UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia
Departament de Fisiologia

EFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO EN RATAS

CAROLINA RAMÍREZ SANTANA
2008

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia
Departament de Fisiologia

Programa de doctorado:
INMUNOLOGIA
Departament de Fisiologia
Facultat de Biologia
Bienio: 2005-2007

EFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO EN RATAS

Memoria presentada por Carolina Ramírez Santana para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Firma de los Directores: Firma de la doctoranda

Dra. Àngels Franch Masferrer Dr. Francisco J Pérez Cano Carolina Ramírez Santana

CAROLINA RAMÍREZ SANTANA
2008

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Fisiologia (Farmàcia)

Facultat de Farmàcia
Edifici B, escala A, 3a planta
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

Àngels Franch Masferrer, Professora Titular de Fisiologia i **Francisco José Pérez Cano,** Professor Lector de Fisiologia del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN:

Que la memòria titulada **"*Efecto del ácido linoleico conjugado en el desarrollo del sistema inmunitario en ratas*"** presentada per CAROLINA RAMÍREZ SANTANA per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció al Departament de Fisiologia, i considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I, per què així consti, signem la present a
Barcelona, 9 de desembre de 2008.

Dra. Àngels Franch Masferrer

Dr. Francisco J Pérez Cano

Esta tesis ha sido subvencionada por el proyecto “Influencia de un nuevo componente C.D.I. sobre el desarrollo del sistema inmunológico en ratas neonatas (FBG 303225). Durante su realización, la autora ha disfrutado de una *Beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI)* (octubre 2005-octubre 2008).

A mi tío Alirio, que desde el cielo me cuida

Si yo pudiera enumerar cuánto debo a mis antecesores y contemporáneos, no me quedaría gran cosa en propiedad. Estas palabras de Goethe resultan muy apropiadas para poner punto y final a una tesis. A lo largo de estos años he recibido aportaciones de mucha gente y aunque solo mi nombre figura en la portada, no creo que exista una sola obra científica debida exclusivamente al mérito de su autor.

La primera persona en mi extensa lista de acreedores es el Dr. Francisco J Pérez Cano, director de tesis, de quien siempre he tenido un apoyo incondicional. Es el mentor que todo doctorando quisiera tener, trabaja contigo hombro a hombro, de palabras elocuentes y grandes ideas. Sin embargo, esta no es la única faceta de Francisco de la que quiero hacer mención, ya que además de director de tesis, es un gran amigo al que tengo un inmenso aprecio y a quien confié mi vida matrimonial, como padrino de bodas. Por tanto, ha sido un placer disfrutar de su compañía a lo largo de estos años.

A la Dra. Àngels Franch, directora de tesis, de quien aprendí el valioso arte de la experimentación animal, a quien le debo todas y cada una de las correcciones de ésta tesis, para hacer su lectura más amena, clara y coherente. Además, Àngels me ha permitido estar en el seno de su familia, junto a Enric, Nuria y Clara. Con ella tengo una deuda invaluable a la que nunca podré hacer frente, ya que me permitió soñar y hacer realidad traer a mi esposo de Colombia, de quien había estado separada mucho tiempo. Gracias, mil gracias.

El día que llegué al departamento en busca del Dr. Francisco Pérez Cano (debido a una de sus publicaciones) me recibieron las doctoras Cristina Castellote y Margarida Castell. Ellas se encargaron de realizarme la entrevista, donde he de confesar hoy día, estaba muy nerviosa y ansiosa de que me aceptasen. Cristina por sus nexos con Colombia me hizo sentir tranquila y más cerca de casa, y sigue siendo así. A ella le agradezco que me haya permitido hacer parte del grupo Autoimmunitat i Tolerancia, además de permitirme conocer Andorra al abrirme las puertas de su casa.

A la Dra. Margarida Castell he de agradecerle que me transmita serenidad y conocimiento, tiene una inmensa capacidad de trabajo y ayuda. Gracias por las correcciones y el tiempo dedicado a cada uno de los artículos, y por todos aquellos trucos informáticos que reducen las horas de trabajo. Me encanta tu sentido del humor y eres de las personas que uno de pequeño quiere ser cuando grande.

A Silvia y Ana, mis primeras compañeras de laboratorio, de quienes tuve una gran acogida y me hicieron sentir como en casa, al permitir hacerme partícipes de su familia y amigos.

Sara y Teresa, mis compañeras de experimentos y del día a día siempre tan joviales me han permitido conocer otras culturas de España. A Chari y Carme por llenar de juventud e inocencia nuestro grupo.

Emmina, compañera de la que he aprendido mucho y gran amiga. Ella me ha dado la oportunidad de conocer en profundidad la cultura catalana junto a su familia. A ella debo mis conocimientos de gastronomía española. Gracias por la experiencia de las cerezas, por las largas caminatas sin rumbo fijo, por los picnics improvisados y por los pasos de salsa enseñados. Amiga a la que extraño y deseo que todas sus metas se hagan realidad.

A Mary Joe y Raquel, gracias por acompañarme en un momento tan especial de mi vida, como lo fue mi matrimonio. Mary Joe, además de amiga y madrina de bodas, es mi psicóloga de cabecera, es el bastón invisible en el que siempre te apoyas. Raquelina es un símbolo de amistad invaluable.

Vanessa semi-compañera de despacho, con la que considero que he estrechado mi amistad en este último año. Ha sido mi compañera de aventura de tesis, hemos sufrido juntas y nos hemos dado ánimo para continuar. Ya está Vane, por fin hemos terminado. Admiro su voluntad, de la cual yo carezco para las dietas y el ejercicio.

A Lourdes, Diana y Vero, antiguas compañeras de comida en el Colegio Mayor. Gracias por las aventuras vividas en el Pirineo Catalán.

A Montse por el café matutino y sus conocimientos cineastas. A Jaume por compartir sus experiencias de viaje y por nuestras largas charlas de idiomas. A Àngels Moscatel, agradezco la foto cedida para la portada de la tesis.

Gracias a todos y cada uno de los miembros del Departamento de Fisiología, por su compañía en estos años. Deseo expresar de manera especial a Trini, por la inmensa ayuda en la estadística.

A la Dra. Gloria Romero por adentrarme en los campos de la microscopía e inmunología. Fue mi primer contacto con la ciencia, a ella le debo el camino que he seguido, ya que me ayudó en la búsqueda de las células M que me han traído hasta aquí.

Ich möchte Dr. Andreas Gebert danken, dass er hat mir in seinem Labor in Deutschland begrüsst habe und sein Wissen von M Zellen übermitteln.

A Mònica Comalada y Elvira Bailón por haberme recibido en Granada y haberme ensañado las técnicas de inflamación intestinal. Además de mostrarme esa hermosa ciudad y sus maravillosas tapas.

A Sandra mi compañera de carrera con la que he compartido momentos especiales y largas charlas en Starbucks.

A Luisa y las niñas por ser mi familia colombiana en la distancia, gracias por acercarme a mi entrañable Colombia y hacer que extrañe menos mi casa.

Por último he de agradecer a mis acreedores de toda la vida, mi familia. A mi familia materna: mi abuelita María, mi tía Gloria y mi tío José, por sus cuidados, desvelos y mimos, que siempre me han apoyado en la distancia, de ellos también es esta tesis.

A Simón por ser mi amigo y compañero, quien probablemente es quien haya sufrido más de cerca los efectos colaterales de esta tesis, no sólo debo agradecerle por su inmenso apoyo y paciencia, sino además por su ayuda en la graficación de esta tesis. Gracias amor por estar a mi lado y que sepas que este es sólo un paso en la larga carrera que recorreremos juntos.

A mi hermanito, por ser mi amigo más fiel y confidente, gracias chiquis por quererme tanto.

A mi mami, por ser mi guía, amiga y consejera. Gracias por hacer de mi la persona que soy, por tus cuidados incluso en la distancia, a través de la virgencita. Gracias por ser mi mamá, te extraño con nostalgia y este logro es tan tuyo como mío. Extraño nuestras compras cogidas de brazo, extraño tus arrullos de noche, extraño nuestros días de interna, extraño todo contigo. Agradezco a Lili por cuidarte y acompañarte en mi lejanía.

Por último, he de agredecer a la persona que ha hecho posible todo esto, a mi guía académico, la luz que ilumina mi sendero, a mi mecenas, a quien me dió alas para volar, incluso sabiendo que volaría lejos del nido. Gracias papá por confiar siempre en mi, por apoyar mis decisiones. Quiero que te sientas muy orgulloso y espero que esta sea una de las tantas alegrías que te daré en la vida.

Gracias a Dios, por traerme hasta acá. Gràcies a tothom per tot.

ÍNDICE

I OBJETIVOS.....1

II INTRODUCCIÓN 7

1 SISTEMA INMUNITARIO DEL NEONATO 9

1.1 Inmunidad innata neonatal 11

1.2 Inmunidad adaptativa neonatal 13

2 LACTANCIA MATERNA 17

2.1 Componentes de la leche materna 17

2.1.1 Componentes nutritivos de la leche..... 19

2.1.1.1 Proteínas 19

2.1.1.2 Carbohidratos..... 20

2.1.1.3 Lípidos 20

2.1.1.4 Vitaminas..... 22

2.1.1.5 Minerales..... 22

2.1.2 Factores inmunitarios de la leche 22

2.1.2.1 Inmunoglobulinas 22

2.1.2.2 Lactoferrina 23

2.1.2.3 Lisozima..... 24

2.1.2.4 α-Lactoalbúmina..... 24

2.1.2.5 Nucleótidos..... 24

2.1.2.6 Oligosacáridos 25

2.1.2.7 Citocinas 25

2.1.2.8 Leucocitos..... 26

2.1.2.9 Probióticos..... 27

2.1.2.10 Otros componentes 28

2.2 Fórmulas infantiles 28

2.2.1 Fórmulas a base de proteínas de leche de vaca..... 30

2.2.2 Fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de leche de vaca 31

2.2.3 Fórmulas a base de proteínas de soja..... 31

3 EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS 33

3.1 Estructura, nomenclatura y fuentes alimenticias de ácidos grasos 33

3.2 Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados 37

3.2.1 Efecto en la biosíntesis de eicosanoides 37

3.2.2 Efecto en la organización de la membrana y señalización celular 38

3.2.3 Efecto en la expresión génica 40

3.3 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la respuesta inmunitaria innata 41

3.3.1 Influencia sobre la actividad de las células NK 41

3.3.2 Influencia sobre la actividad de macrófagos 42

3.4 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la respuesta inmunitaria adquirida 44

3.4.1 Influencia sobre la proliferación linfocítica 44

3.4.2 Influencia sobre la presentación antigénica y producción de anticuerpos 47

3.5 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en enfermedades mediadas por el sistema inmunitario 48

3.5.1 Enfermedad inflamatoria intestinal 49

3.5.2 Artritis reumatoide 49

3.5.3 Alergia 50

3.6 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en el desarrollo del neonato 52

3.6.1 Influencia de los AGPI-CL durante el embarazo y la lactancia ... 52

3.6.2 Influencia de los AGPI-CL sobre el sistema inmunitario de neonatos 53

4 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO 54

4.1 Estructura y origen del ácido linoleico conjugado 54

4.2 Fuentes de ácido linoleico conjugado 56

4.3 Efectos biológicos del ácido linoleico conjugado 59

4.3.1 Efecto sobre el peso y la composición corporal 60

4.3.2 Efecto anticancerígeno 61

4.3.3 Efectos antiaterogénicos 62

4.3.4 Efecto antidiabético 64
4.3.5 Efecto inmunomodulador 65
4.3.5.1 Proliferación linfocítica 65
4.3.5.2 Producción de anticuerpos 68
4.3.5.3 Producción de citocinas y otros mediadores 70
4.3.5.4 Poblaciones celulares 71
4.3.5.5 Respuesta específica 71
4.3.5.6 Mecanismos de acción 72

III RESULTADOS 75

Resumen Artículo 1: "Humoral immune response in CLA-supplemented rats during gestation and suckling" 77

Artículo 1 81

Resumen Artículo 2: "Infant rat immune enhancement by an 80:20 mixture of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid" 117

Artículo 2 121

Resumen Artículo 3: "Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy" 155

Artículo 3 159

Resumen Artículo 4: "Long-term feeding of the *cis*-9,*trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific immune response in rats" 195

Artículo 4 199

IV DISCUSIÓN 205

V CONCLUSIONES 227

VI BIBLIOGRAFÍA 233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de las inmunoglobulinas séricas en las primeras etapas de vida 16

Figura 2. Esquema representativo de la observación microscópica de la leche a diferentes aumentos 18

Figura 3. Estructura de ácidos grasos representativos de las diversas familias: AG saturados e insaturados en posiciones n-9, n-6 y n-3 35

Figura 4. Vía de síntesis de los AGPI n-3 y n-6 36

Figura 5. Mecanismos de acción implicados en el efecto de AGPI sobre la respuesta inmunitaria. 37

Figura 6. Mecanismo de acción de los AGPI en la expresión génica a través de los receptores PPAR.....41

Figura 7. Efectos de una elevada ingesta de AGPI n-3 en las funciones inmunitarias.....46

Figura 8. Efectos de los AGPI n-6 y sus metabolitos eicosanoides en las funciones inmunitarias 47

Figura 9. Estructura de los isómeros de CLA *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 y del ácido linoleico *cis*9,*cis*12 54

Figura 10. Rutas de síntesis del isómero *cis*9,*trans*11 en el rumen y en la glándula mamaria de rumiantes.....56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de la leche humana 19

Tabla 2. Especies bacterianas aisladas de leche materna de mujeres sanas 27

Tabla 3. Composición media de la leche madura humana y bovina 31

Tabla 4. Nomenclatura y fuentes de ácidos grasos..... 34

Tabla 5. Efecto del suplemento con AGPI n-3 sobre el sistema inmunitario en distintas especies animales 43

Tabla 6. Efecto del suplemento con aceite de pescado (EPA+DHA) sobre el sistema inmunitario en voluntarios adultos sanos 45

Tabla 7. Efectos del aceite de pescado (EPA+DHA) sobre la evolución de enfermedades en pacientes voluntarios..... 51

Tabla 8. Contenido de CLA y proporción relativa del isómero *cis*9,*trans*11 en alimentos crudos 57

Tabla 9. Isómeros posicionales y geométricos de CLA y su presencia en leche bovina (%) 59

Tabla 10. Efecto del suplemento dietética con CLA sobre el sistema inmunitario en animales..... 66

Tabla 11. Efecto del suplemento dietético con CLA sobre el sistema inmunitario en voluntarios sanos..... 69

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
Ac	Anticuerpo
AG	Ácido graso
Ag	Antígeno
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGPI-CL	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
AGS	Ácido graso saturado
ALA	Ácido α-linolénico
APC	*Antigen presenting cells.* Células presentadoras de antígeno
AR	Artritis reumatoide
CD	*Cluster of differentiation.* Grupos de diferenciación
CD	*Crohn's disease.* Enfermedad de Crohn
CLA	*Conjugated linoleic acid.* Ácido linoleico conjugado
COX	Ciclooxigenasa
CRP	*C-reactive protein.* Proteína C reactiva
DC	*Dendritic cells.* Células dendríticas
DGLA	Ácido dihomo-γ-linolénico
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GALT	*Gut associated lymphoid tissue.* Tejido linfoide asociado al intestino
IEL	*Intraepithelial lymphocytes.* Linfocitos intraepiteliales
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INFγ	Interferón γ
LA	Ácido linoleico
LF	Lactoferrina
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MHC	*Major histocompatibility complex.* Complejo mayor de histocompatibilidad
MLN	*Mesenteric lymph nodes.* Ganglios linfáticos mesentéricos
NF-κB	*Nuclear factor κB.* Factor nuclear κB.
NK	*Natural killer*
OVA	Ovoalbúmina
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells.* Células mononucleares de sangre periférica
PG	Prostaglandina
PPAR	*Peroxisome proliferator-activated receptor*
RA	*Rumenic acid.* Ácido ruménico
ROS	*Reactive oxygen species.* Especies reactivas de oxígeno

SC	*Secreting cells.* Células secretoras
SI	Sistema inmunitario
sIgA	Inmunoglobulina A secretora
Tc	T citotóxicos
TCR	*T cell receptor.* Receptor de linfocitos T
TGFβ	*Transforming growth factor β.* Factor transformador de crecimiento β
Th	*T helper.* T colaborador
TLR	*Toll-like receptors*
TNFα	*Tumor necrosis factor α.* Factor de necrosis tumoral α
T_{reg}	T reguladores
TX	Tromboxano
UC	*Ulcerative colitis.* Colitis ulcerosa
VA	*Vaccenic acid.* Ácido vaccénico

OBJETIVOS

El ácido linoleico conjugado (CLA) designa una mezcla de isómeros dienoicos conjugados del ácido linoleico, de los cuales predominan *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12. El CLA se encuentra presente de forma natural en la leche y carne de rumiantes y puede ser sintetizado a nivel industrial mediante hidrogenación parcial del ácido linoleico. Numerosos estudios le confieren actividad protectora frente al cáncer, aterosclerosis, alteraciones en la composición corporal y diabetes. Además, algunos estudios sugieren su actividad inmunomoduladora.

Existen estudios que muestran el efecto de CLA en las primeras etapas de vida en aspectos como la composición y crecimiento corporal; sin embargo, no se ha analizado la influencia de CLA sobre el sistema inmunitario durante estas fases de desarrollo. En estudios previos, hemos podido constatar la inmadurez del sistema inmunitario intestinal y sistémico de ratas en el momento del nacimiento y su maduración progresiva durante el período de lactancia.

La hipótesis de partida de este trabajo es que, dado que CLA posee propiedades inmunomoduladoras, el suplemento dietético con CLA durante las primeras etapas de vida puede contribuir a la maduración del sistema inmunitario.

Puesto que se han demostrado efectos biológicos distintos para cada uno de los isómeros de CLA y que el isómero mayoritario en leche materna es el *cis*9,*trans*11, en el presente estudio se ha utilizado una mezcla isomérica 80:20 de *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 de CLA.

En base a la hipótesis de partida y a las consideraciones anteriores, el objetivo general del presente trabajo ha sido:

Establecer el efecto del suplemento dietético con CLA cis9,trans11 y trans10,cis12 (80:20) en el desarrollo del sistema inmunitario en ratas Wistar.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado como objetivos específicos:

1. ***Determinar la influencia del suplemento dietético con CLA durante los períodos de gestación y lactancia sobre el sistema inmunitario de ratas Wistar al final de la lactancia.***

   Para ello se ha evaluado, en ratas de 21 días, la respuesta inmunitaria sistémica humoral -mediante cuantificación de inmunoglobulinas séricas y secretadas por

esplenocitos- y celular -mediante evaluación de la capacidad linfoproliferativa y la secreción de citocinas-. Asimismo, se ha analizado la expresión génica de IgA intestinal y de posibles mediadores del mecanismo efector de CLA sobre la respuesta inmunitaria intestinal.

- Los resultados obtenidos han dado lugar al manuscrito: **Humoral immune response in CLA-supplemented rats during gestation and suckling.** J Br Nut (en revisión).
- Los resultados de expresión génica forman parte de la publicación: **Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy.** J Lip Res 2009; 50 (2) (doi:10.1194/jlr.M800356-JLR200; en prensa).

2. ***Evaluar la influencia del suplemento dietético con CLA durante los períodos de lactancia y primera infancia sobre el sistema inmunitario de ratas Wistar en la infancia.***

   De forma paralela al objetivo anterior, en ratas de 28 días, se ha evaluado la respuesta inmunitaria sistémica humoral (inmunoglobulinas séricas y esplénicas) y celular (capacidad linfoproliferativa y secreción de citocinas). En relación al sistema inmunitario intestinal, además de la expresión génica de IgA y de posibles mediadores de CLA, se ha cuantificado la IgA secretada al lumen intestinal.

   - Los resultados obtenidos han sido incluidos en el manuscrito: **Infant rat immune enhancement by an 80:20 mixture of *cis*9,*trans*11 and *trans*10,*cis*12 conjugated linoleic acid.** J Lipid Res (pendiente de aceptación).
   - Los resultados sobre el sistema inmunitario intestinal forman parte de la publicación: **Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy.** J Lip Res 2009; 50 (2) (doi:10.1194/jlr.M800356-JLR200; en prensa).

3. ***Establecer el efecto inmunomodulador del suplemento dietético con CLA, de forma continuada desde el período de gestación hasta la edad adulta, en ratas inmunizadas con ovoalbúmina.***

   Para ello se ha evaluado la respuesta inmunitaria sistémica e intestinal de tipo humoral (inmunoglobulinas totales y anticuerpos anti-ovalbúmina en diferentes compartimentos) y celular (respuesta linfoproliferativa policlonal y específica).

- Los resultados derivados de este objetivo han sido aceptados para su publicación en: **Long-term feeding of the *cis*-9,*trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific immune response in rats**. J Nutr 2009; 139 (en prensa)

INTRODUCCIÓN

1 SISTEMA INMUNITARIO DEL NEONATO

La función del sistema inmunitario consiste en proteger al individuo frente a microorganismos patógenos y, para ello, dispone de mecanismos de reconocimiento, eliminación y memoria. El sistema inmunitario es también responsable de la tolerancia del organismo frente a elementos propios, alimentos, microbiota y otros componentes ambientales. El desarrollo de la tolerancia es el resultado de mecanismos inmunitarios que requieren el contacto con antígenos (Ag) (Taylor *et al*., 2005). El desarrollo y permanencia de la tolerancia son procesos que tienen lugar a lo largo de la vida, iniciándose en etapas muy tempranas, incluso prenatales. Al parecer la educación precoz del sistema inmunitario se inicia en el útero y continúa tras el nacimiento, particularmente durante los dos primeros años de vida (Michaelsson *et al*., 2006).

Desde las primeras etapas de desarrollo humano, los órganos linfoides primarios - timo y la médula ósea- están ya bien formados y contienen células progenitoras linfoides. La linfopoyesis se inicia en la gestación temprana y en el nacimiento está muy avanzada. Durante las primeras etapas de gestación se forma una red de vasos linfáticos que origina un sistema circulatorio funcional que conduce a la diseminación rápida de células precursoras linfomieloides. Este sistema permite el transporte de células precursoras desde los órganos progenitores a los lugares de inducción -como placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos-, lo que asegura el desarrollo paralelo tanto de órganos linfoides primarios como secundarios (Kelly & Coutts, 2000). A las 18 semanas de gestación en los centros germinales de las placas de Peyer y de la lámina propia del epitelio intestinal se detectan linfocitos T que expresan el receptor de las células T (TCR) y los grupos de diferenciación (CD) CD4 o T helper (Th) y CD8 o T citotóxicos (Tc). Los linfocitos intraepiteliales (IEL) aparecen a las 11 semanas de gestación y tras el nacimiento la mayoría son $CD8^+$. Durante la vida fetal y primeros meses de vida, los linfocitos B sufren un reordenamiento génico independiente del contacto con Ag que resulta en un repertorio aproximado de 10^4 clones específicos (Zanetti, 1992; Insoft *et al*., 1996). Por otra parte, las células responsables de la respuesta inmunitaria innata, tales como macrófagos, neutrófilos y células *natural killer* (NK) están ya presentes en las primeras etapas de gestación (Kelly & Coutts, 2000).

En la vida fetal y neonatal, el útero y la placenta se caracterizan por una distribución anatómica única y por la expresión funcional de moléculas del sistema inmunitario innato, tales como los *Toll-like receptors* (TLR) -receptores que reconocen la presencia de patógenos- y los *Active antimicrobial proteins and peptides*, con actividad microbicida.

Estas moléculas junto con la lactoferrina, lisozima y α-defensinas protegen frente a los microorganismos que ascienden desde la vagina (Levy, 2007).

Tras el nacimiento, el recién nacido pasa de un ambiente intrauterino estéril a un ambiente con elevado riesgo de infección, donde la protección es vital. Esta transición se acompaña de la maduración gradual de su sistema inmunitario. Es en el período postnatal, cuando el contacto con una amplia variedad de Ag -ambientales y de la dieta- influye en el desarrollo de los linfocitos de memoria inmunológica. El sistema inmunitario neonatal está condicionado por tres demandas fisiológicas: protección contra infecciones, evasión de las respuestas proinflamatorias y mediación entre ambientes, incluyendo la colonización de la piel y del tracto gastrointestinal por parte de microorganismos (Levy, 2007).

Durante la primera infancia, los niños están expuestos a un gran número de microorganismos infecciosos, que incluyen virus, bacterias y parásitos. Durante los primeros meses de vida, los anticuerpos (Ac) maternos transferidos al feto mediante la placenta (exclusivamente inmunoglobulina G, IgG) y al neonato a través de la leche materna, atenúan la gravedad de los episodios infecciosos causados por microorganismos contra los cuales la madre ha desarrollado memoria inmunológica (Zinkernagel, 2000). Sin embargo, los linfocitos maternos normalmente no atraviesan la barrera placentaria, por lo que la inmunidad mediada por linfocitos T no es transferida a la descendencia "in útero". No obstante, la madre transfiere linfocitos, en su mayoría linfocitos T, al lactante a través de la leche materna. Estos linfocitos, procedentes de las mucosas maternas, se hallan ya activados y expresan receptores asociados a memoria inmunológica (Kelly & Coutts, 2000).

La vida del neonato se caracteriza por una elevada sensibilidad a agentes infecciosos, probablemente debida a la falta de memoria inmunológica preexistente. Otro factor que puede contribuir a esta sensibilidad es el reducido número de células inmunocompetentes presentes en los tejidos linfoides periféricos del neonato, hecho descrito en ratas y ratones (Marshall-Clarke *et al*., 2000). Sin embargo, salvo estas características diferenciales, numerosos estudios -tanto en humanos como en roedores-, demuestran que las células inmunitarias del neonato son cualitativamente distintas a las del adulto. Así, en rata, las subpoblaciones celulares presentes en tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y en bazo se encuentran en proporciones distintas en neonatos y adultos, y dentro de estas subpoblaciones existen diferencias fenotípicas destacables (Pérez-Cano *et al.,* 2005a, 2005b, 2007). Por otra parte, en neonatos humanos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* describen deficiencias o desviaciones inmunitarias entre linfocitos T, B y células presentadoras de antígeno (APC) (Adkins *et al.*,

2004; Marodi, 2006). Además de las diferencias celulares descritas, el ambiente propio del neonato puede modificar la respuesta inmunitaria (Marshall-Clarke *et al.,* 2000). Si bien el sistema inmunitario del neonato no alcanza el grado de madurez característico de adulto, no puede considerarse totalmente inmaduro ya que es capaz de desarrollar respuestas inmunitarias eficientes que mantienen a salvo al neonato.

La falta de madurez del sistema inmunitario del neonato se ha puesto en evidencia por una serie de factores (Ogundele, 2001): La presencia de un número reducido de APC, el predominio de linfocitos T fenotípica y funcionalmente vírgenes, el retraso en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y su baja capacidad para producir Ac dirigidos contra polisacáridos bacterianos, la escasa actividad del sistema del complemento, la elevada actividad de linfocitos T supresores, la actividad reducida de las células NK y la funcionalidad incompleta de macrófagos y neutrófilos, entre otros factores.

1.1 Inmunidad innata neonatal

La inmunidad innata es ontogénicamente más antigua que la inmunidad adaptativa y constituye el paso previo a la anterior (Janeway, 2001). En animales vertebrados, la inmunidad innata y adaptativa se solapan. La inmunidad innata es la primera respuesta de un individuo frente a microorganismos, ya que muchos de los mecanismos para el reconocimiento de la inmunidad innata son codificados en el DNA celular y, a diferencia de la respuesta inmunitaria adaptativa, no requiere reordenamiento génico o contacto previo con el Ag (Janeway, 2001).

Debido a la presencia limitada de Ag en el útero y a la inmunidad adaptativa deficiente del neonato, los recién nacidos deben confiar en su inmunidad innata como mecanismo de protección. La respuesta inmunitaria innata es iniciada por bacterias, virus, protozoos y hongos, que inducen la activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos, células dendríticas (DC), células NK y sistema del complemento. El reconocimiento inespecífico de Ag se lleva a cabo mediante receptores TLR, que constituyen el punto central de la inmunidad innata. Los TLR son un grupo conservado de proteínas trasmembrana de tipo I responsables del reconocimiento de varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) expresados en un amplio espectro de agentes infecciosos (Staros, 2005; Takeda, 2005). Hoy en día se han identificado 11 TLR en humanos y 13 en ratón, que se expresan en la superficie celular o en el citoplasma de monocitos, macrófagos, DC y células epiteliales (Balaram *et al*., 2008). Recientemente, también se ha descrito la expresión de TLR en linfocitos T (Kabelitz, 2007). La activación

de estos receptores conduce a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) y de otros factores de transcripción, que conllevan a la liberación de citocinas que activan la respuesta adaptativa.

Diversos estudios han demostrado que los monocitos obtenidos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos expresan niveles similares de TLR que los del adulto, si bien sus consecuencias funcionales difieren de las de éstos (Levy, 2007).

Por otra parte, los lactantes -ya sean nacidos a término o pretérmino- contienen un número de neutrófilos en sangre periférica similar al de los adultos. Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, los neutrófilos del neonato tienen una funcionalidad limitada. La alteración más notoria es el bajo número de neutrófilos reclutados en los focos de inflamación. Ello se atribuye a una menor quimiotaxis, menor capacidad de rodamiento, menor número de células que se unen al endotelio activado y menor número de células que migran al tejido subendotelial. Todas estas deficiencias se deben a la baja expresión de integrinas β_2 y selectinas, junto con alteraciones en el citoesqueleto de los neutrófilos (Carr, 2000). Por otra parte, también se debe a la elevada secreción -por parte de macrófagos y APC- de interleucina (IL)-6, citocina que inhibe la migración de neutrófilos hacia los focos de inflamación (Levy, 2007).

Los macrófagos presentes en bazo fetal son prácticamente indetectables y no adquieren la capacidad de procesar y presentar Ag hasta fases avanzadas de la ontogenia (Marshall-Clarke *et al*., 2000). Los macrófagos del neonato exhiben una baja producción de citocinas proinflamatorias, específicamente de IL-1β, IL-6, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF)α. Posiblemente los bajos niveles de dichas citocinas se deben a la elevada producción de IL-10 por parte de macrófagos neonatales. Además, estos macrófagos presentan bajos niveles de expresión de CD14, TLR2 y TLR4, los cuales están involucrados en el reconocimiento y unión de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Chelvarajan *et al*., 2004).

Las células NK constituyen la primera línea de defensa frente a agentes infecciosos, ya que al no requerir la exposición previa del patógeno, constituyen el eje central de la inmunidad innata. Estas células cumplen un papel destacado en los mecanismos de defensa frente a bacterias y patógenos intracelulares, el control de infecciones virales, la eliminación de células tumorales y la determinación del perfil de la respuesta adaptativa contra un determinado patógeno. Hace 10 años se describió que el número de células NK neonatales es similar al observado en adultos, mientras que su función citotóxica está disminuida (Carayol *et al*., 1998). Estudios más recientes *in vitro* demuestran que el estímulo con IL-8 de células NK de cordón umbilical induce una mayor producción de

interferón (IFN)γ y mayor expresión de CD69 (marcador de activación) que en células NK de adultos (Nomura *et al.,* 2001). Por otra parte, estudios llevados a cabo en animales demuestran la elevada presencia de células NK y NKT en el intestino delgado de ratas durante el período de lactancia, etapa en la que predomina la respuesta inmunitaria innata (Pérez-Cano *et al*., 2005b; Marín-Gallén *et al*., 2008).

1.2 Inmunidad adaptativa neonatal

Históricamente, la respuesta inmunitaria adaptativa del neonato se ha considerado inmadura. Sin embargo, en 1996, diversos estudios demostraron que los mamíferos neonatos son inmunocompetentes sólo bajo ciertas circunstancias, siendo capaces de superar *in vivo* el grado de respuesta de los linfocitos T de adulto (Ridge *et al*., 1996). Desde entonces, se ha confirmado que las respuestas inmunitarias adaptativas del neonato tienen un amplio rango de variabilidad, desde la "no-respuesta" hasta una función completamente madura (Adkins *et al.,* 2004).

Las APC de neonatos y adultos presentan diferencias cualitativas y cuantitativas. Estudios realizados en rata y ratón muestran que el sistema de DC del neonato es menos maduro que el del adulto e incluye una población distinta de DC esplénicas, además de una reducida producción *in vitro* de IL-12. La baja producción de esta citocina parece estar mediada por el TLR9 y la consiguiente producción de IL-10 (Sun, 2005).

La respuesta inmunitaria característica del neonato puede ser también debida a diferencias cuantitativas de linfocitos T. En este sentido, se ha descrito que en ratas y ratones recién nacidos, el número de linfocitos T se halla reducido de 10 a 100 veces en comparación con animales adultos (Adkins *et al.,* 2004). La limitada capacidad de respuesta en neonatos puede también ser atribuida a diferencias en la composición relativa de los subtipos de linfocitos T. Otro factor a considerar es la coincidencia parcial en la generación de células T por precursores hematopoyéticos fetales y del adulto, lo cual se ha demostrado en ratones neonatos. Es por ello, que los linfocitos T periféricos en las primeras semanas de vida del neonato constituyen una mezcla de células derivadas del adulto y del feto, coexistiendo células totalmente maduras con otras inmaduras (Adkins *et al*., 2004).

La idea de la falta de madurez del sistema inmunitario adaptativo del neonato se debe en parte, a la producción limitada de IL-2, IL-4 e IFNγ, y a la baja capacidad de proliferación de los linfocitos T neonatales. No obstante, el descubrimiento de las poblaciones Th1 y Th2, aclararon que la respuesta de los linfocitos T en ratones recién

nacidos no es deficiente, sino que tiende hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th2 (Marshall-Clarke *et al.,* 2000; Levy, 2007).

Recientemente, una serie de estudios demuestran que los linfocitos T $CD4^+$ neonatales procedentes de ganglios linfáticos mantienen una clara tendencia a desarrollar respuestas eficientes de tipo Th2 y son muy deficientes en el desarrollo de respuestas Th1, cuando se transfieren a adultos (Adkins *et al.*, 2004; Lewis *et al.,* 2006). En resumen, tanto las características cualitativas como cuantitativas de los linfocitos T $CD4^+$ neonatales son responsables de la plasticidad de las respuestas celulares Th1/Th2. Dada la influencia que ejercen los linfocitos T $CD4^+$ sobre otras células del sistema inmunitario, una variación en las respuestas Th del neonato puede contribuir substancialmente a la variabilidad de las respuestas de otras poblaciones celulares.

Al igual que en las respuestas de linfocitos T $CD4^+$, los neonatos se han considerado deficientes en la función citotóxica mediada por linfocitos T $CD8^+$. Sin embargo, estudios recientes en ratones neonatos han demostrado que los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos en las primeras etapas de vida se encuentran en cantidades comparables a las del adulto, y poseen características similares en cuanto a sus funciones efectoras y avidez por el Ag (Adkins *et al*., 2004). Por tanto, los linfocitos T $CD8^+$ en neonatos murinos y humanos pueden desarrollar funciones citotóxicas maduras durante el período neonatal. Sin embargo, las mismas condiciones que inician respuestas de tipo Th1 también activan a linfocitos T $CD8^+$, mientras que las condiciones que llevan al predominio de respuestas Th2 se acompañan de una baja actividad de linfocitos T citotóxicos (Adkins, 1999).

Actualmente, no se dispone de información comparativa entre adultos y neonatos sobre las propiedades de los linfocitos T reguladores (T_{reg}). Sin embargo, este tipo celular parece cumplir una función importante en las primeras etapas de vida. Concretamente, en ratón se han identificado linfocitos T_{reg} en ganglios linfáticos periféricos a los pocos días del nacimiento. Estos linfocitos podrían intervenir en promover la adquisición de tolerancia y al mismo tiempo estar implicados en modelar el sistema inmunitario del neonato (Adkins *et al.,* 2004).

Los folículos de linfocitos B en bazo sólo se observan a partir de las dos semanas de vida, sin embargo la capacidad para formar centros germinales se desarrolla a la cuarta semana. Aunque el recién nacido posee linfocitos B no-funcionales, nace con un gran suministro de IgG materna aportada a través de la placenta. Estas Ig controlan el proceso de infección durante los primeros 6 meses de vida, momento en el cual el niño ya sintetiza sus propias Ig. La producción de Ac específicos inicialmente es muy baja y no resulta adecuada hasta los 2 meses tras el nacimiento. El recién nacido tiende a

incrementar el número de linfocitos B con el paso del tiempo, pero hay un retraso en su diferenciación a células plasmáticas (Lewis *et al.,* 2006).

Diversos estudios, en humanos y ratones, han demostrado que la respuesta primaria de Ac dependiente de linfocitos T en el período neonatal difiere de la adulta. En este sentido, la ubicación estructural es un factor primordial para que se lleve a cabo una respuesta de linfocitos B frente a Ag T-dependientes. Una respuesta de Ac requiere tres estructuras arquitectónicas: folículos linfoides, redes de DC foliculares y centros germinales. Estas estructuras están ausentes en el ratón recién nacido y se desarrollan durante las primeras semanas de vida, mediante un mecanismo de interacción entre células de estroma y linfocitos B, en el que intervienen citocinas y quimiocinas (Adkins *et al*., 2004).

Por otra parte, se había sugerido que los linfocitos B carecían de capacidad de respuesta a señales de linfocitos T y a experimentar cambios de isotipo de IgM a IgG. Sin embargo, hoy en día se sabe que los linfocitos B no pueden llevar a cabo dichas funciones debido a la ayuda inadecuada por parte de los linfocitos T neonatales (Lewis *et al*., 2006). Estudios llevados a cabo en rata demuestran que, tras el nacimiento, la proporción de linfocitos B en la lámina propia es menor al 10%, sin embargo, tras el período de lactancia dicha proporción aumenta por encima del 30%. Durante la segunda semana de vida predominan las células secretoras (SC) de IgM y posteriormente se detectan IgA-SC pero en menor proporción (Pérez-Cano *et al*., 2005a). En bazo de ratas de la misma edad predominan los linfocitos B, aunque su capacidad proliferativa es baja (Pérez-Cano *et al*., 2007). En los mamíferos, el mayor aporte de Ig en el neonato se debe a la transferencia de IgG a través de la placenta. Las reservas de IgG generadas se mantienen hasta los tres meses de vida, y es durante el período de lactancia, cuando la leche materna proporciona los Ac necesarios al lactante (Niers, 2007). En la **Figura 1** se muestra la evolución de las Ig séricas en las primeras etapas de vida.

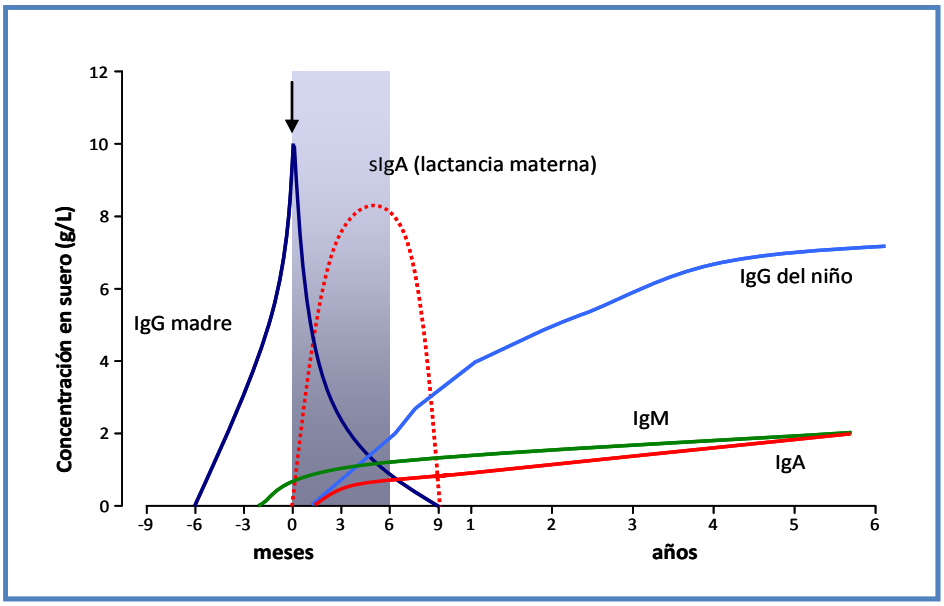

Figura 1. Evolución de las inmunoglobulinas séricas en las primeras etapas de vida. El rectángulo corresponde al intestino delgado, donde permanece confinada la IgA aportada durante la lactancia. Adaptada de Niers, 2007.

En resumen, los períodos de gestación, lactancia e infancia son críticos para el desarrollo del sistema inmunitario. Es en estas etapas cuando deben proporcionarse las condiciones óptimas, entre ellas la nutrición, para su maduración. Esta nutrición debería:

- Ser una fuente de Ag ante los cuales el sistema inmunitario adquiera tolerancia
- Proporcionar factores que ayuden a modular la respuesta inmunitaria y promuevan la maduración del sistema inmunitario
- Proporcionar factores que condicionen la microbiota intestinal y, en consecuencia, afecten la exposición antigénica, la maduración y la respuesta inmunitaria

A través de estos mecanismos es posible que la nutrición durante las primeras etapas de vida condicione la respuesta inmunitaria en etapas posteriores (Calder, 2006).

2 LACTANCIA MATERNA

En el momento del nacimiento, la relación nutricional madre-niño pasa de una transferencia de nutrientes de forma aséptica a través del cordón umbilical a depender de la leche materna y del intestino del neonato para transportar nutrientes y protegerse de patógenos entéricos. Estos dos nuevos sistemas deben compensar el estado virgen de la inmunidad adaptativa y la falta de madurez del sistema digestivo del recién nacido. Las primeras etapas de vida del neonato requieren, por tanto, un aporte elevado de nutrientes para su crecimiento, desarrollo y maduración. En este sentido, la leche materna contiene el patrón de nutrientes más idóneo para el lactante, ya que es adecuado en cantidad y calidad (Picciano, 1998). Debido a la gran trascendencia que tiene la leche materna en el desarrollo del neonato, es de gran importancia la alimentación de la madre durante la gestación y lactancia.

Además de nutrientes, la leche materna transfiere inmunocompetencia al recién nacido durante los primeros meses de vida, aporte que ya se inició durante la gestación a través de la placenta. Por esta razón, se considera la leche materna un vínculo de comunicación entre el sistema inmunitario materno y el del neonato (Field, 2005).

El conocimiento de la composición de la leche materna ha permitido la formulación de leches de sustitución y de suplementos dietéticos adecuados para el óptimo desarrollo del neonato.

2.1 Componentes de la leche materna

La leche materna es un fluido corporal dinámico -sintetizado en los lactocitos de la glándula mamaria- que presenta variaciones en su composición a lo largo del día y del período de lactancia, y cuya composición está específicamente adaptada al crecimiento de los neonatos de cada especie (Kent, 2007; Wheeler *et al.,* 2007).

A lo largo del período de lactancia se distinguen tres tipos de secreción láctea, en función de su composición: calostro, leche de transición y leche madura. El calostro es la secreción inicial que se produce durante los primeros 4-5 días posparto. Posteriormente y hasta las 2 semanas se secreta leche de transición -de elevada variabilidad entre madres- y, finalmente, se produce leche madura (Lawrence, 1994; Jiménez, 2001). El calostro contiene mayor concentración de proteínas -fundamentalmente IgA y lactoferrina- y de leucocitos que los otros tipos de leche; en la leche de transición los

niveles de Ig disminuyen, mientras que los de lactosa y lípidos aumentan hasta alcanzar los valores correspondientes a leche madura (Lawrence, 1994).

Los componentes de la leche se clasifican en: componentes nutritivos (carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales), y componentes bioactivos, entre los que se encuentran factores inmunitarios, tales como Ig, leucocitos, citocinas, lactoferrina y lisozima. Otros agentes bioactivos son las hormonas, factores de crecimiento y enzimas. Estos componentes se encuentran distribuidos en diferentes compartimentos lácteos: suero lácteo, micelas de caseína, membrana y glóbulos de grasa (Picciano, 1998) (**Figura 2**).

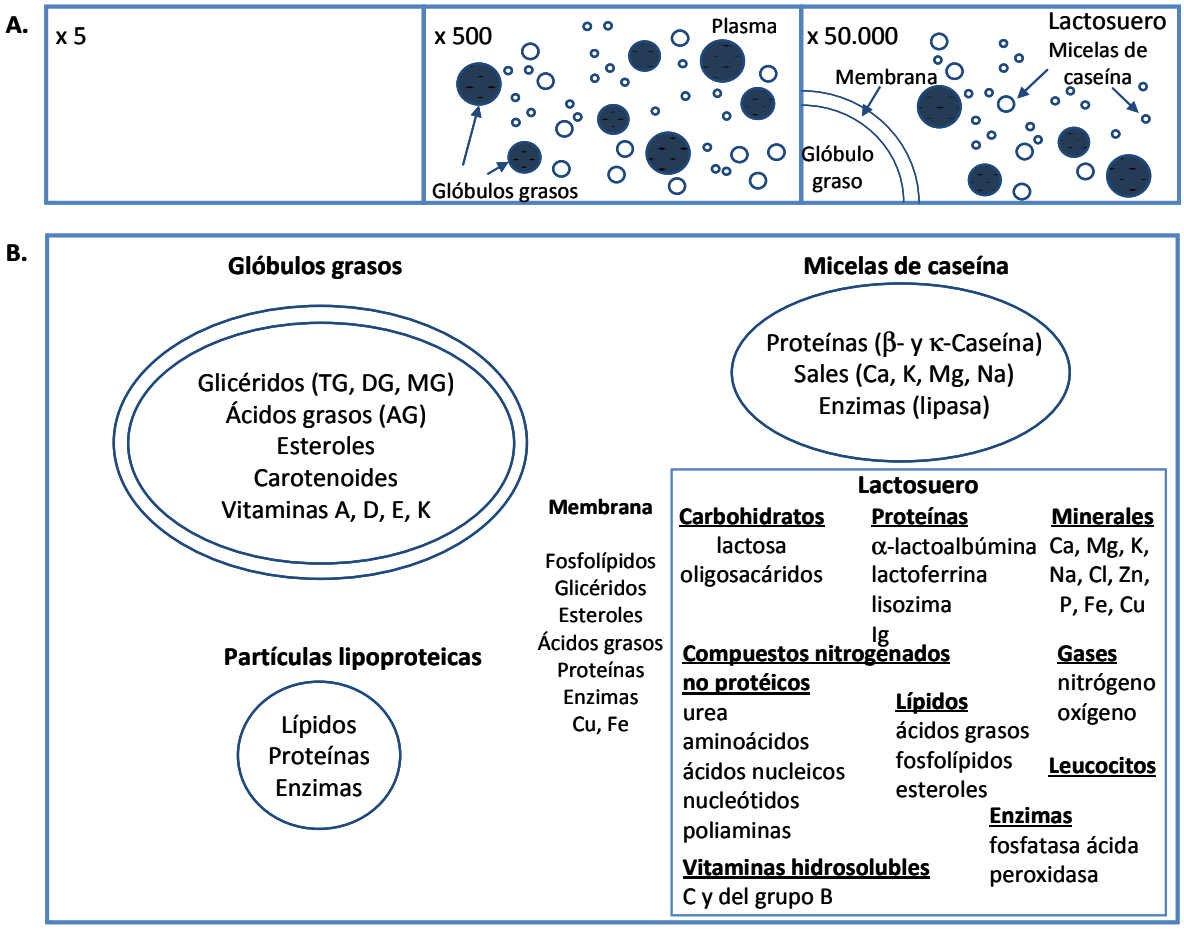

Figura 2. Esquema representativo de la observación microscópica de la leche a diferentes aumentos (**A**). Componentes en los distintos compartimentos (**B**). Modificada de Walstra *et al.*, 2001.

El conjunto de componentes de la leche que no se encuentran en fase sólida constituyen el suero lácteo, donde predomina la fase líquida. El agua es el elemento predominante de la leche, ya que representa el 87% del volumen lácteo (Picciano, 2001; Lawrence &

Pane, 2007). En la **Tabla 1** se halla una relación de los principales componentes de la leche humana.

Tabla 1. Principales componentes de la leche humana. Modificada de Picciano, 2001.

Proteínas	**Hidratos de carbono**	**Microminerales**
α-lactoalbúmina	glucopéptidos	cobalto
β-lactoglobulina	lactosa	cobre
caseínas	oligosacáridos	hierro
enzimas		manganeso
factores de crecimiento	**Lípidos**	selenio
hormonas	ácidos grasos	zinc
inmunoglobulinas	esteroles y colesterol	
lactoferrina	fosfolípidos	**Células**
lisozima	triglicéridos	células epiteliales
		linfocitos
Componentes nitrogenados no proteicos	**Macrominerales**	macrófagos
ácidos nucleicos	calcio	neutrófilos
ácido úrico	cloruro	
creatina	fosfato	**Vitaminas**
creatinina	magnesio	vitamina C
glucosamina	potasio	vitaminas del grupo B
nucleótidos	sodio	vitaminas liposolubles (A, D, E, K)
poliaminas		
urea		

2.1.1 Componentes nutritivos de la leche

2.1.1.1 Proteínas

El contenido proteico en la leche varía entre especies y a lo largo de la lactancia. En la leche humana, la concentración proteica es elevada durante las primeras etapas de lactancia (15,8 g/L) y disminuye de forma progresiva hasta 8,5 g/L en leche madura (Picciano, 2001). La leche humana contiene un amplio espectro de proteínas tales como κ-caseína, lactoperoxidasa, haptocorrina, lactadherina y péptidos derivados de la digestión de la leche, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y virus y, por tanto, protegen de la infección. Además, la haptocorrina y la κ-caseína facilitan la absorción intestinal de nutrientes en el lactante (Lönnerdal, 2003; Lawrence & Pane, 2007).

La leche humana está constituida por proteínas del suero lácteo (lactoalbúmina, IgA y lactoferrina) y caseína en una proporción de 60:40 (Lawrence, 1994; Lönnerdal, 2003). La caseína de la leche humana está formada por los tipos β y κ y, a diferencia de la bovina,

es fácilmente digerible. La principal función de esta proteína es formar agregados de calcio y fósforo, incrementando la concentración de dichos elementos en la leche.

Una característica importante en su composición es el bajo contenido en los aminoácidos fenilalanina y tirosina -debido a los bajos niveles de enzimas presentes en el neonato para metabolizarlos- mientras que contiene niveles relativamente altos de cisteína, metionina y taurina. Este último aminoácido es fundamental en los procesos de proliferación celular, absorción de lípidos y maduración del sistema nervioso (Lawrence, 1994; Emmett *et al*., 1997; Lönnerdal, 2003). La carnitina facilita el transporte de ácidos carboxílicos a través de la membrana mitocondrial, liberando sustratos y eliminando compuestos tóxicos. Además, la carnitina interviene en el desarrollo y maduración de las estructuras cerebrales (Lönnerdal, 2003).

La fracción nitrogenada no proteica es abundante, alrededor de un 25%, y su concentración se mantiene constante a lo largo de la lactancia. Dicha fracción consta de más de 200 componentes, entre los que se encuentran aminoácidos libres, amino-azúcares, ácidos nucleicos, nucleótidos y poliaminas. Estos componentes son de gran importancia para los tejidos de crecimiento rápido, como el epitelio intestinal y células del sistema inmunitario (Picciano, 2001).

2.1.1.2 Carbohidratos

Los carbohidratos aportan el 40-50% del contenido calórico de la leche materna (Lawrence, 1994). El principal carbohidrato presente en leche humana es la lactosa con una concentración de 6,5-7,3 g/dL, que se mantiene constante a lo largo del día y no se modifica por la dieta materna (Lawrence, 1994; Hamosh, 2001). La lactosa además de cumplir una función nutritiva, interviene en la absorción de calcio, magnesio y manganeso (Picciano, 2001). Aunque la lactasa presente en las microvellosidades de los enterocitos ya se encuentra activa desde el nacimiento, este disacárido aportado por la leche a los recién nacidos no se hidroliza completamente en el intestino delgado. La lactosa no-hidrolizada alcanza el colon y es utilizada por la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos (Coppa *et al*., 2006).

Además de la lactosa, la leche humana contiene glucolípidos, glucoproteínas y oligosacáridos (ver apartado 2.1.2.6) (Picciano, 2001).

2.1.1.3 Lípidos

Los lípidos son la segunda fracción mayoritaria de la leche humana y constituyen la principal fuente de energía para el lactante (40-55% del total). La composición lipídica de la leche humana es variable y depende de la dieta materna. Además de la variabilidad interindividual, su composición cambia a lo largo de la lactancia siendo su concentración en leche madura de 3,9 g/L (German & Dillard, 2006).

Los lípidos se hallan localizados en discretos compartimentos insolubles, de aproximadamente 1-10 μm de diámetro (Jensen, 2002). Estos glóbulos grasos están formados principalmente por triglicéridos (96%) sintetizados en el retículo endoplásmico de las células epiteliales mamarias. El glóbulo se encuentra envuelto por una membrana lipídica anfipática compuesta de colesterol, fosfatidilcolina y esfingomielina, además de glucolípidos, gangliósidos, glucoproteínas y mucinas. Esta membrana contribuye a estabilizar el glóbulo graso en forma de emulsión en el ambiente acuoso de la leche (German & Dillard, 2006).

Desde el punto de vista biológico, en los lípidos de la leche están incluidas las vitaminas liposolubles, los tri-, di- y monoglicéridos que contienen ácidos grasos (AG) saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (AGPI), AG *trans*, ácido linoleico conjugado (CLA), y una pequeña porción de AG libres, fosfolípidos y esteroides (Smit *et al*., 2002). Los diglicéridos, monoglicéridos y AG libres -resultantes de la hidrólisis de los triglicéridos que finaliza en el duodeno con la acción de las sales biliares y de la lipasa pancreática- aportan protección al neonato, dada su actividad antimicrobiana y antiviral. El ácido oleico es el AG con mayor actividad antimicrobiana tras ser liberado por hidrólisis de triglicéridos (Isaacs, 2001).

En la leche humana se han identificado más de 200 AG de distinta longitud e insaturación. Entre ellos se encuentran los siguientes AGPI: ácido linoleico (LA), ácido α-linolénico (ALA) y sus metabolitos de cadena más larga -ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA)-. Estos AG son abundantes en el cerebro y retina durante el desarrollo prenatal y posnatal, siendo necesarios para el óptimo desarrollo de las funciones visuales y cognitivas (Smit, 2002; German & Dillard, 2006; Innis, 2007).

El CLA es un AGPI presente en leche humana en cantidades variables. Su contenido en leche se halla influenciado por la edad de la madre, régimen alimenticio, edad, AG presentes en la dieta y estación del año (Field, 2005). Las funciones biológicas de este AG se tratan en detalle en el apartado 4.

2.1.1.4 Vitaminas

El contenido vitamínico de la leche humana está muy influenciado por la dieta materna y varía a lo largo de la lactancia (Lawrence, 1994; Picciano, 2001). Las vitaminas se clasifican en liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles (C, B_1, B_2, B_6 y B_{12}) y están presentes en la fracción lipídica y en el suero lácteo, respectivamente. La matriz de la cual forman parte las vitaminas es de gran importancia para su biodisponibilidad en leche (Picciano, 2001; Baldi & Pinotti, 2008).

Las vitaminas C, E y A son las más abundantes en leche humana y, además de propiedades nutricionales, poseen también efectos antioxidantes y antiinflamatorios debido a su capacidad secuestradora de radicales de oxígeno (Lawrence & Pane, 2007). En base a su contenido en leche humana, y en orden decreciente, también se encuentran las vitaminas B_6, B_2, D, K y B_{12} (Niers *et al*., 2007).

2.1.1.5 Minerales

En leche humana, los macrominerales mayoritarios, en concentraciones de 100-300 mg/mL, son el calcio, fósforo, magnesio, potasio y sodio. Estos dos últimos minerales se hallan en la fracción acuosa, a diferencia de los demás que se encuentran formando parte de la fracción lipídica de la leche (Picciano, 2001).

Los microminerales de mayor relevancia en la leche humana son el zinc, selenio, cobre e hierro. Las deficiencias de zinc y cobre en leche -asociadas a malnutrición- generan un estado de inmunodeficiencia caracterizado por linfopenia, alteración de las subpoblaciones de linfocitos T y secreción de citocinas. Las deficiencias de selenio descompensan los sistemas antioxidantes de defensa y dan paso a infecciones bacterianas y virales. El hierro tiene funciones opuestas en el neonato, mientras que su presencia favorece el crecimiento de bacterias en el lumen intestinal, su deficiencia provoca la disminución de la concentración de IgG y de la actividad fagocítica (Niers *et al*., 2007).

2.1.2 Factores inmunitarios de la leche

2.1.2.1 Inmunoglobulinas

La IgA secretora (sIgA) es el isotipo de Ig mayoritario en leche humana (80-90%), seguida de IgM e IgG. La concentración de sIgA es mayor en calostro (12 g/L) que en leche

madura (1 g/L). El descubrimiento de la presencia de IgA en leche humana -la cual difería de la presente en suero- condujo a la primera descripción del complejo sIgA, que está formado por la IgA dimérica y el componente secretor (Garofalo & Goldman, 1999; Van de Perre, 2003). En leche de madres malnutridas se ha detectado menor contenido de IgA, IgG, y del componente C4 del sistema del complemento (Miranda *et al.,* 1983; Picciano, 2001).

La función protectora de la sIgA se lleva a cabo principalmente a nivel de mucosas -a lo largo del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario- a través de mecanismos de neutralización y exclusión inmunitaria. Estos mecanismos tienen como objetivo prevenir o limitar la unión de microorganismos patógenos o macromoléculas al epitelio y su consiguiente paso a través de las membranas de las mucosas (Van de Perre, 2003; Hanson *et al*., 2005). La neutralización de los Ag evita la activación del sistema inmunitario como el aumento de IgM e IgG en suero y tejidos, y la consiguiente activación del sistema del complemento.

Además de poseer efectos antimicrobianos, las cadenas de carbohidratos de la sIgA promueven el crecimiento de *E. coli* de tipo 1 pili. Esta bacteria es de baja patogenicidad y compite por espacio y nutrientes con otras bacterias potencialmente patógenas en el intestino del neonato. Además se ha postulado que la sIgA interviene en la formación de una biopelícula de bacterias sobre la superficie epitelial del intestino, que promueve la colonización del intestino por parte de la microbiota bacteriana (Bollinger *et al*., 2003; Hanson, 2007).

2.1.2.2 Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una proteína mayoritaria en leche materna, cuya concentración es más elevada en calostro (5-7 g/L) que en leche madura (1-3 g/L). La LF pertenece a la familia de las transferrinas y está formada por dos dominios capaces de unirse al hierro. Esta proteína está presente en todas las secreciones exocrinas y en granulocitos (Hanson *et al*., 2005).

De toda la LF transferida al lactante, aproximadamente un 6-10% no es digerida por la tripsina y quimiotripsina y, por tanto, alcanza el colon donde ejerce efectos prebióticos, promoviendo el crecimiento de bifidobacterias (Coppa *et al*., 2006). La LF es bactericida para bacterias grampositivas y gramnegativas, y actúa mediante la desestabilización de la pared celular con la consiguiente liberación de LPS y ácido teicoico, respectivamente (Lawrence & Pane 2007). Además esta proteína tiene efectos antivirales y antimicóticos frente a *Candida albicans* (Hanson *et al*., 2005).

La LF tiene la capacidad de disminuir la infección causada por bacterias, virus y hongos, sin recurrir a mecanismos inflamatorios. Esta proteína es capaz de entrar en el núcleo de los leucocitos y bloquear la transcripción de NF-κB, que de otra manera induciría la producción de citocinas proinflamatorias: IL-1β, TNFα, IL-6 e IL-8 y, simultáneamente, induce la producción de citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 (Haversen *et al*., 2002; Field, 2005; Hanson, 2007).

2.1.2.3 Lisozima

La lisozima es una glucoproteína que aumenta en concentración a medida que transcurre la lactancia, alcanzando los 250 ng/mL a los 6 meses (Hanson *et al*., 2005). Esta enzima lisa la pared de bacterias grampositivas y algunas gramnegativas, mediante la hidrólisis del enlace entre N-acetilglucosamina y N-acetil ácido murámico, y por ello recibe también el nombre de muraminidasa (Hamosh, 2001; Gil & Rueda, 2002; Hanson *et al*., 2005). La lisozima incrementa la producción de sIgA y contribuye a la activación de los macrófagos (Hanson *et al*., 2005; Lawrence & Pane, 2007).

2.1.2.4 α-Lactoalbúmina

La α-lactoalbúmina posee actividad bactericida, ya que su digestión genera tres fragmentos polipeptídicos que actúan contra un amplio rango de bacterias (Hanson *et al*., 2005; Goldman, 2007). La α-lactoalbúmina también induce apoptosis en células linfoides, embrionarias y transformadas, mediante una estructura derivada denominada HAMLET (*human α-lactoalbumin made letal to tumor cells*). HAMLET actúa entrando en el núcleo de las células donde se acumula, se une a histonas e interrumpe la organización de la cromatina (Hanson *et al*., 2005).

2.1.2.5 Nucleótidos

Los nucleótidos presentes en leche humana se hallan en mayor concentración en calostro (53-58 g/L) que en leche madura (33 g/L). Su función es favorecer el desarrollo de la mucosa intestinal e intervenir en procesos de reparación tras trastornos diarreicos, además de ejercer un efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal (Garofalo & Goldman, 1999; Coppa *et al*., 2006).

En cuanto a la actividad inmunomoduladora de los nucleótidos, cabe destacar que estimulan la inmunidad humoral y celular, mediante el incremento de los niveles plasmáticos de IgA, IgM e IgG, así como favoreciendo la maduración y función de linfocitos T, la actividad de células NK, la actividad de macrófagos y también la producción de IL-2 (Field, 2005; Wheleer *et al.,* 2007).

2.1.2.6 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son carbohidratos de gran complejidad y variabilidad sintetizados en la glándula mamaria. El núcleo de la molécula está formado por repetidas uniones de galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetil-ácido neuramínico, fucosa y/o ácido siálico (Boehm & Stahl, 2007; Espinosa *et al*., 2007). Los oligosacáridos son el tercer componente mayoritario de la leche humana, después de la lactosa y lípidos. Alcanzan la máxima concentración en calostro (20 g/L) y disminuyen hasta una concentración estable (12-14 g/L) en leche madura (Coppa *et al*., 2006).

En cuanto a la función de los oligosacáridos, su fracción neutra resiste a la digestión alcanzando el colon donde estimula el desarrollo de la microbiota bífida. Así, los oligosacáridos constituyen la fibra soluble de la leche materna y ejercen acción prebiótica, ya que son el sustrato adecuado para el desarrollo de bacterias beneficiosas tales como *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*. Los oligosacáridos son además conocidos como "falsos receptores de patógenos", ya que por su similitud con los glicanos -receptores de patógenos- se unen a los patógenos y evitan la infección, entre otros de *Campylobacter jejuni* (Coppa *et al*., 2006).

Por otra parte, la fracción ácida de los oligosacáridos previene la adhesión de bacterias patógenas a la superficie intestinal. Además está involucrada en reacciones del sistema inmunitario como la interacción con selectinas durante los procesos inflamatorios (Boehm & Stahl, 2007; Lawrence & Pane, 2007).

2.1.2.7 Citocinas

La leche humana contiene una gran variedad de citocinas y quimiocinas, entre las que se encuentran IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNFα, IFNγ, TGF (*transforming growth factor*) β, G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), MCP-1 (*monocyte chemotactin protein-1*) y RANTES (Field, 2005; Lawrence & Pane 2007; Wheeler *et al*., 2007).

TGFβ favorece la adquisición de tolerancia oral y reduce las reacciones inflamatorias en el intestino del neonato, promoviendo la producción de sIgA y suprimiendo la producción de IL-2 por parte de linfocitos T. TNFα e IL-6 contribuyen a la síntesis de IgA. IL-7 promueve el desarrollo de las placas de Peyer y de las criptas en el intestino, y específicamente de las células Tγδ. La IL-10 posee propiedades antiinflamatorias y, junto a TGFβ, promueve la adquisición de tolerancia oral en el neonato (revisado en Hanson *et al*., 2005).

2.1.2.8 Leucocitos

La leche materna contiene leucocitos, siendo su contenido en leche calostral (1-3 x 10^6/mL) superior al de leche madura (1 x 10^5/mL). La mayoría de leucocitos son macrófagos (55-60%), seguidos de neutrófilos (30-40%) y linfocitos (5-10%) (Brandtzaeg, 2003; Field, 2005; Niers *et al.,* 2007).

- Macrófagos

Los macrófagos de leche materna se encuentran activados, ya que poseen actividad fagocítica y secretan citocinas tales como IL-1β, IL-6 y TNFβ de forma espontánea. Además, estos macrófagos contienen receptores específicos para sIgA que al unirse con sIgA y entrar en contacto con bacterias intestinales aumentan la producción de prostaglandina (PG)E_2 y el proceso oxidativo (Field, 2005; Hanson *et al*., 2005).

- Neutrófilos

En leche humana, los neutrófilos se encuentran en estado de activación ($CD11b^+$), y presentan menor capacidad de adherencia -por sus bajos niveles de L selectina-, polaridad y motilidad. La función principal de los neutrófilos parece ser la protección materna, ya que su capacidad funcional es limitada una vez han sido secretados a la leche (Field, 2005, Hanson *et al*., 2005).

- Linfocitos

La mayor parte de linfocitos en leche humana son linfocitos T (83%) -sobretodo linfocitos CD8 activados-, seguidos de células NK (11%) y por último linfocitos B (6%). Los linfocitos T activados de origen materno compensan la función de los linfocitos T neonatales y promueven su maduración. Estos linfocitos pueden atravesar el intestino del lactante,

pudiendo así modular el sistema inmunitario del neonato y compensar su escaso número de linfocitos T memoria (Field, 2005; Niers *et al.,* 2007).

2.1.2.9 Probióticos

Se ha demostrado que la leche humana, lejos de ser un fluido estéril constituye una fuente de bacterias comensales para el intestino del lactante (Martin *et al*., 2003). Entre las bacterias presentes en leche, las más frecuentes son las especies *Staphilococcus, Lactococcus, Enterococcus* y *Lactobacillus* (Fuller, 1989; Parracho *et al*., 2007) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Especies bacterianas aisladas de leche materna de mujeres sanas. Tabla modificada de Lara-Villoslada *et al*., 2007.

Grupo bacteriano	
Staphylococcus spp.	*Streptococcus spp.*
S. epidermis	*S. salivarus*
S. hominis	*S. mitis*
S. captis	*S. parasanguis*
S. aureus	*S. peores*
Lactobacillus spp.	*Enterococcus spp.*
L. gasseri	*E. faecium*
L. rhamnosus	*E. faecalis*
L. acidophilus	
L. plantarum	
L. fermentun	
L. salivarus	
L. reuteri	

Las bacterias probióticas ejercen principalmente actividad antimicrobiana, posiblemente mediante la producción de compuestos tales como ácidos orgánicos, H_2O_2, y/o bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (Olivares *et al*., 2006). Algunas bacterias presentes en leche humana mejoran la función de la barrera intestinal, incrementando la producción de mucina y reduciendo su permeabilidad. Sin embargo, el mecanismo antiinfeccioso más efectivo de estas bacterias probióticas es la competición con bacterias enterotóxicas por nutrientes y

por lugares de unión en el epitelio intestinal (Olivares *et al*., 2006; Lara-Villoslada *et al*., 2007).

La frecuencia de episodios de alergia en niños lactantes alimentados con leche materna es inferior a la de lactantes alimentados con fórmulas infantiles. El efecto antialérgico de los probióticos es mediado por la modificación del balance Th1/Th2. Así, los probióticos inducen respuestas de tipo Th1 y disminuyen la producción de citocinas Th2, responsables de la respuesta alérgica (Lara-Villoslada *et al*., 2007).

2.1.2.10 Otros componentes

Las defensinas son un grupo de péptidos antimicrobianos, con capacidad citotóxica contra bacterias grampositivas, gramnegativas, micobacterias, hongos y algunos virus encapsulados. Estos péptidos se encuentran en leche humana a concentraciones de 1-10 ng/mL (Hanson *et al*., 2005).

La leche humana, tanto calostral como madura, contiene gran cantidad del receptor CD14 soluble, cuya principal función es mediar la activación de las células epiteliales que no expresan este receptor para LPS. Además esta molécula promueve la expansión y diferenciación de linfocitos B (revisado en Hanson *et al*., 2005).

En leche materna se encuentran numerosas hormonas y factores de crecimiento, incluyendo cortisol, estrógenos, progesterona, eritropoyetina (EPO), gonadotropina, insulina, leptina y *epidermal growth factor* (EGF). La EPO es producida por las células epiteliales de la glándula mamaria y parece tener un papel importante en el desarrollo del intestino, del sistema nervioso e inmunitario del neonato. La prolactina y EGF son agentes inmunomoduladores que actúan en el intestino. El primero de ellos induciendo IL-2 y el segundo estimulando la activación de linfocitos T, macrófagos y células NK (Garofalo & Goldman, 1999; Field, 2005; Hanson *et al*., 2005).

2.2 Fórmulas infantiles

Desde hace 25 años se adopta el código "*International Code of Marketing of Breast-Milk Substitutes*" por la organización mundial de la salud (OMS). El propósito de este código es contribuir al suministro de una nutrición adecuada y segura para los lactantes -mediante la promoción y protección de la lactancia materna-, y asegurar el correcto uso de sustitutos de leche materna, cuando sea necesario, basándose en una adecuada información y a través de la distribución y marketing adecuado (Heird, 2007). A lo largo

del siglo XIX y XX, con el progreso de las técnicas analíticas y un mejor conocimiento de la composición de la leche, se elaboraron preparados más idóneos para lactantes. Los preparados se producían a partir de diferentes formulaciones, lo que llevó a aplicar el término de "fórmulas infantiles" a estos sustitutos de la leche materna (Woodruff, 1981).

A lo largo de los últimos 25 años, la composición en macrominerales de las fórmulas infantiles, que simulan la composición de la leche materna, ha sufrido pocos cambios cuantitativos. Sin embargo, se han llevado a cabo numerosos cambios cualitativos para mimetizar aún mejor la composición de la leche materna (Heird, 2007). Así, los avances sucesivos en el conocimiento de la composición de la leche materna y de sus funciones fisiológicas, han permitido desarrollar nuevas fórmulas infantiles y modificar aquellas ya existentes. Sin embargo, la leche materna contiene algunos factores inmunitarios, factores de crecimiento, enzimas y células vivas, que no pueden ser añadidos a las fórmulas infantiles. Además, los preparados alimenticios no están adaptados a las variaciones que se producen en la leche materna a lo largo de la lactancia (Carver, 2003; Lawrence, 2007).

Según el Real Decreto 72/1998, las fórmulas infantiles deben contener una composición de nutrientes básica y aportar entre 60-75 kcal/100 mL. Los preparados a partir de proteínas de leche de vaca deben tener un contenido proteico de 1,8-3 g/100 kcal. El contenido en aminoácidos esenciales y semiesenciales debe alcanzar como mínimo el de la leche materna. El contenido en taurina debe ser equivalente a 42 μmoles/100 kcal y el contenido de L-carnitina de 75 μmoles/100 kcal. Hoy en día se hace gran énfasis en la adición de probióticos y prebióticos a las fórmulas infantiles que simulen la composición de la leche materna, debido a sus beneficios demostrados en el desarrollo del sistema inmunitario del lactante (Fanaro & Vigi, 2008).

La mezcla de lípidos está especialmente diseñada para lograr una absorción intestinal óptima y proporcionar una cantidad adecuada de AGPI. Concretamente, se permite la adición de aceite de soja, aceite de oliva, aceite de coco y otras grasas poliinsaturadas, pero se prohíbe el uso de aceite de sésamo y aceite de algodón. El contenido de lípidos en las fórmulas debe hallarse entre 4,4 y 6,5 g/100 kcal.

Según la fuente de proteína utilizada se pueden distinguir tres tipos diferentes de fórmulas infantiles. Las fórmulas pueden ser preparadas a partir de:

- Proteínas de leche de vaca
- Hidrolizados de proteínas de leche de vaca
- Proteínas de soja

2.2.1 Fórmulas a base de proteínas de leche de vaca

El proceso para obtener este tipo de fórmulas consiste en utilizar suero lácteo desmineralizado de leche de vaca, como ingrediente base. En este lactosuero se ajusta la relación entre caseína y el resto de proteínas. A continuación, se le agrega lactosa, vitaminas y minerales, junto con una mezcla de aceite, que normalmente procede de aceites vegetales (Aggett *et al.*, 2001; Macé *et al*., 2006).

En relación a este tipo de fórmulas, cabe destacar las diferencias existentes entre la leche humana y la leche de vaca, no sólo en cuanto a composición, sino también en la proporción de sus componentes. En la **Tabla 3** se referencian los componentes de la leche humana y bovina.

El contenido proteico en leche de vaca es tres veces superior al de leche humana. Además, su composición varía considerablemente en la proporción existente de caseína, proteínas de suero lácteo y nitrógeno no proteico. En la leche de vaca estas proporciones son de 78:17:5, respectivamente; mientras que en leche humana son de 35:45:25, respectivamente. En cuanto al contenido proteico, la caseína humana está constituida por las formas β y κ, mientras que en la leche de vaca predomina la forma α-caseína, ausente en leche humana (Aggett *et al*., 2001; Macé *et al*., 2006; Sabikhi, 2007). El predominio de la caseína en fórmulas infantiles comporta un porcentaje elevado de aminoácidos aromáticos, tirosina y fenilalanina. Finalmente, la leche de vaca aporta un bajo contenido de nitrógeno no proteico, concretamente de nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, ácido úrico, urea y poliaminas (Macé *et al*., 2006).

En cuanto a las proteínas de suero lácteo, en leche humana se halla principalmente la α-lactoalbúmina, sIgA y LF mientras que en leche de vaca predomina la β-lactoalbúmina, -principal alérgeno alimentario de la leche de vaca- e IgG. En la leche de vaca no se encuentra IgA y están presentes sólo trazas de LF y de lisozima, por lo que la leche bovina presenta una menor capacidad defensiva para los neonatos humanos que la leche materna (Alonso *et al*., 2004; Macé *et al*., 2006).

En la leche humana existe mayor concentración de AGPI de cadena larga que en la de vaca, predominando los AGS (Macé *et al*., 2006). Por otra parte, el contenido de lactosa presente en leche de vaca es aproximadamente el doble del presente en leche humana, mientras que los oligosacáridos están prácticamente ausentes en leche de vaca (Sabikhi, 2007).

Tabla 3. Composición media de la leche madura humana y bovina. Modificada de Emmett *et al*., 1997.

Nutrientes (g/100 mL)	Leche humana	Leche bovina
Agua	87,10	87,80
Proteína	1,30	3,20
Grasas	4,10	3,90
Hidratos de carbono	7,20	4,80
Energía (kcal)	69,00	66,00
Nitrógeno total	0,20	0,50
AG saturados	1,80	2,40
AG monoinsaturados	1,60	1,10
AGPI	0,50	0,10
Colesterol	0,016	0,014

2.2.2 Fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de leche de vaca

Las fórmulas a base de hidrolizados de proteínas de leche de vaca fueron introducidos en el mercado en 1942, para tratar la alergia o intolerancia a las proteínas presentes en leche de vaca. Así, las proteínas predigeridas -en forma de aminoácidos libres o pequeños péptidos- aportan nutrientes de menor alergenicidad al organismo. La caseína bovina se hidroliza mediante técnicas de tratamiento térmico o hidrólisis enzimática, o su combinación, y una fase posterior de ultracentrifugación (Macé *et al*., 2006).

2.2.3 Fórmulas a base de proteínas de soja

Las fórmulas a base de proteínas de soja están disponibles desde hace ya 100 años, y se utilizaron por primera vez en niños alérgicos a las fórmulas infantiles a base de proteínas de leche de vaca. Desde entonces, su formulación ha cambiado a lo largo de los años. En la actualidad, este tipo de fórmulas infantiles están libres de proteínas de leche de vaca y lactosa, y aportan 67 kcal/100 mL (Bhatia *et al*., 2008).

La proteína presente en estas fórmulas infantiles está aislada de la soja, y suplementada con L-metionina, L-carnitina y taurina, de forma que en total aportan entre 2,45 y 2,8 g de proteína/100 kcal. La fracción lipídica presente proviene en su totalidad de aceites vegetales como el de soja, palma, girasol y coco, y varía de 5,02 a 5,46 g/100 kcal. En

estas fórmulas, las fuentes de hidratos de carbono son maltodextrina de maíz, jarabe de maíz o sacarosa, en una proporción aproximada de 10,95 g/100 kcal (Bhatia *et al*., 2008).

Aunque las fórmulas a base de proteínas de soja no son recomendables para neonatos a pretérmino, son altamente recomendadas para lactantes con galactosemia y deficiencia de lactasa hereditaria, o en situaciones en las cuales se prefiera una dieta vegetariana (Bhatia *et al*., 2008).

3 EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

3.1 Estructura, nomenclatura y fuentes alimenticias de ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son cadenas hidrocarbonadas de longitud variable que tienen en un extremo terminal un grupo carboxilo y en el otro un grupo metilo. El grupo carboxilo es reactivo y forma fácilmente uniones de tipo éster con grupos alcohol; de forma que la reacción con el colesterol o el glicerol, da lugar a ésteres de colesterol y acilgliceroles, respectivamente. Los AG más abundantes en la naturaleza son los de cadena lineal con un número par de carbonos. Los AG pueden ser saturados, cuyos carbonos están unidos por enlaces sencillos, monoinsaturados (AGMI) con un único doble enlace entre carbonos adyacentes o poliinsaturados (AGPI) con dos o más enlaces dobles. Dentro de los AGPI, los AG que contienen más de cuatro enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada se les denomina AG altamente poliinsaturados (AGAPI) (Akoh, 2006).

El nombre que reciben los AG está determinado por el número de carbonos y el número de dobles enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada (**Tabla 4**). En el caso de los AG insaturados existen varias características que deben ser claramente designadas para su correcta identificación, como la posición y configuración de los dobles enlaces. En la cadena hidrocarbonada, los dobles enlaces pueden estar en múltiples posiciones y cada uno de ellos puede estar en configuración *cis* o *trans*. La posición de los dobles enlaces se identifica nombrando el número del carbono que participa en el doble enlace, siendo el carbono 1 el que se encuentra en el extremo terminal carboxilo. La mayoría de AG insaturados tienen los dobles enlaces en configuración *cis*. Sin embargo, los dobles enlaces *trans* están presentes en productos intermedios de la biosíntesis de grasas de rumiantes, aceites vegetales y de algunos aceites de semillas. Hoy en día se utiliza ampliamente una nomenclatura más corta para la identificación de los AG. Ésta se basa en identificar el número de átomos de carbono en la cadena acilada, el número de dobles enlaces y la posición del primer doble enlace, donde el carbono del extremo metilo o carbono omega (ω) es el número 1. Además de estas dos nomenclaturas, frecuentemente los AG se identifican por sus nombres comunes (Calder & Field, 2002).

Tabla 4. Nomenclatura y fuentes de ácidos grasos. Modificada de Calder & Field, 2002

Nombre IUPAC	Nombre común	Abreviatura	Fuentes endógenas y exógenas
Ácido Decanoico	Ácido Cáprico	10:0	Síntesis d*e novo*, aceite de coco
Ácido Dodecanoico	Ácido Laúrico	12:0	Síntesis d*e novo*, aceite de coco
Ácido Tetradecanoico	Ácido Mirístico	14:0	Síntesis d*e novo*, leche
Ácido Hexadecanoico	Ácido Palmítico	16:0	Síntesis d*e novo*, leche, huevos, grasa animal, carne, manteca de cacao, aceite de palma (otros aceites vegetales contienen menores cantidades), aceites de pescado
Ácido Octadecanoico	Ácido Esteárico	18:0	Síntesis d*e novo*, leche, huevos, grasa animal, carne, manteca de cacao
Ácido 9-Hexadecanoico	Ácido Palmitoleico	16:1n-7	Desaturación del ácido palmítico, aceite de pescado
Ácido 9-Octadecanoico	Ácido Oleico (OA)	18:1n-9	Desaturación del ácido esteárico, leche, huevos, grasa animal, carne, manteca de cacao, la mayoría de aceites vegetales
Ácido 9,12-Octadecanoico	Ácido Linoleico (LA)	18:2n-6	No es sintetizado en mamíferos, algunas leches, huevos, grasa animal, carne, manteca de cacao, la mayoría de aceites vegetales (especialmente de maíz, girasol, cártamo y soja, hojas verdes)
Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico	Ácido α-Linolénico (ALA)	18:3n-3	No es sintetizado en mamíferos, hojas verdes, algunos aceites vegetales (especialmente colza, soja y semillas de lino)
Ácido 6,9,12-Octadecatrienoico	Ácido γ-Linolénico (GLA)	18:3n-6	Sintetizado a partir del ácido oleico, aceite de onagra
Ácido 11,14,17-Eicosatrienoico	Ácido aguamiel	20:3n-9	Sintetizado a partir del ácido oleico
Ácido 8,11,14-Eicosatrienoico	Ácido Dihomo-γ-linolénico (DGLA)	20:3n-6	Sintetizado a partir del ácido γ-linolénico
Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico	Ácido Araquidónico (AA)	20:4n-6	Sintetizado del ácido linoleico a través de los ácidos γ-linolénico y dihomo-γ-linolénico, carne
Ácido 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	20:5n-3	Sintetizado del ácido α-linolénico, aceite de pescado
Ácido 7,10,13,16,19-Docosapentaenoico	Ácido Docosapentaenoico (DPA)	22:5n-3	Sintetizado del ácido α-linolénico vía ácido eicosapentaenoico
Ácido 4,7,10,13,16,19-Docosahexanoico	Ácido Docosahexaenoico (DHA)	22:6n-3	Sintetizado del ácido α-linolénico vía ácido eicosapentaenoico, aceite de pescado

Existen tres grandes familias de AGPI, de acuerdo a la posición del primer doble enlace en la cadena acilada: los ω-3 o n-3, los ω-6 o n-6 y los ω-9 o n-9. Los miembros más sencillos de cada familia (menor número de carbonos y dobles enlaces) son el ácido α-linolénico (18:3n-3, ALA) y el ácido linoleico (18:2n-6, LA), que reciben el nombre de AG esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por mamíferos y deben ser aportados a través de la dieta (**Figura 3**). A diferencia de los ω-3 y ω-6, los ω-9 no se consideran AG esenciales. El ácido oleico (18:1n-9, OA) es el miembro más simple de los ω-9 y se encuentra presente principalmente en el aceite de oliva. El LA está presente sobretodo en los aceites de semillas: germen de trigo, girasol, maíz, cártamo, soja, pepita de uva y cacahuete, y en las margarinas. Por el contrario, el ALA se encuentra en vegetales de hojas verdes, en algunos aceites vegetales como el de soja, colza y linaza, y en las nueces (Shaikh & Edidin, 2006a; Yaqoob & Calder, 2007). El LA y el ALA también contribuyen al 95% de la ingesta total de AGPI en la mayoría de dietas occidentales. Debido al incremento de la ingesta de LA, frente a ALA, la relación de AGPI n-6/n-3 ha incrementado y actualmente se halla entre 5 y 20 en la mayoría de poblaciones occidentales (Calder, 2008).

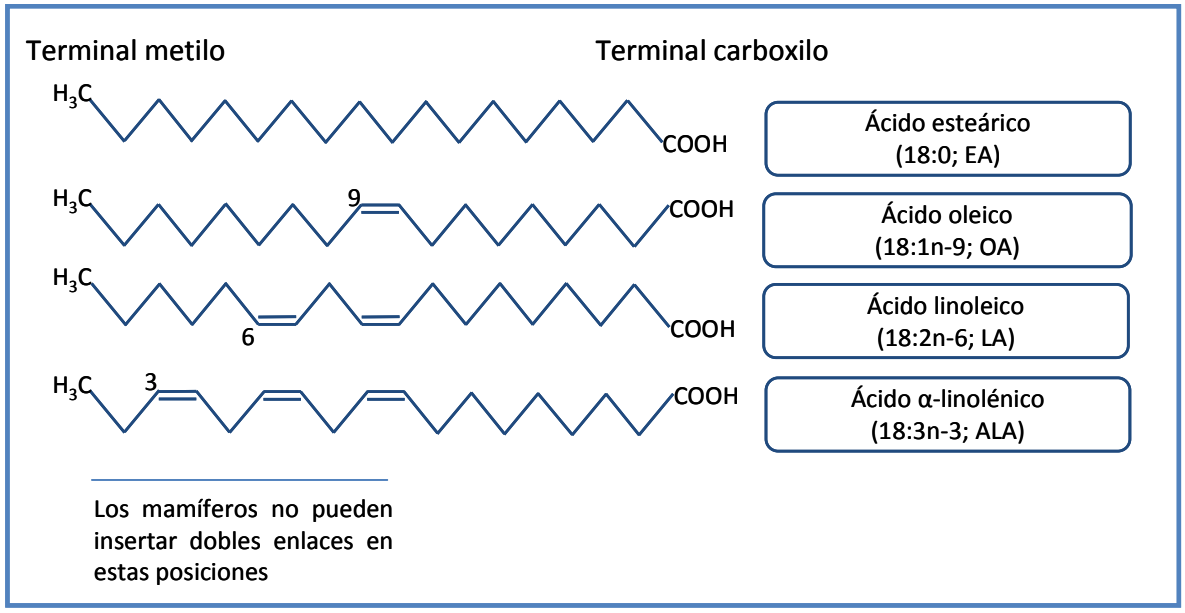

Figura 3. Estructura de ácidos grasos representativos de las diversas familias: AG saturados e insaturados en posiciones n-9, n-6 y n-3. Modificada de Calder & Field, 2002.

Ambos AG esenciales son elongados y desaturados en las células animales formando AGPI de las familias n-3 y n-6 de cadena más larga, y con mayor número de dobles enlaces (**Figura 4**). Respecto a la vía de síntesis de los n-6, el LA se convierte en ácido γ-linolénico (18:3n-6, GLA) y, posteriormente, en ácido dihomo-γ-linolénico (20:3n-6, DGLA), para formar finalmente ácido araquidónico (20:4n-6, AA). En cuanto a

los n-3, el ALA se convierte en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), mediante el mismo conjunto de enzimas que cataliza las reacciones del AA. El EPA continúa siendo metabolizado para convertirse en ácido docosapentaenoico (22:5n-3, DPA) y, finalmente, al docosahexaenoico (20:6n-3, DHA). En seres humanos, la vía de formación de AA es cualitativamente la más importante en el metabolismo de los AGPI, puesto que las cantidades ingeridas de LA son superiores a las de ALA (Akoh, 2006).

La ingesta de AGPI de cadena superior a 18 carbonos y 2 insaturaciones, es mucho menor que la de LA y ALA. Algunos aceites vegetales contienen GLA y DGLA, sin embargo, la ingesta de estos AG a partir de la dieta es inferior a 10 mg/día. El AA se encuentra en carne y vísceras, y su ingesta aproximada es de 50-500 mg/día. En cuanto a los AGPI de la familia n-3, el EPA, DPA y DHA se encuentran en pescado, especialmente en aquellos denominados "pescados grasos", como el atún, salmón, sardina, arenque y caballa. Una comida a base de pescado aporta entre 1,5 y 3,5 g de estos AGPI de cadena larga de la serie n-3. En ausencia de consumo de pescado, la ingesta de éstos AG es inferior a 100 mg/día (Mataix & Gil, 2004).

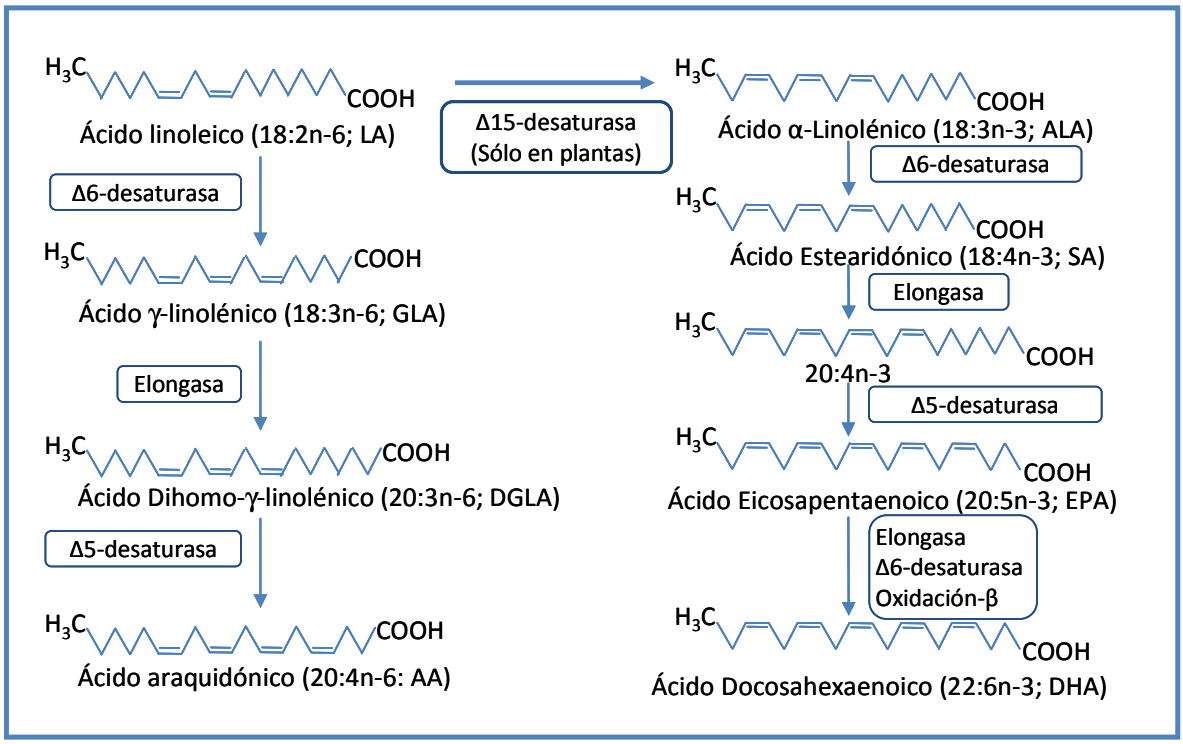

Figura 4. Vía de síntesis de los AGPI n-3 y n-6. Modificada de Akoh, 2006.

3.2 Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados

La ingesta de AGPI en la dieta comporta la incorporación de éstos en todas las células del organismo, por lo que intervienen en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre ellos los del sistema inmunitario y, por tanto, influyen en la respuesta inmunitaria. Los AGPI son importantes como fuente de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares, como moléculas de señalización y como reguladores de la expresión génica. A través de esta variedad de mecanismos, los AG pueden modificar la funcionalidad de las células del cuerpo humano (**Figura 5**).

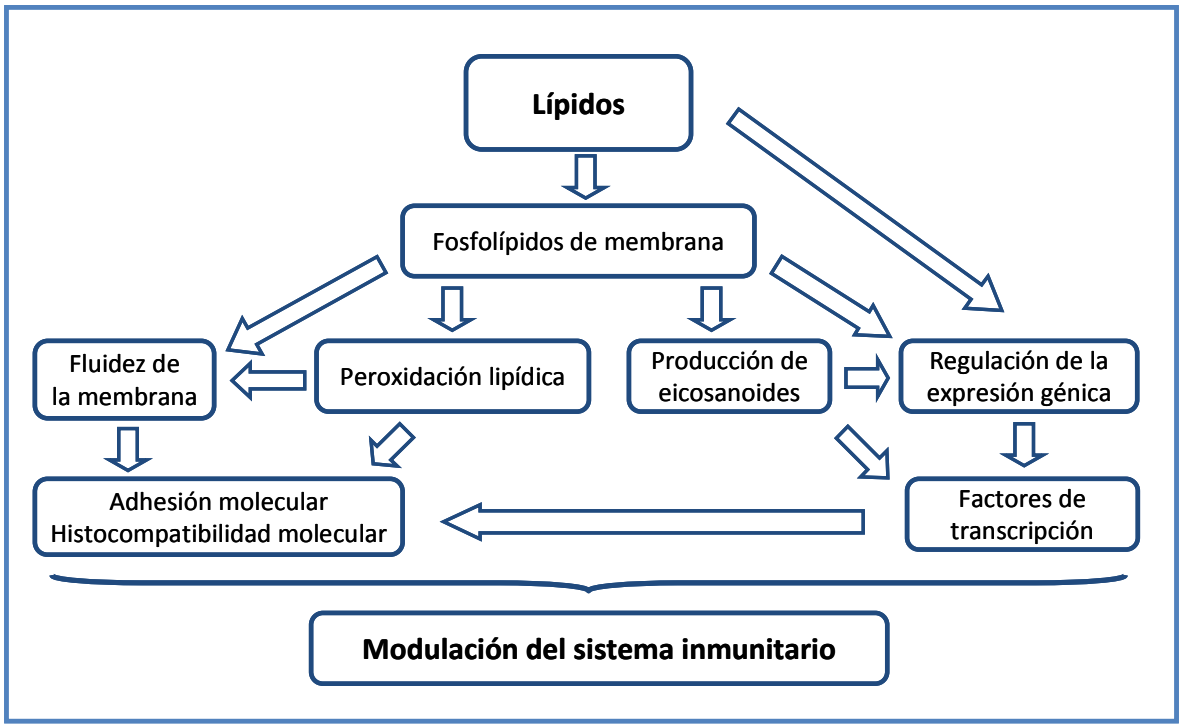

Figura 5. Mecanismos de acción implicados en el efecto de AGPI sobre la respuesta inmunitaria. Modificada de de Pablo *et al*., 2000.

3.2.1 Efecto en la biosíntesis de eicosanoides

Un factor común entre AG, procesos inflamatorios y respuesta inmunitaria, es un grupo de mediadores bioactivos denominados eicosanoides. Los eicosanoides son una familia de derivados oxigenados -procedentes de AA, DGLA y EPA- que incluyen prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE) e hidroxiecosatetraenoicos (HETE). Debido a la elevada proporción de AA en las membranas, en comparación con DGLA y EPA, el AA es el principal precursor de la síntesis de eicosanoides. El AA liberado de las membranas por la fosfolipasa A_2, es el

sustrato para las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX), que originan PG y TX de la serie 2, LT de la serie 4, y HETE y HEPTE de la serie 5 (Calder & Field, 2002). La presencia de eicosanoides, al igual que la de enzimas, es específica para cada tejido, siendo por ejemplo los monocitos y macrófagos los mayores productores de PGE_2.

Los eicosanoides -principalmente PGE_2 y LTB_4- modulan la intensidad y duración de los procesos inflamatorios. La PGE_2 posee efectos proinflamatorios ya que induce fiebre, aumenta la permeabilidad vascular y causa vasodilatación; sin embargo, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como son TNFα, IL-1 e IL-6. El LTB_4 es un agente quimiotáctico de leucocitos, que induce la liberación de enzimas lisosomales, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), e incrementa la actividad de células NK e inhibe la proliferación linfocítica; pero a diferencia de PGE_2, estimula la producción de citocinas proinflamatorias. El AA da origen a mediadores que producen efectos antagónicos entre sí, por lo que el resultado fisiológico está determinado por el balance entre dichos mediadores y la sensibilidad de las células diana (Calder & Field, 2002; Akoh, 2006).

La incorporación de pescado en la dieta aumenta los niveles de EPA en las membranas de las células -incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos- a expensas del AA y por tanto existe menor cantidad de sustrato disponible para la síntesis de eicosanoides derivados de AA. Los AGPI n-3, además de inhibir la actividad de la fosfolipasa A_2 en macrófagos y la actividad de COX sobre el AA, sirven de sustrato para las enzimas COX y LOX. El EPA da origen a PG de la serie 3 (PGE_3) y a LT de la serie 5 (LTB_5), que son mediadores menos potentes que los sintetizados a partir del AA (Yaqoob *et al.*, 1994a; Calder, 2008).

3.2.2 Efecto en la organización de la membrana y señalización celular

Los AGPI ingeridos en la dieta son incorporados en las membranas celulares, formando parte de los fosfolípidos, y modificando su estructura y función. Los AGPI alteran las propiedades físicas de las membranas, como la microviscosidad y fluidez; sin embargo, afectan particularmente la composición de microdominios de membrana, denominados *lipid rafts*. Los *lipid rafts* son microambientes dinámicos, presentes en la región exoplásmica de la bicapa fosfolipídica de las membranas y ricos en AG saturados, esfingolípidos, colesterol y proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Simons & Ikonen, 1997; Stulnig, 2003; Worgall, 2008). Los *lipid rafts* actúan de plataformas que facilitan la selección apical, la migración celular, la asociación entre moléculas de

señalización y las interacciones entre distintos tipos celulares (Katagiri *et al*., 2001; Yaqoob, 2003).

Los AGPI se unen a una posición específica de los fosfolípidos de membrana (*sn-2*), tanto en los *lipid rafts* como en el resto de membrana plasmática. Estos AG son incorporados en los lípidos que residen principalmente en la región externa de la membrana (fosfatidilcolina, esfingomielina), pero también en aquellos que se encuentran en la región interna (fosfatidiletanolamina). Los AGPI desplazan selectivamente las proteínas aciladas presentes en la cara interna, mientras que no afectan a aquellas ancladas en la cara externa (Stulnig & Zeyda, 2004). El efecto del desplazamiento proteico es más pronunciado tras el tratamiento con EPA que con DHA (Stulnig, 2003). Asimismo, en linfocitos T de ratón, los AGPI n-3 disminuyen significativamente el contenido de esfingomielina de los *lipid rafts* (Fan *et al*., 2003; Kaboudiris & Juri, 2008).

La activación de las moléculas receptoras presentes en los *lipid rafts,* por un ligando extracelular, da lugar a su agrupamiento. Este mecanismo es importante en la transducción de señales en linfocitos T y B. El TCR se agrupa en los *lipid rafts* al entrar en contacto con la APC, formando una "sinapsis inmunológica" o zona de contacto, donde se inicia la señalización intracelular. Por esta razón, la activación de linfocitos T se utiliza como modelo de estudio de la señalización celular a través de los *lipid rafts*.

La activación del TCR se inicia al desfosforilar las quinasas Lck y Fyn, de la familia de las quinasas Src, que se encuentran en la región citoplasmática de los *lipid rafts* (Yaqoob, 2003; Kaboudiris & Juri, 2008). Los AGPI, y en particular EPA, acilan los residuos de estas dos proteínas ocasionando su desplazamiento de los *lipid rafts*, e inhibiendo la transducción de la señal de linfocitos T. La fosforilación de estas quinasas -en la vía de señalización de los linfocitos T- permite la activación de otras proteínas adaptadoras involucradas en la activación de linfocitos T: *linker for activation of T cells* (LAT) y fosfolipasa C (PLC). El tratamiento con EPA inhibe la fosforilación de LAT, hecho que ocasiona su desplazamiento de los *lipid rafts* y, por tanto, una menor fosforilación de PLC. Este hecho implica disminución del calcio intracelular (Shaikh & Edidin, 2006a, 2006b, 2008) y, en consecuencia, menor activación celular. Un aspecto interesante es que la activación del TCR en linfocitos Th1 está mediada por los *lipid rafts*, mientras que no lo está en linfocitos Th2 (Katagiri *et al*., 2001; Yaqoob & Calder, 2007).

Los AGPI también afectan el factor de intercambio de nucleótidos (VAV), que al ser fosforilado, controla el reordenamiento del citoesqueleto para la formación de la sinapsis inmunológica. EPA evita la fosforilación de VAV, por lo que la interacción entre APC y TCR resulta defectuosa. Por otra parte, DHA y EPA al incorporarse en la membrana modifican el contenido de los *lipid rafts*, originando el desplazamiento de las

subunidades de IL-2 y la activación de la fosfolipasa D, que en conjunto emiten señales antiproliferativas (Yaqoob, 2003; Shaik & Edidin, 2006a, 2006b, 2007, 2008).

3.2.3 Efecto en la expresión génica

Los AG -especialmente los AGPI- son capaces de modular la expresión génica, ya sea de forma directa -mediante la interacción con receptores nucleares o de forma indirecta- a través de cascadas de señalización que a su vez alteran la actividad de factores de transcripción (Stulnig, 2003). Respecto a los genes involucrados en la respuesta inmunitaria, los AGPI regulan la expresión génica de citocinas, moléculas de adhesión y otras proteínas inflamatorias. Estas acciones parecen ser mediadas por la interacción de los AGPI y sus metabolitos con receptores intracelulares, que actúan como factores de transcripción cuando son activados por la unión a un ligando (Deckelbaum *et al*., 2006).

Un grupo de factores de transcripción de gran importancia, debido a su papel en los procesos inflamatorios son los *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR). Los PPAR actúan a través de la dimerización con el receptor retinoide-X. Existen cuatro isoformas de PPAR -α, β, δ y γ-, que aunque tienen funciones distintas están relacionadas entre si (Khan & Vanden Heuvel, 2003). PPARγ predomina en células de línea mieloide, mientras que PPARα se expresa constitutivamente en linfocitos. PPARγ posee selectividad por los AG insaturados y se ha demostrado que dicha unión inhibe la secreción de TNFα, IL-6 e IL-1β en monocitos, al igual que inhibe la producción de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en macrófagos y de IL-2 en linfocitos T (Stulnig, 2003).

La acción antiinflamatoria de los AGPI está mediada por la activación de los PPAR regulando de forma negativa la transcripción de otros factores nucleares, principalmente de NF-κB, que a su vez regula la expresión de citocinas proinflamatorias. Además, la activación de PPAR inhibe la cascada de señalización *activator protein* (AP)-1 y el factor nuclear de linfocitos T activados (NF-AT) (Bordoni *et al.,* 2006) (**Figura 6**).

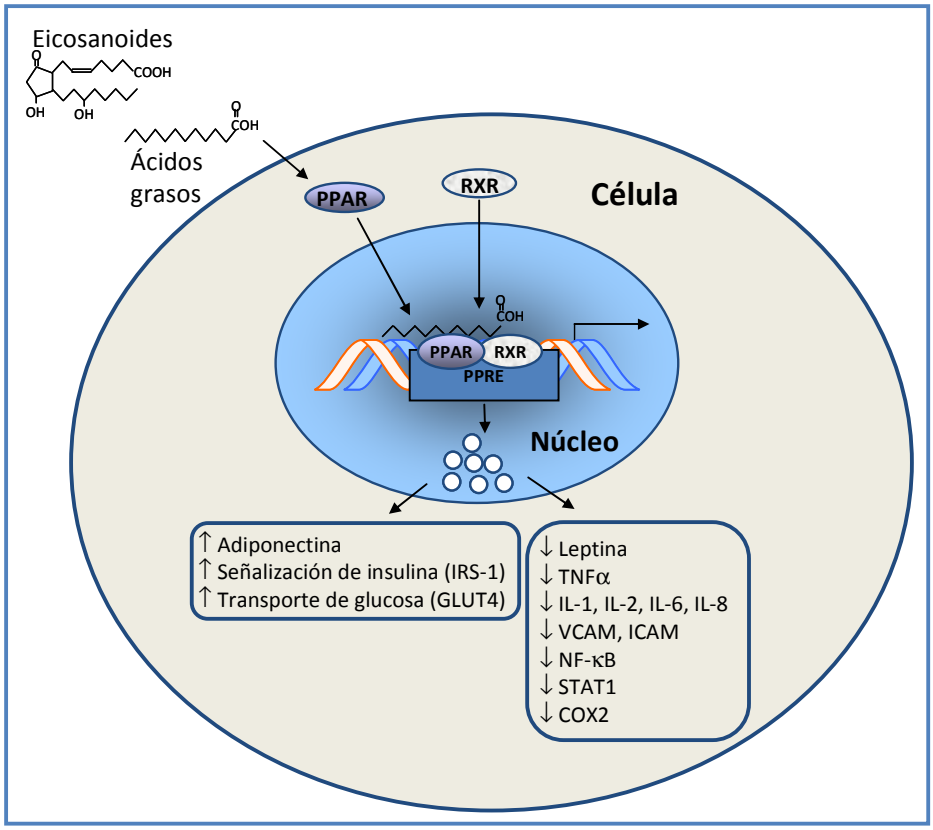

Figura 6. Mecanismo de acción de los AGPI en la expresión génica a través de receptores PPAR. ↑, activación de transcripción; ↓, inhibición de transcripción. Modificada de Enke *et al*., 2008.

3.3 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la respuesta inmunitaria innata

La mayoría de estudios que comparan los efectos de dietas ricas y pobres en AGPI sobre la respuesta inmunitaria innata -tanto en animales como en humanos- concluyen que las dietas ricas en AGPI disminuyen este tipo de respuesta, aunque su efecto preciso depende de la naturaleza y cantidad de AGPI ingerido, así como de la especie animal estudiada.

3.3.1 Influencia sobre la actividad de las células NK

Las células NK participan en la protección frente a virus, bacterias intracelulares o células tumorales. Estudios en roedores han demostrado que los AGPI reducen la actividad de las células NK (Yaqoob *et al*., 1994b; Miles & Calder, 1998; Calder & Field, 2002). Las dietas que contienen aceite de pescado o de oliva, ricos en AGPI n-3 producen el mayor porcentaje de inhibición, mientras que los AGPI n-6 no afectan la actividad de dichas

células (revisado en Sasaki *et al*., 2000, de Pablo & Álvarez de Cienfuegos, 2000, Harbige, 2003, Shaikh & Edidin, 2008). La **Tabla 5** resume el efecto del suplemento con AGPI n-3 sobre la respuesta inmunitaria en distintas especies animales.

En diferentes estudios se han investigado los efectos de AGPI n-3 de cadena larga sobre la actividad de células NK en sujetos sanos, mostrando resultados similares a los anteriores. Concretamente, estos estudios demuestran que dosis elevadas de DHA y EPA inhiben la actividad de células NK, mientras que a dosis bajas no se observan efectos significativos (revisado en Yaqoob *et al*., 2000, Miles *et al*., 2006, Sijben & Calder, 2007). En la **Tabla 6** se incluyen de forma resumida los estudios del efecto del aceite de pescado (DHA+EPA) sobre el sistema inmunitario, llevados a cabo en voluntarios sanos.

3.3.2 Influencia sobre la actividad de macrófagos

Dado que la producción de citocinas por parte de macrófagos está regulada por eicosanoides y que los AGPI afectan la síntesis de eicosanoides, cabe esperar que los AGPI afecten la producción de citocinas. Ahora bien, los estudios experimentales muestran una gran variabilidad en función de la especie animal, el origen de los macrófagos, la naturaleza y dosis de AGPI, el estímulo utilizado, y el tipo de suero presente en los cultivos. En general, una dieta rica en AGPI n-3 disminuye la producción *ex vivo* de TNF en roedores, aunque otros estudios muestran incremento o ningún efecto sobre éste (Wallace *et al*., 2000; Albers *et al*., 2003) (**Tabla 5**). Al igual que la producción de citocinas, en animales de laboratorio también existe gran variabilidad en cuanto a los efectos de los AGPI sobre la producción de ROS como superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Richard *et al.,* 2008).

Los efectos de AGPI sobre la producción de citocinas son más consistentes en sujetos sanos. De veinticuatro estudios llevados a cabo en humanos -con un rango de dosis desde 0,3 hasta 6 g de EPA+DHA/día-, un porcentaje considerable muestran que los AGPI n-3 de cadena larga disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias (Trebble *et al*., 2003, Rees *et al*., 2006, Sijben & Calder, 2007) (**Tabla 6**). Además, el suplemento con EPA+DHA en el rango entre 3,1 y 8,4 g/día reduce la producción de ROS por parte de monocitos y neutrófilos humanos (Calder, 2006). Las **Figuras 7** y **8** esquematizan, entre otras, la acción de los AGPI n-3 y n-6, respectivamente, sobre la actividad de los macrófagos.

Tabla 5. Efecto del suplemento con AGPI n-3 sobre el sistema inmunitario en distintas especies animales

Especie	Edad	AGPI	Dosis	Duración	Citocinas / mediadores	Proliferación	Referencia
Rata	3 sem	AP	20%	10 sem	↔ IL-2	↓ esplenocitos, timocitos, MLN	Yaqoob *et al.,* 1994c
Rata	3 sem	OA	20%	6 sem		↓ esplenocitos, ↓ activación NK	Jeffery *et al.,* 1996a/1996b
Ratón	6 sem	EPA/DHA	1%	10 días	↓ IL-2	↓ esplenocitos	Jolly *et al.,* 1997/1998
Ratón	6 sem	EPA/DHA	4,4%	6 sem	↓ PGE_2	↓ esplenocitos, ↓activación NK	Peterson *et al*., 1998
Ratón	7 sem	AP	20%	6 sem	↓ IFNγ, IL-4, IL-2, TNFα, IL-1β de M∅		Wallace *et al.,* 2000
Ratón	Jóven	AP	2%	2 sem	↓ IL-2	↓ esplenocitos	Arrington *et al.,* 2001
Ratón	Adulto	AP	10%	3 sem	↓ IL-2		Harbige & Fisher, 2001
Ratón	8-10 sem	AP	18%	2 sem	↓ IL-2	↓ esplenocitos	Pompos & Fritsche, 2002
Ratón	Adulto	AP	2-9%	2 sem		↑ apoptosis T	Switzer *et al*., 2003
Ratón	Jóven	DHA	1%	2 sem	↓ IFNγ, IL-10		Ly *et al*., 2006
Vaca	6-7 años	LA	125/250 μM	4 días		↑esplenocitos	Thanasak *et al*.,2005
Ratón	Jóven	AP	5%	2 sem	↑ Th2/Th1		Zhang *et al*., 2005a
Rata	3 sem	AGPI n-3	30%	8 sem		↓ esplenocitos	Pizato *et al*., 2006
Rata	Adulto	AP	15,4%	90 días	↓ IL-15, TNFα, IFNγ, IL-4, IL-10 de IEL		Wang *et al.,* 2008
Gato	Adulto	AGPI n-3	7,6%	26 sem	↔	↔	Jaso-Friedmann *et al*., 2008

AP, aceite de pescado; IEL, linfocitos intraepiteliaes; MLN, ganglios linfáticos mesentéricos; sem, semanas; ↑, aumento; ↓, reducción; ↔, ningún efecto.

3.4 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la respuesta inmunitaria adquirida

3.4.1 Influencia sobre la proliferación linfocítica

Los estudios que han evaluado los efectos de los AGPI sobre la actividad linfocítica han concluido que dietas ricas en AGPI están asociadas con la supresión de la proliferación de linfocitos T (revisado en Sijben & Calder, 2007) (**Tablas 5** y **6**).

Estudios en diferentes especies animales han demostrado que los AGPI n-3 de cadena larga disminuyen la respuesta proliferativa de linfocitos T y B, la producción de IL-2 e IFNγ, la reacción de hipersensibilidad retardada y la presentación antigénica (Wallace *et al*., 2000, Harbige & Fisher, 2001, revisado en Shaikh & Edidin, 2008) (**Tabla 5**). En la **Figura 7** se esquematizan los efectos de los AGPI n-3 sobre los mecanismos de respuesta inmunitaria. La adición de bajas concentraciones de AGPI n-6 a cultivos celulares de linfocitos incrementa su proliferación, mientras que altas concentraciones inhiben estas funciones *in vitro* (Harbige, 2003). En la **Figura 8** se muestran los efectos de los AGPI n-6, sobre estos mismos mecanismos de respuesta inmunitaria.

En ambos casos, el efecto de los AG sobre la proliferación de linfocitos depende también del origen de las subpoblaciones linfocíticas. Estudios comparativos en roedores alimentados con AGPI han mostrado que la inhibición de la proliferación en linfocitos esplénicos es mayor que la inhibición observada en timocitos (de Pablo & Álvarez de Cienfuegos, 2000).

Se han llevado a cabo más de una docena de estudios en voluntarios sanos sobre el efecto de EPA+DHA a la dosis comprendida entre 0,2 y 7 g/día sobre la proliferación linfocítica *ex vivo* (**Tabla 6**). Aunque en todos los casos se utilizaron células mononucleares de sangre periférica, los estímulos y el suero presente en los cultivos celulares fue diferente. Aproximadamente una cuarta parte de estos estudios observaron una disminución de la proliferación linfocítica, sin embargo, en muy pocos de ellos dicha disminución fue significativa (Bechoua *et al.,* 2003, Sijben & Calder, 2007). En general, los individuos de mayor edad son más sensibles que los jóvenes a los efectos de los AGPI n-3 de cadena larga (Thies *et al*., 2001) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Efecto del suplemento con aceite de pescado (EPA+DHA) sobre el sistema inmunitario en voluntarios adultos sanos

Estudio	Dosis (g/día)	Duración (semanas)	Sujetos		Efectos *ex vivo*		Referencia
			Sexo	Edad (años)	Mediadores	Proliferación*	
DC, PC, R, P	0,2	6	H/M	70-83		↓ 45%	Bechoua *et al*., 2003
DC, PC, R, P	0,4-0,8	15	H/M	18-72	↔	↔	Schmidt *et al*., 1996; Blok *et al*., 1997; Thies *et al*., 2001; Hawkes *et al*., 2002; Kew *et al*., 2003; Wallace *et al*., 2003; Miles *et al*., 2004; Vega-López *et al*., 2004; Rees *et al*., 2006
DC, PC, R, P	0,9	12	H	18-39	↓ 45% IL-6 monocitos		Wallace *et al.,* 2003
A, P	1,0	4	H	Media: 30	↓ 84% IL-6;↓ 66% TNFα monocitos		Trebble *et al.,* 2003
DC, PC, R	1,1	5	H	Media: 60	↓ 10% IL-6		Ciubotaru *et al.,* 2003
A, PC, P	1,23	24	H	Media: 65	↓ 50% IL-1β, TNFα	↓ 40%	Meydani *et al*., 1993
A	1,3	6-8	H/M	18-36	↓ 87% IL-1β, IL-6		Cooper *et al.,* 1993
DC, PC, R, P	1,6-1,9	15	H/M	Media: 33	↔	↔	Miles *et al*., 2004, 2006
A, P	2	4	M	Media: 30	↑ 220% IFNγ	↑ 92%	Trebble *et al*., 2003
A, P	2,4	12	H	Media: 61		↓ 36%	Meydani *et al*., 1991
DC, PC	2,4	6	H	24-48	↓ 52% IL-2		Virella *et al*., 1991
DC, PC, R, P	3,3-4,9	4-6	H/M	Media: 44	↔	↔	Yaqoob *et al*., 2000; Kew *et al.,* 2004
DC, PC, R, P	3,3-4,95	23	H	Media: 25	↑ 72% IL-4		Miles *et al*., 2006
A	5,2	26	H/M	20-59	↓ 20-40% IL-2,IFNγ		Gallai *et al*., 1995

Los efectos se evaluaron sobre PBMC (células mononucleares de sangre periférica). DC, doble-ciego; PC, placebo-controlado; R, randomizado; A, abierto; P, paralelo; H, hombre; M, mujer; ↑, aumento; ↓ reducción; ↔, ningún efecto. *Proliferación de PBMC. Modificación de Sijben & Calder, 2007.

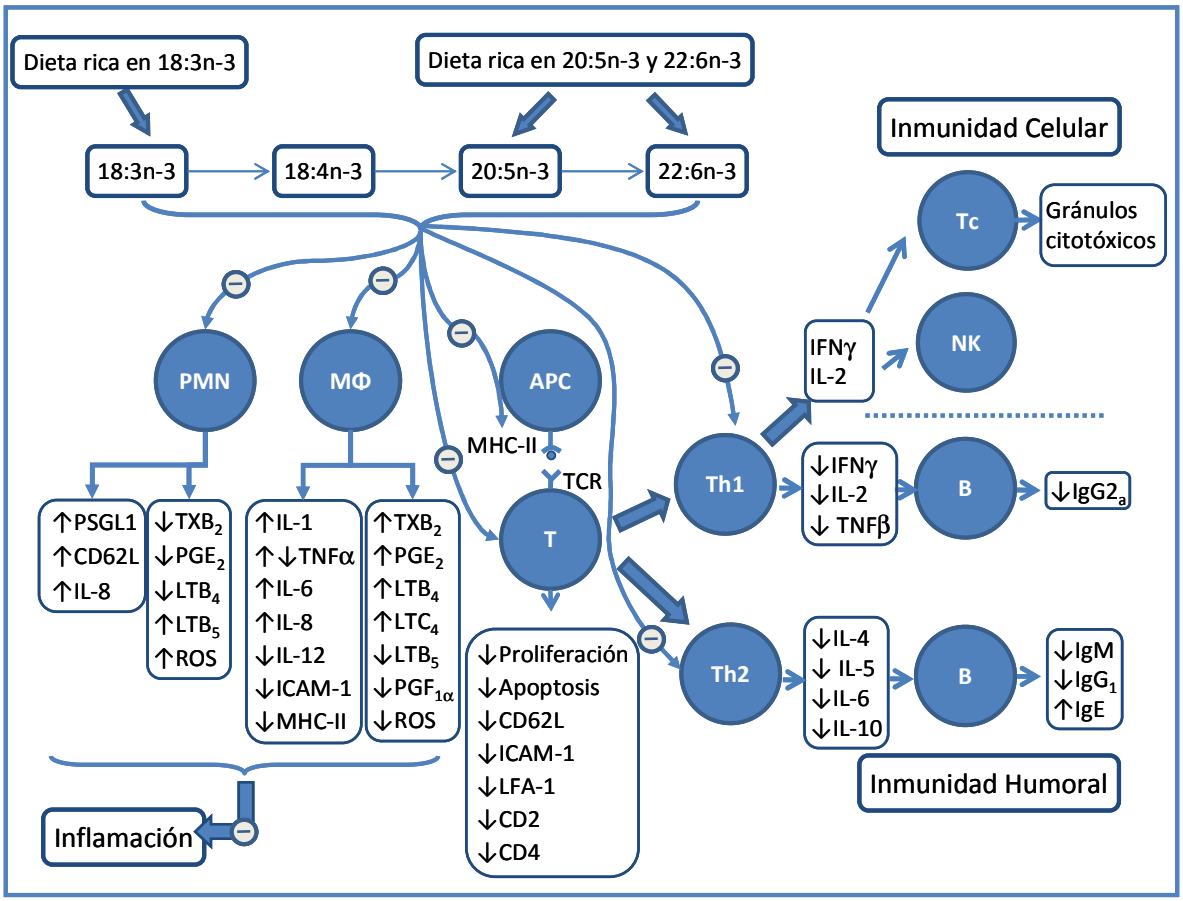

Figura 7. Efectos de una elevada ingesta de AGPI n-3 en las funciones inmunitarias. PMN, células polimorfonucleares; MΦ, macrófagos; Th, T helper (1) (2); MHC-II, complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; TCR, receptor de linfocito T; CD, grupo de diferenciación; LFA-1, antígeno de función leucocítica; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular; PSGL1, molécula de adhesión de tipo mucina; IL, interleucina; TNFα, factor de necrosis tumoral α, β; IFNγ, interferon γ; PGE_2, prostaglandina E_2; $PGF_{1\alpha}$, producto estable de la prostaciclina; TXB_2, tromboxano B2; $LTB_{4(5)}$, leucotrieno $B_{4(5)}$; LTC_4, leucotrieno C_4; ROS, especies reactivas de oxígeno. Las flechas que conducen a las superficies celulares indican aumento o disminución de la expresión, en el caso de citocinas y eicosanoides indican producción/secreción. Modificada de Harbige, 2003.

En relación a la producción de citocinas, ésta no se ve afectada tras la adición de bajas concentraciones de EPA+DHA. Sin embargo, concentraciones elevadas disminuyen la producción de IL-2 e IFNγ (Trebble *et al*., 2003). Otros estudios muestran un incremento de la producción de IL-2, IL-4, IL-10 e IFNγ (Miles *et al.,* 2004, Sijben & Calder, 2007) (**Tabla 6**).

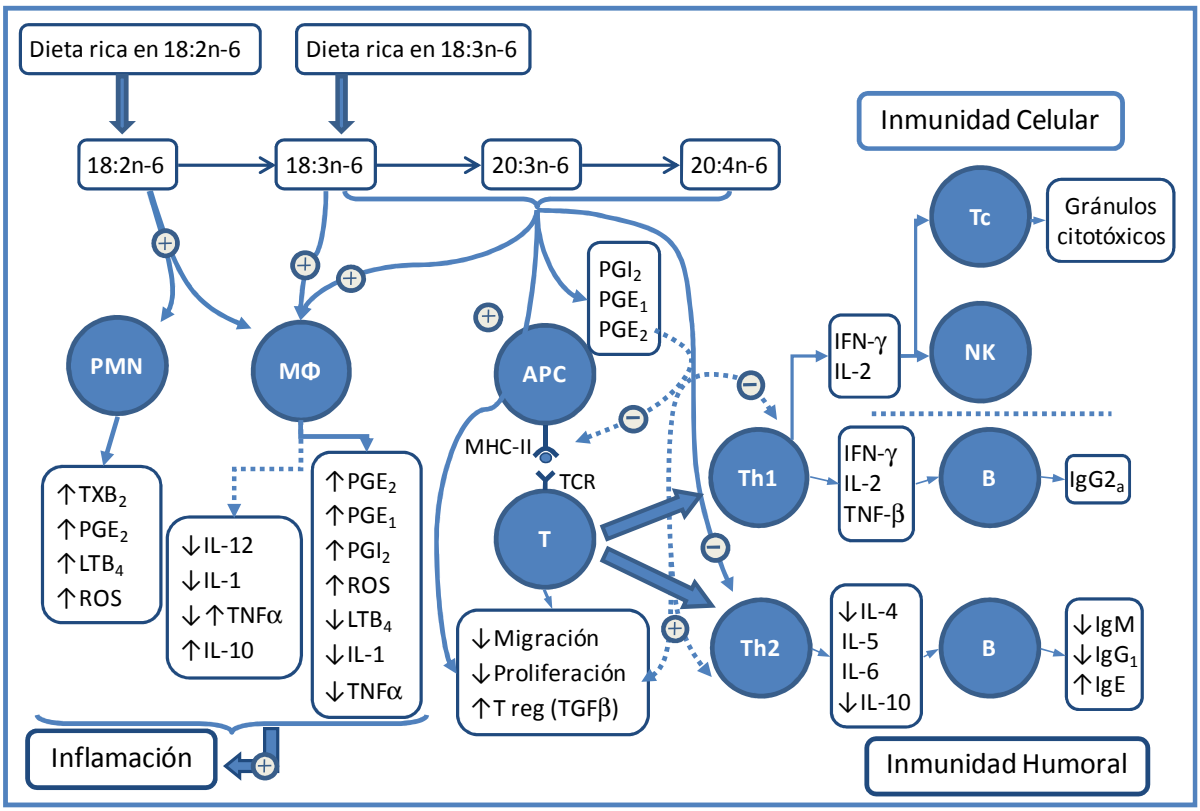

Figura 8. Efectos de los AGPI n-6 y sus metabolitos eicosanoides en las funciones inmunitarias. PMN, células polimorfonucleares; MΦ, macrófagos; APC, células presentadoras de antígeno; Th, T helper (1) (2); MHC-II, complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; TCR, receptor de linfocito T; T_{reg}, linfocito T regulador; IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral α, β; IFNγ, interferon γ; PGE_2, prostaglandina E_2; PGI_2, prostaciclina 2; $PGF_{1\alpha}$, producto estable de la prostaciclina; TXB_2, tromboxano B2; $LTB_{4(5)}$, leucotrieno $B_{4(5)}$; LTC_4, leucotrieno C_4; ROS, especies reactivas de oxígeno. Las flechas que conducen a las superficies celulares indican aumento o disminución de la expresión, en el caso de citocinas y eicosanoides indican producción/secreción. Las líneas continuas representan los efectos de los AGPI *in vivo* o *ex vivo*, y las líneas punteadas representan los efectos de los eicosanoides establecidos en estudios *in vitro*. Modificada de Harbige, 2003.

3.4.2 Influencia sobre la presentación antigénica y producción de anticuerpos

La adición de AGPI a cultivos celulares o tratamientos con dietas ricas en AGPI causan una disminución de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en la superficie celular, así como de la capacidad de presentación antigénica por APC (Hughes & Pinder, 1997; Weatherill *et al.,* 2005; Schweitzer *et al.,* 2006, Shaikh & Edidin, 2008). Sin embargo, la baja expresión de MHC de clase II en la superficie no es suficiente para disminuir la presentación antigénica. Por otra parte, otros estudios han descrito una cierta reducción en la expresión de MHC de clase I (Shaikh & Edidin, 2007). En este sentido, estos autores sugieren que dichos cambios se deben a la modificación

por parte de AGPI de la unión linfocito T-APC, alterando posiblemente la formación de la sinapsis inmunológica.

Existen pocos estudios sobre el efecto de AGPI sobre la producción de Ac, sin embargo algunos estudios han demostrado la reducción de IgM e IgG tras dietas ricas en AGPI n-6. En estudios *ex vivo*, estos mismos AGPI a concentraciones elevadas inhiben IgM, IgG e IgA y al mismo tiempo incrementan IgE (Harbige, 2003). Por otra parte se ha mostrado el efecto potenciador de AGPI n-3 en la producción de Ac. Estudios *in vivo* han mostrado que el suplemento con una dieta rica en aceite de pescado a ratones incrementa la producción de IgG e IgE frente a ovoalbúmina (OVA). Sin embargo, otros estudios muestran disminución de IgG1-Ag específica, tras suplementar con aceite de pescado (Harbige, 2003).

3.5 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en enfermedades mediadas por el sistema inmunitario

Si bien la respuesta inflamatoria normalmente es protectora, en determinadas circunstancias tiene lugar de forma incontrolada e inapropiada, lo cual genera un daño excesivo en los tejidos. Una característica común en estos casos es la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y eicosanoides. Dichos mediadores se encuentran asociados al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas -como la enfermedad inflamatoria intestinal-, enfermedades autoinmunes -como la artritis reumatoide y la diabetes-, y otras mediadas por el sistema inmunitario –como las alergias-. Además de la estrecha asociación con enfermedades inflamatorias clásicas, la inflamación está implicada en la patogenia de otras enfermedades, como la enfermedad cardiovascular, en la progresión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y en enfermedades neurodegenerativas. Debido a que el tejido adiposo es una fuente importante de citocinas inflamatorias, cabe destacar otras patologías como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes de tipo 2 (Calder, 2006; Sijben & Calder, 2007).

EPA y DHA se incorporan en las células a expensas del AA, principal precursor de eicosanoides inflamatorios como la PGE_2 y LTB_4, siendo sustrato para la producción de mediadores de menor capacidad inflamatoria que los producidos por AA, denominados antiinflamatorios (Calder, 2008). La **Tabla 7** resume algunos estudios representativos sobre los efectos de los AGPI n–3 en la evolución de diversas patologías con base inmunitaria en voluntarios sanos.

3.5.1 Enfermedad inflamatoria intestinal

La colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal. La UC afecta principalmente a la mucosa del colon, mientras que la CD puede afectar gran parte del tracto gastrointestinal, aunque normalmente se localiza en íleon y colon. Estas enfermedades se caracterizan por la elevada producción de LTB_4, PGE_2 y TXB_2 por parte de neutrófilos, y de citocinas proinflamatorias procedentes de macrófagos.

Por una parte, se ha demostrado que una elevada ingesta de AGPI n-6 promueve el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal y su perpetuación (Calder, 2006). Por otra parte, numerosos estudios llevados a cabo en modelos animales -la mayoría en colitis inducida por sustancias químicas-, muestran efectos antiinflamatorios de los AGPI n-3. Algunos estudios se han realizado con dietas ricas en ALA y han mostrado efectos antiinflamatorios y menor daño colónico. Sin embargo, se desconoce si los efectos se deben a ALA o a la conversión de éste a derivados más insaturados como el EPA, ya que dietas ricas en aceite de pescado muestran resultados contradictorios (revisado en Calder, 2008). Un estudio reciente sobre colitis inducida con sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratones fat-1, los cuales son capaces de sintetizar AGPI n-3 a partir de AGPI n-6, mostró menor inflamación y daño colónico que en ratones control alimentados con una dieta rica en AGPI n-6 (Hudert *et al*., 2006). Los efectos antiinflamatorios observados en todos los estudios se han asociado a la reducción de eicosanoides derivados del AA, como LTB_4, PGE_2 y TXB_2.

Ensayos clínicos han demostrado que AGPI n-3 de cadena larga en dosis comprendidas entre 2,7 y 5,6 g/día ejercen efectos beneficios sobre las manifestaciones clínicas, la histología de la mucosa colónica, la valoración sigmoidoscópica, la tasa de relapso y la disminución en el uso de corticoides en la enfermedad inflamatoria intestinal. Otros estudios llevados a cabo en pacientes voluntarios que además de seguir una dieta con aceite de pescado, se les administró AGPI n-3 directamente en la mucosa intestinal, observaron efectos antiinflamatorios, como disminución de la producción de LTB_4 por parte de neutrófilos, PGE_2 y TXB_2 en la mucosa colónica y PGE_2 e INF-γ en sangre periférica (revisado en Calder, 2008) (**Tabla 7**).

3.5.2 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad recurrente, inflamatoria, crónica, que afecta a las articulaciones y a numerosos tejidos del organismo. Las lesiones articulares

se caracterizan por infiltración sinovial de macrófagos activados, linfocitos T y células plasmáticas, así como proliferación de sinoviocitos. El líquido sinovial de pacientes con AR contiene elevados niveles de TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-8, COX-2, PGE_2 y LTB_4 (Feldmann & Maini, 1999).

Los efectos de EPA+DHA a dosis de 2,9 a 5,9 g/día sobre los mediadores inflamatorios presentes en pacientes con AR se reflejan en una disminución de citocinas proinflamatorias, concentración sérica de CRP y producción de LTB_4 por parte de neutrófilos. Por ello, se considera que los AGPI n-3 de cadena larga ejercen cierto papel protector sobre la AR (Sijben & Calder 2007) (**Tabla 7**). El efecto beneficioso de AGPI n-3 sobre la AR, resulta potenciado con la disminución de la ingesta de AGPI n-6, especialmente la de AA, ya que es precursor de eicosanoides implicados en el desarrollo de esta enfermedad (Calder, 2006).

3.5.3 Alergia

Las enfermedades alérgicas constituyen un importante problema de salud durante el primer año de vida del niño, siendo las más frecuentes el asma, rinitis y la dermatitis atópica. La alimentación exclusiva con leche materna se ha asociado con una menor incidencia y desarrollo atenuado de alergias alimentarias. Dicha protección se debe a la presencia de AGPI n-3 de cadena larga en leche materna (Hoppu *et al*., 2005; Field *et al*., 2008). Se ha demostrado que el consumo de AGPI n-3 por parte de la madre durante la lactancia modifica el perfil de citocinas y el desarrollo de alergias en la infancia, siendo el efecto superior cuando dicho consumo se inicia ya en la gestación (Calder *et al*., 2006). De hecho, un elevado consumo de DHA y EPA desde la semana 20 de gestación hasta el día del parto disminuye la concentración de las citocinas IFNγ, IL-13, IL-10, IL-5 en plasma de cordón umbilical, tras estimulación con varios alérgenos. Además, en niños con dermatitis atópica se han encontrado bajos niveles de AGPI n-3 en eritrocitos y sangre de cordón umbilical, así como en eritrocitos, leucocitos y leche de las madres (Dunstan *et al*., 2003; Calder *et al*., 2006).

Tabla 7. Efectos del aceite de pescado (EPA+DHA) sobre la evolución de enfermedades en pacientes voluntarios.

Estudio	Dosis (g/día)	Duración (semanas)	Sujetos		Patología	Efectos		Referencia
			Sexo	Edad (años)		Mediadores	Manifestaciones	
DC, PC	2,7	52	H/M	18-75	CD		↓ 41% relapso	Belluzzi *et al*., 1996
PC, R	5,6	26	H/M	Adultos	UC	↓ IL-2, IL-2R, LTB_4		Almallah *et al*., 2000
DC, PC, R	2,7	24	H/M	Media: 45	CD	↓ 50% IFNγ		Trebble *et al*., 2004
DC, PC, R	4	58	H/M	Media: 40	CD	↔	↔	Feagan *et al.,* 2008
DC, PC, R	3,2	12	H/M		AR	↓ IL-1β		Esperson *et al*., 1992
DC, R	4,2	12	H/M	Media: 57,4	AR	↓ 34% LTB_4, ↓ 15% TBX_2	↓ 14% rigidez	Adam *et al*., 2003
A	0,2 g/kg*	0,7	H/M	27-81	AR		↓ 1,5 DAS28	Leeb *et al*., 2006
DC, PC, R	5	16	H/M		Psoriasis	↔	↔	Soyland *et al*., 1994
DC, PC, R	3,7	18	M	Embarazadas	DA	↓ IL-13 en suero neonato		Dunstan *et al*., 2003
DC, PC, R	5,4	8	H/M	27	DA	↓ IgE en PBMC	↓ 18% SCORAD	Koch *et al*., 2008
A	3,2	7	H	24	Diabetes	↓ 50% proliferación		Molvig *et al*., 1991
DC, PC, R, A	3,8	6	H/M	40-75	Diabetes	↔		Mori *et al*., 2003

AR, artritis reumatoide; CD, enfermedad de Crohn; DA, dermatitis atópica; UC, colitis ulcerosa. DAS28, síntomas de la actividad de la enfermedad teniendo en cuenta 28 articulaciones; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; SCORAD, puntuación de la enfermedad. *La dosis fue administrada por vía intravenosa. Modificada de Sijben & Calder, 2007

3.6 Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en el desarrollo del neonato

Los períodos fetal y neonatal son claves en la adaptación del sistema inmunitario del niño a su entorno. En este sentido, gran parte de las alergias y enfermedades inflamatorias en la edad adulta tienen su inicio en estos períodos cruciales. Se ha postulado que el tratamiento con AGPI de cadena larga (AGPI-CL) en el período fetal y/o neonatal puede modificar el repertorio de citocinas y prevenir el desarrollo de enfermedades durante la infancia o edad adulta (Lauritzen *et al*., 2005; Gottrand, 2008).

3.6.1 Influencia de los AGPI-CL durante el embarazo y la lactancia

La ingesta de AGPI-CL por parte de la madre determina los niveles de éstos transferidos al feto. Los requerimientos intrauterinos de AGPI n-3 y n-6 durante el último trimestre del desarrollo fetal y las primeras semanas de vida se estiman alrededor de 50 y 400 mg/kg/día, respectivamente (Herrera, 2002; Koletzo *et al*., 2008). El 80% de DHA y AA intrauterino se acumula en los últimos tres meses de gestación, debido a que es en este período cuando se desarrolla el tejido adiposo del feto (Fleith & Clandinin, 2005). Por tanto, los lactantes nacidos a pretérmino se encuentran en desventaja en cuanto al suministro de DHA y AA necesarios para su maduración. El AA es esencial para el crecimiento del feto, mientras que DHA tiene un papel fundamental en el desarrollo del cerebro y en la función visual. En cerebro, los lípidos constituyen el 50% de su peso seco y aproximadamente la mitad son AGPI-CL. Estos AG transferidos al feto no se originan en la placenta, ya que ésta no es capaz de transformar GLA en AA, sin embargo, tiene la habilidad de extraer AGPI-CL de la circulación materna y transportarla al feto, de ahí que la concentración de AGPI-CL sea superior en el feto que en sangre materna (Herrera, 2002). La transferencia la madre al feto, por vía placentaria, se lleva a cabo en el siguiente orden decreciente: DHA, ALA, OA y, finalmente, AA (Herrera, 2002, Enke *et al*., 2008).

Entre otros AGPI-CL, la leche materna proporciona LA, ALA, DHA y AA al lactante. El nivel de AA es relativamente constante, sin embargo el nivel de DHA es muy variable y depende de la dieta materna y del estilo de vida (Yuhas *et al*., 2006). El AA se encuentra en la leche humana en un rango de 0,35-0,7% de los AG, mientras que el de DHA varía de 0,17 a 1% (Koletzko, 2008).

3.6.2 Influencia de los AGPI-CL sobre el sistema inmunitario de neonatos

Algunos estudios han demostrado que el suplemento con AGPI-CL en la edad temprana influencia el desarrollo del sistema inmunitario. Estos estudios muestran que los AGPI n-3 tienen influencia sobre funciones de linfocitos T, principalmente en la maduración y secreción de citocinas (Lauritzen *et al*., 2005; Gottrand, 2008). En lactantes alimentados con leche materna o con fórmula infantil suplementada con AGPI-CL, se observa un incremento en la proporción de linfocitos T $CD4^+$ y de linfocitos B. Los linfocitos T $CD4^+$ de estos lactantes expresan más CD45RO -marcador de madurez antigénica- y menos CD45RA -marcador de inmadurez antigénica- (Field *et al*., 2000). En términos generales, se considera que la adición de AGPI-CL n-3 durante el período de lactancia incrementa la madurez del sistema inmunitario del neonato. Un ejemplo de ello es que el suplemento con aceite de pescado, durante los primeros 4 meses de lactancia, incrementa en niños de 2,5 años la producción de IFNγ por PBMC estimulados con LPS, mientras que disminuye la producción de IL-10. Estos resultados han sido interpretados por los autores como un indicador de aceleración en la maduración del sistema del neonato (Field *et al*., 2001; Damsgaard *et al*., 2007; Gottrand *et al*., 2008, Field *et al*., 2008). Además, las células NK de leche materna –rica en AGPI-CL n-3- presentan mayor actividad que de aquellos alimentados con fórmulas infantiles no suplementadas (Hawkes, 1999). Por otra parte, la ingesta de dietas ricas en AGPI n-3 reduce la respuesta inflamatoria en enfermedades infantiles como la dermatitis atópica, asma y gastroenteritis, en comparación con dietas ricas en AGPI n-6 (Gottrand, 2008).

4 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

4.1 Estructura y origen del ácido linoleico conjugado

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término genérico que se refiere a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (18:2n-6, LA), que está constituido por 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces y posee la misma fórmula química que el ácido linoleico (C18:2). Los dobles enlaces en el CLA son conjugados, es decir, se encuentran separados por un enlace sencillo, lo que posibilita que el enlace cambie de posición. Los dobles enlaces en los isómeros de CLA pueden estar en las posiciones 7,9; 8,10; 9,11; 10,12 y 11,13; además pueden tener configuración *cis* o *trans* (Ha *et al*., 1987). Existen dos isómeros de CLA que predominan de forma natural en los tejidos animales -el *cis*9,*trans*11 (*c*9,*t*11) y el *trans*10,*cis*12 (*t*10,*c*12)-, por lo que han sido objeto de numerosos estudios (Chin *et al*., 1992) (**Figura 9**).

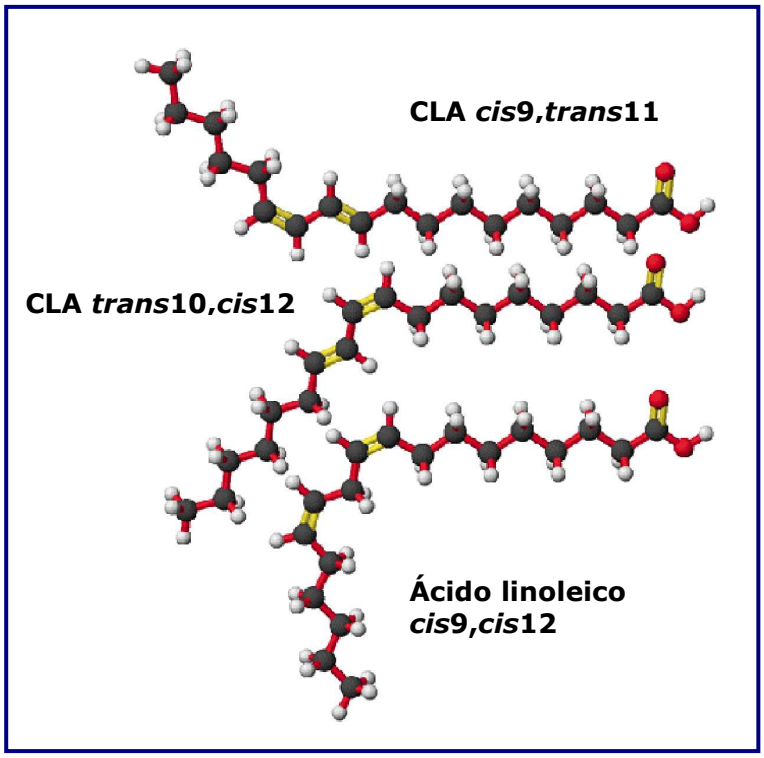

Figura 9. Estructura de los isómeros de CLA *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 y del ácido linoleico *cis*9,*cis*12. Modificada de Bauman *et al.,* 1999.

CLA fue descubierto por Pariza *et al.* en 1979 en el intento de esclarecer la actividad anti-mutagénica atribuida a una hamburguesa frita. Se demostró que un derivado parcial

purificado de este extracto anti-mutagénico tenía la capacidad de prevenir los tumores inducidos en ratón con 7,12-dimetil-benzoantraceno (Pariza *et al*., 1979). Estudios posteriores confirmaron la actividad anticarcinogénica de CLA en modelos *in vitro* e *in vivo* (Ha *et al.,* 1990; Ip *et al.,* 1991, 1995, 1996, 1997; Visonneau *et al*., 1997).

Las principales fuentes naturales de CLA son los tejidos corporales, principalmente el tejido adiposo de animales rumiantes o de estilo rumiante, como los wallaby y los canguros que presentan procesos de fermentación digestiva. Puesto que CLA se encuentra en baja proporción en la alimentación de los rumiantes -grano y forraje- es evidente que estos animales poseen la capacidad de transformar el ácido linoleico en los isómeros de CLA. En el poderoso ambiente reductor del rumen es donde se lleva a cabo la biohidrogenación del ácido linoleico. El primer paso de este proceso es la isomerización y transposición del doble enlace Δ-12 del ácido linoleico, mediante la acción de la isomerasa de las bacterias *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Megasphaera elsdenii,* lo que da lugar de forma mayoritaria al isómero *cis*9,*trans*11 y, en menor proporción, a un amplio espectro de isómeros geométricos y posicionales de CLA (Kepler *et al*., 1966; Jenkins *et al*., 2008). El isómero *cis*9,*trans*11 es el más abundante en el tejido adiposo de rumiantes y, debido a su origen, se conoce como ácido ruménico (RA). La posterior hidrogenación de este isómero resulta en la producción del *trans*11 C18:1 o ácido vaccénico (VA), AGMI *trans* que predomina en la fracción grasa de los productos de origen rumiante. A partir de VA, una serie de transformaciones adicionales por reductasas microbianas eliminan los dobles enlaces hasta producir una cadena completamente saturada, lo que conduce a la acumulación de ácido esteárico en el contenido intestinal de los rumiantes (Kim *et al.,* 2000; Teker & Jenkins, 2006; Jenkins *et al*., 2008) (**Figura 10**). El proceso de biohidrogenación se lleva a cabo de forma incompleta, ya que de otra forma sólo se acumularían AGS. La elevada proporción de RA en leche de rumiantes no proviene únicamente del modesto flujo de RA desde el rumen, el cual tras su absorción se distribuye a los tejidos, particularmente adiposo y mamario. Se ha demostrado que tanto en animales rumiantes como en el organismo humano -principalmente en la glándula mamaria- el VA puede convertirse en RA por acción de la enzima ∆9 desaturasa (Bauman *et al*., 1999; Turpeinen *et al*., 2002; Mosley *et al*., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, en el proceso de biohidrogenación se producen un amplio rango de isómeros minoritarios de CLA. Este rango va desde *trans*6,*trans*8 hasta *trans*13,*trans*15, con isómeros posicionales intermedios *cis*-*trans*, *trans*-*cis* y *cis*-*cis* (Parodi, 1997; Wahle, 2004). Se dispone de poca información relativa a la acción biológica de estos isómeros minoritarios; sin embargo, los isómeros *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 -éste último en menor proporción en leche, pero significativa-, han sido

objeto de numerosos estudios debido a su actividad biológica (Pariza *et al*., 2001; Belury, 2002a; Bhattacharya *et al*., 2006).

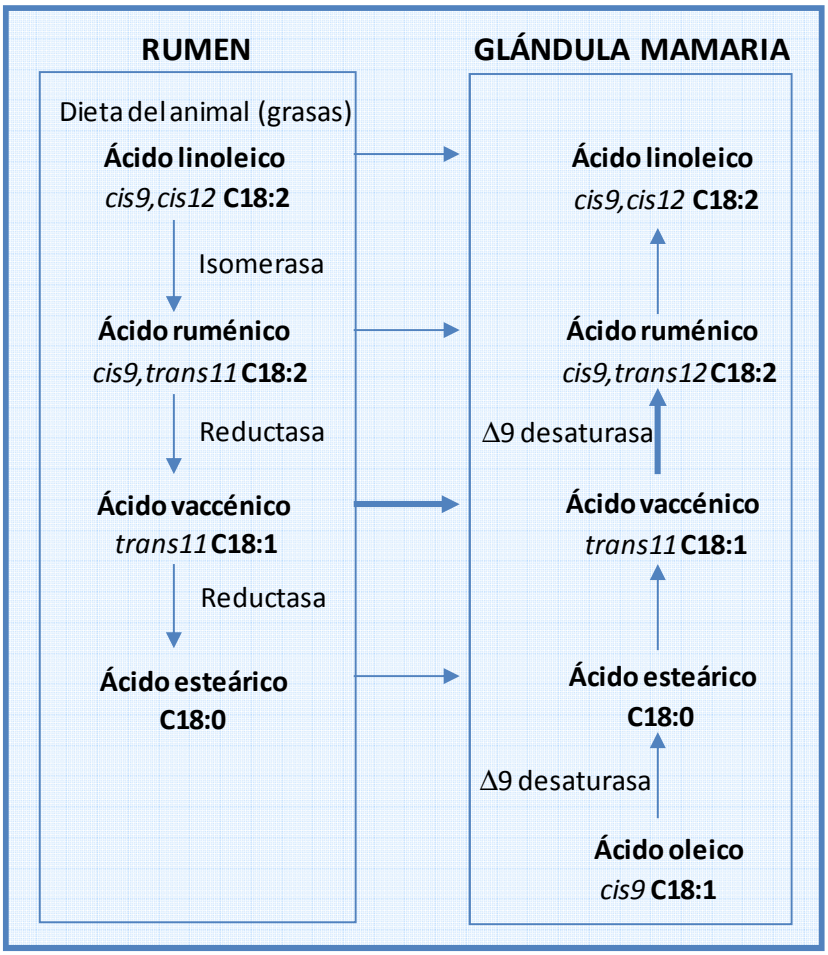

Figura 10. Rutas de síntesis del isómero *cis*9,*trans*11 en el rumen y en la glándula mamaria de rumiantes. Modificada de Bauman *et al*., 1999.

4.2 Fuentes de ácido linoleico conjugado

Como se ha mencionado anteriormente, la principal fuente de CLA son los productos de origen rumiante, tales como bovino y ovino. Sin embargo, el contenido de CLA está condicionado por las características fisiológicas y genéticas propias de cada animal, por el tipo de alimentación que reciben y por los factores tecnológicos asociados a los procesos de elaboración y conservación de los alimentos. Es por ello, que el consumo de CLA por parte de la población varía significativamente de acuerdo a los hábitos alimentarios. Además, se ha demostrado que el contenido de CLA en leche de vaca en invierno es de 3,7 mg/g grasa, mientras que en verano aumenta hasta 22,7 mg de

CLA/g grasa. La **Tabla 8** muestra de forma resumida la variedad de alimentos que contienen CLA. Concretamente, los productos procedentes de leche de oveja y/o cabra poseen mayor contenido de CLA que aquellos procedentes de leche de vaca. Los productos marinos, porcinos, avícolas y aceites vegetales aportan pequeñas cantidades de CLA -que varía entre 0,1 y 0,9 mg/g de grasa- en comparación con los productos de origen rumiante.

Tabla 8. Contenido de CLA y proporción relativa del isómero *cis*9,*trans*11 en alimentos crudos.

Alimento	**Total CLA (mg/g grasa)**	***cis*9,*trans*11 (%)**
Carne		
Ternera fresca picada	4,3	85
Ternera	2,9	79
Salchicha de ternera	3,8	84
Oveja	5,6	92
Cerdo	0,6	82
Aves		
Pollo	0,9	84
Pavo	2,5	76
Productos marinos		
Salmón	0,3	ND
Trucha	0,5	ND
Gambas	0,6	ND
Productos lácteos		
Leche homogeneizada	5,5	92
Mantequilla	4,7	88
Crema ácida	4,6	90
Yogurt natural	4,8	84
Helado	3,6	86
Queso cheddar	3,6	93
Queso mozzarella	4,9	95
Requesón	4,5	83
Queso Burgos	6,7	90
Queso tipo americano	5,0	93
Aceites Vegetales		
Girasol	0,4	38
Canola	0,5	44
Maíz	0,2	39
Oliva	0,2	47

ND, no detectable. Modificada de Chin *et al*., 1992.

Resulta difícil cuantificar la ingesta de CLA, puesto que no se dispone de suficientes datos sobre el contenido de los isómeros en los alimentos, además de las variaciones en los hábitos alimentarios anteriormente mencionados. La ingesta media de CLA en EEUU se ha estimado que es del orden de 102 mg/día -para los consumidores poco habituales de carne- y de 221 mg/día -para los consumidores habituales de productos de rumiantes-, mientras que en Inglaterra y Australia los valores son bastante superiores, de 600-800 mg/día y 1500 mg/día, respectivamente. En términos generales, se estima que la ingesta media de CLA en dietas occidentales es alrededor de 1,5-2 g/día aunque se observan oscilaciones entre 0,3 y 2,6 g/día. Sin embargo, existen estudios en dietas occidentales -como la portuguesa- en los cuales el consumo se ha estimado muy por debajo de la media, de aproximadamente 73 g/día (Martins *et al*., 2007). En general, el 60% de la ingesta total de CLA procede de productos lácteos y el 37% de productos cárnicos, donde la proporción entre *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 varía de 30:1 a 70:1 (Wahle *et* al., 2004; Haro *et al*., 2006). Si bien el mayor contenido de CLA se encuentra en la carne, el mayor aporte a la dieta lo constituye la leche. La leche es un alimento excelente e indiscutible desde el punto de vista nutricional, sin embargo, en las últimas décadas ha sido sustituido en los adultos por productos con menor cantidad de grasas saturadas. Sin embargo, es en la grasa de la leche en la cual se encuentra CLA. Del total de CLA presente en leche, el isómero *cis*9,*trans*11 representa el 80-90 % del CLA total (Chin *et al*., 1994b).

El isómero *trans*10,*cis*12, aunque posee actividad biológica, se encuentra presente en cantidades inferiores al 5% de CLA total y no se ha detectado en muchos casos. Otro isómero de importancia cuantitativa, del cual se desconoce su función biológica es el *cis*9,*trans*7 que representa el 3 a 16% de CLA total en productos de rumiantes (Yurawecz *et al.,* 1998). Hoy en día, mediante la introducción de métodos analíticos más avanzados se ha demostrado que la grasa de leche tiene vestigios de concentraciones de muchos isómeros adicionales de CLA. En la **Tabla 9** se muestran los distintos isómeros y su proporción en leche.

Dado que la leche humana es la única fuente natural de alimento para el neonato, durante los primeros meses de vida, la calidad de los lípidos presentes en ésta resulta ser de gran importancia para su desarrollo. El CLA se encuentra presente en leche humana en un rango de 2,23 a 5,43 mg/g de grasa. El RA es el isómero mayoritario, representando más de un 60% de CLA total; tras éste se encuentran los isómeros *trans*9,*trans*11 y 7,9 *cis*,*trans* o *trans,cis*. A pesar de los efectos biológicos atribuidos al isómero *trans*10,*cis*12, éste no excede el 4% de CLA total presente en leche humana (McGuire *et al*., 1997; Luna *et al*., 2007).

Tabla 9. Isómeros posicionales y geométricos de CLA y su presencia en leche bovina (%)

Isómeros	Presencia en leche (% de CLA total)
cis,trans	
9,7	5,5
8,10	1,5
9,11	72,6
12,10	0,4
11,13	7,0
12,14	0,7
trans,trans	
8,6	ND
9,7	2,4
10,8	0,4
11,9	2,0
12,10	0,6
13,11	4,2
14,12	2,6
15,13	ND
cis,cis	
10,8	ND
11,9	ND
12,10	ND
13,11	ND

ND, no detectable. Modificada de Khanal & Olson, 2004

4.3 Efectos biológicos del ácido linoleico conjugado

En los últimos 15 años, a partir del descubrimiento del efecto anti-mutagénico de CLA, se han llevado a cabo numerosos estudios en animales y voluntarios sanos para determinar las propiedades fisiológicas de CLA. En la mayoría de estudios se ha utilizado una mezcla en cantidades similares (50%) de los dos isómeros de CLA con actividad biológica *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12. Los mecanismos de acción de CLA no se conocen aún con exactitud, pero se han planteado diversas hipótesis relacionadas con sus efectos sobre el metabolismo de eicosanoides, la expresión génica o el incremento de la actividad lipolítica. Entre las propiedades atribuidas a CLA cabe destacar la reducción de la grasa corporal e incremento de la masa muscular, efecto anticancerígeno, antiaterogénico, antidiabético y modulador del sistema inmunitario. Se considera que algunos efectos son

específicos de un isómero determinado, mientras que otros se deben al efecto sinérgico de ambos.

4.3.1 Efecto sobre el peso y composición corporal

Sin duda, el efecto de CLA más estudiado ha sido sobre el peso corporal. Este efecto se ha evaluado en una gran variedad de modelos animales, entre ellos ratón, rata, hámster y cerdo (Park *et al.,* 1997; de Deckere *et al*., 1999; Ostrowska *et al*., 1999; Yamasaki *et al*., 2003b; Bissonauth *et al*., 2006; Park & Pariza, 2007; Ruth *et al*., 2008). Park *et al.* (1997) demostraron por primera vez, que la adición de un 0,5% de CLA (*cis9,trans*11:*trans*10,*cis*12; 50:50) en la dieta de ratones causaba disminución de la grasa corporal y aumento de la masa muscular, sin modificar su peso corporal. Estudios posteriores corroboraron los resultados referentes a la grasa y masa muscular corporal, pero hallaron pérdida de peso (West *et* al., 1998; Terpstra *et al*., 2002; Bhattacharya *et al*., 2006). La mayoría de estudios que no mostraban efectos sobre el peso corporal habían utilizado bajo contenido de CLA (≤ 0,5% en la dieta) o bajas concentraciones del isómero *t*10,*c*12 (Wang & Jones, 2004a). La posibilidad de utilizar isómeros puros o dietas enriquecidas con uno de los dos isómeros permitió establecer, en estudios *in vitro* e *in vivo,* que el isómero *trans*10,*cis*12 es el responsable de la reducción de grasa corporal (Pariza *et al*., 2001; Park & Pariza, 2007). Los resultados obtenidos en cerdo son contradictorios, ya que muestran incremento, disminución, e incluso ausencia de efecto sobre la masa muscular, grasa y peso corporal (O'Quinn *et al*., 2000; Thiel-Cooper *et al*., 2001; Wiegand *et al*., 2002).

De todos los modelos animales estudiados, el de ratón es en el que se demuestran los mayores efectos de CLA. La suplementación con CLA reduce principalmente la grasa de los tejidos inguinal, epididimal y retroperitoneal, mientras que afecta en menor grado el tejido adiposo mesentérico (Wang & Jones, 2004b).

El primer estudio relativo a los efectos de CLA en la composición corporal en culturistas de EEUU fue publicado en 1998 y mostró que 6,2 g de CLA/día durante 6 semanas aumentaba el peso corporal y el diámetro de las piernas, sin modificar la grasa corporal (Gaullier & Gudmunsen, 2006). A partir de entonces, se han publicado otros estudios en humanos sin obtener resultados tan contundentes como en el caso de los animales. Hasta el momento, se han llevado a cabo aproximadamente 25 ensayos clínicos, en los cuales la cantidad de CLA ingerida varía desde 0,7 a 6,8 g/día (Tricon *et al*., 2005; Sneddon *et al*., 2008). Los resultados son contradictorios, sin embargo, la mayoría demuestran que CLA no modifica el peso corporal ni el índice de masa corporal (IMC), si

bien tiende a reducir la grasa corporal (Wahle *et al*., 2004; Bhattacharya *et al*., 2006; Park & Pariza, 2007).

Las diferencias observadas entre animales y humanos, pueden atribuirse entre otros factores, a la baja dosis de CLA utilizada en humanos. La dosis habitual en ratón es de 0,5% (p/p), lo que correspondería en humanos a 56 g CLA/día/70 kg que son incluso menores que las empleadas en ratón (Malpuech-Brugère *et al*., 2004). Otro factor influyente podría ser las diferencias metabólicas entre ratón y humano. El ratón tiene una elevada tasa de conversión lipídica, de ahí que el CLA sea tan efectivo en esta especie.

Algunos de los mecanismos sugeridos que podrían estar implicados en la reducción de grasa corporal por CLA son el incremento del gasto energético, incremento de la oxidación lipídica, disminución del tamaño de adipocitos e inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico y en la lipidogénesis (Wang & Jones, 2004b; Bhattacharya *et al*., 2006; Park & Pariza, 2007).

4.3.2 Efecto anticancerígeno

CLA posee capacidad anticancerígena, tanto *in vitro* como *in vivo,* ya que modula las diferentes fases de la carcinogénesis conocidas como iniciación, promoción y progresión. En particular, las propiedades anticancerígenas de CLA se identificaron en la fase de iniciación de un carcinoma cutáneo, en la cual se producía una alteración genética en un grupo de células del tejido diana (Ha *et al*., 1987). Estudios en cultivos celulares y en animales de experimentación demuestran que el suplemento dietético con una mezcla isomérica de CLA 50:50 de *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 (0,05 – 1%) durante o después de la fase de iniciación, inhibe el desarrollo de tumores de glándula mamaria, piel y colon. La duración de dicho suplemento condiciona el grado de efectividad de CLA en la prevención del proceso de carcinogénesis (Ip *et al*., 1991; Liew *et al*., 1995; Futakuchi *et al*., 2002; Kelley *et al*., 2007). Estudios realizados por Pariza et al. (1999) demuestran que el isómero *c*9,*t*11 es el más activo como agente anticancerígeno.

Los resultados obtenidos en humanos sobre el efecto de CLA en cáncer son menos concluyentes que los obtenidos en animales. El primer estudio se llevó a cabo en mujeres finlandesas postmenopáusicas y demostró el efecto protector de CLA en el desarrollo de cáncer mamario. Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado relación entre la ingesta de CLA y el riesgo de padecer cáncer de mama (McCann *et al*., 2004; Haro *et al.,* 2006). Sin embargo, el efecto anticancerígeno de CLA se ha demostrado *in vitro*

utilizando líneas celulares humanas de glándula mamaria, colon, próstata y estómago (Palombo *et al*., 2002; Tanmahasamut *et al*., 2004; De la Torre *et al*., 2005; Beppu *et al*., 2006).

Los mecanismos a través de los cuales CLA controla la carcinogénesis podrían estar relacionados con: la regulación del ciclo celular mediante la inhibición de la replicación celular, el incremento de la muerte celular mediante necrosis o apoptosis, la alteración del metabolismo lipídico y procesos de regulación génica (Field & Schley, 2004). CLA reduce la expresión de las ciclinas D y A en tumores, las cuales están involucradas en facilitar la entrada de las células al ciclo celular y su posterior progresión a la fase M (mitosis y división celular), respectivamente. Por otra parte, CLA incrementa la expresión de la proteína p53, encargada de controlar la calidad de DNA tras la fase G1 y evitar en caso necesario, la entrada de la célula a la fase S (síntesis de DNA) (Belury, 2002b). Otro mecanismo de acción de CLA podría ser en inducción de apoptosis celular, por medio de la inhibición de la proteína Bcl-2 encargada del control de dicho proceso. Por último, CLA podría estar actuando mediante la alteración de la producción de eicosanoides. Los eicosanoides modulan la tumorogénesis en varios tejidos, incluidos la glándula mamaria, piel, próstata y colon. CLA, principalmente el isómero *cis*9,*trans*11, al parecer se incorpora en los fosfolípidos de los tejidos, desplazando la incorporación del AA, con lo que se reduce la producción de PGE_2, LTB_4 y LTC_4. La disminución en la producción de estos eicosanoides está relacionada con la reducción de la tumorogénesis en los tejidos anteriormente mencionados (Park *et al*., 2001; Belury, 2002b; Kelley *et al*., 2007).

4.3.3 Efecto antiaterogénicos

La aterosclerosis es una alteración vascular, de elevada incidencia, que contribuye al incremento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Los efectos de CLA sobre la aterosclerosis son muy contradictorios tanto en animales como en humanos. Las discrepancias entre estudios pueden atribuirse a variaciones en el modelo experimental utilizado, especie, dosis de CLA, duración de la suplementación y metodología usada para medir el grado de lesión.

El efecto de CLA en el desarrollo de placas de ateroma y sobre el perfil lipídico se ha estudiado principalmente en tres especies: conejo, hámster y ratón (revisado por Haro *et al*., 2006). Estudios realizados en conejo muestran que el suplemento con una mezcla isomérica 50:50 de *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12 reduce la deposición lipídica en la arteria aorta, además de revertir lesiones ya existentes (Lee *et al*., 1994; Kritchevsky *et al*.,

2000). El conejo dejó de utilizarse por ser poco adecuado para el desarrollo del modelo experimental de aterosclerosis.

También se ha utilizado el modelo de hámster debido a la similitud existente entre su perfil lipoproteico y el de los humanos (Sullivan *et al*., 1993). Este modelo permitió concluir que CLA es más ateroprotector cuando se combina con una dieta baja en grasa y colesterol (Valeille *et al*., 2005; Wilson *et al*., 2006; Navarro *et al*., 2007; Mitchell & McLeod, 2008). Si bien el modelo de hámster es más similar al humano, en los últimos años el modelo de ratón ha sido el más utilizado, debido a su elevada susceptibilidad a desarrollar placas ateroscleróticas en estado avanzado (Mitchell & McLeod, 2008). De los estudios llevados a cabo en ratón, algunos muestran incremento de la lesión tras el suplemento con una mezcla isomérica de CLA, mientras que otros muestran disminución o ausencia de efectos sobre el área afectada (Munday *et al*., 1999; Lee *et al*., 2005; Arbones-Mainar *et al*., 2006; Toomey *et al*., 2006; Nestel *et al*., 2006; Franczyk-Zarow *et al*., 2008; Cooper *et al*., 2008).

Los estudios realizados en humanos son también contradictorios y difíciles de interpretar. En estos ensayos, CLA se ha utilizado en un rango comprendido entre 0,7 g/día y 6,8 g/día. La dosis de 0,7 g/día disminuye el colesterol, los triglicéridos y el colesterol en forma de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma, mientras que la dosis de 6,8 g/día de CLA no modifica su concentración plasmática (Blankson *et* al., 2000; Mougios *et* al., 2001; Smedman & Vessby, 2001; McLeod *et al*., 2004). Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que los isómeros *c*9,*t*11 y *t*10,*c*12 de CLA tienen un efecto opuesto sobre el perfil lipídico en sujetos con peso normal. El suplemento con el isómero *t*10*,c*12 produce un aumento del cociente entre cLDL + cHDL -colesterol unido a lipoproteínas de baja y alta densidad- y cHDL y, por tanto, podría ejercer efectos adversos sobre los factores de riesgo cardiovascular. En cambio el suplemento con el isómero *c*9,*t*11 disminuye tanto el colesterol total como el de cLDL, de ahí a que se le atribuyen efectos beneficiosos (Tricon *et al*., 2004a; Haro *et al*., 2006).

Los mecanismos propuestos a través de los cuales CLA podría actuar son diversos. El principal se centra en el papel de CLA como ligando de PPAR. PPARα es un miembro de esta familia de receptores nucleares que se expresa en hígado y modula el metabolismo lipídico. Algunos estudios sugieren que el isómero *c*9,*t*11 posee mayor afinidad por el PPARα que el *trans*10*,cis*12; sin embargo, existen otros estudios que demuestran que la acción de CLA es independiente de PPAR (Peters *et al*., 2001; McLeod *et al*., 2004).

4.3.4 Efecto antidiabético

Actualmente el número de personas diagnosticadas de diabetes está en aumento y en la mayoría de casos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, se trata de diabetes tipo 2, la cual se caracteriza por su resistencia a la insulina (Aminot-Gilchrist & Anderson, 2004). Debido a que la obesidad es el principal factor de riesgo de la diabetes tipo 2, es factible que CLA -con efectos beneficiosos sobre el peso y grasa corporal-, posea propiedades antidiabéticas.

Los efectos de CLA sobre la resistencia a la insulina y la homeostasis de la glucosa son variados y dependen de la especie y del isómero utilizado (Kelley & Erickson, 2003). El primer estudio que muestra un efecto antidiabético de CLA se llevó a cabo en ratas diabéticas Zucker suplementadas durante 2 semanas con una mezcla 50:50 de *c*9,*t*11 y *t*10,*c*12 de CLA al 1,5%. Este estudio mostró una reducción significativa de la concentración plasmática de insulina, triglicéridos, glucosa en ayunas y leptina (Belury 2002a). Posteriormente, el efecto antidiabético de CLA se ha confirmado en otras especies de animales diabéticos (Ryder *et al*., 2001; Evans *et al*., 2002). En cambio, estudios realizados en cerdos y ratones sanos, ponen de manifiesto que el suplemento con CLA incrementa la concentración plasmática de insulina y glucosa en ayunas (Belury, 2002a; Vemuri *et al*., 2007). Estos efectos adversos también han sido demostrados en humanos, particularmente la resistencia a la insulina (Riserus *et al*., 2002, 2004; Larsen *et al*., 2003). Riserus *et al*. (2002) mostraron que tras el aporte de 3,4 g/día del isómero de *trans*10,*cis*12 de CLA a hombres obesos, disminuyó la sensibilidad a la insulina y aumentó la concentración de glucosa en sangre en ayunas. De ahí, que los efectos adversos sean atribuidos exclusivamente a este isómero. Posteriormente se ha sugerido que los efectos adversos del isómero *trans*10,*cis*12 sólo se evidencian en individuos obesos, pero no son importantes en personas sanas (Noone *et al*., 2002; Tricon *et al*., 2004b; 2005). También existen estudios en humanos que no muestran efectos de CLA sobre esta enfermedad (Raff *et al*., 2008).

El mecanismo propuesto por el cual CLA ejerce efectos antidiabéticos es mediante la unión al receptor nuclear PPARγ. Éste regula la sensibilidad de la insulina activando la transcripción de los genes involucrados en la señalización de la insulina, el consumo de glucosa y AG, al igual que el almacenamiento de AG (Brown & McIntosh, 2003; Moloney *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2008).

4.3.5 Efecto inmunomodulador

Los efectos de CLA sobre el sistema inmunitario se han evaluado en cultivos celulares, modelos animales y ensayos clínicos. Los estudios *in vivo* relativos a la influencia de CLA sobre el sistema inmunitario, llevados a cabo en animales y humanos en los últimos 10 años se resumen en las **Tablas 10** y **11**, respectivamente. Las tres principales especies animales han sido ratón, rata y cerdo, aunque existen estudios en conejo de indias y perro. El primer estudio lo llevó a acabo Wong *et al*. (1997) en ratones Balb/c machos de 8 semanas de edad, los cuales recibieron suplementó durante 3 o 6 semanas con una dieta de 0,1%, 0,3% o 0,9%, de una mezcla isomérica 50:50 de CLA. Este estudio mostró que las dosis más altas incrementaron la proliferación esplénica frente a phytohemagglutinin (PHA), además de incrementar la producción de IL-2; sin embargo, CLA no modificó la capacidad citotóxica.

Como se ha mencionado anteriormente, los dos isómeros de CLA con actividad biológica conocida son *cis*9,*trans*11 y *trans*10,*cis*12. Aunque a cada uno de estos isómeros se le atribuyen propiedades fisiológicas específicas, pueden también actuar de forma sinérgica. Mientras que la función de cada isómero en algunos procesos está bien documentada, como es el efecto del isómero *trans*10,*cis*12 en la composición corporal, no se dispone de suficiente información relativa al efecto particular de cada isómero sobre el sistema inmunitario. Aunque algunos estudios evalúan los efectos de los isómeros puros, la mayoría han utilizado mezclas 50:50 de los dos isómeros, razón por la cual es difícil establecer el isómero responsable de los efectos inmunomoduladores de CLA.

4.3.5.1 Proliferación linfocítica

Aproximadamente la mitad de los estudios llevados a cabo en animales evalúan la respuesta linfoproliferativa. De éstos se puede concluir que el suplemento con CLA durante un período mínimo de 3 semanas y en un rango de dosis de 0,5-3% de la dieta (mezcla 50:50) -independientemente de la especie animal utilizada-, incrementa la proliferación, tanto de esplenocitos como de PBMC, tras estimulación con mitógeno PHA o Concavalina A (ConA). Tan sólo en dos de los estudios mencionados, el incremento de la proliferación se acompaña de un aumento en la producción de IL-2 (Wong *et al*., 1997; Hayek *et al*., 1999).

Tabla 10. Efecto del suplemento dietética con CLA sobre el sistema inmunitario en animales

Especie	Dosis (*c*9,*t*11:*t*10,*c*12) Duración (sem)	Edad (sem)	EFECTOS					Referencia
			Proliferación	Anticuerpos	Citocinas	Otros mediadores	Tipo celular	
Ratón Balb/c ♀	0,1%; 0,3%; 0,9% (50:50) 3/6	8	↑ bazo (PHA)		↑ IL-2 (bazo)			Wong *et al*., 1997
Ratón ♂/♀ C57BL/6NCrIBR	1% (43:45) 8	13 o 90	↑ bazo (PHA, ConA)		↑ IL-2 (bazo)			Hayek *et al*., 1999
Ratón ICR ♂	1% (50:50) 8	4			↓ TNFα (suero)	↓ leptina (suero)		Akahoshi *et al*., 2002
Ratón ♂/♀ C57BL/6N	0,5% (*c*9,*t*11) 5% (*t*10,*c*12) 8	8			↑ TNFα, IL-6 (bazo) ↓ IL-4 (bazo)		↔ leucocitos (sangre)	Kelley *et al*., 2002
Ratón ♂/♀	0,5% (50:50) 6	Adulta			↑ IL-2, IL-4 (bazo) ↓ TNFα (suero)	↑ NO (M∅)		Yang & Cook, 2003
Ratón ♂/♀ C57BL/6J	1% (*c*9,*t*11);(*t*10,*c*12) 6	3		↑ IgA, IgM (bazo)	↑ TNFα (bazo)		↑↓ Linfocitos B, T $CD8^+$ T $CD4^+$ (sangre)	Yamasaki *et al*., 2003a
Ratón C57BL/6N ♂	0,1%; 1% (50:50) 3	5		↑ IgG (bazo)	↑ mRNA IL-9, MCP-5 ↓ IL-4, 5, 6, 12, 13, (bazo)			Yamasaki *et al*., 2004
Rata Sprague-Dawley ♂	1% (50:50) 6	4			↑ IL-6 (M∅)			Turek *et al*., 1998
Rata Sprague-Dawley ♂	0,5%; 1% (50:50) 3	4		↑ IgA, IgG, IgM (suero) ↑ IgA, IgM (MLN)		↓ LTB_4 (bazo) ↓ PGE_2 (suero)	↔ linfocitos (sangre)	Sugano *et al*., 1998
Rata Sprague-Dawley ♂	0,05%-0,5% (50:50) 3 4			↑ IgA, IgG, IgM (bazo)				Yamasaki *et al*., 2000

Tabla 10 (continuación). Efecto de la suplementación dietética con CLA sobre el sistema inmunitario de animales

Especie	Dosis (c9,t11:t10,c12) Duración (sem)	Edad (sem)	EFECTOS					Referencia
			Proliferación	Anticuerpos	Citocinas	Otros mediadores	Tipo celular	
Rata Sprague-Dawley ♂	20/40 mg/kg/día (*c*9,*t*11) 8	11			↑ IL-2, ↓ TNFα, IL-1β (PBMC)	↓ PGE_2, LTB_4 (PBMC)		Turpeinen *et al.*, 2006
Cerdo ♂/♀	2,21% (34,5:24,5) 10	Adulta					↑ T $CD8^+$, NK (sangre)	Bassaganya-Riera *et al.*, 2001a
Cerdo ♂/♀	0,67%; 1,33%; 2% (35,1:25,1) 7	2	↔				↑ leucocitos ↑ T $CD8^+$ (sangre)	Bassaganya-Riera *et al.*, 2001b
Cerdo ♂/♀ inmunizado	2,21% (34,5:24,5) 10,3	2	↑ PBMC				↑ T $CD8^+$ (sangre)	Bassaganya-Riera *et al.*, 2002a
Cerdo gestante	0,5% (50:50) 2, 4, 6	Adulta		↑ IgG (calostro, suero materno-neonatal)				Bontempo *et al.*,; Rossi *et al.*, 2004
Cerdo inmunizado	1%-3% (50:50) 4	3 o 4	↑ PBMC	↑ Ac específicos	↓ IL-1β (suero)	↓ PGE_2 (suero)	↑ T $CD8^+$ (sangre)	Changhua *et al.*, 2005
Cerdo ♂/♀	2% (*c*9,*t*11); (*t*10,*c*12) 3	4			↓ TNFα, ↓ NF-κB (PBMC)			Zhao *et al.*, 2005
Pollo Arbor Acre ♂/♀	0,25%; 0,5%; 1% (50:50) 6	34,5	↑ PBMC			↑ lisozima (suero)		Zhang *et al.*, 2005b
Cabra gestante	12% (50:50) 7	Adulta		↑ IgG (suero)				Castro *et al.*, 2006
Perro Beagle ♂/♀	0,5% (50:50) 36	Adulta	↑ PBMC (ConA)					Nunes *et al.*, 2008

MØ, macrófagos; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; ↑, aumenta; ↓, disminuye; ↔, no modifica

Respecto a los estudios realizados en humanos, la tercera parte evalúa la respuesta linfoproliferativa, obteniendo resultados muy variados. En uno de ellos se evalúa el efecto de CLA 50:50 (3,9 g/día) durante 93 días en hombres de una edad media de 28 años, no observándose cambios significativos (Kelley *et al*., 2000). De forma similar en otro estudio realizado en hombres y mujeres tampoco se halla ningún efecto (Nugent *et al*., 2005). Por otra parte, cuando de evalúa el efecto por separado de cada uno de los isómeros los resultados son diferentes. Una dosis de 0,59 a 2,52 g/día de ambos isómeros durante 390 días mostró una disminución de la proliferación de PBMC de forma dosis dependiente (Tricon *et al*., 2004a). Sin embargo, otro estudio mostró un aumento de la proliferación de PBMC tras el suplemento con una mezcla 80:20 con dosis similares a las empleadas en los anteriores ensayos clínicos, pero durante un menor tiempo, 56 días (Nugent *et al*., 2005).

4.3.5.2 Producción de anticuerpos

El 60% de estudios realizados en animales evalúan la producción de Ac *in vitro* y/o la concentración de Ac *in vivo*. En todos ellos se muestra un incremento de las Ig evaluadas -IgA, IgG y/o IgM- tras el suplemento con CLA en un rango de dosis de 0,05% a 3%, la mayoría utilizando mezclas isoméricas 50:50; independiente de la especie utilizada, edad o tiempo de suplementación. La principal diferencia entre estudios radica en el compartimento en el cual se evalúan las Ig. Por una parte, un estudio demuestra que tras el suplemento con CLA durante 3 semanas en ratas jóvenes aumenta la producción de IgA e IgG en MLN, aunque no modifica su concentración esplénica (Sugano *et al*., 1998). Sin embargo, otros estudios muestran un incremento de la producción esplénica de IgA e IgM (Yamasaki *et al*., 2000). Cuando se evalúan los isómeros por separado, la producción de IgA e IgM esplénica aumenta únicamente en el caso del isómero *trans*10,*cis*12, mientras que el isómero *cis*9,*trans*11 parece no ejercer efecto alguno en este sentido (Yamasaki *et al*., 2003a).

Un 25% de los estudios realizados en humanos evalúan la producción de Ac. En uno de estos se observa un incremento de IgA e IgM sérica y una disminución de IgE tras la ingesta de 3 g/día de una mezcla de CLA 50:50 durante 84 días (Song *et al*., 2005). Otro estudio evalúa la producción de Ac frente a hepatitis B y muestra un incremento de dichos niveles tras el consumo de 1,7 g/día de una mezcla 50:50 de CLA durante un período similar (Albers *et al*., 2003).

Tabla 11. Efecto del suplemento dietético con CLA sobre el sistema inmunitario en voluntarios sanos

Estudio	Dosis (g/día) (*c*9,*t*11:*t*10,*c*12) Duración (días)	Edad (años) (sexo)	EFECTOS					Referencia
			Proliferación	Anticuerpos	Citocinas	Otros mediadores	Tipo celular	
R	3,9 (17,6:22,6) 93	27-29 (M)	↔ T y B (PBMC)				↔ leucocitos	Kelley *et al*., 2000
R	3,9 (17,6:22,6) 93	27-29 (M)			↔ MØ	↔ eisocanoides (PBMC)		Kelley *et al*., 2001
DC, PC, R, P	1,7 (50:50) 84	31-69 (M)		↑ Ig *in vivo* (hepatitis B)	↔ PBMC	↔ eicosanoides (PBMC)		Albers *et al*., 2003
DC, PC, R, P	1,6 (80:20) 84	31-69 (M)						Albers *et al*., 2003
DC, R, C	0,59-2,38 (*c*9,*t*11) 0,63-2,52(*t*10,*c*12) 390	20-47 (M)	↓ T y B (PBMC)		↔ PBMC	↑ ICAM-1 (MØ) ↔ eicosanoides (sangre)	↔ linfocitos (sangre)	Tricon *et al*., 2004b
DC	3 (50:50) 84	25-50 (H/M)		↑ IgA, IgM ↓ IgE (*in vivo*)	↓ IFNγ, TNFα ↑ IL-10 (suero)			Song *et al.,* 2005
DC, PC, R	2,016 (50:50) o 1,764 (80:20) 56	31,5 (H/M)	80:20 ↑ T y B (PBMC)		80:20 ↑ IL-2, TNFα (suero)	↔ eicosanoides (sangre)		Nugent *et al*., 2005
DC, PC	2,2 (50:50) 8	40-60 (H)			↓ IL-2 (suero)			Mullen *et al*., 2007
DC, R, P	4,6 (50:50) o 5,1 (*c*9,*t*11)[1] 112	55-68 (M)			↔ (suero)	50:50 ↑ CRP (plasma) ↑ 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ (orina)		Tholstrup *et al*., 2008
DC, P, R	4,6 (50:50) 35	20-35 (H)				↑ 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ (orina)		Raff *et al*., 2008

DC, doble ciego; PC, placebo controlado; R, randomizado; P, paralelo; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; H, hombre; M, mujer; CRP, proteína C reactiva; ↑, aumenta; ↓, disminuye; ↔, no modifica. [1] el aporte de *c*9,*t*11 en este estudio fue a través de CLA de la leche.

4.3.5.3 Producción de citocinas y otros mediadores

Más del 50% de los estudios realizados en animales evalúan la producción esplénica y sérica de citocinas y/o eicosanoides, sin embargo, los resultados son muy variados. Dos de estos estudios, uno llevado a cabo en rata y otro en ratón, ambos jóvenes, que recibieron CLA (mezcla 50:50 o isómeros puros) durante un período de 7 semanas muestran un incremento en la producción de IL-6 por parte de esplenocitos y macrófagos (Turek *et al*., 1998; Kelley *et al*., 2002). Sin embargo, estudios posteriores realizados en ratón en condiciones similares, muestran una disminución esplénica de la expresión génica de una gran variedad de citocinas, entre ellas IL-6 (Yamasaki *et al*., 2004). Tal vez, la citocina que genera más controversia es TNFα. En cuatro estudios se describe una disminución de la concentración de TNFα tras la ingesta de CLA en un rango de dosis de 0,5% a 3% de la dieta (mezcla isomérica 50:50 o isómeros puros), independiente de la especie utilizada y del compartimento considerado (Akahoshi *et al*., 2002; Yang & Cook, 2003; Zhao *et al*., 2005; Turpeinen *et al*., 2006). Por el contrario, en otros dos estudios se demuestra un incremento en la producción esplénica de TNFα tras suplementar ratones con CLA al 0,5% o 1%, con isómeros puros o mezcla isomérica 50:50, de 3 a 8 semanas (Kelley *et al*., 2002; Yamasaki *et al.,* 2003a). Por otra parte, todos los estudios coinciden en que el suplemento con CLA, independientemente de la especie utilizada y las condiciones ensayadas, reduce la producción de eicosanoides, tales como PGE_2 y LTB_4 (Sugano *et al*., 1998; Changhua *et al*., 2005; Turpeinen *et al*., 2006).

En humanos, la mayoría de ensayos realizados evalúan la producción de citocinas y otros mediadores. La mayor parte de los éstos muestran que el suplemento con CLA en un rango de dosis de 1,5 a 3,9 g/día no modifica la producción de citocinas y eicosanoides, por parte de macrófagos y de PBMC (Kelley *et al*., 2001; Albers *et al*., 2003; Trcicon *et al*., 2004b; Nugent *et al*., 2005; Tholstrup *et al*., 2008). Uno de los estudios muestra una mayor producción de TNFα tras el suplemento con 1,7 g/día de una mezcla 80:20 durante 56 semanas, mientras que en otro estudio se observa una disminución tras el aporte de 3 g/día de una mezcla 50:50 de CLA durante un período de tiempo más prolongado (Nugent *et al*., 2005; Song *et al*., 2005). También se ha descrito que el suplemento de CLA, independientemente de la concentración y proporción de isómeros utilizada, incrementa la concentración de 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ en orina y la concentración de CRP sérica (Tholstrup *et al*., 2008; Raff *et al*., 2008).

4.3.5.4 Poblaciones celulares

La mayoría de estudios que se centran en los efectos de CLA sobre las subpoblaciones linfocitarias, se han llevado a cabo en cerdo. En éstos se muestra un aumento del número de linfocitos Tc y células NK en sangre, independientemente de la mezcla isomérica utilizada y el tiempo de suplementación (Bassaganya-Riera *et al*., 2001a; 2001b; 2002; Changhua *et al*., 2005). En ratones, dos estudios no hallan efecto alguno sobre la proporción de leucocitos, ya sea tras el suplemento con una mezcla isomérica 50:50 o con isómeros puros de CLA en un rango de dosis de 0,5% a 5% (Sugano *et al*., 1998; Kelley *et al*., 2002). En otro de los estudios realizado en ratón se demostró que tras el suplemento con un 1% del isómero *c*9,*t*11 durante 3 semanas disminuyó en sangre el número de linfocitos B e incrementó la proporción de linfocitos Tc, mientras que el isómero *t*10,*c*12 incrementó el número de linfocitos B y la proporción de linfocitos Th (Yamasaki *et al*., 2003a).

En humanos, existen pocos estudios en que se evalúen las poblaciones celulares, aunque todos coinciden que el suplemento con CLA -mezclas isoméricas o isómeros puros-, no modifica las poblaciones linfocíticas en sangre (Kelley *et al*., 2000; Tricon *et al*., 2004b).

4.3.5.5 Respuesta inmunitaria específica

El efecto del suplemento con CLA sobre la respuesta inmunitaria específica se ha evaluado en diversas especies animales. Whigham *et al*. (2001) analizó la respuesta inmunitaria en conejos de indias inmunizados con OVA y mostró que el suplemento con una mezcla isomérica de CLA al 0,25% durante la semana previa de la inmunización y continuada durante 3 semanas post-inmunización, disminuye la concentración de histamina y PGE_2 en sobrenadantes de tráquea. Sin embargo, posteriormente se ha mostrado que CLA no modifica la respuesta celular frente a *Listeria monocytogenes* en ratones, así como tampoco modifica los niveles de IgE anti-HEL (lisozima de clara de huevo de gallina) en suero de ratas y ratones (Turnock *et al.,* 2001; Ishiguro *et al*., 2002). También se han realizado diversos estudios en cerdos con enfermedad inflamatoria intestinal o infectados con *type 2 porcine circovirus* (PCV2). Concretamente, el realizado en cerdos con enfermedad inflamatoria intestinal muestra que el suplemento con un 2,21% de CLA (mezcla isomérica 50:50 o isómeros puros) disminuye el daño en las mucosas y la concentración de IL-1β, IFNγ, IL-6, TNFα y PGE_2 en colon, a la vez que aumenta la expresión de PPARγ, siendo más efectivo el isómero *trans*10,*cis*12 que el *cis*9,*trans*11 (Hontecillas *et al*., 2002; Changhua *et al*., 2005; Bassaganya-Riera & Hontecillas, 2006). En animales inmunizados con PCV2, el suplemento con CLA

incrementó la respuesta proliferativa específica y disminuyó la producción de IFNγ (Bassaganya-Riera *et al*., 2003). Recientemente, un estudio realizado en ratón asmático mostró que el suplemento con un 1% de *cis*9,*trans*11 durante 6 semanas disminuye la concentración de IgE, IgG1 e IgG2a específicas (Jadszus *et al*., 2008). Por el contrario, en otro estudio se mostró que el isómero *trans*10,*cis*12 (0,4% durante 8 semanas) disminuye la producción de IL-1β y TNFα en ratas obesas (Ruth *et al*., 2008).

En humanos, existen pocos estudios en que se evalúen la respuesta inmunitaria específica, tras suplemento con CLA. Concretamente, el de Turpeinen *et al*. (2008) evaluó el efecto del aporte de 2 g/día de una mezcla mayoritaria en *cis*9,*trans*11 de CLA en sujetos con alergia al polen de abedul. Los resultados de este estudio muestran que dicho suplemento disminuye las manifestaciones de alergia, al igual que la concentración sérica de IgA e IgE, y la producción de IFNγ e IL-5 por parte de PBMC. Sin embargo, el CLA no modifica la concentración sérica de IgG, IgM o CRP.

4.3.5.6 Mecanismos de acción

Hasta el momento se han planteado dos teorías mecanísticas a través de las cuales puede actuar CLA: una basada en la supresión de eicosanoides a nivel del retículo endoplásmico (PPARγ-independiente) y otra a través de la activación del PPARγ a nivel nuclear (PPARγ-dependiente). La teoría PPARγ-independiente involucra dos vías enzimáticas. Por una parte, la vía de síntesis de AA y por otra, la conversión de AA a eicosanoides. La introducción de CLA a la dieta suprime la vía biosintética de AA, ya que compite por las mismas enzimas utilizadas en la síntesis de AA, como Δ-6 desaturasa, elongasa y Δ-5 desaturasa. Además, CLA reduce la producción de eicosanoides, inhibiendo directamente las enzimas COX y LOX que se ubican en la membrana del retículo endoplásmico (Banni *et al*., 2001).

Por otra parte, CLA es un activador de PPARγ. La regulación transcripcional mediada por PPARγ es un proceso que implica: unión con el ligando, dimerización con el receptor retinoide-X-α, modificación de la composición de co-represores y co-activadores, y finalmente modulación de la expresión génica (Bassaganya *et al*., 2002b). Existen dos isoformas del PPARγ, PPARγ1 y PPARγ2, las cuales difieren entre ellas por 84 nucleótidos. PPARγ1 se expresa en linfocitos T y B, monocitos, células dendríticas y epiteliales. La activación de este receptor nuclear, disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, ya que antagoniza las actividades de NF-κB, c-Jun NH_2 terminal quinasa (JNK) y la quinasa p38. Además inhibe la activación de macrófagos, mediante el antagonismo de STAT-1 y NF-κB (Desreumaux *et al*., 2001). Estudios *in vitro* han

demostrado que CLA es capaz de activar PPARγ. Por otra parte, en cerdos alimentados con una dieta rica en CLA se ha mostrado un incremento en la producción de PPARγ (Hontecillas *et al*., 2002; Bassaganya-Riera *et al*., 2002b).