



Original/Investigación animal

Papel inmunomodulador de las dietas lipídicas en un modelo murino inmunosuprimido e infectado con *Listeria monocytogenes*

José María Cerón Rodríguez¹, M^a Ángeles Puertollano Vacas¹, M^a Elena Puertollano Vacas² y Gerardo Álvarez de Cienfuegos López¹

¹Área de microbiología. Departamento de ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. España. ²Department of Food and Nutritional Sciences. University of Reading. Inglaterra.

Resumen

Introducción: La capacidad inmunomoduladora de los ácidos grasos de la dieta en situaciones de inmunosupresión puede diferir de acuerdo con el tipo de ácido graso presente.

Objetivo: Analizar el efecto de diferentes tipos de dietas lipídicas, en la resistencia de animales inmunosuprimidos o no, frente a una infección experimental con *Listeria monocytogenes*.

Métodos: Ratones Balb/c fueron divididos en cuatro grupos experimentales, según su tratamiento inmunosupresor: control (PBS), Ciclofosfamida (CPA), GK 1.5 y RB6-8C5. Cada grupo fue subdividido en cuatro subgrupos según la dieta lipídica utilizada: control con aceite de maíz 5% (BG); aceite de oliva 20% (AO); aceite de pescado 20% (AP) y aceite de girasol 20% (AG). Los animales se alimentaron durante un mes antes del tratamiento y posteriormente infectados con *L. monocytogenes*.

Resultados: Mostramos incrementos en el número de bacterias viables en bazo e hígado, y bajos porcentajes de supervivencia en todos los grupos de ratones inmunosuprimidos y también en el grupo PBS alimentado con AP. Además, se observaron incrementos en la linfoproliferación, de bazos de ratones alimentados con AO y tratados con CPA.

Discusión: La dieta AP, produce una disminución en la resistencia del hospedador en situaciones de inmunosupresión. Por el contrario, las dietas AO y AG muestran mayor eficacia en la eliminación de *L. monocytogenes* y mayores ventajas en animales inmunosuprimidos. El tratamiento con RB6-8C5, produce una reducción en la supervivencia de los ratones de los grupos estudiados, lo que induce a establecer que los granulocitos juegan un papel fundamental en el control de la infección.

(Nutr Hosp. 2014;30:837-844)

DOI:10.3305/nh.2014.30.4.7677

Palabras clave: Respuesta inmune; ácidos grasos; infección bacteriana.

Correspondencia: Dr Gerardo Álvarez de Cienfuegos López. Departamento de Ciencias de la Salud. Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus "Las Lagunillas" 23071, Jaén (España). Email: gcienfue@ujaen.es

Recibido: 9-VI-2014.

Aceptado: 23-VII-2014.

IMMUNOMODULATORY ROLE OF DIETARY LIPIDS IN AN IMMUNOSUPPRESSED MOUSE MODEL AND INFECTED WITH *Listeria monocytogenes*

Abstract

Introduction: Dietary fatty acids immunomodulatory capacity in immunosuppression conditions may differ according to the type of fatty acid present in the diet.

Objective: To analyze the effect of different types of dietary lipids on the immune resistance of immunosuppressed and immunocompetent animals, against experimental infection with a virulent strain of *Listeria monocytogenes*.

Methods: Balb/c mice were divided into four experimental groups, according to their immunosuppressive treatment: control (PBS), cyclophosphamide (CPA), GK 1.5 and RB6-8C5. Each group was subdivided into four groups according to the lipid diet used which: control, with corn oil 5% (BG); olive oil 20% (AO); fish oil 20% (AP) and sunflower oil 20% (AG). The animals were fed for a month before treatment and subsequently infected with *L. monocytogenes*.

Results: We show increases in the number of viable bacteria in spleen and liver, and low survival rates in all groups of immunosuppressed mice and also in the PBS group and fed with AP. Furthermore, increases in the lymphocyte proliferation were observed, in the spleen of mice fed with AO and treated with CPA.

Discussion: The AP diet produces a significant decrease the host resistance in situations of immunosuppression. On the contrary, the AO and AG diets show major efficiency in the elimination of *L. monocytogenes* and major immunological advantages in immunosuppressed mice. Treatment with RB6-8C5, produces a reduction in the survival of the mice in all groups studied, which leads us to establish that granulocytes play a key role in the control of infection.

(Nutr Hosp. 2014;30:837-844)

DOI:10.3305/nh.2014.30.4.7677

Keywords: Immunity, active; fatty acids; bacterial infection.

Abreviaturas
CPA: (ciclofosfamida)
PBS: (phosphate buffer saline, tampón fosfato salino)
BG: (baja en grasas)
AO: (aceite de oliva)
AP: (aceite de pescado)
AG: (aceite de girasol)
TSA: (triptona-soja agar)
UFC: (unidades formadoras de colonias)
ConA: (concanavalina A)
DO: (densidad óptica)

Introducción

La inmunonutrición, tanto en humanos como en animales, es actualmente uno de los campos de mayor relevancia e interés. La influencia de la ingesta de grasas sobre las funciones inmunes es un hecho constatado por multitud de estudios y aplicado hoy día en la nutrición hospitalaria^{1,2}. Un aspecto importante a considerar es que, según el tipo y cantidad de ácido graso de la dieta, la modulación ejercida sobre las funciones inmunes puede ser diferente³, dependiendo del estado inmune del individuo y de multitud de factores biológicos, lo que provoca que la modulación pueda presentar ciertos beneficios en unos casos o desventajas en otros. Por este motivo actualmente, la composición de las fórmulas empleadas en nutrición enteral y parenteral se ajusta según las necesidades fisiológicas del paciente y la patología a tratar. Existen diversos trabajos que explican el mecanismo de acción mediante los cuales, los ácidos grasos de distinta naturaleza son capaces de influir en las funciones inmunes^{4,6}. Los mecanismos a través de los cuales, el componente lipídico de la dieta ejerce la modulación del sistema inmune son: apoptosis, expresión génica, estrés oxidativo, fluidez de membrana, modulación de la microbiota intestinal, presentación de antígenos, producción de eicosanoides y transducción de señales⁷.

Uno de los inconvenientes asociados a los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, presentes en el aceite de pescado (AP), es una disminución de la resistencia inmune del hospedador frente a infecciones con microorganismos patógenos⁴. Además, en los últimos años existen numerosas investigaciones que muestran que dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, producen un empeoramiento en el desarrollo de la respuesta inmune de ratones experimentalmente infectados bacterias patógenas como *Salmonella enteritidis*⁸ o *Mycobacterium tuberculosis*⁹.

El aceite de girasol presenta una alta concentración ácido linoleico, ácido graso poliinsaturado de la serie n-6 y presente en el aceite de girasol, es uno de los ácidos grasos esenciales y por tanto, no puede ser sintetizado por nuestro organismo. Aunque las emulsiones lipídicas más ampliamente utilizados en la alimentación parenteral, se basan en aceite de soja que contiene una concentración muy alta de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6, sin embargo, una administración excesiva de este tipo de

ácidos grasos puede producir efectos perjudiciales, ya que puede conducir a un patrón de ácidos grasos en las membranas celulares desequilibrado, y a una alteración en la síntesis de eicosanoides¹⁰.

Los ácidos grasos monoinsaturados de la serie n-9 presentes mayoritariamente en el aceite de oliva, también son capaces de modular el sistema inmune. Presentan una menor capacidad inmunosupresora que los de la serie n-3 y además no incrementan la susceptibilidad del individuo a enfermedades infecciosas^{11,12}.

Los procesos de inmunosupresión pueden ser consecuencia de una patología, o estar inducidos como consecuencia de un tratamiento de determinadas patologías (inmunosupresión iatrogénica). Uno de los fármacos inmunosupresores ensayados, la ciclofosfamida, (CPA), es un agente neutropénico que produce leucopenia y reducciones en los niveles de monocitos¹³. Otros agentes inmunosupresores ensayados fueron el GK 1,5 (anti-L3T4, que produce la depleción de linfocitos T CD4+) y el RB6-8C5 (anti-Gr1, que elimina a los granulocitos).

En este estudio analizamos como los ácidos grasos presentes en las dietas lipídicas son capaces de modular las funciones inmunes tanto en ratones inmunosuprimidos como inmunocompetentes y sometidos a una infección experimental con la bacteria patógena intracelular *Listeria monocytogenes*.

Material y métodos

Animales y dietas experimentales

Ratones Balb/c, (4 semanas de edad) adquiridos de Harlan Laboratories fueron mantenidos en racks ventilados en el animalario de la Universidad de Jaén en las condiciones que indica la normativa vigente (R.D 53/2013). Los ratones fueron divididos de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales, ambos con acceso *ad libitum* a sus respectivas dietas experimentales y al agua; un grupo tratado con PBS (control) y tres grupos inmunosuprimidos con CPA, GK 1,5 o RB6-8C5 respectivamente. Cada grupo de tratamiento se dividió en cuatro subgrupos de dieta; las dietas experimentales solo diferían en el tipo de grasa; el primer grupo fue alimentado con una dieta control que contenía un 5 % de aceite de maíz (dieta BG), el segundo grupo fue alimentado con una dieta que contenía como componente lipídico un 20% de aceite de oliva (dieta AO), un tercer grupo con una dieta que contenía un 20% de aceite de pescado (AP) y el cuarto grupo con una dieta que contiene como componente lipídico un 20% de aceite de girasol (AG). Las dietas se administraron durante un periodo de 30 días.

Tratamiento inmunosupresor

Transcurrido el periodo de 30 días de alimentación con las respectivas dietas lipídicas, al grupo control se

le inyectó 100 μL de PBS por vía intraperitoneal a las 72, 48 y 24 h horas previas a la infección con *L. monocytogenes*. Otro grupo fue tratado con una dosis de CPA de 100 mg/kg de peso en 100 μL de PBS estéril; en un total de tres dosis a las 72, 48 y 24 h horas previas a la infección con *L. monocytogenes*. Los agentes inmunosupresores GK 1.5 y RB6-8C5 se inyectaron por vía intraperitoneal 24 h antes de la infección experimental, ambos a una concentración de 2,5 mg/Kg (0,05 mg/ratón) en 100 μL de PBS estéril.

Infección experimental con Listeria monocytogenes

Una cepa virulenta de *L. monocytogenes* fue sembrada en medio agar tripton- soja (TSA) con un 7% de sangre, se incubó a 37 °C durante 24 h. Para los ensayos de supervivencia se inyectó por vía endovenosa a través del plexo retro-orbital ocular en cada ratón, una dosis infectiva de 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 μL de PBS estéril. Para la recuperación de bacterias viables y la proliferación de linfocitos, la dosis infectiva por ratón fue de 10^3 UFC de *L. monocytogenes*.

Cuantificación de bacterias viables procedentes de bazo e hígado de ratones experimentalmente infectados con L. monocytogenes.

A las 24 y 48 horas de la infección, los bazos e hígados procedentes de los ratones infectados fueron extraídos, se homogenizaron asépticamente por separado y sus células fueron recogidas por centrifugación. Se realizaron seis diluciones seriadas en solución salina estéril al 0,9 % (p/v) y se transfirieron 10 μL a placas de agar TSA-sangre. Después de la incubación de las placas durante 24 h a 37° C, el número de colonias se contó en cada muestra triplicada. La técnica llevada a cabo fue la misma para ambos órganos. Los resultados se expresan como \log_{10} de las bacterias viables recontadas.

Determinación de la proliferación de linfocitos en bazo y timo

Las proliferaciones linfocitarias de células esplénicas y tímicas se cuantificaron mediante la técnica colorimétrica con 3-(4,5-dimethylthiazol-2 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)¹⁴. Este compuesto es metabolizado por las mitocondrias de células vivas que lo transforman en cristales de formazán, de un color magenta característico. Esplenocitos y timocitos se dispusieron por triplicado en placas de 96 pocillos a una concentración de 10^5 células/pocillo y se incubaron en presencia de concanavalina A (Con A) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 24 h a 37° C y en atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente se incubó la

placa en iguales condiciones con MTT durante 3 h y por último se añadió 150 μL de HCl 0,04 N en isopropanol para la disolución de los cristales de formazán. La densidad óptica (DO) se cuantificó en un lector de microplacas a 550 nm y 620 nm, como longitudes de onda de medida y referencia respectivamente. Los resultados se expresan como incremento de porcentaje del índice de estimulación respecto al control (dieta baja en grasas).

Índice de estimulación= (DO estimulados / DO sin estimular)x100

Análisis de la supervivencia

En el ensayo de supervivencia cada grupo de tratamiento estaba compuesto de 40 ratones, los grupos se dividieron en 4 subgrupos de 10 ratones alimentados con las diferentes dietas. La muerte después de la infección experimental con una dosis virulenta de *L. monocytogenes* (10^4 UFC/ratón), se registró cada 8 h y los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar asociado a la media; la comparación entre los efectos de las dietas y el control se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de significación estadística de Student-Newman-Keuls al 95% de intervalo de confianza. Las diferencias significativas se presentaron con * $P < 0,05$.

Resultados

Recuentos de bacterias viables a partir de bazo e hígado

Los recuentos de bacterias viables en bazo e hígado de ratones alimentados con la dieta AP mostraron en la mayoría de los grupos, incrementos estadísticamente significativos con respecto a los grupos alimentados con otros tipos de dietas ($P < 0,05$) con independencia del tipo de tratamiento inmunosupresor. El menor número de bacterias viables lo muestran los ratones alimentados con la dieta control, mientras que los grupos alimentados con las dietas de AO y AG reflejan recuentos similares entre ellos, pero siempre inferiores a los ratones alimentados con la dieta AP. Con respecto a los grupos tratados con los agentes inmunosupresores RB6-8C5 y GK 1.5, aquellos ratones alimentados con la dieta de AO, muestran recuentos similares a los encontrados en el grupo control, mientras que los ratones alimentados con la dieta AG tienden a incrementarse a las 48 h. Los datos ausentes de los ratones alimentados con la dieta AP y tratados con

Tabla I
Recuperación de bacterias viables a partir de bazo e hígado

Grupos de tratamiento	Control		AO		AP		AG	
Bazo								
Tiempo (h)	24	48	24	48	24	48	24	48
PBS	1,3 ± 0,3*	1,25 ± 0,5*	3,06 ± 0,4	3,69 ± 0,36	3,95 ± 0,65*	5,96 ± 0,65*	3,16 ± 0,28	4,9 ± 1,02
CPA	2,43 ± 0,23	2,56 ± 0,54	2,72 ± 0,1	3,12 ± 0,24	4,47 ± 0,4*	6,1 ± 0,2*	2,53 ± 0,21	2,9 ± 0,42
GK 1.5	3,4 ± 0,17	4,06 ± 0,29*	2,78 ± 0,16	3,08 ± 0,15	3,26 ± 0,24	4,83 ± 0,57*	3,13 ± 0,46	3,73 ± 0,2
RB6-8C5	2,66 ± 0,05	4,12 ± 1,06	3,69 ± 0,36	5,53 ± 0,81	4,75 ± 0,5*		4,07 ± 0,21	6,52 ± 0,68*
Hígado								
Tiempo (h)	24	48	24	48	24	48	24	48
PBS	1,46 ± 0,15*	2,07 ± 0,5*	3,53 ± 0,68	3,53 ± 0,68	5,17 ± 0,51*	5,77 ± 0,68*	3,5 ± 0,34	3,5 ± 0,34
CPA	2,98 ± 0,3	2,92 ± 0,85*	3,25 ± 0,52	4,02 ± 0,68	4,87 ± 0,23*	6,09 ± 0,07*	3,16 ± 0,28	3,65 ± 0,4
GK 1.5	3 ± 0	3,58 ± 0,68*	3,19 ± 0,17	2,5 ± 0,14	3,95 ± 0,09*	4,88 ± 0,51*	3,26 ± 0,24	3,52 ± 0,33*
RB6-8C5	3,56 ± 0,31	4,63 ± 0,53	4,38 ± 0,43	5,49 ± 0,5	5,14 ± 0,47*		4,93 ± 0,48	6,19 ± 0,27*

Media ± error estándar asociado a la media (n=40 en cada grupo de tratamiento). AO: aceite de oliva; AP: aceite de pescado; AG: aceite de girasol. *P<0,05 comparado con el subgrupo de dieta control se considera como diferencia estadísticamente significativa.

RB6-8C5, se debe a la incapacidad de los mismos de superar la infección experimental con *L. monocytogenes* (Tabla I y Fig. 1).

Proliferación de linfocitos procedentes de bazo y timo estimulados con Con A

La figura 2 muestra la proliferación en linfocitos de bazo y timo estimulados con el mitógeno Con A. En bazo, los ratones alimentados con AP reflejan incrementos estadísticamente significativos respecto a las demás dietas ensayadas en los tratamientos control y

GK 1.5; en cambio en el tratamiento con CPA los ratones alimentados con AO se incrementan significativamente sobre los demás grupos de dieta tanto a las 24 h como a las 48 h. El tratamiento con RB6-8C5 produce en los esplenocitos de ratones alimentados con AG una significativa reducción en comparación a grupo de ratones alimentados con AO, en los que se puede observar un ligero incremento con respecto al resto de grupos.

En timo se puede observar que apenas existen diferencias estadísticas significativas; en la mayoría de tratamientos los ratones alimentados con AO muestran ligeros incrementos en comparación a los alimentados

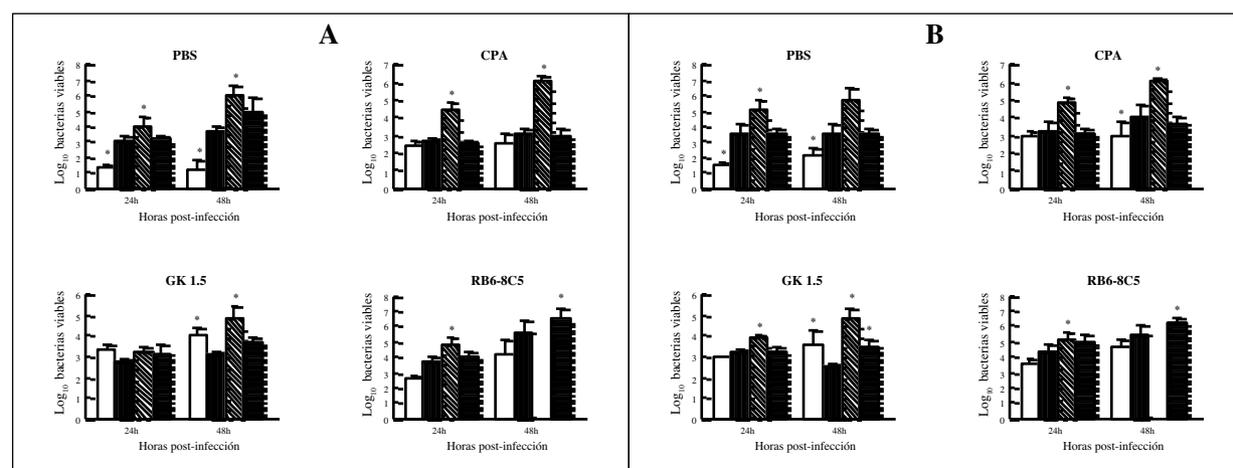


Fig. 1.—Recuentos de *Listeria monocytogenes* a las 24 y 48 h aislada a partir del bazo (A) e hígado (B) de ratones alimentados con dietas lipídicas e inmunosuprimidos (n=10 en cada subgrupo de dieta). Las barras de color blanco corresponden a la dieta baja en grasas (control), las barras con líneas verticales corresponden a la dieta de aceite de oliva, las barras con líneas diagonales corresponden a la dieta de aceite de pescado y las barras con líneas horizontales corresponden a la dieta de girasol. *P<0,05 comparado con el subgrupo de dieta control se considera como diferencia estadísticamente significativa.

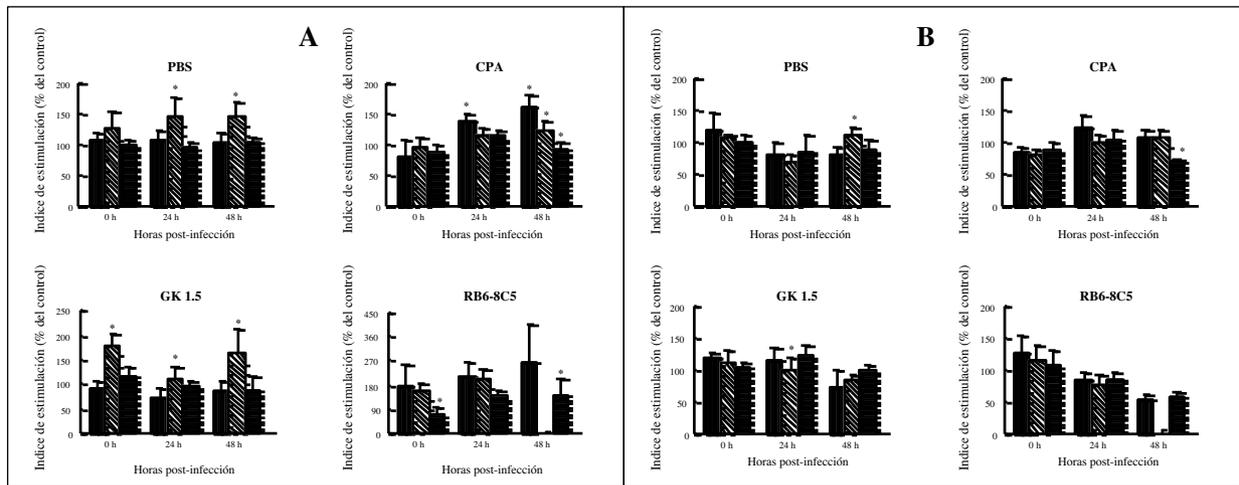


Fig. 2.—Determinación de la proliferación en esplenocitos (A) y tímocitos (B) estimulados con concanavalina A (Con A) de ratones alimentados con dietas lipídicas e inmunosuprimidos ($n=10$ en cada subgrupo de dieta). Los resultados son expresados como porcentaje de incremento respecto de la dieta control (datos no mostrados). Las barras con líneas verticales corresponden a la dieta de aceite de oliva, las barras con líneas diagonales corresponden a la dieta de aceite de pescado y las barras con líneas horizontales corresponden a la dieta de girasol. * $P < 0,05$ comparado con el subgrupo de dieta control se considera como diferencia estadísticamente significativa.

con AP. La ausencia de datos en bazo y timo de ratones alimentados con AP y tratados con RB6-8C5 a las 48 h, se debe a la incapacidad de superar la infección experimental.

Supervivencia

El porcentaje de supervivencia de ratones sometidos a inmunosupresión o no, alimentados con dietas lipídicas e infectados experimentalmente con *L. monocytogenes* puede observarse en la figura 3. Los ratones alimentados con la dieta de AP muestran reducciones importantes en el porcentaje de supervivencia en todos los casos a partir de las 48 h desde el comienzo de la infección experimental, y a los 4 días solo sobreviven un 10% de los animales en todos los tratamientos. En el tratamiento control (PBS) se debe destacar los altos índices de supervivencia del 90%, en los ratones alimentados con AO durante una infección con *L. monocytogenes*. En ratones sometidos al tratamiento inmunosupresor con CPA, además del escaso porcentaje de supervivencia del grupo de ratones alimentados con la dieta AP, también se produce un efecto similar, aunque no tan acusado en los ratones alimentados con la dieta AO, mientras que la supervivencia del grupo alimentado con la dieta AG, muestra porcentajes incluso superiores que los alimentados con la dieta control (BG). El tratamiento con el agente GK 1.5 no afecta al grupo de ratones alimentados con la dieta AO, que a los 10 días, presentan una tasa de supervivencia del 90%, por el contrario en el grupo de ratones alimentados con la dieta AG, el porcentaje de supervivencia disminuye dramáticamente a partir del día 6. Finalmente en grupo tratado con RB6-8C5 a los 4 días mueren el 100% de los ratones alimentados con AP, mientras que los ali-

mentados con las dietas control, AO y AG presentan porcentajes de supervivencia entre el 10-20%. En todos los casos de inmunosupresión los ratones alimentados con las dietas de AO, AG y control viven más tiempo que los alimentados con AP.

Discusión

Estudios recientes, han analizado desde el punto de vista experimental y epidemiológico la inmunomodulación ejercida por los diferentes tipos de ácidos grasos contenidos en las dietas lipídicas^{15,16}. Los resultados de estos trabajos muestran una mayor

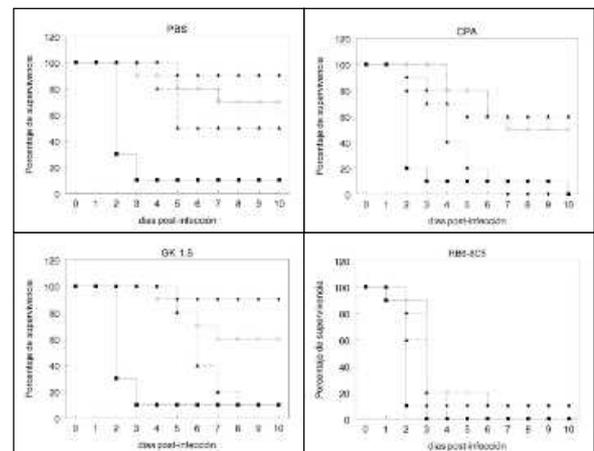


Fig. 3.—Porcentaje de supervivencia de ratones alimentados con dietas lipídicas e inmunosuprimidos ($n=10$ en cada subgrupo de dieta) después de la infección con *L. monocytogenes*. Los rombos cerrados corresponden a la dieta de aceite de oliva, los cuadrados cerrados corresponden a la dieta de aceite de pescado, los triángulos cerrados corresponden a la dieta de girasol y los círculos abiertos corresponden a la dieta control.

capacidad inmunosupresora en los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 presentes mayoritariamente en el AP. Este efecto inmunomodulador que se traduce en una disminución de los síntomas inflamatorios ha sido propuesto para su incorporación en la dieta de pacientes afectados por diversos tipos de enfermedades autoinmunes como puede ser la artritis reumatoide¹⁷ o el lupus eritematoso sistémico¹⁸. Sin embargo, este efecto inmunosupresor incrementa la susceptibilidad del hospedador a las infecciones microbianas debido a una disminución en la resistencia inmune frente a ellas, tal como se ha descrito con diversas bacterias patógenas como *Borrelia burgdorferi*¹⁹, *Pseudomonas aeruginosa*²⁰, *Salmonella enteritidis*⁸, *Mycobacterium tuberculosis*²¹ y *Listeria monocytogenes*^{22,11}. Sin embargo, existen otras investigaciones que demuestran incrementos en la resistencia inmune de animales alimentados con ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 frente a infecciones bacterianas^{23,24}. Estas discrepancias que pueden encontrarse en la bibliografía podrían deberse a variaciones en el tipo de patógeno utilizado y a la metodología usada para inducir la infección experimental.

Los ácidos grasos monoinsaturados de la serie n-9 mayoritarios en la composición del AO, no ejercen una inmunosupresión tan profunda en el organismo como en el caso del AP, por lo que tiene claras ventajas, por tanto, en situaciones de infección. Anteriores investigaciones de nuestro grupo de investigación, mostraron que durante una infección experimental con *L. monocytogenes*²⁸, ratones alimentados con AO poseen una menor carga bacteriana en bazo que la que presentan ratones alimentados con una dieta de AP, datos que posteriormente fueron corroborados por otros autores en modelos similares a los utilizados por nosotros²⁹.

Por otro lado, las investigaciones en las que se estudia la influencia de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados en ratones infectados y en los que previamente se deplecciona determinadas poblaciones de células inmunes no son muy abundantes, aunque se han ensayado distintos tipos de patógenos (bacterias, virus, parásitos...) y además existe una gran variabilidad en los resultados consultados²⁵⁻²⁷.

En el presente estudio hemos observado una reducción significativa del porcentaje de supervivencia frente a una infección con una dosis letal de *L. monocytogenes* en los ratones alimentados con AP (Fig. 3); además este hecho se correlaciona con incrementos significativos en el número de bacterias viables en el bazo e hígado (Tabla I y Fig 1). En estudios previos, nuestro grupo mostró como el tratamiento de los ratones con el agente CPA y la infección experimental con *L. monocytogenes* produce un importante reducción de la supervivencia en los grupos alimentados con la dieta AP²⁸. Los resultados del presente estudio muestran además que, independientemente del tratamiento inmunosupresor, incluso si éste no existe, una dieta cuyo componente lipídico es AP reduce dramáticamente la supervivencia frente a la infección bacteriana. Este he-

cho es especialmente acusado cuando el tratamiento inmunosupresor se hizo con el agente RB6-8C5 en el que los animales no son capaces de superar la infección más de 24 h, aunque la disminución del tiempo de supervivencia de los ratones tratados con este agente inmunosupresor fue generalizada en todas las dietas estudiadas (Fig. 3). Este hecho nos induce a pensar que los granulocitos juegan un papel fundamental en el control de la infección por *L. monocytogenes*. Por el contrario, en el resto de grupos alimentados con sus respectivas dietas el porcentaje de supervivencia fue mayor y la cantidad de bacterias recuperadas de los órganos fue menor en comparación a los animales alimentados con la dieta de AP, en estos grupos los tratamientos con los agentes inmunosupresores no mostraron grandes diferencias (Fig. 3).

Aunque los esplenocitos de ratones alimentados con AP mostraron incrementos significativos en la respuesta proliferativa con los tratamientos GK 1.5 y control (PBS); en los tratamientos con CPA y RB6-8C5, los porcentajes respecto a controles se redujeron en comparación a ratones alimentados con AO (Fig. 2). Esta disminución de la linfoproliferación de esplenocitos podría explicarse porque al desaparecer, por la acción de los agentes CPA y RB6-8C5, las poblaciones celulares responsables de la síntesis de citoquinas activadoras de la linfoproliferación, esta no llega a producirse. En la respuesta linfoproliferativa de timocitos, debemos destacar una reducción significativa en los ratones alimentados con AP y tratados con GK 1.5 a las 24 h de la infección (Fig. 2). Todas estas evidencias ratifican el hecho que una dieta rica grasas en las que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 son el componente mayoritario, provocan una importante disminución de los mecanismos de defensa frente a infecciones bacterianas, tanto en situaciones de inmunocompetencia como en estados de inmunosupresión, siendo los granulocitos, las células más directamente implicadas en la defensa frente a este tipo de infecciones.

La acción inmunomoduladora del ácido oleico componente mayoritario del aceite de oliva, es la responsable de los efectos asociados a las administraciones de dietas que contienen como componente lipídico mayoritario, este tipo de grasa^{5,30}. La capacidad de eliminar en hígado y bazo la bacteria experimentalmente inoculada en ratones alimentados con las dietas AO y AG, nos muestra que estos tipos de dieta no provocan de forma tan acusada una disminución de los mecanismos de defensa frente a este tipo de agresiones (Tabla I y Fig. 1), lo que se traduce en tiempos de supervivencia que en ocasiones llegan incluso a superar a los que presenta los ratones alimentados con la dieta control (BG) (Fig. 3), tanto en casos de inmunocompetencia como en los casos de tratamiento con los agentes inmunosupresores CPA y GK 1.5, aunque con el tratamiento con el agente RB6-8C5, que provoca la eliminación de los granulocitos, células responsables de la defensa antibacteriana, las supervivencias, al igual que en to-

dos los casos, también disminuye dramáticamente. La respuesta linfoproliferativa de esplenocitos de ratones alimentados con AO y estimulados con el mitógeno ConA, fue similar a la que presentan estas células procedentes del grupo de ratones control, pero se observaron incrementos en los tratamientos con CPA y RB6-8C5 (Fig. 2).

Los esplenocitos de ratones alimentados con AG reflejaron reducciones significativas en el porcentaje respecto a controles en los tratamientos con CPA y RB6-8C5, a las 48 h de la infección con *L. monocytogenes*. En la respuesta linfoproliferativa de timocitos se debe destacar una reducción significativa a las 48 h en ratones alimentados con AG y tratados con CPA; los timocitos de ratones alimentados con la dieta de AO mostraron niveles similares a controles y demás dietas en la mayoría de tratamientos. Las variaciones en cuanto a la estimulación linfocitaria del presente estudio con anteriores, podría deberse a diferencias en la posición de grupos triacilglicerol en el AP empleado³¹.

Los ensayos realizados en el presente estudio ratifican las propiedades que atribuyen al consumo de dietas ricas en AO en anteriores investigaciones¹². Aunque a los ácidos grasos monoinsaturados de la serie n-9 también se le atribuye un carácter inmunosupresor este es significativamente menor que el observado en el AP²², sobre todo frente a enfermedades de naturaleza infecciosa⁴. Por tanto podemos concluir, de acuerdo con los resultados que hemos mostrado, que la dieta AO, no sólo no contribuye a la disminución de los mecanismos de defensa frente a la infecciones bacterianas típica de las dietas ricas en grasas, sino que en algunos casos puede llegar a ser incluso más beneficiosa que una dieta baja en grasas.

Los ácidos grasos son muy empleados actualmente a nivel mundial en la nutrición hospitalaria como componentes de emulsiones lipídicas empleadas en nutrición enteral y parenteral^{32,33}; en este aspecto el aceite de oliva contenido en algunas emulsiones lipídicas ha mostrado ventajas frente a las emulsiones tradicionales basadas en el aceite de soja, como puede observarse en un estudio llevado a cabo en neonatos³⁴. No obstante, las discrepancias existentes en la bibliografía plantean la necesidad de llevar a cabo más estudios para determinar con una mayor precisión los diferentes mecanismos moleculares de la inmunomodulación ejercida por los diferentes tipos de ácidos grasos, tanto a nivel experimental como a nivel clínico, como podría ser la determinación de citoquinas de la respuesta Th1, inflamatoria, y la proporción de las distintas subpoblaciones linfocitarias que podían alterarse como consecuencias de las dietas ricas en los distintos tipos de grasas utilizadas.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha financiado a través de fondos de la "Convocatoria de Incentivos a Proyectos de

Investigación de Excelencia" (Proyecto n° P08 AGR 3773). Agradecemos el apoyo económico recibido a la Secretaría General de Universidades; Investigación y Tecnología (Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía).

Referencias

1. Fritsche KL. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr* 2006, 26: 45-73.
2. Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *Br J Nutr* 2007, 98 Suppl 1:S133-9.
3. De Pablo MA and Álvarez de Cienfuegos G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol* 2000, 78: 31-9.
4. Puertollano MA, Puertollano E, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, De Pablo MA and 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.
5. Jeffery NM, Yaqoob P, Newsholme EA and Calder PC. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann Nutr Metab* 1996, 40(2): 71-80.
6. Anderson M and Fritsche KL. (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *J Nutr* 2002, 132: 3566-76.
7. Puertollano MA, Puertollano E, Álvarez de Cienfuegos G and de Pablo MA. Olive oil, immune system and infection. *Nutr Hosp* 2010, 25(1): 1-8.
8. Snel J, Born L and Van der Meer R. Dietary fish oil impairs induction of gamma-interferon and delayed-type hypersensitivity during a systemic *Salmonella enteritidis* infection in rats. *APMIS* 2010, 118(8): 578-84.
9. Bonilla DL, Ly LH, Fan YY, Chapkin RS and McMurray DN. Incorporation of a dietary omega 3 fatty acid impairs murine macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2010, 5(5): e10878.
10. Yaqoob P and Calder PC. Effects of dietary lipids manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol* 1995, 163: 120-128.
11. Puertollano MA, Pérez-Toscano MT, Cruz-Chamorro L, Puertollano E, Álvarez de Cienfuegos G and de Pablo MA. Analysis of the immune resistance in an experimental murine model fed dietary lipids and infected with *Listeria monocytogenes*. *Nutr Hosp* 2004, 19(6): 333-40.
12. Puertollano MA, Puertollano E, Álvarez de Cienfuegos G and de Pablo MA. Significance of the olive oil in the host immune resistance to infection. *Br J Nutr* 2007, 98 Suppl 1: S54-8.
13. van 't Wout JW, Linde I, Leijh PC and van Furth R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal conditions and during acute inflammatory reaction. *Inflammation* 1989, 13(1):1-14.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2): 55-63.
15. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, 79(3-5): 101-8.
16. González S, López P, Margolles A, Suárez A, Patterson AM, Cuervo A, de los Reyes-Gavilán CG and Gueimonde M. Fatty acids intake and immune parameters in the elderly. *Nutr Hosp* 2013, 28(2): 474-8.
17. Miles EA and Calder PC. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2012, 107 Suppl 2: 171-84.
18. Halade GV, Rahman MM, Bhattacharya A, Barnes JL, Chandrasekar B and Fernandes G. Docosahexaenoic acid-enriched

- fish oil attenuates kidney disease and prolongs median and maximal life span of autoimmune lupus-prone mice. *J Immunol* 2010, 184(9): 5280-6.
19. Dumlao DS, Cunningham AM, Wax LE, Norris PC, Hanks JH, Halpin R, Lett KM, Blaho VA, Mitchell WJ, Fritsche KL, Dennis EA and Brown CR. Dietary fish oil substitution alters the eicosanoid profile in ankle joints of mice during Lyme infection. *J Nutr* 2012, 142(8): 1582-9.
 20. Auvin S, Collet F, Gottrand F, Husson MO, Leroy X, Beer-mann C and Guery BP. Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate lung inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Pediatr Res* 2005, 58(2): 211-5.
 21. McFarland CT, Fan YY, Chapkin RS, Weeks BR and McMurray DN. Dietary polyunsaturated fatty acids modulate resistance to *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *J Nutr* 2008, 138(11): 2123-8.
 22. Fritsche K, Irons R, Pompos L, Janes J, Zheng Z and Brown C. Omega-3 polyunsaturated fatty acid impairment of early host resistance against *Listeria monocytogenes* infection is independent of neutrophil infiltration and function. *Cell Immunol* 2005, 235(1): 65-71.
 23. Sharma S, Chhibber S, Mohan H and Sharma S. Dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates acute pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice. *Can J Microbiol* 2013, 59(7): 503-10.
 24. Lanza-Jacoby S, Flynn JT and Miller S. Parenteral supplementation with a fish-oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocyte function during sepsis. *Nutrition* 2001, 17(2): 112-6.
 25. Marchal G and Milon G. Control of hemopoiesis in mice by sensitized L3T4+ Lyt2-lymphocytes during infection with bacillus Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83(11): 3977-81.
 26. Tan MP, Pedersen J, Zhan Y, Lew AM, Pearse MJ, Wijburg OL and Strugnell RA. CD8+ T cells are associated with severe gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice in the absence of CD4+ T cells. *Infect Immun* 2008, 76(3): 1289-97.
 27. Carr KD, Sieve AN, Indramohan M, Break TJ, Lee S and Berg RE. Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 2011, 41(9): 2666-76.
 28. Cruz-Chamorro L, Puertollano MA, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G and de Pablo MA. Examination of host immune resistance against *Listeria monocytogenes* infection in cyclophosphamide-treated mice after dietary lipid administration. *Clin Nutr* 2007, 26(5): 631-9.
 29. Irons R, Anderson MJ, Zhang M and Fritsche KL. Dietary fish oil impairs primary host resistance against *Listeria monocytogenes* more than the immunological memory response. *J Nutr* 2003, 133(4): 1163-9.
 30. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS and Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 2013, 13(2): 201-10.
 31. Kew S, Wells S, Thies F, McNeill GP, Quinlan PT, Clark GT, Dombrowsky H, Postle AD and Calder PC. The effect of eicosapentaenoic acid on rat lymphocyte proliferation depends upon its position in dietary triacylglycerols. *J Nutr* 2003, 133(12): 4230-8.
 32. Deshpande G, Simmer K, Deshmukh M, Mori TA, Croft KD and Kristensen J. Fish Oil (SMOFlipid) and Olive Oil Lipid (Clinoleic) in Very Preterm Neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014, 58(2): 179-84.
 33. Olthof ED, Roelofs HM, Versleijen MW, Te Morsche RH, Simonetti ER, Hermans PW and Wanten GJ. Long-term olive oil-based parenteral nutrition sustains innate immune function in home patients without active underlying disease. *Clin Nutr* 2013, 32(4): 643-9.
 34. Sala-Vila A, Barbosa VM and Calder PC. Olive oil in parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007, 10(2): 165-74.