol (Figura 10.20).

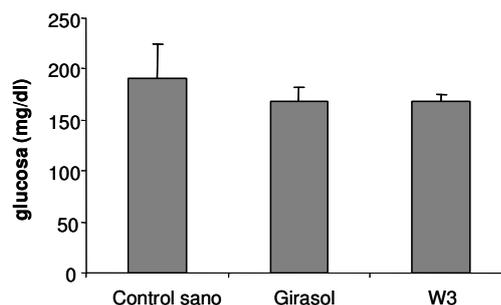
Un problema técnico impidió obtener los datos referentes al colesterol-LDL, pero puesto que no existieron diferencias entre los niveles de HDL de los grupos de ratas que ingirieron la dieta de cafetería, se podría deducir que el descenso de colesterol observado pudo ser debido a un descenso del colesterol-LDL.



**Figura 10.20. La dieta W3 reduce los niveles circulantes de colesterol y triglicéridos.** A) Niveles de triglicéridos en plasma; B) Niveles de colesterol total en plasma; C) Niveles de colesterol HDL en plasma. Los resultados vienen expresados en mg/dl y son la media $\pm$ DE, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control sano; #  $p < 0.05$  entre los grupos girasol y W3. (n = 8/grupo).

Puesto que la grasa también puede afectar al metabolismo glucídico, se determinaron los niveles de glucemia en el plasma de los animales, observándose que estos no se afectaban apenas por el consumo de la dieta de cafetería (Figura 10.2).

**Figura 10.21.** Niveles de glucosa en plasma de ratas que ingirieron dieta de cafetería junto con dietas Girasol y W3. Los resultados vienen dados en mg/dl y son la media $\pm$ DE; (n = 8/grupo).



Como consecuencia de la ingesta de grasa tan elevada, es lógico que se estuviesen produciendo marcados cambios de tipo metabólico, motivo por el cual se decidió también estudiar algunos aspectos hepáticos.

Cuando los hígados fueron extraídos, se observó que habían adquirido un color blanquecino, debido a un proceso de esteatosis. De hecho, el incremento de grasa en los hígados procedentes de ratas que tomaron dieta de cafetería fue significativamente mayor con respecto al control sano, tanto al consumir la dieta Girasol como la dieta W3 (0.081 $\pm$ 0.042 g de grasa en los hígados control frente a 0.154 $\pm$ 0.045 y 0.162 $\pm$ 0.071 en los hígados de las ratas obesas, consumidoras de la dieta Girasol y W3 respectivamente). La composición lipídica de los hígados de las ratas se describe en la Tabla 10.11.

**Tabla 10.11.** Composición de ácidos grasos de los hígados de las ratas que ingirieron dieta de cafetería y de sus ratas control.

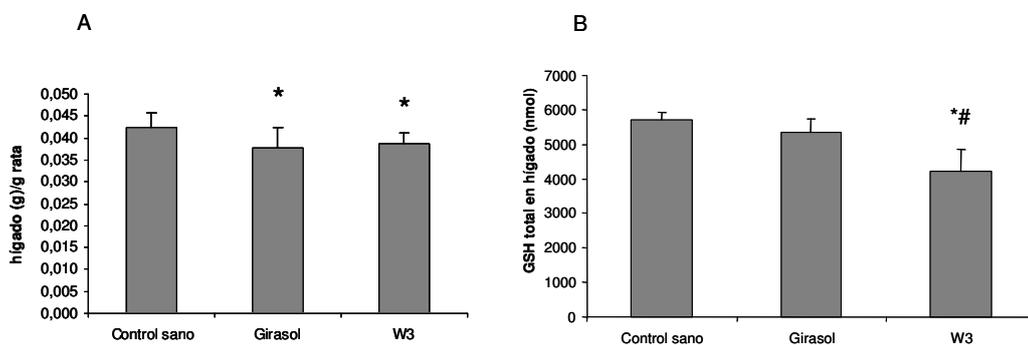
	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	AA	EPA	DHA
<b>Control Sano</b>	15,3 $\pm$ 1,2	24,5 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 3,2	15,02 $\pm$ 1,3	27,02 $\pm$ 2,06	0,1 $\pm$ 0,007	1,8 $\pm$ 0,2
<b>Girasol</b>	20,2 $\pm$ 1,4**	20,17 $\pm$ 1,8**	17,5 $\pm$ 1,6**	11,3 $\pm$ 0,7**	17,4 $\pm$ 1,5**	0,03 $\pm$ 0,01**	3,2 $\pm$ 0,38**
<b>W3</b>	22,4 $\pm$ 1,01** #	17,01 $\pm$ 1,9** #	21,2 $\pm$ 3,8**	12,7 $\pm$ 4,4	12,02 $\pm$ 1,5** ##	0,3 $\pm$ 0,1** ##	6,2 $\pm$ 1,07**##

Los resultados vienen dados en porcentaje y son la media $\pm$ DE; \*\*p<0.01 con respecto al control sano; # p<0.05, ## p<0.01 con respecto al grupo Girasol enfermo (n = 8/grupo).

Como se puede observar, con la ingesta de la dieta de cafetería se produjo un incremento significativo en ácido palmítico y oleico, ácidos grasos en los que estaba principalmente enriquecida la dieta de cafetería (aproximadamente un 30% de ácido palmítico y un 22% de oleico). Estos incrementos se producen a expensas del ácido linoleico, del esteárico y del araquidónico (ARA) que disminuyen. El hecho de incorporar

aceite de pescado en la dieta W3 supone que los hígados se enriquecen en EPA y DHA y que disminuya la cantidad de ARA con respecto al grupo Girasol.

La dieta de cafetería también pareció afectar al tamaño del hígado, que disminuyó (Figura 10.22A), probablemente por la menor densidad de la grasa acumulada. Sin embargo, en las ratas que consumieron la dieta W3 al tiempo que la dieta de cafetería, los niveles de GSH descendieron (Figura 10.22B). El hígado es el órgano principal de síntesis de GSH, de modo que ante situaciones de estrés que afecten al organismo incrementa la producción de GSH para abastecerlo. Con este modelo no se consiguió llegar a una situación en la que el hígado tuviese la necesidad de incrementar su síntesis.

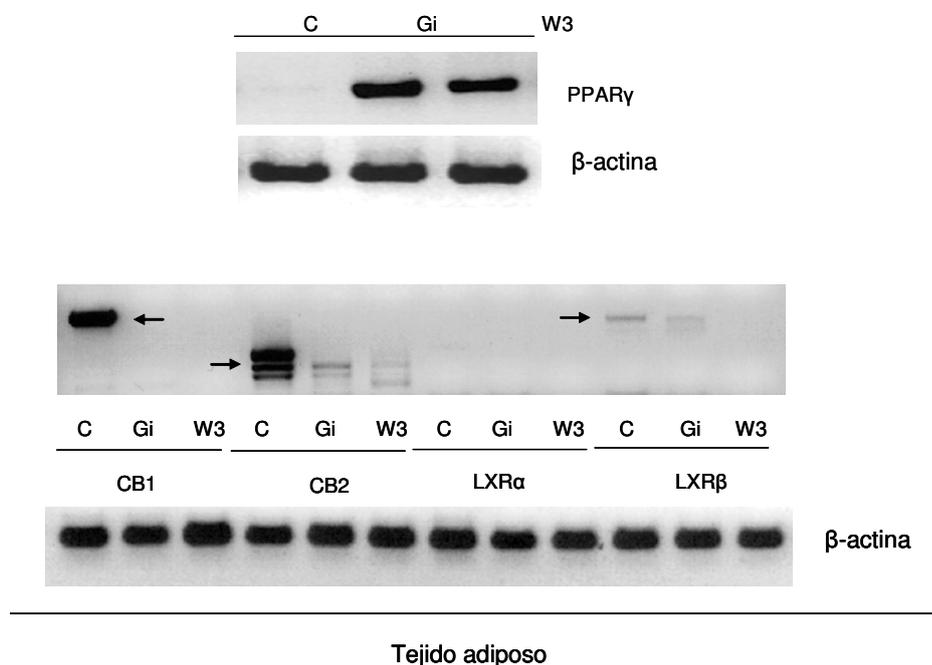


**Figura 10.22.** A) Tamaño del hígado expresado como g hígado/g ratón; B) Niveles de GSH determinados en homogenado de hígado y expresado en nmol. En ambos casos los resultados son la media $\pm$ DE; \* $p$ <0,05, \*\*  $p$ <0,01 con respecto al control sano; #  $p$ <0,05 con respecto al grupo Girasol (enfermo). ( $n = 8$ /grupo).

Como en animales sanos se estudió el efecto del aceite de pescado sobre la expresión génica en diversos órganos y se comprobó que ésta era fácilmente modulable por los ácidos grasos n-3 (ver apartado 10.1 de los Resultados), se decidió analizar en este modelo la posible implicación de determinados genes. Con este objetivo, se analizaron los mismos receptores nucleares que se habían estudiado anteriormente. En la Figura 10.23 se muestra la regulación génica tenida lugar en el tejido adiposo de los animales a los que se administraba la dieta de cafetería.

Se observa como la administración de la dieta de cafetería produjo cambios en la expresión génica de por sí. En tejido adiposo, se indujo la expresión de PPAR $\gamma$ , se reprimió la expresión de CB1 y LXR $\beta$ , y ligeramente disminuyó la expresión de CB2. En ninguno de estos casos la dieta W3 fue capaz de modificar los efectos inducidos por la dieta de cafetería. No se detectó expresión de LXR $\alpha$  en tejido adiposo. Puesto que es evidente que este tipo de receptores analizados modifican su expresión muy sensiblemente

frente a cambios en la alimentación, se hace imprescindible realizar estudios más exhaustivos al respecto.



**Figura 10.23.** Expresión de PPAR $\gamma$ , CB1, CB2, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  en tejido adiposo determinado por RT-PCR. La  $\beta$ -actina fue usada como control. C (control sano), Gi (Grupo Girasol enfermo), W3 (Grupo W3 enfermo).

A juzgar por los resultados obtenidos, los ácidos grasos n-3 podrían ejercer un efecto a nivel de salud cardiovascular, ya que al reducir los niveles de triglicéridos y colesterol, están frenando uno de los principales desencadenantes de fenómenos de aterosclerosis. Sin embargo no queda claro el efecto de los ácidos grasos n-3 a nivel hepático ni su implicación en la modulación de la expresión génica.

#### **10.6.2. Efectos de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre cambios genéticos ocurridos tras una ingesta rica en grasa saturada**

Puesto que los ácidos grasos n-3 parece que puedan ejercer un efecto sobre el metabolismo lipídico se decidió investigar en los mecanismos responsables de dicho efecto. En el estudio anterior quedaron dos incógnitas por resolver; la primera es acerca del efecto de los ácidos n-3 sobre el hígado; y la segunda sobre como estos PUFA podían

regular la expresión génica. Con el fin de solventar las dudas al respecto y de profundizar en el estudio de los efectos del EPA y DHA, se puso en marcha un nuevo estudio. Con este nuevo estudio, trato de mejorarse el modelo, puesto que anteriormente no se había observado incremento de peso al administrar la dieta de cafetería

El experimento constó de dos grupos de ratones que consumieron dietas con alto contenido en grasa saturada a base de mantequilla (15%), de modo que fuese posible estudiar más fácilmente los beneficios ejercidos sobre el metabolismo lipídico; en una de las dietas, parte de la grasa se sustituyó por aceite de pescado (Grupo Mantequilla-W3), quedando el grupo control como Grupo Mantequilla (Material y Métodos, apartado 6.1.15.).

Durante el experimento se evaluó el aspecto y comportamiento de los animales, así como su peso. No se observaron diferencias entre los dos grupos en cuanto a su peso, de modo que no parece que el aceite de pescado tenga un efecto a este nivel. Se extrajeron los hígados de los animales y se analizó su expresión génica por medio de sistemas de *microarrays*. Los resultados se muestran en la Tabla 10.12.

**Tabla 10.12. La dieta Mantequilla-W3 modifica la expresión génica en hígado propiciando la mejora del perfil lipídico y la actividad antioxidante.** Inducción de los genes del grupo W3 con respecto al grupo control en hígado analizado por sistemas de *microarrays*. Los cambios son significativos estadísticamente en todos los casos,  $p < 0.05$ .

Genes	Variación (Total induction)
<b>Síntesis de colesterol</b>	
Escualeno epoxidasa	- 2.5
7-dihidrocolesterol reductasa	- 1.7
<b>Absorción de colesterol</b>	
Apolipoproteína A4	- 1.71
Apolipoproteína A1	- 1.3
LXR $\beta$	+ 2.69
<b>Síntesis de ácidos grasos</b>	
Estereaoil Coenzima A desaturasa I	- 1.7
<b>Degradación de ácidos grasos</b>	
Carnitinal palmitoil transferasa 2	+ 1.3
Alcohol deshidrogenasa 4 de clase II	+ 1.34
<b>Sistema de óxido-reducción</b>	
Canal iónico I	+ 1.3
Xantina deshidrogenasa	+ 2.25
Aldehído deshidrogenasa 3	+ 1.21
Ornitina aminotransferasa	+ 1.3
2, 4-dienoil CoA reductasa 1	+ 1.5

De entre los 1700 genes que se analizaron, sólo existieron unos pocos genes donde existiesen diferencias significativas entre ambos grupos. Estos genes se pueden agrupar

según sus funciones, de modo que se observa como en referencia al metabolismo lipídico disminuyó la expresión de los genes relacionados con la síntesis del colesterol y de ácidos grasos en los hígados del grupo W3, al igual que quedaron reprimidos genes responsables de la absorción de colesterol o del catabolismo de ácidos grasos. La inducción de LXR $\beta$  pudo suponer también un mecanismo de retirada de colesterol del organismo (Sean BJ y col, 2003). Estas diferencias en expresión génica entre el grupo que toma la dieta control y el que toma la dieta W3, sugieren un mecanismo de regulación de los ácidos grasos n-3 sobre la síntesis, degradación y transporte de ácidos grasos y colesterol que probablemente sea el responsable de la disminución de los niveles circulantes de estos compuestos en el organismo.

Otro grupo de genes cuya expresión se ve modificada en el grupo W3 en comparación con el control, está implicado en sistemas de óxido-reducción, lo cual explicaría la acción antioxidante del aceite W3, hecho que se ha observado en alguno de estos estudios al incrementarse los niveles de GSH para contrarrestar los daños causados (Ver apartados 10.2 y 10.4 de los Resultados).

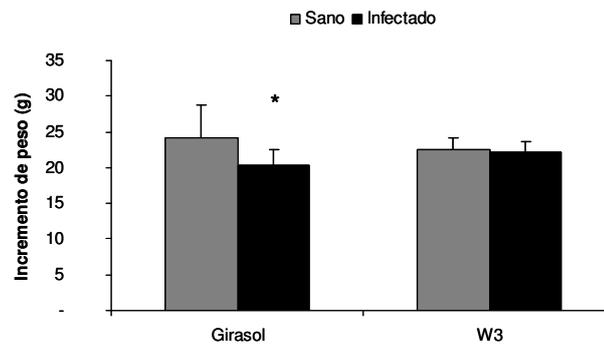
En conclusión, la expresión génica en el hígado parece estar estrechamente modulada por los ácidos grasos n-3, de modo que su inclusión en la dieta podría mejorar en gran medida el metabolismo lipídico evitando factores de riesgo cardiovascular.

#### **10.7. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de infección en ratones**

Una de las principales controversias que rodea el empleo de los ácidos grasos n-3 en clínica es la posibilidad de que el individuo sea más susceptible a infecciones como consecuencia de la supresión de gran parte de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, nuestros datos en ratones sanos ya indicaban que el individuo no queda desprotegido, ya que se produce un incremento de IgA en plasma, un aumento de fagocitosis y una mayor expresión de iNOS en macrófagos (Capítulo 10.1 de los Resultados, Figura 10.7) .

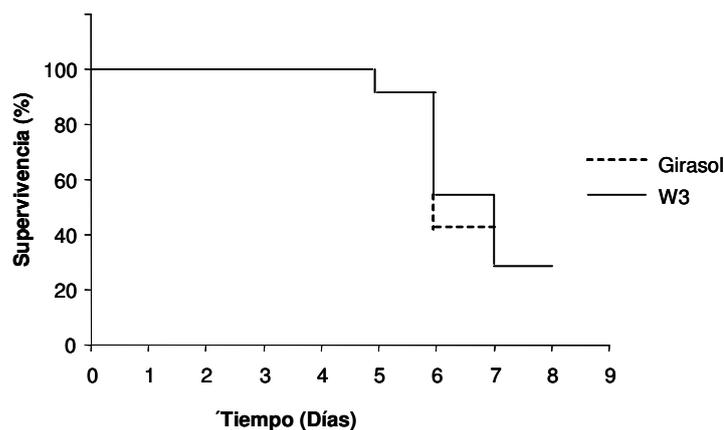
Con el fin de demostrar que los ácidos grasos n-3 no perjudican al individuo, se puso en marcha un modelo de infección. El experimento constó de cuatro grupos de ratones (n = 11/grupo). Dos de ellos alimentados con dieta a base de aceite de girasol (Grupo Girasol) y los otros dos alimentados con una dieta rica en aceite de pescado (Grupo W3). Tras 15 días de administración de dietas, dos grupos que consumían dietas diferentes fueron infectados con *Salmonella* según se indica en el Material y Métodos (apartado 6.1.16.), quedando los otros dos grupos como control.

Después de 5 días de la infección empezó a observarse la mortalidad inducida por la infección. El día previo a la muerte de los primeros animales pudo apreciarse como el grupo de ratones que ingirieron la dieta Girasol sufrió una reducción de peso con respecto a los no infectados, mientras que el crecimiento continuó siendo normal en los ratones del grupo W3 (Figura 10.24).



**Figura 10.24. La dieta W3 previene la pérdida de peso en ratones infectados.** Incremento de peso de los ratones con respecto al día previo a la primera muerte. Los resultados son la media $\pm$ DE; \* $p < 0.05$  con respecto al grupo de animales sanos. (n = 11/grupo).

Sin embargo, a partir del momento en que empiezan a morir animales lo hacen progresivamente y de manera bastante semejante en ambos grupos. En la Figura 10.25 se muestra la curva de supervivencia de ambos grupos.



**Figura 10.25.** Supervivencia de los animales infectados expresada en porcentaje.

Puesto que a día 8 después de la infección quedaron dos ratones vivos en cada grupo, que por su peso y por su aspecto parecían recuperados, se decidió sacrificarlos junto con los animales control para poder llevar a cabo el estudio de los mismos.

Los ratones de los grupos control sin infectar estaban limpios de bacterias en todos los casos. En la Tabla 10.13 se observa el recuento de bacterias de *Salmonella* translocadas a nivel de los órganos de animales infectados. En ningún caso se produjo septicemia, no encontrándose bacterias en sangre.

**Tabla 10.13.** Recuentos de *Salmonella* en bazo, hígado y heces de animales infectados. Los datos de bazo e hígado vienen expresados en CFU/mg de órgano y en el caso de las heces en CFU/g heces

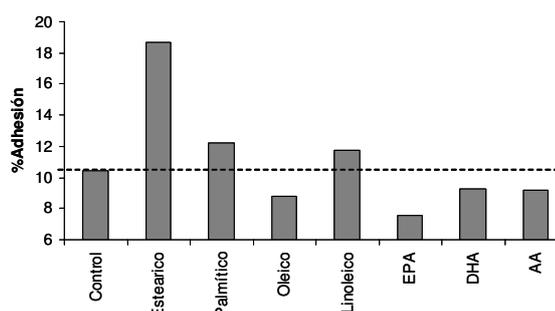
	Bazo		Hígado		Heces	
	Girasol	W3	Girasol	W3	Girasol	W3
Ratón 1	4,E-01	0,00,E+00	5,2,E+05	0,0,E+00	1,6,E+05	0,0,E+00
Ratón 2	5,E+06	1,02,E+06	3,4,E+00	3,9,E+05	1,4,E+04	0,0,E+00

Como se puede apreciar, se produjo translocación de bacterias de manera semejante en los ratones de ambos grupos a nivel de hígado y bazo, aunque en el caso de los ratones que ingirieron dieta W3, la translocación es algo menor. Sin embargo, con tan pocos ratones no es posible realizar un análisis estadístico. En las heces no aparecieron bacterias de *Salmonella* en el grupo W3, lo cual supone una ventaja sobre la dieta Girasol. Estos resultados deberían completarse con un estudio empleando un número de animales mayor que pueda aportar datos estadísticamente significativos.

Para confirmar estos resultados, se llevaron a cabo experimentos *in vitro*. Se empleó un protocolo de adhesión de bacterias a células intestinales (caco-2). Se cultivaron las células en presencia de diversos ácidos grasos y se determinó como se adhería la *Salmonella* que se había añadido al cultivo (Material y Métodos, apartado 5.8). En la Figura 10.27 se aprecia cómo los MUFA y los PUFA en general, en especial el EPA y a excepción del ácido linoleico, disminuyen la adhesión del patógeno al epitelio intestinal, mientras que los ácidos grasos saturados parecen incrementarla.

En conclusión, la dieta W3, por poseer un efecto anti-inflamatorio no convierte al sujeto que la ingiere en más susceptible de padecer infecciones. No solamente no resulta negativo, sino que incluso parece mejorar el proceso de infección y evitar la entrada de microorganismos, aunque serían necesarios más estudios para confirmar los efectos beneficiosos de los ácidos grasos n-3 en modelos de infección bacteriana.

**Figura 10.27.** Adhesión de *Salmonella* a células caco expresado en porcentaje con respecto al control sin patógeno. Los resultados son la media de los valores obtenidos. (n = 4/grupo).



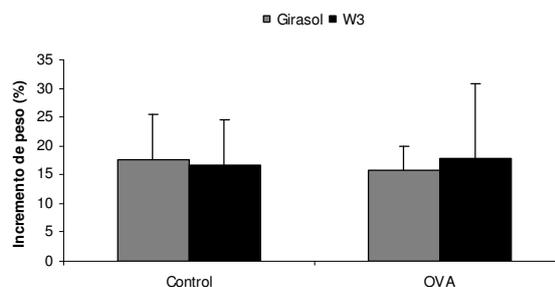
### 10.8. Efecto de una dieta rica en ácidos grasos n-3 sobre un modelo de *shock* anafiláctico

Aunque se había comprobado en ratones sanos que la ingesta de una dieta enriquecida en ácidos grasos n-3 podría llevar a un descenso de la respuesta Th2, el hecho de que se produjese un incremento tan importante de IL-10, citocina responsable del cambio de isotipo de Igs hacia IgE, hizo pensar que tal vez fuese perjudicial en determinados casos, pudiendo potenciar fenómenos de alergia.

Para asegurarnos que los ácidos grasos n-3 eran seguros a este respecto, se decidió administrar una dieta a base de aceite de pescado (dieta W3) frente a otra a base de aceite de girasol (dieta Girasol) a ratones e inducir un *shock* anafiláctico con ovoalbúmina (OVA) según se describe en el Material y Métodos (apartado 6.1.17.). El estudio constaba de 4 grupos de ratones (n = 10/grupo); 2 grupos recibían la dieta Girasol y los otros dos la dieta W3. El proceso alérgico se indujo en los ratones de dos de los grupos que consumían dietas diferentes, y los otros dos grupos quedaron como controles sanos.

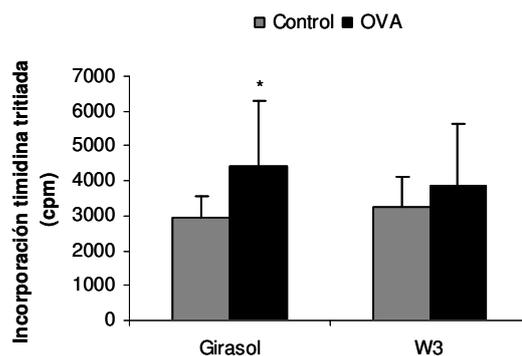
Tras la segunda sensibilización se esperaba el *shock* anafiláctico. Este se percibió en los ratones de ambos grupos por igual, alcanzándose la puntuación 4 del *score* en todos los casos (datos no mostrados). También se analizaron los pesos, viéndose que no existía diferencia en el crecimiento de los animales, ni siquiera en aquellos que habían sido inmunizados (Figura 10.27).

**Figura 10.27.** Incremento de peso expresado en porcentaje de los ratones a los que se sensibilizó con OVA y de sus controles. Los resultados son la media $\pm$ DE, (n = 10/grupo).



Tampoco se encontraron diferencias en cuanto al tamaño del bazo y al número de células del mismo (datos no mostrados).

Finalmente se analizó la proliferación de linfocitos estimulados con OVA observándose que en los animales previamente sensibilizados, la proliferación era mayor al contacto con este antígeno. La dieta W3 fue capaz de disminuir levemente la proliferación de células, frenando en parte la respuesta a OVA (Figura 10.28).



**Figura 10.28. La dieta W3 disminuye la proliferación de linfocitos en ratones alérgicos.** Medida de proliferación de linfocitos estimulados con OVA durante 24 horas, por medio de incorporación de timidina tritiada. Los resultados expresados en cuentas por minuto (cpm) son la media $\pm$ DE, \* $p < 0.05$  con respecto al Control Girasol. (n = 10/grupo).

Se tomaron los plasmas y los sobrenadantes de los linfocitos de los ratones objeto de estudio y se analizó su concentración en Igs y citocinas. En la Tabla 10.14 se exponen los resultados obtenidos.

**Tabla 10.14.** Inmunoglobulinas y citocinas determinadas en ratones sensibilizados con OVA.

Ratones sensibilizados		
	Girasol	W3
IgE (ng/ml)	275.9 $\pm$ 52.6	148.2 $\pm$ 81.56*
IgG1 ( $\mu$ g/ml)	670.2 $\pm$ 178.4	434.7 $\pm$ 230.3*
IgG1 antígeno-específica (DO)	0.417 $\pm$ 0.01	0.386 $\pm$ 0.026*
IL-4 (pg/ml)	20.62 $\pm$ 5.98	18.4 $\pm$ 5.8
IL-10 (pg/ml)	154.7 $\pm$ 71.5	214.5 $\pm$ 64.7*
IL-12 (pg/ml)	50.93 $\pm$ 11.6	54.05 $\pm$ 13.91
[IL-4]/[IL-12]	0.393 $\pm$ 0.2	0.373 $\pm$ 0.18
[IL-12]/[IL-10]	0.364 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.05*
[IL-4]/[IL-10]	0.13 $\pm$ 0.05	0.098 $\pm$ 0.04

Igs determinadas en plasma; citocinas determinadas en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A durante 48h. Relaciones entre las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes de linfocitos. Los resultados son la media $\pm$ DE, \* $p < 0.05$  con respecto al grupo Girasol sensibilizado (n=10/grupo).

El efecto de la dieta W3 sobre las Igs del plasma de los ratones alérgicos se tradujo en una reducción de la respuesta Th2, y por lo tanto del *shock* anafiláctico, aunque este efecto no debió ser suficiente puesto que no se evitaron los síntomas propios del *shock*. El efecto sobre los linfocitos del bazo no fue tan llamativo, aunque de nuevo se percibe un

incremento significativo de la IL-10. Este hecho responde a nuestra inquietud acerca del beneficio o no de que aumente la IL-10 al administrar ácidos grasos n-3 durante un proceso alérgico. En este modelo la IL-10 parece ser responsable de la modulación de la respuesta Th2, más que de potenciar un cambio de isotipo de Ig hacia IgE.

Con este estudio y con los resultados obtenidos a partir del estudio de dermatitis alérgica en ratones (Ver Capítulo 10.4 de los Resultados), se podría afirmar la inocuidad de los ácidos grasos n-3 en fenómenos alérgicos. Sin embargo, sería muy atrevido atribuir un papel antialérgico a los ácidos grasos n-3 con los resultados obtenidos hasta el momento, si bien existe una tendencia de los mismos a reducir la respuesta Th2 exacerbada tras el contacto con un alérgeno.

### **COMPARACION ENTRE LOS EFECTOS INMUNITARIOS DEL EPA Y DHA**

Una de las principales controversias surgidas en torno al papel anti-inflamatorio de los ácidos grasos n-3, es a quién atribuir dicho efecto, al EPA o al DHA o a la sinergia de ambos. Puesto que la mayor parte de los estudios se realizan empleando aceite de pescado como fuente de estos ácidos grasos, no son muchos los datos sobre los efectos del EPA y del DHA por separado.

#### **10.9. Efectos inmunomoduladores de dietas ricas en EPA o DHA en ratones**

La principal característica del aceite de pescado y que más concierne a nuestros estudios, es su abundancia en ácidos grasos de la serie n-3, propiedad que lo distingue del resto. Sin embargo, no todos los aceites de pescado son iguales. Dependiendo del pescado del que se extraiga o de los métodos de extracción, encontramos diferentes propiedades organolépticas y físico-químicas o lo que es más importante, diferente perfil de ácidos grasos. Las diferencias más importantes a este nivel son las relacionadas con la mayor o menor concentración de ácidos grasos n-3 y dentro de éstos, las proporciones de EPA y DHA.

En la Tabla 10.15 se muestra el perfil de ácidos grasos de dos aceites de pescado comerciales diferentes frente al de un aceite de girasol común, con los cuales se elaboraron las dietas para el siguiente estudio. Se trataba de dos aceites de pescado que se diferenciaban fundamentalmente en las proporciones de EPA y DHA, teniendo cantidades semejantes de ácidos grasos n-3. Un aceite con mayor contenido de DHA y otro más rico en EPA.

**Tabla 10.15** Perfil de ácidos grasos de un aceite de girasol frente al de dos aceites de pescado comerciales.

	Aceite de girasol	Aceite de pescado rico en DHA	Aceite de pescado rico en EPA
Mirístico C14:0	nd	4,0	7,2
Palmitico C16:0	6,3	20,7	16,2
Palmitoleico (C16:1)	nd	4,7	8,5
Esteárico (C18:0)	4,0	5,6	3,1
Oleico (C18:1 n-9c)	27,8	10,2	8,9
Linoleico (C18:2 n-6c)	60,5	1,3	1,3
Araquidónico C20:4 n-6c	nd	1,8	1,2
EPA (C20:5 n-3)	nd	6,0	19,8
DHA (C22:6 n-3)	nd	29,6	9,7
Otros	1,4	16,1	24,3
<b>Saturados</b>	10,3	32,9	27,0
<b>MUFA</b>	28,5	18,4	23,7
<b>PUFA</b>	60,5	41,0	38,9
n-6	60,5	3,1	2,4
n-3	0	37,9	36,4
n-3/n-6	0	12,4	15,0

Como se puede observar, ambos aceites de pescado tienen menor cantidad de PUFAs y mayor concentración de ácidos grasos saturados que el aceite de girasol. Los PUFA de los aceites de pescado son principalmente n-3 y en el caso del aceite de girasol, sobre todo linoleico. Mientras que en el aceite de girasol los ácidos oleico y linoleico constituyen casi la totalidad de los ácidos grasos, en el aceite de pescado existe una gran variabilidad, encontrando cantidades apreciables de numerosos ácidos grasos, totalmente ausentes en el aceite de girasol. Sin embargo, las diferencias más drásticas son las referidas al EPA y DHA. En el aceite rico en DHA la proporción DHA:EPA es de 5:1 mientras que en el aceite rico en EPA la proporción EPA:DHA es 2:1. El total de PUFAs n-3 es semejante en ambos aceites (37.9 vs 36.4 %; aceite rico en DHA vs aceite rico en EPA), lo cual hace posible la comparación entre los grupos a los que se administrarían las dietas elaboradas con los mismos. Con estos datos se puede apreciar la enorme diferencia existente entre un aceite de consumo occidental como es el girasol, y el aceite de pescado, muy consumido en otras poblaciones, sobre todo orientales.

El objetivo del siguiente experimento fue tratar de averiguar cual de los dos PUFAs, EPA o DHA, era más eficaz modulando el sistema inmunitario y que posibles mecanismos diferentes podían verse implicados en el efecto de uno u otro ácido graso.

Para ello se tomaron tres grupos de ratones (n = 10/grupo). Uno se alimentó con dieta a base de aceite girasol (Grupo Girasol), otro con una dieta enriquecida en aceite de pescado alto en EPA (Grupo EPA) y el último grupo recibió una dieta enriquecida en aceite de pescado alto en DHA (Grupo DHA). La administración de la dieta se llevó a cabo durante dos semanas.

Antes del sacrificio se indujo en una de las orejas de cada animal una dermatitis de contacto que cursó con una inflamación aguda, del mismo modo que se hizo en el capítulo 10.2 de los Resultados. Los detalles del modelo se explican en el apartado 6.1.18. del Material y Métodos.

A continuación se expone el perfil de ácidos grasos definitivo con el que quedaron las dietas sintetizadas (Tabla 10.16).

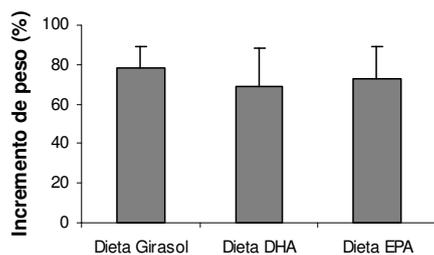
**Tabla 10.16.** Composición de ácidos grasos de la Dieta Girasol, la Dieta EPA y la Dieta DHA expresada en g/100 mg de grasa.

	<b>Dieta Girasol</b>	<b>Dieta DHA</b>	<b>Dieta EPA</b>
<b>Palmítico C16:0</b>	9,5	11,4	11,2
<b>Esteárico C18:0</b>	5,1	5,3	4,9
<b>Oleico C18:1 n-9c</b>	27,4	25,2	25,1
<b>Linoleico (C18:2 n-6c)</b>	53,7	46,8	45,2
<b>Araquidónico C20:4 n-6c</b>	0,0	0,3	0,0
<b>EPA C20:5 n-3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,8</b>	<b>2,8</b>
<b>DHA C22:6 n-3</b>	<b>0,0</b>	<b>3,9</b>	<b>1,4</b>
<b>Otros</b>	4,1	6,3	9,15
<b>Saturados</b>	14,6	16,6	16,2
<b>MUFA</b>	27,4	25,1	25,1
<b>PUFA</b>	53,7	51,8	49,5
<b>n-3/n-6</b>	0,0	0,1	0,0
<b>n-6</b>	53,7	47,1	45,5
<b>n-3</b>	0,0	4,7	4,2

Como se puede observar en la tabla, los ratios n-3/n-6 de las dietas elaboradas con aceite de pescado son semejantes y muy superiores al de la dieta control. En la dieta DHA la relación definitiva DHA:EPA es de 4,8:1 mientras que en la dieta EPA la relación EPA:DHA es de 2:1, frente a la ausencia de ambos ácidos grasos en la dieta Girasol.

La semejanza entre las concentraciones de PUFAs, MUFAs y ácidos grasos saturados entre las tres dietas elaboradas facilita la comparación entre las mismas. La principal diferencia entre la dieta Girasol y las enriquecidas con aceite de pescado es, por tanto, la cantidad de ácidos grasos n-3, por lo que cualquier efecto observado en estas dietas será atribuido a los mismos. Por último, la igualdad de ratio n-3/n-6 en las dietas elaboradas con aceite de pescado, permite a su vez atribuir mayoritariamente los efectos de una u otra dieta al ácido graso n-3 en el que estén principalmente enriquecidas.

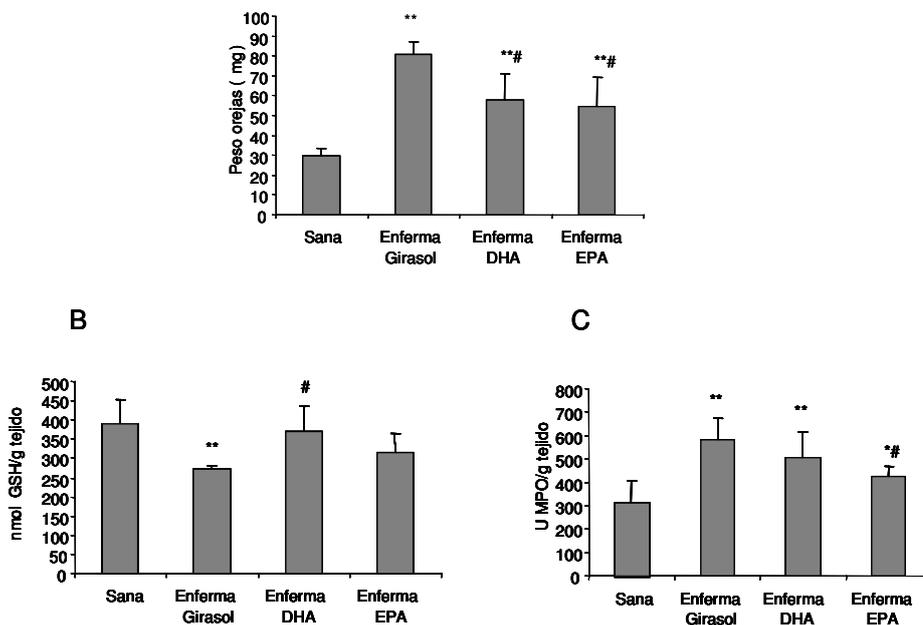
Después de dos semanas de administración de las dietas, no se percibieron cambios ni en el aspecto ni en el comportamiento de los animales. El análisis del crecimiento de los ratones no reveló diferencias entre los grupos (Figura 10.29).



**Figura 10.29.** Incremento del peso de los animales expresado en porcentaje. Los resultados son la media $\pm$ DE. (n = 10/grupo).

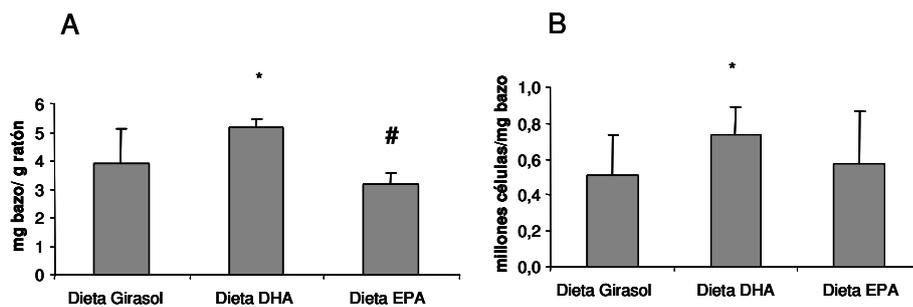
El siguiente objetivo fue determinar que dieta funcionaba mejor en un proceso inflamatorio agudo, por lo que se analizaron las orejas de los ratones obteniendo los resultados que se detallan en la Figura 10.30.

Ambas dietas, EPA y DHA, fueron igualmente eficaces a la hora de frenar el proceso inflamatorio que estaba teniendo lugar. Sin embargo, el efecto beneficioso cursado por la dieta EPA parece estar mediado en mayor medida por la disminución de MPO, mientras que en el caso de la dieta DHA por medio de la restauración de los niveles de GSH.



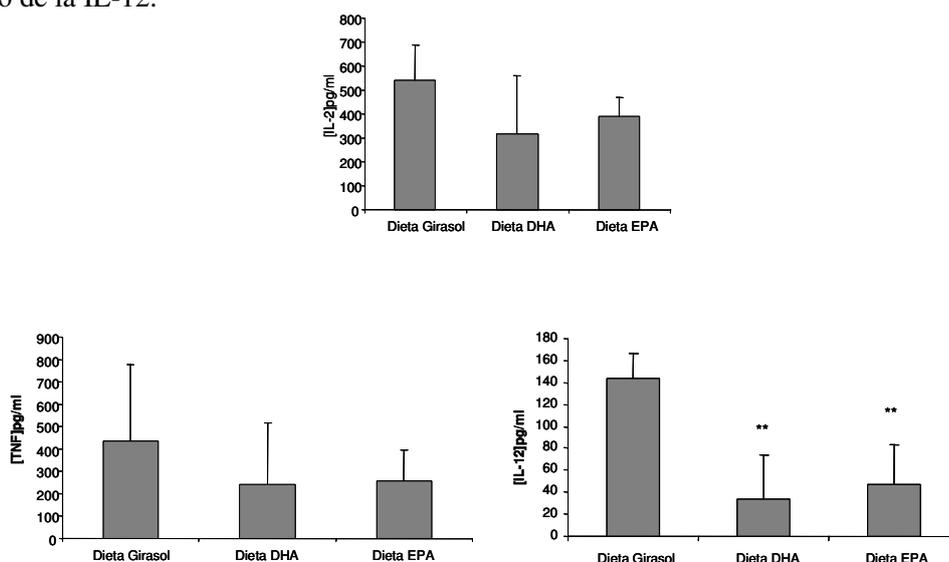
**Figura 10.30.** Las dietas EPA y DHA mejoran el curso de la inflamación local. A) Peso de las orejas; B) Contenido de GSH de las orejas; C) Actividad MPO en las orejas. Los resultados son la media $\pm$ DE; \*p<0.05, \*\*p<0.01 con respecto a la oreja sana con respecto a la oreja sana; # p<0.05 con respecto a la oreja enferma del grupo Girasol. (n = 10/grupo).

Se analizaron diversos parámetros inmunitarios con el fin de ver las diferencias de actuación entre las dietas. Estudiando el bazo, se observó que tanto el tamaño como el número de células del mismo incrementaban con la dieta DHA, hecho contrario a lo que se había observado previamente al analizar los efectos del aceite de pescado (ver apartado 10.1 de los Resultados). De hecho, la dieta EPA sí que disminuyó ambos parámetros, hecho que hace pensar que pueda existir un efecto anti-inflamatorio más marcado (Figura 10.31).



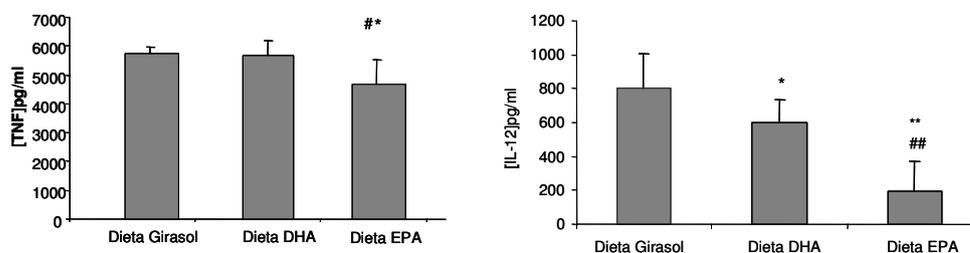
**Figura 10.31. La dieta DHA incrementa el tamaño y el número de células del bazo.** A) tamaño del bazo expresado como mg bazo/g ratón. B) Millones de células por mg de bazo. Los resultados son la media $\pm$ DE, \* $p < 0.05$  con respecto al grupo Girasol; #  $p < 0.05$  con respecto al grupo DHA (n = 10/grupo).

Se comprobó que ambas dietas inhibían por igual la respuesta Th1 mediada por linfocitos (Figura 10.32), al disminuir los niveles de TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12 en los sobrenadantes de estas células, aunque sólo se alcanzó la significación estadística en el caso de la IL-12.



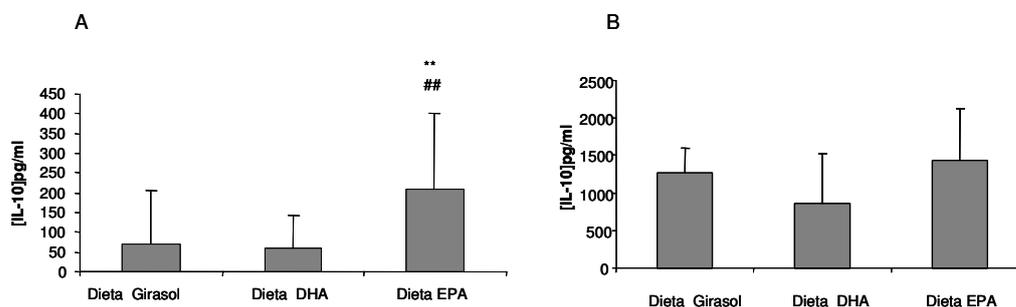
**Figura 10.32. Las dietas EPA y DHA reducen por igual la producción linfocitaria de citocinas Th1.** Concentración de citocinas en sobrenadantes de linfocitos de bazo estimulados durante 48h con Con A y determinada por ELISA. Los resultados son la media $\pm$ DE; \*\* $p < 0.01$  con respecto a la dieta Girasol. (n = 10/grupo).

Sin embargo, a nivel de los macrófagos, sí que se apreciaron diferencias. La dieta EPA era capaz de inhibir en mayor medida la producción de citocinas inflamatorias, como fue el caso de la IL-12 y del TNF $\alpha$  (Figura 10.33), mostrando así un mayor efecto anti-inflamatorio.



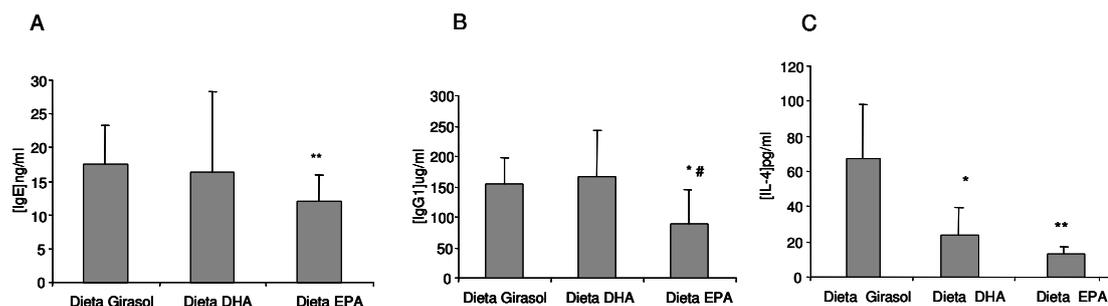
**Figura 10.33. La dieta EPA reduce la producción de citocinas inflamatorias por los macrófagos.** Concentración de citocinas en sobrenadantes de macrófagos estimulados durante 24h con Con A y determinada por ELISA. Los resultados son la media $\pm$ DE; \* p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto a la dieta Girasol; # p<0.05, ## p<0.01 con respecto a la dieta DHA (n = 10/grupo).

Puesto que en los estudios anteriores se había atribuido el efecto inmunosupresor de la dieta rica en aceite de pescado, al incremento de la IL-10, se analizó la producción de esta citocina por parte de linfocitos y macrófagos. La dieta EPA, pero no la dieta DHA, incrementó la producción de IL-10 con respecto al control por parte de ambos tipos celulares (Figura 10.34), especialmente en linfocitos. Es un resultado curioso, ya que este aumento tan significativo de la IL-10 en el sobrenadante de linfocitos no fue capaz de disminuir las citocinas inflamatorias, mientras que en macrófagos, donde la IL-10 no aumentó de un modo tan espectacular, sí que se produjo un descenso de los mediadores inflamatorios. Probablemente este hecho sea debido a una mayor susceptibilidad de los macrófagos frente a la IL-10.



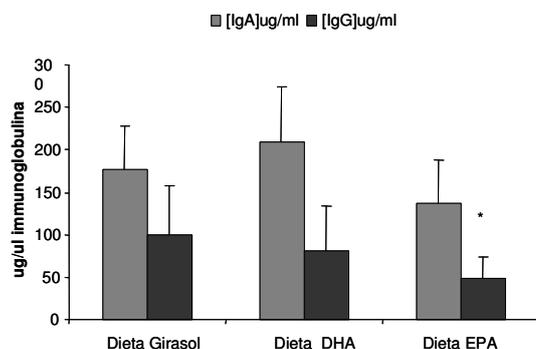
**Figura 10.34. La dieta incrementa la producción de IL-10.** A) Concentración de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos de bazo estimulados durante 48h con Con A; B) Concentración de IL-10 en sobrenadante de macrófagos estimulados con LPS durante 24h. Los resultados obtenidos por ELISA son la media $\pm$ DE, \*\* p<0.01 con respecto a la dieta Girasol; ## p<0.01 con respecto a la dieta DHA (n = 10/grupo).

Otro de los parámetros que se afectó más por la dieta EPA que por la dieta DHA fue la respuesta Th2. Cuando se estudiaron los niveles de Igs pro-alérgicas se comprobó que la dieta EPA reducía las concentraciones en plasma de IgE e IgG1 (Figura 10.35 A y B), mientras que no existía variación al administrar la dieta DHA. Al mismo tiempo disminuía la secreción linfocitaria de IL-4 en los ratones de los grupos EPA y DHA (Figura 10.35 C).



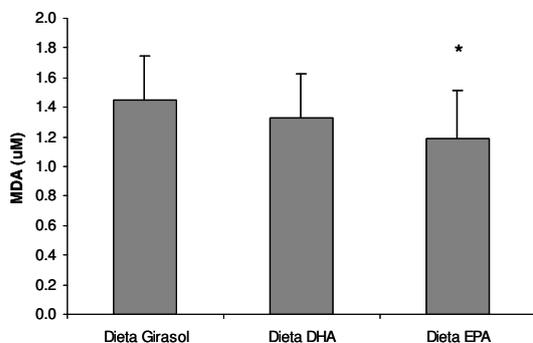
**Figura 10.36. La dieta EPA más que la DHA, reduce la respuesta Th2.** A) Niveles de IgE en plasma; B) Niveles de IgG1 en plasma; C) Niveles de IL-4 medido por ELISA en sobrenadante de linfocitos de bazo, cultivados 48h en presencia de ConA. Los resultados son la media±DE, \*p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto a la dieta Girasol; # p<0.05 con respecto a la dieta DHA.

Siguiendo el mismo esquema de otras ocasiones, se analizaron parámetros relacionados con las defensas propias del organismo, ya que se había visto que el aceite de pescado no las afectaba e incluso las aumentaba. En este caso, parecía ser el DHA el responsable de este efecto del aceite de pescado, ya que la dieta EPA disminuyó los niveles de IgG e IgA con respecto al control mientras que la dieta DHA los mantuvo o incrementó (Figura 10.36). Este dato sugiere también, que el EPA pueda ser más inmunosupresor que el DHA, de lo que se derivan los diferentes efectos observados.



**Figura 10.36. La dieta DHA parece ser la responsable del incremento de las defensas inducido por el aceite de pescado.** Concentración plasmática de IgG e IgA determinada por ELISA. Los resultados son la media±DE, \*p<0.05 con respecto al grupo Girasol. (n = 10/grupo).

Por último, se decidió comprobar el papel de el EPA y DHA como antioxidantes, motivo por el que se analizaron los valores de MDA en plasma. Se encontraron los resultados que se muestran en la Figura 10.37.



**Figura 10.37. La dieta EPA posee mayor poder antioxidante que la dieta DHA.** Niveles de MDA determinados en plasma. Los resultados son la media $\pm$ DE, \* $p < 0.05$  con respecto a la dieta Girasol. (n = 10/grupo).

Teniendo en cuenta todos estos datos, parece que el EPA sea más eficaz en la reducción de las respuestas de tipo Th1 y Th2 que el DHA. Puesto que el EPA, y no el DHA, es sustrato de la COX y LOX, lo que lleva a la inhibición en la formación de eicosanoides de potente acción inflamatoria, sería lógico que su papel como anti-inflamatorio fuese superior al del DHA. Sin embargo, a nivel de la inflamación, ambos son igualmente útiles, sugiriendo que el DHA debe actuar por mecanismos diferentes a los estudiados en este experimento. Sería necesario testar estas dietas en modelos de inflamación más severa, como en IBD o en la esclerosis múltiple, usados en otras ocasiones, para poder confirmar qué ácido graso tiene una mayor potencia anti-inflamatoria.

#### **10.10. Interconversión de EPA en DHA**

Si se confirmase el hecho de que EPA es más eficaz como anti-inflamatorio que el DHA, podría incrementarse la ingesta de EPA con respecto a DHA con fines terapéuticos, surgiendo un nuevo problema. La reducción del DHA en la dieta podría llevar a una disminución de este ácido graso en las membranas de determinados órganos, como cerebro o retina, en los que interviene en el correcto desarrollo y maduración.

En la Tabla 10.17 está la respuesta a este interrogante. Se administre la dieta EPA o la dieta DHA, siempre se acumulan en los tejidos cantidades de DHA semejantes, incluso superiores al administrar la dieta EPA, y siempre superiores al control. Sin embargo, los niveles de EPA en los tejidos no se modifican por incrementar el consumo de

DHA. Estos datos sugieren que existe una potente conversión de EPA a DHA y una escasa o casi inexistente retroconversión de DHA a EPA.

**Tabla 10.17.** Contenido de EPA, DHA, LA y ARA en diversos órganos de ratones que ingirieron las dietas Girasol, DHA o EPA, expresado como g/100 g de grasa. nd = no detectado.

	EPA	DHA	LA	AA
<b>HIGADO</b>				
Grupo Girasol	nd	2,52±0,5	19.02±1.5	12.12±3.4
Grupo DHA	0,23±0,03 <sup>†</sup>	11,32±1,1 <sup>**</sup>	19.5±1.7	7.6±0.8 <sup>*</sup>
Grupo EPA	0,62±0,1 <sup>**#</sup>	9,4±1,4 <sup>**#</sup>	23.2±0.6 <sup>**#</sup>	6.30±1.3 <sup>**#</sup>
<b>CEREBRO</b>				
Grupo Girasol	nd	14.86±0.6	nd	10.19±0.3
Grupo DHA	nd	16.52±0.4 <sup>**</sup>	nd	9.55±0.4 <sup>*</sup>
Grupo EPA	nd	16.02±0.4 <sup>**</sup>	nd	9.26±0.1 <sup>**</sup>
<b>SUERO</b>				
Grupo Girasol	nd	1.66±0.5	24.47±2.009	14.03±3.2
Grupo DHA	0.33±0.3 <sup>**</sup>	7.01±0.9 <sup>*</sup>	30.65±2.83 <sup>**</sup>	8.17±1.09 <sup>**</sup>
Grupo EPA	1.04±0.6 <sup>**#</sup>	8.45±0.93 <sup>**</sup>	25.99±2.02 <sup>#</sup>	11.23±2.008 <sup>#</sup>
<b>OJO</b>				
Grupo Girasol	nd	5.69±1.7	5.09±2.1	5.5±0.9
Grupo DHA	nd	10.56±2.1 <sup>**</sup>	4.007±1.7 <sup>#</sup>	5.26±0.58
Grupo EPA	nd	11.71±2.3 <sup>**</sup>	4.75±2.3	5.61±0.51
<b>BAZO</b>				
Grupo Girasol	nd	1,28±0,19	10,34±1,8	13,48±0,95
Grupo DHA	0,17±0,02 <sup>**</sup>	6,81±0,79 <sup>**</sup>	10,29±1,28	10,48±1,24 <sup>**</sup>
Grupo EPA	0,56±0,1 <sup>**#</sup>	5,98±0,29 <sup>#</sup>	10,38±0,84	11,32±0,52 <sup>**</sup>

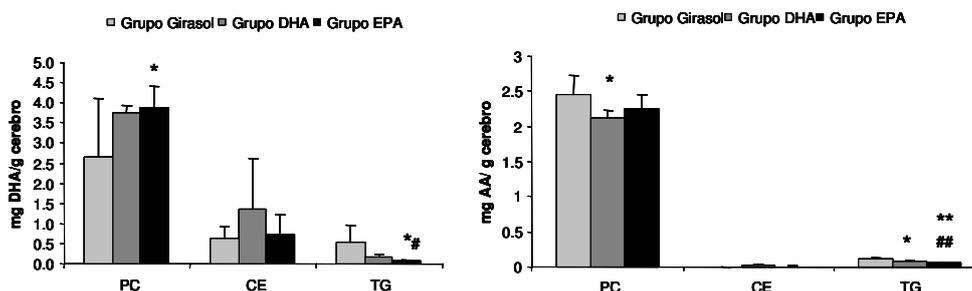
Los resultados son la media±DE; \* p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto al grupo Girasol; # p<0.05 con respecto al grupo DHA (n = 10/grupo).

En hígado y plasma el incremento de ácidos grasos n-3 sucede a expensas del ácido araquidónico (ARA), mientras que cerebro y ojo conservan sus niveles de ARA para mantener así su funcionalidad. Se observa como estos órganos nerviosos, apenas contienen EPA ya que se enriquecen en DHA fundamental para sus células. Hay que tener en cuenta que en los órganos procedentes de los tres grupos hay cantidades de grasa semejantes, por lo que los datos obtenidos no son relativos sino veraces. Por ejemplo, en hígado encontramos las siguientes cantidades de grasa: Grupo Girasol, 0.105±0.01; Grupo DHA, 0.114±0.025 y Grupo EPA, 0.116±0.01.

Esta información no es suficiente para justificar el efecto inmunitario del EPA y del DHA, ya que no basta con que las células inmunitarias se enriquezcan en los mismos, sino que tienen que formar parte de sus fosfolípidos de membrana, en el caso de pretender justificar sus acciones a través de la formación de eicosanoides.

Por este motivo, se estudiaron las distintas fracciones lipídicas de las que pueden formar parte los ácidos grasos dentro de una célula. Para demostrar la incorporación de ácidos grasos en los fosfolípidos, se eligieron hígado y cerebro, órganos ricos en materia grasa que permitirían una extracción sencilla de la misma. Por el protocolo usado (Material y Métodos, apartado 7), el análisis de macrófagos y bazo era muy difícil por su escasez de lípidos.

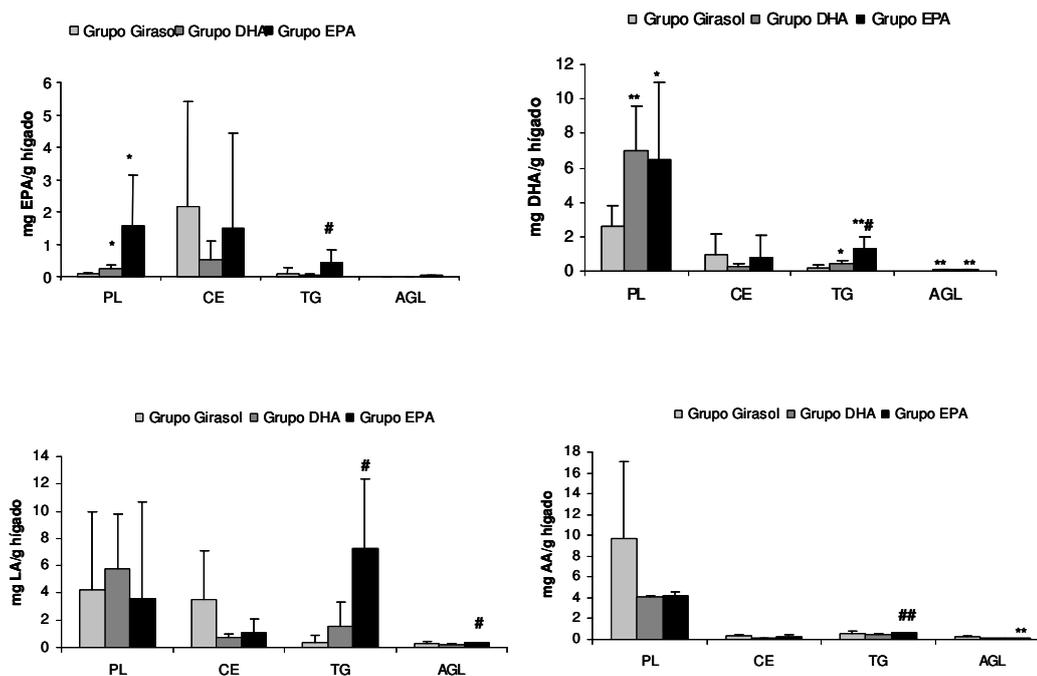
En cerebro (Figura 10.38), los principales ácidos grasos fueron ARA y DHA. El aumento general de DHA en este órgano tras el consumo de dietas enriquecidas con aceite de pescado, se produjo como consecuencia del enriquecimiento en las fracciones de ésteres de colesterol (CE) y de los fosfolípidos (PL) principalmente. En la fracción de PL, dicho incremento sucedió a expensas del ARA, efecto más palpable en el grupo DHA, mientras que en los CE el incremento fue a costa de disminuir el porcentaje del ácido linoleico (LA) (datos no mostrados), también efecto más relevante en el grupo DHA. Hay que tener en cuenta también que tanto DHA como ARA se acumularon principalmente en la fracción fosfolipídica.



**Figura 10.38.** Contenido de DHA y ARA en fosfolípidos (PL), colesterol (CE) y triglicéridos (TG). Los resultados vienen dados en mg de ácido graso por g de cerebro y son la media $\pm$ DE, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  con respecto al grupo girasol correspondiente; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  con respecto al grupo DHA correspondiente ( $n = 10$ /grupo).

A continuación se analizaron las fracciones lipídicas del hígado (Figura 10.39), observándose que la mayor parte de los ácidos grasos se incorporaron sobre todo en PL antes que en otras fracciones. En esta fracción se observaron los mismos resultados que al analizar el contenido de ácidos grasos totales, confirmando estos datos que la incorporación es a nivel de fosfolípidos. Por tanto, al administrar EPA, éste aumenta en PL, mientras que el DHA incrementa en hígado tanto al consumir EPA como al consumir DHA. Además, el incremento en estos ácidos grasos n-3 se acompaña de un descenso de ácido araquidónico al administrar la dieta EPA o la dieta DHA.

Estos datos sugieren la gran capacidad de acción de las elongasas y desaturasas responsables de la síntesis de DHA a partir de EPA en este modelo, motivo por el cual los niveles de DHA necesarios para el correcto desarrollo de retina y cerebro, se alcanzan con la administración de una dieta rica en EPA, sin necesidad de administrar DHA, al menos durante el tiempo de este estudio.



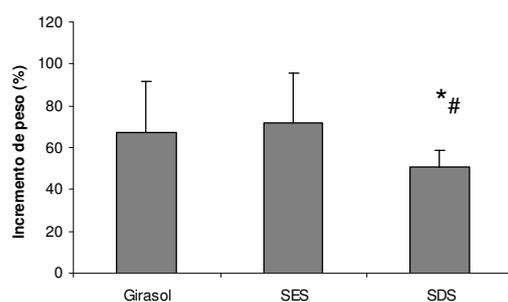
**Figura 10.39.** Incorporación de ácidos grasos en las diferentes fracciones lipídicas. Los resultados vienen dados en mg de ácido graso por g de hígado en fosfolípidos (PL), colesterol (CE), triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres (AGL), y sol la media±DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto al grupo Girasol en de su fracción; # p<0.05, ## p<0.01 con respecto al grupo DHA de su fracción; (n = 10/grupo).

### 10.11. Efecto anti-inflamatorio del EPA y DHA en triglicéridos estructurados

Con la ingesta de aceites ricos en EPA o en DHA se obtuvieron efectos anti-inflamatorios, aunque el EPA parecía ser el más potente a este nivel. Sin embargo, debido a que en ambos aceites estaban presentes tanto EPA como DHA, las conclusiones obtenidas podían ser sesgadas. Además, la riqueza relativa de estos ácidos grasos en los aceites, así como su composición a nivel de triglicéridos, y por tanto su biodisponibilidad, podían ser diferentes, nos propusimos analizar de nuevo la implicación de EPA y DHA en la respuesta inmunitaria utilizando triglicéridos estructurados.

Hoy día es factible la construcción de triglicéridos estructurados que permiten situar un ácido graso específico en cualquiera de las tres posiciones de un triglicérido. Puesto que los ácidos grasos de la posición 2 de un TG se mantienen tras la digestión, se sintetizaron triglicéridos con EPA (SES) o con DHA (SDS) en dicha posición, para asegurarnos de la máxima absorción e incorporación en PL de membrana de los mismos, y poder comparar de manera más fiable los efectos inmunitarios de estos ácidos grasos n-3. El ácido graso acompañante en el TG fue el ácido esteárico, que ocupaba las posiciones 1 y 3. En el Material y Métodos (apartado 6.1.19.) se especifica la estructura de cada uno de los TG estructurados empleados en los estudios.

Estos triglicéridos fueron incorporados en la dieta y comparados con otra a base de aceite de girasol que sirvió de control, como se explica en el Materia y Métodos, apartado 6.1.19. Las diferentes dietas fueron administradas durante un mes a ratones (n =10/grupo), y tras la inducción de una dermatitis de contacto, se sacrificó a los animales, observándose al final del experimento que la dieta que contenía DHA producía un leve descenso de peso (Figura 10.40).



**Figura 10.40. El incremento de peso es menor con la dieta rica en DHA.** Incremento de peso expresado en porcentaje. Los resultados son la media±DE. \* p<0.05 con respecto al grupo Girasol; # p<0.05 con respecto al grupo SES (n = 10/grupo).

A continuación se analizó el perfil de ácidos grasos de las dietas para conocer exactamente las diferencias en cuanto a la calidad de la grasa suministrada. En la Tabla 10.18 se contemplan estos datos. Se observa una ligera disminución de PUFA y MUFA en las dietas con TG estructurados como consecuencia de la menor cantidad de ácido oleico y linoleico con respecto al control. Por el contrario, aumentan los ácidos grasos saturados en estas dietas, debido a la presencia en posición 1 y 3 de ácido esteárico en los TG estructurados. El ratio n3/n6 se incrementa en todas las dietas con dichos triglicéridos, en la dieta SES gracias al EPA y en la dieta SDS gracias al DHA.

**Tabla 10.18.** Composición de la dieta en ácidos grasos expresada g/100 g de grasa nd, no detectado.

	<b>Girasol</b>	<b>SES</b>	<b>SDS</b>
<b>Ac. Esteárico C16:0</b>	10.02	9,5	10,3
<b>Ac. Oleico C18:1 n-9c</b>	25.3	22,7	22,6
<b>Ac. Linoleico C18:2 n-6c</b>	51.4	46,1	44,1
<b>Ac araquidónico C20:4 n-6c</b>	0.8	0,7	0,7
<b>EPA C20:5 n-3</b>	0.2	3,1	0,3
<b>DHA C22:6 n-3</b>	nd	0,0	3,1
<b>Saturados</b>	20.02	25,4	26,6
<b>MUFA</b>	26.2	23,7	23,8
<b>PUFA</b>	53.7	50,9	44,6
<b>n-3/n-6</b>	0.01	0,1	0,1
<b>n-6</b>	45.5	46,8	37,7
<b>n-3</b>	0.6	3,4	3,2

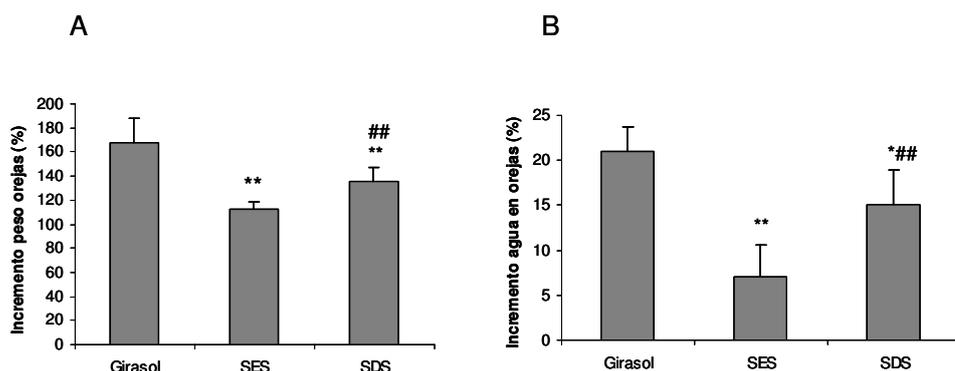
Se analizaron los perfiles de ácidos grasos de diferentes órganos para determinar cómo afectaba la ingesta de los TG estructurados (Tabla 10.19). De nuevo, al administrar la dieta rica en EPA (SES), se observó que se acumulaba en los tejidos DHA, de la misma manera que si se administraba la dieta SDS. En cuanto a la incorporación de EPA en los tejidos, cabe destacar que sucedía de manera proporcional al contenido de las dietas, también resultado semejante al del estudio anterior. En plasma, parece que era donde se incorporaban principalmente los ácidos grasos saturados procedentes de los TG estructurados.

**Tabla 10.19.** Composición de ácidos grasos en hígado, plasma y cerebro de ratones que tomaron las dietas elaboradas con TG estructurados.

	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>n3/n6</b>	<b>PUFA</b>
<b>Hígado</b>				
Girasol	0.028±0.01	1.67±0.36	0.09±0.03	33.04±4.32
SES	0.57±0.05*	6.89±0.97 *	0.28±0.02 *	39.27±2.64 *
SDS	0.18±0.02 *#	7.91±0.73 * #	0.34±0.01*#	36.83±1.9 *
<b>Plasma</b>				
Girasol	0.12±0.14	0.54±0.17	0.13±0.08	13.52±7.26
SES	0.94±0.3 *	2.49±0.84 *	0.72±0.22 *	23.03±4.028 *
SDS	0.03±0.07 #	4.45±1.19 * #	0.77±0.1 *	25.37±5.85 *
<b>Cerebro</b>				
Girasol	0.012±0.02	12.54±0.66	1.37±0.04	25.18±0.88
SES	0.062±0.03 *	15.47±0.47 *	1.57±0.03 *	27.03±0.68 *
SDS	0.04±0.004 *#	14.57±0.13 * #	1.59±0.012 *	25.29±0.25 #

Los resultados son la media±DE; \* p<0.05 con respecto al grupo Girasol; # p<0.05 con respecto al grupo SES. (n =10/grupo).

Se repitió el modelo de dermatitis de contacto, observándose en este caso una mayor eficacia por parte de la dieta SES en la reducción de la inflamación, si bien con ambas dietas se aprecian efectos anti-inflamatorios (Figura 10.41). La dieta SES reduce de manera más severa el edema ocurrido durante el proceso inflamatorio al disminuir la extravasación de líquidos en el tejido dañado. La menor gravedad del daño en las orejas de los ratones del grupo SES se aprecia también en el menor incremento de peso.



**Figura 10.41. La dieta SES mejora más el proceso inflamatorio que la dieta SDS.** A) Incremento de peso de la oreja enferma con respecto a la sana. B) Incremento del contenido de agua de la oreja enferma con respecto a la sana. Los datos están expresado en porcentaje y son la media $\pm$ DE, \* p<0.05, \*\* p<0.01 con respecto al grupo Girasol;. ## p<0.01 con respecto al grupo SES.

Según estos datos, la dieta que contiene EPA, es mas eficaz resolviendo la inflamación, con lo que podría sugerirse, que el EPA es mejor anti-inflamatorio que el DHA. Estos resultados concuerdan con el estudio anterior, donde parecía que el EPA era más potente que el DHA.

### 10.12. Efecto anti-inflamatorio derivado de la posición del ácido graso

El efecto inmunitario de los ácidos grasos de la dieta se debe principalmente a la liberación de los mismos desde los fosfolípidos hallados en las membranas de las células del sistema inmunitario. El ácido graso que se libera del fosfolípido es el situado en posición 2, debido a la especificidad de la fosfolipasa A2 (PLA2) por la misma, por lo que si se administran triglicéridos con los ácidos grasos n-3 en la posición 2 exclusivamente, se piensa que se podría obtener un mayor efecto.

Para comprobar esta hipótesis, se decidió testar dos dietas incorporando el EPA en TG estructurados, ocupando distintas posiciones. Se eligió el EPA ya que parecía ser más anti-inflamatorio que el DHA. De este modo, el experimento constó de tres grupos; un grupo control que recibió una dieta Girasol; y otros dos grupos que recibieron dietas a base de TG estructurados, una con EPA en posición 2 (SES), semejante a la testada anteriormente, y otra con EPA en posición 1 o 3 (ESS). Tras administrar las dietas durante un mes, se indujo una dermatitis de contacto y se sacrificó a los animales. Los detalles del estudio se indican el Material y Métodos (apartado 6.1.20.).

En este caso, al administrar las dietas no se observó variación en el incremento de peso entre los grupos de ratones ( $67.5 \pm 24.1$ ,  $72.02 \pm 23.7$  y  $66.6 \pm 16.1$  %, son los incrementos de peso de los grupos Girasol, SES y ESS respectivamente).

En la Tabla 10.20 se muestran tanto los contenidos de EPA y DHA como el total de PUFAs, en las dietas administradas y en los tejidos procedentes de roedores de los tres grupos.

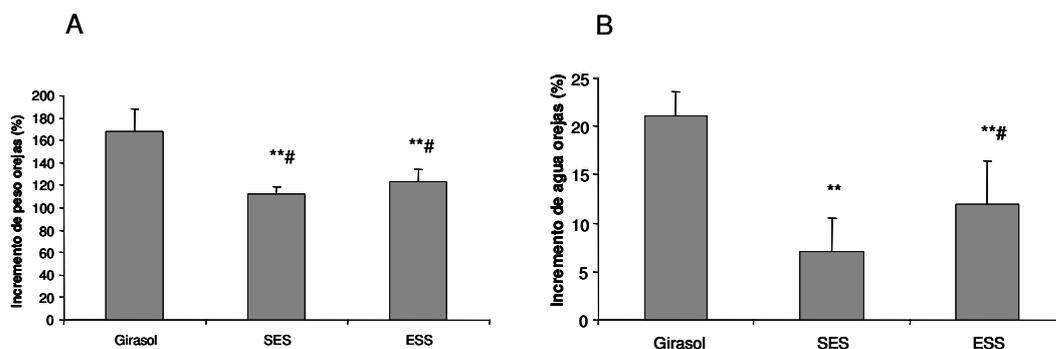
Los datos de nuevo, parecen indicar que se incorpora DHA en los tejidos a pesar de no estar administrándose y que el EPA, en el caso del plasma se incorpora en mayor proporción si se administra en la posición 2 del TG. Sin embargo, en hígado ocurre a la inversa, por lo que no se puede concluir que el administrar el ácido graso en posición 2 lleve a un mayor aumento de la asimilación por parte de los tejidos

**Tabla 10.20.** Contenido de ácidos grasos de dietas y tejidos expresado %.

	EPA	DHA	n3/n6	PUFA
<b>Dieta</b>				
Girasol	0.24	nd	0.01	53.7
SES	3.1	0.03	0.07	50.8
ESS	3.03	0.02	0.07	50.9
<b>Hígado</b>				
Girasol	0.028±0.01	1.67±0.36	0.09±0.03	33.04±4.32
SES	0.57±0.05*	6.89±0.97 *	0.28±0.02 *	39.27±2.64 *
ESS	0.72±0.13 *#	6.48±1.39 *	0.29±0.02 *	36.92±4.58
<b>Plasma</b>				
Girasol	0.12±0.14	0.54±0.17	0.13±0.08	13.52±7.26
SES	0.94±0.3 *	2.49±0.84 *	0.72±0.22 *	23.03±4.028 *
ESS	0.392±0.53 <sup>‡</sup>	3.33±1.15 *	0.83±0.16 *	22.91±3.91*
<b>Cerebro</b>				
Girasol	0.012±0.02	12.54±0.66	1.37±0.04	25.18±0.88
SES	0.062±0.03 *	15.47±0.47 *	1.57±0.03 *	27.03±0.68 *
ESS	0.05±0.0007 *	15.26±0.71 *	1.57±0.06 *	26.64±0.83 *

Los resultados son la media±DE, \* p<0.05 con respecto al grupo Girasol; # p<0.05 con respecto al grupo SES. (n = 10/grupo).

De nuevo, para testar el carácter anti-inflamatorio de las dietas, se evaluó el modelo de dermatitis de contacto. Aunque otra vez las dietas, por ser ricas en PUFAs n-3, presentaban un claro efecto anti-inflamatorio, se observó que era ligeramente más eficaz la dieta que aporta el EPA en posición 2, SES (Figura 10.42).



**Figura 10.42. La dieta con el EPA en posición 2 es más eficaz como anti-inflamatoria.** A) Incremento de peso de la oreja enferma con respecto a la sana; B) Incremento del contenido de agua de la oreja enferma con respecto a la sana. Los resultados son la media $\pm$ DE, \*\* p<0.01 con respecto al grupo Girasol; # p<0.05 con respecto al grupo SES. (n = 10/grupo).

Teniendo en cuenta los diferentes datos obtenidos en los experimentos llevados a cabo en esta sección, se podría sugerir un efecto más importante a nivel anti-inflamatorio para el EPA que para el DHA. Sin embargo, los mecanismos diferentes que involucran a uno y otro para mediar dicho efecto, necesitan de mayor investigación. Otros datos importantes extraídos de estos estudios, son que la administración de EPA permite cubrir las necesidades de DHA del organismo, al menos en ratones, hecho que si se demuestra en humanos supondría un efecto importante especialmente en niños; o bien el importante efecto que tiene la posición que ocupa el ácido graso en el triglicérido, pudiendo variar significativamente los efectos encontrados en función de la posición.

## **Discusión**

---



El estado de salud de un individuo no es fortuito, sino que está determinado por multitud de factores, que abarcan desde la complejidad de la genética, hasta la simplicidad, por ejemplo, de los hábitos higiénicos, dietéticos, o las condiciones-medio-ambientales. Algunos de estos factores son difícilmente modificables, como la condición genética de cada sujeto, aunque la ciencia incluso esté rebasando hoy día estas limitaciones. Sin embargo, muchos de los factores que condicionan la salud, pueden ajustarse de manera sencilla para aportar el máximo de beneficio para cada individuo.

La dieta es posiblemente el factor más fácilmente modulable para la mejora de la salud, y quizás también el principal responsable de gran número de alteraciones de la misma, con la consecuente aparición de diversas patologías. De hecho, los cambios dietéticos ocurridos a lo largo de la historia vienen acompañados de un cambio en las enfermedades propias de cada época. En los países desarrollados ya han quedado atrás enfermedades condicionadas por la malnutrición como la tuberculosis o el escorbuto, mientras que, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y alérgicas así como el SIDA, son las patologías que incrementan el índice de mortalidad y empeoran la calidad de vida de la población del siglo XX y XXI. Todas estas enfermedades tienen un denominador común: el papel determinante que juega el sistema inmunitario, tanto en la aparición de las mismas como en su resolución, sistema que a menudo se ve importantemente afectado por los hábitos alimenticios.

Puesto que el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema inmunitario depende de una nutrición adecuada, la dieta debe ser objeto prioritario para la mejora de la salud y para la prevención de numerosos desórdenes. Además, determinados componentes de la dieta son capaces de alterar la expresión génica en las células del organismo, pudiendo intervenir a su vez en otros factores. Entre los constituyentes de la dieta, la grasa modula de manera importante la respuesta inmunitaria, de modo que sería necesario vigilar las características de la misma para la obtención de la respuesta más óptima (Kelley DS, 2001).

En la actualidad, existe la firme convicción de que no es tan importante la cantidad de grasa como la calidad de la misma. El tipo de lípidos que integran la dieta es objeto de estudio como consecuencia de la enorme repercusión que tiene sobre la salud. Los humanos ancestralmente consumían dietas ricas en ácidos grasos n-3 y bajas en otros ácidos grasos insaturados y saturados, ya que las comidas procedentes de animales silvestres poseen contenidos de n-3 más altos que las que proporcionan los animales de granja que, actualmente, sostienen la mayor parte de la alimentación cárnica humana (Simopoulos AP, 1999). En aquellos tiempos, se calcula que la ingesta de ácidos grasos n-6:n-3 era 1:1, coeficiente muy alejado de los que se dan hoy en los países occidentales, con una alta

ingesta de PUFAs n-6 y de grasa saturadas como consecuencia del elevado consumo de aceites de semillas y de mantequilla (Raper NR, Cronin FJ, 1992). En estos países, las consecuencias son un desequilibrio en la producción de eicosanoides y una mayor exposición a enfermedades como las citadas anteriormente. De hecho, numerosos organismos, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han dado recomendaciones acerca de la ingesta apropiada de ácidos grasos n-6 y n-3, cuyo ratio óptimo ha sido estimado entre 3:1-4:1 (FAO/WHO, 1993).

Sin embargo, el modelo nutricional surgido en la cuenca mediterránea en los años cincuenta, con un consumo de ácidos grasos n-6:n-3 próximo a las recomendaciones actuales debido a la mayor ingesta de pescado, y con la sustitución de la grasa saturada por aceite de oliva, supuso una importante mejora en cuanto a las expectativas de vida y a la incidencia de enfermedades como las inflamatorias o el cáncer. Del mismo modo, el incremento del consumo de antioxidantes, presentes tanto en frutas y verduras como en el aceite de oliva o el vino propios de esta dieta, fue otra de las características propias de la dieta mediterránea, que contribuyó a la mejora observada en la población de estos países.

Este trabajo pretende destacar la importancia que tiene el practicar hábitos alimenticios adecuados, mostrando como de manera sencilla se podría cambiar el patrón de consumo de ácidos grasos para la correcta modulación de la respuesta inmunitaria según las necesidades. Estas investigaciones también tienen por objeto resaltar la importancia de los antioxidantes de la dieta, que completan y/o potencian los efectos moduladores de los diferentes ácidos grasos.

Para realizar los estudios que componen esta Tesis Doctoral se utilizaron modelos animales, normalmente ratas o ratones. La elección del ratón, concretamente de la cepa Balb/c, como modelo animal base sobre el que estudiar los efectos de la grasa sobre el sistema inmunitario, responde a diferentes necesidades entre las que destacan las siguientes: a) la facilidad de manejo de un animal pequeño, que permite trabajar con múltiples sujetos a la vez y con diferentes grupos y experimentos, b) la fácil accesibilidad a la cepa elegida, c) la reducción de los costes, d) el elevado número de estudios existentes a nivel del sistema inmunitario en ratón que permitiría comparar resultados, e) la homogeneidad de la población, tanto somática (peso, sexo, edad) como genética (alta tasa de consanguinidad). El uso de la rata se llevó a cabo cuando el modelo que se inducía, IBD u obesidad, era más fácilmente estudiable en un animal de mayor tamaño. El hecho de utilizar un tamaño de muestra  $n = 10$  animales por grupo, nos permitía obtener datos estadísticamente significativos. En general, los estudios se desarrollaron durante un mes. Puesto que la

media de vida de un ratón se estima entre los 1-2 años, se consideró que un mes era un tiempo más que considerable de la vida de un ratón para que las dietas ejerciesen algún tipo de efecto sobre el sistema inmunitario de los roedores. Conforme se observaban los efectos, los tiempos de administración de dietas se recortaban, de modo que en algunos casos, se comprobó incluso que las dietas eran eficaces también al suministrarlas durante menos tiempo. Los estudios de duración mayor responden a la necesidad de inducir un determinado modelo, que requería de un tiempo de instauración, como es el caso del modelo de obesidad o del de EAE.

Gran parte de los estudios se llevaron a cabo en animales al destete, que apenas habían ingerido alimento alguno salvo, la leche materna. De esta manera, interviniendo con las diferentes dietas desde el inicio de la vida del ratón, se observó mayor eficacia de las dietas. Además, es el periodo de mayor ganancia de peso y por tanto de mayor eficiencia de conversión dieta/masa corporal.

El objetivo principal de estos estudios fue el evaluar la calidad e idoneidad de los diferentes ácidos grasos sobre la respuesta inmunitaria, sin tener en cuenta los efectos de la cantidad de grasa sobre la misma. Diversos estudios han demostrado que una ingesta de grasa elevada lleva a una disminución de la respuesta inmunitaria a través de sus efectos a nivel metabólico (Tanaka S y col, 1993), del mismo modo que una ingesta baja, característica de estados de malnutrición, también conduce a la depresión del sistema inmunitario (Marcos A, 1997). Puesto que la cantidad de grasa afecta de modo significativo la evolución de la respuesta inmunitaria, fue necesario buscar una concentración óptima y que fuese siempre la misma en todos los estudios. De este modo, la cantidad de grasa utilizada fue del 5%, salvo en modelos en los que se pretendía alterar el peso y el metabolismo de los animales. Aunque esta cantidad de grasa es muy inferior a la que consume un humano, los expertos en preparación de dietas para animales recomiendan dicha cantidad para roedores por presentar las máximas ventajas y los mínimos inconvenientes, además de porque este contenido de grasa permite que muchas fuentes dietéticas en este nutriente aporten niveles aceptables de ácidos grasos esenciales. Esta recomendación del 5% de grasa para las dietas animales se ha obtenido tras la correlación con la mayor longevidad y la menor aparición de tumores (Martínez de la Victoria E y col, 2001). Además, esta cantidad de grasa incorporada en la dieta, le confería la suficiente palatabilidad para ser ingerida por los roedores, factor de gran importancia para que se produzca una ingesta adecuada. En la Tabla 11.1 se muestran los contenidos de los principales ácidos grasos presentes en algunas de las dietas empleadas a lo largo de los

estudios, y que ayudará durante la discusión para un mejor entendimiento de los resultados obtenidos.

**Tabla 11.1.** Contenido de ácidos grasos de las dietas empleadas en los diferentes estudios. Los datos vienen expresados en g/100 g de grasa.

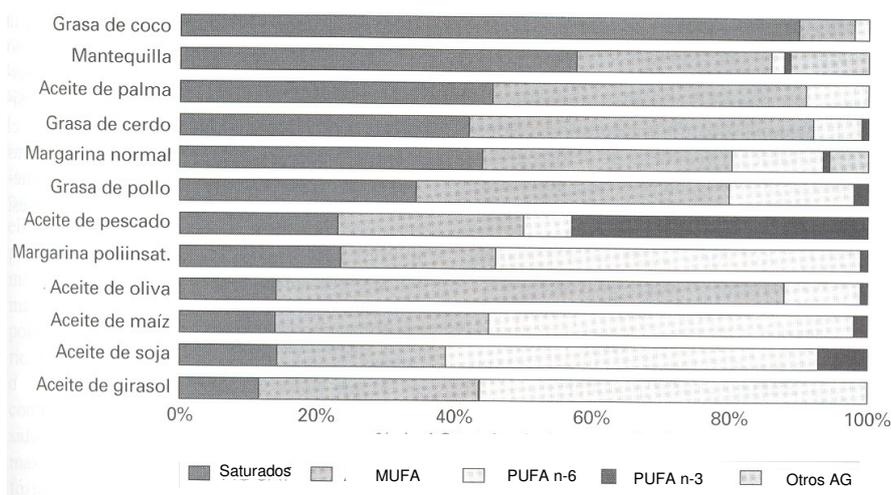
	Girasol	GAO	RBO	AS	OO	W3 (+Girasol)	W3 (+GAO)
Oleico	25.3	75.14	41.92	22	73.2	23.61	71.25
Linoleico	51.4	12.98	35.44	58	7.5	45.7	11.5
Araquidónico	0.82	nd	nd	nd	nd	0.81	0.04
EPA	0.24	nd	nd	nd	nd	1.45	1.48
DHA	0.09	nd	0.05	nd	nd	1.42	1.98
Saturados	19.35	9.69	19.14	14.6	14.9	22.85	10.83
MUFA	26.15	72.26	42.41	23	76.3	25.9	71.97
PUFA	53.45	14.07	36.73	61.7	8	51.2	15.17
n-6/n-3	92.26	90.27	28.62	15.7	14	12.92	4.91
n-6/n-9	2.07	0.18	1.19	2.6	0.1	1.64	0.21

GAO, dieta a base de aceite de girasol alto oleico; RBO, dieta a base de aceite de arroz; AS, dieta a base de aceite de soja; OO, dieta a base de aceite de oliva; W3, dietas elaboradas incluyendo aceite de pescado en una base de aceite de girasol o de girasol alto oleico.

Uno de los ácidos grasos estudiados en este trabajo por su repercusión en la población mediterránea, es el ácido oleico. Las dietas elaboradas con aceites de oliva (OO) y girasol alto oleico (GAO) fueron las principales fuentes de este ácido graso, diferenciándose únicamente por la presencia o no de la fracción insaponificable, propia del aceite de oliva virgen. Este ácido graso está presente en mayor o menor medida, pero siempre en cantidades relativamente importantes, en todas las dietas, factor importante que habrá que tener en cuenta al evaluar el efecto de un ácido graso concreto incluido en una dieta.

Las dietas preparadas a base de aceite de girasol o de soja (AS) eran ricas en ácido linoleico (LA), siendo las dietas anteriores ricas en ácido oleico, GAO y OO, las más pobres en LA. Es el aceite de girasol el que aportó a las dietas un mayor contenido de ácidos grasos saturados, aunque a nivel de estos ácidos grasos, las diferencias no fueron tan marcadas como en otros casos. Cabe destacar, que los aceites de pescado, son bastante ricos en ácidos grasos saturados, especialmente en palmítico, y su contenido en ácidos grasos n-6 es mínimo. También poseen elevados niveles de colesterol. Por estos motivos, el aceite de pescado no es equilibrado para que sirva como única fuente de grasa, por lo que se decidió incorporar una concentración pequeña del mismo (15% del total de la grasa generalmente), con el fin de que no se alterase la ingesta recomendada de otros ácidos grasos al tiempo que sí era factible el incremento significativo en las dietas de ácidos grasos n-3. Es importante

resaltar que a pesar de la escasa cantidad de EPA y DHA que aportan las dietas que contienen aceite de pescado, ausentes prácticamente en el resto de las dietas, los efectos observados fueron más relevantes que cualquiera de los apreciados al administrar otro tipo de grasa, hecho que indica el importante poder biológico de estos compuestos. Otro ácido n-3 de importancia es el  $\alpha$ -linolénico (ALA), cuya presencia era escasa en las dietas, salvo en el caso de la elaborada a partir de aceite de soja. En la Figura 11.1 se muestran los contenidos de los diversos tipos e ácidos grasos presentes en la grasa.



**Figura 11.1.** Perfil de ácidos grasos de distintas grasas dietéticas. (Tomado de Mataix J y Carazo E. Nutrición para Educadores. Díaz de Santos, 1995).

Las dietas elaboradas con aceite de arroz (RBO) se caracterizan por estar en una posición intermedia en cuanto a los diferentes contenidos de ácidos grasos, rica en LA al tiempo que en oleico y con una cantidad relativamente importante de ácidos grasos saturados. Gran parte del contenido de ácidos grasos saturados en la dieta RBO es consecuencia de la elevada cantidad de palmítico que posee, y al cual se le podría atribuir en cierto modo algunos de sus efectos inmunoestimulantes.

Otro factor importante a tener en cuenta es la presencia o no en las dietas de antioxidantes, propios del aceite que las constituye. Es el caso de las dietas que se fabricaron a base de aceite de salvado de arroz crudo, con elevado contenido de  $\gamma$ -orizanól, o base de aceite de oliva virgen, con destacadas cantidades de hidroxitirosol (HT). Debido a la importancia cuantitativa de estos compuestos en sus aceites correspondientes y a las diversas propiedades biológicas que ya se les ha atribuido, los efectos inmunitarios tanto del  $\gamma$ -orizanól como del hidroxitirosol, fueron evaluados de manera independiente.

Conocidas las características de las dietas empleadas, diferentes en cuanto a su composición de ácidos grasos y en cuanto a sus fracciones insaponificables, se analizaron sus efectos sobre la respuesta inmunitaria en animales sanos, para posteriormente corroborar su efecto sobre determinadas patologías donde estuviera implicado el sistema inmunitario.

El primero de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto que ejercía sobre la respuesta inmunitaria una dieta donde los PUFA n-6, característicos de las dietas occidentales, fuesen sustituidos por MUFA n-9, en especial por ácido oleico, tal y como sucede en las poblaciones mediterráneas.

La inclusión del aceite de oliva en la dieta mediterránea ha permitido la realización de estudios de cohorte, por medio de los cuales se ha descubierto que el incremento del consumo de aceite de oliva está relacionado con una reducción en enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide e incluso cáncer, todas patologías con importante implicación del sistema inmunitario. Ello parece ser debido a que este aceite modula la función inmunitaria, particularmente la relacionada con los procesos inflamatorios. Mientras que los ácidos grasos n-6 parecen estimular el sistema inmunitario y los ácidos grasos n-3 suprimirlo (Yaqoob P y Calder PC, 1993), los MUFA n-9, para los cuales se había descrito en un principio una acción neutral sobre el sistema inmunitario, hoy parecen ejercer una acción inmunitaria cercana a la propia de los PUFA n-3 (Yaqoob P, 1998).

Partiendo del concepto aceptado de la capacidad inmunosupresora y anti-inflamatoria del aceite de oliva, nos planteamos cual de sus componentes sería el responsable de tales efectos, una incógnita ampliamente planteada por la comunidad científica y que normalmente ha llevado a controversia, no alcanzándose una conclusión definitiva. Uno de los principales problemas que envuelve este dilema, es la falta de homogeneidad en los estudios que se han llevado a cabo, lo cual hace difícil la comparación entre los resultados obtenidos.

Al estudiar la acción aislada del ácido oleico comparando la dieta Girasol frente a la dieta GAO, no se encontraron efectos muy marcados sobre el sistema inmunitario, si bien la ligera reducción de la proliferación linfocitaria observada, coincide con la mayoría de los estudios realizados, donde el efecto sí que era significativo e incluso de igual magnitud que el de dietas ricas en aceite de pescado comparadas al mismo tiempo (Yaqoob P y col, 1994). En muchos de estos estudios se analizaba paralelamente el efecto del aceite de oliva, el cual coincidía con el del GAO, ambos capaces de inhibir la proliferación de linfocitos, lo cual sugería que el ácido oleico era el responsable de esta acción (Jeffery NM y col, 1996).

Esto nos hizo pensar que tal vez, la menor cantidad de grasa incluida en nuestros estudios, y como consecuencia, el menor consumo de ácido oleico, era lo que determinaba la ausencia de efecto. Sin embargo, estudios realizados por Jeffery y col trataron de determinar el efecto al incrementar gradualmente las cantidades de ácido oleico en la dieta, demostrando que éste era proporcional a la concentración hasta un límite al partir del cual no se incrementaba más el efecto, y que ya existía un ligero efecto inhibitor de la proliferación de linfocitos con la cantidad de oleico administrada con nuestras dietas, a pesar de existir mayor cantidad de grasa (Jeffery NM y col, 1996).

Otro factor importante a tener en cuenta es que el hecho de incrementar la ingesta de ácido oleico por medio de la dieta, suponía una alteración en el consumo de otros ácidos grasos, de manera que algunos autores, han sugerido que no es el ácido oleico en sí el responsable del efecto inmunosupresor observado, si no la disminución en la ingesta de otros, especialmente los de PUFA n-6. Según lo que habíamos comentado anteriormente sobre el poder de estimulación de los PUFA n-6 sobre el sistema inmunitario, sería lógico observar una inmunosupresión al administrar dietas a base de GAO, sin embargo, en nuestro estudio, donde el consumo de ácido linoleico se redujo cuatro veces, no se apreció un efecto muy llamativo sobre la respuesta inmunitaria. Otros autores, también han sugerido que al disminuir el suministro de LA, se podría favorecer la conversión del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), compuesto también de carácter inmunosupresor por pertenecer a la familia n-3 (Wahle KWJ y col, 2004). Puesto que no se había observado un efecto importante para la dieta GAO, no parece probable que esta conversión hubiese tenido lugar. Aunque no se determinó en este estudio la incorporación de los ácidos grasos en los tejidos, al administrar dietas a base de aceite de oliva con un perfil de ácidos grasos semejante al de la dieta GAO, no se observó un aumento en la acumulación de ALA o de sus derivados.

El resto de parámetros inmunitarios analizados en nuestro estudio, no fueron generalmente objeto de análisis en otros estudios animales, por lo que no se pudieron realizar comparaciones concluyentes, aunque muchos de esos trabajos sí que coincidían con atribuir un papel inmunosupresor al ácido oleico, por ejemplo disminuyendo la actividad de células NK (Jeffery y col, 1996) o la expresión de moléculas de adhesión (Sanderson P y col, 1994).

Según nuestros datos, el ácido oleico no parecía ser el principal responsable de la modulación inmunitaria ejercida por el aceite de oliva, si bien contribuía a la evolución de la misma. Para completar estos estudios se estudiaron los efectos de la fracción insaponificable sobre la respuesta inmunitaria, especialmente del hidroxitirosol (HT), su compuesto mayoritario. Nuestros datos revelan un efecto anti-inflamatorio asociado al

consumo de HT por ratones, que se manifestó con la menor producción de citocinas inflamatorias, y en un incremento de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Probablemente, el incremento de la proliferación de linfocitos y de la producción de IL-2 así como el mayor tamaño y número de células del bazo, sea el responsable directo del incremento de linfocitos reguladores, y productores de IL-10.

Estos datos coinciden con la bibliografía, ya que diferentes investigaciones han asociado las propiedades antioxidantes propias de compuestos fenólicos a propiedades antiinflamatorias (Bitler CM y col, 2005). Así, en estudios *in vivo* se ha observado que la administración de este tipo de compuestos mejora los procesos inflamatorios producidos al inducir artritis o edema. La disminución de síntomas característicos o de parámetros inflamatorios como la MPO en estos procesos (de la Puerta R, 2000; Martínez-Domínguez E y col, 2001), se correlacionan con los espectaculares resultados obtenidos en nuestro modelo de EAE al suministrar HT a los ratones. *In vitro*, el número de estudios es más elevado, observándose como el HT induce apoptosis de células inmunitarias (della Ragione F y col, 2000), modula la activación linfocitaria (Palmerini C y col, 2005) o disminuye la formación de LTB<sub>4</sub>, TXB<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> por medio de la supresión de 5-LOX o COX-2 (Carluccio MA y col, 2003; Petroni A y col, 1997). Otros genes cuya expresión es inhibida por HT son MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, o iNOS, normalmente actuando sobre factores de transcripción como AP-1 o NFκB, y llevando así a un efecto inmunosupresor, en el que se basan los efectos anti-aterogénicos atribuidos a este compuesto (Turner R y col, 2005). Con todos estos datos, no resulta extraño que en ratones sanos hayamos observado un efecto inmunosupresor para el HT, pudiendo ser este compuesto, junto con otros que forman parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva, de semejantes características, los principales responsables del efecto anti-inflamatorio del aceite de oliva.

A juzgar por los resultados obtenidos en nuestros estudios, los efectos del HT son más potentes a nivel inmunitario que los del ácido oleico, ejerciendo ambos un efecto inmunosupresor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las concentraciones de HT administradas fueron muy superiores a las que se suministran cuando se dan a los animales dietas elaboradas a base de aceite de oliva, por lo que los efectos no son comparables. De este modo, probablemente el efecto neto del aceite de oliva sea consecuencia de la suma del efecto de su fracción saponificable e insaponificable.

Puesto que habíamos partido de la idea de que el aceite de oliva ejercía un efecto anti-inflamatorio, se decidió analizar su participación en un proceso de inflamación más severo, como es el modelo de inflamación intestinal (IBD), empleando para su evaluación

dietas y tiempos semejantes a los empleados en los estudios anteriores, lo cual nos permitiría correlacionar más fácilmente los resultados.

Aunque no hay mucha información sobre el posible papel beneficioso del aceite de oliva en pacientes con IBD, experimentos en modelos animales o celulares ponen de manifiesto que el aceite de oliva virgen podría actuar a distintos niveles: a) reduciendo la producción de citocinas inflamatorias y expresión de moléculas de adhesión y otros marcadores endoteliales, b) el consumo habitual del aceite de oliva podría restablecer el patrón normal de péptidos gastrointestinales que se alteran durante la enfermedad, c) tanto el ácido oleico como los compuestos fenólicos del aceite de oliva son candidatos potenciales para incrementar el umbral de apoptosis de células intestinales, disminuyendo por tanto la necrosis y protegiendo así de la enfermedad, todo ello llevado a cabo mediante la reducción en la producción de radicales libres y normalizando la expresión de la COX, d) el aceite de oliva podría modificar el entorno lipídico disminuyendo la producción de eicosanoides inflamatorios y al aportar ácidos grasos menos insaturados, confiriendo resistencia a los procesos de peroxidación lipídica (Martínez de la Victoria E y col, 1999)

De hecho, con la administración de aceite de oliva se observó una ligera mejora del proceso inflamatorio intestinal, la cual se reflejó en la mejora general de los diferentes parámetros alterados al inducir la IBD, aunque no se trató de efectos muy relevantes, hecho que se corresponde con los datos inmunitarios obtenidos para el ácido oleico en nuestros estudios, que no eran tampoco muy llamativos. El efecto debió ser producido como consecuencia de la disminución en tejidos de LA y al incremento de oleico, perfil que cambió con la administración de la dieta. El elevado contenido de ALA en la dieta AS (Dieta a base de aceite de soja), siete veces superior a la de su control, no supuso efecto, ya que ni se incorporó ni se transformó en sus derivados más activos. A las concentraciones de ALA presentes en la dieta, EPA y DHA han demostrado poseer efectos anti-inflamatorios muy marcados, de modo que resulta interesante resaltar la falta de efecto de este n-3 en comparación con otros más insaturados, puesto que este es el principal ácido graso de la serie n-3 aportado por la dieta occidental (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1997). Parece ser que el ALA, a elevadas concentraciones, comparte algunos efectos inmunitarios con los PUFA n-3 del aceite de pescado, pero no todos, sin quedar claro si los efectos observados son propios del ALA o de los ácidos grasos en los que se convierte (Bazinet RP y col, 2004). Entre ellos destaca la inhibición de la proliferación linfocitaria, la producción de citocinas proinflamatorias o el retraso de fenómenos de hipersensibilidad retardada (Calder PC y col, 2002). Puesto que el aceite es virgen, los antioxidantes presentes en el mismo estarían probablemente contribuyendo al efecto realizado, hecho que

se refleja especialmente en la restauración de los niveles de GSH, a pesar de las bajas concentraciones de antioxidantes presentes en la dieta OO (Oliva). De hecho, ya se había observado un incremento de este antioxidante natural tras la administración de aceite de oliva (Visoli F y col, 1998), confirmando la capacidad de los lípidos de la dieta para mejorar las defensas antioxidantes del organismo (Burke A y col, 1997), y en especial de los MUFA, que por contener un único doble enlace no padecen peroxidación lipídica.

La administración de HT a concentraciones superiores para tratar la IBD sería un punto interesante a tener en cuenta vistos los resultados obtenidos al suministrarse durante la EAE en animales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que si se extrapolase a humanos la dosis de HT que se administró a los ratones, dichas cantidades serían demasiado elevadas para obtenerlas a partir de la dieta, hablándose en tal caso de dosis farmacológicas.

Resultados muy semejantes a los nuestros se obtuvieron en un estudio realizado por Nieto y col (Nieto N y col, 2002), donde con una dieta rica en aceite de oliva se observó una mejora del proceso de IBD, inferior a la ejercida por una dieta rica en ácidos grasos n-3 pero superior a la de una dieta rica en ácido grasos n-6. Esta eficacia de los ácidos grasos n-3 también es demostrada en nuestros estudios, datos que se discutirán más adelante.

En humanos, la obtención de resultados acerca del efecto anti-inflamatorio del aceite de oliva son más difíciles de encontrar, debido a que en los estudios animales se utilizan cantidades de MUFA demasiado elevadas, que no pueden ser consumidas por humanos. Entre los datos más interesantes encontrados destaca la disminución de la expresión de moléculas de adhesión o la tendencia a disminuir la actividad de células NK o la proliferación linfocitaria (Yaqoob P, 1998).

Aunque el consumo de aceite de oliva resulte beneficioso, obviamente una dieta donde la única fuente de grasa fuese este aceite sería inviable, puesto que se estaría comprometiendo el aporte correcto de otros muchos ácidos grasos necesarios para el mantenimiento de un adecuado estado de salud; por lo que tratamos de buscar una dieta que aportase beneficios pero que fuese más equilibrada y más cercana a las condiciones actuales. Por ello, el siguiente paso fue plantearnos qué efectos induciría una dieta donde al tiempo que se suministraban cantidades de ácidos grasos saturados y n-6 elevadas, propias de las dietas occidentales, se suministrase también una cantidad moderada del ácido oleico y de antioxidantes, propios de la tierra mediterránea. Con este objetivo se elaboraron dietas a base de aceite de salvado de arroz (RBO), que además posee una fracción insaponificable rica en antioxidantes, en este caso de  $\gamma$ -orizanol. De este modo podríamos también determinar los efectos de los ácidos grasos n-6, en especial del LA, procedentes de una fuente distinta a la de los aceites de semillas, que es el que normalmente se consume Se

trataba de una fuente de grasa muy novedosa, consumida en la actualidad en países orientales, donde se habían apreciado importantes efectos sobre el metabolismo lipídico y enfermedad cardiovascular (ECV). Sería interesante buscar una aplicación para el excedente de las producciones de arroz o de los productos de deshecho de la manipulación del arroz, de donde se obtiene este aceite

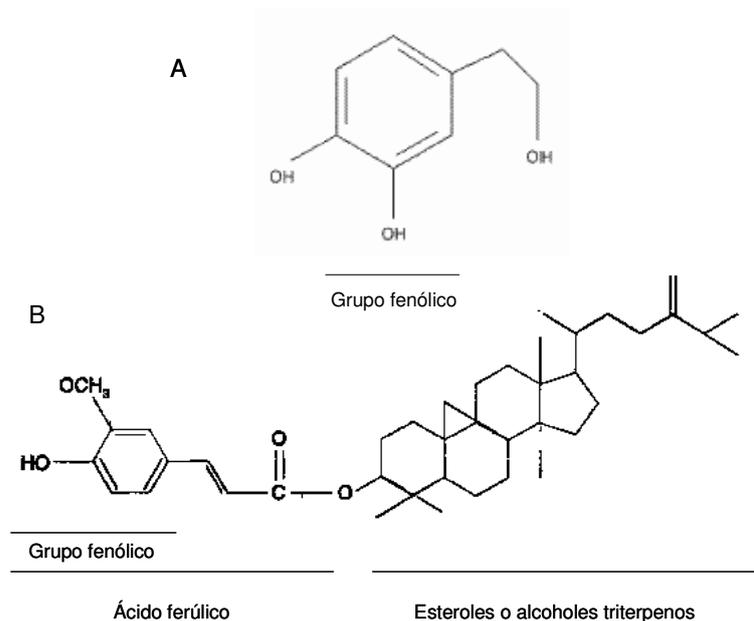
La dieta RBO fue capaz de modificar la respuesta inmunitaria en los ratones que la consumieron, aunque en este caso ejerciendo un efecto inmunoestimulante (Sierra S y col, 2005). Nada existe en la bibliografía acerca de los efectos del RBO sobre el sistema inmunitario, de modo que estos resultados son innovadores. Puesto que al desproveer al aceite de salvado de arroz de su fracción antioxidante el efecto neto seguía siendo inmunoestimulante, su fracción saponificable debía ser la principal responsable de estos efectos. Probablemente el alto contenido de la dieta tanto LA como en ácido palmítico, sean los responsables de esta activación sobre el sistema inmunitario. Ni siquiera, el elevado contenido de ácido oleico, que tendería a suprimir levemente la respuesta inmunitaria, fue capaz de frenar el efectos de estos ácidos grasos.

Al analizar los efectos inmunitarios del  $\gamma$ -orizanol de manera independiente, no se observó una tendencia clara en el comportamiento inmunitario inducido por este compuesto, aunque parece que tienda más a ejercer un efecto pro-inflamatorio, ya que aumenta ciertas citocinas inflamatorias, de modo que de alguna manera esté propiciando el efecto del aceite de salvado de arroz. En este caso las dosis administradas correspondían con la concentraciones de  $\gamma$ -orizanol incluidas en la dieta RBO, por lo que no es necesario la administración de dosis farmacológicas para la obtención de un efecto como en el caso del hidroxitirosol. Por otra parte, el  $\gamma$ -orizanol podría resultar también muy útil sobre todo en ECV debido al papel antioxidante que se le ha atribuido así como la capacidad de disminuir colesterol total y triglicéridos en sangre, y aumentar los niveles de HDL-colesterol (Accinni R y col, 2006; Berger A y col, 2005; Sugano M y Tsuji E, 1997). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar este efecto.

Previamente habíamos observado que la dieta Girasol era ligeramente más inmunoestimulante que la GAO; en este caso la dieta RBO posee un efecto inmunosestimulante muy marcado en comparación con la misma dieta GAO; de estos resultados se deduce que el poder inflamatorio y activador del sistema inmunitario de la dieta RBO fue superior al ejercido por la dieta Girasol, a pesar de tener esta última un mayor contenido de ácidos grasos n-6. El efecto inmunoestimulante tanto del ácido palmítico como del  $\gamma$ -orizanol presentes en el RBO, probablemente sean responsables de este mayor efecto. Además, hay que añadir que al contener la dieta abundantes

antioxidantes, se estaría evitando la posible pérdida de LA consecuencia de la oxidación, de modo que este hecho podría contribuir a que el RBO sea más potente que el aceite de girasol, carente de fracción insaponificable, puesto que se utilizó refinado.

Ante los resultados obtenidos, surgió la cuestión de por qué motivo, dos compuestos antioxidantes, constituyentes de fracciones insaponificables de grasas vegetales, presentaban acciones opuestas, el HT actuando como anti-inflamatorio y el  $\gamma$ -orizanol como estimulante del sistema inmunitario. La estructura de ambos compuestos se detalla en la Figura 11.2.



**Figura 11.2.** A) Estructura química del hidroxitirosol. B) Estructura química del  $\gamma$ -orizanol.

Ambas moléculas tienen en común un grupo fenólico; en el caso del HT constituye la base de la molécula, mientras que en el  $\gamma$ -orizanol, el ácido ferúlico con el que esterifican alcoholes triterpénicos o esteroides vegetales, posee también estructura fenólica. De hecho, este ácido ferúlico es un metabolito del ácido cafeico, otro antioxidante propio del aceite de oliva y de estructura semejante al HT. Este grupo fenólico, proporciona a ambos compuestos actividad antioxidante, ya que por medio de los hidroxilos presentes en la molécula, se secuestran agentes oxidantes como el  $\text{Fe}^{3+}$ . Según esta estructura, la diferencia entre  $\gamma$ -orizanol y HT radica a nivel de los alcoholes y esteroides presentes en el  $\gamma$ -orizanol. Puesto que a los esteroides vegetales se les ha atribuido propiedades anti-inflamatorias (Bouic PJ, 2001), tal vez sean los alcoholes triterpénicos los responsables de la activación

inmunitaria. Sin embargo, un estudio japonés donde se evaluó la eficacia como anti-inflamatorios de diversos esteroides y alcoholes triterpénicos extraídos del salvado de arroz, mostró como todos ellos presentaban actividad anti-inflamatoria (Akihisa T y col, 2000), por lo que debería realizarse un estudio más amplio del efecto del  $\gamma$ -orizanol sobre la respuesta inmunitaria, analizando más parámetros y probándolo en modelos de enfermedad, para determinar exactamente su efecto, que no queda del todo claro.

La siguiente alternativa que se contempla dentro de las posibilidades de manipulación de la grasa dietética con el fin de mejorar la función inmunitaria, fue la incorporación en las dietas de ácidos grasos n-3, en especial de EPA y DHA utilizando aceite de pescado como fuente, con la consecuente disminución del ratio n-6/n-3. El ratio n-6/n-3 de las dietas W3 empleadas en nuestros estudios (12.9 n-6/n-3 para la dieta W3), es más cercano a los hábitos de hace unas décadas, donde el consumo de ácidos grasos n-3 era mínimo, que aunque algo alejado de los hábitos más actuales, no deja de representar la deficiencia existente de estos ácidos grasos en la población. Estas dietas presentaban un perfil de ácidos grasos más equilibrado, que se correspondía con las recomendaciones actuales. Hoy día las recomendaciones acerca de las ingestas de EPA y DHA son más elevadas en determinados casos, como en ECV o en embarazo; además, con la creciente disponibilidad de alimentos funcionales y otros productos que aportan EPA y DHA así como por las campañas para fomentación de su consumo, la ingesta cada vez tenderá a ser mayor.

El carácter anti-inflamatorio de los ácidos grasos n-3 no es un dato novedoso, ya que múltiples estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, y tanto en animales como en humanos, coinciden en afirmar su capacidad de modular la respuesta inmunitaria en este sentido. Los efectos anti-inflamatorios hallados en animales sanos se confirman con la mejora experimentada por las ratas a las que se indujo IBD, dermatitis de contacto o alérgica o EAE y que consumieron la dieta rica en aceite de pescado. En relación al modelo de IBD, su mayor eficacia con respecto a la dieta a base de aceite de oliva demuestra el mayor carácter anti-inflamatorio del EPA y DHA, ácidos grasos n-3, que del ácido oleico, n-9. La disminución de TNF $\alpha$ , LTB $_4$  y MPO en colon son probablemente los parámetros responsables de que el grupo que ingirió la dieta FOO (dieta a base de aceite de oliva con aceite de pescado incorporado) tuviese un DAI (Índice de Severidad de Enfermedad) significativamente inferior al del grupo OO. Ni siquiera, el hecho de que el aceite de oliva poseyera una rica y biológicamente activa fracción de antioxidantes pudo asemejarse al efecto de los PUFA n-3. En este caso, el contenido de aceite de pescado incorporado en la dieta fue inferior al del resto de estudios, pero suficiente para cambiar el ratio n-6/n-3 y

acercarlo a las recomendaciones actuales, evitando así, al tratarse de pequeñas cantidades, el tener que añadir antioxidantes. El hecho de que la concentración de aceite de pescado incorporada en la dieta sea menor y que aparezca un efecto importante, es un indicio más del potente efecto modulador de los PUFA n-3. De hecho, estos resultados en el modelo de IBD concuerdan con los estudios llevados a cabo en animales sanos, donde en todos los casos, el efecto inmunosupresor de la dieta W3 fue superior al de la dieta GAO, salvo en referencia a la producción de IgG, inmunoglobulina significativamente disminuida por el consumo de ácido oleico y cuya producción no fue alterada al consumir ácidos grasos n-3. Este hecho es de nuevo una ventaja para el aceite de pescado, que no perjudicó las defensas naturales del organismo.

Sobre la utilidad de los ácidos grasos n-3 para la mejora del curso de enfermedades inflamatorias intestinales existen numerosos estudios llevados a cabo en animales que aseguran el papel importante de estos nutrientes; sin embargo, y a pesar de la mucha investigación llevada a cabo en humanos, la información no es concluyente (McLean CH y col, 2005).

Con respecto al efecto inmunomodulador de los ácidos grasos n-3 observados en animales sanos, quizás el dato más innovador es la modulación que ejercen sobre la producción de la citocina reguladora IL-10 a distintos niveles, que aunque se había apreciado en otros estudios, no fue considerado como un posible mecanismo de acción (Song C y col, 2003). Sin embargo, la bibliografía no coincide a menudo con este dato, que incluye a la IL-10 entre las citocinas inhibidas por estos ácidos grasos (Verlengia R y col, 2004). Además, es importante destacar que parece un efecto llevado a cabo por el EPA y no por el DHA del aceite de pescado, a juzgar por los datos obtenidos al comparar las dietas ricas en uno u otro ácido graso. Esta diferencia de efecto entre EPA y DHA ya había sido observada previamente, aunque los autores no atribuyen a esta citocina el efecto anti-inflamatorio observado (Ly LH y col, 2004). De hecho, otro de los aspectos destacados que incluye este trabajo, es la comparación en cuanto a efectos sobre la respuesta inmunitaria del EPA y del DHA, con el fin de determinar si uno u otro, o el conjunto de ambos, son los responsables del efecto anti-inflamatorio del aceite de pescado. Sobre este tema, del que no existe demasiada información, los diversos grupos investigadores no han llegado a conclusiones determinantes, necesarias para optimizar el consumo de estos PUFAs para obtención del máximo beneficio.

Al evaluar el efecto de las dietas enriquecidas en DHA o en EPA en el modelo de dermatitis de contacto, se apreció que ambas poseían la capacidad de frenar el proceso

inflamatorio. Estudios semejantes, solo observaron este efecto al administrar DHA y no EPA (Tomote YE y col, 2000), mientras que otros, induciendo procesos inflamatorios más severos como artritis reumatoide, muestran efecto solo para el EPA (Volker DH y col, 2000). En nuestros estudios, parece que la actuación la llevan a cabo mediante mecanismos diferentes. No es de extrañar, puesto que solamente el EPA parece poder actuar modulando la síntesis de eicosanoides, a pesar de que ciertos autores reconozcan la capacidad del DHA para intervenir en la cascada del ARA (Corey EJ y col, 1983).

Con respecto a los efectos de EPA y DHA, uno de los más estudiados es el llevado a cabo sobre la proliferación linfocitaria. Aunque en nuestros estudios no fue analizada, el menor tamaño del bazo inducido por la dieta EPA, podría sugerir que éste, y no el DHA, presentaría efectos inhibidores sobre la proliferación. En este sentido existen varios estudios de acuerdo con esta teoría, que confirman otros efectos anti-inflamatorios para el EPA, como disminución de la actividad de células NK o de la respuesta celular. Sin embargo, la controversia es importante y hay toda una variedad de trabajos que se contradicen (Kew S y col, 2004). Parece que los efectos cardiovasculares son más patentes al administrar DHA, probablemente por su capacidad de modular la expresión génica de moléculas de adhesión, implicadas en fenómenos de aterogénesis (DeCaterina R y col, 1994; McLennan y col, 1996).

Con el conjunto de datos que arrojan nuestros estudios no se puede llegar a conclusiones definitivas, pero a juzgar por los resultados generales, parece que EPA sea más anti-inflamatorio que el DHA, sobre todo por la capacidad de éste de disminuir la producción de IL-12 y TNF $\alpha$  por macrófagos, y por la ya comentada capacidad de aumentar la IL-10 (Lopes R y col, 1999). Además, al administrar dietas más puras y con cantidades más elevadas de EPA o DHA, el efecto anti-inflamatorio en el modelo de dermatitis de contacto fue más importante en los ratones que consumieron la dieta rica en triglicéridos estructurados con EPA en posición 2. Se confirmó también, que al situar al ácido graso en posición 2 del TG, los efectos se acentúan. Este hecho debe ser debido a dos motivos: por un lado, durante la digestión, la lipasa pancreática es específica para posiciones 1 y 3, de manera que el ácido graso en posición 2 se mantiene al entrar al torrente sanguíneo en los nuevos TG resintetizados; por otro lado, la fosfolipasa A2 corta en la posición 2, de modo que para la síntesis de eicosanoides se utilizan los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana de esas posiciones; si desde el principio administramos el ácido graso requerido en posición dos, aseguramos su mayor incorporación en las células y su posterior utilización. Estos estudios recalcan la importancia de la posición que ocupa el ácido graso en el TG, aunque experimentos de Kew y col (2003), señalan que sólo existe

dependencia de la posición para el EPA, no para el DHA en cuanto a efecto. Este resultado es lógico, puesto que la actuación del DHA no está tan relacionada con la síntesis de eicosanoides, si no más bien con la modulación de la expresión génica.

Las diferentes dosis de ácidos grasos empleados, los tiempos de tratamientos, las diferencias entre humanos y animales son las principales causas que impiden llegar a un consenso sobre los efectos del EPA y DHA.

Como se ha comentado, uno de los principales mecanismos de actuación del que participan los ácidos grasos n-3, es la modulación de la expresión génica. Se decidió estudiar receptores susceptibles de activación por ácidos grasos o sus derivados, observándose que la administración de las dietas ricas en aceite de pescado alteraban su expresión. Tanto PPAR $\alpha$  como PPAR $\gamma$  se sabe que están involucrados en funciones inmunes, llevando a efectos anti-inflamatorios, aunque es éste último el de mayor repercusión; de igual modo ocurre con LXR. Varios trabajos han demostrado que uno de los mecanismos por los que actúa EPA y DHA es a través de la estimulación de PPAR $\gamma$  (Li H y col, 2005). La estimulación de estas vías se confirma en nuestro trabajo, donde la expresión del gen se aumenta en células inmunitarias, favoreciendo así el efecto. El incremento de expresión de LXR en macrófagos, también activa vías que llevarían a anti-inflamación, puesto que la activación de estos receptores antagoniza la vía NF $\kappa$ B (Joseph SB y col, 2003). El análisis de receptores de cannabinoides es más complejo y los efectos de los ácidos grasos n-3 sobre los mismos, bastante desconocidos. Se sabe que su activación lleva a efectos inhibitorios sobre el sistema inmunitario (Croxford JL y Yamamura T, 2005). La inhibición de CB1 y CB2 en bazo puede responder a varias explicaciones: a) Los principales ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides (CB), el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y la anandamida, se sintetizan a partir del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, de tal modo que se ha comprobado que con la ingesta de aceite de pescado, disminuyen los niveles de estos ligandos en cerebro (Watanabe S y col, 2003). Extrapolando estos datos a las células del sistema inmunitario, el consumo de ácidos grasos n-3 podría dificultar el estado anti-inflamatorio propiciado por estos mediadores, que estarían disminuidos. Esta puede ser una de las causas por las se inhiba la expresión de receptores CB2 en los linfocitos de ratones del grupo W3, para impedir este efecto negativo; b) La dieta W3 esté induciendo tanto la estimulación de los receptores de cannabinoides, que se produzca un efecto regulador negativo compensatorio y se inhiba la expresión. Estas podrían ser posibles explicaciones sin embargo los datos son demasiado preliminares para aportar conclusiones. Todavía se necesitan gran cantidad de estudios para poder determinar el papel exacto de los PUFA n-3 en la regulación de la

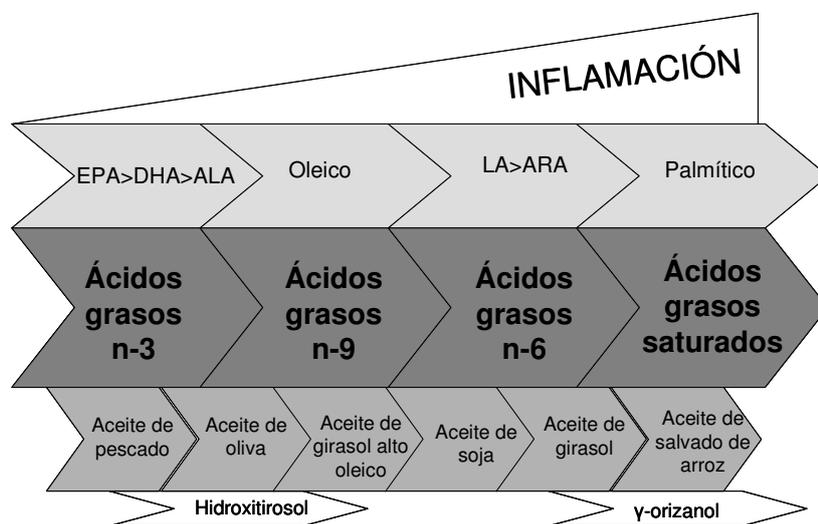
expresión génica. También sería interesante vislumbrar como actúan EPA y DHA a este nivel.

Puesto que la enfermedad cardiovascular (ECV) y los fenómenos de obesidad y sobrepeso tienen un importante componente inflamatorio y están implicadas en su evolución muchas células inmunitarias, consideramos importante evaluar los efectos de los PUFA n-3 a este nivel. Con respecto a salud cardiovascular existen multitud de estudios y como se comentó en la Introducción, diversas organizaciones recomiendan una ingesta elevada de estos ácidos grasos para la prevención de ECV y para la mejora de enfermos que ya las padecen. Nuestros datos confirman los efectos beneficiosos de los ácidos grasos n-3 sobre el metabolismo lipídico, disminuyendo TG y colesterol en sangre, a pesar que el efecto hipocolesterolemiante no esté ampliamente aceptado (Wilt TJ y col, 1989). De hecho, en el análisis de la expresión génica por *microarrays* se detectó un efecto significativo de la dieta W3 que, inhibió la expresión de genes implicados en la absorción y síntesis de colesterol, al tiempo que aumentó la expresión de los involucrados en la retirada del mismo del organismo. Es el caso del LXR, cuya expresión se inhibía ligeramente en ratones sanos al no existir un exceso de colesterol y probablemente para evitar lipogénesis.

Sobre la implicación de los PUFA n-3 en obesidad, no existen datos tan claros. Está descrito que EPA y DHA protegen frente a resistencia a insulina y a obesidad, en general debido a la regulación de diferentes hormonas implicadas en ambos procesos como la adiponectina, leptina, incretinas o grelina entre otras (Flasch P y col, 2006). Nuestra dieta W3 no fue capaz de modular los receptores nucleares, también implicados, a pesar de que existen evidencias de una modulación de estos receptores en tejido adiposo con efectos anti-obesidad (Chambrier C y col, 2002). Sin embargo, estos estudios son aún muy preliminares, no pudiendo obtenerse conclusiones certeras.

Para resumir los efectos de la grasa sobre la respuesta inflamatoria, el estudio llevado a cabo con el modelo de EAE sirve como refuerzo de los diferentes efectos atribuidos a los componentes analizados durante esta Tesis Doctoral. El aceite de salvado de arroz llevó a un empeoramiento de la enfermedad, consecuencia de su efecto inmunoestimulante por su alto contenido de ácidos grasos n-6 y saturados así como de la presencia del  $\gamma$ -orizanól; la administración del aceite de pescado llevó a una ligera mejora del proceso, consecuencia del poder inmunosupresor de los PUFA n-3 que contiene. De hecho, existen estudios que confirman la eficacia del consumo de PUFA n-3 en pacientes de esclerosis múltiple (Meeteren ME y col, 2005); por último, el hidroxitirosol resultó ser el compuesto más eficaz para el tratamiento de la enfermedad debido a sus efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, sugiriéndose la posibilidad de su aplicación

farmacológica a concentraciones más elevadas que las dietéticas. Se trata de un resultado bastante innovador, que abre las puertas hacia la posibilidad de tratamientos más eficaces que los actuales. El modelo de IBD también permitió establecer comparaciones similares entre los diversos compuestos analizados. La mejora del proceso inflamatorio gracias al aceite de oliva, por su composición en ácido oleico n-9 y HT, sobre el aceite de soja, rico en ácidos grasos n-6, sugiere las diferencias de actuación a nivel inmunitario entre los ácidos grasos n-6 y los n-9; del mismo modo, la mayor eficacia sobre la IBD del aceite de pescado, pone de manifiesto el importante papel anti-inflamatorio del EPA y DHA. Reuniendo todos estos datos,, se puede establecer un orden en cuanto a la capacidad de supresión de las diferentes grasas sobre el sistema inmunitario, como se indica en la Figura 11.3.



**Figura 11.3.** Capacidad inmunosupresora y anti-inflamatoria de los diversos ácidos grasos, familias de ácidos grasos y grasas.

Un tema de importancia que ha suscitado la alarma sobre los inconvenientes del uso de los ácidos grasos n-3, es el hecho de que al poseer un potente efecto anti-inflamatorio, pudiese llevar a la depresión del sistema inmunitario, dejando al individuo desprotegido frente a infecciones. Nuestros estudios en ratones sanos muestran cómo determinadas defensas, no sólo no son alteradas por el consumo de aceite de pescado, sino que incluso son aumentadas. El incremento que se observó de IgA, parece estar principalmente mediado por DHA, más que por EPA, dato que concuerda con que el EPA sea más potente como anti-inflamatorio. Estos datos coinciden con los de Hung P (Hung P y col, 1999), que muestran niveles séricos de IgA, IgG e IgM superiores en ratones que

consumieron dietas ricas en DHA que en los que consumieron dietas ricas en EPA. Por este motivo, el consumo de DHA y EPA debería ser conjunto, a pesar de que el EPA parezca poseer más potencia anti-inflamatoria. Otros estudios también coinciden en señalar que el consumo de aceite de pescado no altera la actividad fagocítica de los macrófagos ni su capacidad de generar daño oxidativo, del mismo modo que proponemos nosotros (Baró L y col, 2003; Carrero JJ y col, 2004; Halvorsen DS y col, 1997). De hecho, parece ser que en ratones el incremento en fosfolípidos de membrana de ácidos grasos insaturados, hace aumentar la fagocitosis (Mahoney EM y col, 1977). Sin embargo, los estudios existentes son bastante limitados, sobre todo en humanos donde junto con su administración se incluyen otros inmunonutrientes; sería necesaria una mayor profundización en este aspecto (Anderson M y Frtsche KL, 2002).

Puesto que los ácidos grasos modulan la respuesta inmunitaria, no sólo existirá una regulación a nivel de inflamación, sino que también se podrá ver afectada la respuesta Th2 y con ella los fenómenos de alergia. Evaluando los resultados obtenidos al administrar los diferentes tipos de grasa, encontramos que la eficacia en cuanto a la disminución de la respuesta Th2 fue la que se representa en la Figura 11.4.



**Figura 11.4.** Capacidad de diversos aceites de inhibir la respuesta Th2

El elevado ratio n-6/n-3 que caracterizaba a la dieta Girasol, puede ser el responsable de la respuesta Th2 más aumentada en los ratones que la consumían. Existen evidencias de que las dietas occidentales, también con dichos ratios, han hecho aumentar la incidencia de enfermedades alérgicas en la población (Prescott SL y Calder PC, 2004). De hecho, existen diversos estudios donde el consumo de PUFA n-3 ejerce beneficios sobre enfermedades como psoriasis (Mayser P y col, 2002), dermatitis atópica o asma, aunque no son muy importantes. Parece ser que sean más eficaces como preventivo, de modo que su administración a embarazadas, podría disminuir la incidencia de aparición de estas patologías (Dunstan JA y Prescott SL, 2005). Por este motivo, en nuestros estudios de

dermatitis alérgica (DA) se utilizaron ratones al destete, mostrándose efectivamente, efectos más marcados que los que se observaron al analizar la acción anti-alérgica del aceite de pescado en el modelo de *shock* anafiláctico. El componente Th1 e inflamatorio del modelo de DA, es decir, la reacción de hipersensibilidad retardada, fue claramente inhibida por la dieta W3, mientras que en el componente Th2, la respuesta IgE-mediada, los efectos no fueron tan espectaculares. Además, parece ser que el EPA es más efectivo para reducir la respuesta Th2, puesto que es el responsable de la disminución de IgE e IgG1, como ya apuntan otros autores (Hung P y col, 1999).

Un dato que resulta bastante sorprendente es que la dieta RBO posea una mayor capacidad de reducción de la respuesta Th2 que la dieta GAO, puesto que la primera es rica en PUFA n-6, potenciando la formación de IgE. Es posible, que el conjunto de compuestos que conforman su fracción insaponificable, esté influyendo en este sentido. El menor efecto de la dieta GAO inhibiendo la respuesta Th2 no nos sorprende, puesto que está descrito que el elevado consumo de MUFA aumenta el riesgo de padecer enfermedades de índole alérgica (Trak-Fellermeier MA, y col, 2004).

Estos resultados, lejos de pretender atribuir un potente papel anti-alérgico a los PUFA n-3, sugieren la importante asociación existente entre los lípidos de la dieta, con el riesgo de sensibilización alérgica y de sufrir la enfermedad de dicha clase. De este modo, un consumo apropiado de los distintos tipos de grasa, podría proporcionar protección frente a patologías alérgicas.

El análisis de las defensas anti-oxidantes y del estado oxidativo de los organismos no fue objetivo principal de este trabajo. Sin embargo, debido al importante papel que ejercen las grasas a nivel oxidativo y del contenido de antioxidantes propio de las mismas, consideramos importante evaluar en determinadas ocasiones sus efectos a este nivel. Además, muchas de las patologías estudiadas se caracterizaban por cursar con un marcado estrés oxidativo, fruto, en parte, de las alteraciones del sistema inmunitario, por lo que el restablecimiento de las condiciones oxidativas se convertía en un parámetro determinante para la resolución de dichas enfermedades.

La composición de ácidos grasos de la dieta determina en mayor o menor grado la composición de ácidos grasos de la membrana, y su nivel de insaturación así como la consecuente vulnerabilidad a la peroxidación lipídica y la mayor o menor permeabilidad de la propia membrana. En función de esto, las dietas con menos grasa poliinsaturada, concretamente las ricas en ácido oleico, no sólo podrían condicionar un menor estado

oxidativo celular de base, sino tamponar los posibles efectos de un posible estrés oxidativo generado por causas diversas.

Sin embargo, no sólo debemos considerar la susceptibilidad de oxidación de los ácidos grasos en las membranas en función del número de insaturaciones (DHA>EPA>ARA>LA=ALA>oleico), también debe tenerse en cuenta la propia capacidad antioxidante de los compuestos, que no tiene por qué estar relacionada con el grado de insaturación.

El aceite de oliva, rico en oleico, sobre el cual no es posible la peroxidación lipídica y con un alto contenido de antioxidantes en su fracción insaponificable, se convertiría de esta manera en la grasa más eficaz en este sentido. De hecho, la dieta OO fue capaz de restaurar los niveles de GSH en el colon de las ratas que padecían IBD; sin embargo, la dieta W3 empleada en este mismo modelo, que estaba exenta de antioxidantes que estabilizasen la grasa, ejerció un efecto semejante a pesar de ser rica en EPA y DHA, los ácidos grasos dietéticos más insaturados; de manera que parece que los ácidos grasos n-3 tengan *per se*, la capacidad disminuir el estrés oxidativo, posibilidad que han sugerido ya otras investigaciones (Barbosa DS y col, 2003). Otra posibilidad que se ha planteado es que los PUFA del aceite de pescado, al oxidarse, eviten la oxidación de otros compuestos fundamentales para el funcionamiento del organismo.

Al analizar los niveles de MDA en el plasma de los ratones que ingirieron una dieta rica en aceite de pescado, no se observaron grandes diferencias con respecto a los que consumieron la dieta rica en girasol; estudios en humanos habían visto anteriormente descensos en los niveles plasmáticos de MDA al administrar EPA y DHA (Parinyasiri U y col, 2004); incluso la dieta EPA fue capaz de disminuir dichos valores de manera significativa; probablemente, su acción antioxidante propia, sea la responsable de la menor peroxidación lipídica. Esa acción antioxidante propia del aceite de pescado se manifestó en diversos modelos ya que los ácidos grasos n-3 fueron capaces de restablecer los valores de GSH en las orejas de ratones donde se indujeron las dermatitis de contacto y la alérgica, además de inducir la expresión de enzimas responsables de la disminución de estrés oxidativo. Diversas investigaciones en humanos confirman el papel de los PUFA n-3, especialmente al actuar sobre actividades enzimáticas antioxidantes (Ramaprasad TR y col, 2005). Aunque no se analizaron parámetros de este tipo en los estudios llevados a cabo con el aceite de salvado de arroz, su alto contenido de antioxidantes permite suponer un efecto positivo a este nivel, sin que el alto contenido de PUFA afecte. De hecho, diversos estudios confirman la eficacia del RBO que disminuye el estrés oxidativo previamente inducido (Rena P y col, 2004).

Otro de los aspectos importantes que se analizan en esta Tesis Doctoral es cómo un ácido graso administrado por medio de la dieta se incorpora directamente en los tejidos y/o se transforma en sus diferentes derivados a través de las diversas vías metabólicas, apareciendo los nuevos ácidos grasos en los tejidos. Son principalmente importantes las rutas que parten de los denominados ácido grasos esenciales linoleico (LA) y y linolénico (ALA) y que darán lugar a los diferentes ácidos grasos de las series n-6 y n-3, y como consecuencias a la aparición de sus derivados más activos, ARA, EPA y DHA.

Los ácidos grasos administrados con la dieta no son incorporados por igual en los diferentes tejidos, sino que en función de los mismos, esta incorporación es más o menos eficaz. Es el caso de ácidos como el ARA y el DHA, que aparecen preferentemente en lipoproteínas del plasma o en hígado mientras que lo hacen en mucho menor grado en corazón y riñón (Presa-Owens y col, 1998). Ambos PUFA presentan un especificidad máxima por cerebro o retina debido a su papel par el correcto funcionamiento del tejido nervioso, así como por la placenta, motivado por la necesidad de transmitirlos al feto durante el embarazo para su correcto desarrollo. En nuestro estudio el ácido oleico de la dieta OO se incorporó en todos los tejidos analizados a expensas del LA, mientras que el LA de las dietas AS y Girasol se incorporó en los tejidos a expensas del oleico; en estos tejidos; sin embargo, a pesar de los elevados niveles de LA, éstos no llevaron a un aumento del ARA en hígado, colon ni plasma, de la misma forma que los ricos en ALA tampoco llevaron a un aumento de EPA y DHA como se discutirá después, a pesar de estar descrita la capacidad de conversión in vivo de LA y ALA (Salem N Jr y col, 1999; Sauerwald T y col). Sin embargo, existe también una variedad de estudios donde no se apreció conversión. Este hecho hace pensar que los PUFA de cadena larga deberían ser considerados como si fueran prácticamente ácidos grasos esenciales debido a que su transformación a partir de los precursores es escasa. Este fenómeno es de particular importancia en recién nacidos, sobre todo en prematuros, donde dichas actividades enzimáticas de elongación y desaturación, existen, pero son poco eficaces, motivo por el cual se recomienda la incorporación de ARA y DHA en dietas infantiles (Horrocks LA y Yeo Y, 1999). El incremento de EPA y DHA en las dietas W3, llevó en todos los casos a un aumento significativo de los mismos en los tejidos. Ya se administre la dieta rica en EPA o la rica en DHA, siempre existen mayores niveles de DHA, ya que éste es considerado la principal forma de almacenamiento de ácidos grasos n-3 (Kasim-Karakas SE, 1995). Probablemente por este motivo, los niveles de DHA son menores en plasma que en la mayor parte de los tejidos analizados. Se aprecia que este incremento de EPA y DHA sucedió a expensas del ARA, que disminuyó significativamente en plasma e hígado. En el estudio donde se

compararon las dietas EPA vs DHA este efecto se apreció de manera significativa (Tabla 10.17 de los Resultados); sin embargo, en cerebro y ojo, los niveles de ARA no variaron tanto, posiblemente por haberse realizado el estudio en animales después del destete, una vez ya se han desarrollado y madurado estos tejidos y en donde ya es más difícil que se produzcan cambios significativos en la composición de ácidos grasos en comparación con otros tejidos como el intestino y el hígado, más permeables a la composición de ácidos grasos de la dieta. En el estudio general donde se analizaron los efectos inmunitarios del aceite de pescado, los niveles de ARA no se alteraron apenas al tiempo que se apreció el incremento de LA, probablemente debido a la capacidad de sus PUFA n-3 de inhibir la acción de la  $\Delta 6$ -desaturasa (Emken EA y col, 1999). La bibliografía coincide en general en afirmar que la suplementación de PUFA n-3 supone un descenso de ARA en los tejidos, probablemente como consecuencia de la competición entre los ácidos n-6 y n-3 (Prisco D y col, 1996), aunque parece ser que al inicio de la suplementación ocurre a expensas de LA (Zuijdgeest-van Leeuwen SD y col, 1999). Está descrito que el EPA también lleva a una inhibición de la  $\Delta 5$ -desaturasa, motivo por el cual seguramente se produjo un incremento significativo en hígado del ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA). Este es otro mecanismo por el cual aumenta la capacidad anti-inflamatoria de los PUFA n-3, puesto que el DGLA es precursor de PGE<sub>1</sub>, prostaglandina con propiedades anti-inflamatorias (Cleland LG y col, 1990).

Estos datos además confirman que se ha producido una adecuada absorción de los ácidos grasos n-3, cuya longitud de cadena pudiera afectar la digestibilidad (Martínez de la Victoria E y col, 2001). Todas estas incorporaciones de ácidos grasos tras la administración de las dietas, son las responsables de los efectos observados en uno u otro sentido. Hay que destacar, aunque no haya sido contemplado en nuestros estudios, que una vez finalizado el tratamiento con los ácidos grasos, su efecto va desapareciendo con el tiempo, puesto que los tejidos van recuperando su perfil original.

Los estudios llevados a cabo con dietas ricas bien en EPA, bien en DHA mostraron que la administración de EPA siempre llevaba a un incremento significativo de DHA en todos los tejidos analizados, que era semejante al alcanzado al administrar la dieta DHA. Sin embargo, cuando se administró la dieta DHA, los niveles de EPA aumentaron, aunque en mucha menor medida con respecto al efecto de la dieta EPA. Este dato hace pensar en la existencia de un fenómeno de retro-conversión de DHA en EPA, aunque el ligero aumento pudo ser debido a la cantidad de EPA existente en la dieta, que se incorpora. Estos resultados no siempre coinciden con la bibliografía. Algunos autores afirman que la conversión de EPA en DHA es un proceso bastante limitado y que ocurre en escasa proporción, bloqueándose especialmente a nivel del ácido docosapentaenoico (DPA)

(Burge GC y col, 2002). Este hecho sugiere la necesidad de administrar con la dieta una ingesta adecuada de DHA. Sin embargo, estos datos contrastan con nuestros resultados, que sugieren que administrando EPA mayoritariamente se podrían alcanzar los requerimientos de DHA. Por otro lado, otros investigadores piensan que para que se de un fenómeno de retro-conversión de DHA en cantidades de EPA biológicamente activas, las cantidades de DHA administradas deberían ser muy elevadas, puesto que se ha descrito que se reconvierte entre 8-9% de DHA en EPA (Wainwright PE y col, 1996). En nuestro estudio donde enfrentamos la dieta DHA frente la dieta EPA, los niveles de DHA alcanzados en los distintos tejidos de ambos grupos fueron semejantes, lo que supone que la diferencia en cuanto al efecto inmunitario de ambas dietas ha sido debido al EPA.

Los estudios con TG estructurados también arrojaron mucha información acerca del destino de los ácidos grasos de la dieta y de la influencia de la estructura intramolecular de los TG de la misma. Al administrar el EPA, se acumuló más en plasma cuando se daba en posición 2 mientras que en hígado, se incorporaba más al administrarlo en posición 1 o 3, siendo en cerebro la incorporación de EPA semejante al darlo en una u otra posición. Este dato nos hace pensar que la incorporación en estos órganos, no sea dependiente de la posición del ácido graso como sugiere Kew S y col (Kew S y col, 2003). Puesto que en todos los tejidos de los animales de los grupos a los que se administraron TG estructurados con EPA aparecieron niveles de DHA superiores a los del control, se confirma de nuevo la capacidad de las desaturasas y elongasas responsables de la síntesis de DHA a partir de EPA.

El análisis de las diversas fracciones lipídicas reveló que DHA, EPA y ARA se incorporaban principalmente en fosfolípidos (PL) de cerebro e hígado, lo que sugiere que podría ocurrir de igual forma en las células del sistema inmunitario. Este dato sugiere la importancia de esta fracción lipídica. En hígado, la administración de las dietas EPA y DHA llevaron a un incremento de ambos ácidos grasos en los PL; en los TG se produjo un incremento de EPA con ambas dietas, pero sólo de DHA al dar la dieta DHA; en la fracción CE se apreció la disminución relativa de los PUFA n-3, dato que no concuerda con lo observado en otros estudios, en los que al dar aceite de pescado se incrementaban EPA y DHA en todas las fracciones (Cleland LG y col, 1990). Este hecho podría ser debido a la capacidad de EPA y DHA de reducir los niveles de colesterol en plasma, que como consecuencia, no alcanzan otros tejidos. En PL, las dietas ricas en aceite de pescado condujeron a una disminución de ARA, por igual en ambos casos; el aumento de PUFAs n-3 en TG no sucedió a expensas de LA ni ARA, lo que hace pensar que sucedió a expensas de oleico, ácido graso disminuido por igual en los hígados de los ratones alimentados con

aceite de pescado ( $23.2 \pm 4.5$  vs  $20.1 \pm 2.9$ ; Girasol vs W3). Estos datos coinciden con los estudios de Cleland y col que aprecian una disminución de MUFA.

En el cerebro, se produjo un enriquecimiento en DHA en los PL al dar las dietas ricas en EPA o DHA. Puesto que los niveles de DHA alcanzados fueron superiores en el grupo EPA y la ligera disminución de ARA producida fue mayor en el grupo DHA, parece que las dietas ricas en EPA fueron mejores al llevar a niveles superiores de DHA y ARA en tejido nervioso, PUFAs imprescindibles para su correcto desarrollo, maduración y funcionamiento. La dieta DHA, sin embargo, llevó a un mayor enriquecimiento en DHA en la fracción CE que la dieta EPA. Tanto DHA como ARA disminuyeron en TG. Como se ha podido observar, en cerebro no existió asimilación de EPA, que prefirió el DHA por su mayor utilidad para el mismo.

Uno de los aspectos a analizar es el resultado de incrementar ALA en la dieta, el precursor de los PUFA n-3, al igual que anteriormente se analizó el destino del LA, precursor de los PUFA n-6. Al enfrentar las dietas a base de aceite de soja (AS) y de aceite de oliva (OO), no solo se diferenciaban en los contenidos de oleico y LA, sino que la dieta AS poseía además un contenido de ALA superior al del resto de las dietas y en concreto con respecto a la dieta OO. A pesar de ser el contenido de ALA siete veces superior en la dieta AS, este ácido graso se incorporó por igual en los diferentes tejidos analizados administrando tanto la dieta OO como la dieta AS. En estos tejidos tampoco se percibió un incremento de EPA o DHA consecuencia de la posible conversión, datos que coinciden con otros estudios (Thies F y col, 2001). Este hecho podría ser debido a que las cantidades de ALA, aunque superiores en la dieta AS, no sean suficientes para provocar un incremento de sus derivados, puesto que es conocido que esta transformación es limitada en humanos, especialmente hacia DHA (Horrocks LA y Yeo IK, 1999) siendo decisiva la cantidad de ALA en la dieta (Morise A y col, 2004). De hecho, existen bastantes dudas acerca de si la efectividad de administración de PUFAs n-3 de origen vegetal sería semejante a los procedentes de aceite de pescado. Sí que se ha visto en otros trabajos una incorporación y transformación hacia EPA cuando se han administrado elevadas cantidades de ALA, proporcionadas normalmente por aceites como el de linaza, aunque para observar un aumento de DHA se requerirán largos periodos de administración de ALA, ya que la eficiencia en la conversión disminuye al ir descendiendo en la cascada de biosíntesis. Estos fenómenos suelen ocurrir a expensas de reducir el LA en los tejidos (Mantzioris E y col, 1994). Puesto que la dieta AS es tan rica en LA, posiblemente éste tienda a acumularse en los tejidos prioritariamente con respecto al ALA. Está descrito que para que la conversión de ALA sea eficiente, deben existir bajas concentraciones de LA en la dieta (Sinclair AJ y

col, 2002). Este precisamente es otro de los motivos que se proponen por los cuales ALA, a pesar de ser sustrato preferible para las elongasas y desaturasas que comparte con LA, se convierta escasamente, debido al elevado ratio LA:ALA presente en las células (Hague TA y Christofferson BO, 1984). Además, parece ser que el 75% del ALA ingerido, es sometido a  $\beta$ -oxidación, y que sólo una pequeña parte se destina a la síntesis de otros PUFA n-3, por lo que al administrar concentraciones tan pequeñas de ALA, sería lógico no apreciar transformación (Brenna JT, 2002). Otra posibilidad es que el ALA o sus derivados estén formando parte de tejidos diferentes a los analizados, como podría ser el caso de las células del sistema inmunitario, donde está descrito que se acumula gran parte del EPA (Mantzioris E y col, 1994 ; o bien el hecho de que una importante cantidad de ALA se destina a la piel (Fu Z y Sinclair AJ, 2000).

El conjunto de resultados obtenidos son la clara evidencia de la repercusión tan marcada que tiene la grasa sobre la respuesta inmunitaria y por tanto sobre numerosos procesos patológicos. Estos estudios resaltan la necesidad de cambiar los hábitos alimenticios, alterando en nuestras dietas el tipo de grasa. Según nuestros datos y la bibliografía existente, es necesario incorporar aceite de oliva en nuestras comidas, puesto que el conjunto de sus componentes ejercen efectos importantes a nivel inmunitario, pero sobre todo a nivel cardiovascular. La incorporación de ácidos grasos n-3 hasta alcanzar los ratios n-6/n-3 recomendados se hace imprescindible para mantener un correcto funcionamiento del sistema inmunitario y para prevenir y/o mejorar el curso de múltiples enfermedades inflamatorias y autoinmunes que tanto se incrementan en nuestra sociedad actual. El incremento en el consumo de pescado así como los alimentos funcionales que incorporan PUFAs n-3 permiten alcanzar las dosis nutricionales recomendadas para individuos sanos mientras que productos nutracéuticos, como las cápsulas que hoy se comercializan de aceite de pescado, permiten alcanzar dosis farmacológicas, a veces necesarias en enfermos cardiovasculares, dementes o en embarazadas. En el campo de la inmunonutrición ya se están aplicando estos ácidos grasos, que son incorporados en nutrición enteral y parenteral, para propiciar la mejoría estado post-traumático o post-operatorio donde se potencia la inflamación y el estrés oxidativo. Puesto que es difícil aumentar el ratio n-3/n-6 a expensas únicamente de pescado y no todo el mundo puede acceder a los diversos productos ricos en aceite de pescado que se ofertan, otra manera de actuar sobre este ratio es incrementar el consumo de aceite de oliva, que al aportar ácidos grasos n-9, disminuye el consumo de los n-6. El aceite de salvado de arroz, aunque no muy habitual en las zonas occidentales, podría servir de ayuda por su capacidad de estimular el

sistema inmunitario a individuos cuyo sistema inmunitario estuviera deprimido, como ocurre tras el ejercicio físico (Scharhag J y col, 2005), en situaciones de estrés (Barriga-Ibars C y col, 2005) o durante la senescencia (Bauer ME, 2005). En ciertas enfermedades también podría servir como coadyuvante de fármacos en la estimulación de células inmunitarias pudiendo ser muy útil en casos de SIDA o en pacientes con cáncer, donde el individuo se encuentra desprotegido por la afectación del sistema inmunitario, bien por la propia enfermedad o bien por los drásticos tratamientos empleados. De hecho, uno de sus principales aplicaciones actuales es la alimentación de caballos, ya que además este aceite presenta la propiedad de estimular la síntesis proteica. Además, la acción antioxidante de componentes de la grasa como hidroxitirosol y  $\gamma$ -orizanol también sería beneficiosa para evitar la oxidación de compuestos biológicamente activos como los PUFA n-3, propiciando así la potenciación de su efecto (Juliano C y col, 2005) además de mejorar el curso de determinadas enfermedades por su acción propia antioxidante.

De este modo, el combinar todos los tipos de grasa, sin incrementar la ingesta sobre los niveles recomendados, podría ayudar a mejorar la salud del individuo, que en función de sus circunstancias requerirá un tipo de dieta enriquecido en una grasa o en otra.

Por último, cabe destacar la importancia que podría tener la comercialización de TG estructurados, diseñados de acuerdo a los requerimientos especiales de cada individuo, de modo que éstos podrían constituir una herramienta importante con la que optimizar el uso de los ácidos grasos para mejorar la salud. Por ejemplo, TG estructurados para mejorar la absorción de PUFA en casos de mal-absorción, situando a éste en posición dos y MCTs en posiciones 1 y 3. Los ácidos grasos de cadena media (MCFA) en esas posiciones son digeridos más fácilmente y suponen una fuente de energía rápidamente disponible (Mu H, 2005); TG estructurados con ácido palmítico en posición 2 para incorporar en fórmulas infantiles y así mimetizar la estructura de la leche materna. Este es el caso de Betapol (Lucas A y col, 1997). También se ha estudiado su uso en prevención de obesidad, a través de la síntesis de grasas “bajas en calorías”, por ejemplo, TG estructurados con AGCC o diacilglicéridos, productos capaces de inhibir la acumulación de grasa (Nagao T y col, 2000). Otra posible aplicación no nutricional, es su utilidad como vehículo para drogas liposolubles, con el fin de aumentar su absorción normalmente limitada (Hola R y col, 2003). Sin embargo, en la actualidad los métodos de síntesis de TG estructurados no son especialmente rentables para su elaboración y comercialización a nivel industrial. En referencia a la importancia de la posición de los ácidos grasos en los TG de la dieta, hay que decir que EPA y DHA están principalmente localizados en las posiciones 1 y 3 en el pescado marino mientras que en el aceite de pescado se sitúa mayoritariamente en posición

2 (Mu H y Porsgaard T, 2005). Este hecho podría suponer que en los individuos cuyo aporte de PUFA n-3 sea únicamente el pescado, la biodisponibilidad de los PUFA sería menor, corriéndose el riesgo de no alcanzar las concentraciones óptimas recomendadas de EPA y DHA. Otras fuentes de estos PUFA como alimentos funcionales, elaborados a partir de aceite de pescado, con mayor disponibilidad de EPA y DHA, podría ayudar a asegurar el correcto aporte dietético de los mismos.

## **Conclusiones**

---



Con los resultados de la investigación que se describe en esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

**1. Los cambios en el tipo de grasa incluida en la dieta tienen una repercusión de gran importancia sobre la respuesta inmunitaria:**

**1.1. En ratones sanos los PUFA n-3, EPA y DHA principalmente, presentan un marcado efecto anti-inflamatorio, mientras que los PUFA n-6 tienen un carácter más inflamatorio. Los MUFA, como el ácido oleico, tienden ligeramente a suprimir la respuesta inmunitaria, siendo su efecto anti-inflamatorio muy inferior al de EPA y DHA.** Las dietas ricas en PUFA n-3, son las de mayor potencial anti-inflamatorio, con efectos inhibitorios marcados sobre la proliferación linfocitaria o la producción de citocinas inflamatorias, al tiempo que incrementan citocinas inmunosupresoras. Reducen la de la respuesta Th2 y mantienen la integridad de las defensas del organismo. En cuanto al potencial anti-inflamatorio le siguen las dietas ricas en ácido oleico, que disminuyen la producción de inmunoglobulinas. El aceite de salvado de arroz es una fuente novedosa de PUFAs n-6, que al tiempo que proporciona cantidades equilibradas de ácidos grasos saturados y de ácido oleico, estimula al sistema inmunitario.

**1.2. Los PUFA n-3 del aceite de pescado han resultado ser eficaces en modelos de dermatitis de contacto, dermatitis atópica, inflamación intestinal, EAE o alteraciones del perfil lipídico en ratones. A pesar de sus efectos inmunosupresores, a nivel de procesos alérgicos y en infecciones parece ser que el consumo de estos ácidos grasos no es perjudicial, incluso se observa una tendencia que indica que podrían ser beneficiosos en tales casos.** En inflamación aguda recuperan la integridad de los tejidos de manera eficaz, en inflamaciones más severas como la intestinal mejoran el curso de la enfermedad, de modo más relevante que con aceite de oliva. Los procesos autoinmunes se frenan ligeramente con la administración de estas dietas ricas en aceite de pescado, mientras que se aceleraron con la administración de dietas a base

de aceite de arroz. Sobre el metabolismo lipídico también actúan, mejorando el perfil de triglicéridos y disminuyendo el colesterol.

- 1.3. **Tanto EPA como DHA tienen propiedades anti-inflamatorias aunque parece ser que los mecanismos de actuación que participan son diferentes en uno y otro caso.** Mientras que para el EPA se ha detectado un efecto más potente a este nivel quizás mediado a través de un incremento de IL-10 y una disminución de eicosanoides de las series 2 y 4, el DHA parece estar más involucrado en el mantenimiento de las defensas generales del individuo.
- 1.4. **Mientras que la conversión de ALA a EPA o DHA no es muy eficaz, la conversión de EPA en DHA parece ser más efectiva, dato que indica la necesidad de incorporar en las dietas al menos EPA.** La administración de dietas ricas en EPA llevó a alcanzar niveles de DHA semejantes a los alcanzados al administrar dietas ricas en DHA en los diversos tejidos analizados, hecho que demuestra la existencia de una alta tasa de conversión de EPA en DHA, al menos en ratones.
- 1.5. **La estructura de los triglicéridos existentes en la dieta es importante en la consecución del efecto de los ácidos grasos que lo componen.** La situación en la posición 2 en triglicérido de un ácido graso concreto lleva a un uso más eficaz del mismo a nivel inmunitario, ya que éste se mantiene tras la digestión y es liberado de los fosfolípidos de membrana por la PLA<sub>2</sub> para la síntesis de eicosanoides. En este sentido, una dieta que contiene EPA en posición 2 es más eficaz como inmunomoduladora que una misma dieta donde EPA está en posición 1 o 3.
2. **La fracción insaponificable de las grasas de la dieta, normalmente rica en compuestos antioxidantes como el hidroxitirosol o el  $\gamma$ -orizanol, no solo protege al organismo por medio del mantenimiento de los sistemas de oxidoreducción, sino que además posee la capacidad de modular la respuesta inmunitaria,** llevando a la estimulación de la misma o ejerciendo efectos anti-inflamatorios en función de la fuente de la que deriven. De este modo, el hidroxitirosol presentó un destacado efecto beneficioso sobre el modelo de EAE en ratones, mientras que el  $\gamma$ -orizanol ejerce un efecto más inmunoestimulador.

## **Bibliografía**

---



**Abbas AK**, Lichtman AH, Pober JS. Propiedades generales de la respuesta inmunitaria. En: Inmunología celular y molecular. Ed: Interamericana McGraw-Hill.

**Accinni R**, Rosina M, Bamonti F, della Noce C, Tonini A, Bernacchi F, Campolo J, caruso R, Novembrino C, Ghersi L, Lonati S, Grossa S, Hipólito S, Lorenzano E, Ciani A, Gorini M. Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dislipidemic subjets. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16: 121-127.

**Agnello E**, Palmo A. The efficacy of dietetic intervention in multiple sclerosis. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2004; 50(4):317-323.

**Akihisa T**, Yasukawa K, Yamamura M, Ukiya M, Kimura Y, Shimizu M, Arai K. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem.* 2000; 48 (6): 2313-2319.

**Alessandri JM**, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Pomes-Ballihaut C, Champeil-Potokar, Lavialle L. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throught life. *Reprod Nutr Rev.* 2004; 44(6): 509-538.

**Algarra I**, Garrido F. Citocinas. En: Inmunología, bases moleculares y celulares. Ed: Pirámide. 1994.

**Alzoghaibi MA**, Walsh SW, Willey A, Fowler AA, 3<sup>rd</sup>, Graham MF. Linoleic acid, but not oleic acid, upregulates the production of interleukin-8 by human intestinal smooth muscle cells isolated from patients with Crohn's disease. *Clin. Nutr.* 2003; 22: 529-535.

**Anderson M** y Fritsche KL. N-3 Fatty acids and infectious disease resistance. *J Nutr.* 2002; 132: 3566-3576.

**Anderson ME**. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method Enzymol.* 1985; 113:548-555.

**Babayan VK**. Medium-chain triglycerides and structural lipids. *Lipids.* 1987; 22(6): 417-420.

**Bach AC**, Ingenbleek Y, Frey A. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J Lipid Res.* 1996; 37(4): 708-726.

**Bach AC**, Storck D, Meraihi Z. Medium-chain triglyceride-based fat emulsions: an alternative energy supply in stress and sepsis. *J Parenter Enteral Nutr.* 1988; 12 (Supl. 6): 82S-88S.

**Barbosa DS**, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition.* 2003; 19: 837-842.

**Baró L**, Fonollá J, Peña JL, Martínez-Férez A, Lucena A, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E. N-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr.* 2003; 22(2): 175-182.

**Barriga-Ibars C**, Rodriguez-Moratinos AB, Esteban S, Rial RV. Interrelations between sleep and the immune status. *Rev Neurol.* 2005; 40(9):548-56.

**Bauer ME.** Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress.* 2005; 8(1):69-83.

**Bazinet RP**, Douglas H, McMillan EG, Wilkie BN, Cunnane C. Dietary 18:3w3 influences immune function and the tissue fatty acid response to antigens and adjuvant. *Immunol Lett.* 2004; 95: 85-90.

**Beale RJ**, Bryg DJ, Bihary DJ. Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med.* 1999; 27: 2799-2805.

**Beck MA**, Antioxidants and viral infects: host immune response on viral pathogenity. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20:384S-388S.

**Belluzi A**, Boschi S, Brignola C, Munarini a, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin nutr.* 2000; 71 (Suppl 1): 339S-342S.

**Belluzi A**, Brignola C, Campieri M y col. Effect of an enteric-coated fish oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1557-1560.

**Bengmark S**. Immunonutrition: Role of biosurfactants, fiber and probiotic bacteria. *Nutrition* 14:585-54.

**Berger A**, Rein D, Schafer A, Monnard I, Gremaud G, Lambelet P, Bertoli C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *Eur J Nutr.* 2005; 44 (3): 163-173.

**Besler HT**, Grimble RF. Comparison of the modulatory influence of maize and olive oils and butter on metabolic response to endotoxin in rats. *Clin Sci.* 1995; 88: 59-66.

**Binkoski AE**, Kris-Etherton PM, Wilson TA, Mountain ML, Nicolosi RJ. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. *J Am Diet Assoc.* 2005; 105 (7): 1068-70.

**Bisignano G**, Tomaino a, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51 (8): 971-974.

**Bitler CM**, Viale TM, Damaj B, Crea R. Hydrolyzed olive oil vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *J Nutr.* 2005; 135: 1475-1479.

**Black PN**, Sharp S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Resp J.* 1997; 10: 6-12.

**Boehm G**, Borte M, Bohles HJ, Muller H, Kohn G, Moro G. Docosahexaenoic and arachidonic acid content of serum and red blood cell membrane phospholipids of preterm infants fed breast milk, standard formula or formula supplemented with n-3 and n-6 long chain polyunsaturated fatty acids. *Eur J Pediatr.* 1996; 155: 410-416.

**Bouic PJ**. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past ten years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4 (6): 471-475.

**Boza JJ**, Jiménez J, Martínez O, Suárez MD, Gil A. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. *J Nutr.* 1994; 124: 1978-1986.

**Brenes M**, García A, García P, Garrido A. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of coulometric electrode array system. *J Agric Food Chem.* 2000; 50: 4934-4940.

**Brenna JT**. Efficiency of conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002; 5: 127-132.

**Brocke S**, Gijbels K, Steinman L. En: *Autoimmune disease models. A guidebook.* Academic press. Eds: Cohen IR, Miller A. San Diego, CA. 1994.

**Burdge GC**, Calder PC. Conversion  $\alpha$ -linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 2005; 45(5): 581-597.

**Burdge GC**, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of  $\alpha$ -linolenic metabolism in young men. *Br J Nutr.* 2002; 88: 355-363.

**Burke A**, Lichtenstein GR, Rombeau JL. Nutrition and ulcerative colitis. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1997; 11: 153-174.

**Byenes RD**, Bothwell TH. Iron deficiency. *Annu Rev Nutr.* 1990. 10:133-48.

**Calder PC**, Deckelbaum RJ. Fat as a physiological regulator: the news gets better. *Curr Opin Clin Metab Care.* 2003; 6:127-131.

**Calder PC**, Miles EA. Fatty acids and atopic disease. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2000; 11 (Supl): S29-S36.

**Calder PC**. Polyunsaturated fatty acids and cytokine profiles: a clue to the changing prevalence of atopy? *Clin Exp Allergy.* 2003; 33: 412-415.

**Calder PC**, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr.* 2002; 87 (Supl. 1): S31-S48.

**Calder PC.** Fat chance of immunomodulation. *Trends Immunol Today*. 1998; 19 (6): 244-246.

**Calder PC.** Immunonutrition. *BMJ* 2003; 327: 117-8.

**Calder PC, Yaqoob P, Harvey DJ, Watts A, Newsholme EA.** Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J*. 1994. 300: 509-518.

**Calder PC.** More good news about fish oil. *Nutrition*. 2001. 17 (2):158-159.

**Calder PC.** Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 423-427.

**Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al.** Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:622-629.

**Carrero JJ, Baro L, Fonollá J, Gonzalez-Santiago M, Martinez-Ferez A, Castillo R, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E.** Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition*. 2004; 20(6):521-7.

**Cavaglieri CR, Martins EF, Colleone VV, Rodrigues C, Vecchia MG, Curi R.** Fiber rich-diets alter rat intestinal leucocytes metabolism. *Proc Nutr Biochem*. 2000; 11: 555-561.

**Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC.** Differential effects of short Chain fatty acids on proliferation and pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci*. 2003; 73: 1683-1690.

**Cavallion JM.** Pro-versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol*. 2001; 47: 695-702.

**Cave WT.** Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J*. 1991; 5: 2160-2165.

**Celada A**, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. Evidence for gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med.* 1984; 160: 55-74.

**Chait A**, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 2005; 46: 389-403.

**Chambrier C**, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Hainque B, Riou JP, Laville M, Vidal H. Eicopentaenoic acid induces mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Obes Res.* 2002; 10 (6): 518-525.

**Chandra RK**. Nutrition, immunity and infection: fro basic knowledge of dietary manipulation of immune response to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl acad Sci USA*, 1996; 93: 14304-14307.

**Cleland LG**, Gibson RA, Neumann M, French JK. The effect of dietary fish oil supplement upon the content of dihomo-gammalinolenic acid in human plasma phospholipids. *Prostaglandins Leukot Essent fatty acids.* 1990. 40 (1): 9-12.

**Comalada M**, Xaus J, Valledor AF, López-López C, Pennington DJ, Celada A. PKC epsilon in involved in SNK activation that mediated LPS-induced TNF $\alpha$ , which induces apoptosis in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285: C1235-C1245.

**Comalada M**, Xaus J, Sánchez E, Valledor AF, Celada A. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-,or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21<sup>waf1</sup> through the phosphatidyliositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur J Immunol.* 2004; 34 (8): 2257-2267.

**Cook JA**, Wise WC, Knapp DR, Haslishka PV. Essential fatty acid deficient rats: a new model for evaluating arachidonate metabolism in shock. *Adv Shock Res.* 1981; 6: 93-105.

**Coombs RRA**, Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. En: *Clinical aspects of immunology.* Eds: Gell PGH, Coombs RRA; Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1963.

**Cooper HS**, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. (1993). Clinic-pathologic study of dextran sulphate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 69:238-249.

**Corey EJ**, Shin C, Cashman JR. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Sci.* 1983; 80: 3581-3584.

Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases. 2005; 166: 3-18.

**Cummings JH**. Nutritional implications of dietary fibre. *Am J Clin Nutr.* 1978;31:821.

Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1235-1237.

**Curtis CL**, Hughes CE, Flannery CR y col. N-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage destruction. 2000; 275: 721-724.

**Daynes RA**, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature.* 2002; 2: 748-759.

**de la Puerta R**, Martínez-Domínguez E, Ruiz-Gutierrez V. Effects of minor components of virgin olive oil on topical inflammatory assays. *Z Naturforsch.* 2000. 55: 814-819.

**de Pablo MA**, Alvarez de Cienfuegos G. Modulatory effects of dietary lipids on immune functions. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78: 31-39.

**de Pablo MA**, Ortega E, Gallego AM, Alvarez C, Pancorbo PL, Álvarez de Cienfuegos G. The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1998; 44 (1): 47-57.

**de Pablo MA**, Puertollano MA, Alvarez de Cienfuegos G. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clin Diagn Laboratory Immunol.* 2002; 9(5): 945-950.

**de Roos NM** y Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71 (2): 405-411.

**DeCaterin R**, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexanoate reduces cytokine-induced expression of pro-arteriogenic and

proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 1829-1836.

**della Ragione F**, Cuccioli V, Borriello A, della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Pharmacol.* 2000; 57: 445-449.

**Deny A**, Hichami A, Khan NA. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells. *J Lipid Res.* 2001; 42:2015-2020.

**Denys A**, Hichami A, Khan NA. n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway. *J Lipid Res.* 2005; 46(4): 752-758.

**Deyberg J**, Leaf A, Galli C y col. ISSFAL board statement: Recommendations for the essential fatty acid requirement for infant formulas. *J Am Coll Nutr.* 1995; 14: 213-214.

**Diau GY**, Hsieh AT, Sarkadi-Nagy EA, Wijendran V, Nathanielsz PW, Brenna JT. The influence of long chain polyunsaturated supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *BCM Medicine.* 2005; 23: 3-11.

**Dinarello CA.** Biology of interleukin 1. *FASEB.* 1988; 1:108-115.

**Diplock AT**, Aggett PG, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe". *Br J Nutr*, 1999;81:S1-S27.

**Donadio JV.** The emerging role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of patients with IgA nephropathy. *J Renal nutr.* 2001; 11: 122-128.

**Dunstan JA** y Prescott SL. Does fish oil supplementation in pregnancy reduce the risk of allergic disease in infants? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; 5 (3): 215-221.

**Eicher SD**, McVey SD. Dietary modulation of kupffer cell and splenocyte function during a *Salmonella typhimorium* challenge in mice. *J Leukoc Biol.* 1995; 58: 32-39.

**Emken EA**, Adolf RO, Duval SM, Nelson GJ. Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope-labeled oleic, linoleic and linolenic acids by male subjects. *Lipids*. 1999. 34: 785-791.

**Endres S**, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonneman G, van der Meer JMW, Cannon JG, Rogers TS, Klemoner MS, Weber PC y col. 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*. 1989. 320: 265-271.

**Erickson KL**, adams DA, McNeil CJ. Dietary lipid modulation of the immune responsiveness. *Lipids*. 1983; 18: 468-474.

**Espejo C**, Penkowa M, Demestre M, Montalban X, Martínez-Cáceres M. Time-course expresión of CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*. 2005; 132: 1135-1149.

**Evoy D**, Lieberman MD, Fahey TJ, Daly JM. Immunonutrition: the role of arginine. *Nutrition*, 1998. 14:611-617.

**Failla ML**. Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges. *J Nutr*. 2003; 133: 1443S-1447S.

**FAO/WHO**. Reports, fats and oils in human nutrition. Food and Agricultural Organization of The United Nations: Rome. 1993; 49-55.

**Fckunaga K**, Yoshida M, Nakazono N. A Simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr*. 1998; 12(5): 300-3.

**Flachs P**, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2006; 49 (2): 394-397.

**Folch JL**, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226:497-509.

**Forchielli ML**, Walter WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defense. *Br J Nut.* 2005; 93 (Supl. 1): S41-S48.

**Frenández ML**, Vega-López S. Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. *Cardiovas Drug Rev.* 2005; 23 (1): 57-70.

**Fu Z**, Sinclair AJ. Novel pathway metabolism of alpha-linolenic acid in the guinea pig. *Pediatr Res.* 2000; 47: 414-417.

**Furneri PM**, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4892-4894.

**Gadek JE**, DeMichele SK, Karlstad MD y col. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit care.* 1999. 27: 1409-1420.

**Galli SJ**, Lantz CS. Allergy. En: *Fundamental immunology*. Ed: William E Paul. Lippincott-Raven, Filadelfia. 1999.

**Gálvez J**, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med.* 1997; 63: 409-414.

**Gálvez J**, Rodríguez-Cabezas ME, Zarzuelo A, Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res.* 2005; 49(6): 601-608.

**Gaudio E**, Taddei, G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli, R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig. Dis. Sci.* 1999. 44:1458-1475.

**Gerster H**. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Int J Nutr Res.* 1998; 68(3):159-173.

**Gibson GR**, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125: 1401-1412.

**Gil A.** Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56 (Supl. 3):51-54.

**Gil A.** New additions to infant formulas. En: Lifshitz C (ed). *Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice.* New York. Marcel Dekker, 2001; 113-135.

**Gill HS,** Doull F, Rutherford KJ, Cross ML. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr.* 2000; 84, S1:S111-S117.

**Gill HS.** Enhancement of natural and acquired immunity and *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *J Nutr.* 2000; 83:167-176.

**Gill HS.** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17:755-773.

**Gombos I,** Kiss E, Detre C, Laszlo G, Matko J. Cholesterol and sphingolipids as lipid organizers of the immune cells plasma membrane: their impact on the function of MHC-molecules, effector of T-lymphocytes and T-cell death. *Immunol Lett.* 2006; 104 (1-2): 59-69.

**González-Gross,** Wörnberg J, Álvarez R, Medina S, Marcos A. Los alimentos funcionales y su relación con el sistema inmune. En: *Actualización en Nutrición, Inmunidad e infección.* Ed: Ascensión Marcos, Editorial Médica Panamericana. 2003.

**Gonzalez-Ruiz F,** de León R, Fernández-Banares F. Polymeric enteral diets a primary treatment of active Crohn's disease: a prospective steroid controlled trial. *Gut.* 1993; 34: 778-782.

**Grimble RF,** Grimble GK. Immunonutrition role of sulfur amino acids, related amino acids and polyamines. *Nutrition* 1998;14:605-610.

**Grimble RF.** Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol,* 2005. 21:216-222.

**Grimble RF.** Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition.* 1998; 14: 634-640.

**Grimm H**, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *J Nutr.* 2002; 87 (Supl. 1): S59-S67.

**Grundy SM**. What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet? *Am J Clin Nutr.* 1997; 66 (Supl. 4): 988S-990S.

**Hague TA** y Christofferson BO. Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion to C<sub>22</sub> fatty acids in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 796: 205-217.

**Halvorsen DS**, Hansen JB, Grimsgaard S, Bonna KH, Kierulf P, Nordoy A. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on monocyte phagocytosis in man. *Lipids.* 1997; 32 (9): 935-942.

**Haraldsson GG**, Gudmundsson BÖ, Almarsson Ö. The synthesis of homogenous triglycerides of eicosapentaenoic and docosahexaenoic by lipase. *Tetrahedron.* 1995; 51: 941-952.

**Haraldsson GG**, Halldorsson A, Kull E. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *JAOCS.* 2000; 77: 1139-1145.

**Harbige LS**, Yeatman N, Amor S, Crawford MA. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel source of  $\gamma$ -linolenic acid. *Br J Nutr.* 1995; 74: 701-715.

**Harbige LS**. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids.* 2003; 38(4): 323-341.

**Hardman WE**. N-3 fatty acids and cancer therapy. *J Nutr.* 2004; 134: 3427S-3430S.

**Hassam AG**, Rivers JPW, Crawford MA. Metabolism of  $\gamma$ -linolenic acid in essential fatty acid deficient rats *J Nutr.* 1977; 107: 519-524.

**Heide JJ**, Bilo HJG, Donker JM, Wilmink JM, Tegzess AM. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *N Engl J Med.* 1993; 329: 769-773.

**Heinrich PC**, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265: 621-636.

**Hernández D**, Guerra R, Milena A y col. Dietary fish oil does not influence acute rejection rate and graft survival after renal transplantation: a randomised placebo-controlled study. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 897-904.

**Hibbeln JR**, Salem N Jr. Dietary polyunsaturated fatty acids and depression : when cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62: 1-9.

**Hibbeln JR**. Fish consumption and major depression. *Lancet (Letter).* 1998; 351: 1213.

**Hii CST**, Ferrante A, Edwards YS, Huang ZH, Hartfield PJ, RATHjen DA, Poulos A, Murray AW. Activation of mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid in rat liver. *J Biol Chem.* 1995; 270: 4201-4204.

**Hirve S**, Ganatra B. A prospective cohort study on the survival experience of under five children in rural western India. *Indian Pediatr.* 1997; 34(11): 995-1001.

**Hodge L**, Salome CM, Hughes JM, Liu-Brennan D, Rimer J, Alman M, Pang D, Armour C, Woolcock AJ. Effect of dietary intake of omega-3 and omega-6 fatty acids on severity asthma in children. *Eur Respir J.* 1998; 11(2): 361-366.

**Holm R**, Porter CJH, Edwards GA, Müllertz A, Kristensen HG, Charman WN. Examination of oral absorption and lymphatic transport of halofantrine in triple-canulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing structured triglycerides. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 20: 91-97.

**Horrobin DF**. Low prevalences of coronary heart disease, psoriasis, asthma, rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid, a genetic variation of essential fatty acid metabolism or a combination of both? *Med hypotheses.* 1987; 22: 421-428.

**Horrocks LA** y Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res.* 1999; 40(3): 211-225.

**Hung P**, Kaku S, Yunoki S, Ohkura K, Gu J, Ikeda I, Sugano M, Yazawa k, Yamada K. Dietary effect of EPA-rich and DHA-rich fish oils on immune function of Sprague-dawley rats. *Biosci Bitechmol Biochem.* 1999; 63(1): 135-140.

**Hung P**, Yamada K, Lim BO, Mori M, Yuki T, Sugano M. Effect of unsaturated fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol on immunoglobulin levels in culture medium of rat mesenteric lymph node and spleen lymphocytes. *J Biochem.* 1997; 121: 1054-1060.

**Ishizuka S**, Tanaka S, Xu H, Hara H. Fermentable dietary fiber potentiates the localization of immune cells in the rat large intestinal crypts. *Exp Biol Med.* 2004; 229: 876-884.

**Jeffery NM**, Cortina M, Newsholme EA, Calder PC. The effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in rat diet on spleen lymphocyte functions. *Br J Nutr.* 1996; 77: 805-823.

**Jeffery NM**, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions are due to oleic acid. *Ann Nut Metab.* 1996; 40: 71-80.

**Jobin C**, Bradham CA, Russo MP et al. Curcumin blocks cytokine mediated NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting I $\kappa$ B kinase activity. *J Immunol.* 1999; 163:3474-3483.

**Jones PJH** y Papamandjaris AA. Lipids: absorption and transport. En: Present knowledge in nutrition. Eds: Bowman BA y Russel RM. ILSI Press, Washington DC. 2001.

**Joseph SB**, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 213-219.

**Juliano C**, Cossu M, Alamanni MC, Piu L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanisms of action and its effects on oxidative stability of pharmaceuticals oils. *Int J Pharm.* 2005; 299: 146-154.

**Kalmijn S**, Launer NJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol.* 1997; 42: 776-782.

**Kasim-Karakas SE**. Impact on n-3 fatty acids on lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1995. 6: 167-171.

**Keen CL**, Gershwin. Zinc deficiency and immune function, 1990. *Annu Rev Nutr.* 10: 415-31.

**Kehlen A**, Geisler M, Olsen J, Sablotzki A, Langner J, Riemann D. IL-10 and TGF-beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. *Int J Mol Med.* 2004; 13(6):877-82.

**Kelley DS**. Modulation of the human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition.* 2001; 17: 669-673.

**Kew S**, Gibbons ES, Thies F, McNeill GP, Quinlan PT, Calder PC. The effects of fed structured triacylglycerols enriched in eicopentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leukocyte phagocytosis. *Br J Nut.* 2003; 90 (6): 1071-1080.

**Kew S**, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 674-681.

**Keys A**. Coronary hearth disease in seven countries. *Circulation.* 1970; 41: 1-211.

**Kono H**, Fujii H, Asakawa M, Maki A, Amemiya H, Hirai Y, Matsuda M, Yamamoto M. Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286: 1081-1089.

**Krawisz JE**, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation base done myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984; 87: 1344-1350.

**Kremer JM**, Lawrence DA, Petrillo GF, Litts LL, Mullaly PM, Rynes RI, Stocker RP, Parhami M, Greenstein NS, Fuchs BR y col. Effects of high dose of fish oil in rheumatoid arthritis after stopping non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 1107-1014.

**Krishna AGG**, Khatoon S, Shiela PM, Sarmandal CV, Indira TN, Mishra A. Effect of refining crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. *JAOCS.* 2001; 78 (2): 127-131.

**Kuby J**. Citokines. En: *Immunology*. Ed: WH Freeman and Company. 1994.

Kuby J. Hypersensitivity reactions. Nueva York: WH Freeman and Company. 1994:417-444.

**Kullmann, F**, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int. J. Colorectal. Dis.* 2001. 16:238-246.

**Kunz C**, Rudolff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000. 20: 699-722.

**Lara-Villoslada F**, Debras E, Nieto A, Gálvez J, López-Huertas E, Boza J, Obled C, Xaus J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr.* 2005; *In press*.

**Lara-Villoslada F**, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004; 39 (4): 354-360.

**Lasztity N**, Hamvas J, Biro L, Nemeth E, Marosvolgyi T, Decsi T, Pap A, Antal M. Effect of enterally administered n-3 polyunsaturated fatty acids in acute pancreatitis-- a prospective randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2005; 24(2): 198-205.

**Lasztity N**, Hamvas J, Biro L, Nemeth E, Marosvolgyi T, Decsi T, Pap A, Antal M.

Le J, Weinstein D, Galle D, Gubler U, Vilcek J. Induction of membrane associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J Immunol.* 1987; 138: 2137-2142.

**Le Poul E**, Loison C, Struyf S, Springael JY, LAnnoy V, Docobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Dethoux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 25481-25489.

**Linder MC.** Nutrición y metabolismo de las grasas. En: Nutrición, aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos. Ed: Elsevier Science Publishers B.V. 1988.

**Lopes R**, Laurindo FR, Manini.Filho J, Curi R, Sannomiya PN. NADPH-oxidase activity and lipid peroxidation in neutrophils from rats fed fat-rich diets. *Cell Biochem Funct.* 1999; 17: 57-64.

**López-Huertas E**, Baró L, Carrero JJ, Fonollá J, Jiménez J, Boza J. N-3 fatty acids: health effects and opportunities to increase intake. *Agrofood Industry Hi-tech.* Mayo/Junio 2003: 18-19.

**Lucas A**, Quinlan P, Abrams S, Ryan S, Meah S, Lucas PJ. Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Arch Dis Child.* 1997; 77: F178-184.

**Ly LH**, Smith III R, Chapkin RS y McMurray DN. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids suppress splenic CD4+ T cell function in interleukin IL-10-/- mice. *Clin Exp Immunol.* 2004; 139: 202-209.

**Mahoney EM**, Hamill AL, Scout WA, Cohn ZA. Response of endocytosis to altered fatty acyl composition of macrophage phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74: 4895-4899.

**Male D**, Roitt I. Inmunidad innata y adaptativa. En: *Inmunología.* Ed: Salvat; Barcelona. 1991.

**Mantzioris E**, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary substitution with an alpha-linolenic acid vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59 (6): 1304-1309.

**Marcocci L**, Maguire JJ, Droy-Lefais MT et al. The nitric oxid scavenging properties of Ginkgo biloba extract EgB 761. *Biochem Biophys Res commun.* 1994; 201:748-755.

**Marcos A**. The immune system in eating disorders: an overview. En: *Nutrition Inter J Appl Bas Nutr Sci (Nutrition, Immunology, Neuroscience and Behavior: Part VII)*. Guess Ed. Plata-Salamán CR, 13: 853-862.

**Martínez de la Victoria E**, Maña M, Zúñiga J. Nutrición y alimentación. En: *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Ed: McGraw-Hill Interamericana. 2001.

**Martínez de la Victoria E**, Yago MD, Mañas M. Aceite de oliva y sistema digestivo. En: *Aceite de oliva y salud (1)*. Ed: Mataix J. 1999.

**Martínez-Domínguez E**, de la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V. Protect effects upon experimental inflammation models of polyphenols supplemented virgen olive oil diet. *Inflamm Res.* 2001; 50. 102-106.

**Massa F**, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BJ, ferri GL, Sibae A, Storr M, Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest.* 2004; 113(8): 1202-1209.

**Mata P**, Alonso R, López-Ferre A, Ordovas JM, Lahoz C, Garces C, caramelo C, Codeceo R, Blazquez E, de Oya M. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1996; 16: 1347-1355.

**Mataix J**, Quiles JL, Rodríguez J. Aporte de grasa: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. *Guías alimentarias para la población española*. Madrid 1995; 231-237.

**Mataix J**, Rodriguez Huertas J. Alimentos ricos en lípidos. En: Nutrición y alimentación humana. Ed: Ergón, 2002.

**Mayser P**, Grimm H, Grimminger F. n-3 fatty acids in psoriasis (Supl). 2002; 87: S77-S82.

**Mayser P**, Mayer K, Mahloudjan y col. A doubled-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 versus n-6 fatty acid-based lipid infusion in atopic dermatitis. J Parenter Enteral nutr. 2002; 26: 151-158.

**McLean CH**, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz J, Garland RH, Tu W, Hilton LG, Granlek IM, Rhodes S, Khanna P, Morton SC. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. Am J Clin Nutr. 2005; 82 (3): 611-619.

**McLennan PL**, Howe P, Abeywardena M y col. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. Eur J Pharmacol. 1996; 300: 83-89.

**Meharban S**. Essential fatty acids, DHA and human brain. Indian J Pediatr. 2005; 72 (3):239-242.

**Meydani SN**, Lichtenstein AH, White PJ, Goodnight SH, Elson CE, Woods M, Gorbach SL, Schaefer EJ. Food use and health effects of soybean and sunflower oils. J Am Coll Nutr. 1991; 10(5): 406-428.

**Mihraha S**, Peat JK, Marks GB y col. Eighteen-month outcomes of house dust mite avoidance and dietary fatty acid modification in the Childhood Asthma Prevention Study (CAPS). J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 162-166.

**Ministry of agriculture, Fisheries and Food**. Dietary intake of iodine and fatty acids, food information surveillance sheet No. 127. Ministry of agriculture, Fisheries and Food, London. 1997.

**Moisecc P**, Ziff M. Immune interferon enhances the production of interleukin-1 by human endothelial cells stimulated by lipopolysaccharide. J Immunol. 1986; 37: 284-2852.

**Moncellin S**, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol.* 2003; 24 (1): 36-43.

**Moraes LA**, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2005. *In press.*

**Mori TA**, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ. Docosahexaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension.* 1999; 34: 253-260.

**Mori TA**, Burke V, Puddey IB, et al. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL, particle size, glucose and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1085-94.

**Mori TA**, Woodman RJ. The independent effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab care.* 2006; 9 (2):95-104.

**Morise A**, Combe N, Boué C, Legrand P, Catheline D, Delplanque B, Féart E, Weill P, Hermier D. Dose effect of  $\alpha$ -linolenic acid on PUFA conversion, bioavailability and storage in hamster. *Lipids.* 2004; 39 (4): 325-334.

**Mottram HR**, Evershed RP. Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric chemical ionization mass spectrometry. *Tetrahedron Letters.* 1996; 37: 8593-8596.

**Moya-Camarena SY**, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and an activator of PPAR $\alpha$ . *J Lipid Res.* 1999; 40: 1426-1433.

**Mu H**, Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* 2005; 44: 430-448.

**Mullenix PS**, Andersen CA, Starners BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg.* 2005; 19 (1): 130-138.

**Nagao T**, Watanabe H, Goto N, Onizawa K, Taguchi H, Matsuo M, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. *J Nutr.* 2000; 130 (4): 792-797.

**Nieto N**, Torres MI, Ríos A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr.* 2002; 132: 11-19.

**Nomura I**, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall C, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DYM. Cytokines milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol.* 2003; 171: 3262-3269.

**Nordvik I**, Myhr KM, Nyland H, Bjerve KS. Effect of dietary advice and n-3 supplementation in newly diagnosed MS patients. *Acta Neurol Scand.* 2000; 102(3): 143-149.

**O'Shea M**, Bassaganya-Riera J, Mohede ICM. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79 (Supl): 1199S-1206S.

**Olivares M**, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol.* 2006. *In press.*

**Ortega RM**, Requejo AM; Andres P, López-Sobaler AM, Quintas ME, Redondo MR, Navia B, Rivas T. Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66: 803-809.

**Owen RW**, Mier W, Giacosa A, Hull HE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38: 647-659.

**Palmerini CA**, Carlini E, Saccardi C, Servili M, Montedoro G, Arienti G. Antagonism between olive oil phenolics and nitric oxide on lymphocyte cytosolic calcium. *Mol Cell Biochem.* 2005; 280 (1-2): 181-184.

**Parinyasiri U**, Ong-Ajyooth L, Parichatikanond P, Ong-Ajyooth S. Effect of fish oil on oxidative stress, lipid profile and renal function in IgA nephropathy. *J Med Assoc Thai.* 2004; 87 (2): 143-149.

**Pariza MW**, Park Y, Cook ME. Mechanism of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 223: 8-13.

**Peña J**. Introducción al sistema inmune. En: *Inmunología, bases moleculares y celulares.* Ediciones Pirámide. 1994.

**Peterson LD**, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. 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.* 1998; 33(2): 171-180.

**Petroni A**, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A, Galli C. Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Throm Res.* 1997; 87(3): 315-322.

**Piltz T**, Saint-Mézard, Satho M, Herren S, Waltzinger C, Bittencourt MC, Kosko-Vilbois MH, Chvatchko Y. IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. *J Immunol.* 2003; 171: 1164-1171.

**Plat J**, Mensink RP. Food components and immune function. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16 (1): 31-37.

**Pompeétia C**, Lopes LR, Miyasaka CK, Procópio J, Sinnomiya P, Curi R. Effect of dietary acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33: 1255-1268.

**Prescott SL**, Calder PC. N-2 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7: 123-129.

**Presa-Owens S**, Innis SM, Rioux FM. Addition of triglycerides with arachidonic acid or docosahexaenoic acid to an infant formula has tissue- and lipid class-specific effects on fatty acids and hepatic desaturase activities in formula-fed piglets. *J Nutr.* 1998; 128: 1376-1384.

**Prescott SL** y Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Metab Care*. 2004; 7: 123-128.

**Prisco D**, Filippini M, Francalanci I, Paniccia R, Gensini GF, Abbate K, Neri Serneri GG. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid intake on phospholipids fatty acid composition in plasma and erythrocytes. *Am J Clin Nutr*. 1996; 63: 925-932.

**Pscheidl E**, Schywalsky M, Tschakowsky K, Boke-Prols T. Fish oil supplemented parenteral diets normalize splanchnic blood flow and improve killing of translocated bacteria in a low-dose endotoxin rat model. *Crit Care Med*. 2000; 28: 1489-1496.

**Puertollano MA**, Puertollano E, Ruiz-Bravo A, Jimenez-Valera M, De Pablo MA, De Cienfuegos GA. Changes in the immune functions and susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection in mice fed dietary lipids. *Immunol Cell Biol*. 2004; 82(4): 370-6.

**Ramaprasad TR**, Baskaran V, Krishnakatha TP, Lokesh BR. Modulation of antioxidant activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 2005; 280 (1-2): 9-16.

**Rana P**, Vadhera S, Soni G. In vivo antioxidant potencial of rice bran oil (RBO) in albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2004; 48 (4): 428-436.

**Raper NR**, Cronin FJ, Exler J. Omega-3 fatty acid content of the US food supply. *J AM Coll Nutr*. 1992; 11 (3): 304-308.

**Ratnayake WMN**, Hollywood R. Influence of diet on human milk fatty acid composition. Abstracts, 88<sup>th</sup> AOCS Annual Meeting and Expo. 1997; 96:96.

**Reddy Avula CP**, Zaman AK, Lawrence R, Fernandes G. Induction of apoptotic mediators in Balb/c splenic lymphocytes by dietary n-3 and n-6 fatty lipids. *Lipids*. 1999; 34: 921-927.

**Reeves PG**, Nielsen EF, Fahey GC Jr. (1995). AIN-93, purified diets laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*; 123: 1939-1951.

**Ricote M**, Valledor AF, Glass CK. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effect on lipid homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 230-239.

**Robert OB**. Practical applications of fish oil (n-3 fatty acids) in primary care. *J Am Board Pract.* 2005; 18:28-36.

**Rodriguez-Cabezas ME**, Gálvez J, Camuesco D, Lorente MD, Concha A, Martinez-Augustin O, Redondo L, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. 2003; 22(5): 463-71.

**Roth MD**, Baldwin GC, Tashkin DP. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on human immune function and host defence. *Chem Phys Lipids.* 2002; 121: 229-239.

**Rukmini C**, Raghuram TC. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J Am Coll Nutr.* 1991; 10(6):593-601.

**Ryan D**, Robards K. Phenolic compounds in olives. *Analyst.* 1998; 123: 31R-44R.

**Sadegui S**, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysacchride in mice. *Immunology.* 1999; 96: 404-410.

**Salem N Jr**, Pawlosky R, Wegher B, Hibbeln J. In vivo conversión of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999; 60 (5-6): 407-410.

**Sánchez-Álvarez VM**. Inmunocompetencia en la malnutrición proteico-energética. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1999; 13 (2):129-36.

**Sanderson IR**. Short Chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium. *J Nutr.* 2004: 134(9): 2450S-2454S.

**Sanderson P**, Yaqoob P, Calder PC. Effect of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expresión of lymphocyte surface molecules. *J Nutr Env Med.* 1994; 5: 119-132.

**Sanderson P**, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon graft versus host and host vs graft responses in the rat. *Cell Immunol.* 1995; 164: 240-247.

**Sauerwald TU**, Hachey DL, Jensen CL, Chen H, Anderson RE, Heird WH. Effect of dietary alpha-linolenic acid intake on incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids into plasma phospholipids in term infants. *Lipids*; 1996; 31: 131S-135S.

**Scharhag J**, Meyer T, Gabriel HH, Schlick B, Faude O, Kindermann W. Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function? *Br J Sports Med.* 2005; 39(3):171-7.

**Schmidt EB**, Varming K, Pederson JO y col. Long-term supplementation with n-3 fatty acids, II effect on neutrophil and monocyte chemotaxis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996; 56: 87-92.

**Scientific Committee for food.** 1993. Nutrient and energy intakes for the European Community Report of the 31 st series. Commission of the European Community, Luxemburgo.

**Shapiro AC**, Wu D, Meydani SN. Eicosanoid derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferation response. *Prostaglandins.* 1993; 45: 229-240.

**Shinohara H**, Ogawa A, Kasai M, Aoyama T. Effect of randomly interestified triacylglycerols containing medium and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(10): 1811-1818.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus j. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *Eur J Nutr.* 2005; 44(8): 509-516.

**Simopoulos AP.** Omega-3 fatty acids in inflammation and immune diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21(6): 495-505.

**Simopoulos AP**, Leaf A, Salem N. Essentiality of recommended dietary intake for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab.* 1999; 43: 127-130.

**Sinclair AJ**, Attar-Bashi NM, Li D. What is the role of  $\alpha$ -linolenic acid for mammals? *Lipids.* 2002; 37: 1113-1123.

**Singh M**. Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J Pediatr.* 2005; 72(3): 239-242.

**Singh U**, Devaj S, Jialal J. Vitamin E, oxidative stress and inflammation. *Annu rev Nutr.* 2005. 25:151-74.

**Soeters PB**, Van de Poll MGC, Van Gemert WG, Dejong CHC. Amino acid adequacy in pathophysiological states. *J Nutr.* 2004. 134:1575S-1582S.

**Soler C**, García-Manteiga J, Valdes R. Macrophages require different nucleoside transport system for proliferation and activation. *FASEB J*, 2001; 15:1979-1988.

**Song C**, Li X, Leonard BE, Horrobin DF. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 $\beta$ -induced anxiety, stress and inflammatory responses in rats. *J Lipid Res.* 2003; 44 (10): 1984-1991.

**Stallmach A** y Zeitz M. The intestine as an immunological organ. *Wien Klin Wochenschr.* 1998; 110:72-78.

**Standen J** y Bihari D. Immunonutrition:an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000. 3:149-157.

**Stenson WF**, Cort D, Rodgers J y col. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med.* 1992; 116: 609-914.

**Stucchi AF**, Shofer S, Leeman S, Materne O, Bee E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M and Becker JM. NK-1antagonist reduces colonic inflammation and oxidative estress in dextran sulphate sodium experimental colitis in rats. *Am J Physiol.* 2000; 279:G1298-G1306.

**Stulnig TM**, Zeyda M. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: impact on T-cell signaling. *Lipids*. 2004; 39 (12): 1171-1175.

**Sugano M**, Hirahara F. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan. *Am J Clin Nutr*. 2000 ; 71 (Suppl. 1) :189-196.

**Sugano M**, Koba K, Tsuji E. Health benefits of rice bran oil. *Anticancer Res*. 1999; 19: 3651-3657.

**Sugano M**, Tsuji E. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J Nutr*. 1997; 127 (3): 521S-524S.

**Tanaka S**, Inoue S, Isoda F, Waseda M, Yamakawa T, Sugiyama A, Takamura Y, Okuda K. Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993; 17: 631-636.

**Teitelbaum JE**, Wilker WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J Nutr Biochem*. 2001; 12: 21-32.

**Thies F**, Neve-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. 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 years. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 539-548.

**Tiwary RK**, Clandinin MT, Cinander B y col. Effect of high polyunsaturated fat diets on the composition of B cell and T cell membrane lipids. *Nutr Res*. 1987; 7:489-98.

**Tomobe YI**, Morizawa K, Tsuchida M, Hibino H, Nakano I, Tanaka Y. Dietary docosahexaenoic acid suppresses inflammation and immunoresponsess in contact hypersensitivity reaction in mice. *Lipids*. 2000. 35 (1):61-69.

**Trak-Fellermeier MA**, Brasche S, Winkler G, koletzo B, Heinrich J. Food and fatty acid intake and atopic disease in adults. *Eur Respir J*. 2004; 23: 575-582.

**Trautwein EA**. N-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2001; 103: 45-55.

**Trichopoulou A**, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *Br Med J*. 1995; 34: 1457-1460.

**Trichopoulou A**, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D. Cancer and Mediterranean diet traditions. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2000; 9: 869-873.

**Trowel H**, Southgate DA, Wolever TMN et al. Dietary fiber redefined. *Lancet*, 1976; 1:967.

**Tsimidou M**. Phenolic compounds and stability of virgin oil: part 1. *Food Chem*. 1992; 45: 141-144.

**Turner R**, Etienne N, Alonso MG, de Pascual Teresa S, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G. Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *Int J Vitam Nutr Res*. 2005; 75 (1): 61-70.

**Valledor A** y Ricote M. Nuclear receptors signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67: 201-212.

**Valledor AF**. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology*. 2005; 210: 127-132.

**Van Immerseel F**, Fievez V, de Buck J, Pasmans S, Martel A, Haesebrouck F, Ducatelle R. Microencapsulated short chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritis* in young chickens. *Poult Sci*. 2004; 83(1): 69-74.

**Van Meeteren ME**, Tuinissen CE, Dijkstra CD, van Tol EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2005; 59(12): 1347-61.

**Vanderlugt CL** y Miller SE. Epitope spreading in immune mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev*. 2002; 2: 85-95.

**Verlengia R**, Gorjao R, Kanunfre CC, Bordin S, de Lima TM, Martins EF, Curi R. Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene expression in Jurkat cells. *J Nutr Biochem*. 2004; 15: 657-665.

**Verlengia R**, Gorjao R, Kanunfre CC, Bordin S, de Lima TM, Martins EF, Newsholme P, Curi R. Effects of EPA and DHA on proliferation, cytokine production and gene expression in Raji cells. *Lipids*. 2004; 39 (9): 857-864.

**Vicent BJ**, McQuiston DJ, Einhorn LH, Nagy CM, Brames MJ. Review of cannabinoids and their antiemetic effectiveness. *Drugs*. 1983; 25 (Supl. 1): 52-62.

**Visioli F**, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998. 247 (1):60-4.

**Visioli F**. The effects of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev*. 1998; 56: 142-147.

**Volker D**, Fitzgerald P, Major G, garg M. Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. 2000; 27: 1343-1346.

**Volker DH**, FitzGerald PEB, Garg L. The eicopentaenoic to docosahexaenoic acid ratio of diets affect the pathogenesis of arthritis in Lew/SSN rats. *J Nutr*. 2000; 130: 559-565.

**Wahle KWJ**, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil and modulation of cell signalling in disease prevention. *Lipids*. 2004; 39(12): 1223-1231.

**Wainwright PE**, Xing HC, Mutsaers L, McCutcheon D, Kyle D. Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behaviour of a diet with low n-6:n-3 ratio and very high levels of docosahexaenoic acid. *J Nutr*. 1997; 127: 184-193.

Walter L, Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol*. 2004; 141: 775-785.

**Watanabe S**, Doshi M, Hamazaki T. n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonylglycerol level in mice. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 69 (1): 51-59.

**Wilmore DW**, Shabert JK. Role of glutamine in immunological responses. *Nutrition*. 1998; 14:618-626.

**Wilt TJ**, Lofgren RP, Nichol KL, Schorer AE, Crespin L, Downes D, Eckfeldt J. Fish oil supplementation does not lower plasma cholesterol in men with hypercholesterolemia. Results of a randomized, placebo-controlled crossover study. *Ann Intern Med*. 1989; 111(11): 900-5.

**Wolfe RR**, Martini WZ, Irtun O y col. Dietary fat alters pulmonary function in pigs. *Nutrition*. 2002; 18: 647-653.

**Wollenberg KF**. Quantitative high resolution  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance of the olefinic and carbonyl carbons of edible vegetable oils. *JAOCS*. 1990; 67: 487-494.

**Wu GH**, Zhang YW, Wu ZH. Modulation of post-operative immune and inflammatory response by immune enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World Review of Gastroenterology*. 2001; 7: 357-362.

**Xi S**, Cohen D, Barve S, Chen LH. Fish oil suppressed cytokines and nuclear factor kB induced by murine AIDS virus infection. *Nutr Res*. 2001; 21: 865-878.

**Yang SP**, Morita I, Murota SI. Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells. *J Cell Physiol*; 176: 342-349.

**Yaqoob P**, Calder PC. The effects of fatty acids on lymphocyte functions. *Int J Biochem*. 1993; 20: 419-426.

**Yaqoob P**, Knapper JA, Calder PC. The effect of olive oil consumption on immune functions in middle-aged men. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(1): 129-135.

**Yaqoob P**, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology*. 1994; 82: 603-610.

**Yaqoob P**, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett*. 1994; 41: 241-247.

**Yaqoob P.** Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol.* 2003; 24(12): 639-645.

**Yaqoob P.** Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications. *Curr Opin Clin Nutr Metab care.* 2003; 6: 133-150.

**Yaqoob P.** Monounsaturated fatty acids and immune function. *Braz J Med Biol res.* 1998; 31(4): 453-465.

**Yaqoob P.** Monounsaturated fatty acids and immune functions. *Eur J Clin Nutr,* 2002; 56: Supl 3: S9-S13.

**Yoshida H,** Miura S, Kishikawa H y col. Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 2001; 131: 2943-2950.

**Zuijdgeest-van Leeuwen SD,** Dagnelie PC, Rietveld T, Willem J, van der Berg O, Wilson JHP. Incorporation and wash out of orally administered n-3 fatty acid ethyl esters in different plasma lipid fractions. *Br J Nutr.* 1999; 82: 481-488.



**Anexo**

---



## **Curriculum vitae**

Saleta Sierra Ávila nació en Granada (1979) y se licenció en Farmacia por la Universidad de Granada en el año 2002. Durante sus estudios universitarios le fueron concedidas la Beca Inicio a la Investigación del Plan Propio de la Universidad de Granada (2001) y la Beca de Colaboración del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2002), ambas desarrolladas en el Departamento de Farmacología de la facultad de Farmacia de Granada. En Junio del 2002 se incorporó al Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech, donde se comenzó la Tesis Doctoral que se recoge en la presente memoria, bajo la dirección del Dr. Jordi Xaus Pey y la Dra. Mónica Olivares Martín y becado por la Fundación Universidad-Empresa de Granada. Obtuvo el Diploma de Estudios Avanzados en el año 2004 mediante un trabajo titulado “Papel anti-inflamatorio de los ácidos grasos n-3”.

## **Publicaciones científicas**

### **Artículos originales**

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. IL-10 expression is involved in the regulation of the immune response by omega-3 fatty acids. *Nutrición Hospitalaria*. 2004. 19 (6):376-382.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *European Journal of Nutrition*. 2005; 44(8):509-516.

Olivares M, Diaz-Ropero MP, Gomez N, Lara-Villoslada F, **Sierra S**, Maldonado JA, Martin R, Lopez-Huertas E, Rodriguez JM, Xaus J. Oral administration of two probiotics strains, *Lactobacillus gassery* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 enhances the intestinal function of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 107(2):104-111.

Comalada M, Camuesco D, **Sierra S**, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. In vivo quercetin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits

inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *European Journal of Immunology*. 2005; 35 (2): 584-592.

Comalada M, Ballester I, Bailón E, **Sierra S**, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Inhibition of proinflammatory cytokines and iNOS expresión in mouse macrophages via decreased nuclear factor-kappaB by naturally occurring flavonoids. *Manuscript submitted*.

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, Lara-Villoslada F, **Sierra S**, Maldonado JA, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. The consumption of two probiotics strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, boosts yhe immune system of healthy humans. *International microbiology*. 2005. *In press*.

Camuesco D, Comalada M, Concha A, Nieto A, **Sierra S**, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercetin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clinical Nutrition*. 2005. *In press*.

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, **Sierra S**, Lara-Villoslada F, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. The deprivation of fermented food in diet causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of deprivation. *Journal of Dairy Research*. 2006. *In press*.

Díaz-Ropero MP, Martin R, **Sierra S**, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. *In press*.

Lara-Villoslada F, **Sierra S**, Boza J, Xaus J, Olivares M. Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children. *Nutrición Hospitalaria*. 2006. *In Press*.

**Olivares M**, Diaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F., Fonolla J, Navas M, Rodriguez JM, Xaus J. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effect of influenza vaccination. 2006. *Manuscript submitted*.

**Abstracts publicados en revistas científicas**

**Sierra S**, Lara Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Il-10 expression is involved in the regulation of immune response by w3 fatty acids. *Nutrition*. 2003; 19 (11-12), 1059.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, López-Huertas E, Xaus, J. Effects of Rice Bran Oil on the immune response. *Clinical Nutrition*. 2004; 23 (4), 933-934.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. Dietary EPA and DHA are equally incorporated into DHA pool while EPA seems to be more potent as anti-inflammatory compared to DHA. *Clinical Nutrition*. 2005; 24(4): 589.

**Artículos de divulgación científica**

Lara-Villoslada F, **Sierra S**, Olivares M, Xaus J. Omega-3 fatty acids and the immune system: a safety way to modulate host defences. Review. *Ing Health Nutr*. Agosto, 16-19. 2005.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Arjan Geerlings, Olivares M, Xaus J. Immunomodulatory effects of hydroxytyrosol. Manuscript submitted.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. The importance to be called EPA or DHA in immune modulation. Manuscript submitted.

**Posters y comunicaciones en congresos**

## Posters

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, López-Huertas E, Xaus, J. Effects of Rice Bran Oil on the immune response. 26th ESPEN Congress. Lisboa 2004.

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. Dietary EPA and DHA are equally incorporated into DHA in cells while EPA seems to be more potent as anti-inflammatory compared to DHA. 27<sup>th</sup> ESPEN Congress. Bruselas. 2005.

Gálvez J, Comalada M, Camuesco D, **Sierra S**, Ballester I, Zarzuelo A. Quercetin inhibits cytokine and iNOS expresión through the inhibition of NF-kB pathway. 2<sup>nd</sup> Spanish and Portuguese Congress of free radicals. Bilbao 2004.

Camuesco D, Comalada M, **Sierra S**, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo. Synergic effects of quercetin and w-3 PUFA enriched diet on dextran sodium sulfate-induced rat colitis. 27<sup>th</sup> congress of Spanish Society of Pharmacology. Gerona 2005.

Ballester I, Comalada M, **Sierra S**, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Structure-activity relationship of flavoinds as intestinal antiinflammatory agents in vitro. 27<sup>th</sup> congress of Spanish Society of Pharmacology.

#### Comunicaciones orales

**Sierra S**, Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. Regulación de la respuesta inflamatoria por ácidos grasos n-3. IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición. Tenerife 2003.



