



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN LA
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA CONTRA *Giardia
lamblia* EN RATONES C3H/HEN**

Por:

Lorena Bustamante Córdova

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lorena Bustamante Córdova la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Nutrición.



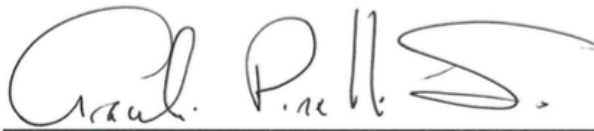
Dra. Maricela Montalvo Corral

Directora de Tesis



Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena

Asesora



Dra. Araceli Pinelli Saavedra

Asesora



Dra. Erika Silva Campa

Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que se me otorgó para continuar mis estudios de posgrado. De la misma manera al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por haber abierto sus puertas y permitirme utilizar sus instalaciones durante mi estancia.

Gracias a mi directora de tesis, Dra. Maricela Montalvo Corral, y al resto de mis sinodales, Dra. Silvia Moya Camarena, Dra. Aracelli Pinelli Saavedra y Dra. Erika Silva Campa, por ser mis guías en este trayecto, les agradezco toda su ayuda y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio que han apoyado de alguna manera este trabajo. A Karla, Itzel y Lucy, por su compañía, por soportar mis malos ratos y por nuestras pláticas tan interesantes.

A mis amigos, que se han convertido en mi familia extendida, por aceptarme como soy y quererme como tal. A Iván, por acompañarme en las buenas y en las malas todos estos años, por no dejarme sola cuando más lo necesitaba.

Gracias a mi familia, por sus palabras de aliento y apoyarme en mis decisiones. A los que ya no están, mi nana Clara, Uma y mi niño Humberto, por ser pilares en mi vida. A mis princesas, Molly, Maya y Madonna, que no podían faltar como parte de mi familia, las adoro.

Por último, agradecer a la persona más importante en mi vida, mi madre. Gracias por todo lo que has hecho por mí. Por siempre motivarme a seguir adelante y no darme por vencida.

Este trabajo de tesis fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, bajo la dirección de la Dra. Maricela Montalvo Corral. Se agradece el financiamiento otorgado por el Fondo Sectorial SEP-CONACYT, Proyecto de Ciencia Básica CB-2012-1-182422.

DEDICATORIA

*A mi madre, Teresa Bustamante Córdova,
y a mi niño, Humberto Molina Colsa.
Por su amor y apoyo incondicional.*

CONTENIDO

I. Introducción	1
II. Antecedentes y justificación	2
II.1 Ácido Linoleico Conjugado.....	2
II.1.1 Origen y Síntesis.....	3
II.1.2 Propiedades Fisiológicas.....	3
II.2 Efecto del Ácido Linoleico Conjugado en la Respuesta Inmune Adaptativa..	5
II.2.1 Respuesta Humoral Sistémica.....	6
II.2.2 Respuesta Humoral en Mucosas.....	7
II.2.3 Respuesta Celular.....	7
II.3 Inmunidad en Mucosas.....	8
II.3.1 Producción de Citocinas.....	9
II.3.2 Activación de Linfocitos.....	11
II.3.3 Generación de IgA en Mucosas.....	11
II.3.4 Importancia de la Respuesta Inmune en Mucosas.....	12
II. 4 <i>Giardia lamblia</i>	13
II.4.1 Morfología.....	13
II. 4.2 Variabilidad Antigénica.....	14
II.4.3 Patogenia.....	15
II. 4.4 Respuesta Inmune Contra <i>Giardia lamblia</i>	15
III. Hipótesis	19
IV. Objetivo General	20
IV.1 Objetivos Específicos.....	20
V. Materiales y Métodos	21
V.1 Animales.....	21
V.2 Tratamientos.....	21
V.3 Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	22
V.4 Peso de los Ratones.....	22
V.5 Infección Experimental.....	22
V.6 Colecta de Muestras Biológicas.....	23
V.7 Conteo de Trofozoítos.....	23
V.8 Obtención de Extracto Antigénico de <i>Giardia lamblia</i> (EAGL).....	24
V.9 Extracto Fecal para la Determinación de Inmunoglobulinas.....	24

CONTENIDO (Continuación)

V.10 Obtención de Linfocitos de Placas de Peyer	25
V.11 Inmunofenotipificación de Poblaciones Linfocíticas de Placas de Peyer ..	25
V.12 Producción de Citocinas <i>ex vivo</i>	25
V.13 Cuantificación de Inmunoglobulinas Totales y Citocinas por ELISA	26
V.14 Inmunoglobulina A Giardia-Específica	26
V.15 Análisis Estadístico	27
VI. Resultados y Discusiones	28
VI. 1 Animales	28
VI. 2 Conteo de Trofozoítos	30
VI. 3 Inmunofenotipificación de Poblaciones Linfocíticas de Placas de Peyer .	32
VI. 4 Cuantificación de Citocinas Producidas <i>ex vivo</i>	37
VI. 5 Cuantificación de Inmunoglobulinas tipo IgA Total e IgA Giardia-específica en Extracto Fecal	40
VII. Conclusión.....	43
VIII. Referencias.....	44

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	Página
1. Curva de crecimiento de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	29
2. Cinética de infección de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	31
3. Histogramas representativos de la población de linfocitos T CD4+ de placas de Peyer de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	34
4. Histogramas representativos de la población de linfocitos T CD8+ de placas de Peyer de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	35
5. Histogramas representativos de la población de linfocitos B CD21/35+ de placas de Peyer de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	36
6. Producción de IFN γ (a) e IL-17A (b) <i>ex vivo</i> por células de placas de Peyer de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA.	39
7. Producción de IgA total en ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA	41
8. Producción de IgA <i>Giardia</i> -específica en ratones infectados con <i>G. lamblia</i> pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA.....	42

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA) es una familia de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico. En diversos estudios en modelos animales y en humanos, los isómeros del CLA han mostrado cualidades de modulación del sistema inmunológico, como el incremento en la producción de anticuerpos, citocinas y proliferación de linfocitos. La inmunidad adaptativa es una de las defensas principales en la mucosa intestinal, donde el organismo está en contacto constante con patógenos, tales como *Giardia lamblia*. Este parásito es causante de una de las principales parasitosis en el mundo denominada giardiasis. La respuesta inmune contra *G. lamblia* se caracteriza por una producción elevada de anticuerpos tipo IgA. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del CLA en la respuesta inmune adaptativa en un modelo murino de giardiasis. Se realizaron dos bioensayos de infección de 40 días en 48 ratones C3H/HeN. Por medio de citometría de flujo se determinó el porcentaje de las poblaciones linfocíticas T y B en Placas de Peyer. Además se cuantificó la producción de citocinas *ex vivo* y la concentración de IgA total y específica en extracto fecal mediante ELISA. Se observó un pico a los 6 días post-infección en ambos grupos, con menor carga parasitaria en el grupo CLA en todos los tiempos evaluados ($p < 0.05$). Las poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 se mantuvieron constantes entre grupos durante las 6 semanas post-infección ($p > 0.05$). Se observó un incremento de la población de linfocitos CD35/21+ en el grupo control el día 6 post-infección ($p < 0.05$), con comportamiento similar entre ambos grupos el resto de la infección. La producción *ex vivo* de IFN γ se vio incrementada en el grupo CLA en aquellas células estimuladas con extracto de *G. lamblia* ($p < 0.05$). Mientras que la producción de IL-17A se incrementó en el grupo CLA con PMA + ionomicina

pero no con extracto de *G. lamblia* ($p < 0.05$). Se encontró un aumento en la producción de IgA total en el grupo CLA a lo largo de la infección con una concentración máxima el día 21 post-infección coincidiendo con la fase de eliminación del parásito. También se observó una producción elevada de IgA *Giardia*-específica en el grupo CLA el día 6 post-infección ($p < 0.05$), mismo al que se presentó la mayor carga parasitaria. En conclusión el CLA modula la respuesta adaptativa de ratones infectados con *Giardia lamblia*, incrementando la producción de IgA e IFN γ , que participan en el control de la infección.

Palabras claves: Ácido linoleico conjugado, adaptativa, anticuerpos, giardiasis, inmunomodulación

ABSTRACT

Studies have found that conjugated linoleic acid modulates immune system, by increasing antibody and cytokines production. Adaptive immunity is one of the main defenses in the intestinal mucosa, where the organism is in contact with pathogens, like *Giardia lamblia*, one of the main parasitic infections in the world. The immune response against *G. lamblia* is characterized by a high IgA antibody production. The aim of this work was to evaluate the CLA effect on adaptive immunity response in a murine model of giardiasis. Two bioassays performed in 48 C3H/HeN mice. Peyer's patches T and B lymphocyte populations were evaluated using flow cytometry. Total and specific IgA concentration in feces was quantified using ELISA. The highest parasitic load was observed at day 6 post-infection in both groups, however the load from CLA group was lower throughout the study ($p < 0.05$) than control group. CD4+ and CD8+ lymphocytes were constant between groups during the 6 weeks post-infection ($p < 0.05$). An increase in CD35/21+ lymphocytes in the control group at day 6 post-infection was observed ($p > 0.05$), however the percentage in CLA group was constant during infection ($p > 0.05$). The production of IFN γ was higher in CLA group in response to *G. lamblia* stimuli ($p < 0.05$), as well as the production of IL-17 in response to PMA + ionomycin in CLA group. We found higher levels of total IgA in CLA group throughout the infection and higher levels of IgA giardia-specific in the acute phase of the infection than control group ($p < 0.05$). CLA stimulates adaptive response in mice infected with *G. lamblia*, increasing specific IgA and IFN γ production, involved in the control of infection.

Keywords: Conjugated linoleic acid, adaptive immunity, antibodies, giardiasis, immunomodulation.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un ácido graso al que se le atribuyen distintas propiedades fisiológicas incluyendo la modulación del sistema inmunológico, para el desempeño de funciones de protección y mantenimiento homeostático en el organismo (Pariza et al., 1985; West et al., 1998; Zhou et al., 2008). Se ha visto que el CLA tiene un efecto potenciador de la respuesta inmune adaptativa humoral y celular. Este efecto se debe a que promueve la inducción de mecanismos efectores como proliferación de linfocitos, producción de anticuerpos y citocinas que participan en el control de antígenos a nivel sistémico y de mucosas (Ramírez-Santana et al., 2009; Yamasaki et al., 2003).

Por su localización anatómica, las zonas de mucosas están en contacto constante con microorganismos, por lo que una respuesta inmune eficaz es primordial para evitar la diseminación de patógenos y daños al organismo. En mucosas, la respuesta adaptativa humoral es la principal defensa inmunológica ante patógenos extracelulares, como *Giardia lamblia* que es un protozooario intestinal y el agente causal de la infección conocida como giardiasis. *G. lamblia* es un parásito flagelado, que coloniza la parte duodenal del intestino delgado y se transmite de forma fecal-oral (Adam, 2001). La respuesta inmune adaptativa contra la giardiasis consta de la participación de linfocitos T CD4+ y linfocitos B productores de IgA, cuya producción se ha relacionado directamente con la eliminación de la infección (Scott et al., 2004; Amorim et al., 2010). Debido a la capacidad inmunomoduladora del CLA para intervenir en estos aspectos inmunológicos, se evaluó el efecto del CLA en un modelo *in vivo* con una infección experimental.

II. ANTECEDENTES

El ácido linoleico conjugado (CLA) es el nombre acuñado a una familia de isómeros geométricos y posicionales derivados del ácido linoleico que se encuentran principalmente en productos lácteos, carne de rumiantes y en algunos aceites vegetales biohidrogenados. Los isómeros del CLA han mostrado cualidades funcionales como efecto anticancerígeno, antidiabetogénico y de la modulación del sistema inmunológico, encontrándose efectos favorecedores en la respuesta inmune humoral. Este tipo de inmunidad adaptativa es una de las defensas principales en mucosas, en especial a nivel intestinal, donde el organismo está en contacto constante con patógenos, tales como *Giardia lamblia* causante de una de las principales parasitosis en el mundo.

II.1 Ácido Linoleico Conjugado

Se conocen 28 isómeros de CLA, siendo el 9cis-11trans hasta el isómero más abundante, seguido del isómero 10trans-12cis (Chin et al., 1992). El CLA se encuentra en productos procedentes de rumiantes como la leche y la carne, producto de la biohidrogenación parcial que se lleva a cabo a nivel del rumen por bacterias anaerobias. También se obtiene CLA por medio de hidrogenación de aceites vegetales comerciales (Chin et al., 1994; Parodi, 1999).

II.1.1 Origen y Síntesis

La generación de CLA en rumiantes, se atribuye principalmente a la acción de la bacteria anaeróbica *Butyrivibrio fibrisolvens*, que sintetiza ácido cis-trans-octadecadienoico como producto de la hidrogenación del ácido linoleico de la dieta (Kepler et al., 1966). También se produce de manera endógena a partir de ácido vaccénico por la acción de la enzima delta-9-desaturasa presente en tejido adiposo y glándulas mamarias (Griinari et al., 2000), este ácido es a su vez producto del proceso de biohidrogenación en el rumen. Además se obtiene CLA utilizando métodos de hidrogenación en aceites vegetales. En éstos, la cantidad obtenida depende del tipo de hidrogenación y duración del proceso. Algunos aceites utilizados para esta síntesis, son de maíz, de canola y de soya (Jung y Ha, 1999).

II.1.2 Propiedades Fisiológicas

La primera propiedad biológica reconocida del CLA fue como anticancerígeno en ratones (Pariza et al., 1985). Se encontró que la mezcla de isómeros de CLA tiene efectos en las fases de iniciación y proliferación de tumores cancerígenos de piel en ratones (Belury et al., 1996). Además se observó que los isómeros 9 cis-11 trans y 10 trans-12 cis del CLA inhiben la proliferación en líneas celulares humanas de cáncer ductal de mama MCF-7 y T47D, cuando son incubadas por al menos 48 horas con CLA (Koronowicz et al., 2008). También se obtuvieron resultados favorables en protección contra cáncer de mama en ratas Sprague-Dawley suplementadas con CLA (Ip et al., 1991).

Park et al. (1997) encontraron que el CLA actúa sobre la composición corporal, con acción reductora de masa grasa en ratones. Esta pérdida de grasa se le atribuyó a varios mecanismos de acción del CLA sobre la acumulación y metabolismo de lípidos, así como del metabolismo energético (West et al., 1998). Debido al creciente problema de obesidad en la población

esta propiedad ha sido evaluada en humanos obteniéndose resultados controversiales. Recientemente, se evaluó el efecto del consumo de leche reducida en grasa adicionada con CLA en personas con obesidad, donde hubo una disminución en la circunferencia de cintura, índice de masa corporal y reducción de masa grasa total (López-Plaza et al., 2013). Sin embargo en otro estudio no se encontraron diferencias significativas en los cambios de la masa grasa corporal de personas que también consumieron un producto lácteo suplementado con CLA por 18 semanas (Malpuech-Brugère et al., 2004).

Por otra parte, se observó que el CLA tiene actividad antiaterogénica por sus efectos en el perfil de lípidos y formación de placas ateroscleróticas. Se encontró una disminución del colesterol total, LDL y triglicéridos en conejos suplementados con 0.5 gramos diarios de CLA (Lee et al., 1994). Este efecto en colesterol y triglicéridos también se observó en ratas (Zhou et al., 2008), por ello el CLA puede actuar reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Así mismo, el consumo de CLA ocasionó una disminución en la expresión de moléculas de adhesión en macrófagos, como VLA-4 y Mac-1, involucradas en la formación de placas ateroscleróticas. Aunado a esto, el isómero 9cis-11trans del CLA redujo la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie del endotelio (Stachowska et al., 2012), con ello disminuyendo la adhesión de macrófagos a la superficie endotelial. También se evaluó el efecto del CLA en factores de riesgo de aterosclerosis. En dicho estudio hubo una disminución en los niveles de proteína C reactiva y malonaldehído, e incremento de la enzima glutatión peroxidasa (Hassan et al., 2013), mostrando así propiedades benéficas en marcadores de inflamación y estrés oxidativo.

Respecto a su efecto antidiabetogénico, se observó que la administración de una mezcla 50:50 de los isómeros principales del CLA mejoró la tolerancia a la glucosa así como la acción de insulina en músculo esquelético de ratas (Ryder et al., 2001, Houseknecht et al., 1998). También se ha visto que el CLA disminuye los niveles de glucosa e insulina en plasma, además incrementa la expresión de GLUT-4 (Zhou et al., 2008) mejorando la resistencia a la insulina en ratas con obesidad.

II.2 Efecto del Ácido Linoleico Conjugado en la Respuesta Inmune Adaptativa

El sistema inmunológico a menudo es referido como un órgano que se expande por el organismo ofreciendo protección contra la entrada y diseminación de patógenos. Sin embargo, esta respuesta defensiva no es igual en todo el cuerpo si no que se encuentra dividida en compartimientos anatómicos, cada uno capaz de generar una respuesta particular (Abbas et al., 2012). Los efectos del CLA en el sistema inmune se han descrito en una variedad de modelos animales y en humanos, evaluando su participación en la modulación de parámetros que conforman la respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta adaptativa se caracteriza por la presencia de linfocitos T, linfocitos B y sus productos secretados, y se divide en humoral y celular.

La respuesta adaptativa humoral es un mecanismo de defensa contra organismos extracelulares y sus toxinas. Su acción efectora es realizada por los anticuerpos que tienen la capacidad de neutralizar, opsonizar antígenos y activar el sistema del complemento, para promover su eliminación (Abbas et al., 2012; Murphy, 2009). Además, según la zona anatómica en la que actúa, la inmunidad humoral se clasifica como sistémica y de mucosas o secretora. La respuesta sistémica se enfoca a los antígenos que han ingresado o diseminado a través de los tejidos y la sangre, mientras que la respuesta secretora se dirige a patógenos cuya vía de entrada son las mucosas (Pérez et al., 1993).

La inmunidad adaptativa celular es mediada por linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Consiste principalmente en la eliminación de células infectadas mediante linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$), mientras que los T cooperadores ($CD4^+$) funcionan como auxiliar a otras células efectoras (Murphy et al., 2009).

II.2.1 Respuesta Humoral Sistémica

Se ha evaluado el efecto de diferentes dosis de CLA en la producción de anticuerpos en roedores suplementados. Se observó un aumento de la producción de IgM en linfocitos de bazo así como un incremento de IgG, IgA e IgM en linfocitos de ganglios mesentéricos de ratas con dietas con 1% de CLA por 3 semanas (Sugano et al., 1998). También se encontró un incremento de IgA, IgG e IgM producidas por linfocitos de bazo de ratas Sprague-Dawley suplementadas con dosis distintas de CLA durante 3 semanas (Yamasaki et al., 2000). Este grupo de trabajo también evaluó el efecto individual de los principales isómeros de CLA en ratones C57BL/6J suplementados por 3 semanas, encontrando que con el isómero 10trans-12cis hubo un aumento de IgA e IgM (Yamasaki et al., 2003).

Al evaluar el efecto de una dieta con 0.5 % de mezcla 50:50 de CLA de 2 semanas en cerdas gestantes, se observó que las madres y sus camadas presentaban un incremento de los niveles séricos de IgG (Bontempo et al., 2004). Del mismo modo se vio un incremento de IgG sérico en otro estudio de cerdas suplementados con CLA durante la última semana de gestación y primera semana de lactancia pero no se observó efecto en la concentración de IgA e IgM en suero (Corino et al., 2009). También se encontró un incremento en niveles de IgG en plasma en pollos alimentados por 2 semanas con dietas conteniendo 10 g/kg de 50:50 CLA (Takahashi et al., 2003). Asimismo, se realizó un ensayo de suplementación con mezcla 80:20 de CLA en ratas Wistar durante la gestación y la lactancia, donde se observó un incremento en las concentraciones de IgG e IgM en el suero de las crías. Este efecto se mantuvo incluso al término de la etapa de lactancia (Ramírez-Santana et al., 2009).

Por otro lado, en un estudio de casos y controles en pacientes vacunados contra Hepatitis B y suplementados con mezcla 50:50 de CLA durante 12 semanas, se observó un aumento en la producción de anticuerpos específicos del tipo IgG, IgA e IgM. Además el CLA tiene un efecto protector en el desarrollo de alergias e hipersensibilidad, debido a la disminución de IgE (Albers et al.,

2003). Estos resultados concuerdan con Song et al. (2005), quienes encontraron niveles elevados de IgM e IgA y nivel bajo de IgE en plasma en personas bajo suplementadas con 3 gramos al día de mezcla 50:50 de CLA por 12 semanas.

II.2.2 Respuesta Humoral en Mucosas

Tras suplementar un grupo de cerdas gestantes se observó un incremento en la concentración de IgG en el calostro en el grupo tratamiento, al cual se le administró una dieta de 0.5 % de una mezcla 50:50 de isómeros 9cis-11trans y 10trans-12cis de CLA (Bontempo et al., 2004). En un trabajo similar, donde se suplementaron cerdos durante la gestación, lactancia y destete, se observó un aumento en los niveles de IgA, IgG e IgM en calostro (Corino et al., 2009). Este incremento de anticuerpos también fue observado por Ramírez-Santana et al. (2009), quienes evaluaron los efectos de la suplementación de CLA en ratas Wistar durante la gestación y lactancia. Aunado a esto, se observó que el CLA estimula la expresión genética de IgA en el intestino delgado en ratas Wistar y por lo tanto, se incrementa el nivel de este anticuerpo en mucosa intestinal (Pérez-Cano et al., 2009).

II.2.3 Respuesta Celular

En un estudio realizado por Yamasaki et al. (2003), se observó que al suplementar con el isómero 10trans-12cis de CLA, por 3 semanas, hubo un incremento en la población de linfocitos B y disminución de T CD4⁺. Mientras que al utilizar el isómero 9cis-11trans aumentó la proliferación de los linfocitos CD8⁺. También se observó una disminución de la relación de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺, al suplementar con una mezcla en proporción 1:1 de isómeros 9cis-11trans y 10trans-12cis de CLA. Sin embargo, Sugano et al. (1998) no observaron efecto sobre la tasa de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ en ratas

suplementadas con varias dosis de CLA durante 3 semanas. Asimismo, no se encontró efecto de CLA en proliferación de linfocitos en pollos suplementados con 10 g/kg de mezcla 50:50 de CLA durante 3 semanas, pero si al suplementar por 6 semanas (Zhang et al., 2005). Ramírez-Santana et al. (2011) observaron una disminución en la capacidad de proliferación *ex vivo* de linfocitos de bazo en ratas Wistar suplementadas durante la gestación y la lactancia, en comparación con ratas suplementadas en la semana post-destete.

Se encontró que la suplementación de CLA por 8 semanas incrementa la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo, cuando se estimulan con mitógenos como concavalina A (Con-A), lipopolisacárido S (LPS) y fitohemaglutinina (PHA) (Hayek et al., 1999). En contraste, Kelley et al. (2002) no encontraron efecto del CLA, suplementado por 56 días, en la proliferación de linfocitos esplénicos estimulados con Con-A y LPS. Además, en este estudio se observó un incremento en la secreción de factor de necrosis tumoral- α (TN- α) e interleucina- 6 (IL-6) y disminución de IL-4. El incremento en la secreción de IL-6 también fue observado por el grupo de Ramírez-Santana et al. (2011), al igual que un aumento de IL-4 e IL-10 después de 4 semanas de suplementación con CLA. Aunado a esto, se ha visto que el CLA incrementa la producción de IL-2 (Yamasaki et al., 2000; Hayek et al., 1999), esta citocina es reconocida por inducir la proliferación de linfocitos T y B.

II.3 Inmunidad en Mucosas

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) está presente en las superficies de tejidos de mucosa pulmonar, ocular, nasofaríngea, bucal, genitourinaria e intestinal, siendo este último el más extenso. La función primordial del MALT es proteger estas zonas que por su localización son vulnerables a la exposición de patógenos para que estos no se diseminen al resto del organismo (Cesta et al., 2006; Janeway et al., 2001). Su principal mecanismo de acción consiste en la producción y secreción de anticuerpos, mediante linfocitos B y Th2, aunque

también se dan reacciones del tipo celular por linfocitos Th1 y citotóxicos (Gormley et al., 1998).

El MALT se encuentra organizado en sitios efectores e inductivos. Estos últimos constan de tejido linfoide secundario en donde se realiza el cambio de isotipo hacia IgA y la proliferación clonal de células B mediante activación de linfocitos T. El siguiente paso es la migración de linfocitos B y T activados hacia los sitios efectores en lámina propia (Pabst, 1987). La comunicación entre estos sitios se da mediante un sistema inmune común de las mucosas que permite que antígenos presentados y linfocitos B activados en un sitio de la mucosa resulte en la secreción de anticuerpos en otros sitios (Janeway et al., 2001).

En el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) se encuentran varios tipos de estructuras como placas de Peyer, folículos linfoides aislados y criptoparches (Cesta et al., 2006). En las placas de Peyer se encuentran los centros germinales conteniendo linfocitos y dendríticas que se encargan de activación y regulación de células T (Coombes et al., 2008). En roedores se pueden encontrar de 6 a 12 centros germinales por placa y en general tienen una mayor área para células B que para células T (Haley, 2003). Por su parte, los folículos aislados proveen un ambiente favorable para la presentación de antígenos entre linfocitos intraepiteliales y células presentadoras de antígeno, como dendríticas (Lugton, 1999). Estos folículos son más pequeños que las placas de Peyer y contienen de 1 a 2 centros germinales de células B y una pequeña población de células T CD4⁺. Mientras que los criptoparches son agregados de células T y dendríticas (Pabst et al., 2005).

Otra característica de la inmunidad en mucosa es la producción de IgA secretora. Estos anticuerpos reconocen los antígenos luminales que llegan a placas de Peyer mediante células microplegadas (M) que se encuentran en el epitelio asociado a folículos (Davis et al., 1997).

II.3.1 Producción de Citocinas

Gran parte de la respuesta inmune a nivel sistémico y de mucosas está regulada por la acción de citocinas, su efecto depende de la naturaleza de la citocina y de la célula diana. De hecho, una de las razones por las que predomina el isotipo IgA se debe a que las células T localizadas en placas de Peyer fomentan el cambio de isotipo con la producción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Svanborg et al., 1999). Asimismo, se encontró que la citocina IL-5 producida por los linfocitos T en GALT, actúa como factor de diferenciación en linfocitos B ya comprometidos a la expresión de IgA (Schoenbeck et al., 1989). También, se ha visto que la IL-6 promueve la diferenciación terminal de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de IgA (Kurashima et al., 2014).

Por otro lado, se observó que al suprimir la expresión de IL-4 no se afecta el cambio de isotipo hacia IgA, pero si se altera la polarización de linfocitos T cooperadores hacia Th2, que participan en la respuesta humoral (Vajdy et al., 1995). Además, se ha demostrado que la citocina IL-10 participa en la respuesta Th2 a antígenos y en el mantenimiento de la mucosa, ya que al suprimir su expresión se promueve un proceso inflamatorio en respuesta al LPS de bacterias comensales (Jarry et al., 2008). Por su parte, las células Th2 producen grandes cantidades de citocinas incluyendo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que regulan la producción de anticuerpos y respuestas alérgicas. Mientras que en presencia de IL-12 e interferon- γ (IFN- γ), producidos por dendríticas, las células T se diferencian a Th1 que a su vez producen IFN- γ e inducen reacciones de hipersensibilidad retardada y activación de macrófagos (Neurath et al., 2002).

Otras citocinas producidas en lámina propia son IL-17 e IL-22, que son secretadas por linfocitos Th17. Los receptores de estas citocinas se encuentran en células epiteliales intestinales y a su vez estimulan la expresión proteínas funcionales en la barrera de la mucosa intestinal, como mucinas y defensinas β .

Además, se ha observado la producción de IL-8 en lámina propia, la cual ha sido asociada con procesos inflamatorios (Abbas et al., 2012).

II.3.2 Proliferación de Linfocitos

La parte de inmunidad celular de los sitios efectores en MALT consta de linfocitos T, en su mayoría CD4+, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, y en menor proporción mastocitos y eosinófilos en la región intrafolicular (Cesta et al., 2006). En ratones se han identificado subtipos B1 y B2 de linfocitos B productores de IgA. Los linfocitos B1 se encuentran en la cavidad peritoneal y generan poca diversidad de anticuerpos que reconocen antígenos altamente conservados (Cerutti, 2008). Esto pudiera deberse a que son estimulados por dendríticas con antígenos provenientes de la flora comensal (Mcpherson et al., 2004). Por otro lado, en los linfocitos B2 se da la interacción de células B IgM+ y T CD4+, esto mediante sus moléculas coestimuladoras CD40 y CD40L respectivamente. Esta interacción induce el cambio de isotipo en B IgM+ hacia IgA+ con gran afinidad (Cerutti, 2008). Cabe mencionar que otros linfocitos actúan en lámina propia son los linfocitos Th17, involucrados en la regulación de la respuesta inmune y mantenimiento de la función de la barrera mucosa epitelial (Nogales et al., 2008).

II.3.3 Generación de IgA en Mucosas

Se ha propuesto que una estimulación antigénica en la mucosa, induce la generación de centros germinales en placas de Peyer (McGhee, 2005). En este lugar es donde se dan las interacciones entre linfocitos B, dendríticas y linfocitos T CD4+. Estas interacciones inducen la proliferación, cambio de isotipo, hipermutación somática y maduración de la afinidad en linfocitos B para producir IgA específicos (Suzuki et al., 2007). La generación de células B IgA+ a partir de B IgM+ se ha atribuido a la expresión de citidin-desaminasa inducida

por activación (AID), que induce la recombinación para cambio de isotipo e hipermutación somática (Muramatsu et al., 2000).

Se ha propuesto que los centros germinales que se encuentran en placas de Peyer son intrínsecamente diferentes de otros en el organismo. Se cree que esto se debe a la constante estimulación antigénica, presencia de linfocitos y dendríticas, moléculas coestimuladoras (CD40-CD40L, CD80/86-CD28) y citocinas provenientes de linfocitos Th2 que promueven la expresión de IgA (Suzuki et al., 2007). Aunado a esto, se ha visto que más del 80 % de los linfocitos B IgM+ cambian a IgA+ después de una semana de estimulación con CD40L, IL-4 y TGF-B (Nakamura et al., 1996).

En ratones se ha visto la participación de linfocitos B1 para normalizar la respuesta de IgA en mucosa, cuando no hay presencia de centros germinales ni coestimulación vía B7 (CD80/86)-CD28 (Gärdby et al., 2003). También se han encontrado, en niveles bajos, la presencia de células B IgA+ en intestino de ratones deficientes de sitios inductores. Lo que indica la migración de linfocitos B IgA+ de otros lugares a mucosa intestinal (Suzuki et al., 2007).

II.3.4 Importancia de la Respuesta de Mucosas

El intestino es un sitio frecuente de infección por microorganismos patógenos. Estos incluyen virus, hongos, bacterias patógenas como *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.*, *Shigella sp.*, y parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium sp.* y *Giardia lamblia*. Dependiendo de la patogenicidad del organismo e intensidad de la respuesta inmune, las infecciones intestinales pueden eliminarse con poco daño a tejido, causar respuesta inflamatoria local, invadir el torrente sanguíneo o vasos linfáticos y llegar a una infección sistémica (Murphy et al., 2009).

La principal consecuencia de una infección es la inflamación, donde la secreción de citocinas y quimiocinas en esta etapa induce la respuesta de la inmunidad adaptativa. Estos mediadores inflamatorios estimulan la maduración de células presentadoras de antígeno, como dendríticas, para que expresen

moléculas coestimuladoras y proporcionen señales para activación y expansión de linfocitos vírgenes (Abbas et al., 2012). Los agentes patógenos intestinales afectan a los enterocitos y estimulan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clásicas que activan a linfocitos $\alpha:\beta$, y no clásicas que activan a células como linfocitos $\gamma:\delta$. Muchos patógenos atacan a las células M, una infección de este tipo es una vía directa al sistema linfoide del huésped (Murphy et al., 2009).

II. 4 *Giardia lamblia*

Giardia lamblia es un parásito intestinal responsable de diarreas en humanos y otras especies animales, también es conocido como *G. duodenalis* y *G. intestinalis*. Este protozooario se encuentra entre los principales parásitos intestinales humanos en el mundo (Adam, 2001). La enfermedad ocasionada por la infección con *G. lamblia* es conocida como giardiasis y se caracteriza por diarrea aguda o crónica, deshidratación, dolor abdominal y pérdida de peso. También se asocia a malabsorción de nutrientes, por daño a tejido epitelial, y por consiguiente a desnutrición (Sullivan et al., 1991). Un factor determinante para contraer la infección es el contacto con el patógeno y esto está íntimamente relacionado con el manejo de alimentos y agua de consumo, que son las mayores fuentes de contaminación por quistes.

II.4.1 Morfología

Giardia lamblia presenta dos estadios de vida: quiste, forma resistente e infectiva, y trofozoíto, forma vegetativa y reproductiva. Los trofozoítos son piriformes (tienen forma de pera) miden aproximadamente de 12 a 15 μm , poseen 2 núcleos simétricos, tienen 4 pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) para la motilidad celular y una ventosa para la adherencia a la pared intestinal (Adam, 2001).

Cuando se encuentra en forma de quiste *G. lamblia* presenta cuatro núcleos, aproximadamente de 5 por 7-10 μm de diámetro. La enquistación es el mecanismo de preservación del parásito frente a condiciones adversas como cambios de pH, de temperatura y presencia de sales biliares (Gillin et al., 1989). Durante la enquistación la tasa metabólica disminuye hasta ser un 10 % de la de un trofozoíto. El parásito se desenquista cuando es expuesto a condiciones de la región proximal del intestino, después de pasar por el ambiente ácido del estómago (Adam, 2001).

La transmisión es del tipo fecal-oral, siendo la forma infectiva los quistes que al desenquistarse liberan una forma tetranucleada del parásito, que después se divide por fisión binaria y da como resultado 2 trofozoítos. Estos, siguen dividiéndose hasta colonizar la pared intestinal, mientras que otros siguen su curso por el intestino hacia el colon, donde se vuelven a enquistar y después son excretados (Roxstrom-Lindquist et al., 2006).

II. 4.2 Variabilidad Antigénica

Es común encontrar variación de antígenos de superficie en bacterias, virus y parásitos proporcionando diferentes características a los organismos. Una de las principales funciones de esta variación es la de eludir al sistema inmune del huésped, esto mediante el reemplazo de antígenos para los cuales se han producido anticuerpos. También se cree que este cambio de variables antigénicas le permite al parásito ampliar su gama de huéspedes para infectar a más especies (Meng et al., 1993).

El parásito *G. lamblia* es capaz de cambiar su antigenicidad al modificar la expresión de sus proteínas de superficie variables (VSP) (Nash, 2002). En ratones inmunocompetentes infectados con *G. lamblia*, se observó que tras la aparición de anticuerpos específicos para la variante de superficie H7, los parásitos dejaban de expresar dicha molécula (Stäger et al., 1997). Este cambio de proteínas variables también ha demostrado contribuir a la supervivencia del

parásito al exponerse a proteasas intestinales (Nash, 2002). Estos estudios son evidencia del mecanismo de evasión inmunitario mediante cambio de VSP.

Por otro lado se ha demostrado que durante el cambio de estado de trofozoíto a quiste *G. lamblia* puede expresar otra molécula antigénica, VSPB10B, al mismo tiempo que otros VSP en la membrana plasmática. Lo cual sugiere que el mecanismo de variación antigénica está relacionado con procesos de diferenciación (Carranza et al., 2002). Esto concuerda con estudios de enquistación *in vitro*, donde trofozoítos recubiertos por un VSP específico pierden la proteína al pasar al estado de quiste. Se ha observado que estos VSP son internalizados en estructuras similares a vacuolas en la célula, mientras que al mismo tiempo aparecen transcritos codificantes para VSP diferentes (Meng et al., 1993)

II.4.3 Patogenia

Los mecanismos de la patogenicidad de la giardiasis aún no están bien dilucidados. Se ha sugerido que el parásito actúa como barrera mecánica al adherirse al intestino y esto inhibe la absorción de nutrimentos (Farthing et al., 1997). Se ha demostrado que las infecciones causadas por *G. lamblia* dañan la superficie de la mucosa causando atrofia de criptas y microvellosidades, además afectando la actividad de enzimas digestivas como lipasas, proteasas y disacaridasas (Scott et al., 2004). *In vitro* se ha visto que el parásito puede inducir apoptosis y rompimiento en las uniones de monocapas intestinales (Chin et al., 2002).

II. 4.4 Respuesta Inmune contra *Giardia lamblia*

La mayoría de las infecciones causadas por *G. lamblia* son autolimitadas en organismos inmunocompetentes, donde los mecanismos de defensa del huésped están en buenas condiciones y pueden combatir eficientemente la

infección (Thompson, 2009). Son varios factores los que contribuyen a una inmunidad eficiente contra *G. lamblia*, donde intervienen elementos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Se ha estudiado *in vitro* la capacidad de componentes inmunes como defensinas, pequeños péptidos producidos por células de Paneth en el intestino delgado, que tienen la capacidad de eliminar trofozoítos (Aley et al., 1994). También se ha encontrado que el óxido nítrico producido por células epiteliales intestinales, inhibe la proliferación y diferenciación de trofozoítos (Eckmann et al., 2000). Sin embargo, se desconoce el efecto *in vivo* de estos componentes.

Un elemento muy importante en la respuesta inmune adaptativa contra *G. lamblia* es la producción de anticuerpos de tipo IgA. En humanos y ratones se ha visto que como respuesta a una infección por este parásito se incrementan significativamente los títulos de anticuerpos IgA anti-giardia (Faubert, 2000). Se ha observado en ratones que la presencia de *G. lamblia* induce una respuesta de anticuerpos sistémica y secretora, encontrando un aumento en la producción de antígenos reconocidos por IgA intestinal e IgG sérica, con la concomitante reducción de la carga de trofozoítos (Velázquez et al., 2005). Por otro lado, se ha observado en jerbos, que a mayor carga de *G. lamblia* es mayor el incremento de los niveles de IgA secretora, y esto impide el enquistamiento del trofozoíto (Amorim et al., 2010).

Se han encontrado anticuerpos anti-giardia en saliva y leche humana. Esto sugiere que la madre puede pasar cierta inmunidad contra *G. lamblia* al bebé por medio de la lactancia, protegiéndolo en etapas temprana de poco desarrollo inmunológico (Tellez et al., 2003). Esto pudiera relacionarse con casos de personas inmunodeficientes cuya producción de IgA es baja o nula donde la incidencia de giardiasis es menor a la esperada (Lai et al., 1997).

Asimismo se ha explorado el papel de linfocitos B en el control de giardiasis. Se observó que ratones deficientes de células B, y por lo tanto de anticuerpos, infectados con *G. lamblia* no fueron capaces de resolver la infección y hubo una disminución en la velocidad de cambio de VSP (Stäger et al., 1997). Esto propone un papel importante de los linfocitos B y los anticuerpos

en el recambio de variantes antigénicas del parásito. Aunque también se han encontrado mecanismos independientes de células B que actúan en la etapa temprana de la infección (Li et al., 2004, Singer et al., 2000).

Se ha observado que ratones deficientes de células T no son capaces de controlar la infección ocasionada por *G. lamblia*, y aquellos sin células T CD4⁺ desarrollaron giardiasis crónica. Asimismo, se ha encontrado que las células T están involucradas en modificaciones en la membrana de enterocitos, y se observó que en ratones sin timo no se presentan daños histológicos después de una infección por *G. lamblia* (Scott et al., 2004). También se ha sugerido el papel de mastocitos en la protección contra *G. lamblia* y *G. muris*, donde seguido de la infección se forman acumulaciones de mastocitos en el intestino delgado. Además, se ha demostrado que los ratones deficientes de mastocitos no son capaces de controlar las infecciones por *G. muris* (Li et al., 2004). Por otra parte se encontró que estos mastocitos son una fuente de IL-6, la cual está involucrada en el control temprano de la infección (Kurashima et al., 2014).

En humanos con hipogammaglobulinemia se desarrolla giardiasis crónica, lo que sugiere que los anticuerpos tienen un papel muy importante en el control de la infección (Perlmutter et al., 1985). La producción de anticuerpos específicos IgA, IgM e IgG anti-giardia en suero y en mucosa se ha correlacionado con la eliminación de la infección (Nash, 2002). Este tipo de ensayos de anticuerpos son *in vivo* ya que van dirigidos a la superficie de los trofozoítos en ratones infectados con *Giardia* (Heyworth, 1986). Además se llevó a cabo un estudio para evaluar la importancia del transporte intestinal de IgA, mediante el receptor polimérico Ig (pIgR) ya que se vio que los ratones que no tenían niveles suficientes de IgA en mucosas no pudieron controlar la infección (Davids et al., 2006)

Se ha evaluado la capacidad de mecanismos dependientes de IgA, IgM y linfocitos B en ratones infectados con *G. lamblia* y *G. muris*. Se encontró que aquellos roedores deficientes de IgA y linfocitos B no fueron capaces de controlar satisfactoriamente la infección. Mientras que los ratones deficientes de IgM si erradicaron la infección, sugiriendo que la secreción de IgM no tiene una

función esencial en la defensa anti-giardia (Langford, 2002). Ratones cuyas células B se han suprimido por acción de anticuerpos anti-IgM y ratones con inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, que tienen defectos en el desarrollo y función de células B, no son capaces de controlar la giardiasis por *G. muris* (Snider et al., 1988). Asimismo, ratones que fueron modificados genéticamente para que no produzcan células B tampoco pueden erradicar por completo la infección por *G. lamblia* (Stäger et al., 1997).

Dreesen et al. (2014) infectaron con *G. muris* ratones C57Bl/6 y encontraron aumento en la producción de citocina IL-17A a partir de los 7 días post-infección. También compararon la cepa silvestre del ratón C57Bl/6 con una cepa que no expresa el receptor de IL-17A (IL17RA KO), en esta última encontraron un mayor conteo de quistes del parásito. Además, realizaron cortes histológicos para evaluar la presencia de *G. muris* en el intestino a las 3 semanas post-infección y observaron una mayor cantidad de trofozoítos en los ratones knockout que en los ratones silvestres. Esto último denota la importancia de la respuesta Th17 y en especial la citocina IL-17 en la resolución de la giardiasis en roedores.

Dada la participación de la inmunidad adaptativa contra *G. lamblia* es importante el estado inmunológico en el que se encuentra el huésped. Por lo tanto, un adyuvante que potenciara la respuesta inmune incrementando aspectos como producción de anticuerpos y activación diferencial de linfocitos, como el CLA, podría resultar en una respuesta más eficaz, beneficiando así la salud del hospedero.

III. HIPÓTESIS

El ácido linoleico conjugado modula la inmunidad adaptativa al incrementar la producción de IgA y citocinas en ratones C3H/HeN infectados con *Giardia lamblia*, mejorando la respuesta a la infección.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) en la respuesta inmune adaptativa en un modelo murino de giardiasis.

IV.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar las poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y B en placas de Peyer de ratones C3H/HeN infectados con *Giardia lamblia*.
2. Cuantificar la producción *in vivo* de anticuerpos IgA totales y giardia-específicos.
3. Determinar la producción *ex vivo* de citocinas Th1, Th2 y Th17 en linfocitos de ratones C3H/HeN.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Animales

Se utilizaron ratones C3H/HeN (HARLAN) de seis a ocho semanas de edad y se mantuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura, ciclos de 12 horas de luz – oscuridad y acceso libre a comida y agua. Se realizaron tres bioensayos en los cuales los ratones se asignaron al azar en los grupos de tratamiento. Se utilizaron 48 ratones para el primer bioensayo y 32 ratones para el segundo y tercer bioensayo. El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CE/005/2012).

V. 2 Tratamientos

V.2.1 Grupo Control

Ratones alimentados con dieta estándar (Global Diet 18% proteína, HARLAN) e infectados con *Giardia lamblia*. Se les administró 60 µL de un placebo (Solución tampón salina de fosfato (PBS) 1X estéril) vía intragástrica como control de suplementación 3 días pre-infección y 6 días post-infección.

V.2.2 Grupo CLA

Ratones alimentados con dieta estándar (Global Diet 18% proteína, HARLAN) e infectados con *Giardia lamblia*. Se les administró 60 µL de ácido linoleico conjugado mezcla 50:50 de isómeros cis9-11trans y 10trans-12cis (donado por Stepan Lipids Nutrition) vía sonda intragástrica durante 3 días pre-infección y 6 días post-infección.

V.3 Cultivo de *Giardia lamblia*

Se mantuvo el stock de *G. lamblia*, cepa GS/M-83-H7 (donada por el Dr. Humberto Astiazarán García), dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Para la activación de la cepa se tomó un vial con 2×10^6 de trofozoítos, el cual se descongeló a temperatura ambiente y se agitó por inversión 2 veces. Se pasó el contenido del vial a un tubo de vidrio de 10 mL, el cual contenía 5 mL de medio frío TYI-S-33 suplementado, para después llevarlo al volumen total del tubo con dicho medio. Se incubó 1 hr a 37°C y se observó al microscopio en busca de trofozoitos adheridos al vidrio. Al observarse lo anterior, se descartó el medio y se reemplazó con medio nuevo. Se incubó a 37°C por aproximadamente 2 – 3 días, hasta observarse una monocapa de trofozoítos en la totalidad del tubo. Para realizar la expansión de la cepa, se colocó el tubo de activación en agua con hielo durante 15 minutos para la separación de los trofozoítos, después de dividió el contenido del tubo en los tubos de 20mL con TYI-S-33. Una vez llenados los tubos, se incubaron a 37°C por alrededor de 3 – 4 días, hasta observarse una monocapa de trofozoítos en la pared del tubo.

V.4 Peso de Ratones

Se registró el peso en gramos de los ratones al inicio de la suplementación, el día de infección, y los posteriores tiempos evaluados para monitorear el estado de salud general del animal. Individualmente, se colocó a cada ratón en una caja de plástico, previamente tarada, sobre una balanza Chef Master.

V.5 Infección Experimental

Se indujo una infección experimental a los grupos control y CLA con 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia*, cepa GS/M-83-H7, por medio de una jeringa de alimentación estéril para la inoculación oral (Instech Solomon). El inóculo se preparó con cultivos en fase logarítmica de trofozoítos de 96 horas de crecimiento, los cuales se lavaron tres veces con 1 mL solución tampón fosfato salino (PBS) frío estéril y centrifugaron a 2700 rpm a 4°C por 10 minutos. Finalmente se inocularon a cada ratón en un volumen de 200 μ L de PBS estéril (Velázquez et al., 2005).

V.6 Colecta de Muestras Biológicas

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, de acuerdo con la NOM-062-ZOO (1999). Los días de sacrificio correspondieron al día que se realizó la infección (día 0) y los días 6, 14, 21, 28 y 45 post-infección para el primer bioensayo y días 0, 6, 21 y 40 para el segundo y tercer bioensayo. Se recolectó el intestino delgado, del cual se seleccionó la región correspondiente a duodeno, y se colectaron heces a partir del contenido en colon ascendente en cada ratón.

V.7 Conteo de Trofozoítos

Se resuspendió el corte extraído de duodeno (aproximadamente 10 cm) en 1.5 mL de PBS estéril frío y se incubó 1 h a 4°C en rotación semihorizontal. Después se centrifugó a 2700 rpm por 10 minutos a 8°C. El botón celular se resuspendió con 100 μ L de PBS y se contaron trofozoítos utilizando la cámara de Neubauer. La carga parasitaria se evaluó el día 0 de la infección y posteriormente los días 6, 14, 21, 28 y 45 post-infección en el primer bioensayo.

También se evaluó la carga parasitaria el resto de los bioensayos el día 0 de la infección, 6, 21 y 40 post-infección.

V.8 Obtención de Extracto Antigénico de *Giardia lamblia* (EAGL)

Se recuperaron trofozoítos de *Giardia lamblia* de cultivos durante fase logarítmica colocándolos en hielo durante 30 minutos. Se lavaron 50×10^6 trofozoítos tres veces con 1 mL de solución tampón salina de fosfatos (PBS), se adicionó 100 μ L de mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA) y se llevaron a un volumen final de 500 μ L con PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron a temperatura ambiente, tres veces. Después se sometieron a sonicación, 7 ciclos de 10 pulsos por vial (Branson sonifier 450). El detrito celular fue removido por centrifugación a 10000 g por 30 min (Centrífuga 541r Eppendorf) y se recolectó el sobrenadante. La concentración de proteína en la preparación de antígeno soluble se determinó utilizando la técnica de ácido bicinonínico con el sistema comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Este extracto antigénico fue empleado en los ensayos de detección de inmunoglobulinas giardia-específicas y producción de citocinas.

V.9 Extracto Fecal para la Determinación de Inmunoglobulinas

Se tomaron muestras fecales al momento del sacrificio y se colocaron en 0.6 mL de PBS + Albúmina al 0.1% (PBA) con antibióticos en presencia de 100 μ L de inhibidores de proteasas (SIGMA), posteriormente se incubaron a 4°C por 1 hora. Se agitaron por vórtex y después se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm a 4°C para remover el material insoluble. Se conservó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su utilización para la cuantificación de anticuerpos (Jiménez et al., 2004).

V.10 Obtención de Linfocitos de Placas de Peyer

Se extrajeron las placas de Peyer (PP) del intestino delgado de cada ratón. Posteriormente, se colocaron en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) y suero fetal bovino (SFB) 2% a temperatura ambiente. Se homogenizaron las PP con la ayuda de una malla de 100 μm agregando poco a poco medio RPMI+SFB a 37°C. Una vez homogenizadas se filtraron utilizando organza estéril y el filtrado se centrifugó a 1200 rpm por 8 minutos. Se resuspendió el botón celular en 2 mL de RPM+SFB a 37°C y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

V.11 Inmunofenotipificación de Poblaciones Linfocíticas de Placas de Peyer

Se realizó la identificación de poblaciones de linfocitos de PP obtenidas el día pre-infección (tiempo 0) y en los días 6, 14, 21, 28 y 40 post-infección. Para ello, se utilizaron los marcadores anti-CD4 de ratón clona GK.5, isotipo IgG2b kappa, con Alexa Fluor 488 para identificar linfocitos T CD4+; anti-CD8 de ratón clona 53-6.7, isotipo IgG2a kappa, con APC-Fluor 780 para linfocitos T CD8+ y anti-CD21/35 de ratón clona 4E3, isotipo IgG2a lambda, conjugado a PE para linfocitos B. El análisis de los datos se realizó con el programa FACSDiva (BD Biosciences).

V.12 Producción de Citocinas *ex vivo*.

Se cultivaron 2×10^5 células con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EAGL, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ forbol miristato de acetato (PMA) e ionomicina (Life Technologies), o 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fitohemaglutinina (PHA). El sobrenadante de cultivo se colectó a las 24 h de estimulación con EAGL, PMA e ionomicina o PHA, y se guardó a -80°C hasta su uso.

V.13 Cuantificación de Inmunoglobulinas Totales y Citocinas por ELISA

Se determinó la concentración de inmunoglobulinas IgA total en extracto fecal y las citocinas IL-17A, IL-4, IL-10 e IFN- γ en sobrenadante del cultivo de linfocitos provenientes de PP. Esto se realizó utilizando los kits de detección “Ready-Set-Go! ELISA Kits” (eBioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las diluciones de las muestras para la determinación de IgA total fue de 1:1000 y para citocinas de 1:5.

V.14 Inmunoglobulina A *Giardia*-Específica

Se cuantificaron los niveles de IgA giardia específicos en extracto fecal mediante ELISA tipo sándwich. Para ello, se fijó extracto antigénico de *Giardia lamblia* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen de 100 μL por pozo) en una placa de 96 pozos de alta adherencia (ThermoScientific) y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween_{0.05%} y se bloqueó por 2 horas a temperatura ambiente con PBS-Tween_{0.05%} con gelatina de pescado al 5%. Se lavó de nuevo y se agregaron 100 μL de muestras de extracto fecal (dilución 1:5) y se dejó incubando por 1 hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados, se agregó 100 μL de anticuerpo anti IgA de ratón conjugado con biotina, dilución 1:500 (BioLegend), y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se lavó cuatro veces y se agregó 100 μL de enzima peroxidasa conjugada con avidina, dilución 1:2000, en cada pozo y se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. Después se lavó 5 veces y se agregó 100 μL del sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina). Se detuvo la reacción con 50 μL H₂SO₄ 1M. Los resultados se leyeron en un lector de ELISA (Biorad) a una longitud de onda de 450 nm.

V.15 Análisis Estadístico

Se realizó el estudio con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x6 y 2x4, según corresponda, siendo el primer factor los tratamientos (CLA o PBS) y el segundo los tiempos en los que se tomaron las muestras. La significancia estadística se tomó a $p < 0.05$. De ser necesario, la comparación de medias se realizó por el método de Tuckey-Kramer. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico NCSS 2007.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI. 1 Animales

Se registró el peso corporal de los ratones en el grupo control y el grupo suplementado con CLA al inicio del bioensayo y en los días de infección evaluados, 0, 6, 14, 21, 28 y 40 (Figura 1). Los pesos registrados de ambos grupos fueron semejantes al inicio del estudio y tuvieron un comportamiento similar durante la infección ($p > 0.05$).

Los roedores mantuvieron el peso inicial durante las primeras semanas del estudio hasta el día 21 post-infección donde se observó una ligera disminución de peso en el grupo control, mas no fue significativa ($p > 0.05$). Se ha correlacionado la pérdida de peso e impedimento en el crecimiento como consecuencia de la infección por *G. lamblia* en otros modelos de estudio (Iñigo-Figueroa et al., 2013; Aloisio et al., 2006). Seguido de esto, se observó un incremento de peso en el grupo control y grupo CLA el día 28 de infección ($p < 0.05$) el cual se mantuvo hasta el día 40 post-infección. Esta ganancia de peso pudiera ser indicativo de la recuperación de los roedores al resolverse la infección así como la ganancia de peso debido al crecimiento conforme a la edad.

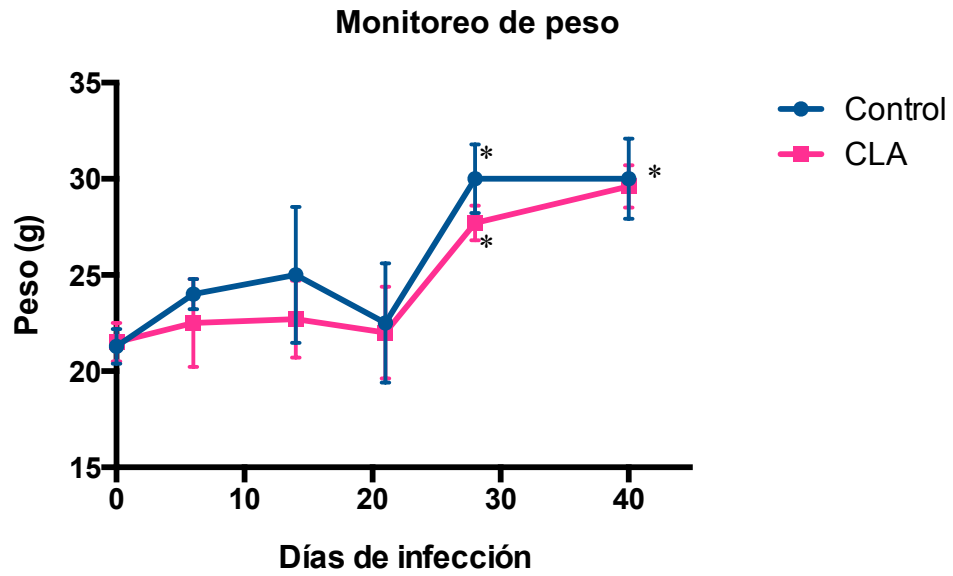


Figura 1. Cambios en la cinética de crecimiento de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4.

* Diferencia significativa entre tiempo; ϕ entre tratamientos; $p < 0.05$

VI. 2 Conteo de Trofozoítos

Se realizó el conteo de trofozoítos en duodeno para determinar la carga parasitaria en cada ratón de los grupos de estudio el día 0, 6, 14, 21, 28 y 40 post-infección. Al día 6 post-infección, se comprobó el establecimiento de la infección, y se obtuvo un mayor número de trofozoítos en el grupo control ($p < 0.05$), con una media de $3 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$ en comparación con el grupo suplementado con CLA, con una media de $1 \times 10^4 \pm 0.7 \times 10^4$. Se observó una disminución de la carga parasitaria el día 14 post-infección, la cual continuó disminuyendo hasta el día 40 post-infección donde no se recuperaron trofozoítos en duodeno, sin diferencias entre tratamientos (Figura 2).

Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Byrd et al. (1994) en ratones C3H/HeJ, donde observaron la mayor carga parasitaria el día 6 post-infección y un descenso de ésta hasta el día 41 post-infección donde no detectaron trofozoítos. Este pico de infección el día 6 post-infección y posterior disminución de la carga parasitaria también fue encontrado por Puebla-Clark, 2015, en ratones C3H/HeN.

La carga parasitaria obtenida en nuestro bioensayo fue menor en comparación a otros estudios en roedores, como es el caso de jerbos (*Meriones unguiculatus*) (Amorim et al., 2010). Mientras que Franco et al., (2013), encontró una carga parasitaria similar a la de nuestro grupo, 2.8×10^4 de trofozoítos, el día 7 post-infección en ratones C57B1/6. La diferencia entre cargas parasitarias pudiera deberse en la susceptibilidad propia de cada especie frente al parásito y al inóculo utilizado para las infecciones experimentales.

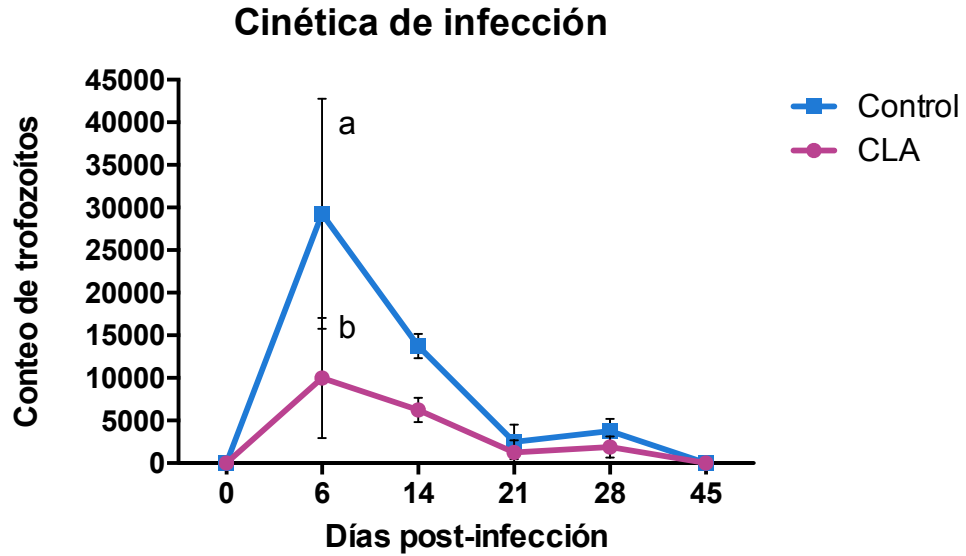


Figura 2. Cinética de infección de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Se evaluó la carga parasitaria mediante conteo de trofozoítos en duodeno intestinal del grupo control (línea azul) y grupo CLA (línea rosa). Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4.

^{ab} Literales distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)

VI. 3 Inmunofenotipificación de Poblaciones Linfocíticas de Placas de Peyer

Respecto a los linfocitos T CD4 en PP, se observó que al inicio de la infección el grupo control y el grupo CLA mostraban porcentajes similares, los cuales disminuyeron en el día 6 post-infección ($p < 0.05$) (Figura 3). Sin embargo, el grupo CLA mantuvo un mayor nivel que el grupo control pero no mayor al día 0 de infección. El día 14 post-infección se observó que la población de linfocitos T CD4+ se incrementó de nuevo en ambos grupos ($p < 0.05$), para posteriormente disminuir hacia el día 40 post-infección sin diferencias entre grupo control y grupo CLA.

Esta disminución de la población de T CD4+ el día 6 post-infección difiere con lo encontrado en otros estudios en ratones donde se observó un aumento de estas células en la fase aguda de la infección (Abdul-Wahid et al., 2008; Franco et al., 2013). Esto pudiera deberse a que en estos estudios se utilizaron inóculos mayores del parásito (Franco et al., 2013) y también a la utilización de la especie *Giardia muris*, la cual es específica para ratones y por lo tanto la susceptibilidad es mayor. Aunado a esto, Yamasaki et al. (2003), encontraron que la suplementación con una mezcla de isómeros 50:50 de CLA y de isómero puro 10trans-12cis en ratas Sprague-Dawley disminuía la población de linfocitos T CD4. Por lo tanto la falta del incremento de linfocitos CD4+ en nuestro estudio pudiera deberse a la suplementación con la mezcla de isómeros 50:50 de CLA y a la baja concentración del inóculo utilizado.

Por otra parte, la población de linfocitos T CD8+ al inicio de la infección era mayor en el grupo previamente suplementado con CLA que en el grupo control, con valores de 9.16 ± 2.2 y 7.4 ± 1.8 respectivamente ($p < 0.05$). Al progresar el tiempo de infección este efecto desapareció y ambos grupos presentaron porcentajes similares de células CD8+ (Figura 4). Este incremento inicial en la población CD8+ concuerda con lo encontrado por Yamasaki et al. (2003), como efecto de la suplementación con una mezcla 50:50 de CLA por 3 semanas en ratones C57BL/6J. Al suspender la suplementación este efecto desapareció y la población de linfocitos CD8+ en el grupo con CLA se normalizó y se mantuvo

constante el resto del estudio con niveles similares al grupo control. Esto concuerda con otros estudios donde no se ha observado efecto en la población de linfocitos CD8+ en Placas de Peyer en respuesta a la infección por *G. lamblia* (Abdul-Wahid et al., 2008)

Los porcentajes de linfocitos CD21/35+ del grupo control y grupo CLA no mostraban diferencias entre si al inicio de la infección (Figura 5). Se observó un incremento de esta población celular el día 6 post-infección en el grupo control ($p < 0.05$), lo cual concuerda con otros estudios (Amorim et al., 2010; Abdul-Wahid et al., 2008). Sin embargo, este incremento temprano no se observó en el grupo CLA el cual no presentó cambios significativos desde el inicio de la infección hasta el día 21 post-infección ($p < 0.05$).

La ausencia de incremento de linfocitos B en grupo CLA durante la etapa inicial del estudio concuerda con lo publicado por Yamasaki et al, (2003), el cual observó que la suplementación de los diferentes isómeros tienen efectos contrarios en esta población celular. Se encontró que la suplementación con isómero 10trans-12cis aumenta la población de linfocitos B mientras que el isómero 9cis-11trans tiene el efecto opuesto. Esto pudiera explicar el hecho de no encontrar incremento en el porcentaje celular en nuestro grupo suplementado con una mezcla 50:50 de CLA. Asimismo, se observó un incremento de linfocitos B en el grupo control y en el grupo con CLA los días 21 y 40 post-infección ($p < 0.05$) lo cual concuerda con lo encontrado por el grupo de Abdul-Wahid et al., (2008).

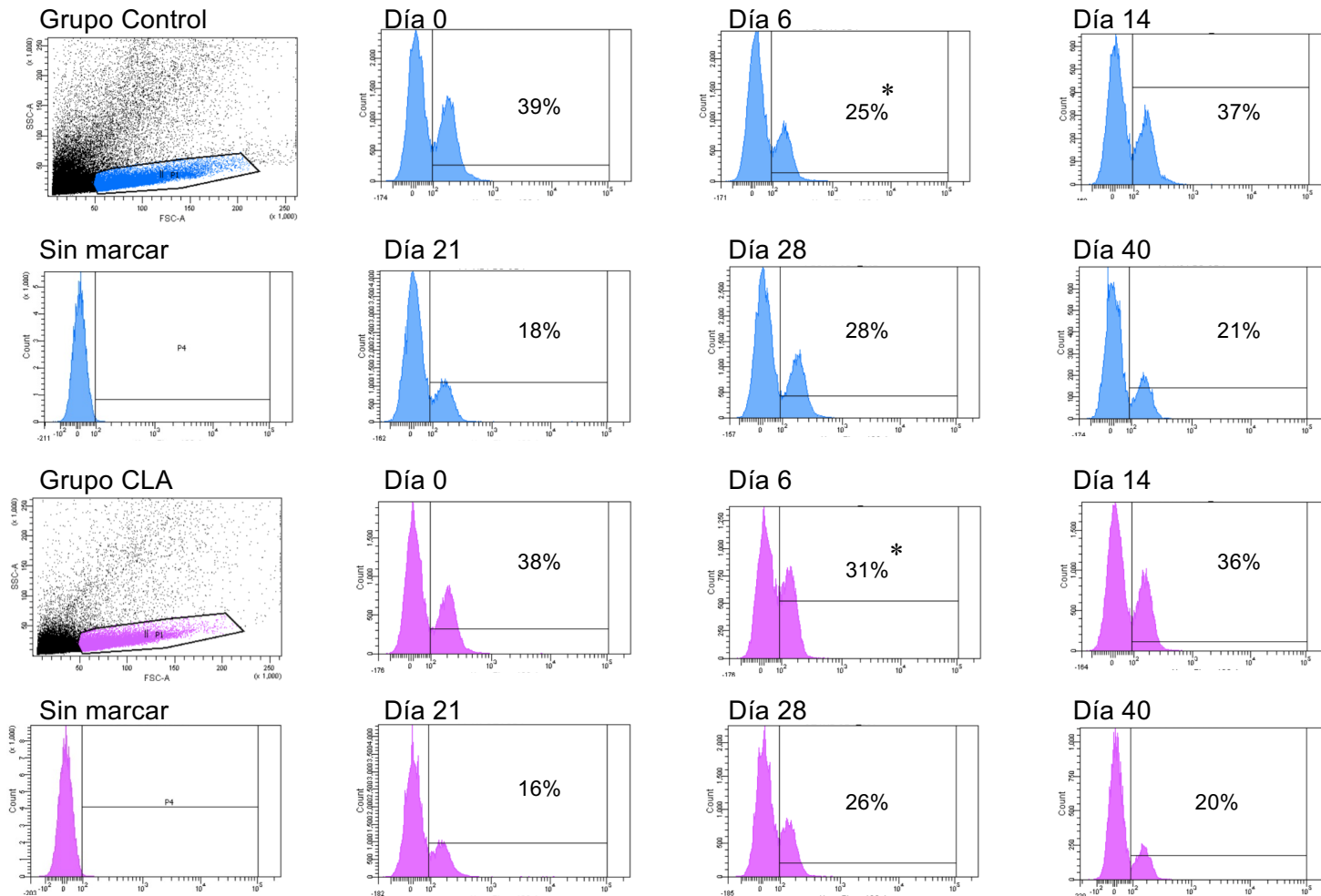


Figura 3. Histogramas representativos de la población de linfocitos CD4+ de placas de Peyer de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4. * Diferencia significativa entre tiempo; ϕ entre tratamientos; p < 0.05

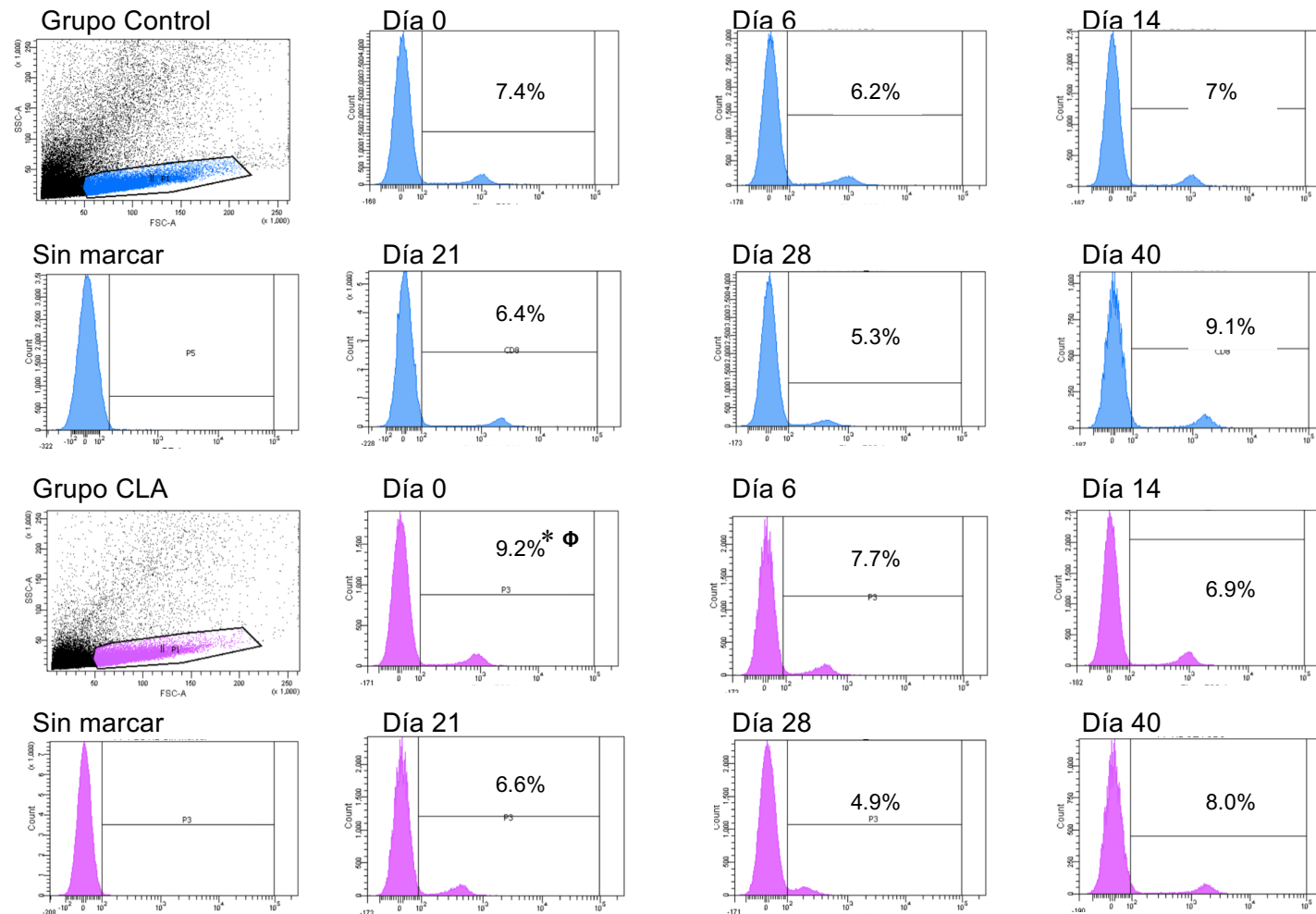


Figura 4. Histogramas representativos de la población de linfocitos CD8+ de placas de Peyer de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control (azul) y al grupo suplementado con CLA (rosa). Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4. * Diferencia significativa entre tiempo; Φ entre tratamientos; p < 0.05

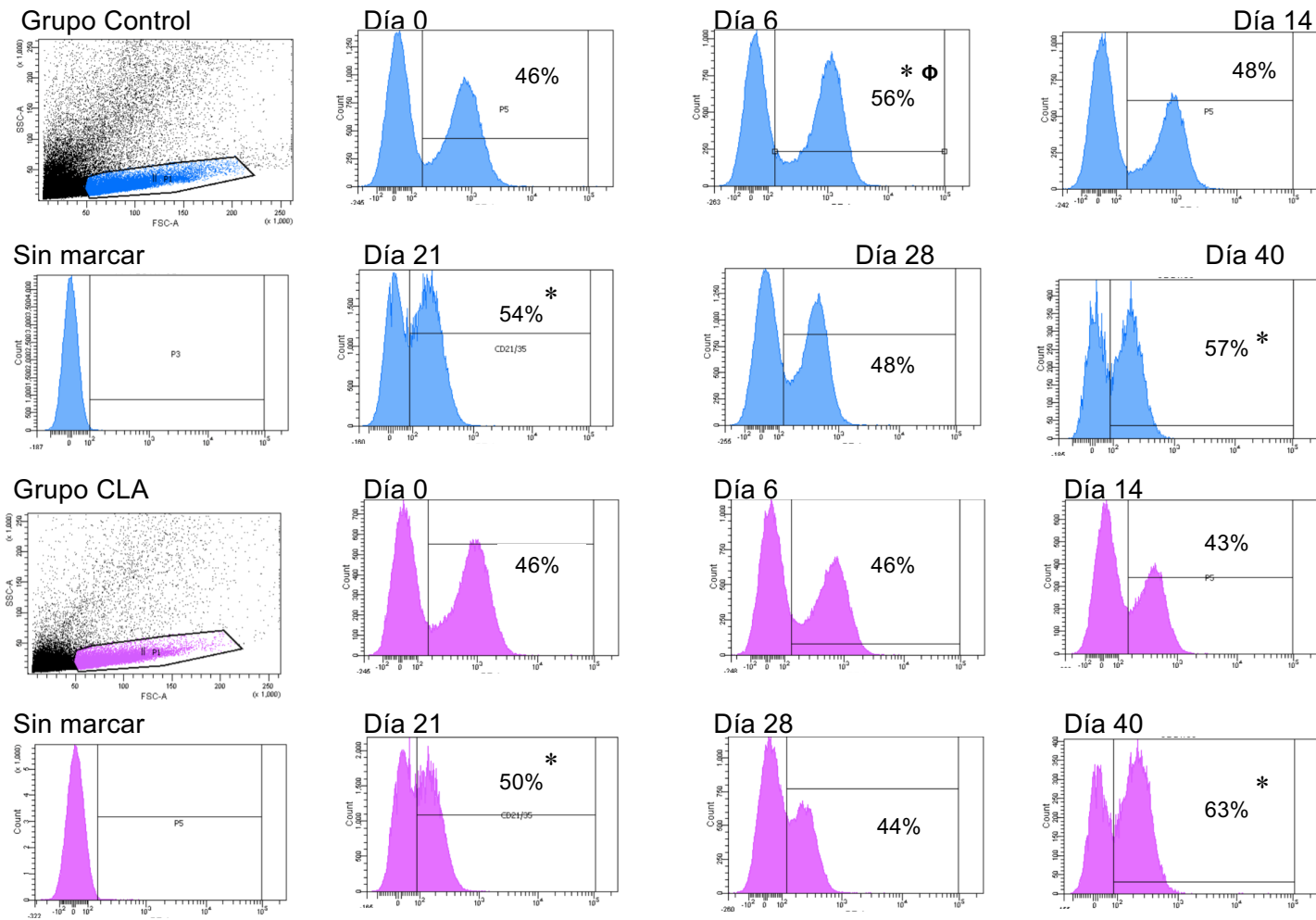


Figura 5. Histogramas representativos de la población de linfocitos CD21/35+ de placas de Peyer de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4. * Diferencia significativa entre tiempo; ϕ entre tratamientos; p < 0.05

VI. 4 Cuantificación de Citocinas Producidas *ex-vivo*

Se analizaron muestras de sobrenadante de cultivo celular de Placas de Peyer y se cuantificó la producción de citocinas IFN γ , IL-4 e IL-17A, correspondientes a Th1, Th2 y Th17 respectivamente.

En general, se encontraron niveles bajos de IFN γ en el grupo control y grupo CLA en células sin estimular, con la mayor concentración de esta citocina en los días 6 y 21 post-infección para ambos grupos ($p < 0.05$). Se observó un incremento de la producción de IFN γ en el grupo CLA el día 6 post-infección en células estimuladas con PHA, así como una mayor producción, en respuesta a la estimulación con extracto antigénico de *G. lamblia*, en células del día 6 y 21 post-infección del grupo de CLA con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Fig. 6a). Esto concuerda con lo observado por Abdul-Wahid et al., (2008), quienes observaron un incremento en la cantidad de células productoras de IFN γ expuestas a extracto de trofozoítos de *G. lamblia*. Además, Jimenez et al., (2014) también encontró un aumento en la producción de IFN γ el día 7 post-infección, en respuesta a antígenos de *G. lamblia*, el cual tuvo su pico máximo de producción a partir de la segunda semana y disminuyó hacia la fase de eliminación. La producción de IFN γ se ha relacionado con el incremento de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), la cual genera óxido nítrico e interviene en la replicación del parásito, reduciendo la disponibilidad de arginina, lo cual favorece el control temprano de la infección (Yarovinsky, 2014; Byrd et al., 1994).

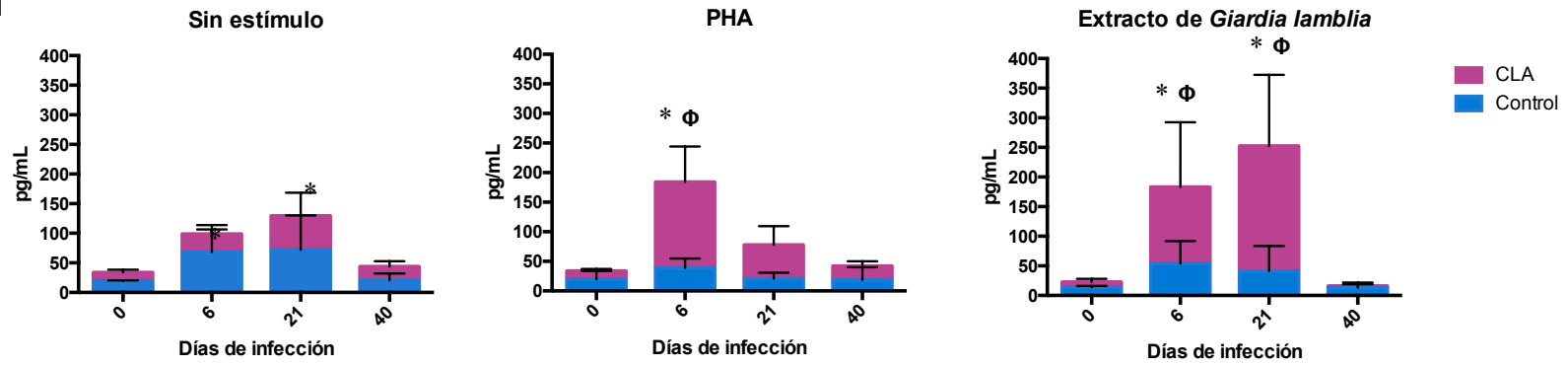
Se cuantificó la producción de IL-17A en células sin estimular, estimuladas con PMA + ionomicina y con extracto antigénico de *G. lamblia*. Observándose una mayor producción de IL-17A en células estimuladas con PMA + ionomicina en el grupo CLA independientemente del tiempo de infección ($p < 0.05$). Sin embargo no se observó este efecto en las células estimuladas con extracto antigénico de *G. lamblia* manteniéndose una producción constante durante la infección. Este comportamiento también se observó en el grupo de células sin estimular (Fig. 6b). Estos resultados contrastan con lo publicado por otros

grupos de trabajo, donde se ha visto un incremento a nivel transcripcional de dicha citocina en las primeras dos semanas de infección con *Giardia muris* en ratones C57BL/6 (Dreesen et al., 2014; Dann et al., 2015). Al contrario de nuestro ensayo, estos estudios utilizan como inóculo quistes de *Giardia muris*, que al ser la forma infectiva natural del roedor, es un mejor inductor de la respuesta inmune y por lo tanto, estimula la producción de IL-17A a niveles cuantificables.

Cabe mencionar que tanto en el grupo sin estímulo así como en el grupo con extracto antigénico de *G. lamblia*, hubo una producción de IL-17A ligeramente mayor en el grupo CLA con respecto al grupo control, sin ser significativa ($p > 0.1$). Esto en contraste con lo publicado por Draper et al., (2014) el cual observó que en un modelo in vitro el CLA suprimió la respuesta Th17. No obstante, las cantidades de IL-17A obtenidas en nuestro modelo de infección concuerdan con lo publicado por Li et al., (2014), donde la concentración de extracto de *G. lamblia* utilizado para estimular fue determinante en la cantidad de citocina producida.

Se trató de determinar la cantidad IL-4 producida, sin embargo esto no fue posible debido a las bajas concentraciones en las que se encontraba la citocina que estuvieron debajo del límite detectable de la prueba. Estos niveles bajos de citocinas pudieran deberse a la baja concentración de estímulo utilizado como lo fue observado por Li et al., (2014), así como al tiempo de incubación del cultivo. Por lo anterior, se sugiere probar con un sistema de detección más sensible como sería a nivel transcripcional mediante PCR, así como incrementar el estímulo antigénico y su tiempo de incubación.

a) IFN



b) IL-17A

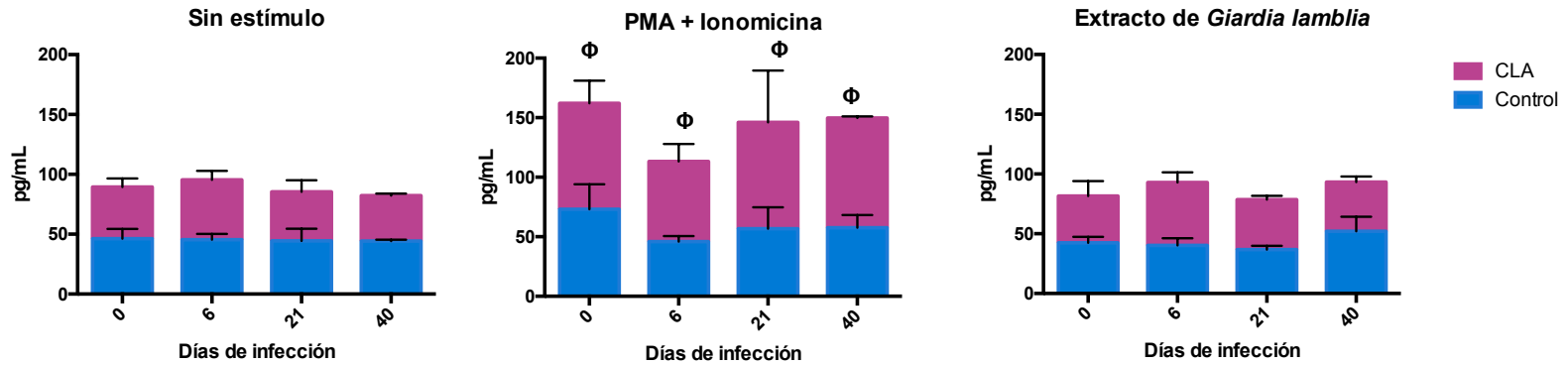


Figura 6. Producción de IFN γ (a) e IL-17A (b) ex vivo por células de placas de Peyer de ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Cada barra representa n=4.

* Diferencia significativa entre tiempo; Φ entre tratamientos; $p < 0.05$

VI. 5 Cuantificación de Inmunoglobulinas IgA-Total e IgA Giardia-Específica en Extracto Fecal

Se evaluó la producción de anticuerpos IgA total en extracto fecal durante la infección y se encontró una producción mayor en el grupo CLA que el control al inicio de la infección ($p < 0.05$). Este incremento basal en la producción de IgA concuerda a lo observado en varios modelos tales como roedores y humanos suplementados con CLA (Ramírez-Santana et al., 2009; Albers et al., 2003). Asimismo, los niveles de IgA total en el grupo de CLA se mantuvieron por encima del grupo control durante todo el bioensayo (Figura 7).

La concentración más elevada de IgA total en el grupo control y grupo CLA se encontró en el día 21 post-infección ($p < 0.05$). Esto último concuerda con otros estudios, como el de Amorim et al., (2010), quien encontró mayor producción de IgA total el día 21 post-infección en gerbos inoculados con *G. lamblia*. También, Velázquez et al. (2005) observó un aumento de IgA en la segunda semana de infección en ratones C3H/HeJ infectados con un inóculo similar al nuestro. Por su parte, Jiménez et al., (2004) encontró un incremento leve en la producción de IgA a partir de la segunda semana de infección, el cual se volvió significativo hacia la tercera semana post-infección en ratones BALB/c.

Además se realizó un ELISA directo utilizando el extracto antigénico de *G. lamblia* para evaluar la producción de IgA giardia-específica en extracto fecal (Fig. 8). Se observó un nivel más alto de anticuerpos en el grupo CLA correspondiente al día 6 ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control. Ambos grupos mostraron una disminución hacia el día 21 para después incrementarse de nuevo el día 40 post-infección ($p < 0.05$). El grupo de Abdul-Wahid et al., (2008), a su vez encontró un ligero incremento de IgA específica en la fase aguda de la infección, en las primeras semanas, la cual aumentó significativamente hacia la fase de eliminación (día 40 post-infección). Esto también fue observado por Jiménez et al., (2014) con una concentración máxima el día 7 post-infección, la cual fue disminuyendo con el tiempo, hasta elevarse de nuevo el día 28 post-infección.

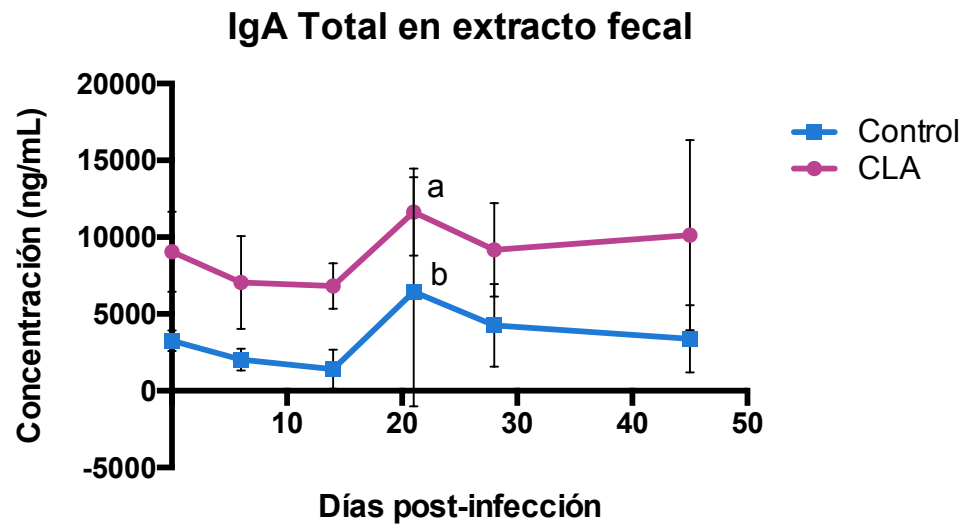


Figura 7. Producción de IgA total en ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Se cuantificó la concentración de IgA total en extracto fecal obtenido de los grupos de estudio mediante la técnica de ELISA. Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4.

^{ab} Literales distintas denotan diferencias significativas

* Diferencias significativas se tomaron a $p < 0.05$

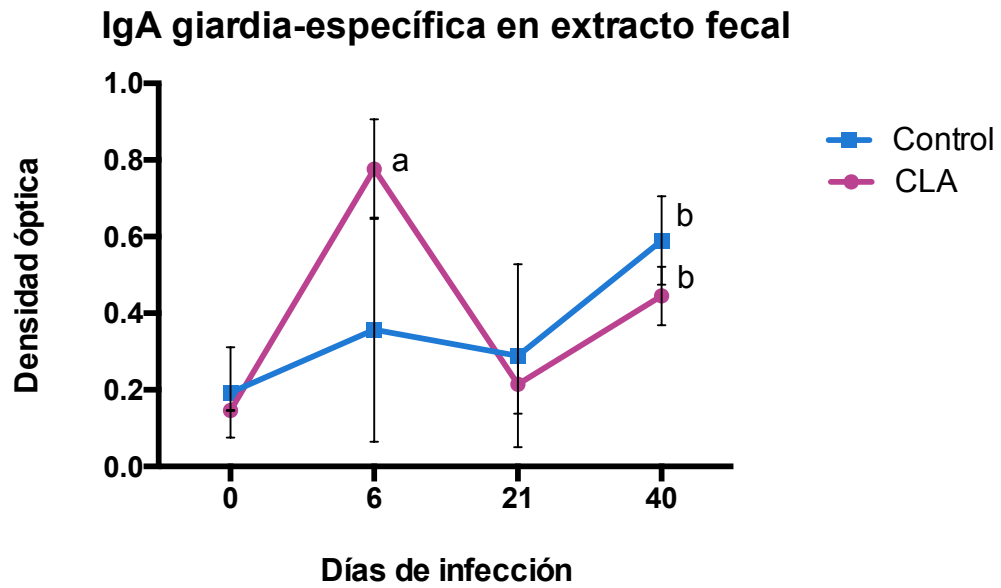


Figura 8. Producción de IgA giardia-específica en ratones infectados con *G. lamblia* pertenecientes al grupo control y al grupo suplementado con CLA. Se analizaron muestras de extracto fecal obtenido mediante técnica ELISA directo utilizando extracto antigénico de *Giardia lamblia*. Datos obtenidos de dos ensayos independientes. Cada punto representa n=4.

^{ab} Literales distintas denotan diferencias significativas en tiempo y tratamiento.

* Diferencias significativas se tomaron a $p < 0.05$

VII. CONCLUSIÓN

La suplementación con la mezcla 50:50 de 9cis-11trans y 12trans-10cis de ácido linoleico conjugado no modifica la población de linfocitos CD4+ de placas de Peyer con respecto al grupo control en ratones C3H/HeN infectados con *Giardia lamblia*. Asimismo, la suplementación con CLA incrementa el porcentaje de linfocitos CD8+ en estado basal. Mientras que mantiene porcentajes constantes de linfocitos B durante la etapa aguda de la infección.

El CLA incrementa la producción de IFN γ a un estímulo específico de *Giardia lamblia* los días 6 y 21 post-infección, los cuales corresponden al pico de infección y al inicio de la fase de eliminación. Además, se vio un efecto de incremento, no específico a *G. lamblia*, en la producción IL-17A en células provenientes de ratones suplementados con CLA, en presencia de PMA + ionomicina.

La suplementación con la mezcla 50:50 9cis-11trans y 12trans-10cis de CLA incrementa la producción de inmunoglobulina IgA total e IgA giardia-específica en ratones C3H/HeN.

En conclusión el CLA modula la respuesta adaptativa de ratones infectados con *Giardia lamblia*, incrementando la producción de IgA e IFN γ , que participan en el control de la infección.

VIII. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H.H., and Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular + Student Consult: Elsevier Health Sciences Spain. Séptima edición. Madrid. 560 pp.
- Abdul-Wahid A., and Faubert G. 2008. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. *Int J Parasitol*, 38(6), 691-703.
- Adam R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 447-475.
- Albers R., van der Wielen R.P., Brink E.J., Hendriks H.F., Dorovska-Taran V.N., and Mohede I.C. 2003. Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur J Clin Nutr*, 57(4), 595-603.
- Aley S.B., Zimmerman M., Hetsko M., Selsted M.E., and Gillin F.D. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infection and immunity*, 62(12), 5397-5403.
- Aloisio F., Filippini G., Antenucci P., Lepri E., Pezzotti G., Caccio S.M., et al. 2006. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Vet Parasitol*, 142(1-2), 154-158.
- Amorim R.M., Silva D.A., Taketomi E.A., Morato M.G., Mundim M.J., Ribeiro D.P., et al. 2010. *Giardia duodenalis*: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. *Exp Parasitol*, 125(3), 297-303.
- Belury M.A., Nickel K.P., Bird C.E., and Wu Y. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer*, 26(2), 149-157.

- Bontempo V., Sciannimanico D., Pastorelli G., Rossi R., Rosi F., and Corino C. 2004. Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. *J Nutr*, 134(4), 817-824.
- Byrd L.G., Conrad J.T., and Nash T.E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun*, 62(8), 3583-3585.
- Carranza P.G., Feltes G., Ropolo A., Quintana S.M., Touz M.C., and Luján H.D. 2002. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. *Infect Immun*, 70(9), 5265-5268.
- Cesta M.F. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34(5), 599-608.
- Cerutti A. 2008. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol*, 1(1), 8-10.
- Chin A.C., Teoh D.A., Scott K.G.-E., Meddings J.B., Macnaughton W.K., and Buret A.G. 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*, 70(7), 3673-3680.
- Chin S., Liu W., Storkson J., Ha Y., and Pariza M. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(3), 185-197.
- Chin S.F., Storkson J.M., Albright K.J., Cook M.E., and Pariza M.W. 1994. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr*, 124(12), 2344-2349.
- Coombes J.L., and Powrie F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), 435-446.
- Corino C., Pastorelli G., Rosi F., Bontempo V., and Rossi R. 2009. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation in sows on performance

- and immunoglobulin concentration in piglets. *J Anim Sci*, 87(7), 2299-2305.
- Davids B.J., Palm J.D., Housley M.P., Smith J.R., Andersen Y.S., Martin M.G., et al. 2006. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *The Journal of Immunology*, 177(9), 6281-6290.
- Davis I.C., and Owen R.L. 1997. *The immunopathology of M cells*. Springer Semin Immunopathol, 18(4), 421-448.
- Draper E., DeCoursey J., Higgins S.C., Canavan M., McEvoy F., Lynch M., et al. 2014. Conjugated linoleic acid suppresses dendritic cell activation and subsequent Th17 responses. *J Nutr Biochem*, 25(7), 741-749.
- Dreesen L., De Bosscher K., Grit G., Staels B., Lubberts E., Bauge E., et al. 2014. *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect Immun*, 82(8), 3333-3340.
- Eckmann L., Laurent F., Langford T.D., Hetsko M.L., Smith J.R., Kagnoff M.F., et al. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology*, 164(3), 1478-1487.
- Farthing M.J. 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 24(1), 79-88.
- Faubert G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*, 13(1), 35-54.
- Franco M.C., Golowczyc M.A., De Antoni G.L., Perez P.F., Humen M., and Serradell Mde L. 2013. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J Med Microbiol*, 62(Pt 12), 1815-1822.
- Gärdby E., Wrammert J., Schon K., Ekman L., Leanderson T., and Lycke N. 2003. Strong differential regulation of serum and mucosal IgA responses

- as revealed in CD28-deficient mice using cholera toxin adjuvant. *J Immunol*, 170(1), 55-63.
- Gillin F.D., Boucher S.E., Rossi S.S., and Reiner D.S. 1989. *Giardia lamblia*: The roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp Parasitol*, 69(1), 164-174.
- Gormley P.D., Powell-Richards A.O., Azuara-Blanco A., Donoso L.A., and Dua H.S. 1998. Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated-lymphoid-tissue after exposure to retinal-S-antigen. *Int Ophthalmol*, 22(2), 77-80.
- Haley P.J. 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188(1), 49-71.
- Hassan E.M., Aliasghari F., Babaei-Beigi M., and Hasanzadeh J. 2013. Effect of conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acid supplementation on inflammatory and oxidative stress markers in atherosclerotic patients. *ARYA atherosclerosis*, 9(6), 311-318.
- Hayek M.G., Han S.N., Wu D., Watkins B.A., Meydani M., Dorsey J.L., et al. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. *J Nutr*, 129(1), 32-38.
- Heyworth M.F. 1986. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. *Infect Immun*, 52(2), 568-571.
- Houseknecht K.L., Vanden Heuvel J.P., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., et al. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(3), 678-682.
- Ip C., Chin S.F., Scimeca J.A., and Pariza M.W. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res*, 51(22), 6118-6124.
- Iñigo-Figueroa G., Mendez-Estrada R.O., Quihui-Cota L., Velasquez-Contreras C.A., Garibay-Escobar A., Canett-Romero R., et al. 2013. Effects of dietary zinc manipulation on growth performance, zinc status and immune

- response during *Giardia lamblia* infection: a study in CD-1 mice. *Nutrients*, 5(9), 3447-3460.
- Janeway CA Jr T.P., Walport M, et al. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science, The mucosal immune system.
- Jarry A., Bossard C., Bou-Hanna C., Masson D., Espaze E., Denis M.G., et al. 2008. Mucosal IL-10 and TGF- β play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN- γ -mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest*, 118(3), 1132.
- Jimenez J.C., Fontaine J., Grzych J.M., Dei-Cas E., and Capron M. 2004. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1), 152-160.
- Jung M., and Ha Y. 1999. Conjugated linoleic acid isomers in partially hydrogenated soybean oil obtained during nonselective and selective hydrogenation processes. *J Agric Food Chem*, 47(2), 704-708.
- Kelley D.S. 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, 17(7), 669-673.
- Kelley D.S., and Erickson K.L. 2003. Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: benefits vs. risks. *Lipids*, 38(4), 377-386.
- Kepler C.R., Hirons K.P., McNeill J., and Tove S. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6), 1350-1354.
- Koronowicz A., Dulińska-Litewka J., Pisulewski P., and Laidler P. 2008. [Effect of conjugated linoleic acid isomers on proliferation of mammary cancer cells]. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 60(3), 261-267.
- Kurashima Y., and Kiyono H. 2014. New era for mucosal mast cells: their roles in inflammation, allergic immune responses and adjuvant development. *Exp Mol Med*, 46, e83.

- Lai P.S.A., and Mayer L. (1997). Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. Paper presented at the Seminars in gastrointestinal disease.
- Langford T.D. 2002. Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, 70(1), 11-18.
- Lee K.N., Kritchevsky D., and Pariza M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108(1), 19-25.
- Li E., Liu M., and Singer S.M. 2014. Resistance to reinfection in mice as a vaccine model for giardiasis. *Hum Vaccin Immunother*, 10(6), 1536-1543.
- Li E., Zhou P., Petrin Z., and Singer S.M. 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 72(11), 6642-6649.
- López-Plaza B., Bermejo L.M., Koester Weber T., Parra P., Serra F., Hernández M., et al. 2013. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid on weight control and body composition in healthy overweight people. *Nutricion Hospitalaria*, 28(6).
- Lugton I. 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol Cell Biol*, 77(4), 364-372.
- Malpuech-Brugère C., Verboeket-van de Venne W.P., Mensink R.P., Arnal M.A., Morio B., Brandolini M., et al. 2004. Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity research*, 12(4), 591-598.
- McGhee J.R. 2005. Peyer's patch germinal centers: the elusive switch site for IgA. *J Immunol*, 175(3), 1361-1362.
- McPherson R.C., Cambrook H.E., O'Connor R.A., and Anderton S.M. 2014. Induction of passive EAE using myelin-reactive CD4+ T cells. *Methods Mol Biol*, 1193, 187-198.
- Meng T., Hetsko M., and Gillin F. 1993. Antigenic switching of TSA 417, a trophozoite variable surface protein, following completion of the life cycle of *Giardia lamblia*. *Infect Immun*, 61(12), 5394-5397.

- Meng T.C., Hetsko M.L., and Gillin F.D. 1993. Antigenic switching of TSA 417, a trophozoite variable surface protein, following completion of the life cycle of *Giardia lamblia*. *Infect Immun*, 61(12), 5394-5397.
- Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., and Honjo T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553-563.
- Murphy K. 2009. *Inmunobiología de Janeway*. McGraw-Hill. Séptima edición. Madrid. 913 pp.
- Nakamura M., Kondo S., Sugai M., Nazarea M., Imamura S., and Honjo T. 1996. High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int Immunol*, 8(2), 193-201.
- Nash T.E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 45(3), 585-590.
- Neurath M.F., Finotto S., and Glimcher L.H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine*, 8(6).
- Nogales K., Zaba L., Guttman-Yassky E., Fuentes-Duculan J., Suárez-Fariñas M., Cardinale I., et al. 2008. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *British Journal of Dermatology*, 159(5), 1092-1102.
- Pabst O., Herbrand H., Worbs T., Friedrichsen M., Yan S., Hoffmann M.W., et al. 2005. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *European journal of immunology*, 35(1), 98-107.
- Pabst R. 1987. The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat Embryol (Berl)*, 176(2), 135-144.
- Pariza M.W., and Hargraves W.A. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. *Carcinogenesis*, 6(4), 591-593.

- Park Y., Albright K.J., Liu W., Storkson J.M., Cook M.E., and Pariza M.W. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32(8), 853-858.
- Park Y., Albright K.J., Storkson J.M., Liu W., and Pariza M.W. 2007. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model. *J Food Sci*, 72(8), S612-617.
- Parodi P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J Dairy Sci*, 82(6), 1339-1349.
- Perez O., Lastre M., Bandera F., Díaz M., Domenech I., Fagundo R., et al. 1993. Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. *Arch Med Res*, 25(2), 171-177.
- Perez-Cano F.J., Ramirez-Santana C., Molero-Luis M., Castell M., Rivero M., Castellote C., et al. 2009. Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy. *J Lipid Res*, 50(3), 467-476.
- Perlmutter D., Leichtner A., Goldman H., and Winter H. 1985. Chronic diarrhea associated with hypogammaglobulinemia and enteropathy in infants and children. *Dig Dis Sci*, 30(12), 1149-1155.
- Ramirez-Santana C., Castellote C., Castell M., Molto-Puigmarti C., Rivero M., Perez-Cano F.J., et al. 2011. Enhancement of antibody synthesis in rats by feeding cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid during early life. *J Nutr Biochem*, 22(5), 495-501.
- Ramirez-Santana C., Perez-Cano F.J., Castellote C., Castell M., Rivero M., Rodriguez-Palmero M., et al. 2009. Higher immunoglobulin production in conjugated linoleic acid-supplemented rats during gestation and suckling. *Br J Nutr*, 102(6), 858-868.
- Roxstrom-Lindquist K., Palm D., Reiner D., Ringqvist E., and Svard S.G. 2006. Giardia immunity--an update. *Trends Parasitol*, 22(1), 26-31.
- Ryder J., Portocarrero C., Song X., Cui L., Yu M., Combatsiaris T., et al. 2001. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid

- improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes*, 50(5), 1149-1157.
- Schoenbeck S., McKenzie D.T., and Kagnoff M.F. 1989. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *European journal of immunology*, 19(6), 965-969.
- Scott K.G., Yu L.C., and Buret A.G. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*, 72(6), 3536-3542.
- Snider D., Skea D., and Underdown B. 1988. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the *xid* gene. *Infection and immunity*, 56(11), 2838-2842.
- Song H. J., Grant I., Rotondo D., Mohede I., Sattar N., Heys S. D., y Wahle K. W. (2005). Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*, 59, 508-517
- Stachowska E., Siennicka A., Baskiewicz-Halasa M., Bober J., Machalinski B., and Chlubek D. 2012. Conjugated linoleic acid isomers may diminish human macrophages adhesion to endothelial surface. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(1), 30-35.
- Stäger S., Gottstein B., and Müller N. 1997. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Int J Parasitol*, 27(8), 965-971.
- Sugano M., Tsujita A., Yamasaki M., Noguchi M., and Yamada K. 1998. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids*, 33(5), 521-527.
- Sullivan P., Marsh M., Phillips M., Dewit O., Neale G., Cevallos A., et al. 1991. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of disease in childhood*, 66(3), 304-306.

- Suzuki K., Ha S.A., Tsuji M., and Fagarasan S. 2007. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol*, 19(2), 127-135.
- Svanborg C., Godaly G., and Hedlund M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol*, 2(1), 99-103.
- Takahashi K., Akiba Y., Iwata T., and Kasai M. 2003. Effect of a mixture of conjugated linoleic acid isomers on growth performance and antibody production in broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 89(05), 691-694.
- Tellez A., Winiacka-krusnell J., Paniagua M., and Linder E. 2003. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 35(5), 322-325.
- Thompson R. 2009. The impact of Giardia on science and society. *Giardia and Cryptosporidium: from Molecules to Disease*. CAB International, Wallingford, 1-11.
- Vajdy M., Kosco-Vilbois M.H., Kopf M., Köhler G., and Lycke N. 1995. Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *The Journal of experimental medicine*, 181(1), 41-53.
- Velazquez C., Beltran M., Ontiveros N., Rascon L., Figueroa D.C., Granados A.J., et al. 2005. Giardia lamblia infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol*, 27(9), 351-356.
- West D.B., Delany J.P., Camet P.M., Blohm F., Truett A.A., and Scimeca J. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol*, 275(3 Pt 2), R667-672.
- Yamasaki M., Chujo H., Hirao A., Koyanagi N., Okamoto T., Tojo N., et al. 2003. Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Nutr*, 133(3), 784-788.
- Yamasaki M., Kishihara K., Mansho K., Ogino Y., Kasai M., Sugano M., et al. 2000. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin

- productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64(10), 2159-2164.
- Yarovinsky, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*. 14(2), 109-121
- Zhang H., Guo Y., and Yuan J. 2005. Effects of conjugated linoleic acids on growth performance, serum lysozyme activity, lymphocyte proliferation, and antibody production in broiler chicks. *Arch Anim Nutr*, 59(5), 293-301.
- Zhou X.-R., Sun C.-H., Liu J.-R., and Zhao D. 2008. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR γ gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. *Growth Hormone & IGF Research*, 18(5), 361-368.