



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



*EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN MATERNA
DE UN SIMBIÓTICO EN EL DESARROLLO
INMUNITARIO DE LA DESCENDENCIA*

Sandra Galindo Fernández

Trabajo de final de máster

Máster en Nutrición y Metabolismo

(URV-UB)

2021-2022

Departamento de Bioquímica y Fisiología

Grupo de Autoinmunidad, Inmunonutrición y Tolerancia

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación (UB)

Directores:

Francisco José Pérez Cano

María José Rodríguez Lagunas

Agradecimientos,

Me gustaría empezar agradeciendo a todo el equipo del grupo de investigación de Autoinmunidad, Immunonutrición y Tolerancia del Departamento de Bioquímica y Fisiología, especialmente a mis tutores Francisco José Pérez Cano y María José Rodríguez Lagunas por permitirme formar parte de este equipo, aportarme tantos conocimientos y guiarme en este gran proyecto que han desarrollado. En especial quiero dar las gracias a la doctoranda Laura Sáez Fuertes por todo su apoyo, su paciencia y por sacar una sonrisa a pesar de las dificultades que han surgido en todo este tiempo.

Finalmente, agradecer a mis compañeras Aina, Paula y Cristina por todas las horas que hemos compartido, por ayudarme en el camino y facilitarme el día a día haciendo que haya disfrutado inmensamente de esta etapa.

RESUMEN:

El desarrollo del sistema inmunitario en las primeras etapas de la vida se ve influenciado por diversos factores ambientales y dietéticos. Además, los factores maternos tienen un efecto directamente relacionado con las respuestas inmunitarias de la descendencia a lo largo de su vida.

Este estudio ha sido diseñado para evaluar el impacto de la suplementación con un simbiótico por vía oral en ratas durante la gestación, la lactancia y las primeras etapas de vida de las crías, sobre la modulación y el desarrollo del sistema inmunitario. Este trabajo tenía como objetivo evaluar el crecimiento de las crías de rata a día 28 de vida, así como las variables morfológicas, hematológicas y el desarrollo del sistema inmunitario.

La suplementación con el simbiótico ha provocado algunos cambios positivos en cuanto al desarrollo del intestino delgado y del tejido adiposo marrón (TAM), así como en las concentraciones de las poblaciones linfocíticas, síntesis de inmunoglobulinas, respuesta inmunitaria y expresión de marcadores específicos.

En conclusión, se sugiere que la suplementación materna y en las primeras etapas de la vida con el simbiótico tiene un impacto positivo en el desarrollo del sistema inmunitario y por tanto puede ser de utilidad en la mejora de la respuesta inmunitaria durante la infancia.

PALABRAS CLAVE: sistema inmunitario, simbiótico, inmunonutrición, desarrollo neonatal.

KEY WORDS: immune system, symbiotic, immunonutrition, neonatal development.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	SISTEMA INMUNITARIO	1
1.1.1.	LINFOCITOS T	2
1.1.2.	RESPUESTA Th1 y Th2	3
1.1.3.	LINFOCITOS B	4
1.1.4.	INMUNOGLOBULINAS	4
1.1.5.	INMUNIDAD DE LA MUCOSA INTESTINAL	6
1.2.	INMUNONUTRICIÓN E INMUNOMODULACIÓN	7
1.2.1.	MICROBIOTA	8
1.2.2.	PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS	8
1.3.	INFECCIONES EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA VIDA	9
1.3.1.	INFECCIONES POR ROTAVIRUS	9
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	10
3.2.	PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DEL SIMBIÓTICO	11
3.3.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	12
3.3.1.	VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS	12
3.3.2.	OBTENCIÓN DEL LAVADO INTESTINAL (RI)	13
3.3.3.	DETERMINACIÓN DEL HEMOGRAMA	13
3.3.4.	OBTENCIÓN Y RECUENTO DE LINFOCITOS DEL BAZO Y GLM	13
3.4.	EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES INMUNITARIOS	14
3.4.1.	DETECCIÓN DE IgA E IgM MEDIANTE ELISA	14
3.4.2.	DETECCIÓN DE Ig MEDIANTE TÉCNICA MULTIPLEX	14
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS: MARCAJE FENOTÍPICO Y CITOMETRÍA DE FLUJO	15
3.5.	ESTADÍSTICA	16
4.	RESULTADOS	16
4.1.	VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS	16
4.1.1.	Curva de crecimiento	16
4.1.2.	Medidas morfológicas	17
4.2.	PESO DE ÓRGANOS Y TEJIDO ADIPOSO	17
4.3.	CONSUMO DE PIENSO Y AGUA	17
4.4.	VARIABLES HEMATOLÓGICAS	18
4.5.	VARIABLES INMUNOLÓGICAS	18

4.5.1. Inmunoglobulinas.....	18
4.6. FENOTIPOS DE LAS POBLACIONES LINFOCÍTICAS	19
5. DISCUSIÓN.....	20
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO I.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO II.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO III.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO IV	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO V	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO VI	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO VII.....	¡Error! Marcador no definido.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario es un sistema fisiológico constituido por una serie de células, las cuales, junto con las moléculas que producen, se encargan de la protección del organismo frente a agentes patógenos o células malignas. Este no es un sistema de órganos definido per se, sino más bien una población de células distribuidas en todos los órganos para defender el cuerpo contra cualquier invasor potencial. La inmunidad es fundamental para la supervivencia. El sistema inmunitario humano ha evolucionado con la capacidad biológica para distinguir lo propio de lo ajeno y para producir memoria a través del proceso de expansión clonal celular. Esto es posible gracias a los genes que codifican inmunoglobulinas (Ig) y receptores de células T, así como por el requisito de que las células T reconozcan antígenos. La comprensión de la respuesta inmunitaria es crucial para conocer y detectar defectos en su funcionamiento que provocan los trastornos inmunitarios, así como para identificar las posibles vías de modulación terapéutica del sistema inmunitario. Los recién nacidos poseen un sistema inmunitario en desarrollo, inmaduro en comparación con el de los adultos. Esto hace que sean muy susceptibles a infecciones. Además, las alteraciones del sistema inmunitario en desarrollo en los recién nacidos como resultado del desequilibrio nutricional materno pueden dar lugar a la susceptibilidad a infecciones en el nacimiento temprano o al riesgo de enfermedades inflamatorias o mediadas por el sistema inmunitario en etapas posteriores de la vida (1,2).

La inmunidad se divide en dos respuestas generales, la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa (**Figura 1**). La respuesta innata aparece de manera rápida e inespecífica frente a patógenos mientras que la respuesta adaptativa aparece de forma más lenta en el tiempo, pero con una mayor especificidad y con capacidad de generar memoria inmunitaria. En la inmunidad innata están implicadas células mieloides, las células NK y las células linfoides innatas, así como los sistemas humorales como las defensinas y el sistema del complemento. La inmunidad adaptativa se basa en la acción de los linfocitos T, linfocitos B y las Ig. En un primer momento, la invasión de patógenos induce la activación de células inmunitarias innatas. Estas vías activan fuertemente una reacción inflamatoria y eliminan los patógenos. En caso de que no se elimine la infección, las células presentadoras de antígenos (CPA) se encargan de ingerir y procesar los patógenos, presentar el antígeno y así estimular la activación específica de los linfocitos T y B. A su vez, esto conduce a la expansión clonal y la activación de mecanismos efectores como las citoquinas y las

inmunoglobulinas. Por tanto, podemos decir que la activación de la respuesta adaptativa y la inducción de la memoria inmunitaria en los linfocitos dependen del sistema inmunitario innato, en particular de las CPA (3–5).

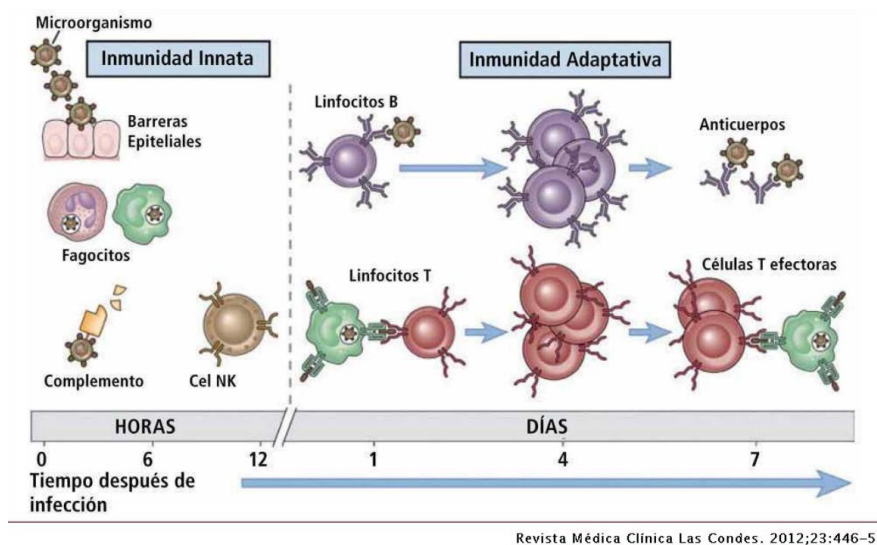


Figura 1. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa (2).

1.1.1. LINFOCITOS T

Estas células se designan con la letra T debido a que se producen principalmente en el timo. Reconocen antígenos a través del receptor de célula T (TCR), que se expresa en superficie y tiene una alta variabilidad. Existen dos grupos principales de células T: las T colaboradoras o “helper” (Th), que favorecen a otras células inmunitarias, y las T citotóxicas (Tc) que eliminan células infectadas o tumorales.

El TCR necesita que el antígeno sea procesado en pequeños péptidos y estos se presenten por las CPA, que expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos tipos de MHC: el de clase I y el de clase II. El MHC de clase I presenta antígenos a los Tc mientras que el MHC de clase II los presenta a los Th. La unión del TCR con la molécula de MHC cargada con el péptido antigénico es algo inestable, por lo que se requieren moléculas adicionales llamadas correceptores. El correceptor CD4 se expresa en las células T colaboradoras mientras que el correceptor CD8 lo hace en los linfocitos T citotóxicos.

El TCR está formado por cadenas que aseguran la transmisión de la señal a la célula T. El receptor puede ser alfa-beta o gamma-delta, dando lugar a las células T $\alpha\beta$ o las células T $\gamma\delta$. A su vez, el receptor tiene unidas otras moléculas que, en conjunto, se denominan

CD3. Los linfocitos Th y Tc expresan TCR $\alpha\beta$ y son mayoritarias respecto a los linfocitos T $\gamma\delta$ que representan un subconjunto relativamente pequeño de linfocitos T en la sangre periférica. En general, los linfocitos T $\gamma\delta$ se enriquecen en los tejidos epiteliales y mucosos donde parece ser que sirven como primera línea de defensa contra los patógenos o células infectadas mediante la producción de citocinas y quimiocinas, citólisis de células diana infectadas (perforinas) e interacción con otras células, incluidas las células epiteliales, los monocitos, las células dendríticas, los neutrófilos y los linfocitos B. Todo ello conduce a la activación de respuestas inmunitarias adaptativas (1).

Una vez que los linfocitos T salen del timo, circulan por todo el cuerpo hasta que reconocen su antígeno en la superficie de las CPA. El TCR tanto en los Th CD4+ como en los Tc se une al antígeno mientras se mantiene en el complejo MHC, en la superficie de la CPA. Esto desencadena la activación inicial de los linfocitos T. Las moléculas CD4 y CD8 también se unen a la molécula MHC, estabilizando toda la estructura. Esta unión inicial entre un linfocito T específico para un antígeno y el antígeno-MHC con el que coincide pone en marcha toda la respuesta. Esto normalmente tiene lugar en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas o MALT).

Después de esta unión, se necesitan señales secundarias para activarse y ser efectivas contra el antígeno, como CD28, que es la molécula que aporta esta segunda señal a los linfocitos Th e inicia la proliferación y por tanto la producción de millones de linfocitos T que son capaces de reconocer el antígeno (3-5).

1.1.2. RESPUESTA Th1 y Th2.

Posteriormente a la activación de los linfocitos T, las citocinas generadas van a determinar el tipo de respuesta inmunitaria convirtiendo el Th en Th1, Th2, Th17 o Th reguladores (**Figura 2**). Tanto en ratones como en humanos, los subconjuntos de linfocitos Th1 y Th2, funcionalmente distintos, se caracterizan por los patrones de citocinas que producen. Cada una de estas células realiza una tarea específica en el tejido y en el desarrollo de más respuestas inmunitarias. De esta forma, la población de células resultante es capaz de acudir al lugar de la infección o inflamación para hacer frente a la amenaza.

Las citocinas secretadas por los linfocitos Th1 causan la proliferación de Th activados. Además, estimulan el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos promoviendo la fagocitosis y favorecen la activación de células NK y Tc promoviendo la respuesta celular y estimulando la formación de anticuerpos activadores del complemento, efectivo contra microorganismos intracelulares (6).

Las citocinas secretadas por linfocitos Th2 estimulan la activación de linfocitos B y la formación de anticuerpos (IgA e IgE). Además, potencian la formación de mastocitos y eosinófilos promoviendo la respuesta humoral. Inhiben la activación de macrófagos y la respuesta Th1. Son efectivos contra microorganismos extracelulares y se encuentran incrementadas en el neonato y en los procesos alérgicos. Esto hace que la inmunidad neonatal sea más vulnerable a las enfermedades respiratorias y diarreicas agudas (7).

El desarrollo de respuestas Th1 o Th2 depende de factores ambientales, incluida la dosis de antígeno, su naturaleza, las citocinas en el momento de la presentación del antígeno e incluso la genética del individuo (8).

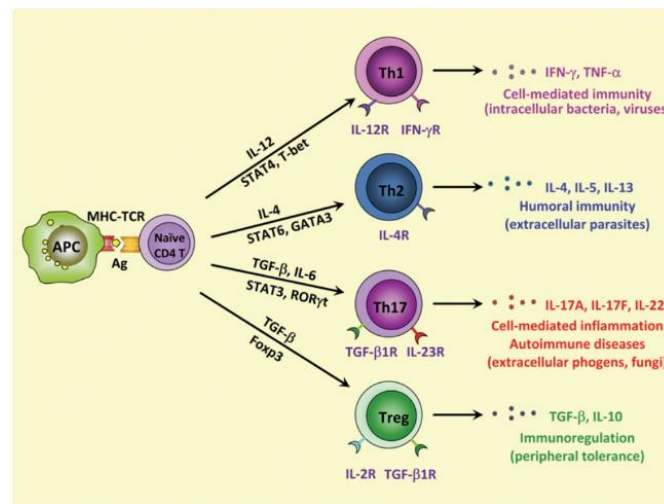


Figura 2. Esquema de linfocitos efectores en la respuesta inmunitaria [6].

1.1.3. LINFOCITOS B

Los linfocitos B requieren de la interacción con los linfocitos T para la producción de Ig. Así, la activación de las linfocitos B se desencadena por la unión del ligando (antígeno) al receptor de células B (BCR), que inicia una cascada de señalización intracelular que lleva a la internalización del antígeno para su procesamiento y presentación a los linfocitos T. Mientras que las APC convencionales, como los macrófagos, no muestran especificidad de unión por el antígeno, los linfocitos B tienen receptores de Ig de superficie específicos de antígeno que mejoran su capacidad para presentar antígeno a los linfocitos T (9,10). Así, podemos decir que la principal función de estos linfocitos B es la producción de Ig en la respuesta inmunitaria.

1.1.4. INMUNOGLOBULINAS

Las Ig, también conocidas como anticuerpos, son glicoproteínas producidas por las células plasmáticas que actúan en las respuestas inmunitarias al reconocer y unirse a antígenos

específicos. Existen distintos tipos de anticuerpos, las IgA, IgG, IgM, IgE e IgD. Estas tienen distintas características biológicas, estructura, especificidad por los antígenos y distribución en el organismo. En general, las Ig están compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que forman la unidad monomérica básica del anticuerpo (**Figura 3**), aunque en el caso de la IgA y la IgM suelen ensamblarse en dímeros o pentámeros, reaccionando con distintos receptores y siendo transportadas a las superficies de las mucosas (11).

Las Ig neutralizan los patógenos o antígenos y activan el sistema del complemento mediante mecanismos específicos para cada una de ellas. La capacidad de memoria de la respuesta inmunitaria frente a infecciones nos protege de la posible reinfección y limita la propagación entre individuos. Los anticuerpos quedan circulando en sangre llegando a todos los tejidos del organismo. Después de la resolución de una infección y producción de estas Ig, las células permanecen en alerta, aunque no activadas, por si ocurre una reinfección, donde la respuesta sería más rápida (12–14).

Se ha observado que la línea linfocítica de los humanos se desarrolla de forma similar a la de los roedores. En ensayos preclínicos donde se han estudiado las poblaciones de linfocitos del bazo en ratas al nacer y durante la etapa de lactancia, se ha encontrado una baja población de linfocitos T en las primeras semanas de vida. En cambio, los linfocitos B son la población que predomina en el momento del nacimiento, manteniéndose en estado inmaduro con una baja expresión de IgM en la superficie durante la lactancia (15). Las IgG e IgM séricas se detectan en ratas en los primeros días de vida y estas van aumentando durante la lactancia. Las células plasmáticas maduras producen IgA en la lámina propia del intestino, pero son las últimas que aparecen en suero, tanto en animales como en humanos. Estas son transportadas a través del intestino por un receptor polimérico de Ig (16).

Por otro lado, cabe destacar la importancia de la producción de IgM secretora por parte de los linfocitos B, necesaria para la inmunidad óptima frente a las infecciones virales agudas. Esta inmunoglobulina multifuncional es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y de la respuesta inmunitaria. Sus múltiples efectos vienen dados por sus distintos puntos de unión a distintos tipos de células mediante una amplia variedad de receptores (17).

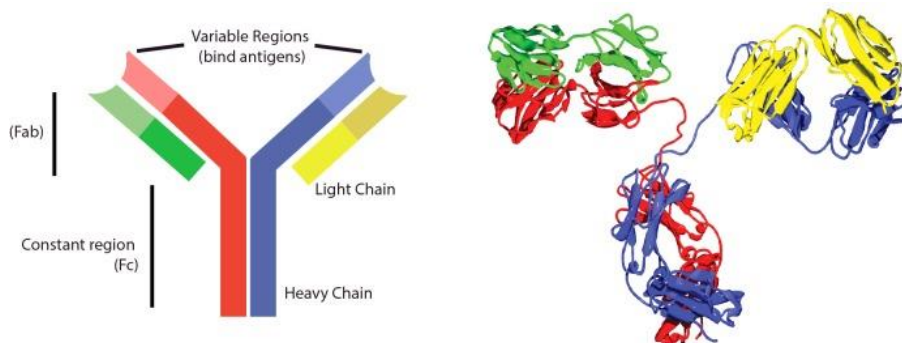


Figura 3. Estructura de una inmunoglobulina (IgG). Esta estructura está formada por dos cadenas pesadas idénticas (roja y azul) y dos cadenas ligeras idénticas (amarilla y verde). La parte superior de la Y (llamada región Fab) contiene dos regiones variables, cada una de las cuales se une al mismo antígeno. La parte inferior de la Y es la región constante (Fc), que interactúa con estructuras como los receptores celulares o el complemento [12].

1.1.5. INMUNIDAD DE LA MUCOSA INTESTINAL

El sistema inmunitario de la mucosa, también conocido como tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), incluye el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) entre otros asociados a otras mucosas del organismo. El GALT de las ratas es anatómicamente muy similar al humano. En este podemos distinguir dos compartimentos (**Figura 4**), el GALT organizado y el GALT difuso. En el GALT organizado es donde se induce la respuesta inmunitaria intestinal, constituido por las placas de Peyer (PP), folículos linfoides aislados y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). En cambio, en el GALT difuso es donde ocurre la fase efectora de la respuesta inmunitaria, constituido por poblaciones de linfocitos intraepiteliales (IEL) distribuidas por el epitelio y lámina propia intestinal (16,18)

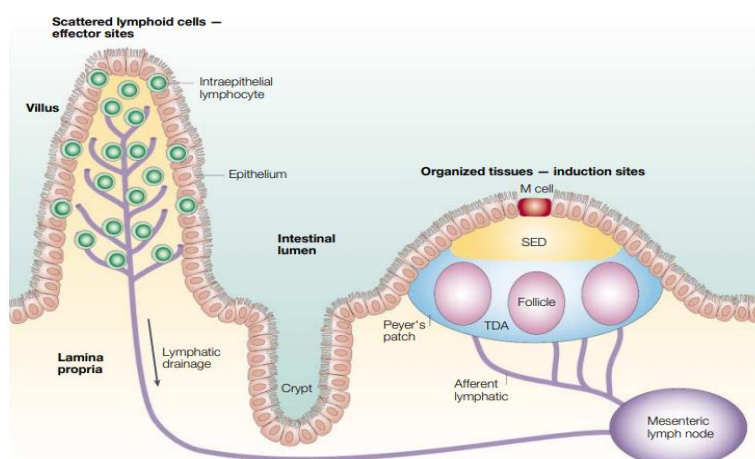


Figura 4. Representación esquemática de los elementos linfoides del sistema inmunitario intestinal [12].

Las PP son agregados linfoides que se distribuyen a lo largo de la mucosa y submucosa del tracto gastrointestinal, pero son de mayor densidad en el yeyuno y están orientados a

lo largo del borde mesentérico. Aquí es donde se induce la respuesta inmunitaria intestinal. El número de linfocitos T y B van aumentando en las PP desde el nacimiento hasta los primeros años de vida (19).

Entre los IEL descritos anteriormente se encuentran las células NK, que varían en su fenotipo, encontrando más CD8+ o CD8- dependiendo del momento de la lactancia en la que se encuentren. En estudios con ratas, se ha observado como conforme avanzan las semanas aumenta la población de NKCD8-, siendo la población de NK más abundante en la rata adulta. A este nivel también podemos encontrar linfocitos NKT, sobre todo en las primeras semanas tras el nacimiento, que van disminuyendo con la edad (12).

1.2. INMUNONUTRICIÓN E INMUNOMODULACIÓN

El campo de la inmunonutrición se está desarrollando de manera creciente en los últimos años y está creando un gran interés en la comunidad científica ya que aborda distintos campos relacionados con la nutrición, infecciones, inflamación, daño en los tejidos, la inmunidad y la microbiota. Cada vez existe más evidencia sobre la relación entre la nutrición, la microbiota intestinal, la integridad de la mucosa y la programación y modulación del sistema inmunitario. En este sentido, se han realizado estudios sobre los componentes de la leche materna, sus funciones e implicación en el desarrollo del sistema inmunitario del bebé (20,21).

Además, el impacto de la nutrición en el crecimiento y desarrollo fisiológico en los primeros años de vida es de vital importancia ya que perdura en el tiempo, influenciando en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades crónicas en edad adulta (22).

Por otro lado, el desarrollo de este campo de investigación ha permitido obtener más evidencia sobre la relación entre la desnutrición y una peor respuesta inmunitaria y resistencia a las infecciones, además de poder evaluar el estado nutricional de personas sanas, pero con riesgo de desnutrición o requerimientos nutricionales específicos (niños, ancianos, deportistas, embarazadas, etc.). La aplicación de la inmunonutrición ha sido de vital importancia en el ámbito clínico como estrategia de apoyo frente a enfermedades como el cáncer o enfermedades cardio vasculares, entre otras (23,24). Para estudiar el impacto que pueden tener los componentes de la dieta o compuestos bioactivos nutricionales sobre el sistema inmunitario, existen varios biomarcadores inmunológicos, pero siempre se debe tener en cuenta los diferentes factores ambientales y genéticos que pueden influenciar en cada caso de forma individual (20).

1.2.1. MICROBIOTA

La microbiota de la madre tiene una influencia relevante en el comienzo de la colonización y conformación del microbioma del bebé. Los factores más estudiados que influyen en la colonización microbiana del neonato han sido el tipo de parto y la lactancia, pero en últimos años se está investigando sobre la presencia de microbioma en la placenta materna y su relación con infecciones del líquido amniótico o el parto prematuro. Además, se plantea la posibilidad de que el desarrollo de la microbiota intestinal empiece en el útero materno (25–27). Cada vez existen más investigaciones que resultan en la importancia de la microbiota intestinal materna durante el embarazo y la lactancia como determinante crítico de la inmunidad infantil. Incluso se ha podido observar como la dieta materna antes y durante el embarazo influye en la incidencia de alergias e infecciones sobre la descendencia (28,29).

Además, la composición de la leche materna en cuanto a bacterias y nutrientes, como los oligosacáridos presentes, influyen en la composición de la microbiota intestinal de los descendientes y en la modulación inmunitaria (30). En conjunto, se destaca la importancia del papel que juegan los microorganismos beneficiosos durante la impronta del sistema inmunitario en los primeros años de vida. Por ejemplo, se ha mostrado como un desequilibrio en la composición de la microbiota, en especial una falta de bifidobacterias se relaciona con un estado inflamatorio crónico y disfunción en la respuesta inmunitaria en las primeras etapas de la vida, viéndose afectadas las respuestas Th2 y Th17 (31).

1.2.2. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son administrados en la cantidad adecuada, ejercen un efecto beneficioso para la salud de quien los recibe (32). Estos efectos han sido muy estudiados en los últimos años, encontrando, por ejemplo, propiedades inmunomoduladoras sobre el huésped. En este sentido parece que son capaces de aumentar la actividad macrofágica y de las células NK, modulan la secreción de Ig y citocinas, mejoran la integridad de la mucosa intestinal regulando la secreción de moco y compiten directamente con otras especies patógenas presentes en el intestino. El consumo de probióticos parece ser una buena herramienta terapéutica para mantener o reestablecer la eubiosis y, por tanto, la salud intestinal (33). No a todos los productos que contienen probióticos se les puede atribuir los mismos efectos. La acción saludable de las bacterias probióticas depende de la cepa utilizada. Cada cepa probiótica tiene parte de ADN propio, diferente al del resto de las cepas y que le confiere efectos específicos. Decimos, por ello, que los beneficios de un probiótico son cepa dependientes (34).

Los prebióticos son compuestos no digeribles, presentes en la dieta, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, consiguiendo un beneficio para la salud. Entre sus componentes, los cuales suelen formar parte de los alimentos, destacan las fibras alimentarias, los fructooligosacáridos, la inulina y los galactooligosacáridos (32).

Los simbióticos son productos que están compuestos por una mezcla de una o más cepas probióticas con uno o varios compuestos prebióticos, por tanto, aportan las propiedades de ambos compuestos. El término fue acuñado en 1995 por los investigadores Gibson y Roberfroid, que describieron de esta manera la acción sinérgica que pueden ejercer los prebióticos y los probióticos combinados. Se crearon para superar algunas posibles dificultades en la supervivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal. Además, también se utilizan para estimular la proliferación de ciertas bacterias autóctonas presentes en nuestro intestino. Los simbióticos tienen, pues, un efecto sinérgico. Esta acción sinérgica da como resultado la modulación de la actividad metabólica en el intestino, el mantenimiento de la bioestructura intestinal, desarrollo y mantenimiento de una microbiota beneficiosa y la inhibición de patógenos presentes en el intestino (35,36).

1.3. INFECCIONES EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA VIDA

Al nacer y durante los primeros años de vida el sistema inmunitario se mantiene inmaduro, desarrollándose progresivamente. En los recién nacidos los linfocitos se denominan “naïve” ya que aún no han tenido contacto con antígenos externos. Además, existe una falta de IgA secretora, una menor cantidad de microorganismos colonizadores y una menor producción de moco en el intestino, por lo que existe una mayor susceptibilidad a infecciones y alergias en esa etapa de la vida (17, 37, 38).

1.3.1. INFECCIONES POR ROTAVIRUS

Los virus que pertenecen al grupo de los rotavirus (RV) son los más habituales entre las infecciones gastrointestinales, sobre todo en la infancia. Estos son causantes de infecciones virales agudas, provocando daños en las células intestinales e iniciando la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Esto provoca una secreción de anticuerpos naturales, aquellos que se sintetizan incluso antes de una primera exposición frente a cualquier patógeno. Las infecciones por RV son una de las causas más frecuentes de gastroenteritis en niños menores de 5 años, además de provocar infecciones respiratorias o urinarias. Este tipo de virus son causantes de muerte infantil en los primeros años de vida. Aunque la diarrea por RV no se considera inflamatoria, es causante de malabsorción,

provocando diarrea osmótica. Esto acaba provocando la atrofia de las vellosidades intestinales. Aunque algunos probióticos son una herramienta eficaz para el tratamiento de la diarrea aguda, no están incluidos en el estándar de atención para niños con diarrea causada por RV (39–42).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El proyecto de investigación realizado en el grupo de Autoinmunidad y Tolerancia del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación consiste en estudiar los cambios y la posible modulación del sistema inmunitario frente a distintas intervenciones nutricionales. En este sentido, la **hipótesis** de partida de este trabajo es que la suplementación con un simbiótico en las madres y sus crías puede ejercer un efecto beneficiosos sobre el desarrollo y la regulación del sistema inmunitario en las primeras etapas de la vida.

El objetivo principal ha sido evaluar, a nivel preclínico, el efecto de la administración materna con un simbiótico durante la gestación y la lactancia, así como en las crías tras el destete, a día 28 de vida, sobre el desarrollo del sistema inmunitario.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

- Determinar el efecto del simbiótico, sobre el desarrollo y crecimiento de las crías.
- Estudiar el impacto del simbiótico sobre los variables hematológicas y componentes del sistema inmunitario.
- Evaluar el efecto del simbiótico sobre la respuesta inmunitaria humoral y celular a nivel sistémico y de mucosas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo se ha realizado con ratas Lewis machos y hembras (Janvier, La Plaine Saint-Denis Cedex, Francia). Se utilizaron 16 ratas hembra de 8 semanas distribuidas en dos grupos, el control (REF, n=8) y el grupo experimental simbiótico (SYM, n=8), las cuales se mantuvieron cada una con un macho durante una semana para asegurar la fecundación. Finalmente, se consiguieron 5 gestaciones para el grupo SYM y 6 para el grupo REF (**Figura 5**). Todas las ratas se mantenían estabuladas en condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz, en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona. El ensayo experimental siguió las

instrucciones del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Barcelona Ref 240/19.

Las hembras fueron administradas diariamente con el simbiótico por vía oral desde el primer día de experimentación hasta el final del ensayo. Además, todas las jaulas disponían de agua y pienso *ad libitum*. Desde el primer día y de forma continuada se controlaba el peso corporal, consumo de pienso y agua a la misma hora todos los días. Cuando todas las ratas dieron a luz, se igualó en el número de crías por madre, dejando 9 crías en cada jaula. En el quinto día de vida de las crías se les inoculó un rotavirus mediante sonda oral. Esto se hizo con el objetivo de inducir la infección que provoca diarrea aguda en crías y evaluar su evolución, lo que no es objeto de estudio en este trabajo y para lo cual se utilizaron 3 de las crías de cada camada.

Las crías se destetaron en el día 21 de vida (en el cual se utilizaron otras 3 crías de cada camada), se separaron de las madres y se reubicaron en jaulas por sexos. En ese punto, se empezó a suplementar a las crías con el simbiótico todos los días. El punto final del estudio en este trabajo fue en el día 28 de vida de las crías, donde se recogieron las muestras necesarias para evaluar las variables de interés. Para ello, de todas las madres se obtuvieron 21 crías (REF n=12, SYM n=9) para este trabajo y el resto fueron destinadas a otros objetivos para el ensayo general, tal como se ha mencionado anteriormente (**Figura 5**).

Figura 5. Diseño experimental. Representación de la línea temporal de experimentación con el grupo referencia (REF) y el grupo simbiótico (SYM), madres y crías.

3.2. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DEL SIMBIÓTICO

Por motivos de confidencialidad con la empresa proveedora del compuesto ensayado, la composición exacta del simbiótico no puede ser descrita. La preparación del simbiótico se hacía diariamente en el laboratorio, antes de entrar en la sala donde se encontraban los animales. Este se preparaba a base de dos prebióticos y un probiótico disueltos en suero fisiológico. Se administraba, mediante sonda oral, un volumen de 1 mL a las madres gestantes y 1,5 mL a las madres en etapa de lactancia. En este último caso, se procedía primero a separar a la madre de las crías. De día 21 a 28, los animales recibieron 0,2 mL de producto diario.

3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El día 28 de vida de la crías, punto final del estudio, se recogieron las muestras necesarias para las determinaciones. Para ello se administró la anestesia por vía intramuscular (ketamina 90 µL/100 g peso y xilacina 10 µL/100 g peso).

Una vez se encontraban bajo el efecto de la anestesia, se realizaron las medidas antropométricas y se procedió a la abertura de la cavidad abdominal y torácica para poder obtener las muestras necesarias para el estudio. Se obtuvo; sangre para determinar el hemograma y el perfil de inmunoglobulinas en plasma, lavado intestinal para determinar IgA e IgM y glándula salival (GS) y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) para determinar el perfil de inmunoglobulinas y el ratio Th1/Th2. Para el estudio de la composición linfocitaria se utilizaron muestras de GLM y de bazo. Se obtuvo el tejido adiposo de distintos puntos anatómicos para su estudio, como el tejido adiposo marrón (TAM), tejido adiposo retroperitoneal (TAP), subcutáneo dorsal e inguinal y tejido adiposo epididimal en machos o paramétrico en hembras. Además, se obtuvieron los pesos relativos de distintos órganos de los animales.

3.3.1. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

3.3.1.1. *Medidas corporales*

El peso corporal se registró en la misma franja horaria todos los días hasta finalizar el estudio. En el momento del punto final, posterior a la administración de la anestesia, se obtuvo la talla (longitud) de todos los animales. Para ello se les puso en posición decúbito prono sobre un papel, marcando el extremo nasal, el punto final del cuerpo y el extremo de la cola. Con estas medidas se calculó para cada animal el índice de masa corporal (IMC) y el índice de Lee, mediante las fórmulas correspondientes:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso (g)}}{\text{medida naso anal}^2 \text{ (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso(g)}}}{\text{medida naso anal (cm)}} \cdot 1000$$

3.3.1.2. *Peso de órganos y tejido adiposo*

Se obtuvieron diferentes órganos y tejidos (intestino delgado, estómago, ciego, bazo, hígado, timo, corazón, riñón, GS, tejido adiposo) para la determinación del peso antes y después de vaciar su contenido, en algunos casos. Se extrajo el riñón y la GS submaxilar

del lado derecho del animal. Además, se determinó la longitud y anchura del intestino delgado con la ayuda de un papel milimetrado.

El tejido adiposo de los distintos compartimentos corporales (epididimal, parametrial, TAP, subcutáneo dorsal, subcutáneo inguinal y TAM) se pesó justo después de su extracción. Los datos se representan como peso relativo (%) respecto al peso corporal del animal en el punto final.

3.3.2. OBTENCIÓN DEL LAVADO INTESTINAL (RI)

Se obtuvieron fracciones longitudinales de yeyuno de 1,5 cm para su posterior centrifugación en tubos de 15 mL con 4 mL de solución PBS-salina previamente tarados. Se volvieron a pesar los tubos para saber el peso de la muestra de partida. Posteriormente se incubaron en agitación 10 min a 37°C (Thermo Fisher Scientific) para obtener el RI y se centrifugaron (Megafure 1.0R, Heraeus), 10 min. a 4°C. Se recogió el sobrenadante (RI) y se congeló a -20°C hasta el momento del análisis mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

3.3.3. DETERMINACIÓN DEL HEMOGRAMA

Se obtuvo sangre mediante punción cardíaca en el momento de la eutanasia y se recogió en tubos con EDTA. Los tubos se mantuvieron en rotación suave (Roller Mix, Ovan, model RM20E) para evitar la coagulación hasta el momento de su análisis. La determinación del hemograma se realizó mediante el analizador hematológico *Spincell* (MonLab Laboratories, Barcelona). Las variables hematológicas que se determinaron fueron; concentración y proporción de leucocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos, eritrocitos y plaquetas, así como la concentración de hemoglobina (HGB), plaquetas, hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (VCM) y hemoglobina corpuscular media (MCH), entre otras.

3.3.4. OBTENCIÓN Y RECuento DE LINFOCITOS DEL BAZO Y GLM

Después de la extracción del bazo y GLM, se introdujo cada tejido en tubos tarados de 15 mL con medio (4 mL) y se pesaron. Se decantaba el tejido sobre una malla descartando el medio. La malla se colocaba seguidamente sobre una placa de Petri, añadiendo medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) con una pipeta Pasteur. Después, con la ayuda de un émbolo estéril de una jeringuilla de 2,5 mL, se trituraba el tejido varias veces mientras se seguía añadiendo medio. Se recogía el filtrado en un tubo estéril de 15 mL y se taraba con medio hasta un volumen de 10 mL. Estos tubos se centrifugaron a 538 g durante 10 min a 4°C. En el caso del bazo, estos se sumergían posteriormente a su obtención en un medio hipotónico para obtener la lisis de los eritrocitos presentes, evitando la pérdida de

linfocitos y asegurando que no haya otras células que interfieran en la lectura de los resultados. Al finalizar la obtención de las muestras, estas se analizaron con el contador celular automático Countess™ (Thermo Fisher Scientific) para el recuento de linfocitos. Una vez se hizo el recuento, se procedía a distribuir las muestras en tubos etiquetados y codificados para realizar los marcajes y determinación de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

3.4. EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES INMUNITARIOS

3.4.1. DETECCIÓN DE IgA E IgM MEDIANTE ELISA

Estas determinaciones se realizaron para GS, GLM y RI. El día de recogida de las muestras, estas se procesaron con solución salina y con la ayuda de un homogenizador Polytron®, en el caso de las glándulas, y se almacenaron a -20°C y se analizaron posteriormente mediante la técnica ELISA. Se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC Maxisorb, Labclinics), donde se introducía anticuerpo de captura (*Goat anti-rat IgA o IgM*). Se dejaba incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se vació la placa y se realizaron 5 lavados con solución salina con 0,05% Tween. Después se añadió solución de bloqueo a cada pocillo y se incubó 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se volvían a realizar 5 lavados y se sembraron la solución estándar o muestra en los pocillos correspondientes. De nuevo, se incubó la placa 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se vació la placa, realizando de nuevo los 5 lavados y sembrando el anticuerpo de detección para IgA (*Goat anti-Rat IgA HRP conjugated*) o para IgM, en el que se utilizaba “*Goat anti-rat IgM*” y un sistema avidina-biotina-peroxidasa (*Goat anti-Rat IgM biotina y Extravidina-peroxidasa*).

Al finalizar, para el revelado enzimático se añadió solución de O-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno, dejando la placa 15-20 min en agitación suave. Pasado ese tiempo, se paraba la reacción enzimática añadiendo H₂SO₄ en los pocillos. Finalmente se leía la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro (Labsystems).

3.4.2. DETECCIÓN DE Ig MEDIANTE TÉCNICA MULTIPLEX

Para la determinación de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgA e IgM en GLM, GS y plasma se utilizó la técnica de inmunoensayo ProcartaPlex Multiplex (Thermo Fischer) en una placa de 96 pocillos. Primero se realizaron las diluciones de las muestras y se preparó la matriz con las microesferas que contienen los anticuerpos específicos de captura. Se añadió la mezcla de anticuerpos de detección y se incubó 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo se realizaron los lavados de la placa, se añadió solución de lectura a cada pocillo y se

colocó en el agitador, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración de cada Ig estudiada se utilizó en analizador MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, TX EE. UU) del Servicio de Citometría de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiT-UB).

3.4.3. DETERMINACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS: MARCAJE FENOTÍPICO Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Los linfocitos de las muestras de GLM y bazo de día 28 se marcaron fenotípicamente para determinar y cuantificar las subpoblaciones mediante anticuerpos monoclonales (AcMo). Estos van unidos a distintos fluorocromos:

isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína piperidina de la clorofila (PerCP), Violeta brillante 421 (BV421) y alofococianina (APC). Con estos fluorocromos, se realizaron 3 marcajes celulares distintos (**Tabla 1**).

Se realizaron los 3 marcajes en todas las muestras junto con un blanco para cada una, donde no se añadía ningún AcMo, además de preparar una serie de controles para cada tejido (GLM y bazo). Se partió de un volumen equivalente a 500.000 células de la suspensión celular en solución salina con suero fetal (2%) y azida (1%). Se añadió cada AcMo unidos a fluorocromos, tal como se describe en la **Tabla 1**, como mezclas diluidas (entre 1/10 y 1/50). Se pasaba la solución por el agitador vórtex y se dejaban reposar todas las muestras durante 20 min a 4°C, envueltos en papel de aluminio para protegerlas de la luz. De forma simultánea, se realizaron los controles para cada uno de los 3 marcajes. Después de la incubación se lavó con solución salina cada tubo y se volvieron a centrifugar a 4°C. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se añadió de formaldehído para fijar las muestras y se homogeneizaron en el vórtex. Posteriormente se cubrieron todos los tubos con Parafilm y papel de aluminio y se conservaron a 4°C sin luz. Las muestras fueron procesadas en el citómetro de flujo Gallios™ en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático FlowJo v10 Software (Tree Star Inc., Ashland) para el estudio de las poblaciones linfocitarias descritas.

Tabla 1. Descripción de las mezclas de AcMo marcados con fluorocromos para cada marcaje.

3.5. ESTADÍSTICA

Los resultados obtenidos en el presente estudio han sido procesados mediante el programa informático Excel y para el análisis estadístico se ha utilizado el programa *IBM SPSS Statics*. Se analizó la normalidad (*Shapiro-Wilk*) y homogeneidad de varianzas (*Levene*) de todas las variables. Si cumplían con la normalidad y la homogeneidad, se les aplicaba la prueba de ANOVA. En el caso de aquellos resultados no homogéneos o que no cumplen con la normalidad, se les aplicó la prueba estadística post-Hoc de la *U de Mann Whitney*. Se establecen diferencias significativas si la probabilidad (p) es $<0,05$. Los resultados obtenidos se muestran en forma de media \pm error estándar. Los gráficos correspondientes a los resultados se han realizado mediante el programa *GraphPad Prism 9*.

4. RESULTADOS

4.1. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

4.1.1. Curva de crecimiento

La evolución del peso corporal de las crías ha sido evaluada diariamente del día 2 al día 28 de vida de las crías (**Figura 6**). Desde el primer día de registro, se observa un menor peso corporal en el grupo SYM respecto al REF, con diferencias significativas entre ellos ($6,2 \text{ g} \pm 0,1$ vs. $7,0 \text{ g} \pm 0,1$, $p < 0,05$) durante todo el periodo de lactancia hasta el momento del destete, día 21. A partir de ese momento, únicamente se observan diferencias significativas respecto al peso en el día 22 ($43,91 \text{ g} \pm 0,65$ vs. $41,29 \text{ g} \pm 0,69$) y día 25 ($51,79 \text{ g} \pm 1,03$ vs. $46,54 \text{ g} \pm 0,85$) de vida de las crías (REF vs. SYM, $p < 0,05$), con un peso menor en el grupo SYM, aunque la diferencia de pesos entre grupos se ha mantenido hasta el día 28 de vida.

Figura 6. Evolución del peso corporal del día 2 al día 28 de vida ($n = 9-12/\text{grupo}$). REF = referencia, SYM = simbiótico. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (SEM). Estadística: $*p < 0,05$. SYM vs. REF

Parece ser que la suplementación de la madre con simbiótico ha provocado que las crías del grupo SYM nacieran ya con un menor peso ($39,59 \text{ g} \pm 8,36$) respecto al grupo REF ($45,1 \text{ g} \pm 2,89$, $p < 0,05$), lo que se ha mantenido durante todo el período de lactancia. Por tanto, esta diferencia de peso entre grupos se puede asociar al período de gestación.

4.1.2. Medidas morfológicas

La diferencia en cuanto a la masa corporal entre grupos se acompaña de una longitud de la cola significativamente menor en el grupo SYM respecto al grupo REF (**Tabla 2**). En cuanto a la longitud del cuerpo, se observa una tendencia en el mismo sentido, siendo ligeramente menor la longitud del cuerpo en el grupo SYM. De todas formas, no se observan diferencias significativas en cuanto al IMC e índice de Lee, por lo que, podemos decir que, en conjunto, ambos grupos mantienen unas variables morfométricas similares desde el destete hasta el día 28.

Tabla 2. Resultados de las medidas morfológicas. REF = referencia, SYM = simbiótico, IMC = índice de masa corporal (n= 9-12/grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Estadística: #p< 0,1; *p<0,05. SYM vs. REF.

4.2. PESO DE ÓRGANOS Y TEJIDO ADIPOSO

A día 28 se recogieron y pesaron los distintos órganos; intestino delgado, ciego, estómago, bazo, riñón, hígado, timo, corazón, glándula salival, (**Anexo I**), donde no se han obtenido diferencias significativas entre ambos grupos. De los distintos compartimentos de TA que se extrajeron de las crías (**Figura 7**), solo se ha observado una diferencia con relevancia estadística en el TAM (0,34 g \pm 0,00 vs. 0,44 g \pm 0,02), teniendo un peso mayor en el grupo SYM. Además, se realizaron las medidas de longitud y anchura del intestino delgado (**Anexo II**), observando una anchura significativamente mayor en el grupo SYM (0,84 cm \pm 0,07 vs. 1,14 cm \pm 0,05), junto con una tendencia a una longitud mayor (67,03 cm \pm 2,13 vs. 72,38 cm \pm 2,95) cuando se normalizan los resultados por cada 100 g de masa corporal del animal.

Figura 7. Pesos de los distintos compartimentos de tejido adiposo en crías de día 28. % = resultados normalizados por 100g de masa corporal (n= 9-12/grupo). TAM = tejido adiposo marrón. Resultados expresados como media \pm SEM. Estadística: #p< 0,1; *p<0,05. SYM vs. REF.

4.3. CONSUMO DE PIENSO Y AGUA

Se realizó el seguimiento del consumo de pienso y agua del día 22 al 28 de vida, posterior al destete del día 21. En cuanto al consumo de pienso (**Figura 8**), se observa un aumento en los dos primeros días, pudiendo ser debido a la adaptación entre la lactancia y el

consumo de pienso exclusivo, además del cambio de jaula, separados de la madre. A partir del día 24 se observa una estabilización en el consumo de pienso, junto con alguna diferencia puntual significativa ($*p < 0.05$ vs. REF) del consumo entre grupos. En cuanto al consumo de agua, se mantiene relativamente constante a lo largo de los días de estudio. La suplementación con simbióticos en las crías parece que no ha afectado en el consumo de pienso y agua después del destete.

Figura 8. Resultados del consumo de pienso y agua de día 22 a día 28, normalizados y expresados por 100g de masa corporal (n= 9-12/grupo). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Estadística: # $p < 0,1$; * $p < 0,05$. SYM vs. REF.

4.4. VARIABLES HEMATOLÓGICAS

Al final del estudio se analizaron las muestras de sangre recogidas, con la ayuda de un contador celular. En cuanto a la determinación de las células inmunitarias, por un lado, observamos que las proporciones celulares de linfocitos, monocitos y granulocitos son similares entre ambos grupos (**Anexo III**). Sin embargo, existe un recuento significativamente menor de leucocitos en el grupo SYM (REF $4,84 \pm 0,93$ vs. SYM $2,78 \pm 0,20$) que se explica por presentar una concentración menor específicamente de linfocitos ($3,09 \pm 0,42$ vs. $1,89 \pm 0,18$) y granulocitos ($1,47 \pm 0,40$ vs. $0,78 \pm 0,08$), respecto al grupo REF. En cuanto al resto de variables hematológicas estudiadas, no se han encontrado diferencias entre ambos grupos.

4.5. VARIABLES INMUNOLÓGICAS

4.5.1. Inmunoglobulinas

Niveles de Ig y ratio Th1/Th2 en plasma, GS y GLM:

Se han obtenido los valores correspondientes a las concentraciones de IgA, IgM, IgG, junto con los diferentes subtipos de esta, y el cociente Th1/Th2 de los animales de estudio a día 28 (**Tabla 3**). Los resultados absolutos obtenidos no muestran diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, al obtener los resultados en % relativo de cada subtipo de Ig respecto al total de Ig, se observa que el grupo suplementado con simbiótico muestra

diferencias significativas, con unas concentraciones menores ($p < 0.05$) de IgA, IgG e IgG2b en plasma, IgM e IgG2c en GS y IgG2a en GLM, respecto al grupo referencia. Además, también presentan una tendencia estadística para la IgA en GS ($p = 0.55$) e IgG2c en GLM ($p < 0.1$), resultando en unas concentraciones menores en ambos casos. En el caso de la relación Th1/Th2, de los resultados obtenidos en los tres compartimentos, se observa una ratio significativamente menor en GLM del grupo SYM respecto al REF.

Tabla 3. Concentraciones de los subgrupos de IgG, IgM, IgA y ratio Th1/Th2 en plasma, GS y GLM ($n = 9-12/\text{grupo}$). $\text{Th1/Th2} = (\text{IgG2b} + \text{IgG2c}) / (\text{IgG1} + \text{IgG2a})$. Resultados expresados como absolutos ($\mu\text{g/ml}$ o ng/mg) y relativos (% de cada subtipo de Ig respecto al total de Ig). REF = referencia, SYM = simbiótico. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Estadística: # $p < 0.1$; * $p < 0.05$. SYM vs. REF.

Niveles de IgA e IgM en lavado intestinal:

En ambos grupos la concentración de IgA es superior a la concentración de IgM, lo que es normal ya que la IgA es la que se encuentra en mayor cantidad en las mucosas del tracto gastrointestinal. La intervención con simbiótico no ha influenciado de forma significativa en cuanto al contenido de IgA e IgM en RI (**Figura 9**), aunque se observa una tendencia estadística ($p < 0.1$) a una menor concentración de IgA intestinal en el grupo SYM respecto al REF.

Figura 9. Concentración de IgA e IgM en lavado intestinal en día 28 ($n = 9-12/\text{grupo}$). Resultados expresados como media \pm SEM. REF = referencia, SYM = simbiótico. Estadística: # $p < 0.1$; * $p < 0.05$. SYM vs. REF.

4.6. FENOTIPOS DE LAS POBLACIONES LINFOCÍTICAS

Se analizaron las principales poblaciones linfocíticas en bazo y GLM en el día final del estudio (día 28) para determinar el efecto de la suplementación con el simbiótico en las crías después del destete (día 21) en el perfil linfocitario. Para ello, además de las principales poblaciones linfocitarias, se determinó la expresión de CD4, CD8 y marcadores de migración intestinal (αE y CD62L). Se analizó la proporción de las poblaciones de linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK y NKT, así como la expresión del marcador del estado de activación celular CD25. Además, se evaluó la expresión de los receptores CD4 y CD8 de los linfocitos T (**Tabla 4**). El grupo REF presenta una mayor proporción de linfocitos T respecto a los linfocitos B, en cambio en el grupo SYM observamos una mayor homogeneidad de proporción entre estas dos poblaciones, obteniendo unas proporciones muy similares de linfocitos T y B. Al comparar entre los dos grupos de estudio, el grupo

SYM presenta una mayor proporción de linfocitos B respecto al REF ($p < 0,05$), aunque por otro lado se observa una tendencia ($p < 0,1$) a una menor activación de estos. Por otro lado, el grupo SYM presenta una proporción significativamente menor de linfocitos T CD4+ ($p < 0,05$) y CD8+ ($p < 0,1$). Simultáneamente, se evaluó el porcentaje de expresión del correceptor CD8 en linfocitos T TCR $\alpha\beta$ +, TCR $\gamma\delta$ +, NK y NKT (**Anexo IV**). La suplementación con el simbiótico ha provocado cambios significativos ($p = 0,03$) en la subpoblación de linfocitos $\alpha E^+ / CD62L^-$ (**Anexo V**) del bazo, observando una mayor expresión del marcador αE en el grupo SYM respecto al REF.

Tabla 4. Porcentaje de las poblaciones linfocíticas principales en bazo ($n = 9-12$ /grupo). Resultados expresados como media \pm SEM. (1) Resultado del porcentaje respecto a la población superior. Estadística: # $p < 0,1$; * $p < 0,05$. SYM vs. REF.

En el caso de GLM podemos observar claramente una gran diferencia entre la proporción de linfocitos B y linfocitos T en ambos grupos de estudio, siendo predominante la presencia de linfocitos T (**Tabla 5**). Por el contrario, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos, pero si una tendencia relevante ($p = 0,057$) a una menor activación de linfocitos B en el grupo SYM respecto al REF a día 28 de vida. El **Anexo VI** muestra la expresión de CD8 y el **Anexo VII** de los marcadores de migración.

Tabla 5. Porcentaje de las poblaciones linfocitarias principales en GLM ($n = 9-12$ /grupo). Resultados expresados como media \pm SEM. (1) Resultado del porcentaje respecto a la población superior. Estadística: # $p < 0,1$; * $p < 0,05$. SYM vs. REF.

5. DISCUSIÓN

El sistema inmunitario intestinal está constantemente expuesto a antígenos externos, que en su mayor parte deben ser tolerados. Ciertos probióticos, prebióticos y simbióticos pueden influir en la respuesta inmunitaria. En investigaciones previas se ha estudiado el efecto de estos suplementos sobre el desarrollo del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal durante la gestación y la lactancia (43–45). Siguiendo esta línea de estudio, este trabajo ha tenido como

objetivo evaluar estos efectos tras la suplementación materna con un simbiótico durante la gestación, la lactancia, y en las crías después del destete. Para ello, se ha utilizado el modelo de rata Lewis, en la cual los primeros 21 días de vida de la rata son equiparables a los 9 meses de lactancia en humanos (46). Hay que destacar que este trabajo es parte de un estudio que abarca el impacto de la suplementación con el simbiótico en las madres y su descendencia en la etapa de lactancia (21 días) y después del destete (día 21 al 28). Por tanto, los resultados obtenidos deben ponerse en contexto teniendo en cuenta la intervención previa sobre las crías y las madres.

En cuanto al crecimiento y desarrollo ponderal de las crías hasta el día 28 de vida, ha sido similar entre el grupo suplementado con simbiótico y el grupo de referencia desde el nacimiento. Esto concuerda con estudios previos donde se ha observado que la administración de leche enriquecida con probióticos y prebióticos no tenía efectos sobre las determinaciones antropométricas de los sujetos, tanto en humanos como en modelos animales. Hay que tener en cuenta que en estas investigaciones se suplementaron directamente a las crías o neonatos, en cambio, en este estudio las madres también han sido el objeto principal de la intervención (43-46). Por otro lado, se ha observado una diferencia de peso entre ambos grupos desde el primer día de vida, que se mantiene hasta el día 28, lo que nos indica que la suplementación materna con el simbiótico puede haber tenido un efecto en el desarrollo del feto durante la gestación. Este aspecto está siendo objeto de estudio en este mismo proyecto.

En la actualidad se estudian diversas dianas terapéuticas contra enfermedades o condiciones metabólicas como la obesidad. En los mamíferos generalmente encontramos dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el TAM (tejido adiposo pardo o marrón). Una de las funciones de este tejido es regular el metabolismo energético a través de distintas vías hormonales. TAM es el compartimento de tejido adiposo principal en la termogénesis, mientras que el tejido adiposo blanco se encarga del almacenamiento de energía metabólica, entre muchas otras funciones (47). En ensayos clínicos previos se ha observado el efecto positivo que tiene la suplementación con bifidobacterias y prebióticos sobre el porcentaje de grasa corporal, asociándolo a una modulación tanto en la ingesta como en la integridad de la mucosa y el epitelio intestinal (48). En los resultados de este trabajo, aunque se observa una tendencia a una menor proporción de tejido adiposo blanco en algunos compartimentos del grupo SYM respecto al REF, esta no llega a ser significativa. Puede que sea necesario, en futuros estudios, plantearse alargar el tiempo de suplementación de las crías para poder observar una mayor diferencia entre grupos en este sentido. Por otro lado, en cuanto al TAM, su proporción ha resultado ser significativamente mayor en el grupo suplementado con simbiótico. La actividad termogénica del TAM se relaciona con el estilo de vida materno, el tipo de lactancia y la

microbiota saludable (47), por lo que podemos pensar que tanto la suplementación con simbiótico en las madres gestantes como en las crías durante y después de la lactancia ha podido tener un efecto positivo en el desarrollo de este tipo de tejido adiposo.

Por otro lado, se han evaluado distintas variables hematológicas de las crías a día 28 de vida, observando una disminución de los porcentajes de linfocitos y granulocitos en el grupo suplementado con simbiótico respecto al grupo de referencia. Esto nos podría estar indicando que la suplementación con el simbiótico en las crías puede tener un efecto en cuanto al desarrollo y regulación del sistema inmunitario, aunque en estudios previos similares no encontraron diferencias en las variables hematológicas en crías suplementadas con probióticos y prebióticos durante la lactancia (46). Sin embargo, en este caso hay que evaluar y contrastar las variables analizadas en este estudio con los resultados obtenidos en los distintos momentos de recogida de muestras de las crías (día 8, 21 y 28) y de las madres para saber si el efecto vendría dado por la suplementación en las madres durante la gestación y la lactancia o por la suplementación en las crías después del destete.

La microbiota intestinal de los lactantes se caracteriza por un predominio temprano de *Bifidobacterium*, que puede tener un impacto significativo en el desarrollo de la inmunotolerancia (49). En este sentido, la evidencia muestra que los probióticos y los prebióticos son capaces de ejercer efectos relevantes sobre el sistema inmunitario. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos en el intestino por parte de la microbiota intestinal sana, entre otros metabolitos, tienen efectos directos en la regulación inmunitaria (50). Además, durante el embarazo y la lactancia, el tipo de alimentación materna es capaz de modular el paso de distintos tipos de componentes inmunitarios que pasan a través de la placenta o de la leche materna a la descendencia (51,52). Será interesante establecer la composición microbiana en el intestino de estos animales y relacionarlo con el resto de los resultados obtenidos.

En cuanto a la inmunidad humoral, se ha observado que los probióticos y simbióticos, generalmente, tienen la capacidad de estimular la producción de IgA, que controla la translocación bacteriana y neutraliza las toxinas bacterianas en la superficie de la mucosa intestinal (43, 53). Otras investigaciones muestran que la suplementación con un probiótico en ratas durante el embarazo y la lactancia se atribuye a un efecto inmunomodulador tanto en las madres como en su descendencia, teniendo un impacto positivo sobre las proporciones de células inmunitarias, las Ig y la microbiota intestinal (54, 55).

Por el contrario, en nuestros resultados observamos una menor proporción de IgA en el grupo suplementado con el simbiótico cuando analizamos su concentración en plasma, GS y GLM. De la misma forma, se han obtenido resultados en concordancia al analizar la IgA secretora en

el lavado intestinal, donde se observa una tendencia a una menor concentración de IgA en el grupo suplementado respecto al grupo de referencia. Estos resultados no coinciden con la evidencia previa, que nos muestra que la mucosa intestinal es donde se produce una mayor cantidad de IgA por parte de las células plasmáticas (CP) y que esta se ve condicionada por la microbiota comensal del huésped, observando una marcada disminución de secreción de IgA intestinal en animales libres de gérmenes (56). Esto puede deberse a que los efectos en cuanto a los probióticos, como se ha comentado previamente, son cepa dependientes, por lo que no todos los probióticos van a ejercer la función estimuladora sobre la IgA. Además, hay que tener en cuenta que el simbiótico se les administró a las madres durante un periodo de tiempo más prolongado que a las crías ya separadas de la madre, por lo que puede que el efecto no sea muy marcado o haya disminuido después del destete. Sería interesante, para futuros estudios, prolongar la suplementación con el simbiótico a las crías para evaluar si realmente este tiene un efecto significativo en estos parámetros. Por otro lado, y tal como se ha mencionado anteriormente, podría ser interesante contrastar los resultados que se han obtenido en este trabajo con la determinación de la microbiota intestinal de las crías, para ver si el simbiótico ha tenido efecto en la modulación de la microbiota, lo que parece determinar el contenido de IgA secretada en el intestino por parte de las CP (53,55).

Aparte de la IgA, se analizaron IgM e IgG en plasma, GS y GLM para evaluar la respuesta humoral en las crías a día 28. Las IgG (IgG1, IgG2a, IgG2c, IgG2c) son las que aparecen en mayor proporción en los tres compartimentos. Los distintos isotipos de IgG se asocian con la respuesta inmunitaria Th1 o Th2. IgG1 e IgG2a son las principales Ig involucradas en la respuesta Th2, mientras que IgG2b e IgG2b se asocian con la respuesta Th1. En el neonato suele predominar la respuesta Th2, y a medida que pasa el tiempo esta respuesta inmunitaria se declina hacia una respuesta predominante de Th1. Con lo cual podemos asociar la predominancia de estas respuestas inmunitarias a la maduración y desarrollo del sistema inmunitario, por lo que evaluar el ratio Th1/Th2 puede ser de gran utilidad (57–59). Nuestros resultados muestran que el grupo SYM presentaban una mayor proporción de Ig involucradas en la respuesta Th2, con una reducción en la relación Th1/Th2 ($p < 0,05$) al analizarlo en GLM. Aunque a en esta etapa de su crecimiento ya se esperaría, según muestra la evidencia previa, una maduración hacia una respuesta Th1 predominante (60), los resultados obtenidos podrían explicar el hecho de que al haber pasado 7 días desde el destete, el ratio Th1/Th2 disminuya para evitar una respuesta inflamatoria exagerada frente a los nuevos antígenos a los que se exponen en esta nueva etapa de la vida. En este sentido, parece que la suplementación con el simbiótico ayudaría a esta disminución del estado inflamatorio. Sería interesante, tal como se ha comentado anteriormente, hacer las mismas valoraciones en semanas posteriores para ver

si se reestablece este equilibrio Th1/Th2 y si hay diferencias respecto al grupo REF. En este sentido, también hay que tener en cuenta que algunas cepas probióticas han mostrado propiedades proinflamatorias (cociente Th1/Th2 creciente), mientras que otras han mostrado modulación antiinflamatoria (cociente Th1/Th2 decreciente), por lo que se destaca de nuevo la importancia de la respuesta cepa dependiente (43).

Para profundizar más en la capacidad inmunomoduladora del simbiótico, se evaluó el fenotipo linfocítico, su estado de activación y la migración celular sistémica e intestinal. Para ello se caracterizaron las poblaciones de linfocitos (linfocitos B, linfocitos T, NK y NKT) del bazo y GLM. El bazo actúa como reservorio de células inmunitarias que migran al lugar donde se encuentra el antígeno. Los linfocitos B del bazo migran hacia la lámina propia del intestino, donde se diferencian en células plasmáticas y proliferan, por lo que tiene un papel fundamental en la respuesta inmunitaria intestinal (61). En términos generales, los resultados obtenidos muestran una mayor concentración de linfocitos T en GLM respecto al bazo en ambos grupos de animales. Sin embargo, la proporción de linfocitos B tiende a ser mayor en el bazo, aunque la diferencia no es tan marcada como en los linfocitos T. Resultados similares se observaron en un estudio donde caracterizaron el tejido linfoide del bazo de rata durante el período de lactancia mediante la composición de los linfocitos y su funcionalidad, observando una mayor población de linfocitos B en las primeras semanas de vida (62). En otro ensayo previo, se obtuvieron resultados similares cuando se suplementaba a ratas lactantes con probióticos (63). La intervención de nuestro estudio ha conducido a una mayor proporción de linfocitos B con una tendencia a un estado de activación más bajo (CD25⁻), y unos niveles inferiores de linfocitos T CD4⁺ ($p < 0,05$) y CD8⁺ ($p < 0,1$) en el grupo SYM respecto al grupo REF cuando se analiza el bazo. Los linfocitos T CD4⁺ estimulan la activación de linfocitos B, por lo que al haber una menor proporción de linfocitos T CD4⁺ es coherente que se observe una menor concentración de linfocitos B activados. En cambio, al analizar estos parámetros en GLM lo que se observa es una tendencia a una menor activación de los linfocitos B en el grupo SYM, pero sin diferencias en las proporciones de las distintas poblaciones linfocitarias. En cuanto a la expresión del receptor CD8 en linfocitos T TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, NK y NKT, existe una menor expresión de CD8 en las células NK y una mayor expresión en las células NKT de GLM respecto al bazo en ambos grupos. Estudios previos en ratas lactantes suplementadas con un probiótico, no encontraron diferencias significativas en cuanto a estas poblaciones celulares [43]. No obstante, en el presente estudio, cuando se comparan entre ambos grupos se observan diferencias en la expresión de CD8 de las células NKT de GLM, siendo mayor en el grupo SYM ($p < 0,05$). Esto podría relacionarse con la activación de NKT llevada a cabo por la presentación de lípidos derivados de microorganismos, tal como han observado otros investigadores (64).

Para que la respuesta inmunitaria sea efectiva es importante la movilización y migración de los linfocitos por el organismo hacia el antígeno correspondiente. Durante este proceso migratorio se expresan moléculas como la integrina αE y la selectina CD62L que están involucradas en la localización intestinal. En este trabajo, se han encontrado niveles más bajos de integrina αE en comparación con CD62L en ambos tejidos, y se observa una mayor expresión de CD62L y una menor expresión de la integrina αE en GLM respecto al bazo en ambos grupos de animales, lo que coincide con otras investigaciones (43). Al comparar entre los dos grupos de nuestro estudio, se ha observado que, en el bazo, la expresión de la integrina αE ha sido significativamente más elevada en el grupo de intervención, en cambio, existe una tendencia a una menor expresión de CD62L en los linfocitos CD8+, respecto al grupo de referencia. Esto sugiere que la intervención con el simbiótico en las madres y su descendencia podría modificar el patrón de migración celular desde el bazo hacia el intestino al regular la respuesta inmunitaria. Además, parece que la expresión de CD62L se relaciona como posible marcador de diagnóstico en enfermedades inflamatorias intestinales (65), ya que la migración celular a la mucosa intestinal puede estar alterada en estos casos (66), lo que es interesante de cara a futuras investigaciones sobre el impacto de la suplementación con probióticos, prebióticos o simbióticos frente a este tipo de patologías con una base inmunitaria.

En resumen, este trabajo permite establecer que la suplementación con un simbiótico durante el embarazo, la lactancia y las primeras etapas de la vida pueden modificar el perfil de distintas variables en cuanto a desarrollo inmunitario de la crías, específicamente en la producción de Ig, el fenotipo de las poblaciones de linfocitos y la expresión de moléculas de migración celular. De todas formas, hacen falta más estudios en esta línea que tengan en cuenta la suplementación en las crías a más largo plazo después del destete para aclarar y confirmar algunos resultados. Además, cabe destacar la importancia de este tipo de intervenciones frente a la mejora de la salud tanto de las madres como de su descendencia.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En este estudio se ha sugerido el potencial de la suplementación con un simbiótico sobre el desarrollo inmunológico en las primeras etapas de vida, ya sea indirectamente a través de mecanismos fisiológicos con la suplementación durante la gestación y la lactancia como directamente sobre las crías desde el destete a día 21 hasta día 28 de vida.

En este sentido, la administración con el simbiótico ha provocado cambios en las crías a día 28 de vida, concretamente;

- Ha tenido un efecto trófico en la longitud y anchura del intestino delgado.

- Se ha observado una mayor proporción de TAM, pero no el resto de los compartimentos de tejido adiposo ni en el resto de los órganos estudiados.
- En cuanto a las variables hematológicas, ha tenido un efecto en el recuento de linfocitos y granulocitos.
- Ha provocado algunos cambios en la respuesta inmunitaria humoral, específicamente sobre la producción de IgG y sus isotipos, IgA e IgM, así como en la respuesta Th1/Th2.
- Ha influenciado sobre la inmunidad celular, provocando cambios en las poblaciones linfocíticas, así como en los marcadores de migración celular.

En conclusión, podemos sugerir que este tipo de estrategias pueden ser de utilidad en la mejora de la respuesta inmunitaria durante la infancia. De todas formas, aún quedan muchas dudas por esclarecer, así como afinar en los tipos de variables a estudiar, el tipo de simbiótico administrado y el tiempo de intervención de las crías en diferentes etapas del desarrollo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 16];10(9):1171–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25088080/>
2. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2022 Aug 16];23(4):446–57. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-vision-panoramica-del-sistema-inmune-S0716864012703358>
3. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019 Jan 9 [cited 2022 Aug 16];25(1):13–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30629914/>
4. Hato T, Dagher PC. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Aug 8 [cited 2022 Aug 16];10(8):1459. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527020/>
5. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2022 Aug 16];125(2 Suppl 2):S3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923430/>
6. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2022 Aug 16];7(3):182–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383174/>
7. Muraille E, Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 16];47(1):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9467651/>
8. del Prete G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 16];16(3–4):427–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9505198/>

9. Treanor B. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Aug 16];136(1):21–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22269039/>
10. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* [Internet]. 1985 [cited 2022 Aug 16];314(6011):537–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3157869/>
11. Pan S, Manabe N, Yamaguchi Y. 3D Structures of IgA, IgM, and Components. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 16];22(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884580/>
12. Forthall DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2022 Aug 16];2(4):1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159104/>
13. Goodsell DS. The Molecular Perspective: Antibodies. *Stem Cells* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2022 Aug 16];20(1):94–5. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/article/20/1/94/6395449>
14. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem* [Internet]. 2016 Oct 31 [cited 2022 Aug 16];60(3):275–301. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27784777/>
15. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, González-Castro A, Franch À, Castell M. Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 16];31(12):1264–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459475/>
16. Pérez-Cano FJ, Franch Á, Castellote C, Castell M. The Suckling Rat as a Model for Immunonutrition Studies in Early Life. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Aug 16];2012:16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415261/>
17. Blandino R, Baumgarth N. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Aug 16];106(5):1021–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31302940/>
18. Mowat AMI. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 [cited 2022 Aug 16];3(4):331–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12669023/>
19. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Aug 16];34(5):599–608. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17067945/>
20. JS P. Clinical importance of immunonutrition in infants: a review of the recent literature. *Clin Exp Pediatr* [Internet]. 2022 Jul 15 [cited 2022 Aug 16];65(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35176834/>
21. Zapatera B, Prados A, Gómez-Martínez S, Marcos A. Immunonutrition: methodology and applications. *Nutr Hosp* [Internet]. 2015 [cited 2022 Aug 16];31 Suppl 3:145–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25719782/>
22. Levy J. Immunonutrition: the pediatric experience. *Nutrition* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 16];14(7–8):641–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9684269/>
23. Mariette C. Immunonutrition. *J Visc Surg* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Aug 16];152 Suppl 1:S14–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26315574/>
24. Ruiz-León AM, Lapuente M, Estruch R, Casas R. Clinical Advances in Immunonutrition and Atherosclerosis: A Review. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 16];10(APR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31068933/>
25. Sterpu I, Fransson E, Hugerth LW, Du J, Pereira M, Cheng L, et al. No evidence for a placental microbiome in human pregnancies at term. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Aug 16];224(3):296.e1–296.e23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871131/>
26. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med* [Internet]. 2014 May 5 [cited 2022 Aug 16];6(237):237ra65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929217/>

27. Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T, Harris RA, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Aug 16];214(5):627.e1-627.e16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26965447/>
28. Nyangahu DD, Jaspan HB. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Aug 16];198(1):47–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31121057/>
29. Nyangahu DD, Lennard KS, Brown BP, Darby MG, Wendoh JM, Havyarimana E, et al. Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome* [Internet]. 2018 Jul 7 [cited 2022 Aug 16];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29981583/>
30. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Aug 16];171(7):647–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28492938/>
31. Henrick BM, Rodriguez L, Lakshmikanth T, Pou C, Henckel E, Arzoomand A, et al. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell* [Internet]. 2021 Jul 22 [cited 2022 Aug 16];184(15):3884-3898.e11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34143954/>
32. Probiotics - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) [Internet]. [cited 2022 Aug 16]. Available from: <https://isappscience.org/for-scientists/resources/probiotics/>
33. la Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Aug 16];10(1):11–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28861741/>
34. Guarner Coordinador F, Ellen Sanders M, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología Probióticos y prebióticos. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-spanish>
35. Pandey KR, Naik SR, Vakil B v. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Aug 16];52(12):7577–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26604335/>
36. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 15 [cited 2022 Aug 16];9(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5622781/#B5-nutrients-09-01021>
37. Childs CE, Calder PC, Miles EA. Diet and Immune Function. *Nutrients* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Aug 16];11(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31426423/>
38. Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Molero-Luís M, Castell M, Rivero M, Castellote C, et al. Mucosal IgA increase in rats by continuous CLA feeding during suckling and early infancy. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2022 Aug 16];50(3):467–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18824724/>
39. Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections. *Viral Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 16];33(4):294. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247032/>
40. Rose MA. Mucosal Immunity and acute viral gastroenteritis. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Aug 16];10(7):2112–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25424826/>
41. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* [Internet]. 2009 [cited 2022 Aug 16];136(6):1939–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19457420/>

42. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017 Nov 11 [cited 2022 Aug 16];3:17083. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5858916/>
43. del Mar Rigo-Adrover M, Franch À, Castell M, Pérez-Cano FJ. Preclinical Immunomodulation by the Probiotic *Bifidobacterium breve* M-16V in Early Life. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Aug 31];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27820846/>
44. Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Tims S, Knipping K, Garssen J, et al. Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. *Nutrients* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Aug 31];13(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34578853/>
45. Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, et al. Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 31];8(3):1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32610542/>
46. Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Tims S, Knipping K, Garssen J, et al. Effects of a postbiotic and prebiotic mixture on suckling rats' microbiota and immunity. *Nutrients* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Aug 31];13(9). Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/9/2975>
47. Verduci E, Calcaterra V, di Profio E, Fiore G, Rey F, Magenes VC, et al. Brown Adipose Tissue: New Challenges for Prevention of Childhood Obesity. A Narrative Review. *Nutrients* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Aug 31];13(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33923364/>
48. Stenman LK, Lehtinen MJ, Meland N, Christensen JE, Yeung N, Saarinen MT, et al. Probiotic With or Without Fiber Controls Body Fat Mass, Associated With Serum Zonulin, in Overweight and Obese Adults-Randomized Controlled Trial. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Aug 31];13:190–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27810310/>
49. Cukrowska B, Bierała JB, Zakrzewska M, Klukowski M, Maciorkowska E. The Relationship between the Infant Gut Microbiota and Allergy. The Role of *Bifidobacterium breve* and Prebiotic Oligosaccharides in the Activation of Anti-Allergic Mechanisms in Early Life. *Nutrients* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Aug 31];12(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235348/>
50. Frei R, Akdis M, O'mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2015 Mar 13 [cited 2022 Aug 31];31(2):153–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25594887/>
51. Jeurink P v., Knipping K, Wiens F, Barańska K, Stahl B, Garssen J, et al. Importance of maternal diet in the training of the infant's immune system during gestation and lactation. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019 Apr 28 [cited 2022 Aug 31];59(8):1311–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29393671/>
52. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr* [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 31];138(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716190/>
53. Tezuka H, Ohteki T. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1891. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31456802/>
54. Azagra-Boronat I, Tres A, Massot-Cladera M, Franch À, Castell M, Guardiola F, et al. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Supplementation in Rats during Pregnancy and Lactation Impacts Maternal and Offspring Lipid Profile, Immune System and Microbiota. *Cells* [Internet]. 2020 Feb 28 [cited 2022 Aug 31];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32121244/>
55. Wang K, Zhu Q, Kong X, Song M, Azad MAK, Xiong L, et al. Dietary Probiotics or Synbiotics Supplementation During Gestation, Lactation, and Nursery Periods Modifies Colonic Microbiota, Antioxidant Capacity, and Immune Function in Weaned Piglets. *Front Vet Sci* [Internet]. 2020 Dec 14 [cited 2022 Aug 31];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33381535/>

56. Gommerman JL, Rojas OL, Fritz JH. Re-thinking the functions of IgA(+) plasma cells. *Gut Microbes* [Internet]. 2014 Jan 3 [cited 2022 Aug 31];5(5):652–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25483334/>
57. Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, et al. Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 31];8(3):1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32610542/>
58. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 31];63(4):559–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23926244/>
59. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Aug 31];21(21):1–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126494/>
60. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front Immunol*. 2020 Aug 18;11:2025. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32973809/>
61. Weiberg D, Basic M, Smoczek M, Bode U, Bornemann M, Buettner M. Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut. *PLoS One* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Aug 31];13(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30286198/>
62. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, González-Castro A, Franch À, Castell M. Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 31];31(12):1264–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459475/>
63. del Mar Rigo-Adrover M, Franch À, Castell M, Pérez-Cano FJ. Preclinical Immunomodulation by the Probiotic *Bifidobacterium breve* M-16V in Early Life. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Aug 31];11(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5098803/#pone.0166082.ref007>
64. Erazo-Borrás LV, Álvarez-Álvarez JA, Trujillo-Vargas CM. Linfocitos NKT invariantes: ontogenia, fenotipo y función. *Inmunología* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2022 Aug 31];33(2):51–9. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-inmunologia-322-articulo-linfocitos-nkt-invariantes-ontogenia-fenotipo-S0213962614000195>
65. Bar-Ephraim YE, Koning JJ, Burniol Ruiz E, Konijn T, Mourits VP, Lakeman KA, et al. CD62L Is a Functional and Phenotypic Marker for Circulating Innate Lymphoid Cell Precursors. *J Immunol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Aug 31];202(1):171–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504420/>
66. Keir ME, Fuh F, Ichikawa R, Acres M, Hackney JA, Hulme G, et al. Regulation and Role of α E Integrin and Gut Homing Integrins in Migration and Retention of Intestinal Lymphocytes during Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Aug 31];207(9):2245–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34561227/>