

Papel de los lípidos de la dieta en los mecanismos de inflamación, proliferación, diferenciación y muerte celular en el tracto intestinal

X. Llor

Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos saturados, así como la mayoría de ácidos grasos monoinsaturados, pueden ser sintetizados en diversos tejidos del cuerpo a partir de precursores no grasos, como la glucosa o los aminoácidos. Esto no se produce habitualmente en las personas que ingieren una dieta occidental por su elevado contenido de grasa en general, y en particular de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Por el contrario, los mamíferos no son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos linoleico (18:2 n -6) o alfa-linolénico (18:3 n -3), por lo cual a éstos se les denomina ácidos grasos esenciales.

La ingesta del principal ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico (18:1 n -9), supone aproximadamente entre el 8 y el 15% de la energía de la dieta occidental. La aportación energética del ácido linoleico es del 7-8%, mientras que la del ácido alfa-linolénico supone un escaso 0,3-0,4%. La importante ingesta de ácido linoleico, en relación con el alfa-linolénico, es debida a su mayor abundancia en nutrientes altamente consumidos (aceites de girasol, maíz, soja).

Una vez ingeridos, estos ácidos grasos de 18 carbonos son desaturados y elongados a ácidos grasos de 20 carbonos. Así, el ácido oleico será convertido a ácido eicosatrienoico (ETA), el linoleico a ácido araquidónico y el alfa-linolénico a eicosopentanoico (EPA), docosohexanoico (DHA) o docosopentanoico (fig. 1). Todos estos ácidos están presentes en las membranas celulares pero, al competir todos ellos por las mismas enzimas desaturasas y elongasas, los ácidos n -6 (linoleico y araquidónico) representan habitualmente la mayor proporción de ácidos grasos presentes en ellas. Si bien el ETA es sintetizado básicamente a partir del ácido oleico, y el ácido araquidónico lo es a partir del ácido linoleico, la mayor parte de la

aportación de EPA y DHA es directamente a partir del consumo de pescado con alto contenido en ellos, como el atún, las sardinas, la caballa o los arenques.

CONTENIDO EN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Los fosfolípidos de las células del sistema inmunológico (linfocitos T y B, monocitos) contienen mayoritariamente ácidos grasos n -6. Así, el 6-10% contienen ácido linoleico, y 15-25% ácido araquidónico. Las cantidades de n -9 y n -3 son muy inferiores y oscilan entre el 0,1% del ácido eicosatrienoico, y el 0,1-4% de EPA y DHA. De todos modos, el aumento de la cantidad de ácidos n -3 en la dieta (p. ej., ingiriendo aceite de pescado) comporta un aumento de la proporción de los n -3 EPA y DHA en los fosfolípidos de las células del sistema inmunitario y éste se produce a expensas del ácido araquidónico. También el ETA se incorpora a la membrana celular cuando éste es incluido en la dieta.

La alteración de la composición de los ácidos grasos en las células inmunitarias podría afectar sus funciones a través de distintos mecanismos: *a*) alteración de la fluidez de la membrana plasmática; *b*) modificación de la generación de distintas moléculas de señal celular (ceramidas, diacilglicerol, factor activador de plaquetas [PAF], etc.), que son generadas a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares, y *c*) alteración de la habilidad de las células de producir eicosanoides mediante el cambio de disponibilidad de ácido araquidónico como sustrato para su síntesis.

SÍNTESIS DE EUCOSANOIDES POR PARTE DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los eicosanoides son un grupo de mensajeros involucrados en la modulación de la intensidad y la duración de las respuestas inflamatoria e inmunológica. Éstos son sintetizados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos que son liberados de los fosfolípidos de la mem-

Correspondencia: Dr. X. Llor.
Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.
Ctra. del Canyet, s/n. 08916. Badalona. Barcelona. España.

Recibido el 7-1-2003; aceptado para su publicación el 7-1-2003.

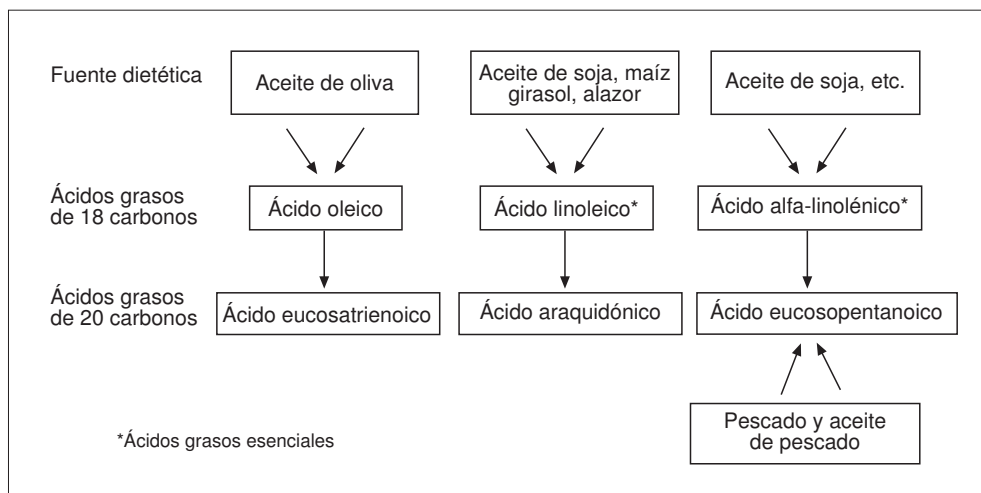


Fig. 1. Los ácidos grasos de la dieta: fuentes dietéticas y metabolismo.

brana celular por la acción de varias enzimas fosfolipasas, principalmente fosfolipasa A_2 , activada a partir de un estímulo celular. El ácido araquidónico es el progenitor de PGE_2 y LTB_4 , gracias a la acción enzimática de la ciclooxigenasa y la 5-lipoxigenasa, respectivamente. Estos eucosanoides poseen una potente actividad biológica proinflamatoria. La PGE_2 aumenta la permeabilidad vascular, produce vasodilatación, induce fiebre y aumenta el edema causado por otros agentes como la histamina. Por otra parte, PGE_2 posee también efectos inmunosupresores y antiinflamatorios: suprime la proliferación linfocitaria y la actividad *natural killer cell* e inhibe la producción del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 e interferón gamma ($IFN-\gamma$). LTB_4 también aumenta la permeabilidad vascular, produce vasodilatación, inhibe la proliferación linfocitaria y facilita la actividad *natural killer cell*. Así mismo, LTB_4 también aumenta la producción de $TNF-\alpha$, IL-1, IL-2, IL-6 e $IFN-\gamma$. Dada la disparidad de efectos, la acción fisiológica general sería determinada, además de por la concentración de estas sustancias, por el preciso instante de su producción y la sensibilidad de las células diana a sus efectos.

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS $n-3$ SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Un importante número de estudios ha revelado un significativo efecto inmunomodulador de los ácidos grasos $n-3$ presentes en el aceite de pescado. Los mecanismos fisiopatológicos que podrían explicar estos efectos parece que pueden ser de distinta índole, y algunos probablemente estén aún por dilucidar. Como ya se ha mencionado, el aumento del consumo de aceite de pescado supone un incremento de la cantidad de EPA y DHA en las membranas de las células inflamatorias, lo que conlleva una disminución del contenido en ácido araquidónico y un subsiguiente decremento de la capacidad de estas células de sintetizar eucosanoides a partir de ácido araquidónico. EPA puede actuar como sustrato para ciclooxigenasa y 5-

lipoxigenasa, produciéndose así derivados con diferente estructura, como PGE_3 y LTB_5 , cuyo rango de actividad biológica no está aún claro. De todas maneras, algunos de los efectos que los $n-3$ ejercen sobre las células inflamatorias son distintos de los que se podría predecir si fuesen sólo el resultado de una disminución de PGE_2 . En definitiva, otros mecanismos pueden desempeñar un importante papel. Así, los ácidos grasos $n-3$ son capaces de alterar la expresión de genes directamente relacionados con los mecanismos de la inflamación y muchos de estos efectos (si no todos) parecen producirse de una manera independiente de los eucosanoides. Los ácidos grasos $n-3$ actuarían en las vías de señal intracelulares que llevan a la activación de uno o varios factores de transcripción como NF κ B. Éste, por su parte, ejerce un importante papel en la inducción de varios genes involucrados en los procesos inflamatorios como COX-2, ICAM-1, VCAM-1, $TNF-\alpha$, IL-6, IL-1 β , óxido nítrico (NO), proteínas de fase aguda y metaloproteinasas, en respuesta al estímulo inflamatorio. El mecanismo por el cual los ácidos grasos $n-3$ disminuyen la activación de NF κ B aún no está claramente establecido. Los PPAR serían otro grupo de factores de transcripción que parecen tener un papel importante en los procesos de inflamación y que también podrían estar regulados por los ácidos grasos $n-3$.

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS $n-9$ SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

El ácido eucosatrienoico, cuyo principal precursor es el ácido oleico, representa un pequeño porcentaje de la totalidad de los ácidos grasos presentes en las membranas de las células del sistema inmunitario. De todas maneras, y como sucede con los ácidos grasos $n-3$, cuando se ingiere en cantidades significativas, el ETA se incorpora en dichas membranas. Esta incorporación supone una inhibición de la síntesis de LTB_4 a través de la inhibición de la hidrolasa leucotrieno- A_4 . Así pues, como sucede en el caso de los $n-3$, el aumento de ETA también puede alterar

el balance de los eucosanoides producidos por los leucocitos hacia una proporción potencialmente menos inflamatoria. La acción de ETA sobre la ciclooxigenasa es menos clara, ya que ETA carece del doble enlace *n*-6 necesario para la formación de prostanoïdes, aunque podría inhibir la producción de PGE₂ mediante la inhibición de la producción endotelial de PGI₂.

Más allá de los efectos de los *n*-9 sobre la producción de eucosanoides, tanto en estudios *in vitro* como en los realizados con animales, el ácido oleico puede inhibir parcialmente la proliferación de los linfocitos, la producción de IL-2 y de su receptor, la expresión de las moléculas de adhesión y la actividad de las células NK. En otros estudios, tanto en animales como en humanos, que utilizaban cantidades más modestas de ácido oleico, los resultados fueron mucho menos evidentes o claramente no significativos.

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS *n*-6 SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Como ya se ha mencionado, los *n*-6 son los principales ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de las células del sistema inmunitario, repartidos entre un 6 y un 10% de ácido linoleico y 15-25% de ácido araquidónico. Por este motivo, el ácido araquidónico es el principal precursor de la síntesis de eucosanoides. Tanto en estudios *in vitro* como con animales, se ha podido observar que la administración de ácido linoleico puede inhibir la proliferación linfocitaria, la producción de IL-2, la actividad CTL (citotóxica de los linfocitos T), la actividad de las células NK y la producción de IgG e IgM. Así, estos estudios sugieren que una dieta con alto contenido en ácido linoleico inhibe tanto las respuestas celulares como por anticuerpos. Por su parte, el ácido araquidónico también inhibiría la proliferación de linfocitos en cultivo, disminuiría la producción de IL-2 e inhibiría la degranulación de CTL. Son pocos los estudios que han investigado el impacto sobre el sistema inmunitario de los *n*-6 en estudios humanos, y en ninguno de ellos se ha podido demostrar algún efecto significativo.

APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS

Las enfermedades inflamatorias crónicas se caracterizan por una sobreactividad de la respuesta linfocitaria y, frecuentemente, por una producción inapropiada de eucosanoides derivados del ácido araquidónico, especialmente de PGE₂ y LTB₄. Diversos estudios ya han sido llevados a cabo con el fin de trasladar los resultados de las investigaciones, tanto *in vitro* como en animales (y en algún caso en humanos sanos), de los potenciales efectos antiinflamatorios sobre algunas enfermedades crónicas cuyo desarrollo se basa en la alteración de estos mecanismos.

Los efectos de los ácidos grasos *n*-3 son los que han sido más estudiados y los que han reflejado resultados más es-

peranzadores. Diversos trabajos han avalado un efecto positivo sobre la artritis reumatoide, reflejado tanto en la mejora de los síntomas como en la posibilidad de reducir el uso de agentes antiinflamatorios no esteroideos. También se han publicado algunos estudios sobre los efectos en la psoriasis con resultados no siempre positivos.

LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN LA ENFERMEDAD DE CROHN Y LA COLITIS ULCEROSA

Diversas alteraciones en el patrón de ácidos grasos poliinsaturados han sido descritas en pacientes con una enfermedad inflamatoria intestinal activa. Con el incremento de la gravedad de la enfermedad, se observa una disminución de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, más acusada en el caso de los ácidos *n*-6. Por el contrario, las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos *n*-3 continúan más elevadas que en los controles sanos. El significado de estos hallazgos está aún por esclarecer.

Diversos estudios han evaluado el papel tanto de los ácidos grasos *n*-3 derivados del aceite de pescado como del principal ácido graso monoinsaturado *n*-9 (ácido oleico) en la enfermedad de Crohn. La evaluación del potencial efecto beneficioso del aceite de pescado sobre la recurrencia de esta enfermedad ha producido resultados desiguales. El dato más claramente positivo que emerge de ambos estudios es un efecto beneficioso en pacientes en larga remisión. Por su parte, si bien un estudio había sugerido que la nutrición enteral con un alto contenido en ácido oleico era altamente efectiva en la inducción de la remisión de la enfermedad de Crohn activa, un ensayo posterior ha mostrado efectos totalmente opuestos. Los autores de ambos trabajos concluyeron que quizá el efecto proinflamatorio o antiinflamatorio de las grasas podría depender más de un cierto perfil de ácidos grasos que de la cantidad presente de un ácido graso en particular.

También han sido dispares los resultados de los distintos estudios que han evaluado los efectos de los ácidos grasos *n*-3 sobre la colitis ulcerosa. La reducción en el uso de corticoides parece ser el efecto positivo en el que más coinciden algunos trabajos.

EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS SOBRE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS Y LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS INTESTINALES

La apoptosis es un proceso esencial en la regulación del número de células epiteliales y supone un mecanismo crucial para prevenir que las células dañadas o mutadas sobrevivan y se dividan, lo que acabaría en un aumento en el número de células mutadas que contribuiría a la carcinogénesis. La constante renovación del epitelio colónico depende de un equilibrio rígidamente regulado entre la mencionada pérdida celular, a través de la apoptosis, y la generación de nuevas células. La alteración de este equilibrio produciría el desarrollo de los tumores colorrectales.

Fig. 2. Microscopia de fluorescencia de células HT-29 suplementadas con: aceite de pescado (A), aceite de oliva (B), control (C), ácido linoleico (D), ácido oleico (E) y control (F). Las células apoptóticas son identificadas de acuerdo con los criterios morfológicos de apoptosis: condensación de cromatina (brillante), formación de vesículas, encogimiento celular, formación de cuerpos apoptóticos (redondos e intensamente brillantes).

Una acumulación de células, consecuencia de un aumento del grado de proliferación o un defecto de estas células de seguir a una muerte celular programada (para compensar esta hiperproliferación), sería la base del desarrollo del cáncer colorrectal. De hecho, los adenomas colorrectales poseen un grado de proliferación aumentado en relación con la mucosa normal, y éste aumenta con la progresión de adenoma a carcinoma. Al mismo tiempo, mientras que el índice apoptótico en adenomas es claramente superior que en el tejido normal, el índice disminuye en el carcinoma establecido, en relación con el adenoma. Dado que el índice proliferativo se mantiene elevado, esta atenuación del grado de apoptosis en carcinomas crearía una alteración del equilibrio entre la proliferación y la muerte celular que favorecería un crecimiento neto del tumor.

Efectos de los ácidos grasos *n*-3

Un gran número de estudios, que emplean tanto los ácidos grasos DHA y EPA como su principal fuente, el aceite de pescado, han sido realizados para averiguar el papel de estos nutrientes sobre los procesos de proliferación y apoptosis en el cáncer colorrectal. Así, en población humana sana, la suplementación con aceite de pescado se acompaña de una disminución de la proliferación celular. En un modelo animal de inducción de cáncer colorrectal por azoximetano, se ha podido comprobar que el aceite de pescado induce la diferenciación y la apoptosis y reduce la mitosis y la proliferación celulares. Tanto el aceite de pescado como el DHA son también capaces de suprimir la formación y el crecimiento de focos de criptas abe-

rrantes, alteraciones presumiblemente precursoras de tumores colorrectales en ratas tratadas con carcinógenos. También en líneas celulares de cáncer colorrectal humano, como Caco-2 y HT-29, tanto el DHA como el aceite de pescado se comportan como potentes inductores de la apoptosis (figs. 2 y 3). Este último también inhibe significativamente el crecimiento de las dos líneas celulares mencionadas (fig. 4). En las mismas células, el DHA parece activar los inhibidores cinasa ciclina-dependiente (CDK) y las proteínas específicas de la parada de crecimiento, lo cual es consistente con la inducción de la apoptosis por parte del DHA.

Efectos de los ácidos grasos *n*-9

Aunque mucho menos estudiados, existen algunos datos sobre el efecto del aceite de oliva y de su principal componente, el ácido oleico, sobre los distintos mecanismos de desarrollo neoplásico. En las células de cáncer colorrectal Caco-2 y HT-29, el aceite de oliva se comporta como un potente inductor de la apoptosis, mientras que el ácido oleico ejerce el mismo efecto sobre las HT-29 (figs. 2 y 3). La capacidad que poseen algunas sustancias de inducir la diferenciación de las células Caco-2 es considerada como una indicación de su potencial anticancerígeno. Tanto el aceite de oliva como el ácido oleico inducen la diferenciación de las células Caco-2. Por otro lado, estos nutrientes no ejercen un efecto inhibitor sobre la proliferación celular (fig. 4). En el modelo animal de inducción de cáncer colorrectal por azoximetano, las ratas alimentadas con dietas con muy alto contenido en grasa basada en aceite de oliva no

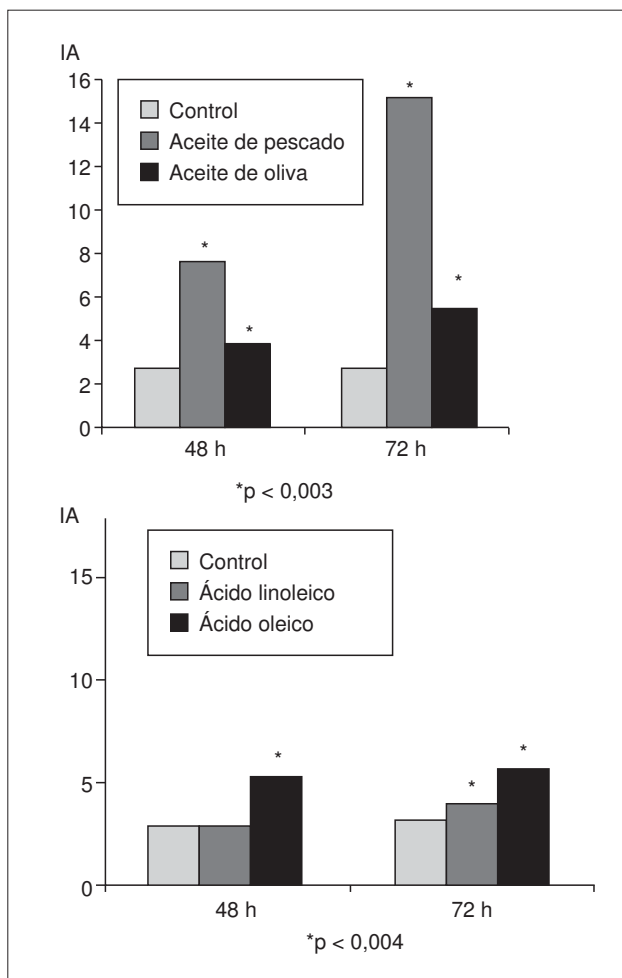


Fig. 3. Representación gráfica de la inducción de apoptosis en células HT-29. A la izquierda, células suplementadas con aceites, y a la derecha con ácidos. Los resultados se expresan como índice apoptótico (IA): número de células apoptóticas/número total de células x100.

presentan un efecto de promoción tumoral en comparación con las alimentadas con otras grasas. En el mismo modelo animal, pero con ratas que ingieren una dieta mucho más baja en grasa (un 5% del total de las calorías), los animales alimentados con aceite de oliva como aportación fundamental de grasa desarrollan muchos menos tumores que las ratas alimentadas con aceite de alazor (compuesto mayoritariamente de ácido linoleico). El mismo estudio también demostró una disminución de la formación de focos de criptas aberrantes en los primeros estadios del desarrollo tumoral, tanto en los animales alimentados con aceite de oliva como con los animales alimentados con aceite de pescado.

Efectos de los ácidos grasos n-6

Mientras algunos estudios prospectivos de casos y controles o de cohortes no han podido demostrar una asociación consistente entre los ácidos grasos poliinsaturados

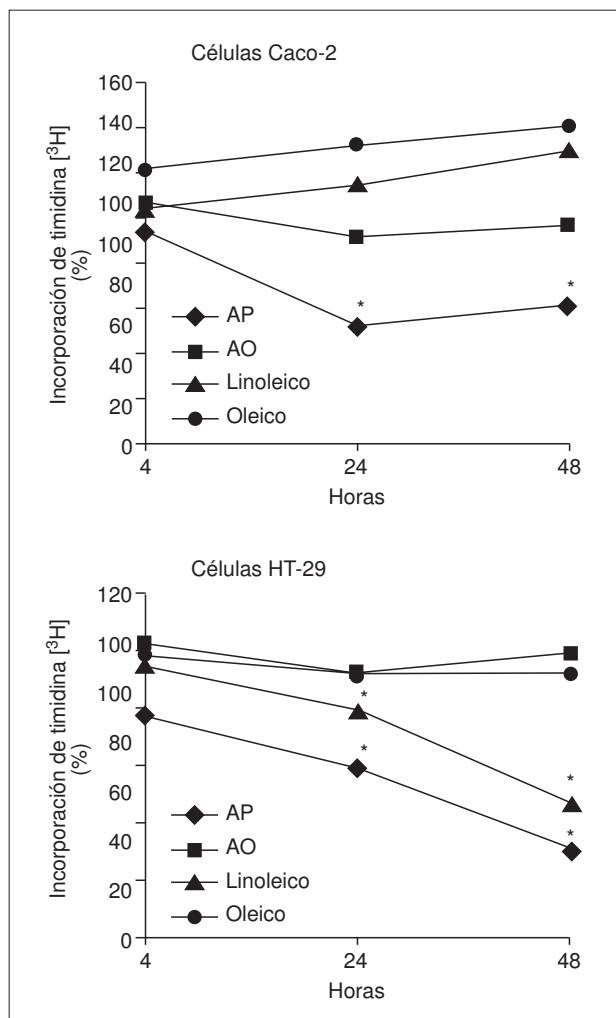


Fig. 4. Inhibición de crecimiento celular expresado en porcentaje de incorporación de timidina [³H]. Las células fueron tratadas con aceite de pescado (AP), aceite de oliva (AO), ácido linoleico y ácido oleico, así como con sus correspondientes controles. Los resultados estadísticamente significativos están marcados con (*).

(PUFA) de la serie n-6, como el ácido linoleico (C18:2), y el riesgo de desarrollo del cáncer colorrectal, algunos estudios experimentales sugieren una significativa asociación, particularmente en los estadios postiniciación y de promoción. En cuanto a los mecanismos celulares, el ácido linoleico parece tener un claro efecto inductor de la diferenciación de las células Caco-2, pero no ejerce ningún efecto sobre la apoptosis en células Caco-2 o HT-29. Por otra parte, mientras que el ácido linoleico inhibe la proliferación de las células HT-29, la ausencia de efecto sobre las células Caco-2 sugiere un efecto específico de línea celular de un dudoso significado (fig. 4).

POTENCIAL EFECTO PROTECTOR DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS DE LA DIETA SOBRE EL DESARROLLO DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por

cáncer en los países occidentales. El hecho de que haya grandes diferencias regionales en cuanto a incidencia y mortalidad, incrementos rápidos en la incidencia en diversos países, y la adaptación de las poblaciones emigrantes a la incidencia de las zonas receptoras, sugiere que el desarrollo del cáncer colorrectal es el resultado de una estrecha relación entre los factores genéticos y medioambientales. Entre los últimos, la dieta y el estilo de vida parecen los más importantes. En lo referente a la dieta, la grasa parece ser uno de los componentes nutritivos más determinantes. De hecho, la asociación entre las grasas saturadas y animales con el riesgo de cáncer colorrectal parece bastante establecida, tal como muestran multitud de estudios de casos y controles, ecológicos y experimentales.

Como ya hemos visto, los efectos de los ácidos grasos insaturados parecen bastante distintos. Así, el tipo de ácido graso sería mucho más determinante en cuanto a riesgo de cáncer colorrectal que la cantidad total de grasa consumida.

El ácido linoleico es el ácido graso de mayor consumo en Estados Unidos y en distintas regiones europeas, donde la incidencia de cáncer colorrectal está entre las más elevadas del mundo. Este relativamente alto consumo de ácido linoleico en estas regiones se produce a expensas de otros ácidos grasos de las series *n*-3 y *n*-9.

Aunque el consumo de grasas es relativamente elevado en Groenlandia, Finlandia y algunas zonas mediterráneas, la incidencia del cáncer colorrectal es relativamente baja en estas poblaciones. Una diferencia importante en cuanto a dieta entre estas regiones y el resto de los países occidentales es el mayor consumo de pescado y aceite de pescado (rico en ácidos grasos de la serie *n*-3, como el eicosapentanoico C20:5 y el docosahexanoico C22:6) en el caso de los países del norte, y de pescado y aceite de oliva (que contiene mayoritariamente ácido oleico, C18:1, *n*-9) en el caso de los países mediterráneos. Los diversos efectos, antes detallados, de estos ácidos grasos insaturados parecen avalar la hipótesis, basada en hallazgos epidemiológicos, del efecto protector de los ácidos grasos *n*-3 y *n*-9. En cualquier caso, si bien los datos empiezan a ser abundantes y significativos en lo referente al aceite de pescado, estos aún son relativamente escasos en lo referente al aceite de oliva y contradictorios en el caso de los ácidos grasos *n*-6.

BIBLIOGRAFÍA

- James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000;71:343S-8S.
- Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S14-9.
- Calder PC. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. *Proc Nutr Soc* 1998;57:487-502.
- Gibney MJ, Hunter B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1993;47:255-9.
- Cleland LG, Neumann MA, Gibson RA, Hamazaki T, Akimoto K, James MJ. Effect of dietary *n*-9 eicosatrienoic acid on the fatty acid composition of plasma lipid fractions and tissue phospholipids. *Lipids* 1996;31:829-37.
- Grimble RF. Dietary lipids and the inflammatory response. *Proc Nutr Soc* 1998;57:535-42.
- Sperling RI, Benincaso AI, Knoch CT, Larkin JK, Austen KR, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 1993;91:651-60.
- Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids* 1999;34: 317-24.
- Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 2002;61:345-58.
- James MJ, Gibson RA, Neumann MA, Cleland LG. Effect of dietary supplementation with *n*-9 eicosatrienoic acid on leukotriene B4 synthesis in rats: a novel approach to inhibition of eicosanoid synthesis. *J Exp Med* 1993;178:2261-5.
- Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Hamazaki T, Akimoto K, James MJ. Dietary (*n*-9) eicosatrienoic acid from a cultured fungus inhibits leukotriene B4 synthesis in rats and the effect is modified by dietary linoleic acid. *J Nutr* 1996;126:1534-40.
- Lerner R, Lindstrom P, Berg A, Johansson E, Rosendahl K, Palmblad J. Development and characterization of essential fatty acid deficiency in human endothelial cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1147-51.
- Calder PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr Rev* 1998;56:S70-83.
- Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borma J, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* 2000;30:260-74.
- Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 1998;67:129-35.
- Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Mackley BE. Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids* 1998;33:125-30.
- Thies F, Miles EA, Neve-von-Caron G, Powell JR, Harst TL, Newsholme EN, et al. Influence of dietary supplementation with long-chain *n*-3 or *n*-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 2001;36: 1183-93.
- Calder PC, Zurier RB. Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:115-21.
- James MJ, Cleland LG. Dietary *n*-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27:85-97.
- Ziboh VA. The role of *n*-3 fatty acids in psoriasis. In: Kremer J, ed. *Medical fatty acids in inflammation*. Basel: Birkhauser Verlag 1998;45-53.
- Esteve-Comas M, Ramírez M, Fernández-Bañares F, Abad-Lacuz A, Gil A, Cabré E, et al. Plasma polyunsaturated fatty acids pattern in active inflammatory bowel disease. *Gut* 1992;33: 1365-9.
- Esteve-Comas M, Núñez MC, Fernández-Bañares F, Abad-Lacuz A, Gil A, Cabré E, et al. Abnormal plasma polyunsaturated fatty acid pattern in non-active inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34:1370-3.
- Belluzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996;334:1557-60.
- Lorenz-Meyer H, Bauer P, Nicolay C, Schulz B, Purrmann J, Fleigg WE, et al. Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:778-85.
- Gassull MA, Cabré E. The role of nutrition in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: Rutgeerts P, Colombel J-F, Hanauer S, Schölmerich J, Tytgat GN, Van Gossum A, eds. *Falk Symposium 106: Advances in Inflammatory Bowel Disease*. London: Kluwer Academic, 1999;80-88.
- González-Huix F, de León R, Fernández-Bañares F, Esteve M, Cabré E, Acero D, et al. Polymeric enteral diets as primary treatment of active Crohn's disease: a prospective steroid controlled trial. *Gut* 1993;37:778-82.
- Gasull MA, Fernández-Bañares F, Cabré E, Papo M, Gaffier MH, Sánchez-Lombrana JL, et al. Fat composition may be a clue to ex-

- plain the primary therapeutic effect of enteral nutrition in Crohn's disease: results of a double blind randomised multicentre. *European trial*. *Gut* 2002;51:164-8.
28. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002;87:S31-48.
29. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107:3569-77.
30. Ansari B, Hall PA. The kinetic organization of tissues. En: Hall PA, Levison DA, Wright NA, editors. *The assessment of cell proliferation in clinical practice*. Berlin: Springer Verlag, 1992.
31. Wyllie AH. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res* 1985;5:131-6.
32. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res* 1996;2: 199-206.
33. Bartram H-P, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao CV, Dusel G, et al. Effect of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids, and prostaglandin E₂ release in healthy subjects. *Gastroenterology* 1993;105: 1317-22.
34. Latham P, Lund EJ, Johnson IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis* 1999;20:645-50.
35. Calviello G, Palozza P, Maggiano N, Franceschelli P, Di Nicuolo F, Marconi ME, et al. Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acids dietary supplementation on cell proliferation and apoptosis in rat colonic mucosa. *Lipids* 1999;34:599-604.
36. Chang WL, Chapkin RS, Lupton JR. Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. *J Nutr* 1998;128:491-7.
37. Bartoli R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, Álvarez M, et al. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachinoid acid metabolism and local prostaglandin E₂ synthesis. *Gut* 2000;46: 191-9.
38. Takahashi M, Fukutake M, Isoi T, Fukuda K, Sato H, Yazawa K, et al. Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinoma development by a fish oil component, docosahexaenoic acid (DHA). *Carcinogenesis* 1997;18:1337-42.
39. Llor X, Pons E, Roca A, Álvarez M, Mané J, Fernández-Banases F, et al. The effects of fish oil, olive oil, oleic and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr* 2003;22 [en prensa].
40. Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2001;19:1255-62.
41. Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid, a major constituent of fish oil diets, prevents activation of cyclin-dependent kinases and S-phase entry by serum stimulation in HT-29 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;64:67-73.
42. Reddy BS, Maeura Y. Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:745-50.
43. Zock PL, Katan MB. Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1998;198:142-53.
44. Howe GR, Aronson KJ, Benito E, et al. The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control* 1997;8:215-28.
45. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz G, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;323:1664-72.
46. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994;54:2390-97.
47. Goldbohm RA, Van den Brandt PA, Van't Veer P, Brants HAM, Dorant E, Sturmans F, et al. A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer. *Cancer Res* 1994;54:718-23.
48. Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, Kuhara T, Asamoto M, Kunitomo T, et al. Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Int J Cancer* 1997;73:607-12.
49. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on *ras*-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res* 1997;57:253-8.
50. Reddy BS. Dietary lipids and colon cancer. In: Spiller GA, editors. *Handbook of Lipids in Human Nutrition*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1996;129-34.
51. Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1991;51:487-91.
52. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
53. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7-33.
54. Esteve J, Kricke A, Parkin DM. Facts and figures of colon cancer in the European Community. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993.
55. Tominaga S, Aoki K, Fujimoto I, Kurihara M. Cancer mortality and morbidity statistics: Japan and the world. Boca Raton, FL: CRC press, 1994.
56. Ji BT, Devesa SS, Chow WH, Jin F, Gao YT. Colorectal cancer incidence trends by subsite in urban Shanghai, 1972-1994. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:661-6.
57. McMichael AJ, Giles GG. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res* 1988; 48:751-6.
58. Kim Y-I. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000;118:1235-57.
59. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;717-35.
60. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993;14:499-545.
61. AICR. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Panel on food. Nutrition and the prevention of cancer: American Institute for Cancer Research, 1997;216-251.
62. Caygill CP, Charlett A, Hill MJ. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer* 1996;74:159-64.
63. Hursting SD, Thornquist M, Henderson MM. Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites. *Prev Med* 1990;19: 242-53.
64. Rao CV, Hirose Y, Indranie C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res* 2001;61:1927-33.
65. Reddy BS, Sugie S. Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res* 1988;48:6642-7.
66. Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Takada H, Yamanara M, Hioki K, et al. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1988;48:4790-4.
67. McDowell MA, Briefel RR, Alaimo K, Bischof AM, Caughman CR, Carroll MD, et al. Energy and macronutrient intakes of persons ages 2 months and over in the United States: Third National Health and Nutrition Examination Survey, Phase 1, 1988-91. *Adv Data* 1994;1-24.
68. Gregory J, Foster K, Tyler H, Wiseman M. The dietary and nutritional survey of British adults. A survey of dietary behavior, nutritional status and blood pressure of adults aged 16 to 64 living in Great Britain. En: *Surveys of OOPCa*, editor. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food and the Department of Health, 1990.
69. Health MO. Resultaten van de voedselconsumptiepeiling. (The Second Dutch National Food Consumption Survey, 1992). En: Ministry of Health W, and Sports. Ministry of Agriculture, Nature Management, and Fisheries, editor. Zoet Nederland, 1992: The Hague: Dutch Bureau for Nutrition Education, 1993.
70. Weissburger JH. Causes, relevant mechanisms, and prevention of large bowel cancer. *Semin Oncol* 1991;18:316-36.
71. Trichopoulos A, Vasilopoulou E. Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* 2000;84:S205-9.
72. Cruz JA. Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe-Southern Europe. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:S9-35.