

## *V. Discussió*

---

Els concentrats de plasma (SDAP) i d'immunoglobulines (IC) són uns suplementes dietètics destinats a animals de granja, concretament a animals acabats de deslletar. En aquesta etapa el sistema immunitari mucosal encara no està totalment desenvolupat i per tant els animals joves són més susceptibles de patir infeccions que els animals adults (Pluske *et al.*, 1997). El deslletament d'animals de granja sovint està associat a malalties infeccioses i a diarrees, que freqüentment n'incrementen la mortalitat (Osek *et al.*, 1999). És per això que en el nostre estudi s'han utilitzat rates acabades de deslletar, per tal que el nostre model sigui comparable als animals de granja que reben aquests suplementes.

Diferents estudis mostren que la suplementació dietètica amb concentrats de plasma redueix la morbiditat, així com la durada i la severitat de les infeccions (Morrill *et al.*, 1995; Quigley i Wolfe, 2003). Una explicació d'aquest fenomen és que aquests concentrats contenen immunoglobulines i glicoproteïnes, que inhibeixen l'adhesió bacteriana a l'epiteli intestinal; és a dir, actuen com a barrera en una infecció oral (Nollet *et al.*, 1999a; Mouricot *et al.*, 1990). A més d'aquest efecte a la llum intestinal, s'ha suggerit que aquests suplementes podrien actuar directament sobre el sistema immunitari (Touchette *et al.*, 2002).

L'objectiu d'aquest treball ha estat aprofundir en l'estudi dels efectes de la suplementació dietètica amb aquests concentrats quan els animals pateixen una inflamació intestinal. Un primer pas ha estat l'establiment i la caracterització d'un model d'inflamació intestinal. Seguidament, s'ha induït la inflamació intestinal en animals que han estat alimentats amb pinsos suplementats amb SDAP o amb IC i s'han estudiat diferents aspectes de la fisiologia intestinal posant especial èmfasi en l'estudi del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT). També s'han analitzat diferents variables sistèmiques per tal d'estudiar un possible efecte sistèmic de l'agent inflamatori.

## MODEL D'INFLAMACIÓ INTESTINAL

Un model d'inflamació intestinal on es vulgui estudiar els efectes dels concentrats de proteïnes plasmàtiques ha de ser comparable a la situació que es dona a les granges, on es produeixen malalties i desordres intestinals causats per microorganismes o pels seus productes. Una inflamació intestinal induïda per una toxina bacteriana estableix una inflamació comparable a les que es produeixen normalment a les granges. L'enterotoxina B de *S. aureus* (SEB) és un superantigen que indueix una inflamació intestinal autolimitant (Benjamin *et al.*, 1998). Els superantígens estimulen de forma potent el sistema immunitari a través de l'activació dels limfòcits T (Müller-Alouf *et al.*, 2001). Aquesta activació condueix a una gran producció de citocines que sovint està protagonitzada per TNF- $\alpha$ ,

IFN- $\gamma$  i IL-2 (Onai i Kudo, 2001; Litton *et al.*, 1994). Tenint en compte tot això, la inflamació intestinal induïda pel SEB reuneix les condicions adequades per estudiar els efectes d'aquests concentrats.

Per poder observar amb més claredat els efectes dels suplementos dietètics sobre el sistema immunitari mucosal s'ha optat per l'administració intraperitoneal de l'enterotoxina, ja que l'administració oral presenta una sèrie de desavantatges. Quan l'enterotoxina s'administra per via oral pot interaccionar amb les immunoglobulines presents a la llum intestinal i, per tant, n'arribarà menys quantitat a la mucosa intestinal (Mouricout *et al.*, 1990). Llavors els efectes observats no podrien ser atribuïts a l'efecte dels suplementos dietètics sobre el sistema immunitari. A més, aquesta via d'administració té l'inconvenient que cal que el SEB s'administri juntament amb inhibidors de la tripsina, perquè pot ser hidrolitzat per aquest enzim gastrointestinal (Spiekermann i Nagler-Anderson, 1998). D'altra banda la via intraperitoneal és àmpliament utilitzada en models d'inflamació intestinal (McKay, 2001; Benjamin *et al.*, 1998) i no presenta els desavantatges de la via oral.

En aquest model s'ha establert un estat inflamatori lleu, en el qual no es produeixen canvis en la conducta alimentària, de forma que els efectes observats es poden atribuir al tipus de suplement i no a una diferent ingesta de pinso. Per tal de poder fer un seguiment del grau d'inflamació intestinal que presenten les rates s'han seleccionat dos marcadors: l'un és el contingut d'aigua en femtes, ja que un dels primers símptomes d'inflamació intestinal és la diarrea (Goodgame, 1996); i l'altre marcador és la infiltració de neutròfils a la mucosa intestinal, característica d'una inflamació local (Stojadinovic *et al.*, 1997; Onai i Kudo, 2001). La infiltració de neutròfils s'ha estimat a través de la quantificació de l'activitat de la mieloperoxidasa (MPO), enzim que es localitza als grànuls primaris d'aquestes cèl·lules i que és àmpliament utilitzat per aquest fi (Bradley *et al.*, 1982).

Diferents estudis realitzats en rata mostren que dosis entre 50  $\mu\text{g}$  i 200  $\mu\text{g}$  de SEB administrades via intraperitoneal (i.p.) són suficients per induir una resposta inflamatòria (Huang i Koller, 1998; Benjamin *et al.*, 1998). En vista d'això les primeres aproximacions s'han realitzat injectant 50  $\mu\text{g}$  o 100  $\mu\text{g}$  de SEB via i.p.. Cap de les dues dosis no altera ni el contingut d'aigua en femtes ni l'activitat MPO de la mucosa (infiltració de neutròfils). Aquesta quantitat de toxina no és suficient per induir una inflamació intestinal en la nostra soca de rata, tot i que els resultats de Huang i Koller (1998) mostren que l'administració de 50  $\mu\text{g}$  de SEB induïx un increment de la concentració sèrica de citocines (IL-6, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ).

Huang i Koller (1998) observen que la resposta és molt superior quan els limfòcits són reestimulats amb una altra dosi de SEB. Altres autors administren dues toxines diferents per obtenir un efecte més elevat. Per exemple, Beno *et al.* (2001) administren conjuntament LPS (lipopolisacàrid) i SEB per induir una inflamació hepàtica a rates. El treball realitzat per Huang i Koller (1998) suggereix que la resposta immunitària enfront a la segona dosi de SEB presenta sinergisme fins 3 dies després de la primera dosi. Així doncs, la pauta escollida per induir la inflamació intestinal ha estat l'administració intraperitoneal de dues dosis de 50 µg de SEB separades per un interval de tres dies. Aquesta pauta induïx una inflamació intestinal que es caracteritza per la infiltració de neutròfils i per l'increment del contingut hídric de les femtes, sense quedar-ne afectada la ingesta de pinso. Una vegada establerta la pauta d'administració del SEB s'ha caracteritzat el model i l'efecte que hi exerceixen els suplementes dietètics.

L'objectiu era induir una inflamació intestinal; però com que el SEB s'ha administrat de forma sistèmica, també s'ha realitzat un estudi de diferents variables per tal de conèixer si el superantigen induïa una resposta inflamatòria generalitzada. L'estudi inclou l'anàlisi de diferents variables hematològiques (concentració de leucòcits, d'eritròcits, d'hemoglobina, determinació de l'hematòcrit), de la concentració sèrica d'IgA i d'IgG i l'anàlisi de les principals poblacions limfocítiques de la melsa. Els resultats obtinguts per a les diferents variables hematològiques dels animals control mostren valors similars als descrits en altres rates sanes (Ringler i Dabich, 1979) i no estan afectades per l'administració de SEB. Les concentracions sèriques d'IgA i d'IgG mostren valors de l'ordre dels observats en altres soques de rata (Elphick *et al.*, 2003; Herías *et al.*, 1999) i tampoc es modifiquen després d'administrar l'enterotoxina. Això indica que tot i que l'administració del SEB és sistèmica, els seus efectes sistèmics són mínims. En el mateix sentit s'ha vist que la infecció amb *Shigella* no incrementa la concentració sèrica d'IgA (Islam *et al.*, 1995).

L'anàlisi de la distribució de les poblacions limfocitàries de la melsa dels animals Control revela que dos terços dels limfòcits són CD3<sup>+</sup> (és a dir, són limfòcits T), dels quals la majoria són limfòcits T col·laboradors. Aquesta distribució és similar a l'observada en rates Lewis adultes (Yaqoob *et al.*, 1994), fet que indica que als 35 dies d'edat les rates d'aquesta soca ja han assolit les proporcions limfocitàries adultes en aquest teixit. En referència a les poblacions limfocitàries minoritàries, com els limfòcits activats, hi són presents en un percentatge realment molt baix, àdhuc quan els seus valors s'expressen com a percentatges dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup>. Les cèl·lules NK representen un 4,5% dels limfòcits de la melsa, valor molt similar a l'observat en rata Wistar (Rodríguez-Palmero *et al.*, 1999). L'administració de SEB de forma i.p. no modifica cap de les poblacions estudiades de la melsa. Aquests resultats, juntament amb la manca d'efecte sobre les variables hematològiques ni la concentració sèrica d'IgA ni d'IgG indiquen que el

SEB no té efectes sistèmics. Els canvis observats pel que fa a hidratació de la femta i a infiltració intestinal de neutròfils cal atribuir-los, per tant, a l'acció de la toxina sobre les mucoses i estructures associades.

La inflamació aguda és un procés de curta durada (hores o dies), que es caracteritza per vasodilatació, edema i migració cel·lular (principalment neutròfils) cap al teixit afectat (Maslinska i Gajewski, 1998; Sherwood i Toliver-Kinsky, 2004). Per tal de caracteritzar la inflamació intestinal induïda pel SEB s'ha analitzat l'efecte de l'enterotoxina sobre la infiltració de neutròfils i sobre la permeabilitat vascular. Respecte la infiltració de neutròfils, diferents grups que han treballat amb SEB han obtingut resultats diferents. Alguns estudis mostren que el superantigen induïx una infiltració de neutròfils, mentre que en d'altres aquesta variable no està afectada. Per exemple, Franco-Penteado *et al.* (2001) observen un increment en l'activitat MPO a la pota de ratolins 4 h després d'administrar-los una dosi de SEB via injecció subplantar. En canvi, McKay *et al.* (1998) no observen cap canvi en l'activitat MPO en jejú de ratolí després de l'administració intraperitoneal de SEB. De fet, tal com mostren els resultats preliminars, una única dosi de SEB no incrementa significativament l'activitat MPO a la mucosa intestinal. En canvi, quan la inflamació s'indueix mitjançant dues dosis, l'activitat MPO mucosal incrementa 24 h després de la segona administració de SEB i es manté elevada fins a les 48 h. De fet, el SEB retarda l'entrada en apoptosi dels neutròfils i, per tant, una vegada han arribat al teixit hi poden romandre durant més temps, i així perllonguen els efectes del SEB. L'efecte del SEB sobre els neutròfils requereix la intervenció de monòcits i de limfòcits activats (Moulding *et al.*, 1999).

En un procés inflamatori es produeix vasodilatació i extravasació de proteïnes per tal de facilitar l'arribada de cèl·lules inflamatòries i factors solubles, com les immunoglobulines i les proteïnes de fase aguda, al teixit afectat. La permeabilitat vascular s'ha estudiat a partir d'experiments realitzats amb el colorant *Evans blue* (EB). Aquest colorant s'uneix ràpidament a proteïnes plasmàtiques (majoritàriament albúmina) formant complexos estables (Lange *et al.*, 1994). L'increment local de la permeabilitat vascular a macromolècules dóna lloc a l'extravasació i deposició a l'espai intersticial dels complexos proteïna-EB, que poden ser quantificats (Lange *et al.*, 1995). En la inflamació intestinal induïda pel SEB hi ha un increment de la permeabilitat vascular local 6 h després de la segona dosi, sense que estigui afectada a les 24 h. Aquest increment de la permeabilitat vascular local observat en el nostre treball confirma observacions realitzades en ratolins, en les quals s'observa un increment de la permeabilitat vascular local 4 h després de l'administració de SEB via subplantar (Franco-Penteado *et al.*, 2001).

En situacions d'inflamació intestinal sol haver-hi diarrea de tipus secretor, induïda per agents inflamatoris que actuen sobre mecanismes de secreció d'ions i sobre l'estructura de les unions intercel·lulars. En el nostre model s'observa un increment en la quantitat d'aigua en femta 24 h després de l'administració de SEB, que es manté fins les 48 h. Aquest increment en el contingut hídric pot estar causat de forma indirecta per la producció de citocines induïda pel SEB, ja que s'ha demostrat que diferents citocines proinflamatòries alteren la secreció d'ions i per tant el moviment d'aigua a través d'epiteli intestinal (McKay i Baird, 1999). La citocina principal que intervé en aquesta resposta és el TNF- $\alpha$ , que induïx un alliberament massiu de prostaglandines i altres estímuls secretors (Field, 2003). Així per exemple, patògens com *C. parvum* provoquen diarrea (Hunt *et al.*, 2002) per un mecanisme iniciat per l'increment de TNF- $\alpha$  que dóna lloc a la inducció de l'expressió de la prostaglandina H sintasa. Aquest enzim catalitza la producció de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i de la prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PG F<sub>2 $\alpha$</sub> ) a partir de l'àcid araquidònic (Weymer *et al.*, 1985). Les dues prostaglandines induïxen un augment de la secreció de clorur cap a la llum intestinal (Eckmann *et al.*, 1997) que va acompanyada per un increment de la secreció d'aigua.

Durant un procés inflamatori els mediadors i citocines proinflamatòries que s'alliberen són els principals responsables d'incrementar la permeabilitat epitelial i, per tant, de facilitar el pas de substàncies i d'antígens a través de la via paracel·lular (Toivola *et al.*, 2004). Tòxines com el SEB estimulen als limfòcits a secretar IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i aquestes citocines desacoblen les proteïnes de les unions estretes (Nusrat *et al.*, 2000) o en redueixen la seva expressió (Tsukita *et al.*, 2002; Brewer *et al.*, 2003), i incrementen així la permeabilitat paracel·lular de l'epiteli intestinal. En el nostre model d'inflamació intestinal, l'expressió de ZO-1 (proteïna de la unió estreta) es redueix un 10% i l'expressió de  $\beta$ -catenina (proteïna de la unió adherent) mostra un descens d'aproximadament un 20% a les 24 h després de la segona administració de SEB. La reducció de l'expressió d'aquestes proteïnes es manté 48 h després de la segona dosi. L'increment de la permeabilitat intestinal afavoreix l'entrada de nous antígens i patògens que poden perllongar la inflamació local, tal com passa en determinades malalties com la colitis ulcerosa o la malaltia inflamatòria intestinal (Farhadi *et al.*, 2003).

La mucosa intestinal té un paper molt important en la generació d'una resposta immunitària. Els patògens que aconsegueixen superar la barrera epitelial arriben a la barrera formada pel teixit limfoide associat a l'intestí (GALT). El GALT està format per un teixit organitzat (plaques de Peyer, fol·licles limfoides aïllats i ganglis limfàtics mesentèrics), que és el responsable de la inducció de la resposta immunitària, i per un teixit difús dividit en dues poblacions de limfòcits que es troben per damunt i per sota de la membrana basal, que són els limfòcits intraepiteliais i els limfòcits de la *lamina propria*,

respectivament, i que són les cèl·lules efectores de la resposta immunitària (Janeway *et al.*, 2000).

La distribució de les principals poblacions limfocitàries de les plaques de Peyer (limfòcits B i limfòcits T, limfòcits T CD4<sup>+</sup> i limfòcits T CD8<sup>+</sup>) de les rates Control és similar a la observada en rates adultes d'altres soques (Lyscom i Brueton, 1982; Kroese, 1998). Així doncs, en el període postnatal ja hi ha els components cel·lulars del sistema immunitari i, a més, es poden generar respostes humorals (tant sistèmiques com mucosals). No obstant això, persisteix una certa immaduresa funcional, tant en la immunitat innata com en l'adquirida durant algun temps després del naixement que deixa al nou-nat susceptible de infeccions bacterianes i virals (Insoft *et al.* 1996).

L'administració de SEB indueix un increment del percentatge de limfòcits T a les plaques de Peyer (32% als animals Control i 40% als animals SEB). Això és coherent amb les característiques de l'agent inductor, ja que el SEB estimula el sistema immunitari mitjançant la seva unió al receptor de cèl·lula T (TCR; McKay, 2001). La unió del SEB al TCR provoca activació i proliferació dels limfòcits T. D'altra banda les plaques de Peyer participen en la inducció de la resposta immunitària i, per tant, un dels primers teixits que entren en contacte amb els antígens.

Els animals inflamats presenten pràcticament el doble de limfòcits T activats a les plaques de Peyer que els animals que no han estat exposats al superantigen. L'expressió d'aquests limfòcits T activats segons el coreceptor que expressen (CD4 o CD8) revela que gairebé tots els activats pertanyen als limfòcits T col·laboradors, fet que confirma els resultats de McKay *et al.* (1998) i Noël *et al.* (2001). Els percentatges de limfòcits amb activitat citotòxica de les plaques de Peyer –limfòcits T  $\gamma\delta$  i cèl·lules NK– de rates sanes estan dins el rang observat en d'altres rosegadors (Gryglewski *et al.*, 1997). Aquestes poblacions incrementen quan les rates són exposades al SEB. Això indica que durant la inflamació induïda pel SEB també s'estimulen cèl·lules amb activitat citotòxica, tal com s'havia observat anteriorment en ratolins (Okamoto *et al.*, 2001) i en humans (cèl·lules T  $\gamma\delta$ , Rust i Koning, 1993; cèl·lules NK, D'Orazio *et al.*, 1995).

El percentatge de les principals poblacions limfocitàries dels ganglis mesentèrics d'animals que no han estat exposats a l'enterotoxina són similars als observats en rates Wistar de 6 setmanes (Serizawa *et al.*, 1994). Els ganglis mesentèrics també pertanyen al GALT organitzat i, al igual que les plaques de Peyer, també participen en la inducció de la resposta immunitària. No obstant això, els animals que presenten inflamació intestinal induïda pel SEB no mostren canvis en les principals poblacions limfocitàries d'aquest teixit (*i.e.* cèl·lules T i B, limfòcits T col·laboradors i supressors/citotòxics). Els animals Control

presenten un percentatge molt baix de limfòcits T activats, valor esperat ja que no han estat exposats al superantigen. Ara bé, l'exposició a l'enterotoxina induïx un increment en l'activació de la població de cèl·lules T. Quan s'analitza en funció del coreceptor que expressa (CD4 o CD8), s'observa que els limfòcits activats pertanyen a la subpoblació de limfòcits T CD4<sup>+</sup>. Aquest efecte del SEB en l'activació de limfòcits T també s'ha pogut observar en ratolins que han rebut el superantigen intragàstricament (Spiekermann i Nagler-Anderson, 1998). Als ganglis limfàtics mesentèrics, a diferència de les plaques de Peyer, el percentatge de limfòcits T  $\gamma\delta$  és molt baix (Rodríguez-Palmero *et al.*, 1999) i no augmenta quan els animals són exposats al SEB.

En diferents models d'inflamació intestinal s'observa un increment en la quantitat d'IgA secretada (Islam *et al.*, 1995). La inflamació intestinal induïda pel SEB no modifica la quantitat d'IgA a la mucosa intestinal. Això, juntament amb el fet que no està afectada la concentració sèrica d'immunoglobulines (IgA i IgG), indica que en la inflamació induïda pel SEB no intervenen de forma activa els limfòcits B, és a dir no està afectada la immunitat humoral. Això és coherent amb el mecanisme d'acció del SEB ja que estimula el sistema immunitari únicament a través de la seva unió al receptor de cèl·lula T (TCR) i de l'activació d'aquestes cèl·lules (Spiekermann i Nagler-Anderson, 1998; McKay, 2001).

L'anàlisi fenotípica de les poblacions limfocitàries tant de la melsa com del GALT organitzat mostra clarament que la resposta immunitària generada pel SEB es desenvolupa de forma molt manifesta al tracte gastrointestinal. Això és coherent amb el tropisme intestinal que mostra aquesta enterotoxina (McKay, 2001). El SEB probablement també té efectes sobre les poblacions limfocitàries dels ganglis mesentèrics, però en el moment en que s'han obtingut les mostres aquests efectes encara no s'havien desenvolupat. Els limfòcits que són activats a les plaques de Peyer migren cap als ganglis limfàtics mesentèrics on proliferen i es diferencien (Mowat, 2003). Així doncs, les plaques de Peyer intervenen en l'inici de la resposta immunitària que és el que s'ha pogut estudiar i posar en evidència en aquest treball, mentre que els ganglis limfàtics mesentèrics col·laboren en la maduració dels limfòcits activats i en el desenvolupament de la resposta immunitària.

L'altre funció fonamental de la mucosa intestinal es l'absorció de nutrients. Aquesta absorció es pot realitzar a través de dues rutes: la transcel·lular i la paracel·lular. La ruta transcel·lular implica el pas dels nutrients a través de les membranes apical i basolateral dels enteròcits. Els transportadors són els responsables del pas de les substàncies hidrosolubles a través de les membranes, si bé hi ha una part que travessa la bicapa lípida per difusió simple (Woudstra i Thomson, 2002). En la ruta paracel·lular, el pas de nutrients es produeix a través de les unions intercel·lulars i a favor del gradient de concentració.



S'ha descrit una reducció del transport de nutrients en diferents processos inflamatoris (O'Loughlin *et al.*, 1988; Sundaram *et al.*, 1997). Aquests autors han observat una reducció de la captació de monosacàrids en conills afectats per un procés inflamatori. Aquesta disminució de l'absorció pot estar causada per mecanismes inespecífics o per mecanismes que afecten específicament la funcionalitat d'un tipus de transportador.

Els mecanismes inespecífics comprenen la reducció de la llargada de les vellositats, que implica una reducció en la superfície d'absorció, o canvis en la composició lipídica de la membrana dels enteròcits, que afecta a la difusió dels nutrients a través de la membrana cel·lular. La reducció de l'àrea absorptiva s'ha observat en infeccions produïdes per *Cryptosporidium* (Argenzio *et al.*, 1990) o per *Yersinia enterocolitica* (O'Loughlin *et al.*, 1988). En aquests estudis s'observa que durant el procés inflamatori hi ha una reducció de l'absorció de monosacàrids que està associada a una forta reducció de la superfície absorptiva de la vellositat. D'altra banda estudis realitzats amb vesícules de membrana apical d'enteròcits de cobai mostra que l'oxidació lipídica afecta a la fluïdesa de la membrana cel·lular (Jour'd'heuil i Meddings, 2001). Aquesta oxidació pot ser deguda a la gran quantitat d'agents oxidants (espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen) que s'alliberen durant un procés inflamatori (Kazi *et al.*, 1995).

L'anàlisi cinètica del transport de D-glucosa a través de la membrana apical mostra que l'administració de SEB incrementa la constant de difusió ( $K_d$ ) d'aquest monosacàrid entre 4 i 5 vegades, i això indica que durant la inflamació intestinal induïda per l'enterotoxina, la permeabilitat passiva per a la D-glucosa està molt incrementada. L'increment de la permeabilitat podria ser causat per un increment de l'expressió apical de GLUT2 que és un mecanisme de transport facilitat de baixa afinitat. Kellet (2001) ha demostrat que una elevada concentració de D-glucosa lliure a la llum intestinal (per exemple; després de la ingesta) pot induir l'expressió de transportadors GLUT2 a la membrana apical dels enteròcits. Per conèixer si aquest increment de la difusió passiva de D-glucosa està causat per una incorporació de GLUT2 a la membrana apical o en canvi és fruit de l'increment de la permeabilitat de la bicapa lipídica de la membrana cel·lular s'han incubat les vesícules amb inhibidors específics d'aquest transportador (citocalasina B i glucosamina). Els resultats mostren que les vesícules de membrana apical no presenten GLUT2 a la membrana, fet que recolza la idea que l'increment del flux transmembrana de D-glucosa a l'intestí inflamat és resultat d'un increment de la difusió simple de D-glucosa.

L'efecte del SEB sobre la permeabilitat de la membrana es pot explicar per l'increment de la concentració de citocines proinflamatòries que presumiblement s'esdevé. S'ha demostrat que la IL-1 (Murray *et al.*, 1999) i el TNF- $\alpha$  (Sundaram *et al.*, 2003) incrementen l'oxidació lipídica de la membrana i com a conseqüència hi ha un increment de la seva

fluïdesa. Les citocines produïdes en la resposta immunitària provocada per l'administració de SEB induïrien canvis en la composició lipídica de la membrana i en la seva fluïdesa que es posarien de manifest quan els enteròcits migressin des de la cripta cap a la vellositat. Els canvis en la fluïdesa podrien modificar les propietats de permeabilitat de membrana en el sentit d'incrementar-la. D'altra banda, també s'ha vist que la fluïdesa de la membrana afecta la cinètica del transport de nutrients (Jourdain i Meddings, 2001; Vázquez *et al.*, 2001).

L'absorció de nutrients també pot estar alterada per mecanismes específics, com per exemple l'alteració de l'expressió de transportadors de membrana. En aquest treball, la inflamació intestinal induïda per SEB provoca una reducció en la capacitat intestinal per transportar D-glucosa ( $V_{max}$ ) a través del transportador apical SGLT-1. Aquesta reducció de la velocitat màxima de transport de D-glucosa reflecteix o bé un descens del nombre de transportadors o bé una reducció de la seva activitat intrínseca. Per aclarir aquest punt, s'ha determinat la unió de florzina a la membrana apical i s'ha relacionat amb la  $V_{max}$ . La florzina és un glucòsid que s'uneix de forma específica al transportador SGLT-1. La quantificació de la florzina que s'ha unit a les vesícules permet estimar la abundància de transportadors a la membrana apical dels enteròcits (Alvarado i Crane, 1962). L'anàlisi de la unió de florzina a la membrana apical indica que la reducció de la  $V_{max}$  del transport de D-glucosa és conseqüència d'un descens de la densitat de transportadors a la membrana apical. Aquest resultat s'ha confirmat per la determinació de la quantitat de proteïna SGLT-1 per Western blot realitzat amb vesícules de membrana apical i per la immunolocalització de SGLT-1 sobre seccions histològiques de jejú.

Els resultats obtinguts en la immunolocalització de l'SGLT-1 mostren que el perfil d'expressió de l'SGLT-1 és el característic d'aquesta proteïna, amb una major expressió a l'àpex de la vellositat (Yoshida *et al.*, 1995). En els animals inflamats, la reducció de la densitat de la proteïna es produeix al llarg de tota la vellositat i no n'està afectada la morfologia de la mucosa intestinal.

El transportador SGLT-1 es troba regulat per mecanismes de dos tipus: els que actuen modificant la transcripció o l'estabilitat de l'mRNA corresponent a la proteïna i els que actuen controlant la traducció de la proteïna o bé del trànsit i de la incorporació de la proteïna ja formada a la membrana (Ferraris, 2001). Un exemple del primer tipus el tenim durant la infecció per rotavirus, en què els ratolins infectats presenten una reducció dels transcrits corresponents a SGLT-1. Això està causat perquè aquests virus expressen proteïnes que disminueixen l'estabilitat de l'mRNA i, per tant, en redueixen la traducció (Boshuizen *et al.*, 2003). En canvi, en infeccions per *Eimeria magna* a conills (Sundaram *et al.*, 1997) i per *N. brasiliensis* a rates (Sekikawa *et al.*, 2003) s'observa una forta reducció

de l'expressió de SGLT-1 a jejú sense observar canvis en la transcripció del mRNA de corresponent.

L'anàlisi de l'absorció d'aminoàcids s'ha realitzat amb tres aminoàcids essencials representatius (L-lisina, L-leucina i L-metionina) i amb una aproximació metodològica que permet diferenciar els efectes sobre l'afinitat del transportador (utilitzant concentracions baixes d'aminoàcid) dels efectes sobre la capacitat de transport (utilitzant concentracions de l'ordre mM). El disseny s'ha centrat en l'absorció global del substrat, més que en el funcionament de transportadors específics. Cal tenir present que un aminoàcid pot utilitzar més d'un sistema transportador (Palacín *et al.*, 1998). Els resultats mostren clarament que la captació d'aminoàcids no està alterada en el nostre model d'inflamació intestinal induïda per SEB. Això difereix dels resultats de Topouchian *et al.* (2003) que han observat que rates infectades amb *C. parvum* presenten una forta reducció del flux d'entrada de leucina i de glutamat a l'epiteli intestinal durant la criptosporidiosi, la qual s'ha atribuït a una reducció del gradient electroquímic del Na<sup>+</sup> (Capet *et al.*, 1999).

## EFFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES

Tal com s'ha dit anteriorment, els concentrats de proteïnes plasmàtiques poden actuar de dues formes: neutralitzant els antígens i els microorganismes presents a la llum intestinal, o bé reduint el grau d'estimulació del sistema immunitari. Així doncs, quan l'administració d'antígens es realitza per via oral, la quantitat que pot arribar-ne a la mucosa intestinal d'animals que han rebut el concentrat és menor que a la d'animals que no el reben (Mouricot *et al.*, 1990). En el nostre model d'inflamació induït per SEB, l'administració és sistèmica i, per tant, la quantitat de toxina que arriba és igual per a tots els animals, rebin o no suplementació dietètica. Els suplementes dietètics poden millorar alguns dels efectes induïts per l'administració sistèmica de l'enterotoxina, que seran exposats més endavant.

La suplementació dietètica amb SDAP o amb IC no modifica ni el consum de pinso, ni la taxa de creixement de les rates del present estudi. Touchette *et al.* (2002) també han observat que l'SDAP no millora ni el consum de pinso ni la taxa de creixement de porcs estabulats. Això pot ser degut a que l'efecte dels concentrats de proteïnes plasmàtiques es posa de manifest més clarament quan els animals estan en condicions menys higièniques i en conseqüència amb més càrrega patogènica (Coffey i Cromwell, 1995; Bergström *et al.*, 1997).

L'SDAP i l'IC no modifiquen cap de les variables hematològiques estudiades ni la concentració sèrica d'IgA i d'IgG. Però, en canvi, ambdós concentrats tenen un clar efecte sobre la melsa, on redueixen el percentatge de cèl·lules NK. Aquestes cèl·lules tenen

funció citotòxica i formen part de la immunitat innata o inespecífica. Les cèl·lules NK de la melsa no estan implicades en la inflamació induïda pel SEB, ja que tal com s'ha comentat anteriorment, el SEB no desenvolupa una resposta immunitària sistèmica. El descens en el nombre de cèl·lules NK observat podria indicar que els concentrats de proteïnes plasmàtiques redueixen l'estat d'activació basal del sistema immunitari. Aquesta reducció en el grau d'estimulació immunitària afectaria només a la defensa innata, ja que els percentatges de les cèl·lules que pertanyen a la defensa adquirida no estan modificats. Aquest efecte de l'SDAP sobre les cèl·lules NK de la melsa recolza les observacions de Touchette *et al.*, (2002). Aquests autors veuen que la suplementació amb SDAP redueix l'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6) a melsa i a d'altres teixits com el fetge o l'hipotàlam en animals sans.

La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques (SDAP o IC) mostra un efecte escàs sobre els dos marcadors utilitzats per posar en evidència un procés inflamatori agut: infiltració de neutròfils i permeabilitat vascular. Cap dels dos tipus de suplementos pot prevenir la infiltració de neutròfils a la mucosa de jejú provocada per l'administració de SEB. En aquest punt s'ha de tenir en compte que el SEB, a través dels limfòcits activats i dels monòcits, retarda l'entrada en apoptosi dels neutròfils (Moulding *et al.*, 1999). Aquest fet pot emascarar l'efecte de les dietes sobre la infiltració de neutròfils a la mucosa intestinal. Pel que fa a la permeabilitat vascular només la suplementació amb IC mostra una tendència a reduir l'increment de la permeabilitat vascular induïda per l'enterotoxina. De fet ambdues variables estan molt relacionades, ja que la infiltració de neutròfils comporta un increment de la permeabilitat vascular. Cap dels dos suplementos ha modificat la presència de neutròfils a la mucosa intestinal; per tant, tampoc s'esperava que modifiquessin de forma important la permeabilitat vascular (Sherwood i Toliver-Kinsky, 2004).

Tant SDAP com IC mostren una tendència a reduir l'efecte del SEB sobre proteïnes de la unió estreta i de la unió adherent. Aquestes proteïnes participen en la regulació de la permeabilitat epitelial (Nusrat *et al.*, 2000). Tal com s'ha dit anteriorment, en un procés inflamatori hi ha un increment en la permeabilitat epitelial que afavoreix l'entrada de nous antígens i patògens. Els concentrats incrementen l'expressió de la ZO-1 i de la  $\beta$ -catenina i, en conseqüència disminueix la permeabilitat de les unions intercel·lulars. Aquest efecte és evident 48 h després de la segona administració de SEB. Així doncs, la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC millora l'estructura de l'epiteli i en conseqüència reforça la funció de barrera en condicions d'inflamació intestinal.

El consum dels suplementos SDAP o IC prevenen l'increment del contingut hídric de la femta induït pel SEB. No obstant això, la suplementació amb el concentrat de plasma és

més efectiva que el concentrat d'immunoglobulines, ja que a les 48 h de l'administració de la segona dosi de la toxina, només l'SDAP manté valors de contingut d'aigua en femtes similars als animals sans. Altres estudis realitzats amb suplementes de plasma mostren una millora dels símptomes que presenten els animals que han estat infectats amb diferents patògens. Per exemple, en vedells la suplementació oral amb sèrum boví redueix la diarrea induïda per *Cryptosporidium parvum* (Hunt *et al.*, 2002) i també disminueix la severitat de la infecció en vedells exposats a coronavirus (Arthington *et al.*, 2002).

L'estudi de l'efecte de la suplementació dietètica sobre el transport de nutrients durant un procés inflamatori indica que el principal efecte es produeix sobre l'absorció de D-glucosa. Concretament, la suplementació amb SDAP pot prevenir parcialment la reducció de la capacitat màxima de transport de la D-glucosa ( $V_{max}$ ) de la D-glucosa induïda per l'administració de SEB. El menor grau de reducció de la  $V_{max}$  es pot produir per dues vies; per l'increment de l'activitat intrínseca del transportador o per una menor reducció de transportadors. L'anàlisi dels llocs d'unió a la florzina indica que es produeix pel segon mecanisme, ja que hi ha una correlació lineal entre els valors de  $V_{max}$  i els d'unió de florzina. Aquest resultat s'ha confirmat per Western blot, realitzat sobre vesícules de membrana apical, i per la immunolocalització de SGLT-1 sobre seccions histològiques de jejú.

Des d'un punt de vista nutricional, és difícil predir les conseqüències de l'increment de la permeabilitat passiva i de la reducció del transport sobre l'absorció total de D-glucosa. El contingut luminal de D-glucosa en vertebrats és variable ja que depèn de la composició de la dieta, de l'estat en què es troba el tracte gastrointestinal (període digestiu o entre ingestes) i de la zona de l'intestí que es consideri, entre d'altres, de manera que comprèn un rang que va de 0,2 mM a un màxim de 48 mM (Ferraris *et al.*, 1990). Després de la ingesta, la concentració luminal de D-glucosa s'espera que sigui elevada i, per tant, en aquesta situació l'absorció *in vivo* de monosacàrids per transport i per difusió simple també serà elevada. Els efectes del SEB sobre la permeabilitat passiva compensen completament la petita reducció de la  $V_{max}$  del transportador SGLT-1.

Al GALT organitzat, i en concret a les plaques de Peyer, és on els efectes de la suplementació dietètica són més clars. En aquest teixit, la suplementació amb concentrats de proteïnes plasmàtiques redueix l'activació dels limfòcits T col·laboradors induïda per l'administració de SEB. A més, els animals tractats amb SEB i alimentats amb SDAP presenten percentatges de les poblacions amb activitat citotòxica (cèl·lules T  $\gamma\delta$  i cèl·lules NK) menors que els animals que no han rebut cap suplementació dietètica. Així doncs, la suplementació dietètica amb SDAP (i en menor grau la suplementació amb IC) redueix la intensitat de la resposta immunitària enfront l'agent inflamatori i, per tant, les

conseqüències negatives que generalment acompanyen un procés inflamatori (McKay, 2001). Aquesta reducció de la resposta immunitària és lleu i no deixa a l'animal immunodeprimit, sinó que només en redueix la intensitat.

En algunes poblacions limfocítiques de les plaques de Peyer s'observa un comportament diferent segons si els animals han estat alimentats amb el pinso suplementat amb SDAP o bé amb IC. Aquest efecte diferent en funció del tipus de suplementació que han rebut cal atribuir-la a la diferent composició i activitat biològica dels dos concentrats. L'SDAP conté tots els components plasmàtics (transferrina, factors de creixement i enzims), mentre que l'IC només conté la fracció immunoglobulina (Coffey i Cromwell, 2001; Lee *et al.*, 1988). Per tant, malgrat que les immunoglobulines presents al plasma poden ser les principals responsables de l'activitat de l'SDAP, aquestes altres proteïnes funcionals probablement també contribueixen a que l'SDAP presenti uns efectes més generalitzats, a més dels efectes a la llum intestinal (neutralització d'antígens i microorganismes).

Als ganglis limfàtics mesentèrics, el SEB provoca una activació dels limfòcits T col·laboradors, que no és previngut per cap dels dos tipus de suplementos. De fet, els concentrats no modifiquen cap de les poblacions analitzades d'aquest teixit. Els ganglis mesentèrics estan implicats en la proliferació i maduració de les cèl·lules limfocitàries, una vegada s'ha iniciat la resposta immunitària. En canvi, les plaques de Peyer intervenen en la inducció de la resposta immunitària. Per tant, només podem estudiar de forma fiable el que ha passat a les estructures inductores. Si hi ha algun efecte sobre els ganglis mesentèrics probablement apareixeria més tard.

El paper principal del sistema immunitari és reconèixer, destruir i eliminar els antígens i patògens. No obstant això, una reacció immunitària inadequada pot també resultar en dany tissular i patologia (McKay *et al.*, 1998) que pot conduir a una reducció del creixement. En aquest estudi es demostra que la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC redueix consistentment el percentatge de diferents poblacions amb funcions específiques en estats inflamatoris. La suplementació dietètica amb SDAP prevé l'activació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> produïda per l'administració de SEB, la qual cosa indica que les rates alimentades amb el pinso suplementat amb SDAP no desenvolupen el mateix grau d'activació de les cèl·lules T col·laboradores. La suplementació dietètica amb SDAP també prevé l'increment en el percentatge dels limfòcits T  $\gamma\delta$ , fet que recolza la hipòtesi que els pinsos que contenen SDAP poden jugar un paper en la regulació de la resposta immunitària mitjançant la limitació dels processos activadors que poden comprometre l'ús de l'energia provinent de la ingesta d'aliments (Demas *et al.*, 1997). Aquests efectes de la suplementació amb SDAP sobre la mucosa intestinal s'han d'afegir als efectes luminals mencionats anteriorment (Mouricot *et al.*, 1990).

Durant el desenvolupament postnatal hi ha profunds canvis en l'activitat del sistema immunitari, entre ells la supressió immunitària que es produeix durant la lactància, l'activació del sistema immunitari que s'esdevé durant el deslletament i la seva posterior regulació descendent intrínseca (Cummins i Thompson, 1997). El deslletament està associat a una inflamació intestinal, que és deguda a dos factors principals: l'un és la pèrdua de la immunitat passiva provinent de la llet materna i l'altre el fet que l'animal entra en contacte amb una gran varietat d'antígens que provenen majoritàriament de l'alimentació (Pié *et al.*, 2004). Un exemple d'això és el que s'observa a ratolins, en què el 7è dia després del deslletament hi ha un increment de la producció intestinal de citocines, tant de tipus  $T_H1$  (IL-2 i IFN- $\gamma$ ) com de tipus  $T_H2$  (IL-5 i IL-6; Vázquez *et al.*, 2000), citocines directament relacionades amb processos inflamatoris.

La lactància materna està associada a una menor incidència de certes malalties infeccioses quan es compara amb l'alimentació amb formules substitutives (Dewey *et al.*, 1995). Entre els factors de la llet responsables de protegir als infants d'infeccions i malalties causades per patògens hi ha la IgA secretada, els oligosacàrids i les glicoproteïnes (Glass *et al.*, 1983; Newburg *et al.*, 1990; Yolken *et al.*, 1992) que neutralitzen, agreguen i afavoreixen l'eliminació dels antígens i dels microorganismes patògens. Un altre factor important en la protecció enfront la infecció per patògens és la presència de la lactoferrina a la llet materna, ja que aquesta proteïna és un potent bactericida (Hanson, 1999). D'altra banda, el TGF- $\beta$  i IL-10 presents a la llet materna poden contribuir a les propietats tolerogèniques que presenta, ja que aquestes citocines exerceixen efectes immunosupressors al tracte gastrointestinal (Steidler *et al.*, 2000; Penttila *et al.*, 2003). A més, el TGF- $\beta$  juga un paper fonamental en la millora de la barrera epitelial (Planchon *et al.*, 1994), així com en la reparació de l'epiteli després d'una lesió tissular (Dignass i Podolsky, 1993).

Des d'una perspectiva nutricional, el control de la inflamació intestinal és una forma de prevenir els desordres intestinals que es produeixen en animals de granja després del deslletament. En aquest sentit, diferents treballs demostren que alguns immunonutrients poden modular l'expressió intestinal de citocines (Bosi *et al.*, 2004; Isolauri *et al.*, 2001). Els concentrats de plasma podrien considerar-se com a tals ja que redueixen la incidència i la severitat de les malalties infeccioses en animals de granja (Quigley i Wolfe, 2003). Els factors responsables d'aquest efecte són les immunoglobulines, en concret la IgG (Nollet *et al.*, 1999a), i les glicoproteïnes (Mouricot *et al.*, 1990). Però el plasma conté altres elements que també es troben en la llet materna, concretament, hi ha TGF- $\beta$ , lactoferrina i diversos factors de creixement. Alguns d'ells podrien actuar com a elements tolerogènics i així limitar la resposta immunitària. D'aquesta forma aquests preparats provinents del plasma que s'afegeixen a l'alimentació dels animals de granja permetrien utilitzar una major fracció de l'energia provinent de la ingesta per al creixement.

## *VI. Conclusions*

---



La caracterització de la inflamació intestinal induïda mitjançant l'administració de dues dosis de 50 µg de SEB (Enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus*) permet concloure que:

- La pauta d'administració de l'enterotoxina és adequada per induir un estat inflamatori intestinal lleu, sense quedar-ne afectat ni la ingesta de pinso ni el creixement dels animals. Aquest resultat indica que les alteracions induïdes pel superantigen no afecten els patrons alimentari i del desenvolupament dels animals.
- La inflamació intestinal induïda amb SEB es manifesta a través de canvis en la distribució de diferents poblacions limfocitàries del teixit limfoide intestinal (GALT), la infiltració de neutròfils, l'increment del contingut d'aigua en femtes i per alteracions en l'absorció de nutrients i en la permeabilitat intestinal.
- La inflamació intestinal no modifica ni les variables hematològiques, ni la concentració plasmàtica de la IgA i de la IgG, ni les poblacions limfocitàries de la melsa, fets que indiquen que l'acció del SEB no és sistèmica. L'administració de l'enterotoxina tampoc modifica la quantitat d'IgA present a la mucosa intestinal, fet que suggereix que les cèl·lules B tenen una baixa participació en la resposta immunitària enfront del superantigen.
- El SEB indueix una activació de la població de limfòcits T col·laboradors de les plaques de Peyer i dels ganglis limfàtics mesentèrics, tots dos pertanyents al GALT organitzat. A les plaques de Peyer augmenta el percentatge de limfòcits T.
- Els animals exposats a l'enterotoxina presenten un major nombre de cèl·lules amb activitat citotòxica a les plaques de Peyer, com ara els limfòcits T  $\gamma\delta$  i les cèl·lules NK.
- L'administració de SEB incrementa la difusió passiva de la D-glucosa i redueix la velocitat màxima de transport d'aquest substrat a través del transportador SGLT-1 de la membrana apical. Aquesta disminució de la velocitat de transport es correlaciona amb una reducció del nombre de transportadors a la membrana apical, sense afectar l'afinitat del transportador pel substrat. En canvi, el SEB no modifica l'absorció dels aminoàcids essencials L-leucina, L-lisina i L-metionina.
- Els animals exposats a l'enterotoxina tenen augmentada la permeabilitat vascular a macromolècules que es manifesta 6 h després de l'administració de l'agent inflamatori. A les 24 h la permeabilitat vascular ja s'ha restablert.

- La inflamació intestinal induïda pel superantigen es caracteritza per una reducció de l'expressió de proteïnes de la unió estreta (ZO-1) i de la unió adherent ( $\beta$ -Catenina), que suggereix una major permeabilitat intestinal.

De l'estudi dels efectes de la suplementació dietètica amb concentrat de plasma (SDAP) o amb concentrat d'immunoglobulines (IC) sobre el model d'inflamació intestinal induïda per SEB (grups SEB-SDAP i SEB-IC) es pot concloure que:

- La suplementació dietètica amb SDAP o amb IC no modifica ni el consum de pinso ni el creixement dels animals inflamats. Tampoc no estan afectades les variables hematològiques mesurades ni la concentració sèrica de la IgA i de la IgG. La suplementació amb SDAP (i, en menor grau, la suplementació amb IC) redueix el percentatge de cèl·lules NK de la melsa, fenomen que pot donar lloc a una menor resposta cel·lular inespecífica.
- L'SDAP redueix el grau d'activació de les Plaques de Peyer en disminuir el percentatge de limfòcits T col·laboradors activats pel SEB. En canvi, la suplementació amb IC només mostra una tendència a reduir el percentatge de limfòcits T col·laboradors activats pel superantigen.
- Els animals del grup SEB-SDAP tenen un menor percentatge de poblacions limfocitàries elevades comparats amb els animals SEB. Aquesta resposta indica que els animals alimentats amb pinso suplementat amb SDAP poden desenvolupar una resposta immunitària enfront del SEB, però reduint-ne la intensitat respecte els animals que no han rebut la suplementació dietètica.
- La dieta amb SDAP evita en part l'efecte del SEB sobre la reducció de la velocitat màxima de transport de glucosa a través de SGLT-1; aquesta observació es correlaciona amb l'expressió dels transportadors a la membrana apical de l'enteròcit.
- En animals inflamats, la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC afavoreix que l'expressió de les proteïnes ZO-1 i  $\beta$ -catenina de la unió intercel·lular retorni als valors control.

En resum, l'addició de concentrats de plasma a la dieta en l'etapa que segueix el deslletament afecta la distribució d'algunes poblacions limfocitàries durant la resposta a la inflamació induïda per una enterotoxina de *S. aureus*, que impedeix una activació exagerada del sistema immunitari; alhora, l'SDAP afavoreix l'absorció d'alguns nutrients

energètics i la integritat de l'epiteli. Tot plegat recolza la hipòtesi que la suplementació dietètica amb SDAP millora l'aprofitament energètic dels nutrients i redueix la probabilitat que agents químics i infecciosos puguin penetrar a la circulació sanguínia a través de la barrera epitelial.