



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Farmàcia  
Departament de Fisiologia

# **EFFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO EN RATAS**

**CAROLINA RAMÍREZ SANTANA  
2008**

# DISCUSIÓN



La respuesta inmunitaria en neonatos de mamíferos -hombre, rata, entre otros- es limitada, menos competente y funcionalmente deficiente; y es durante las primeras etapas de vida cuando se inicia y se adquiere, de forma gradual, la capacidad de respuesta inmunitaria propia del animal adulto. Esta situación determina una elevada sensibilidad del neonato frente a agentes infecciosos, lo que se atribuye principalmente a dos factores: la falta de memoria inmunológica preexistente en el recién nacido y el reducido número de células inmunitarias presentes en los tejidos linfoides del neonato en estas primeras etapas (Adkins, 1999; Piguet *et al.*, 1981).

El estado de inmadurez no es exclusivo del sistema inmunitario sistémico, puesto que la funcionalidad del tejido linfoide asociado a las mucosas no se desarrolla completamente hasta después del nacimiento (Parrot *et al.*, 1990). En este sentido, nuestros estudios previos realizados en rata demuestran un incremento progresivo en la concentración sérica de Ig desde el nacimiento y durante el período de lactancia (Pérez-Cano, *et al.*, 2007). A nivel intestinal, la producción de IgM por parte de células de la lámina propia no se inicia hasta la segunda semana tras el nacimiento y la secreción de IgA intestinal se inicia posteriormente y no alcanza los valores propios del adulto hasta después del destete (Pérez-Cano *et al.*, 2005b). Por tanto, es durante las primeras etapas de vida, cuando los neonatos se exponen por primera vez a una gran multitud de microorganismos y Ag procedentes de la dieta, hecho que interviene en el desarrollo del sistema inmunitario intestinal y sistémico (Brandtzaeg, 2003).

En el caso de roedores como rata y ratón, a pesar que el período de lactancia tiene una duración de tres semanas, a partir de los 14 días de edad ya compaginan la ingesta de leche materna con dieta sólida y, por tanto, la activación antigénica de su sistema inmunitario está considerablemente incrementada en esta etapa (Savage, 1997, Hennning *et al.*, 1981). Es indiscutible, que la leche materna supone la forma de alimentación idónea para el recién nacido. Además, desde el punto de vista inmunológico, la leche materna no es únicamente un vehículo de Ag sino que aporta una gran variedad de factores bioactivos que confieren protección al neonato y estimulan y regulan el desarrollo del sistema inmunitario neonatal (Hamosh, 2001). En este sentido, y sin olvidar la actividad biológica que ejercen un gran número de proteínas presentes en leche materna -IgA, lactoferrina, citocinas, entre otras-, hay que destacar la función atribuida a determinados AG en el desarrollo del sistema inmunitario del neonato. Concretamente, se ha sugerido que los AGPI -DHA y AA- que se hallan en muy baja proporción respecto al total de AG presentes en leche materna, participan en el desarrollo del sistema inmunitario neonatal (Field, *et al.*, 2001). De hecho, se conoce ampliamente la gran capacidad de regulación de los lípidos en procesos metabólicos, así como en la expresión génica de proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria, tales como determinadas enzimas y citocinas (Enke *et al.*, 2008).

Diversos estudios sugieren que el ácido linoleico conjugado (CLA) posee, además de numerosos efectos beneficiosos sobre el organismo, propiedades inmunomoduladoras (Jenssen & Lammi-Keefe, 2001; Pariza *et al.*, 2001). De los distintos isómeros de CLA existentes, *cis9,trans11* (*c9,t11*) y *trans10,cis12* (*t10,c12*) son los predominantes en alimentos de consumo diario y, por tanto, los mayoritarios en las mezclas isoméricas utilizadas en los estudios experimentales llevados a cabo hasta el momento. Así, en animales de experimentación se ha evaluado el efecto sobre la función inmunitaria de mezclas de ambos isómeros de CLA en una proporción 50:50 (*c9,t11* y *t10,c12*) y a dosis comprendidas entre 0,1 y 2% de la dieta (p/p) (revisado en Moloney *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estudios con CLA se han llevado a cabo en animales adultos, y por tanto no se dispone de resultados concluyentes al respecto en etapas tempranas de vida, tanto en animales de experimentación como en humanos. Además del reducido número de estudios en animales lactantes o jóvenes, éstos se han centrado en evaluar el efecto de CLA sobre la composición y crecimiento corporal (Akahoshi *et al.*, 2002; Chardigny *et al.*, 2003), y ninguno de ellos ha analizado la influencia de CLA en el desarrollo del sistema inmunitario.

Recientemente, los avances tecnológicos han permitido disponer de isómeros puros (95%) de CLA o de mezclas isoméricas ricas en uno de ellos, para llevar a cabo nuevos estudios. Los resultados obtenidos sugieren que cada isómero de CLA ejerce efectos biológicos distintos y, por consiguiente, los efectos obtenidos dependen de la proporción isomérica utilizada (Pariza *et al.*, 2001). Dado que el isómero de CLA *c9,t11* es el mayoritario en leche materna –constituyendo entre el 83 y 100% de los isómeros presentes de CLA- (McGuire *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2007), en el presente estudio se ha optado por utilizar una mezcla isomérica 80:20 de *c9,t11* y *t10,c12* de CLA.

En base a las consideraciones anteriormente mencionadas, este estudio se plantea a partir de la hipótesis que el suplemento dietético con una mezcla isomérica de CLA -rica en el isómero *cis9,trans11*- durante las primeras etapas de vida puede contribuir a la maduración del sistema inmunitario. Para demostrar esta hipótesis se ha planteado un diseño experimental exhaustivo, dividido en tres fases, correspondientes a las tres edades en las cuales se ha evaluado la respuesta inmunitaria tras el aporte dietético de CLA: al final del periodo de lactancia (21 días de edad, diseño 1), en la infancia -una semana tras el destete- (28 días de edad, diseño 2) y en la edad adulta (15 semanas de edad, diseño 3).

Dado que en estudios previos realizados en un modelo porcino, se había demostrado que el suplemento dietético con CLA en etapas tempranas de la vida ejercía una mayor influencia en la evolución de determinadas enfermedades en etapas posteriores de desarrollo (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004); en el presente estudio, el aporte de CLA ya se

inició durante el período de gestación, a través de madres gestantes que recibieron CLA incorporado en el pienso. Para éste y otros grupos de estudio, se requirió elaborar un pienso especial con un 1% de CLA 80:20 (c9,t11 y t10,c12), el cual se obtuvo por fabricación propia en el Servei de Desenvolupament de Medicaments, de la Facultat de Farmàcia, de la Universitat de Barcelona.

En relación al diseño experimental, a continuación se describen brevemente las tres fases de estudio utilizando un sistema de codificación uniforme para identificar los distintos grupos experimentales, con el fin de facilitar su seguimiento a lo largo de la discusión. Los códigos correspondientes a los diferentes grupos de estudio no coinciden con los utilizados en los distintos artículos, debido a requerimientos específicos de cada revista científica y a modificaciones sugeridas por los propios revisores. El código de grupo indica la edad de los animales (expresado en días) en la cual se ha evaluado la respuesta inmunitaria, seguida del período de tiempo (expresado en semanas) durante el cual han recibido suplemento dietético con CLA.

El primer diseño experimental, en el cual el efecto de CLA se evaluó en animales de 21 días de edad -al final del período de lactancia-, incluyó 4 grupos experimentales: tres grupos que recibieron CLA y un grupo alimentado con dieta estándar que constituyó el grupo referencia (21/Ref). Los dos primeros grupos recibieron CLA durante un período total de 5 semanas; las 2 primeras durante la gestación -por vía transplacentaria- a través de las madres que recibieron suplemento de CLA incorporado en el pienso, y las 3 semanas siguientes correspondientes al período de lactancia. Durante la lactancia, el grupo 21/5 recibió el CLA a través de la leche materna procedente de madres que continuaban consumiendo pienso suplementado con CLA. En cambio, el grupo 21/5', recibió CLA por administración directa mediante sonda oral. Por último, el tercer grupo recibió CLA por administración directa a través de sonda oral, únicamente durante las 3 semanas de lactancia (21/3).

El segundo diseño experimental, en el que se evaluó el efecto de CLA en animales de 28 días de edad -período de infancia-, también incluyó 4 grupos: tres grupos que recibieron CLA y un grupo que no recibió suplemento, constituyendo el grupo referencia (28/Ref). Los dos primeros grupos recibieron CLA durante las 3 semanas de lactancia mediante sonda oral. Durante la semana posterior al destete, uno de ellos consumió pienso suplementado con CLA (28/4), y otro pienso estándar (28/3). Por último, se dispuso de un tercer grupo que únicamente recibió suplemento con CLA -incorporado en pienso- durante la semana post-destete (28/1).

En el tercer diseño experimental se evaluó el efecto del suplemento dietético con CLA en animales de 15 semanas -edad adulta-. Se dispuso de un grupo experimental que recibió

CLA durante 17 semanas (Ad/17): las 2 primeras durante la gestación -por vía transplacentaria- a través de madres que consumieron CLA incorporado en pienso, las 3 semanas siguientes a través de la leche materna y, tras el destete, por consumo de pienso suplementado con CLA (12 semanas). Paralelamente se dispuso de un grupo de referencia que no recibió suplemento dietético (Ad/Ref). A las 9 semanas de edad, los animales de ambos grupos fueron inmunizados con OVA y 6 semanas después se evaluó la respuesta inmunitaria.

Como se detalla en el apartado correspondiente a objetivos, el primer y segundo objetivo específicos del presente trabajo han consistido en evaluar el efecto de CLA en las primeras etapas de vida, concretamente en animales de 21 y 28 días de edad. Dado que algunos de los efectos demostrados son paralelos en ambas edades, la discusión de los resultados correspondientes a los dos primeros diseños se ha realizado de forma conjunta.

Inicialmente, y en relación a la vía utilizada para el aporte de CLA, uno de los primeros hitos planteados consistió en demostrar la llegada de los isómeros *c9,t11* y *t10,c12* de CLA a las crías, a través de la vía transplacentaria, de la leche materna, o directamente vía oral; y, en la etapa post-destete, a través del consumo de pienso suplementado con CLA. Para ello, en primer lugar, se confirmó la estabilidad de ambos isómeros de CLA en el pienso elaborado. En segundo lugar, se demostró que la leche de madres que habían consumido pienso suplementado con CLA -durante las dos últimas semanas de gestación y a lo largo del período de lactancia- presentaba un mayor contenido de los isómeros *c9,t11* y *t10,c12* que madres alimentadas con dieta estándar. Estos resultados confirman que el CLA de la dieta se incorpora en la leche materna, aunque la proporción de ambos isómeros en leche (86:14) es ligeramente distinta a la de la mezcla isomérica utilizada como suplemento. Por último, destacar que ambos isómeros de CLA *c9,t11* y *t10,c12* fueron detectados en el plasma de todos los animales que recibieron dicho suplemento por una o varias de las vías utilizadas en este estudio.

En relación a la transferencia de CLA de las madres gestantes a las crías, cabe señalar que el presente estudio no permite demostrar el paso de CLA por vía transplacentaria, dado que no se obtuvieron muestras sanguíneas de los animales recién nacidos. No obstante, Chin *et al.*, (1994a) demostraron un incremento considerable de CLA respecto al grupo referencia, en el hígado de fetos a los 20 días de gestación, cuyas madres habían ingerido una dieta de CLA al 0,5% durante este período. Además, nuestros resultados muestran que el contenido plasmático de CLA *c9,t11* y *t10,c12* en los grupos que recibieron dicho suplemento durante la gestación y lactancia (21/5 y 21/5') es de aproximadamente entre 1,5 y 2 veces superior al de animales que únicamente recibieron CLA durante la lactancia

(21/3). Estas evidencias de forma conjunta permiten sugerir la vía transplacentaria como vía de transferencia de CLA entre la madre y el feto.

Respecto a la vía de suplementación, el grupo que recibió CLA durante la gestación y lactancia por vía oral (21/5') presentó niveles plasmáticos superiores de ambos isómeros en relación a los del grupo que recibió CLA durante la gestación y lactancia, pero en este caso a través de la leche materna (21/5) y, por tanto durante el mismo período de tiempo. Esta diferencia podría ser debida a que las madres que recibieron CLA durante la gestación incorporaran este AG en sus tejidos, de forma que durante la lactancia, a pesar de no recibir CLA, pudieran transferir ambos isómeros a través de la leche materna a las crías; lo cual supondría un suplemento de CLA adicional al administrado directamente por vía oral.

Tras confirmar por una parte, que las madres gestantes/lactantes que reciben CLA incorporan dicho AG a la leche y por otra, los elevados niveles de CLA en ratas lactantes que recibieron CLA exclusivamente durante la lactancia (21/3 y 28/3), sin duda se puede asegurar que existe transferencia de CLA a las ratas lactantes a través de la leche materna.

Además, la presencia de niveles plasmáticos de CLA en aquellos animales a los que el aporte de CLA se inició tras el nacimiento (grupos 21/3, 28/4, 28/3 y 28/1) demuestra la absorción intestinal de CLA en edades tempranas, hecho que concuerda con los resultados obtenidos para otros AGPI en diseños experimentales similares (Kelley & Erickson, 2003; Yamasaki et al., 2003).

Otro aspecto a considerar es la duración y continuidad del aporte de CLA hasta el momento en que se evalúa la respuesta inmunitaria del animal. En este sentido, los grupos que recibieron CLA durante un período de tiempo más prolongado presentaron mayor contenido de CLA en plasma, tanto en el primer diseño (21/5 y 21/5' > 21/3), como en el segundo (28/4 > 28/3 y 28/1). Sin embargo, la continuidad también es importante, puesto que el grupo que recibió CLA durante la lactancia y dejó de recibirlo durante la semana post-destete (28/3) mostró un contenido de CLA en plasma inferior al del grupo que únicamente recibió CLA esta última semana (28/1). Durante el periodo en que cesa el aporte de CLA es posible que éste pueda incorporarse en tejidos, ser metabolizado o eliminado, por lo cual su contenido en tejidos y heces debería ser cuantificado en estudios posteriores. En definitiva, estos resultados indican que el tiempo transcurrido entre la última toma de CLA y el día de obtención de plasma para cuantificar su contenido es decisivo.

A pesar de haber utilizado siempre una mezcla de isómeros 80:20 de *c9,t11* y *t10,c12* de CLA, esta proporción no se ha mantenido en el plasma de las crías de ninguno de los 6 grupos que recibieron dicho suplemento, siendo del orden de ~90:10 tanto en ratas de 21 y 28 días de edad. Este hecho puede deberse a diversos factores que puedan afectar de forma diferente a ambos isómeros. Un primer factor implicado en el descenso proporcional del isómero *t10,c12* en plasma con respecto al inicial pudo haber sido por un proceso de metabolización más rápido para éste isómero que para el *c9,t11*. En este sentido, se ha descrito en rata que el isómero *t10,c12* de CLA es más eficaz en la activación del sistema de  $\beta$ -oxidación, pudiendo influir en su propio metabolismo (Bowen & Clandinin, 2005). Por otra parte, y a pesar que se ha descrito que ambos isómeros presentan una tasa de absorción intestinal similar en rata adulta (Novelli *et al.*, 2007), no se descarta la posibilidad que el intestino de roedores más jóvenes presente una absorción preferente del isómero *c9,t11* frente a *t10,c12*. Además es importante comentar que, a pesar de no haber hallado el isómero *t10,c12* de CLA en plasma de ratas alimentadas con dieta estándar, si que se ha detectado el isómero *c9,t11* en pequeñas cantidades, lo cual apoya la producción endógena de este isómero mostrada en otros estudios (Porsgaard *et al.*, 2006). El contenido basal de CLA *c9,t11* en animales jóvenes podría justificar la mayor proporción relativa de *c9,t11/t10,c12* presente en plasma de ratas que la del suplemento administrado. Finalmente, existen estudios que muestran que el CLA *c9,t11* se incorpora y acumula en mayor extensión que el *t10,c12* en los fosfolípidos del tejido hepático (Macarulla *et al.*, 2005), de la piel y de los huesos de animales de experimentación (Kavanaugh *et al.*, 1999). Estos datos permiten postular que el CLA y en mayor medida el isómero *c9,t11*, incorporado en las membranas de células y tejidos, y no los isómeros libres en plasma, es el que produce los efectos sobre el sistema inmunitario. Esta hipótesis se halla apoyada por el hecho que los efectos de CLA sobre el sistema inmunitario únicamente se observan en aquellos grupos de animales que han recibido CLA con varias semanas de antelación a la evaluación del efecto (21/5, 21/5' y 28/4, 28/3, pero no 21/3 y 28/1).

Los efectos atribuidos a CLA, y concretamente al isómero *t10,c12*, sobre la composición y distribución de grasa corporal justifican que en el presente estudio se haya realizado el seguimiento del peso corporal de los animales que recibieron CLA. En relación a las madres gestantes y lactantes, el suplemento dietético con 1% de CLA *c9,t11* y *t10,c12* (80:20) no modificó su peso corporal ni la ingesta de pienso, lo cual concuerda con otros estudios de madres que recibieron diferentes mezclas isoméricas de CLA durante la gestación y lactancia (Hayashi *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 1994a; Ringseis *et al.*, 2004). Sin embargo, CLA produjo cambios en los neonatos a lo largo del período de suplementación. Concretamente, los animales recién nacidos de madres que habían recibido CLA presentaban valores inferiores de peso corporal, índice de masa corporal

(IMC) e índice de Lee, en relación a los neonatos de madres alimentadas con dieta estándar. Por tanto, la influencia del suplemento con CLA sobre el peso corporal de las crías fue ya evidente durante la gestación y posiblemente debido a la capacidad reductora de grasa corporal ejercida por el isómero *t10,c12* (Park & Pariza *et al.*, 2007; Terpstra, 2004). Sin embargo, la curva ponderal de los animales que recibieron CLA -por vía transplacentaria- se normalizó a lo largo de la lactancia, no existiendo diferencias entre grupos al final de este período (21 días de edad). A esta edad, los resultados obtenidos ya coinciden con los de otros estudios realizados en rata con una mezcla isomérica de CLA 50:50, durante el mismo periodo de vida (Hayashi *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 1994a; Ringseis *et al.*, 2004). Sin embargo, Chin *et al.*, (1994a) describieron un aumento acentuado del peso corporal en neonatos tras el aporte de CLA durante la gestación y lactancia; resultados que concuerdan con los del presente estudio en ratas de 28 días de edad que recibieron CLA durante 3 o 4 semanas. Si bien estos resultados obtenidos con la mezcla isomérica de CLA 80:20 parecen ser contradictorios con los anteriores, están en línea con estudios realizados en roedores que sugieren un efecto potenciador del crecimiento asociado al isómero de CLA *c9,t11*. (Pariza *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003). Ahora bien, a pesar del incremento en peso corporal observado en ratas de 28 días que habían recibido suplemento con CLA, no se observaron cambios en las otras variables morfométricas estudiadas (IMC o índice de Lee), las cuales fueron comparables a las descritas en ratas de edad similar sin intervención dietética (Novelli *et al.*, 2007).

A pesar de que en algunos estudios se han descrito efectos adversos en animales de experimentación asociados al suplemento con mezclas isoméricas de CLA (Ringseis *et al.*, 2004), en el presente estudio no se han detectado en ningún caso alteraciones -en el comportamiento animal ni en el aspecto macroscópico de los órganos internos- que permitan sugerir de toxicidad asociada al suplemento con CLA. La ausencia de toxicidad asociada al aporte dietético de CLA se ha demostrado en estudios realizados en animales de experimentación (Hayashi *et al.*, 2007; Chin *et al.*, 1994a; Scimeca, 1998; Park *et al.*, 2005), aún cuando el CLA representara el 5% de la dieta en animales, (Scimeca, 1998) y en humanos, a la dosis máxima de 6 g/día de CLA (Pariza, 2004). Por otra parte, estudios realizados con isómeros puros de CLA adicionados a la dieta de animales, sugieren que los efectos adversos atribuidos al CLA podrían deberse al isómero *t10,c12* (Yamasaki *et al.*, 2005), el cual es minoritario en la mezcla isomérica utilizada en el presente estudio. Con el fin de establecer la influencia del suplemento dietético con CLA sobre el desarrollo del sistema inmunitario en rata, uno de los hitos principales del presente estudio ha sido evaluar la capacidad de respuesta inmunitaria humoral en animales de 21 y de 28 días de edad que habían recibido CLA. Diversos estudios muestran un aumento de la producción de Ig séricas tras una dieta rica en CLA, ya sea en animales adultos (Tsuzuki & Ikeda, 2007; Bowen & Clandinin, 2005) o en humanos (Song *et al.*,

2005, Turpeinen *et al.*, 2008). Los efectos descritos en animal adulto no son tan consistentes en animales jóvenes, llegando a ser incluso contradictorios. En este sentido, Sugano *et al.* (1998) describieron un aumento de niveles séricos de IgA, IgG e IgM en ratas de 7 semanas de edad que recibieron CLA al 1% (mezcla 50:50). Por el contrario, Yamasaki *et al.* (2000) no encontraron cambios significativos en la concentración sérica de IgA, IgG o IgM en ratas de 5 semanas de edad que recibieron suplemento de CLA (50:50) a dosis comprendidas entre 0,05 y 0,5 % durante 3 semanas. Por tanto, en base a nuestra hipótesis de trabajo y a la escasa y contradictoria información disponible, uno de los objetivos de este estudio ha sido establecer el posible efecto inmunopotenciador del suplemento dietético con CLA a la proporción 80:20 de *c9,t11* y *t10,c12*. Concretamente, se ha evaluado la respuesta inmunitaria humoral en ratas de 21 días (al final de la lactancia) y de 28 días de edad (infancia), mediante la cuantificación de los niveles de Ig *in vivo* -en suero-, o *in vitro* -secretadas por esplenocitos-.

Los resultados obtenidos correspondientes a los dos primeros diseños experimentales -dos compartimentos y edades distintas- demuestran que el suplemento dietético con CLA favorece la producción de Ig. *In vivo* se han cuantificado -en animales de 21 y 28 días de edad- las concentraciones séricas de Ig de isotipo IgG, IgM e IgA, las cuales son inferiores a las presentes en edad adulta (Pérez-Cano *et al.*, 2007). En general, el suplemento con CLA incrementa la concentración sérica de Ig totales en ambas edades. Concretamente, el suplemento con CLA -durante los períodos de gestación y lactancia a través de la madre (21/5)- incrementa la concentración de Ig (5-7 veces) en ratas de 21 días. Este efecto es debido al incremento en la producción de IgG, ya que no modifica de forma sustancial IgM e incluso reduce la concentración del isotipo minoritario IgA. Por otra parte, a los 28 días de edad, en respuesta al suplemento con CLA durante los períodos de lactancia y primera infancia (28/4), también se observa un incremento en la concentración sérica de Ig de isotipo IgG, IgM e IgA. Un efecto similar se observa cuando el suplemento con CLA se restringe al período de lactancia (28/3). En relación a la producción esplénica *in vitro* de Ig, en animales de 21 días, se observa un incremento del isotipo mayoritario IgM en respuesta al suplemento dietético durante los períodos de gestación y lactancia (21/5 y 21/5'). De forma paralela, en animales de 28 días, el suplemento dietético con CLA durante el período de lactancia (28/3) aumenta la producción esplénica de Ig de isotipo IgM e IgG. De forma global se observa que el efecto potenciador sobre la respuesta en Ac se correlaciona directamente con el inicio y duración del período de aporte dietético con CLA. Así, el incremento en la producción de Ac -asociado a CLA- a los 21 días de edad requiere el aporte de dicho suplemento durante los períodos de gestación y lactancia de forma continuada (5 semanas), ya que este efecto no se observa cuando el suplemento se restringe al período de lactancia (3 semanas). En animales de 28 días, el incremento de Ig requiere que el aporte de CLA se inicie tras el nacimiento y durante el período de lactancia, ya que dicho aumento no se

observa cuando el suplemento se inicia en el período post-destete (28/1). Además de la duración, la dosis de CLA utilizada en este estudio parece ser apropiada, ya que en estudios realizados con dosis de CLA inferiores no se observan efectos a nivel sérico (Yamasaki *et al.*, 2000).

Por otra parte, los resultados correspondientes a las Ig presentes en suero de animales al final del período de lactancia, ponen de manifiesto la importante función inmunomoduladora de la leche materna (Hosea-Blewett *et al.*, 2008). Como se ha comentado anteriormente, las ratas que recibieron CLA a través de la leche materna (grupo 21/5) presentaron niveles de CLA plasmático inferiores a los del grupo 21/5', en el cual CLA se administró directamente por vía oral. A pesar de ello, el grupo 21/5 ha sido el único en que CLA ha mostrado un efecto inmunopotenciador sobre la producción de Ac séricos. Ello podría ser debido en parte, a la mayor incorporación tisular de CLA cuando éste se halla en la matriz láctea. De todas formas, nuestros resultados muestran que la leche de rata no sólo transfiere CLA a las crías, sino también Ig, como IgG, IgA e IgM. En este sentido, las madres alimentadas con dieta estándar presentan un patrón descendente de IgG, IgA e IgM, acorde con el patrón de Ig descrito en leche de rata (Dahlgren *et al.*, 1986). Este mismo patrón se observa en leche de madres que recibieron suplemento de CLA; sin embargo, su contenido en IgG e IgA es muy superior al de aquellas alimentadas con dieta estándar (6 y 2 veces, respectivamente). Por lo tanto, la transferencia a través de la leche materna -de las madres a las crías- de CLA y de cantidades importantes de Ig maternas podrían ser los factores principales responsables de la elevada concentración sérica de Ac en animales del grupo 21/5.

En relación a la producción esplénica *in vitro* de Ig, los resultados obtenidos en animales de 21 y 28 días de edad demuestran que el suplemento continuado con CLA incrementa la producción de IgM, isotipo mayoritario en etapas tempranas de la vida. Estos resultados complementan los descritos por Sugano *et al.* (1998, 2001) y Yamasaki *et al.* (2000) en etapas posteriores de desarrollo del sistema inmunitario, tras el suplemento con la mezcla isomérica 50:50 de CLA. Algunos autores han realizado estudios *in vitro* tras la ingesta de ambos isómeros puros por separado. Concretamente, el suplemento con el isómero *t10,c12* en ratones viejos (Yamasaki *et al.*, 2003) y el de CLA *t10,c12* o *c9,t11* - por separado- en ratas obesas Zucker mostró un efecto estimulador del sistema inmunitario (Yamasaki *et al.*, 2003; Ruth *et al.*, 2008).

Los resultados relativos al incremento de la concentración de Ig séricas y secretadas por esplenocitos *in vitro*, considerados de forma global, demuestran el efecto inmunopotenciador de CLA en la respuesta inmunitaria humoral en las diversas etapas tempranas de vida estudiadas.

Sin embargo, a pesar del efecto estimulador de la producción de Ac, demostrado en el presente estudio, cabe destacar la disminución de IgA sérica asociada al aporte de CLA. Dicho efecto únicamente se ha observado en animales de 21 días de edad que recibieron CLA durante la gestación y lactancia a través de la leche materna (21/5). En este sentido, Yamasaki *et al.* (2000) también describieron una ligera reducción de la concentración sérica de IgA –no significativa- tras la administración de CLA 50:50 al 0,5%. Además, los estudios realizados por Turpeinen *et al.* (2008) en individuos alérgicos al polen que reciben CLA durante 12 semanas, con un contenido de *c9,t11* del 63,5%, muestran también una reducción de IgA. Esta disminución de IgA sérica podría ser debida a un efecto más específico del isómero *c9,t11*. Ahora bien, considerando que IgA es la Ig predominante en la superficie intestinal (80-90%) y que las células plasmáticas productoras de IgA migran continuamente hacia la mucosa intestinal (Brandtzaeg & Johansen, 2005), el descenso de IgA sérica no debe ser interpretado como un efecto adverso. Éste podría ir asociado a un incremento de IgA en otros compartimentos, como las mucosas. Por esta razón, este estudio ha centrado también su atención en la mucosa intestinal, analizando la expresión génica de IgA, TGF $\beta$  -posible citocina reguladora- y PPAR $\gamma$  -posible mediador en el mecanismo de acción de CLA-.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una baja expresión génica de IgA en intestino delgado y colon, acompañado de niveles indetectables de IgA en lavado intestinal de animales de 21 días de edad. Este hallazgo complementa y muestra coherencia con resultados anteriores descritos por nuestro grupo en rata lactante (Pérez-Cano *et al.*, 2005b). Respecto al suplemento con CLA, éste no modificó la expresión génica de IgA en ninguno de los grupos estudiados, con independencia del período o duración de dicha suplementación. Sin embargo, en animales de 28 días edad, se observó un marcado aumento tanto de la expresión génica como de los niveles proteicos de IgA asociado a la suplementación con CLA. Este efecto inmunomodulador sobre la expresión génica de IgA, en intestino delgado y colon, únicamente se observó en el grupo que recibió CLA durante más tiempo, concretamente durante la lactancia e infancia (28/4). En este mismo grupo y en el que recibió CLA únicamente durante la lactancia (28/3), se observó en lavado intestinal una elevada concentración proteica de IgA. Actualmente se dispone de muy poca información relativa al efecto de CLA sobre la inmunidad mucosal y, previo a nuestro estudio, tan sólo puede mencionarse el realizado por Sugano *et al.* (1998), que muestra un incremento en la secreción *in vitro* de IgA por parte de MLN obtenidos de ratas de 7 semanas de edad tras consumir una mezcla isomérica 50:50 de CLA al 1%.

Dada la escasa literatura disponible al respecto, se desconoce el mecanismo de acción mediante el cual CLA incrementa la expresión y secreción de IgA en mucosas. Es por ello,

que se ha planteado analizar algunos de los mecanismos que podrían estar implicados en el incremento de IgA intestinal: disrupción del tejido intestinal, regulación de su secreción a través de TGF $\beta$ , o mediante interacción de CLA con el receptor agonista PPAR $\gamma$ .

En una primera fase, se descartó la existencia de disrupción intestinal como causa de la elevación proteica de IgA observada. La arquitectura tisular del intestino delgado y colon, procedente de animales de 21 o 28 días de edad que habían recibido CLA, mostraba un aspecto normal comparable al de animales referencia. De todas formas, en el caso de existir una alteración estructural del tejido, ésta no justificaría los elevados niveles de mRNA de IgA en ratas del grupo 28/4.

En una segunda fase se planteó la posibilidad de que el incremento de IgA -asociado a CLA- pudiera ser debido a la promoción del cambio de isotipo de IgM a IgA, proceso en el cual desempeña un importante papel la citocina reguladora TGF $\beta$  (Borsutzki *et al.*, 2004; Cerutti, 2008). Sin embargo, la expresión génica intestinal de TGF $\beta$  mostró, por una parte, un patrón similar -sin diferencias asociadas al tipo de tejido- en ratas de 21 y 28 días, lo que implica que el cambio en la dieta durante y posterior al destete no modifica sustancialmente la expresión de esta molécula reguladora a nivel intestinal. Por otra parte, los niveles de mRNA de TGF $\beta$  no se modificaron en ninguno de los seis grupos que recibieron CLA, ya fuese durante la gestación, lactancia y/o infancia. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar la influencia de CLA sobre TGF $\beta$ ; la cual podría tratarse de una regulación post-trascricional y/o traduccional. Estos mecanismos de regulación, parecen ser muy importantes en el caso de esta citocina ya que se ha descrito que los niveles de mRNA de TGF $\beta$  no se correlacionan directamente con la cantidad de proteína producida (Kim & Kagnoff, 1990). En este sentido, hubiera sido de gran ayuda disponer de los niveles proteicos de TGF $\beta$  en la mucosa intestinal de estos animales. De todas formas, cabe contemplar la posibilidad de que el incremento de IgA -asociado a CLA- pueda ser independiente del cambio de isotipo producido por TGF $\beta$ , el cual ha sido pero no está definido completamente (Tokuyama & Tokuyama, 1999).

Se han propuesto diversos mecanismos de acción mediante los cuales CLA podría ejercer efectos inmunomoduladores: un posible mecanismo sería PPAR $\gamma$ -dependiente y otro independiente (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002). Tomando como base esta premisa, se ha planteado el estudio del posible papel de PPAR $\gamma$  en el efecto potenciador de CLA sobre la IgA presente en mucosas. Concretamente, en este trabajo se describe por primera vez la expresión génica de PPAR $\gamma$  en intestino delgado y colon de animales en edades tempranas que han recibido una dieta rica en CLA.

Como fase preliminar, se evaluaron los niveles de expresión génica de PPAR $\gamma$  en intestino delgado y colon procedente de animales de 21 y 28 días de edad. Los resultados muestran que los niveles de expresión génica de PPAR $\gamma$  en animales alimentados con dieta estándar son similares en ambas edades. Sin embargo, se observan diferencias asociadas al tipo de tejido, siendo la expresión génica de PPAR $\gamma$  superior en intestino delgado que en colon. Estos resultados concuerdan con los descritos por Braissant et al. (1996) en ratas Sprague-Dawley adultas, que muestran niveles de mRNA de PPAR $\gamma$  superiores en intestino delgado que en colon; si bien difieren de otros en los cuales se muestra una mayor expresión de PPAR $\gamma$  en tejido colónico (Mansén *et al.*, 1996; Chawla *et al.*, 2001). De todas formas, la mayoría de estudios relativos a la acción del receptor intracelular PPAR $\gamma$  se han realizado en colon (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004; Dubuquoy *et al.*, 2006).

En relación a la influencia de CLA sobre PPAR $\gamma$ , los resultados muestran que los animales que recibieron suplemento de CLA presentan niveles de expresión de PPAR $\gamma$  superiores a aquellos no suplementados. Concretamente, este incremento se evidenció en colon de animales de 21 y 28 días de edad y fue proporcional a la dosis y duración de la suplementación: 21/5 y 21/5' > 21/3 > 21/Ref y 28/4 > 28/3 > 28/1 > 28/Ref. Por tanto, CLA modula la expresión de PPAR $\gamma$  en todos los grupos de estudio, incluso en aquellos que consumieron CLA durante únicamente una semana (28/1). Estos resultados concuerdan con los descritos en colon de cerdos y ratones tras el aporte dietético de CLA (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002; 2004; Bassaganya-Riera & Hontecillas, 2006; Hontecillas *et al.*, 2002), y apoyan los estudios de Takamura et al. (2001), que demuestran el incremento de expresión de PPAR $\gamma$  (2-3 veces) por parte de ligandos específicos naturales o sintéticos. Además, estudios realizados *in vitro* demuestran la capacidad de CLA para activar PPAR $\gamma$ , aunque este efecto parece ser específico del tipo celular y del isómero utilizado (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002).

Respecto a la posible relación directa entre el incremento de expresión génica de PPAR $\gamma$  y la de IgA, destacar que Ponferrada et al. (2007) han descrito recientemente que los agonistas de PPAR $\gamma$  son capaces de revertir la disminución de la producción de IgA en mucosa colónica inducida por estrés, e incluso incrementar su concentración basal. Ahora bien, para relacionar ambas moléculas debe considerarse que, aunque las isoformas PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2 se expresan en adipocitos, PPAR $\gamma$ 1 se expresa también en linfocitos T y B, monocitos, células dendríticas y células epiteliales (Padilla *et al.*, 2000; Nencioni *et al.*, 2002; Hontecillas & Bassaganya-Riera, 2003). Por esta razón, los efectos descritos sobre CLA e IgA en el presente estudio podrían ser debidos a la interacción de CLA con el receptor PPAR $\gamma$  presente en cualquiera de los tipos celulares anteriores.

Una posibilidad sería que CLA ejerciera un efecto directo sobre linfocitos B, puesto que al parecer, PPAR $\gamma$  actúa a través de la modulación de factores transcripcionales tales como el NF- $\kappa$ B, AP-1, y STAT1 (Dubuquoy *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2000), los cuales están involucrados en procesos de regulación de estos linfocitos. En este sentido, se ha descrito que CLA puede regular determinadas funciones linfocíticas efectoras por parte de éstos (Bassaganya-Riera *et al.*, 2001). Por otra parte, estudios recientes muestran una estrecha relación entre las interacciones intestino-microorganismos y la regulación de la expresión de PPAR $\gamma$  por células epiteliales presentes en tejido colónico (Kelly *et al.*, 2004), tejido en el cual hemos detectamos una *up-regulation* mediada por CLA. Para dicha potenciación se sugiere un mecanismo multifactorial que incluiría acciones agonistas mediadas por AGPI generados por la microbiota comensal (Kelly *et al.*, 2004) y el reconocimiento de LPS por parte del receptor TLR4 en células epiteliales activadas (Dubuquoy *et al.*, 2003). En este sentido, se podría sugerir cierta influencia por parte de CLA sobre los mecanismos naturales involucrados en la regulación de la homeostasis intestinal -a través del incremento de expresión de PPAR $\gamma$  a edades tempranas- que comportara un incremento de la producción de IgA intestinal. Por otra parte, existen estudios que demuestran la acción reguladora de PPAR $\gamma$  sobre el proceso de diferenciación epitelial (Chawla *et al.*, 2001). Así, CLA podría modular la entrada de Ag luminales, la capacidad directa de presentación antigénica e incluso la transmisión de Ag a las células dendríticas de la mucosa intestinal, hechos que también justificarían una mayor producción de IgA intestinal. Esta última hipótesis también está apoyada en el hecho que la expresión de moléculas en las células dendríticas está regulada por PPAR $\gamma$  mediante la regulación de la expresión de las moléculas co-estimuladoras (Nencioni *et al.*, 2002). En resumen, se requieren estudios adicionales dirigidos a esclarecer el proceso exacto por el cual CLA incrementa la IgA mucosal, y conocer si dicho proceso es o no dependiente de PPAR $\gamma$  y -en caso de ser independiente- investigar cual es su mecanismo preciso.

Para poder determinar la influencia del suplemento dietético con CLA sobre el desarrollo del sistema inmunitario en rata, en este estudio se ha planteado también evaluar la capacidad de respuesta inmunitaria celular en animales de 21 y 28 días de edad que habían recibido suplemento dietético con CLA.

Si bien existen resultados contradictorios, actualmente está ampliamente aceptada la idea que muchos AGPI, incluyendo CLA, inhiben la capacidad de respuesta linfoproliferativa (Calder *et al.*, 2002; Yaqoob *et al.*, 2007). Esta inhibición por AGPI ha sido demostrada en linfocitos aislados de diversas especies animales (Otton *et al.*, 1998; Calder *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2008). En este sentido, en el presente estudio también se ha evaluado el efecto del aporte de CLA sobre la capacidad linfoproliferativa

esplénica, variable indicativa de la actividad linfocítica. En el primer diseño experimental -en el que se evaluó esta variable funcional al final del período de lactancia (día 21)- la tasa de proliferación, la viabilidad esplénica y la secreción de IL-2 no difirió entre grupos. Este hecho se atribuye, en parte, a la limitada capacidad proliferativa de los linfocitos esplénicos a esta edad, ya que se ha descrito que esta capacidad funcional en rata a edades tempranas es muy inferior a la del animal adulto (Pérez-Cano *et al.*, 2007). Dado que la citocina IL-2 juega un papel central en la respuesta inmunitaria celular, regulando la capacidad proliferativa, era de esperar que si CLA no modifica la proliferación linfocítica, tampoco induzca cambios en la secreción de IL-2. Sin embargo, en el segundo diseño experimental, cuando se analiza el efecto de CLA sobre la proliferación inducida por mitógeno en animales de 28 días, se observa una clara actividad inmunomoduladora.

Concretamente, el suplemento con CLA durante la lactancia y la infancia (28/4) o sólo durante la lactancia (28/3), mostró un efecto inhibitorio, que sólo fue significativo en el grupo que recibió CLA durante ambos períodos. En ambos casos, la disminución de la proliferación linfocítica no se acompañó de un descenso en la secreción de IL-2. Estos resultados son consistentes con la mayoría de estudios en animales y humanos, en los que CLA no modifica la secreción esplénica de IL-2 (Tricon *et al.*, 2004b; Albers *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2000; Kelley & Erickson, 2003; Yamasaki *et al.*, 2003).

Por otra parte, diferentes estudios muestran que una dieta rica en AGPI suprime la proliferación de linfocitos procedentes de MLN, conducto linfático y bazo de ratas, de bazo de ratón, de MLN de cerdo o de sangre periférica humana; y establecen una buena correlación entre la inhibición de la proliferación linfocítica y la disminución de IL-2 (Calder & Newsholme, 1992; Calder *et al.*, 1995; Calder, 1996; Calder *et al.*, 2002). Sin embargo, Calder y Newsholme, (1992) han demostrado que algunos AGPI, a pesar de inhibir la respuesta linfoproliferativa, no reducen la secreción de IL-2; lo cual es consistente con nuestros resultados. Dado que en el presente estudio, el suplemento con CLA no modifica la producción de IL-2, debe considerarse que la inhibición de la proliferación no es mediada por esta citocina, aunque sí quizás a través de sus receptores. En este sentido, numerosos estudios han descrito la modificación de los receptores de IL-2 por parte de los AGPI, específicamente modificando los *lipid rafts* (Yaqoob *et al.*, 1994; Schley *et al.*, 2007). CLA, aún con dobles enlaces *trans*, podría actuar modificando los componentes de los *lipid rafts*, de forma paralela a otros AGPI, evitando así la migración de receptores IL-2R $\alpha$  a la membrana celular donde tiene lugar la señalización de IL-2 y, en consecuencia, la activación y proliferación de linfocitos T (Yaqoob *et al.*, 1994; Marmor & Julius, 2001, Ferreri *et al.*, 2007). El mecanismo mediado por *lipid rafts* podría explicar la capacidad reguladora de la proliferación linfocítica por parte de CLA, independiente de la producción de IL-2. Otro posible mecanismo en el

control de la proliferación por parte del CLA, puede estar mediado por el receptor nuclear PPAR $\gamma$ , ya que Yang et al. (2000) mostraron que los ligandos de PPAR $\gamma$  inhiben la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T de sangre periférica tras estimular con PHA.

De todas formas, algunos estudios han descrito que una dieta rica en CLA no afecta la respuesta linfoproliferativa, ya sea tras la administración de isómeros puros de CLA a ratones de 8 semanas de edad durante 56 días (Kelley *et al.*, 2002), o en humanos, tras la ingesta de isómeros puros o mezclas isoméricas 50:50 y 80:20 de CLA (Park & Pariza, 2007). Una vez más, las condiciones de ensayo, particularmente la mezcla de isómeros utilizada, pueden ser la clave de las diferencias en el efecto de CLA entre distintos estudios.

En este trabajo, además de la capacidad proliferativa de los linfocitos esplénicos, también se ha analizado el perfil de citocinas que secretan. Concretamente, en animales de 21 días de edad, aunque no se hallaron efectos significativos en la producción esplénica de IL-4 ni de IL-10, los grupos que recibieron CLA durante la gestación y lactancia (21/5 y 21/5') mostraron una tendencia a presentar una mayor capacidad productora de estas citocinas que el grupo que recibió suplemento durante un período más corto (21/3) y el grupo referencia (21/Ref). En cambio, en animales de 28 días, la secreción de IL-4 e IL-10 fue relativamente similar en todos los grupos, y únicamente se observó una cierta tendencia potenciada en el grupo que recibió CLA durante 4 semanas (28/4). Respecto a estas citocinas, estudios recientes han demostrado una gran producción de IL-10 por parte de células dendríticas incubadas con CLA c9,t11 en respuesta al estímulo con LPS, lo cual se relaciona con las propiedades antiinflamatorias atribuidas a CLA (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004; Losher *et al.*, 2005; Bergamo *et al.*, 2008). Por tanto, es posible que CLA promueva la respuesta inmunitaria de tipo Th2 mediante el incremento de estas citocinas (IL-4 e IL-10). Dicha polarización de la respuesta podría explicar algunos de los efectos descritos en este estudio. Por una parte, los linfocitos Th2 son responsables de la respuesta inmunitaria mediada por Ac, la cual se halla incrementada *in vivo* e *in vitro* tras el suplemento dietético con CLA. Por otra parte, las células Th2 también participan en la inhibición de diversas funciones celulares, entre las cuales podría hallarse la proliferación linfocítica.

En estos mismos sobrenadantes de cultivo, también se cuantificó la citocina IL-6. La concentración de IL-6 correspondiente al grupo suplementado durante la lactancia e infancia (28/4) fue aproximadamente 6 veces superior a la de los grupos que recibieron CLA durante un menor período de tiempo, sólo durante la lactancia (28/3) o la infancia (28/1). Sin embargo, la producción de IL-6 fue indetectable en el grupo de animales

referencia. De nuevo, la IL-6 podría ser otro mediador importante en el efecto inmunopotenciador de CLA, ya que esta interleucina, además de poseer propiedades reguladoras de la proliferación y diferenciación de linfocitos T, actúa también como inductora de la secreción de Ig por parte de linfocitos B (Jones, 2005).

En resumen, los resultados obtenidos a partir de los dos primeros diseños experimentales, centrados en las primeras etapas de vida, ponen de manifiesto que el suplemento dietético con CLA favorece la capacidad defensiva de ratas Wistar en desarrollo. Este hecho se refleja principalmente en una mayor producción de Ac, la cual es más evidente cuanto más temprano es el inicio y más prolongado es el período de aporte de CLA. Por tanto, queda demostrado el potencial inmunomodulador del suplemento dietético con CLA (c9,t11 y t10,c12; 80:20) durante la gestación, lactancia y primera infancia.

En base a los resultados expuestos anteriormente y al estudio realizado por Bassaganya-Riera *et al.* (2004)-en el que demuestra el aporte de CLA en edades tempranas puede tener repercusiones positivas en la edad adulta- el presente estudio contempla un tercer diseño experimental. En éste, se evalúa el posible efecto inmunomodulador de CLA en rata adulta, tras recibir suplemento dietético durante un período total de 17 semanas, desde la gestación y de forma continuada hasta las 15 semanas de vida.

Dado que el aporte de CLA se llevó a cabo de forma continuada y durante un período de tiempo muy prolongado, se consideró evaluar si CLA modificaba el crecimiento corporal de los animales o si producía efectos adversos. Así, en línea con nuestros resultados en rata joven (21 y 28 días), la dieta con CLA durante 17 semanas no produjo ningún tipo de alteración anatómica a nivel macroscópico ni modificó el comportamiento de los animales. De nuevo destacar la importancia de la baja proporción del isómero t10,c12, sobre el que recaen las principales sospechas de toxicidad (Yamasaki *et al.*, 2005). En referencia a variables morfométricas, el aporte de CLA durante 17 semanas no modificó el IMC de los animales, el cual mostró valores característicos de ratas Wistar alimentadas con dieta estándar (Novelli *et al.*, 2007). Sin embargo, las hembras que consumieron una dieta rica en CLA mostraron una mayor efectividad nutricional, ya que éstas alcanzaron el peso corporal correspondiente a animal adulto (aproximadamente 250 g) dos semanas antes que las hembras del grupo alimentado con dieta estándar. Este efecto coincide con el descrito en otros estudios, en los cuales el isómero c9,t11 es el predominante en la mezcla de CLA utilizada (Pariza *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003), así como en nuestros resultados obtenidos en ratas de 28 días de edad.

En relación al posible efecto inmunomodulador de CLA, aunque el objetivo principal del estudio en rata adulta consistió en evaluar si el aporte prolongado de CLA al 1% era capaz de modular la respuesta inmunitaria Ag-específica, también se analizó la capacidad de generar una respuesta policlonal inducida por mitógeno. El análisis global en ambos tipos de respuesta permite asegurar que los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la inmunización Ag-específica son debidos exclusivamente al efecto de CLA sobre el mecanismo de respuesta inmunitaria específica y, por tanto, permiten descartar que los hallazgos observados se deban a un efecto general sobre el sistema inmunitario. Para conseguir ambos objetivos, se procedió a la inmunización de los animales a las 9 semanas de edad con OVA, y se evaluó ambos tipos de respuesta a las 15 semanas de edad, es decir 6 semanas tras la inmunización.

En primer lugar se estudió el posible efecto de CLA sobre la respuesta inmunitaria a nivel sistémico. Para ello, se evaluó la respuesta inmunitaria celular -mediante la capacidad linfoproliferativa esplénica- y la humoral -Ig totales en suero e *in vitro*-. En ambos casos, se estudio el efecto de CLA sobre la respuesta inmunitaria total, o bajo estimulación policlonal *in vitro*, y sobre la respuesta específica *in vivo*, o bajo estimulación con OVA *in vitro*.

Respecto a los resultados obtenidos relativos a la respuesta inmunitaria celular, concretamente sobre la capacidad linfoproliferativa esplénica, destacar que el aporte con CLA causó una disminución de ésta tras estimulación policlonal. Además, a diferencia de los resultados obtenidos en animales de 28 días, esta inhibición se acompañó de una reducción de la producción *in vitro* de IL-2. Estos resultados están de acuerdo con los de Tricon *et al.* (2004b) los cuales demostraron en sujetos que habían recibido suplemento de CLA (isómero c9,t11 o t10,c12), que las PBMC estimuladas con ConA presentaban una expresión reducida de CD69, la cual se correlaciona directamente con la proliferación linfocítica. Sin embargo, otros estudios realizados en animal adulto y utilizando diversas mezclas isoméricas de CLA describen tanto un incremento de la proliferación esplénica como la ausencia de efecto tras la adición del estímulo (Calder *et al.*, 2002; Albers *et al.*, 2003; Hayek *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 2000). De forma paralela, se evaluó la respuesta proliferativa específica de estos mismos linfocitos tras adicionar al cultivo el Ag (OVA) frente al cual los animales habían sido inmunizados previamente. En este caso, se observó un incremento de la respuesta proliferativa esplénica específica en aquellos animales que habían recibido CLA de forma continuada. Esta potenciación concuerda con otros estudios que muestran este mismo tipo de efecto en linfocitos T CD8<sup>+</sup> procedentes de cerdos alimentados con una dieta rica en CLA (mezcla isomérica 50:50) (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002; 2003). Además, tras la vacunación de hepatitis B, la proliferación específica de linfocitos fue superior en aquellos sujetos alimentados con una dieta rica en CLA (50:50) respecto al grupo referencia (Albers *et al.*, 2003). Por el

contrario, Kelley et al. (2001) no hallaron ningún efecto en la proliferación específica frente al virus influenza en sujetos que habían recibido suplemento de CLA. Cabe destacar que, en este último caso, los dos isómeros principales utilizados representaban únicamente el 40% del total de isómeros de CLA, mientras que en la mayoría de estudios (incluido el nuestro) en los que se describen cambios en la respuesta linfoproliferativa asociados a CLA, los isómeros principales representan prácticamente el 80% del total de isómeros.

A nivel sistémico, también se evaluó en animal adulto el posible efecto inmunomodulador de CLA sobre la respuesta inmunitaria humoral. En este caso, a diferencia del efecto potenciador de CLA demostrado en edades tempranas, no se observaron cambios en la concentración sérica de inmunoglobulinas totales. Este resultado concuerda con los obtenidos en otros estudios (Kelley *et al.*, 2000; 2001; 2002), aunque difiere de un estudio llevado a cabo en humanos, en el que se describe un incremento en la concentración de IgM e IgA en plasma tras el consumo de CLA (Song *et al.*, 2005). Cabe destacar, que los efectos más evidentes del efecto de CLA sobre la respuesta inmunitaria humoral no proceden de estudios realizados en edad adulta, sino de animales jóvenes. Concretamente, en el estudio realizado por Yamasaki et al. (2000; 2003) se demuestra el incremento de IgG, IgM e IgA esplénica tras el consumo de CLA; e incluso, en nuestros propios resultados procedentes de animales a edades incluso más tempranas. Sin embargo, en ninguno de los dos casos, se dispone de información relativa a la respuesta inmunitaria frente a un Ag concreto.

Para analizar la respuesta en Ac dirigidos frente a un determinado Ag, en nuestro caso OVA, se cuantificó tanto la concentración sérica de Ac específicos frente a OVA, como la capacidad de células esplénicas para producir Ac anti-OVA *in vitro*. En ambos casos, se confirmó que los linfocitos B esplénicos activados por OVA son capaces de producir -en un posterior contacto con el mismo Ag- Ac anti-OVA. No obstante, la respuesta humoral sistémica dirigida contra OVA (sérica y esplénica) de los animales que recibieron CLA fue comparable a la de los alimentados con dieta estándar. Estos resultados permiten sugerir que la ingesta de 1% de CLA en la dieta animal no incrementa el número de linfocitos B de memoria activados, ni su habilidad para producir Ac específicos. De hecho, nuestros resultados concuerdan con otros obtenidos en humanos y animales (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002; 2003; Jaudszus *et al.*, 2008). Únicamente en un estudio realizado por Albers et al. (2003), se mostró una potenciación a este nivel, hallando una mayor concentración de Ac frente al virus de hepatitis B en sujetos que habían consumido comprimidos de CLA (50:50).

Cabe destacar, que prácticamente no se dispone de información relativa al efecto de CLA sobre el sistema inmunitario asociado a mucosas, y menos aún sobre la respuesta

inmunitaria mucosal dirigida contra un Ag concreto. Por esta razón, se evaluó la respuesta inmunitaria celular *in vitro* mediante el estudio de la capacidad proliferativa de linfocitos procedentes de MLN tras estimulación policlonal y estimulación con OVA. Los resultados demuestran que el suplemento con CLA no logró modificar significativamente la proliferación frente a mitógeno, si bien se observó una tendencia a la disminución. De forma paralela, tras estimulación específica con OVA, tampoco se observó efecto por la dieta rica en CLA. Por tanto, el efecto demostrado en células procedentes de un compartimento sistémico -bazo- no tuvo lugar cuando el estudio se realizó en células de los mismos animales procedentes del compartimento intestinal -MLN- .

En relación a la respuesta humoral a nivel intestinal, la dieta prolongada con CLA incrementó la producción de IgA intestinal dirigida contra OVA, sin modificar la concentración de IgA total. Cabe destacar que éste constituye el primer estudio que demuestra el incremento de la respuesta inmunitaria en Ac dirigidos contra un Ag determinado en la mucosa intestinal, asociado al consumo de CLA. La estimulación de la producción de IgA intestinal es de gran importancia, dado que es el principal isotipo presente en mucosas, y confiere una elevada protección contra Ag y microorganismos que ingresan en el organismo a través del intestino, así como a través de otras mucosas (Fagarasan, 2008). Dado que el suplemento con CLA sólo incrementó la IgA específica intestinal, y no la producción de Ac anti-OVA en suero o producidos *in vitro* por células de bazo o MLN, es plausible sugerir que CLA incremente la presencia de linfocitos B en lámina propia intestinal o incluso promueva la migración hacia el intestino de células plasmáticas secretoras de IgA procedentes de otros compartimentos. Este efecto propuesto para CLA sobre un subgrupo de células en particular, es posible, dado que Bassaganya-Riera et al. (2001) también han mostrado un efecto específico sobre una subpoblación particular de células inmunitarias en cerdos que recibieron suplemento de CLA. Este efecto potenciador de CLA sobre la producción de IgA intestinal, junto con el demostrado en ratas de 28 días de edad, requiere estudios adicionales dirigidos a elucidar el(los) mecanismo(s) mediante los cuales actúa CLA y si el isómero de CLA *c9,t11* es el principal responsable de esta acción.

En resumen, la suplementación con un 1% de mezcla isomérica 80:20 de *cis9,trans11* y *trans10,cis12* aumenta la defensa inmunitaria humoral de ratas Wistar lactantes, incrementando la concentración sérica de IgG e IgM y la producción esplénica de IgM. La suplementación continuada desde la lactancia hasta la infancia incrementa la concentración sérica de Ig totales y la producción de Ig esplénica, pero además modula la respuesta linfoproliferativa. Por otra parte, la suplementación con CLA aumenta las defensas inmunitarias intestinales durante las primeras etapas de vida, mediante el incremento de la expresión génica y proteica de IgA. Asimismo, este estudio muestra que

la expresión génica de PPAR $\gamma$  se halla incrementada por el CLA, tanto en ratas lactantes como en ratas jóvenes, de forma dosis dependiente. En todos los casos, los efectos mostrados de CLA son más pronunciados cuanto más temprana y duradera es la suplementación. En cuanto a la suplementación prolongada hasta la edad adulta, el presente estudio demuestra que la suplementación con CLA durante 17 semanas modula la respuesta inmunitaria tanto policlonal como específica. Concretamente, dicha suplementación disminuye la reacción policlonal del sistema inmunitario, como se describe para otros AGPI, mientras que incrementa algunos aspectos de la inmunidad celular específica, así como la producción intestinal de IgA para un Ag determinado.

Globalmente, los resultados procedentes de la evaluación de la respuesta inmunitaria tras el suplemento con CLA en diferentes etapas de la vida -gestación, lactancia, infancia y edad adulta- reafirman y complementan estudios previos que describen la capacidad inmunomoduladora de CLA, particularmente de las mezclas ricas en el isómero *c9,t11*. Por tanto, la ingesta de este AG, presente de forma natural en productos de consumo diario, podría contribuir específicamente a la defensa inmunitaria y/o a contrarrestar situaciones de trastornos del sistema inmunitario. De todas formas, se requieren estudios posteriores para definir el (los) mecanismo(s) de acción de CLA en la modulación del sistema inmunitario y, particularmente, del isómero *c9,t11* de CLA.