



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecte dels β -galactomannans sobre la funció intestinal de barrera en les infeccions per *Salmonella*

Maria Teresa Brufau Bonet

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Efecte dels β -galactomannans sobre la funció
intestinal de barrera en les infeccions per
Salmonella

M. Teresa Brufau Bonet

2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Programa de Doctorat:
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

Efecte dels β -galactomannans sobre la funció
intestinal de barrera en les infeccions per
Salmonella

Memòria presentada per M. Teresa Brufau Bonet per optar al títol de Doctor
per la Universitat de Barcelona

Dra. Ruth Ferrer Roig
(directora)

Dra. Raquel Martín Venegas
(directora)

M. Teresa Brufau Bonet
(doctoranda)

M. Teresa Brufau Bonet
2016



Ruth Ferrer Roig, catedràtica, i **Raquel Martín Venegas**, professora agregada interina, ambdues del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN:

Que la memòria titulada *Efecte dels β -galactomannans sobre la funció intestinal de barrera en les infeccions per Salmonella* presentada per M. TERESA BRUFAU BONET per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostre direcció al Departament de Bioquímica i Fisiologia, i considerant-la conclusa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I, per què així consti, signem la present a Barcelona, el dia 27 de setembre de 2016.

Dra. Ruth Ferrer Roig

Dra. Raquel Martín Venegas

Aquesta tesi ha estat subvencionada pel projecte AGL 2009-11936 del Ministerio de Ciencia e Innovación, pel projecte FRI-2011 de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA-UB) i pels projectes FBG-306886 i FBG-307639 de la Fundació Bosch i Gimpera i Industrial Técnica Pecuaria, SA.

ÍNDEX

I. Introducció	1
1. Tracte gastrointestinal del pollastre	3
2. Estructura de la paret de l'intestí prim	4
3. Funció intestinal de barrera	7
3.1. La microbiota intestinal.....	8
3.2. El moc	10
3.3. Compostos antimicrobians.....	13
3.4. Immunoglobulina A (IgA)	13
3.5. Permeabilitat de l'epiteli intestinal.....	13
3.5.1. Estructura de la unió estreta.....	14
3.5.1.1. Proteïnes transmembrana	15
3.5.1.1.1. Ocludina	15
3.5.1.1.2. Família de les claudines.....	15
3.5.1.1.3. Família <i>Junctional Adhesion Molecules</i> (JAM).....	16
3.5.1.1.4. Tricel·lulina	16
3.5.1.2. Proteïnes citoplasmàtiques estructurals	17
3.5.1.3.1. Família <i>Zonula Occludens</i> (ZO)	17
3.5.1.3.2. Afadina (AF6)	18
3.5.1.3.3. Cingul·lina	18
3.5.1.3. Proteïnes citoplasmàtiques reguladores	18
3.5.2. Selectivitat de la via paracel·lular	19
3.6. Sistema immunitari intestinal	20
3.6.1. Resposta immunitària	21
3.6.1.1. Resposta innata.....	21
3.6.1.1.1. Reconeixement de patògens	21
3.6.1.1.1.1. Receptors tipus <i>Toll</i> (TLR).....	22
3.6.1.1.1.2. <i>C-type Lectin Receptors</i> (CLR).....	23
3.6.1.1.1.3. <i>Nucleotide oligomerization domain-Like Receptors</i> (NLR).....	24
3.6.1.1.1.4. <i>Retinoic acid-inducible-I-Like Receptors</i> (RLR)	24

3.6.1.1.2. Cèl·lules immunitàries de la làmina pròpia.....	25
3.6.1.1.2.1. Mastòcits	25
3.6.1.1.2.2. Macròfags	25
3.6.1.1.2.3. Cèl·lules dendrítiques (DC)	27
3.6.1.1.2.4. Limfòcits de la resposta innata (ILC).....	28
3.6.1.2. Resposta adquirida	28
3.6.1.2.1. Limfòcits B	28
3.6.1.2.2. Limfòcits T	28
3.6.1.2.3. Cèl·lules <i>Natural Killer</i> (NK).....	28
3.6.1.2.4. Limfòcits intraepiteliais (IEL).....	29
3.6.2. Citocines de la resposta immunitària implicades en la funció intestinal de barrera	29
4. Infecció intestinal per <i>Salmonella</i>.....	31
4.1. Epidemiologia	31
4.2. Patogenicitat.....	32
4.3. Prevenció	36
4.3.1. Probiòtics.....	38
4.3.1.1. <i>Lactobacillus</i>	39
4.3.2. Prebiòtics	40
4.3.3. Mannan oligosacàrids (MOS)	40
4.3.3.1. α -MOS.....	41
4.3.3.2. β -MOS.....	41
5. Capítol de llibre 1	45
6. Capítol de llibre 2	59
II. Objectius.....	73
Article previ.....	79
III. Resultats	91
Article 1.....	93
Article 2.....	107

Resultats no publicats 1	121
Resultats no publicats 2	125
Resultats no publicats 3	129
Article 3.....	139
IV. Discussió	165
V. Conclusions	177
VI. Bibliografia.....	183
VII. Annex	207

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Tracte gastrointestinal de les aus	4
Figura 2. Cèl·lules caliciformes	6
Figura 3. Cèl·lules M.....	7
Figura 4. Elements que participen en la funció intestinal de barrera	8
Figura 5. Mecanismes implicats en els efectes beneficiosos de la microbiota..	10
Figura 6. Estructura de les mucines secretades formadores de gel i de les mucines associades a la membrana	11
Figura 7. Glicocàlix	12
Figura 8. Unions intercel·lulars de l'epiteli intestinal.....	14
Figura 9. Esquema de la unió estreta	15
Figura 10. Proteïnes transmembrana de la unió estreta	16
Figura 11. Estructura de la ZO-1	17
Figura 12. Fosforilació de les proteïnes del citoesquelet.....	19
Figura 13. Selectivitat de la via paracel·lular	20
Figura 14. Reconeixement de patògens	22
Figura 15. Localització dels diferents TLR en les cèl·lules de l'intestí prim i del còlon.....	23
Figura 16. Polarització dels macròfags	27
Figura 17. Gènere <i>Salmonella</i>	31
Figura 18. Esquema de la internalització de la salmonel·la a l'epiteli intestinal.....	34
Figura 19. Esquema de la formació dels SCV	35
Figura 20. Estructura dels mannans lineals	42

Figura 21. Estructura dels glucomannans.....	42
Figura 22. Estructura dels galactomannans.....	43
Figura 23. Estructura dels galactoglucomannans	43

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. PRR presents a l'epiteli intestinal.....	24
Taula 2. Paper de les citocines en la funció intestinal de barrera	29
Taula 3. Resum de les funcions de les proteïnes efectores d'SPI-1.....	35
Taula 4. Resum de les funcions de les proteïnes efectores d'SPI-2.....	36

ABREVIATURES

AF6	Afadina
AGP	Antibiòtics promotors de creixement, <i>Antibiotic Growth Promoters</i>
AJ	Unió adherent, <i>Adherens Junction</i>
AP1	Proteïna activadora 1, <i>Activator Protein 1</i>
CFU	Unitats formadores de colònies, <i>Colony-Forming Units</i>
CLR	<i>C-type Lectin Receptors</i>
DC	Cèl·lula dendrítica, <i>Dendritic Cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DS	Desmosoma
dTHP1	Macròfags diferenciats de cèl·lules THP-1
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ERK	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars, <i>Extracellular signal Related Kinase</i>
FAE	Epiteli associat a fol·licle, <i>Follicle Associated Epithelium</i>
FBS	Sèrum fetal boví, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FD4	<i>Fluorescein isothiocyanate–Dextran</i>
FI	Intensitat de fluorescència
FOS	Fructo oligosacàrids
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí, <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GDP	Difosfat de guanosina, <i>Guanosine Diphosphate</i>
GLM	Ganglis Limfàtics Mesentèrics
GOS	Galacto oligosacàrids
GTP	Trifosfat de guanosina, <i>Guanosine Triphosphate</i>
GUK	Guanilat cinasa, <i>Guanylate kinase</i>
IEL	Limfòcits intraepitelials, <i>Intraepithelial Lymphocytes</i>
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Limfòcits de la resposta innata, <i>Innate Lymphoid Cells</i>
ILF	Fol·licles limfoides aïllats, <i>Isolated Lymphoid Follicles</i>
INFγ	Interferó γ
IPI-2I	Cèl·lules epitelials d'ili de porc, <i>Immortal Pig Intestinal-2I</i>
JAK	Cinasa Janus, <i>Janus kinase</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>

LDH	Lactat deshidrogenasa
Lpf	<i>Long polar fimbriae</i>
LPS	Lipopolisacàrid, <i>Lipopolysaccharide</i>
LTA	Àcid lipoteicoic, <i>Lipoteichoic Acid</i>
M1	Macròfags clàssics
M2	Macròfags alternatius
MAGUK	<i>Membrane Associated Guanylate Kinase</i>
MAMP	Patrons moleculars associats a microorganismes, <i>Microorganism Associated Molecular Patterns</i>
MAPK	Proteïnes cinasa activades per mitògens, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MCFA	Àcids orgànics de cadena mitjana, <i>Medium Chain Fatty Acids</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MLC	Cadena lleugera de miosina, <i>Myosin Light Chain</i>
MLCK	Cinasa de la cadena lleugera de miosina, <i>Myosin Light Chain Kinase</i>
MOI	Multiplicitat d'infecció, <i>Multiplicity Of Infection</i>
MOS	Mannan oligosacàrids
NF-κB	Factor nuclear- κ B
NK	Cèl·lules <i>Natural Killer</i>
NLR	<i>Nucleotide oligomerization domain-Like Receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAMP	Patrons moleculars associats a patògens, <i>Pathogen Associated Molecular Paterns</i>
PDZ	<i>Post-synaptic density 95/Drosophila discs large/Zona-occludens 1</i>
Pef	<i>Plasmid encoded fimbriae</i>
PGN	Peptidoglicà, <i>peptidoglycan</i>
pIgR	Receptor d'immunoglobulines polimèriques, <i>polymeric Immunoglobulin Receptor</i>
PKC	Proteïna cinasa C, <i>Protein kinase C</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRR	Receptors específics de patrons, <i>Pattern Recognition Receptor</i>
RIG	<i>Retinoic acid-Inducible</i>
RLR	<i>Retinoic acid-inducible-I-Like Receptors</i>
RMPI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RNS	Espècies reactives de nitrogen, <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROCK	Família Rho
ROS	Espècies reactives d'oxigen, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCFA	Àcids orgànics de cadena curta, <i>Short Chain Fatty Acids</i>
SCV	<i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SH3	<i>Scr Homology 3</i>
Sif	<i>Salmonella-induced filaments</i>
Sip	<i>Salmonella inner protein</i>
Sop	<i>Salmonella outer protein</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
STAT	Transductor de senyal i activador de la transcripció, <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
S-βGM	Salmosan®
T3SS	Sistema de secreció de tipus III, <i>Type three Secretion System</i>
TER	Resistència elèctrica transepitelial, <i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
TGFβ	Factor de creixement transformant β, <i>Transforming Growth Factor β</i>
Th	Limfòcits T efectors, <i>T helper cells</i>
TJ	Unió estreta, <i>Tight Junction</i>
TLR	Receptors tipus Toll, <i>Toll-Like Receptor</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α, <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Treg	Limfòcit T regulador
UE	Unió Europea
ZO	<i>Zonula Occludens</i>
βGM	β-galactomannan

RESUM

L'administració d'antibiòtics a dosis subterapèutiques va ser una estratègia extensament utilitzada a partir dels anys 50 en la producció animal per a la prevenció d'infeccions i com a promotors del creixement. Tanmateix, la creixent aparició de bacteris resistents als antibiòtics va comportar que l'any 2006, la Unió Europea (UE) prohibís l'ús dels antibiòtics com a promotors del creixement (AGP) en la nutrició animal (CE n. 1831/2003). Aquesta prohibició, però, va fer repuntar el nombre de casos d'infeccions en animals i toxiinfeccions alimentàries en humans que fins aleshores havien estat controlades. La salmonel·losi, segona causa d'infeccions alimentàries a la UE, és causada per diferents serotips del bacteri gramnegatiu *Salmonella* que contaminen ous i carn d'au de corral (*Salmonella* Enteritidis) i carn de porc i de boví (*Salmonella* Typhimurium). En humans, aquests dos serotips causen gastroenteritis mentre que en animals de granja, les infeccions subclíniques són molt comunes. Per aquesta raó, actualment, la indústria avícola destina molts esforços a la recerca d'estratègies nutricionals alternatives als AGP per a la seva inclusió en els programes de control de *Salmonella*.

Així, el principal objectiu d'aquesta tesi ha estat determinar l'efecte del Salmosan® (S-βGM), un producte ric en mannan oligosacàrids (MOS), sobre la funció intestinal de barrera a l'intestí de pollastres d'engreix infectats amb *S. Enteritidis*, i en cultius de cèl·lules intestinals Caco-2 colonitzades per diferents serotips de *Salmonella* i en dos models d'inflamació intestinal amb cèl·lules Caco-2.

En el pollastre, els resultats revelen que el S-βGM redueix la presència de bacteris adherits a l'epiteli i incrementa la producció de muc. Aquest muc constitueix una superfície d'adhesió i una barrera física per a l'accés dels bacteris a l'epiteli. En els cultius de cèl·lules intestinals Caco-2, el S-βGM té un efecte protector sobre la funció epitelial de barrera malmena per la infecció amb *S. Enteritidis*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*. En el cas de *S. Enteritidis*, aquest efecte es pot atribuir a una reducció de la invasió del cultiu i a la modulació de la permeabilitat paracel·lular. En els models d'inflamació intestinal, es va estudiar la capacitat del S-βGM per a protegir la funció epitelial de barrera independentment de la seva capacitat per a interaccionar amb *Salmonella*. Per aquesta raó, es varen utilitzar co-cultius de cèl·lules Caco-2

amb macròfags (cèl·lules dTHP1) estimulats amb LPS de *S. Enteritidis* i cultius de cèl·lules Caco-2 estimulats amb TNF α . En aquests models, es va estudiar l'efecte del S- β GM i el d'un probiòtic, *Lactobacillus plantarum*. Els resultats posen de manifest que en cap dels models estudiats, ni el S- β GM ni el probiòtic protegeix la funció epitelial de barrera. En canvi, la combinació d'ambdós reverteix els efectes sobre la funció epitelial de barrera. A més a més, també es va observar que el S- β GM estimula el creixement del *L. plantarum*. Aquests resultats permeten atribuir al S- β GM la capacitat per a interaccionar amb l'epiteli i que té com a resultat la modulació de la secreció de citocines.

Així doncs, el S- β GM, un MOS ric en β GM, té propietats prebiòtiques i exerceix efectes beneficiosos sobre la funció intestinal de barrera que permeten considerar-lo un bon candidat com a alternativa als AGP, ja sigui sol o en combinació amb un probiòtic.

I. INTRODUCCIÓ

1. Tracte gastrointestinal del pollastre

Com altres òrgans del pollastre, el tracte gastrointestinal presenta característiques úniques. A la boca, en lloc de les dents i els músculs pesants de les mandíbules, les aus tenen un bec lleuger. Per realitzar la digestió, els pollastres ingereixen l'aliment sencer que queda retingut al pap (Figura 1). Aquest, es localitza a mitja alçada de l'esòfag, el qual té un diàmetre més gran que el dels mamífers. L'aliment és digerit mecànicament al pedrer, després d'haver passat pel proventricle, òrgan que realitza la funció d'estómac glandular i on se l'hi addiciona àcid clorhídric i pepsina a l'aliment. L'intestí prim de les aus, com el dels mamífers, està dividit en tres seccions: duodè, jejú i ili. Les tres seccions contenen vellositats, més llargues al duodè i més curtes a l'ili (Mitjans et al., 1997). Es considera que el duodè comença al pedrer i compren la zona que queda adherida al pàncrees pel mesenteri formant una nansa en què les dues branques es subdivideixen en duodè proximal i duodè distal. Per poder diferenciar el jejú de l'ili s'utilitza de referència la presència del diverticle de Meckel. La zona on s'acaba l'intestí prim i comença el gruixut s'anomena unió ileo-cecal, zona en què s'uneixen els cecs i s'hi localitzen les tonsil·les cecals, visibles macroscòpicament i que són les concentracions més grans de teixit limfoide intestinal. Els cecs estan separats de l'ili i del còlon per les vàlvules ilio-cecals. Els cecs contenen la quantitat més gran de microbiota de l'animal i la seva funció principal és la fermentació de fibra. Les vellositats del cec proximal estan ben desenvolupades, mentre que al cec distal només hi ha plecs circulars (Sturkie, 2000; Rezaian i Hamedi, 2007).

L'intestí gros, també anomenat recte o còlon, és un òrgan curt que connecta l'intestí prim amb el coprodeu, segment inicial de la cloaca. En les aus, el recte conté vellositats més curtes i un nombre inferior de cèl·lules caliciformes respecte el còlon. La cloaca, la part final del tracte gastrointestinal, és a la vegada la part final del sistema urinari i reproductor de les aus i està dividit en tres segments: el coprodeu, l'urodeu i el proctodeu (Sturkie, 2000).

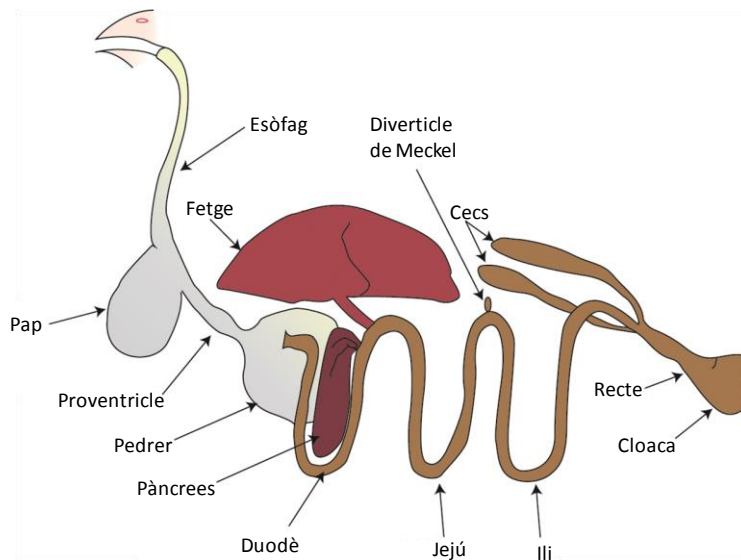


Figura 1. Tracte gastrointestinal de les aus. Adaptat de <http://www.poultryhub.org/tem/>

2. Estructura de la paret de l'intestí prim

L'intestí prim disposa d'una estructura molt especialitzada amb característiques morfològiques i funcionals dirigides a facilitar la digestió dels aliments, l'absorció dels nutrients que en resulten i la protecció davant de tot un seguit d'agents externs potencialment nocius (Deuring et al., 2013). La paret intestinal consta de quatre capes:

- **Serosa.** És la més externa i està formada per teixit connectiu recobert externament per un epitelí simple pla. De la capa serosa se n'origina el mesenteri, suport de vasos sanguinis, vasos limfàtics i fibres nervioses.
- **Muscular.** Està constituïda per una capa interna de múscul en què les fibres estan disposades circularment i una externa amb les fibres en disposició longitudinal.
- **Submucosa.** Està formada per teixit connectiu que conté vasos sanguinis i limfàtics.
- **Mucosa.** Està replegada formant vellositats que en el pollastre incrementen de 12 a 20 vegades la superfície d'absorció disponible (Mitjans et al., 1997). Entre les vellositats hi ha les criptes de Lieberkühn on es produeixen bàsicament processos de secreció i on proliferen les cèl·lules mare de l'epitelí intestinal.

Al seu torn, la mucosa està constituïda per tres capes:

- ***Muscularis mucosae***: capa de fibres de múscul llis que es troba en contacte amb la submucosa i que contribueix al moviment de les vellositats.
- **Làmina pròpia**: capa de teixit connectiu que conté vasos sanguinis i limfàtics i on hi ha nombroses cèl·lules amb funcions immunitàries.
- **Epiteli intestinal**: monocapa de cèl·lules epitelials unides entre si per unions intercel·lulars presents a la membrana lateral i que aïllen el compartiment subepitelial de la llum intestinal. Consta de diferents tipus cel·lulars distribuïts en l'eix cripta-vellositat i especialitzats en el transport vectorial de substàncies i en la funció barrera de l'epiteli:
 - Cèl·lules indiferenciades: són les cèl·lules mare pluripotents que es troben en el fons de les criptes, a partir de les quals se'n deriven totes les altres cèl·lules epitelials per divisió i posterior diferenciació a mida que progressen al llarg de l'eix cripta-vellositat.
 - Enteròcits: és el tipus cel·lular majoritari de l'epiteli intestinal. Són cèl·lules columnars altament polaritzades ja que la membrana apical forma microvil·lis i la proporció de proteïnes i fosfolípids que conté aquesta membrana difereix de la membrana basolateral (Clarke et al., 2000). Els microvil·lis incrementen la superfície d'absorció i constitueixen l'anomenada vora en raspall. La diferent composició dels dos dominis de membrana dona lloc a una distribució heterogènia dels sistemes de transport, dels enzims i dels receptors, així com a una permeabilitat de membrana diferent.
 - Cèl·lules caliciformes: són cèl·lules responsables de la secreció de muc (Figura 2). El percentatge de cèl·lules caliciformes incrementa en sentit aboral, del al duodè fins al còlon (Kim i Ho, 2010; Goto i Kiyono, 2012).

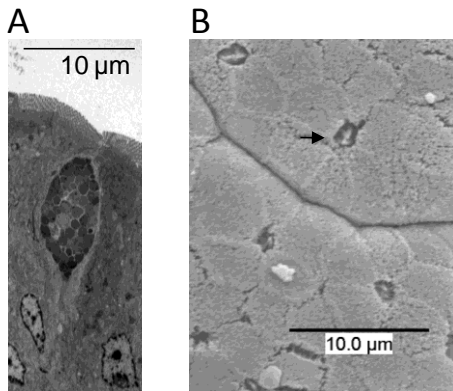


Figura 2. Cèl·lules caliciformes. Imatges obtingudes a l'ili de pollastres de 21 dies d'edat. A, imatge pròpia obtinguda per microscòpia electrònica de transmissió i B, imatge de Brufau et al. (2015), obtinguda per microscòpia electrònica de rastreig. La fletxa senyala una cèl·lula caliciforme.

- Cèl·lules de Paneth: són cèl·lules situades a les criptes que secreten principalment pèptids antimicrobians en resposta a la interacció de bacteris patògens o comensals amb l'epiteli.
- Cèl·lules enteroendocrines: són cèl·lules secretores d'hormones, situades a les criptes i que es diferencien per la morfologia dels grànuls de secreció situats a prop de la membrana basal.
- Cèl·lules M: són cèl·lules que formen part de l'epiteli associat a fol·licle (FAE) que recobreix els fol·licles limfoides i les plaques de Peyer (Kunisawa et al., 2012). Aquestes cèl·lules també es poden trobar disperses a l'epiteli de les vellositats (Goto i Kiyono, 2012). Les cèl·lules M tenen capacitat per transportar antígens macromoleculars i microorganismes des de la llum intestinal fins a les cèl·lules immunitàries subepiteliales. Tot i que el transport per transcitosi ha estat considerat un procés no específic, recentment s'han descrit receptors específics per a patògens, com per exemple GP2, glicoproteïna que reconeix la proteïna FimH de *Salmonella enterica* (Lamichhane et al., 2014; Peterson i Artis, 2014). La principal característica morfològica diferencial d'aquest tipus cel·lular és que els microvil·lis són curts i irregulars (Figura 3). A més a més, la membrana apical té amb un patró de glicosilació diferent a la resta de cèl·lules (Goto i Kiyono, 2012). Aquestes cèl·lules està descrit que també poden procedir d'enteròcits del FAE que, en ser infectats per patògens, per exemple per *Salmonella Typhimurium*, es diferencien a cèl·lules M (Tahoun et al., 2012). Així doncs, es poden considerar dos tipus de cèl·lules M; les que procedeixen de les cèl·lules

indiferenciades, que tarden entre 3 i 4 dies en diferenciar-se, i les que procedeixen d'enteròcits, que poques hores després de l'estímul es converteixen en cèl·lules M (Ohno et al., 2012).

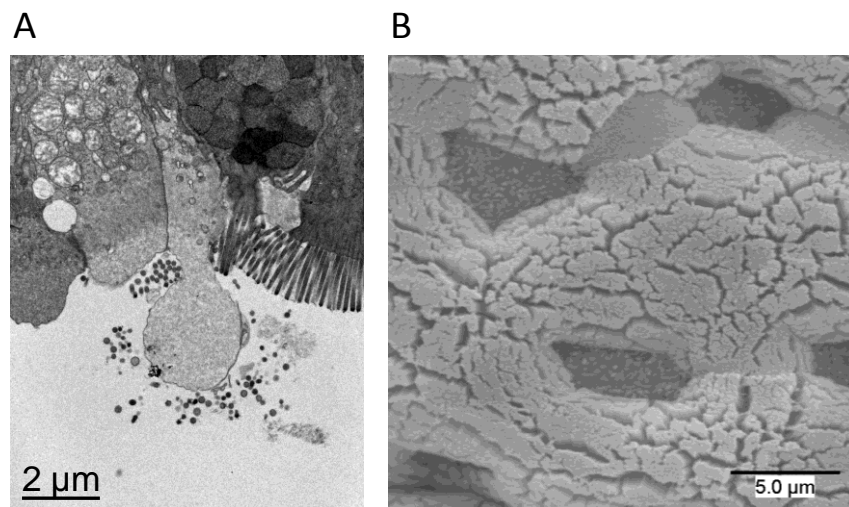


Figura 3. Cèl·lules M. Imatges obtingudes de pollastres de 21 dies d'edat per microscòpia electrònica de transmissió (A, ili) i rastreig (B, tonsil·la cecal). Imatges de Brufau et al. (2015).

3. Funció intestinal de barrera

L'epiteli intestinal està en contacte amb la llum intestinal, el contingut de la qual es considera medi extern. Per això, l'intestí disposa d'un sistema de defensa de vital importància per a l'organisme que s'anomena funció intestinal de barrera. Aquesta barrera està formada principalment per la microbiota, el moc, els compostos antimicrobians, la immunoglobulina A (IgA), la permeabilitat selectiva de l'epiteli intestinal i el sistema immunitari intestinal (Figura 4).

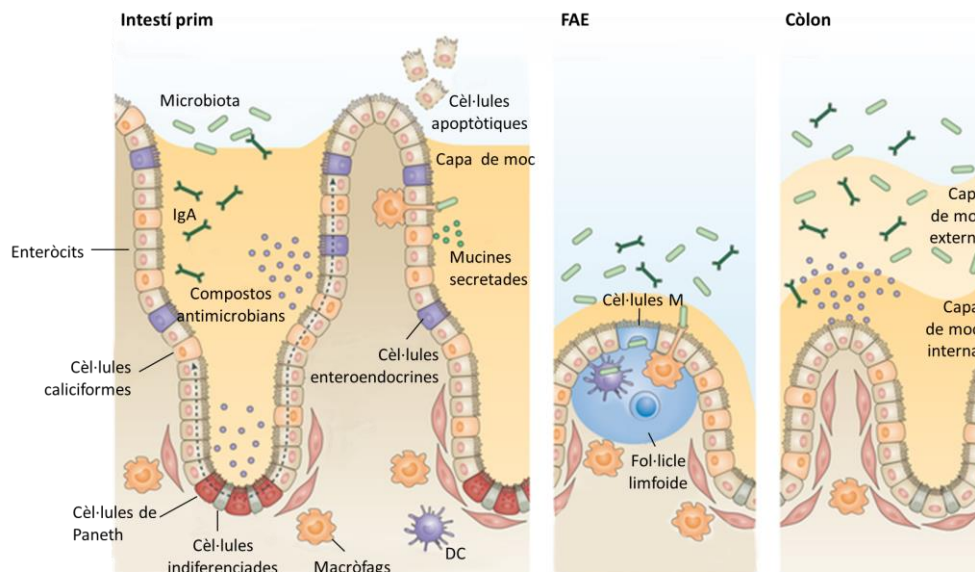


Figura 4. Elements que participen en la funció intestinal de barrera. Adaptat de Peterson i Artis (2014). DC, cèl·lules dendrítiques; FAE, epiteli associat a fol·licle; IgA, immunoglobulina A.

3.1. La microbiota intestinal

Immediatament després de néixer, diferents hàbitats de l'organisme, principalment la pell i el tracte gastrointestinal, són colonitzats majoritàriament per bacteris, així com també per virus, fongs i protozous. Aquestes diferents comunitats formen la microbiota, que supera en nombre les cèl·lules i els gens de l'hoste. La microbiota canvia al llarg del tracte gastrointestinal; poca diversitat i densitat a l'estómac, fins a més de 1000 espècies a l'intestí, essent l'intestí gros la regió on la densitat és més gran.

En el pollastre, així com a l'home, la majoria de les espècies de la microbiota intestinal pertanyen principalment als fílums *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, així com també als fílums *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (Gill et al., 2011; Cénit et al., 2014; Fung et al., 2014; Power et al., 2014; Walsh et al., 2014; Suárez, 2015; Bäumlér i Sperandio, 2016; Han et al., 2016; Mancabelli et al., 2016; Wang et al., 2016). En aquesta espècie animal, la composició de la microbiota difereix al llarg del tracte gastrointestinal. Així, el gènere *Bacillus* predomina al pap, el gènere *Prevotella* a l'ili i els gèneres *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Akkermansia* als cecs. Els gèneres *Lactobacillus* i *Streptococcus* estan presents en tot el tracte gastrointestinal, essent minoritaris en els cecs. Finalment, el gènere *Bacteroides* incrementa la seva proporció en sentit aboral (Pourabedin i

Zhao, 2015; Han et al., 2016). A més a més, la composició de la microbiota i la seva funció metabòlica depèn de diferents factors, com l'edat de l'individu, l'ús d'antibiòtics, certes malalties i la dieta (Flint et al., 2012; Power et al., 2014; Walsh et al., 2014; De Santis et al., 2015; Flint et al., 2015). La microbiota intestinal té una relació sinèrgica amb l'hoste, ja que li aporta els següents beneficis (Schauer, 1997; Cerf-Bensussan et al., 2010; Gill et al., 2011; Flint et al., 2012; Cénit et al., 2014; Goodarzi Boroojeni et al., 2014; Power et al., 2014; Walsh et al., 2014; De Santis et al., 2015; Flint et al., 2015; Giorgetti et al., 2015; Levast et al., 2015; Suárez, 2015) (Figura 5):

- són una font de nutrients essencials com vitamines i aminoàcids en digerir components de la dieta,
- generen àcids grassos de cadena curta (àcid butíric, acètic i propiònic) que, en disminuir el pH de la llum intestinal, inhibeixen el creixement de patògens. A la vegada, són una font d'energia per als enteròcits, com és el cas de l'àcid butíric, i neutralitzen els grups amoni generats per la desaminació dels aminoàcids i d'altres nutrients,
- competeixen amb els patògens per l'espai i els nutrients,
- modulen els altres components de la funció intestinal de barrera ja que estimulen la producció de moc i de compostos antimicrobians, regulen la permeabilitat paracel·lular i modulen el sistema immunitari.

En els darrers anys, ha crescut molt l'interès en el coneixement dels mecanismes pels quals la microbiota exerceix un efecte beneficiós per a l'hoste, així com també en el coneixement dels factors que modulen la seva composició. En aquest sentit, cal remarcar la importància de les intervencions nutricionals. En el pollastre, s'ha demostrat que la composició de la dieta, tant en ingredients (per exemple, el tipus de cereal) com en additius (enzims, probiòtics o prebiòtics, entre d'altres) (Pan i Yu, 2014; Han et al., 2016; Mancabelli et al., 2016), indueixen canvis en la microbiota que comporten un increment del pes corporal, una millora de l'índex de conversió del pinso així com una reducció de la mortalitat (Roto et al., 2015).

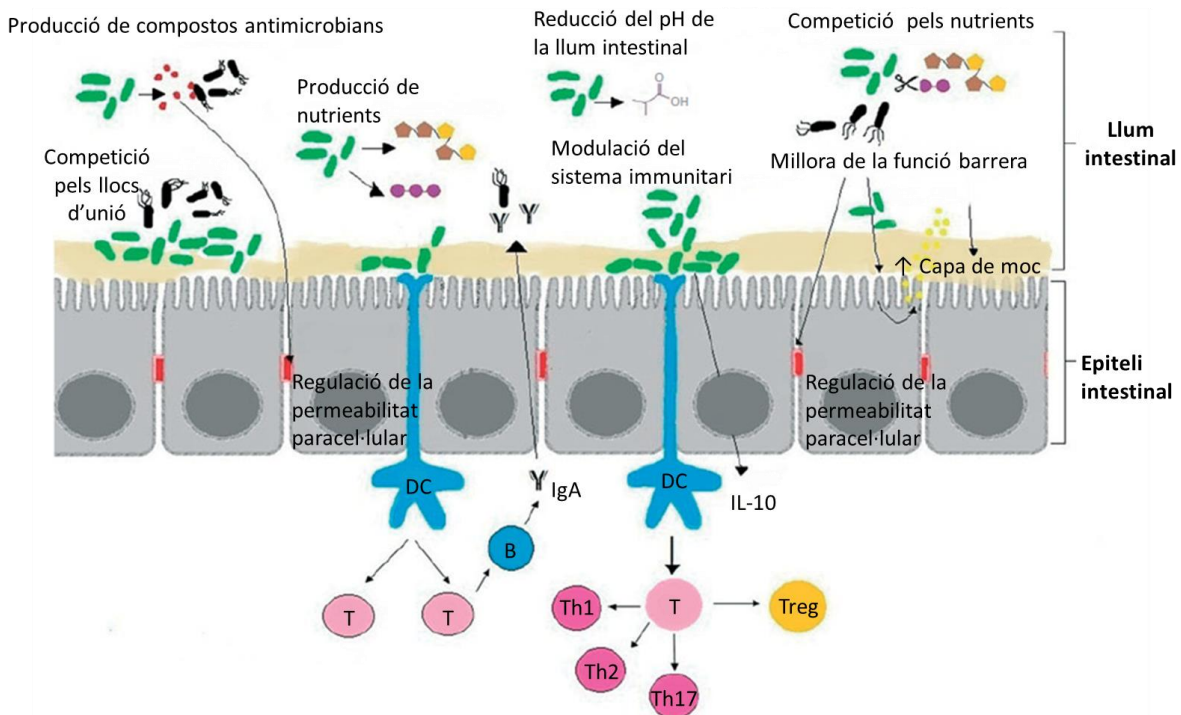


Figura 5. Mecanismes implicats en els efectes beneficiosos de la microbiota. Adaptat de Power et al. (2014). B, limfòcits B; DC, Cèl·lula dendrítica; IgA, immunoglobulina A; IL-10, interleucina 10; T, limfòcits T, Th, limfòcits T efectors, Treg, limfòcits T reguladors.

3.2. El moc

El component majoritari del moc són les mucines, que determinen les propietats biofísiques i bioquímiques de la capa de moc segons els requeriments fisiològics (Corfield, 2015). Les mucines són polipèptids glicosilats flexibles que es diferencien en mucines associades a la membrana i en mucines secretades per les cèl·lules caliciformes, que al seu torn, poden ser no formadores de gels i formadores de gels (Lindel et al., 2008; Kim i Ho, 2010; McGuckin et al., 2011; Johansson et al., 2013) (Figura 6).

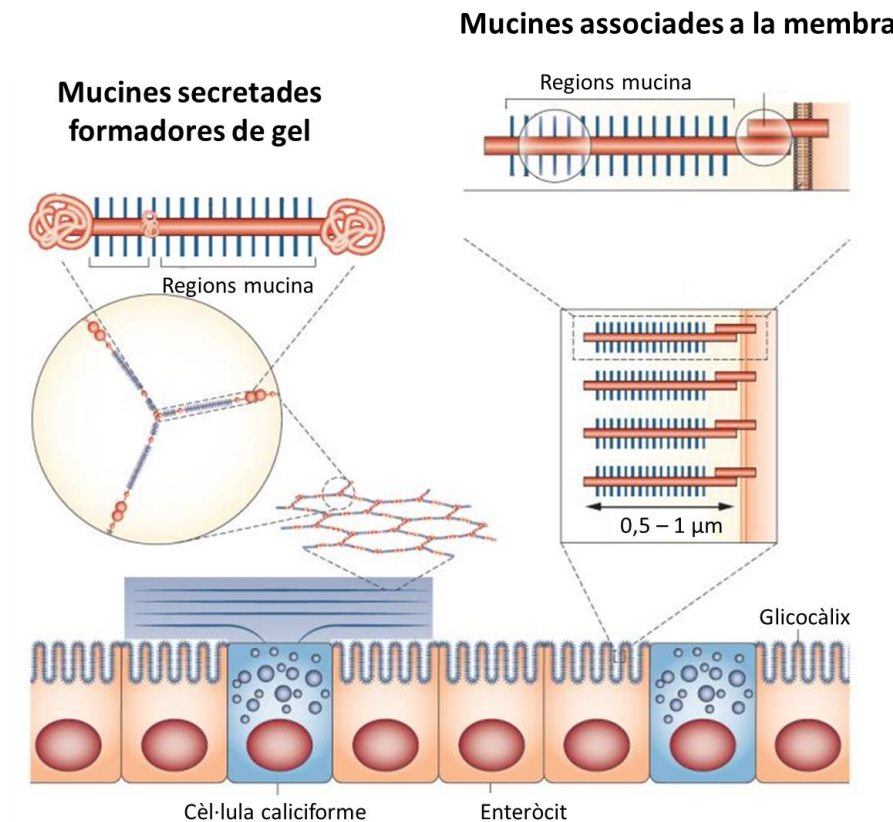


Figura 6. Estructura de les mucines secretades formadores de gel i de les mucines associades a la membrana. Adaptat de Johansson et al. (2013).

Les mucines associades a la membrana estan presents a la membrana apical de les cèl·lules epitelials i contribueixen a la formació del glicocàlix (Corfield, 2015). El glicocàlix dels enteròcits (Figura 7) és una zona rica en carbohidrats i està formada majoritàriament per les mucines MUC3, MUC12 i MUC17 (Johansson et al., 2013; Pelaseyed et al., 2014). La regió citoplasmàtica d'aquestes mucines interacciona amb el citoesquelet dels enteròcits (Pelaseyed et al., 2014), mentre que la regió extracel·lular conté oligosacàrids que són el lloc d'unió als bacteris (Lindel et al., 2008; McGuckin et al., 2011). El glicocàlix limita l'accés de molècules de gran pes molecular a la membrana apical i és el punt d'ancoratge d'enzims digestius.

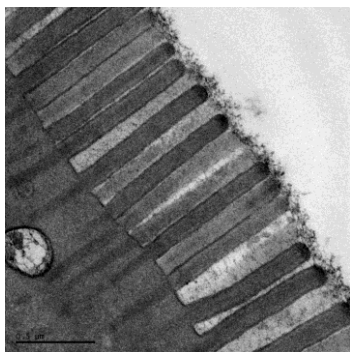


Figura 7. Glicocàlix. Imatge pròpia d'un enteròcit de l'ili d'un pollastre de 21 dies d'edat obtinguda per microscòpia electrònica de transmissió.

Les mucines secretades per les cèl·lules caliciformes que tenen més rellevància en la funció intestinal de barrera són les formadores de gels. Aquestes mucines contenen regions C- i N-terminals implicades en la polimerització (Lindel et al., 2008; McGuckin et al., 2011; Johansson et al., 2013), procés que confereix la viscositat i la consistència de gel característica del moc (Lindel et al., 2008; McGuckin et al., 2011; Johansson et al., 2013). A l'intestí prim, la mucina secretada formadora de gel majoritària és MUC2 (Lindel et al., 2008; Kim i Ho, 2010; McGuckin et al., 2011; Johansson et al., 2013).

La capa de moc cobreix íntegrament l'epiteli intestinal i conté, a més de les mucines, altres molècules bioactives de procedència molt diversa. La composició d'aquesta capa pot ser modulada pel contingut intestinal i per factors neuronals, endocrins i immunitaris (McGuckin et al., 2011). La presència de moc facilita la progressió del quim, protegeix l'epiteli de l'activitat d'enzims digestius i dificulta l'adhesió de patògens a l'epiteli (Gill et al., 2011; Giorgetti et al., 2015). A l'intestí prim, la capa de moc no està adherida a les cèl·lules epitelials i és penetrable per bacteris amb flagel. Al FAE, la capa de moc és més prima ja que és la zona de l'epiteli implicada en el reconeixement de bacteris. En canvi, a l'estomac i al còlon es distingeixen dues capes de moc, una interna més densa i una externa més laxa (Johansson et al., 2013; Pelaseyed et al., 2014) (Figura 4). L'externa té les propietats de la capa de moc que recobreix l'intestí prim i és l'hàbitat de la microbiota. L'interna està fermament adherida a les cèl·lules epitelials, és renovada constantment cada una o dues hores i la composició en MUC2 fa que sigui molt difícil de penetrar pels bacteris. De totes maneres, s'ha descrit que en els processos inflamatoris intestinals aquesta capa de moc interna del còlon és penetrable als bacteris (Pelaseyed et al., 2014).

3.3. Compostos antimicrobians

Els compostos antimicrobians són secretats majoritàriament per les cèl·lules de Paneth, i queden retinguts a la capa de moc. La seva funció és controlar el creixement dels bacteris comensals i patògens (Goto i Kiyono, 2012).

3.4. IgA

L'IgA, secretada pels limfòcits B de làmina pròpia, interacciona amb el receptor d'Ig polimèriques (pIgR) expressat a la membrana basolateral dels enteròcits (Gill et al., 2011; Fung et al., 2014). Un cop s'ha unit a pIgR, es forma un complex que és transportat per transcitosi cap a la llum intestinal, on queda retingut a la capa de moc. Aquest complex neutralitza toxines i fixa bacteris a la capa de moc de manera que limita l'accés de patògens a la superfície epitelial (Suzuki et al., 2010; Salim i Söderholm, 2011). A més a més, té capacitat per neutralitzar compostos amb activitat proinflamatòria (Salim i Söderholm, 2011; Kinnebrew i Pamer, 2012; Santaolalla i Abreu, 2012).

3.5. Permeabilitat de l'epiteli intestinal

L'epiteli intestinal regula la permeabilitat selectivament per dues vies. La via transcel·lular, associada a la difusió simple i al transport mediat de nutrients a través de la membrana apical i basolateral, i la via paracel·lular, associada a la difusió per l'espai intercel·lular (Clarke et al., 2000; Salim i Söderholm, 2011; De Santis et al., 2015). A l'epiteli intestinal hi ha cinc tipus d'unions intercel·lulars: unions estretes, unions adherents, unions de comunicació, desmosomes i hemidesmosomes (Figura 8). Les unions estretes, les unions més apicals, determinen la permeabilitat paracel·lular i contribueixen al manteniment de la polaritat cel·lular. La permeabilitat paracel·lular es pot veure afectada per l'acció de citocines, quimiocines, espècies reactives d'oxigen (ROS), bacteris patògens, hormones i drogues, entre d'altres factors (Harhaj i Antonetti, 2004; De Santis et al., 2015).

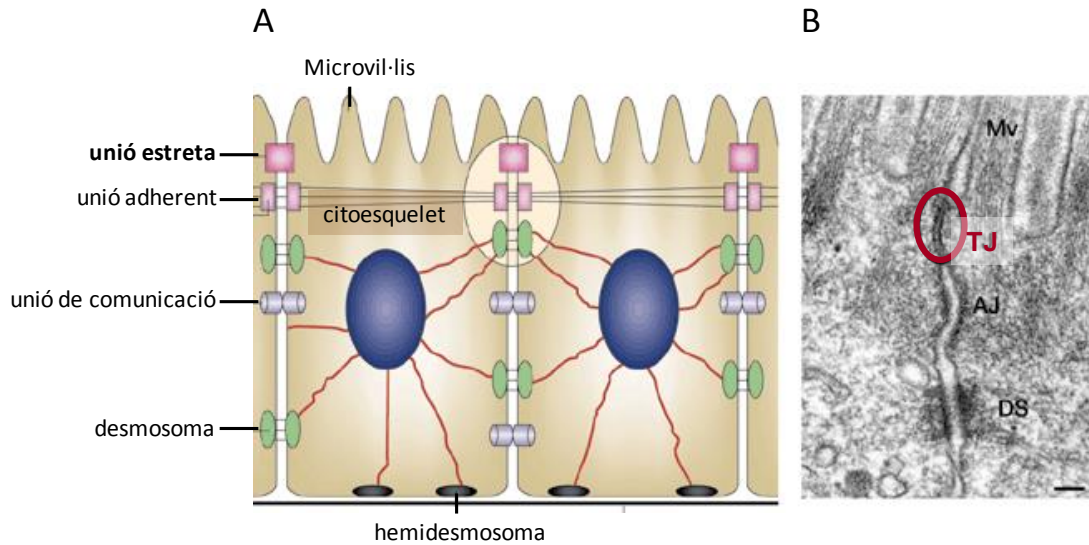


Figura 8. Unions intercel·lulars de l'epiteli intestinal. Esquema de la localització de les diferents unions intercel·lulars (A) i imatge de microscòpia electrònica de transmissions de les unions intercel·lulars (B). Adaptat de Tsukita et al. (2001). AJ, unió adherent; DS, desmosoma; Mv, microvil·li; TJ, unió estreta.

3.5.1. Estructura de la unió estreta

Les unions estretes estan formades per proteïnes transmembrana [occludina, família de les claudines, família de les *junctional adhesion molecules* (JAM) i tricel·lulina], proteïnes citoplasmàtiques estructurals [família *zonula occludens* (ZO), afadina (AF6) i cingulina] i proteïnes citoplasmàtiques reguladores (Miyoshi i Takai, 2008; Salim i Söderholm, 2011; Barreau i Hugot, 2014; De Santis et al., 2015) (Figura 9). La interacció de les proteïnes de la unió estreta amb l'actina del citoesquelet també exerceix un paper important en la regulació de la via paracel·lular, fonamentalment per la contracció de l'anell subapical d'actina a través de l'acció de la miosina.

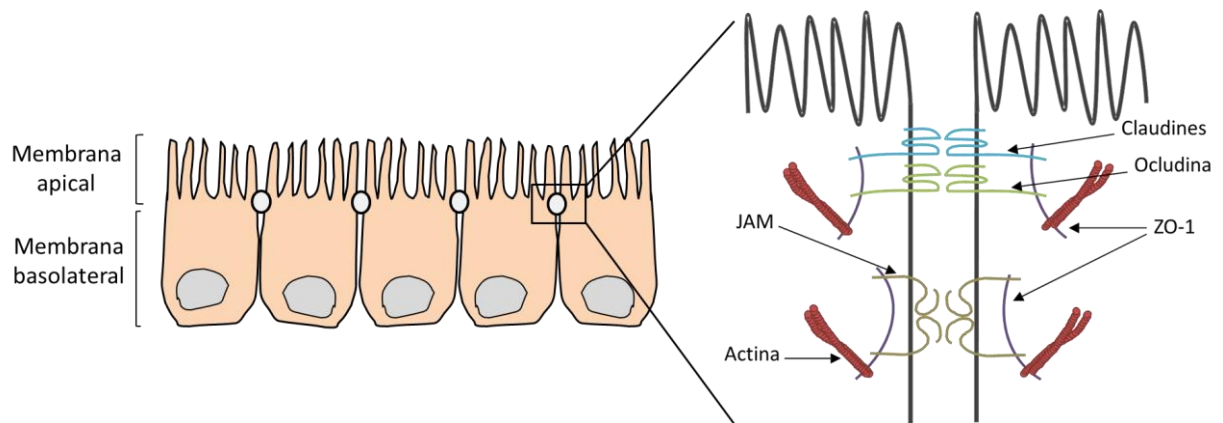


Figura 9. Esquema de la unió estreta. Localització de la unió estreta a la cèl·lula i en detall, les proteïnes transmembrana, la ZO-1 i l'actina del citoesquelet. JAM, *Junctional Adhesion Molecules*; ZO-1, *Zonula Occludens-1*.

3.5.1.1. Proteïnes transmembrana

3.5.1.1.1. Ocludina

L'occludina va ser la primera proteïna de la unió estreta identificada. És una proteïna amb quatre regions transmembrana, dues nanses extracel·lulars, una nansa intracel·lular i les regions N- i C-terminal, citoplasmàtiques (Figura 10). La regió C-terminal interacciona amb les proteïnes de la família ZO (Suzuki, 2013).

3.5.1.1.2. Família de les claudines

Les claudines, una família de 24 membres (Suzuki, 2013), són proteïnes transmembrana amb una estructura similar a l'occludina (Figura 10). De la mateixa manera, la regió C-terminal interacciona amb les proteïnes de la família ZO. Les nanses extracel·lulars formen interaccions homofíliques o heterofíliques entre cèl·lules adjacents i són crítiques per a la formació de canals selectius per a ions (Shen et al., 2011; Ulluwishewa et al., 2011; Lee, 2015). Cada membre de la família té un patró d'expressió diferent dependent del teixit. Així, a l'intestí s'expressen les claudines -1, -3, -4, -5, -8, -9, -11 i -14, implicades en la funció barrera ja que disminueixen la permeabilitat paracel·lular, i les claudines -2, -7, -12 i -15, formadores de canals iònics i que, per tant, incrementen la permeabilitat paracel·lular (Suzuki, 2013).

3.5.1.1.3. Família JAM

La família de les JAM són proteïnes amb una regió transmembrana, la regió N-terminal extracel·lular i la C-terminal citoplasmàtica que s'uneix fonamentalment a les proteïnes de la família ZO (Figura 10). L'expressió de les proteïnes JAM no és igual en tots els teixit (Harhaj i Antonetti, 2004; Groschwitz i Hogan, 2009; Suzuki, 2013) i està descrit que a l'epiteli intestinal s'expressen JAM-A, JAM-4 i CAR (Suzuki, 2013).

3.5.1.1.4. Tricel·lulina

La tricel·lulina és una proteïna amb estructura similar a l'occludina i les claudines (Figura 10). La regió C-terminal s'uneix fonamentalment a les proteïnes de la família ZO (Assimakopoulos et al., 2011; Suzuki, 2013; Van Itallie i Anderson, 2014). Aquesta proteïna es localitza principalment a unions on convergeixen tres cèl·lules epitelials (Suzuki, 2013).

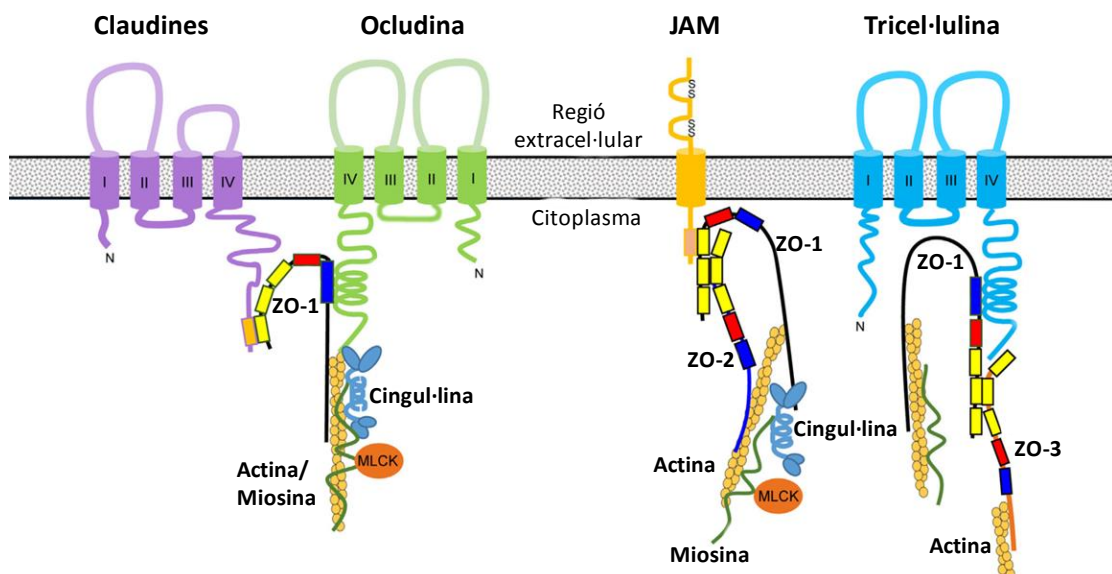


Figura 10. Proteïnes transmembrana de la unió estreta. Esquema de les proteïnes transmembrana, de les proteïnes citoplasmàtiques de la unió estreta i de l'actina del citoesquelet. Adaptat de Robinson et al. (2015). JAM, *Junctional Adhesion Molecules*; MLCK, cinasa de la cadena lleugera de miosina; ZO, *Zonula Occludens*.

3.5.1.2. Proteïnes citoplasmàtiques estructurals

El domini intracel·lular de les proteïnes transmembrana interacciona amb les proteïnes citoplasmàtiques estructurals que actuen d'ancoratge de les fibres d'actina del citoesquelet.

3.5.1.3.1. Família ZO

Les proteïnes de la família ZO formen part de la família de proteïnes *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK) (Harhaj i Antonetti, 2004; Groschwitz i Hogan, 2009; Bauer et al., 2010; Suzuki, 2013). Fins al moment, s'han descrit tres isoformes: ZO-1, -2 i -3. Aquestes proteïnes s'uneixen a les proteïnes transmembrana per la regió N-terminal i a l'actina del citoesquelet per la regió C-terminal. La regió N-terminal conté tres regions *Post-synaptic density 95/Drosophila discs large/ZO-1* (PDZ), una regió *Scr Homology 3* (SH3) i una regió homòloga a guanilat cinasa (GUK) (Harhaj i Antonetti, 2004; Groschwitz i Hogan, 2009; Bauer et al., 2010; Suzuki, 2013; Torres-Flores i Arias, 2015) (Figura 11). Cadascuna d'aquestes regions s'uneix a altres proteïnes de la unió estreta. Per exemple, la ZO-1 s'uneix a les claudines per la primera regió PDZ, a les altres proteïnes de la família ZO per la segona regió PDZ, a la proteïna JAM-A per la tercera regió PDZ i a l'occludina per la regió GUK (Suzuki, 2013). La interacció de les proteïnes de la família ZO amb les proteïnes transmembrana, l'actina del citoesquelet i una gran varietat de proteïnes cel·lulars és crucial per a la formació, organització i funció de les unions estretes i les implica, a la vegada, en la diferenciació cel·lular (Bauer et al., 2010; Harhaj i Antonetti, 2004).

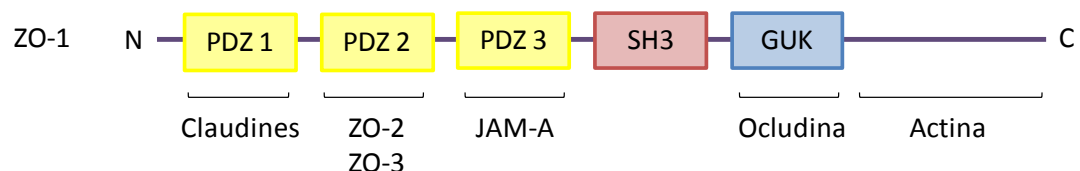


Figura 11. Estructura de la ZO-1. Esquema de les diferents regions estructurals de la proteïna citoplasmàtica ZO-1 on s'indica les proteïnes a les que s'uneix cadascuna de les regions. Adaptat de Suzuki (2013). GUK, guanilat cinasa; JAM, *Junctional Adhesion Molecules*; PDZ, *Post-synaptic density 95/Drosophila discs large/ZO-1*; SH3; *Scr Homology 3*; ZO, *Zonula Occludens*.

3.5.1.3.2. AF6

L'afadina és una proteïna citoplasmàtica que també conté regions PDZ i es localitza tant a les unions estretes com a les unions adherents. Aquesta proteïna interacciona amb la JAM-A i amb els filaments d'actina (Van Itallie i Anderson, 2014).

3.5.1.3.3. Cingul·lina

La cingul·lina és una proteïna citoplasmàtica en la que la regió N-terminal forma una gran estructura globular, mentre que la regió C-terminal forma una estructura globular més petita. Tot i que està descrit que interacciona directament o indirecta amb altres proteïnes de la unió estreta, la seva funció no ha estat identificada (Suzuki, 2013).

3.5.1.3. Proteïnes citoplasmàtiques reguladores

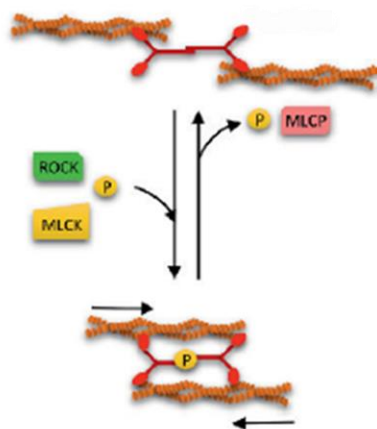
Les proteïnes citoplasmàtiques reguladores són proteïnes de senyalització que regulen l'acoblament, desacoblament i manteniment de les proteïnes de la unió estreta, així com les interaccions amb l'actina del citoesquelet. Aquesta funció reguladora pot ser directa o indirecta.

La regulació directa consisteix en modificar l'estat de fosforilació de les proteïnes de la unió estreta per acció de diferents isoformes de la proteïna cinasa C (PKC) o de la proteïna cinasa activada per mitògens (MAPK) (Harhaj i Antonetti, 2004; Farhadi et al., 2006; Groschwitz i Hogan, 2009; Corr et al., 2013; Suzuki, 2013; Torres-Flores i Arias, 2015).

La regulació indirecta consisteix en modular la funcionalitat de la unió estreta a través de la contracció de l'actina del citoesquelet, per acció de la cinasa de la cadena lleugera de miosina (MLCK) i de les proteïnes de la família Rho (Harhaj i Antonetti, 2004; Miyoshi i Takai, 2008; Torres-Flores i Arias, 2015). La MLCK fosforila la cadena lleugera de miosina (MLC) (Cunningham i Turner, 2012; Lee, 2015) i la interacció de la miosina fosforilada amb l'actina del citoesquelet provoca la contracció de l'anell generant-se una tensió que obre la via paracel·lular (Figura 12). Diferents estímuls extracel·lulars, com citocines i bacteris, poden regular l'acció de MLCK (Ulluwishewa et al., 2011). D'altra banda, la regulació de la permeabilitat paracel·lular per acció de la família Rho és molt complexa ja que cada membre de la família té múltiples proteïnes diana que afecten la dinàmica i l'organització de l'actina (Ulluwishewa et al.,

2011; Lee, 2015). Aquesta família inclou GTPases monomèriques (Cdc42, Rac i Rho) que actuen com a dispositius moleculars que controlen processos cel·lulars i alternen una forma activa unida a trifosfat de guanosina (GTP) i una forma inactiva unida a difosfat de guanosina (GDP). Així l'activació de Cdc42 indueix la polimerització de l'actina i el seu empaquetament, formant fil·lipodis. L'activació de Rac indueix la polimerització de l'actina en aquest cas, en la perifèria cel·lular formant lamel·lipodis o plecs de la membrana. Finalment, Rho afavoreix l'empaquetament dels filaments d'actina amb els de miosina II (Alberts et al., 2004).

Proteïnes del citoesquelet relaxades



Proteïnes del citoesquelet contractes

Figura 12. Fosforilació de les proteïnes del citoesquelet.

Esquema de la fosforilació de les proteïnes del citoesquelet per acció de la cinasa de la cadena lleugera de miosina (MLCK) i de la cinasa associada a proteïnes de la família Rho (ROCK). Adaptat de García-Ponce et al. (2015).

3.5.2. Selectivitat de la via paracel·lular

S'han descrit dues rutes de difusió a través de les unions estretes: la *leak pathway* que és una via de baixa capacitat que permet el pas de molècules d'elevat pes molecular [proteïnes, LPS (lipopolisacàrid) bacterians, etc] i la *pore pathway*, via d'alta capacitat que permet el pas de molècules de radi inferior a 0,4 nm, fonamentalment ions de baix pes molecular (Turner, 2009; Shen et al., 2011; Turner et al., 2014; De Santis et al., 2015) (Figura 13). L'expressió diferencial de les proteïnes de la unió estreta és un factor determinant de la permeabilitat d'aquestes dues vies. Així, fins al moment s'ha descrit que l'occludina i la ZO-1 determinen la funcionalitat de la *leak pathway* i les claudines són responsables de la selectivitat iònica i modulen la *pore pathway* (Al-Sadi et al., 2011; Shen et al., 2011; Turner et al, 2014). A l'apartat 5 (Capítol de llibre 1) s'inclou una revisió de l'estructura, la regulació i la selectivitat de la via paracel·lular.

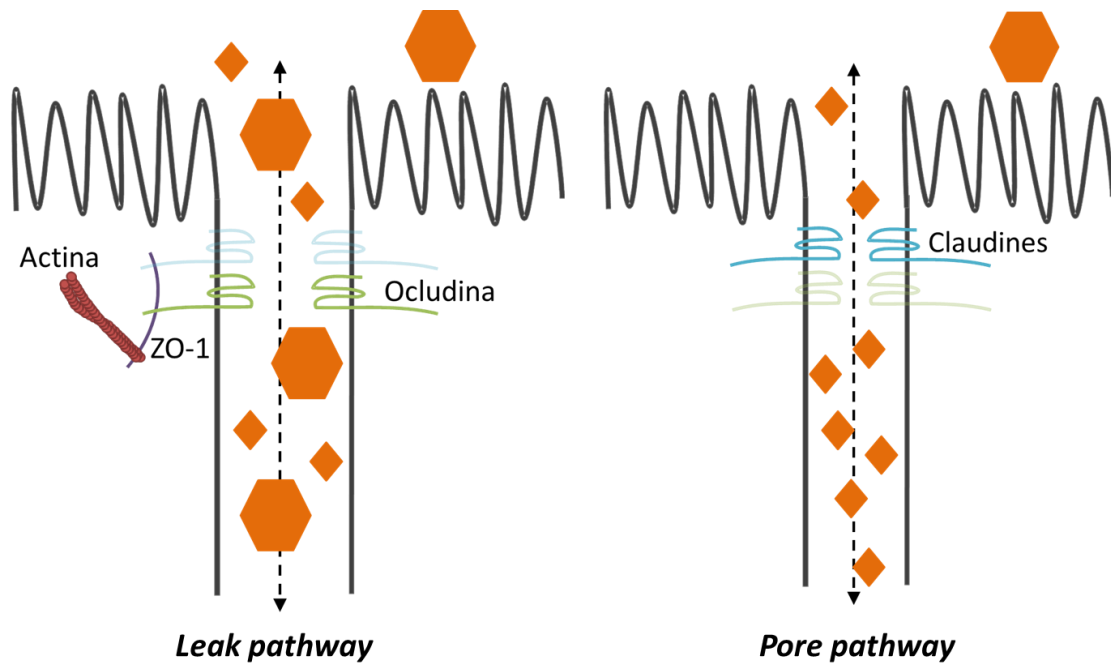


Figura 13. Selectivitat de la via paracel·lular. Esquema de les dues vies de difusió a través de la unió estreta, així com de les proteïnes que les regulen. ZO-1; *Zonula Occludens-1*.

3.6. Sistema immunitari intestinal

El sistema immunitari intestinal es localitza en regions que reben el nom de teixit limfoide associat a l'intestí (GALT). Anatòmicament, el GALT inclou compartiments organitzats i difusos. Els compartiments organitzats inclouen les plaques de Peyer, els fol·licles limfoides aïllats (ILF) i els ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) i se'ls considera les regions inductores de la resposta immunitària. Les plaques de Peyer són concentracions ovals de teixit limfàtic que no estan delimitades per una càpsula i es localitzen disperses en la làmina pròpia de la mucosa intestinal. Aquestes estructures es desenvolupen en el fetus. En canvi, els ILF es desenvolupen un cop l'intestí ha estat colonitzat per la microbiota intestinal i són estructures més petites que les plaques de Peyer (Suzuki et al., 2010). Els compartiments difusos inclouen els limfòcits intraepiteliais (IEL) i les cèl·lules immunitàries de la làmina pròpia i se'ls considera les regions efectores de la resposta immunitària (Ramiro-Puig et al., 2008; Kunisawa et al., 2012; Lamichhane et al., 2014).

En el pollastre, el GALT es presenta com a agregats de cèl·lules limfoides o bé com a fol·licles limfoides o amígdals, dependent de la ubicació. Des de la part proximal fins a la part distal, el tub digestiu del pollastre conté: una amígdala

faríngia, teixit difús a l'esòfag, una amígdala pilòrica, plaques de Peyer, el diverticle de Meckel, dues tonsil·les cecals, teixit difús limfoide en el recte, la bossa de Fabrici i teixit limfoide difús a la paret del proctodeu (Casteleyn et al., 2010). A l'epiteli de les tonsil·les cecals és molt ric en cèl·lules M disperses entre cèl·lules epitelials (Sturkie, 2000; Rezaian i Hamedi, 2007).

3.5.3. Resposta immunitària

La resposta immunitària constitueix un mecanisme de defensa essencial en l'individu en la que, de forma coordinada, actuen la resposta innata i l'adquirida.

3.6.1.1. Resposta innata

La resposta immunitària innata inclou els mecanismes inespecífics de defensa de l'organisme davant de qualsevol agent estrany. A més a més, aquesta resposta es caracteritza per ser immediata i per l'absència de memòria (la resposta no incrementa per exposicions repetides al mateix agent).

3.6.1.1.1. Reconeixement de patògens

Les cèl·lules epitelials i les cèl·lules immunitàries poden identificar específicament patrons moleculars associats a patògens (PAMP) per mitjà de receptors específics de patrons (PRR) presents a la membrana (Figura 14). Aquest reconeixement activa la resposta innata. Els PRR es classifiquen en quatre grups: els receptors tipus *Toll* (TLR), *C-type Lectin Receptors* (CLR), *Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors* (NLR) i *Retinoic acid-Inducible (RIG)-I-Like Receptors* (RLR) (Abreu, 2010; Netea i Van der Meer, 2011; Wells et al., 2011; Newton i Dixit, 2012; Santaolalla i Abreu, 2012).

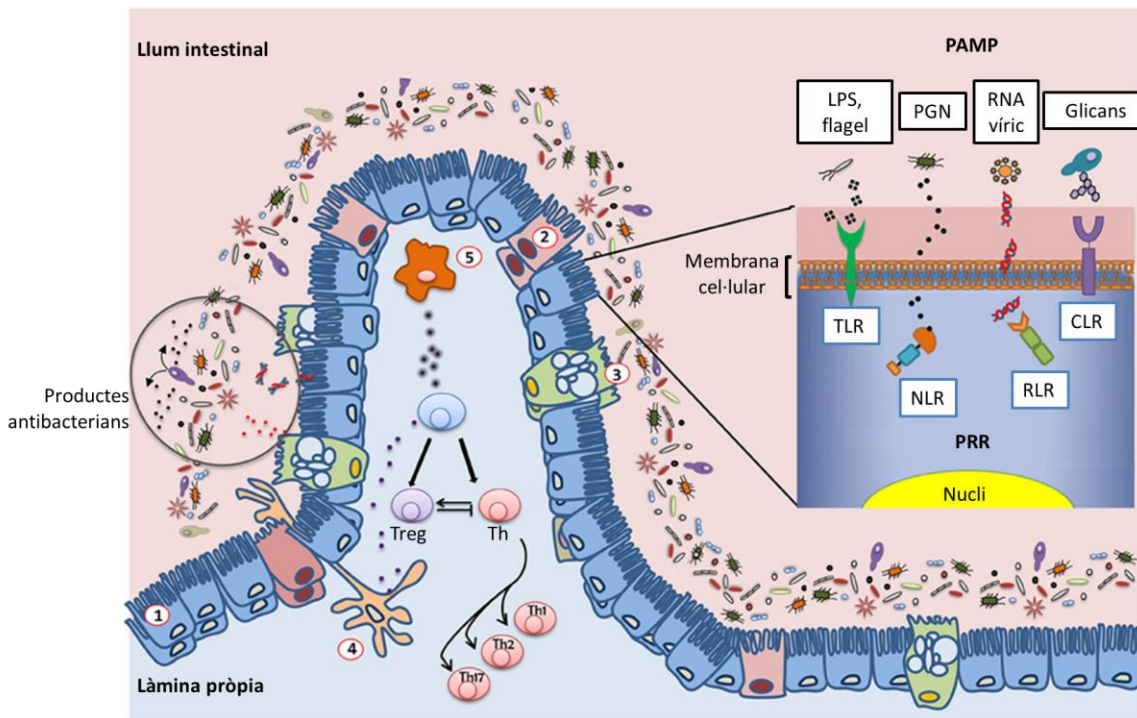


Figura 14. Reconeixement de patògens. Els números identifiquen els diferents tipus cel·lulars: 1) Enteròcits, 2) Cèl·lules M, 3) Cèl·lules caliciformes, 4) DC i 5) Macròfags. Adaptat de Hevia et al. (2015). CLR, *C-type Lectin Receptors*; DC, Cèl·lula dendrítica; LPS, lipopolisacàrid; NLR, *Nucleotide oligomerization domain-Like Receptor*; PAMP, patrons moleculars associats a patògens; PGN, peptidoglicà; PRR, receptors específics de patrons; RLR, *Retinoic acid-inducible-1-Like Receptors*; Th, limfòcits T efectors; TLR, receptors tipus *Toll*; Treg, limfòcits T reguladors.

3.6.1.1.1. TLR

Els TLR es localitzen a la superfície cel·lular o en compartiments endosomals. En general, aquets receptors reconeixen peptidoglicà (PGN), RNA viral, LPS, flagels i ADN bacterià. Tant a l'home com al pollastre, se n'han descrit 13 (Wells et al., 2011; Newton i Dixit, 2012), dels quals 11 són similars entre ambdues espècies (TLR1-TLR11) i dos són exclusius per al pollastre (TLR15 i TLR21) (Wu i Kaiser, 2011). D'aquests receptors, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 i TLR9 s'expressen a l'intestí (Gill et al., 2011) (Taula 1). La localització estratègica d'aquests receptors a l'eix cripta-vellositat és un factor important que evita la hiperreactivitat en front de la microbiota (Yu i Gao, 2015). Així, a les criptes, les cèl·lules expressen una elevada diversitat de receptors a la membrana ja que és una zona de difícil accés per la microbiota intestinal. En canvi a la resta de la vellositat s'expressa TLR2 i TLR4 però en poca quantitat (Kelly et al., 2005) (Figura 15). La localització a la cèl·lula epitelial també és estratègica ja que es poden expressar de manera

diferencial a la membrana apical, sobretot al FAE, o bé a la membrana basolateral, on l'estimulació requereix una invasió de l'epiteli. L'activació dels TLR inicia una cascada de reaccions que comporta la conseqüent estimulació de la producció de citocines i altres mediadors (Takeda i Akira, 2004; Giorgetti et al., 2015; Onyiah i Colgan, 2016).

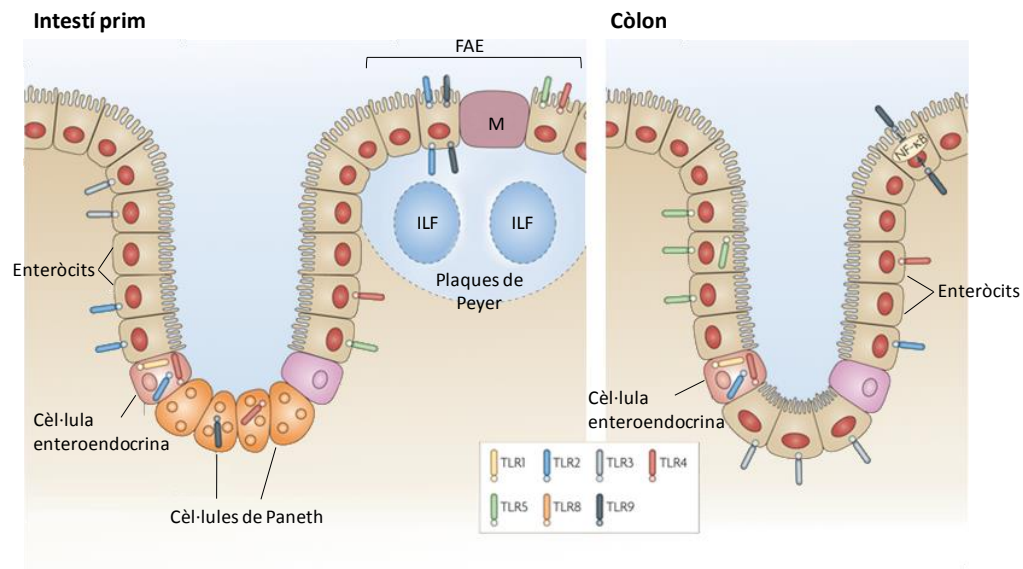


Figura 15. Localització dels diferents TLR en les cèl·lules de l'intestí prim i del còlon. Adaptat de Abreu (2010). FAE, epiteli associat a fol·licle; ILF, fol·licles limfoides aïllats; TLR, receptors tipus *Toll*.

3.6.1.1.1.2. CLR

Els CLR són una família de proteïnes que, en general, reconeixen glicans presents a la superfície dels patògens (majoritàriament mannososa, fucosa i glucans) (Geijtenbeek i Gringhuis, 2009; Gill et al., 2011; Hoving et al., 2014). D'aquests receptors, se n'han descrit de solubles i de transmembrana, essent aquests últims els que actuen com a PRR. Es poden diferenciar dues subfamílies de receptors transmembrana presents majoritàriament en cèl·lules dendrítiques (DC) i macròfags: els receptors de mannososa (com per exemple el CD206) i els receptors de la família de sialoglicoproteïnes (glicoproteïnes que contenen una elevada proporció d'àcid siàlic, com per exemple DC-SIGN) (Gazi i Martinez-Pomares, 2009; Geijtenbeek i Gringhuis, 2009; Gill et al., 2011; Martinez-Pomares, 2012; Hoving et al., 2014) (Taula 1).

3.6.1.1.1.3. NLR

Els NLR es localitzen al citoplasma i són la família de PRR més extensa. Els més estudiats són NOD1 i NOD2 (Gill et al., 2011). Reconeixen components de la paret bacteriana i RNA víric (de Geus i Vervelde, 2013). NOD1 s'expressa en tots els teixits, en canvi NOD2 només s'expressa en macròfags, DC i cèl·lules del epitelí intestinal i pulmonar (de Geus i Vervelde, 2013) (Taula 1).

3.6.1.1.1.4. RLR

Els RLR detecten cadenes dobles d'RNA víric al citoplasma i s'expressen en tots els teixits de l'organisme (Gill et al., 2011). A l'home, els més ben caracteritzats són RIG-I i MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) (Taula 1). En canvi, en pollastres no s'expressa RIG-1, el que els fa més susceptibles a infeccions víriques (de Geus i Vervelde, 2013).

Taula 1. PRR presents a l'epitelí intestinal. Adaptat de Wells et al. (2011).

PRR	Localització a la cèl·lula	PAMP	Patogen
TLR2	Superfície	Àcid lipoteicoic (LTA) Lipoproteïnes/ Lipopèptids Proteïna hemoalgotinin Glicosilfosfatidilinositol	Bacteris grampositiu Varis Virus Paràsits
TLR2/1	Superfície	Triacil lipopèptids	Bacteris i micobacteris
TLR2/6	Superfície	Diacil lipopèptids Zymosan	Micobacteris Fongs
TLR3	Compartiments endosomals	dsRNA	Virus
TLR4	Superfície	LPS Proteïnes envoltants Glicosilfosfatidilinositol	Bacteris gramnegatiu Virus Paràsits
TLR5	Superfície	Flagel·lina	Bacteris
TLR9	Superfície de compartiments endosomals	ADN	Bacteris i virus

DC-SIGN	Superfície	Mannosa i Fucosa	Varis
CD206	Superfície	Mannosa i Fucosa	Varis
NOD1	Citoplasma	PGN Muramil dipèptid	Bacteris gramnegatiu i algun de grampositiu
NOD2	Citoplasma	PGN Muramil dipèptid RNA	Bacteris gramnegatiu i grampositiu Virus
MDA5	Citoplasma	RNA	Virus
RIG-I	Citoplasma	RNA	Virus

3.6.1.1.2. Cèl·lules immunitàries de la làmina pròpia

3.6.1.1.2.1. Mastòcits

Els mastòcits residents en la làmina pròpia d'individus sans són minoritaris, però en estats d'inflamació se'n recluten un gran nombre. Aquestes cèl·lules alliberen una gran varietat de mediadors d'inflamació com són les prostaglandines, els leucotriens, diverses citocines i proteases específiques. Aquestes cèl·lules participen en la regulació de la funció intestinal de barrera, tot modulant l'expressió de les proteïnes de la unió estreta i activant altres cèl·lules immunitàries (Castoldi et al., 2015).

3.6.1.1.2.2. Macròfags

La principal funció dels macròfags és fagocitar patògens de manera que processen els antígens i els situen a la seva superfície on seran reconeguts per els limfòcits que seran els encarregats d'iniciar la resposta adquirida (Setta et al., 2012; Arango Duque i Descoteaux, 2014). A més a més, eliminen les cèl·lules apoptòtiques i reciclen nutrients mitjançant la digestió dels productes de rebuig dels teixits (Setta et al., 2012; Arango Duque i Descoteaux, 2014; Rószler, 2015). Els macròfags són, per tant, essencials, no només per la immunitat, sinó també per al desenvolupament i l'homeòstasi dels teixits.

Els macròfags tenen plasticitat funcional de manera que, dependent del microambient en què es troben, divergeixen cap a macròfags clàssics (M1) o

macròfags alternatius (M2) (Figura 16). Hi ha autors que, a la vegada, classifiquen els M2 en subgrups: M2a, M2b i M2c (Ferrante i Leibovich, 2012; Arango Duque i Descoteaux, 2014; Colin et al, 2014; Martinez i Gordon, 2014; Murray et al., 2014; Zhou et al., 2014; Rószler, 2015). Les senyals de polarització poden ser diverses i cal tenir en compte que la polarització és reversible (Arango Duque i Descoteaux, 2014; Zhou et al., 2014; Rószler, 2015; Sun et al., 2015).

En condicions fisiològiques, els macròfags residents a la làmina pròpia són majoritàriament M2. En condicions d'infecció, però, quan hi ha penetració de bacteris a la làmina pròpia, es genera una polarització cap a M1. A diferència dels M2, amb poca expressió de TLR a la membrana i una alta capacitat fagocítica, els M1 presenten una elevada expressió de TLR i NOD (Flannigan et al., 2015).

Els M1, induïts per interferó γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α), LPS i productes microbians, tenen propietats proinflamàtores (Zhou et al., 2014; Rószler, 2015; Sun et al., 2015). Aquests macròfags, al seu torn, secreten citocines proinflamàtores (TNF α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12, IL-23), promouen el desenvolupament dels limfòcits Th1 i Th17, i l'activació de DC (Flannigan et al., 2015). A més, els macròfags M1 secreten alts nivells de ROS i espècies reactives de nitrogen (RNS) (Arango Duque i Descoteaux, 2014). En canvi, els M2a són induïts per IL-4, IL-13; els M2b són induïts per LPS; i els M2c per IL-10, factor de creixement transformant β (TGF β) i glucocorticoides (Zhou et al., 2014; Rószler, 2015; Sun et al., 2015). Al seu torn, cada subgrup secreta citocines que promouen el desenvolupament dels limfòcits Th2 i T reguladors (Treg) (Arango Duque i Descoteaux, 2014). Així, els M2a secreten IL-10 i TGF β ; els M2b secreten gran quantitat d'IL-10, però també secreten TNF α , IL-1 β i IL-6; i els M2c secreten IL-10 i TGF β (Arango Duque i Descoteaux, 2014; Rószler, 2015).

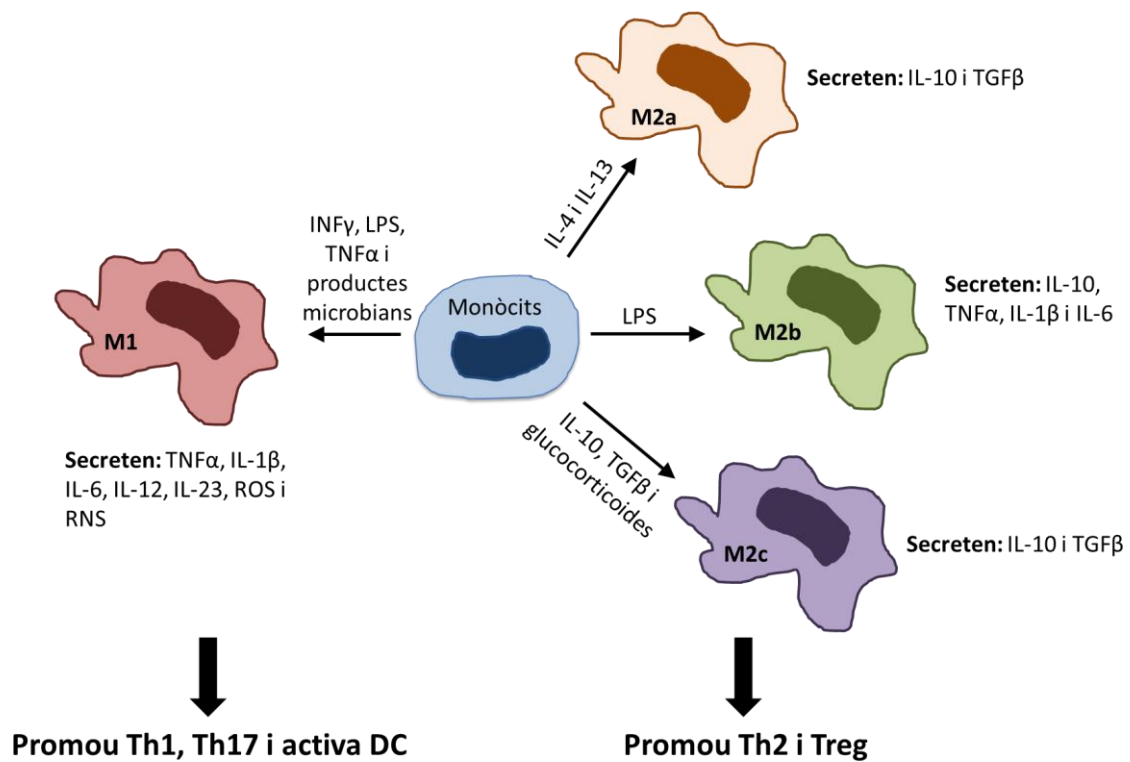


Figura 16. Polarització dels macròfags. Degut a la plasticitat funcional, els macròfags tenen la capacitat per derivar en M1 i els tres subgrups de M2 en funció dels estímuls rebuts. Adaptat de Arango Duque i Descoteaux (2014). DC, Cèl·lula dendrítica; IL, Interleucina; INF γ , Interferó γ ; LPS, Lipopolisacàrid; RNS, Espècies reactives de nitrogen; ROS, Espècies reactives d'oxigen; TGF β , Factor de creixement transformant β ; Th, Limfòcit T efector; TNF α , Factor de necrosis tumoral α ; Treg, Limfòcit T regulador.

3.6.1.1.2.3. DC

Les DC, a part de la seva funció com a cèl·lula presentadora d'antígens, presenten un gran nombre i diversitat de PRR que indueixen la secreció de diferents mediadors a la làmina pròpia que faciliten el reclutament de limfòcits T i B al lloc d'infecció (Kunisawa et al., 2012; Hammer et al, 2015; Iwasaki i Medzhitov, 2015).

De DC, també se'n troben a l'epiteli intestinal, estenent les seves dendrites entre els enteròcits, sense afectar les unions estretes. Aquestes DC no migren, i tenen un paper important iniciant la resposta immunitària local (Kunisawa et al., 2012).

3.6.1.1.2.4. Limfòcits de la resposta innata (ILC)

Els ILC són un grup de limfòcits recentment descrit que resideixen a la làmina pròpia (Kinnebrew i Pamer, 2012). La principal funció d'aquests és secretar citocines i, de fet, es classifiquen en tres subgrups segons les que secreten. Els ILC1 produeixen IFN γ , els ILC2 produeixen IL-5 i IL-13 i els ILC3 produeixen IL-17 i IL-22 (Kinnebrew i Pamer, 2012; Min i Rhee, 2015; Sun et al., 2015).

3.6.1.2. Resposta adquirida

La resposta immunitària adquirida inclou els mecanismes específics de defensa de l'organisme en front als agents estranys. És una resposta més tardana i és capaç de generar una memòria immunològica que li permet reaccionar de manera més ràpida i eficient en front a successives exposicions d'un mateix agent. Així, es diferencia de la resposta innata en tres característiques: és específica, té memòria i està adaptada.

3.6.1.2.1. Limfòcits B

Els limfòcits B són capaços de produir anticossos (IgA i IgM) (Iwasaki i Medzhitov, 2015) i també tenen la capacitat de secretar citocines (Sun et al., 2015).

3.6.1.2.2. Limfòcits T

S'han descrit diferents subpoblacions de limfòcits T, essent els majoritaris Th1, Th2, Th17 i Treg. Mentre que Th1, Th2 i Th17 es consideren cèl·lules efectores (Wu i Kaiser, 2011; Castoldi et al., 2015; Min i Rhee, 2015), els Treg mantenen l'homeòstasi intestinal mitjanant una regulació negativa dels limfòcits T efectors i suprimeixen la resposta inflamatòria (Castoldi et al., 2015; Sun et al., 2015). El nombre de Treg pot estar regulat per la presència de la microbiota intestinal (Castoldi et al., 2015; Min i Rhee, 2015).

3.6.1.2.3. Cèl·lules *Natural Killer* (NK)

L'activació de les NK dona lloc a la destrucció de les cèl·lules infectades i a la producció de citocines proinflamatòries, com ara IFN γ i TNF α . Aquestes cèl·lules contribueixen a la vegada en l'activació i diferenciació dels limfòcits T (Schuster et al., 2016).

3.6.1.2.4. Limfòcits intraepitelials (IEL)

Els IEL comprenen un grup heterogeni de limfòcits que resideixen a l'espai intraepitelial, per sota de les unions estretes. Representen la població majoritària de limfòcits de l'organisme i està descrit que, a l'intestí, hi ha una IEL per cada 10 cèl·lules epitelials (Qiu i Yang, 2013; Castoldi et al., 2015). La seva localització els hi confereix les funcions de protegir l'organisme de bacteris patògens, secretant IFN γ i TNF α , i de regular la resposta immunitària per no malmetre l'epiteli, tot incrementant la producció d'IL-10 i TGF β (Qiu i Yang, 2013; Castoldi et al., 2015; Sun et al., 2015).

3.5.4. Citocines de la resposta immunitària implicades en la funció intestinal de barrera

Com a resposta a l'activació de PRR, les cèl·lules epitelials i immunitàries estableixen una comunicació mitjançant la secreció de citocines i quimiocines. Entre les moltes que intervenen, les que tenen una relació amb la funció intestinal de barrera es descriuen a la Taula 2 (Al-Sadi et al., 2009; Suzuki, 2013; Lee, 2015).

Taula 2. Paper de les citocines en la funció intestinal de barrera.

Citocines	Paper en la funció intestinal de barrera
IL-1 β	Disminueix l'expressió d'occludina i provoca la reorganització del citoesquelet per increment de l'expressió de MLCK (Al-Sadi et al., 2009; Suzuki, 2013; Barreau i Hugot, 2014).
IL-4	Regula la <i>pore pathway</i> ja que incrementa l'expressió de claudina-2 (Suzuki, 2013).
IL-6	El paper d'aquesta citocina en la regulació de la funció epitelial de barrera és controvertida (Al-Sadi et al., 2009; Suzuki, 2013; Al-Sadi et al., 2014).
IL-10	No té cap efecte sobre la funció epitelial de barrera en condicions basals però exerceix un paper protector en condicions de trencament de la barrera. Johansson et al. (2013) també descriuen com la IL-10 afecta directament la producció i les propietats del moc secretat per les cèl·lules caliciformes.

Introducció

- IL-13 Regula la *pore pathway* ja que incrementa l'expressió de claudina-2 (Shen et al., 2011).
- IL-17 Incrementa l'expressió de claudina-1 i 2 [via extracel·lular-signal-related kinase(ERK)], claudines que tenen efectes oposats en la regulació de la permeabilitat paracel·lular (Al-Sadi et al., 2009; Suzuki, 2013).
- IL-18 Reorganitza les proteïnes de la unió estreta per activació de MLCK (Barreau i Hugot, 2014) i, en condicions de disbiosi, modifica la producció de moc (Hand, 2015; Harrison et al., 2015)
- IL-22 Augmenta la producció de compostos antimicrobians i mucina (Onyiah i Colgan, 2016).
- TGF β Millora la funció intestinal de barrera per interacció amb les proteïnes de la unió estreta via ERK i PKC (Suzuki, 2013; Al-Sadi et al., 2009). Incrementa l'expressió de claudina-1 via MAPK/ERK (Suzuki, 2013).
- TNF α Reorganitza el citoesquelet (provoca canvis en l'expressió de MLCK) i regula l'expressió de les proteïnes de la unió estreta, incrementant la permeabilitat paracel·lular (Al-Sadi et al., 2009; Cunningham i Turner, 2012; Suzuki, 2013; Barreau i Hugot, 2014; De Santis et al., 2015).
- IFN γ Reorganitza el citoesquelet (provoca canvis en l'expressió de proteïnes de la família Rho) i regula l'expressió de les proteïnes de la unió estreta, incrementant la permeabilitat paracel·lular (Al-Sadi et al., 2009; Suzuki, 2013; Barreau i Hugot, 2014).
-

4. Infecció intestinal per *Salmonella*

La salmonel·losi, segona causa d'infeccions alimentàries a la Unió Europea (EU), és causada per diferents soques del bacteri gramnegatiu *Salmonella*. El gènere *Salmonella* inclou dues espècies (segons estudis d'homologia d'ADN): *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. *S. Enterica*, a la vegada, consta de sis subespècies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* i *indica* (Figura 17). Fins al moment, s'han descrit més de 2600 serotips dels quals un 99% dels identificats pertanyen a la subespècie *enterica* [Dunkley et al., 2009; European Food Safety Authority (EFSA), 2012; Callegari et al., 2015]. A l'apartat 6 (Capítol de llibre 2) s'inclou una revisió sobre la infecció intestinal per salmonel·la.

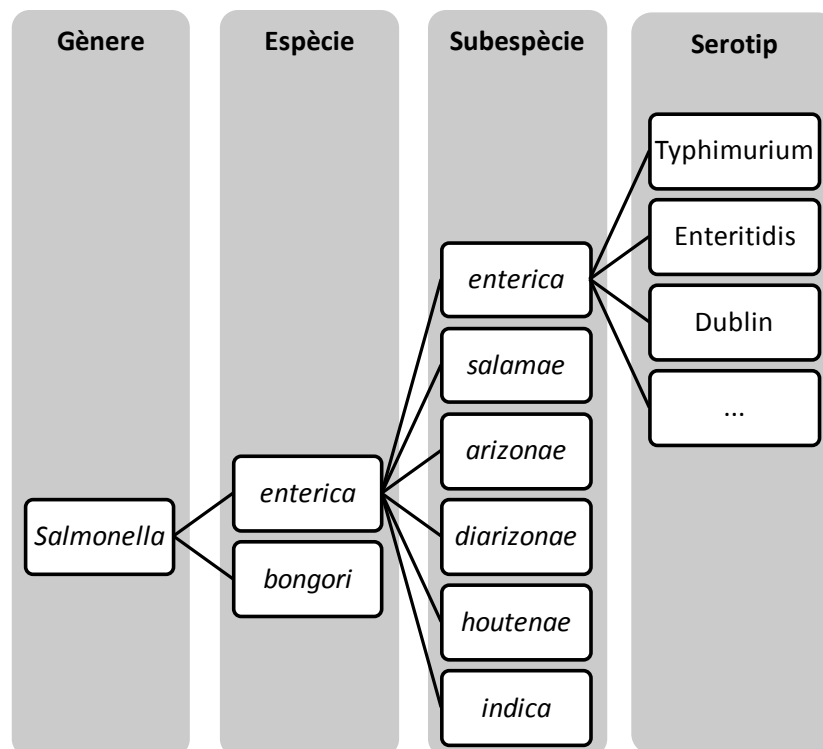


Figura 17. Gènere *Salmonella*. Classificació de les espècies, les subespècies i els serotips. Adaptat de Hurley et al. (2014).

4.1. Epidemiologia

L'any 2014, el nombre total de casos confirmats de salmonel·losi en humans en els 28 països de la UE va ésser de 88.715, dada que indica un increment d'un 1,5% respecte als 87.360 casos reportats el 2013 (EFSA, 2015). A l'Estat Espanyol, el nombre de casos va incrementar un 46% durant el mateix període (6.643 casos al 2014 i 4.537 al 2013), increment que es deu en part a una

ampliació de la cobertura i del sistema de vigilància. Els serotips causants de la majoria de casos a la UE són *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotip Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) i *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotip Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), causants d'un 44% i d'un 17% dels casos reportats al 2014, respectivament. En el primer cas, la infecció està associada al consum d'ous i carn d'au de corral contaminats. En canvi, la infecció per *Salmonella* Typhimurium està associada al consum de carn de porc i de boví contaminada (EFSA, 2015). En humans, aquests dos serotips causen gastroenteritis. Un altre serotip de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* és el serotip Dublin (*Salmonella* Dublin) que és la segona causa d'infeccions en vacum després de *S. Typhimurium* (EFSA, 2015). El que és característic d'aquesta serotip és la seva alta capacitat invasiva i el fet que en humans, causa una clínica més severa i fins i tot bacterièmia (EFSA, 2009; Kisiela et al., 2012; Hurley et al., 2014; Pan et al., 2015).

En el cas dels animals de granja, les infeccions subclíniques són molt comunes. Així, en porcs, poques vegades apareix febre o diarrea (Althouse et al., 2003). En pollastres és freqüent que la infecció passi completament desapercebuda sense cap signe (EFSA, 2011), fet que en facilita la dispersió i en dificulta la detecció, essent el tracte gastrointestinal d'aquests animals el principal reservori del bacteri.

4.2. Patogenicitat

Després de ser ingerida i de passar per l'estómac, la salmonel·la és capaç d'envair i replicar-se majoritàriament en les cèl·lules M de l'intestí (Murray et al., 2006), però també en les altres cèl·lules epitelials, DC i macròfags. L'adhesió a totes aquestes cèl·lules està mediada per diferents fimbries presents a la superfície del bacteri: *type 1 fimbriae* (fimbria de tipus 1), *Long polar fimbriae* (Lpf), *thin aggregative o curli fimbriae* i *Plasmid-encoded fimbriae* (Pef) (Foley i Lynne, 2008; Kato i Ishiwa, 2015). D'aquestes fimbries, la més ben caracteritzada és la fimbria de tipus 1 que s'uneix a les glicoproteïnes de les cèl·lules epitelials (Althouse et al., 2003; Shah et al., 2012).

Després de la interacció amb la membrana de les cèl·lules epitelials, la salmonel·la expressa el sistema de secreció de tipus III (T3SS), conjunt de proteïnes que li faciliten la invasió (Wallis i Galyov, 2000; Sansonetti, 2002). Els

gens que codifiquen per a T3SS constitueixen fins a 12 regions anomenades SPI (*Salmonella pathogenicity island*). En els serotips que pertanyen a *S. enterica*, els SPI més comuns i que s'han descrit fins al moment són SPI-1, 2, 3, 4, i 5 (Sansonetti, 2002; Hurley et al., 2014). L'expressió d'SPI-1 SPI-2 per part de *S. Enteritidis* és fonamental, ja que determina que la colonització de l'hoste sigui sistèmica (Rychlik et al., 2009; Wisner et al., 2010; Troxel et al., 2015). En canvi *S. Dublin* només necessita la presència d'SPI-1 per colonitzar-lo (Hurley et al., 2014). SPI-1 està involucrat en la invasió de cèl·lules no fagocítiques i SPI-2 en la supervivència dins de la cèl·lula hoste (Rychlik et al., 2009; Wisner et al., 2010; Troxel et al., 2015). Per la majoria de serotips de *Salmonella*, la virulència està determinada per l'expressió de SPI-2. En els pollastres, la manca de signes de la malaltia pot ser degut a què l'expressió de SPI-1 de *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* depèn de la temperatura; la seva expressió és menor a temperatures superiors a 41°C, com és el cas de la temperatura corporal de les aus. Així, en aquests animals la presència de salmonel·la queda limitada al cec (Troxell et al., 2015). SPI-3, -4 i -5 també influeixen en la virulència del serotip (Rychlik et al., 2009). Per exemple, SPI-4 està descrit que té un paper important en la supervivència de *S. Enteritidis* dins dels macròfags i en l'albumina dels ous (Shah et al., 2012) i SPI-5 contribueix a la inflamació intestinal que desenvolupen els pollastres infectats (Shah et al., 2012).

El sistema de secreció SPI-1 forma una estructura similar a una agulla que injecta les proteïnes efectores [*Salmonella inner protein* (Sip) i *Salmonella outer protein* (Sop)] a l'interior de la cèl·lula (Sansonetti, 2002; Verma i Srikanth, 2015). Aquestes proteïnes efectores, resumides en la Taula 3, interaccionen amb l'actina del citoesquelet activant Cdc42 i Rho GTPases (Figura 18). Aquesta interacció dona lloc a la reorganització del citoesquelet provocant la formació de lamel·lipodis i fil·lipodis que rodegen i engoleixen la salmonel·la i formen vacúols (*Salmonella containing vacuoles*, SCV).

A l'interior dels SCV s'expressa el sistema de secreció SPI-2 que codifica l'expressió de tot un seguit de proteïnes efectores resumides a la Taula 4 on es pot observar la importància d'aquestes per a l'extensió de la infecció ja que participen en la formació d'extensions tubulars, anomenades *Salmonella-induced filaments* (Sif), que afavoreixen l'engrandiment dels SCV per permetre la replicació del bacteri (Wallis i Galyov, 2000; Foley i Lynne, 2008; Reis i Horn,

2010) (Figura 19). Aquests SCV inhibeixen la fusió amb el fagosoma i permeten l'extensió de la infecció a les cèl·lules epitelials veïnes (Wallis i Galyov, 2000; Foley i Lynne, 2008; Reis i Horn, 2010; Storek i Monack, 2015; Verma i Srikanth, 2015). A més a més, els SCV migren cap a la membrana basolateral de la cèl·lula i, un cop a l'espai subepitelial, la salmonel·la interactua amb els macròfags de la làmina pròpia.

L'expressió d'SPI-1 i SPI-2 indueix la mort de les cèl·lules envaïdes per activació de la caspasa-1 que a la vegada indueix la secreció d'IL-1 β i IL-18, desencadenant la resposta inflamatòria característica de la salmonel·losi (Reis i Horn, 2010; Broz et al., 2012; Storek i Monack, 2015).

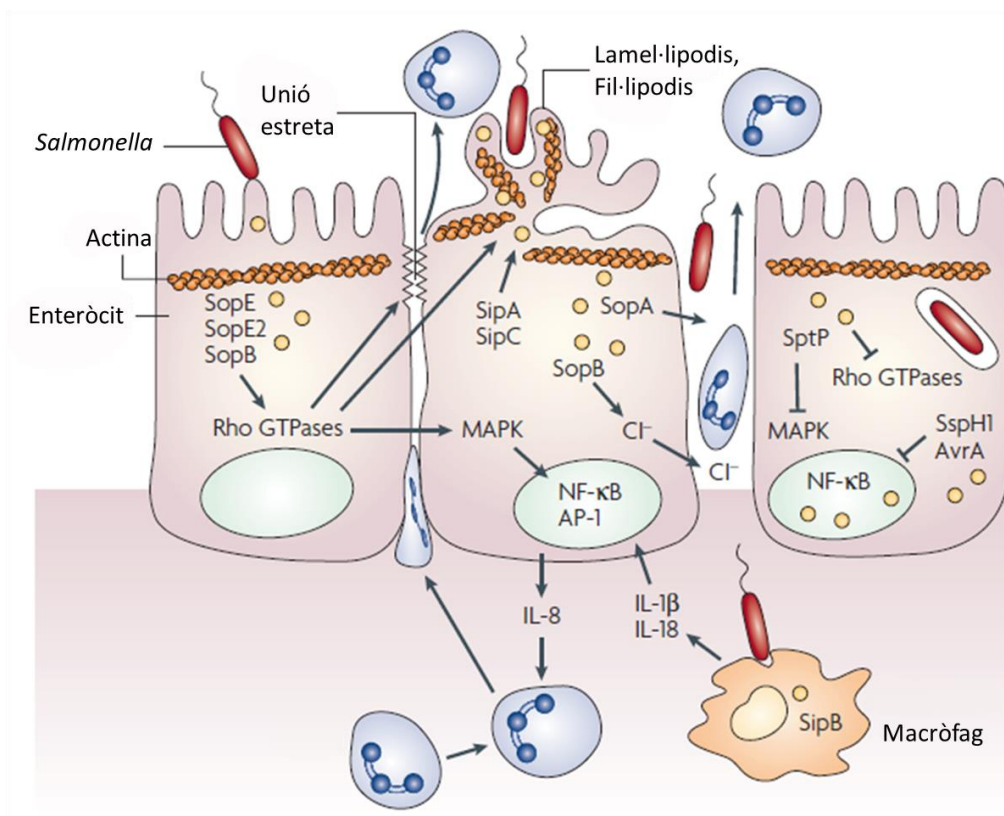


Figura 18. Esquema de la internalització de la salmonel·la a l'epiteli intestinal. A l'esquema també hi són presents les cascades de reaccions que inicien les proteïnes efectores d'SPI-1 i SPI-2 en ser inserides en les cèl·lules epitelials. Adaptat de Haraga et al. (2007). AP-1, Proteïna activadora 1; GTP, Trifosfat de guanosina; IL, Interleucina; MAPK, Proteïnes cinasa activades per mitògens; NF- κ B, Factor nuclear- κ B.

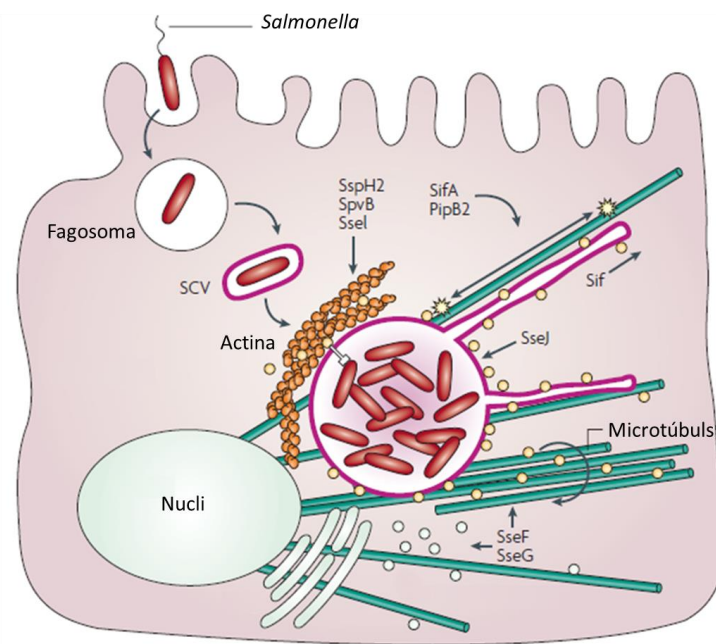


Figura 19. Esquema de la formació dels SCV. Internalització de la salmonel·la, formació dels SCV i canvis en el citoesquelet de les cèl·lules epitelials. Adaptat de Haraga et al. (2007). SCV, *Salmonella containing vacuoles*; Sif, *Salmonella-induced filaments*.

Taula 3. Resum de les funcions de les proteïnes efectores d'SPI-1. Adaptat de Foley i Lynne (2008) i Haraga et al. (2008).

Proteïnes efectores	Efectes en la cèl·lula hoste
AvrA	Inhibició d'NF- κ B (factor nuclear- κ B) i de la secreció d'IL-8
SipA	Reorganització del citoesquelet
SipB	Translocació d'altres efectors/Activació caspasa-1
SipC	Translocació d'altres efectors/Reorganització del citoesquelet/En els macròfags confereix protecció davant de les ROS i RNS
SopA	Reclutament de cèl·lules immunitàries/Secreció de fluids
SopB (o SigD)	Reorganització del citoesquelet/Activació de Cdc42 i RhoGTPases/Secreció de fluids
SopC	Secreció de fluids
SopD	Secreció de fluids
SopE	Reorganització del citoesquelet i formació de lamel·lipodis i fil·lipodis/Activació de Cdc42 i RhoGTPases
SopE2	Reorganització del citoesquelet i formació de lamel·lipodis i fil·lipodis/Activació de Cdc42 i RhoGTPases
SptP	Regulació de l'activació de les proteïnes efectores. Inhibició de Cdc42 i RhoGTPases
SSpH1	Inhibició d'NF- κ B i de la secreció d'IL-8

Taula 4. Resum de les funcions de les proteïnes efectores d'SPI-2. Adaptat de Foley i Lynne (2008) i Haraga et al. (2008).

Proteïnes efectores	Efectes a la cèl·lula hoste
PipB	Marcatge de Sif
SifA	Formació de Sif i manteniment de la integritat dels SCV
SifB	Marcatge de Sif
SopD2	Marcatge de Sif
SpIC	Alteració del transport vesicular
SpvB	Regulació de la formació de Sif
SseF	Cooperació amb la formació de Sif
SseG	Cooperació amb la formació de Sif
SseI	Reorganització del citoesquelet
SseJ	Dinamització de SCV
SSpH1	Inhibició d'NF- κ B i de la secreció d'IL-8
SspH2	Reorganització del citoesquelet

A més de la interacció de les fimbries amb la cèl·lula hoste, aquesta també reconeix altres components del bacteri (Broz et al., 2012). L'LPS de la salmonel·la, component de la membrana de bacteris gramnegatius, és un PAMP que és reconegut pel receptor TLR4 que, un cop activat, inicia la resposta immunitària. La salmonel·la també té un flagel que és reconegut per TLR5, majoritàriament present a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials, i que interacciona amb el flagel quan el patogen invasor arriba a la làmina pròpia (Broz et al., 2012).

4.3. Prevenció

L'administració d'antibiòtics a dosis subterapèutiques va ser una estratègia extensament utilitzada a partir dels anys 50 en la producció animal per a la prevenció d'infeccions i com a promotors del creixement (AGP), amb l'objectiu de reduir els costos de producció (Huyghebaert et al., 2011; Sethiya, 2016).

Tanmateix, la creixent aparició de bacteris resistents als antibiòtics va comportar que l'any 2006, la UE prohibís l'ús dels AGP en la nutrició animal (Reglament CE n. 1831/2003 del Parlament Europeu i del Consell). Actualment, la indústria avícola destina molts esforços a la recerca d'estratègies nutricionals alternatives als AGP per a la seva inclusió en els programes de control de

salmonel·la. Algunes de les estratègies nutricionals aplicades a la UE es descriuen a continuació:

- Evitar la privació de pinso. La restricció de pinso i llum durant uns dies s'ha utilitzat tradicionalment com a accelerador del creixement de l'animal ja que se'l força a canviar el plomatge però a la vegada incrementa la incidència de salmonel·la (Berge i Wierup, 2011).
- Modificar les propietats físiques del pinso. La colonització per salmonel·la està influenciada per la mida i tipus de les partícules que formen el pinso. Està descrit que la utilització de gra gruixut i/o de gra d'alt contingut en fibra dificulta la colonització del cec de pollastres i millora la salut intestinal dels pollastres d'engreix (Santos et al., 2008).
- Substituir la microbiota de pollastres joves per la de pollastres adults (Vilà et al., 2009).
- Suplementar la dieta amb:
 - Àcids orgànics de cadena curta (SCFA) i de cadena mitjana (MCFA). Aquests àcids tenen capacitat per inhibir el creixement de la salmonel·la (Van Immerseel et al., 2006) i són beneficiosos per al creixement de l'animal (Huyghebaert et al., 2011).
 - Probiòtics. L'organització mundial de la salut (OMS) els defineix com a suplement dietètic de microorganismes vius no patogènics que en la quantitat adequada són beneficiosos per a l'hoste (Veure apartat 4.3.1)
 - Prebiòtics. Definits com compostos no digeribles que són metabolitzats per la microbiota intestinal, modulant-ne la composició i activitat, i així conferint beneficis fisiològics per l'hoste (Bindels et al, 2015) (Veure apartat 4.3.2).
 - Simbiòtics. Combinació de probiòtics i prebiòtics en la que els prebiòtics afavoreixen selectivament els probiòtics.
 - Glicans. Carbohidrats que contenen mannanosa, glucosa, galactosa o fructosa, per als que s'ha demostrat capacitat antiinfectiva en competir amb els patògens pel lloc d'unió a les cèl·lules epitelials. Generalment es classifiquen segons la proporció de carbohidrats i reben el nom del carbohidrat majoritari: mannan oligosacàrid (MOS) (Veure apartat 4.3.3), galacto oligosacàrid (GOS), fructo oligosacàrid (FOS), etc (Bahar et al., 2012; Ebersbach et al., 2012; Vendrig et al., 2013; Johnson-Henry et al., 2014; Ortega-González et al., 2014; Pourabedin i Zhao, 2015;

Wickramasinghe et al., 2015). Alguns d'aquests glicans han estat aprovats com a prebiòtics per l'EFSA ja que compleixen els requisits establerts per ser considerats com a tals.

- Olis essencials. En experiments *in vitro*, diversos olis essencials han demostrat tenir efectes bacteriostàtics i bactericides (Burt 2004; Huyghebaert et al., 2011).

4.3.1. Probiòtics

A la UE, els probiòtics aprovats per l'EFSA són els productes que exerceixen una millora en el creixement i en la salut intestinal de l'animal. En la indústria avícola, l'ús de probiòtics és més freqüent que en altres animals de granja ja que els pollets són un exemple d'animals que no presenten transferència de microbiota en ser separats després de l'eclosió dels animals adults. A més a més, el desajustament de la microbiota intestinal o disbiosi, degut a situacions d'estrès com la ventilació inadequada de les instal·lacions, la superpoblació, la falta d'aigua o d'aliments, el transport i les vacunacions, constitueixen la principal causa d'increment de susceptibilitat a infeccions bacterianes tant en pollastres adults com en joves (Dec et al., 2014).

Els probiòtics més utilitzats en avicultura són *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i els llevats, majoritàriament de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* (Lutful Kabir, 2009). Els mecanismes d'acció d'aquests suplementes inclouen (Vinderola et al., 2005; Dunkley et al., 2009; Howarth, 2010; Lebeer et al., 2010; Thomas i Versalovic, 2010; Berge i Wierup, 2011; Dongarrà et al., 2013; Wu et al., 2016):

- Manteniment de la microbiota intestinal i exclusió o inhibició de patògens.
- Alteració del metabolisme en incrementar els enzims digestius i reduir els enzims bacterians i la producció d'amoníac a l'intestí.
- Millora de l'absorció dels nutrients.
- Millora de la funció epitelial de barrera (augment de la producció de muc i de pèptids microbians, regulant la unió estreta i/o prevenint l'apoptosis).
- Modulació de la resposta immunitària de l'hoste.

4.3.1.1. *Lactobacillus*

El gènere *Lactobacillus* pertany al filum de les *Firmicutes* i forma part de la microbiota intestinal (Jensen et al., 2012; Dec et al., 2014). Són bacteris grampositius, productors d'àcid làctic com a resultat de la fermentació dels carbohidrats, negatius en activitat catalasa i no formen espores.

Són àmpliament utilitzats com a probiòtics ja que està demostrada la seva capacitat per a millorar la salut intestinal dels hostes (Dec et al., 2014). A més a més, en avicultura s'ha observat que la seva utilització com a suplement dietètic produeix efectes similars a l'ús d'AGP ja que augmenten el pes dels animals, milloren l'eficiència del pinso i confereixen resistència a patògens com *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium* i *E. coli* (Dec et al., 2014; Nishiyama et al., 2014; Nishiyama et al., 2015; Feng et al., 2016; Saint-Cyr et al., 2016). Nishiyama et al. (2014, 2015), han demostrat que l'administració de *Lactobacillus gasseri* SBT2055 als pollastres produeix una inhibició de l'adhesió i la invasió de *Campylobacter jejuni*. Saint-Cyr et al. (2016) també han demostrat que *Lactobacillus salivarius* SMXD51 disminueix la colonització per *Campylobacter jejuni*, fet que atribueixen a la modulació de l'expressió de citocines i a la producció de bacteriocines. Feng et al. (2016) han demostrat que *Lactobacillus plantarum* PZ01 i diferents soques de *Lactobacillus salivarius* inhibeixen l'adhesió i invasió de *Salmonella* en cultius de cèl·lules Caco-2 i en pollastres, disminueixen la colonització de l'intestí, fetge i melsa, així com la producció de diferents citocines proinflamàtores i incrementen la producció de IL-10.

Dins del gènere *Lactobacillus*, *L. plantarum* és una de les espècies més versàtils, ja que inclou soques amb activitat probiòtica demostrada (Kawashima et al., 2011; Vastano et al., 2016) i amb aplicacions tecnològiques importants (Arena et al., 2016). Aquestes soques produeixen agents antimicrobians com poden ser àcids orgànics, peròxid d'hidrogen, bactericines i pèptids antimicrobians (Dec et al., 2014; Arena et al., 2016). *L. plantarum* conté diferents patrons moleculars que poden ser reconeguts per les cèl·lules de l'hoste mitjançant diferents PRR (Lebeer et al., 2010; Hevia et al., 2015) i s'ha descrit que milloren la funció epitelial de barrera (Chen et al., 2010; Jensen et al., 2012; Kim et al., 2012; Yeung et al., 2013) tot reduint la permeabilitat paracel·lular a través de la

modulació de les proteïnes de la unió estreta (Ko et al., 2007; Chen et al., 2010; Liu et al., 2011).

4.3.2. Prebiòtics

Com a prebiòtics principalment s'utilitzen carbohidrats no digeribles que es classifiquen en funció del seu pes molecular (Mussatto i Mancilha, 2007). A dia d'avui, els únics productes aprovats per l'EFSA per a ser utilitzats com a prebiòtics són: la inulina, alguns FOS i GOS. Els criteris per a considerar que un producte és un prebiòtic són (Roberfroid, 2007; Hajati i Rezaei, 2010; Kadlec i Jakubec, 2014; De Santis et al., 2015; Pourabedin i Zhao, 2015; Krumbeck et al., 2016):

- No han de ser hidrolitzats ni absorbits en el tracte gastrointestinal superior.
- Han de ser substrat selectiu per a la microbiota al cec o al còlon, augmentant el seu creixement o la seva activitat metabòlica.
- Han de ser capaços de canviar la composició de la microbiota a favor d'una més saludable.
- Han d'induir efectes sistèmics beneficiosos per la salut de l'hoste.
- Han de tenir una estructura coneguda per poder ser documentada.
- Han de ser desitjables com a ingredient i el processament a gran escala ha de ser fàcil.

4.3.3. MOS

Els MOS estan presents a la natura formant part de les glicoproteïnes de les parets cel·lulars dels llevats (α -MOS) i de l'hemicel·lulosa de les plantes (β -MOS) (Moreira i Filho, 2008). Segons la procedència, difereixen en l'estructura i tenen propietats i aplicacions diferents.

Tant els α -MOS com els β -MOS han guanyat interès en l'última dècada com a potencials promotors de salut, realitzant aquests efectes per mitjà de diferents mecanismes d'acció (Yamabhai et al., 2016):

- el potencial efecte prebiòtic, ja que són oligosacàrids no digeribles.
- la capacitat per competir amb els patògens per un mateix lloc d'unió (Spring et al., 2000; Iji et al., 2001; Burkey et al., 2004; Solis de los Santos et al., 2007). Els MOS tenen l'habilitat d'unir-se a lectines específiques per

mannosa de patògens gramnegatius que expressen les fímbries de tipus 1 (Duguid et al., 1966; Bäumlér et al., 1997).

- la capacitat per estimular directament o indirecta el sistema immunitari (Ferket et al., 2002; Agunos et al., 2007; Gaggia et al., 2010; Badia et al., 2012b; Kovacs-Nolan et al., 2013).

A més a més, en avicultura està demostrada la seva capacitat per a millorar la salut intestinal:

- incrementen la producció de moc (Baurhoo et al., 2007; Chichlowski et al., 2007; Leforestier et al., 2009; Chee et al., 2010).
- augmenten la superfície epitelial per a l'absorció de nutrients en incrementar la llargària de les vellositats (Solis de los Santos et al., 2005; Baurhoo et al., 2007; Chichlowski et al., 2007; Morales-López et al., 2009).

Tot i comportar el mateix benefici de salut intestinal que els prebiòtics, en tenir diferents mecanismes d'acció, els MOS no se'ls considera com a tal, però es comença a estendre la utilització d'una nova nomenclatura com a substàncies similars a prebiòtics (Roto et al., 2015).

4.3.3.1. α -MOS

Els α -MOS formen part de les parets cel·lulars dels llevats en forma de mannanproteïnes (Yamabhai et al., 2016). A les parets cel·lulars dels llevats també s'hi troben altres polisacàrids com els β -glucans i la quitina. Així, s'ha descrit la seva capacitat per prevenir l'adherència de patògens a l'epiteli intestinal i activar la fagocitosi, a més d'estimular la producció de citocines per part dels macròfags (Kogan i Kocher, 2007; Possemiers et al., 2013; Roto et al., 2015). Un dels α -MOS més utilitzat en la indústria avícola són les parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae*, que contenen un 45% de residus de D-mannosa (Burkey et al., 2004; Morales-López et al., 2009).

4.3.3.2. β -MOS

Els β -MOS són polisacàrids que en la cadena principal presenten D-mannosa i/o D-glucosa, units per enllaços β -1,4, que poden ser substituïts per cadenes laterals de D-galactosa enllaçats amb enllaços α -1,6. Es classifiquen en 4 subfamílies: mannans lineals, glucomannans, galactomannans i galactoglucomannans (Moreira i Filho, 2008).

- Els mannans lineals estan formats per cadenes de D-mannosa unides per enllaços β -1,4 i contenen menys d'un 5% de galactosa (Figura 20). Són els components estructurals principals de les llavors de moltes plantes (Moreira i Filho, 2008).

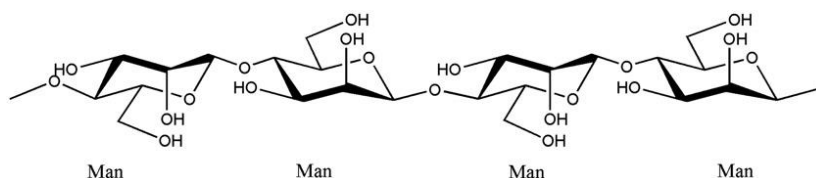


Figura 20. Estructura dels mannans lineals. Adaptat de Yamabhai et al. (2016). Man, D-mannosa.

- Els glucomannans són polisacàrids de cadenes de D-mannosa i D-glucosa unides per enllaços β -1,4 (Figura 21). La proporció de mannososa:glucosa és de 3:1 (Moreira i Filho, 2008). Estan presents en gran quantitat en l'hemicel·lulosa de coníferes. Els glucomannans retarden el buidament gàstric i alenteixen el trànsit gastrointestinal i per això s'utilitzen per controlar el pes ja que produeixen sensació de sacietat (Moreira i Filho, 2008; Sood et al., 2008; Yamabhai et al., 2016; Zalewski et al., 2015).

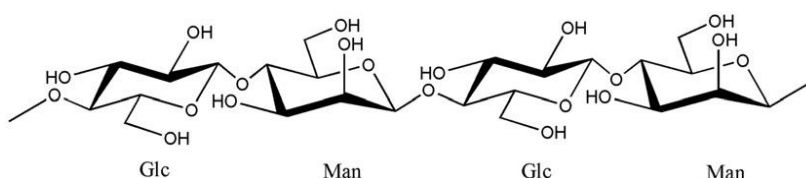


Figura 21. Estructura dels glucomannans. Adaptat de Yamabhai et al. (2016). Glc, D-glucosa; Man, D-mannosa.

- Els galactomannans, són mannans lineals que contenen de D-galactosa unida a la cadena principal per enllaços α -1,6, en que la proporció final de galactosa és superior al 5% (Figura 22). Es troben majoritàriament a l'endosperma de les llavors de la família de les lleguminoses. Per les seves propietats reològiques, han estat àmpliament utilitzats en aplicacions industrials i alimentàries (Moreira i Filho, 2008).

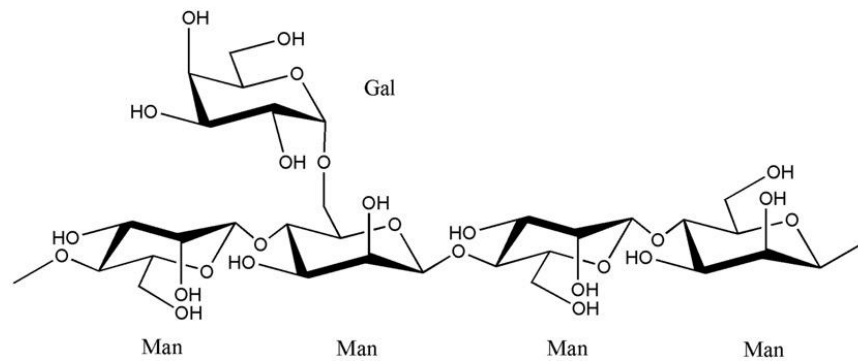


Figura 22. Estructura dels galactomannans. Adaptat de Yamabhai et al. (2016). Man, D-mannosa.

- Els galactoglucomannans són glucomannans que contenen de D-galactosa unida a la cadena principal per enllaços α -1,6 (Figura 23). La proporció de mannosa, glucosa i galactosa és de 3:1:1. Es troben majoritàriament a l'hemicel·lulosa de les gimnospermes (Moreira i Filho, 2008).

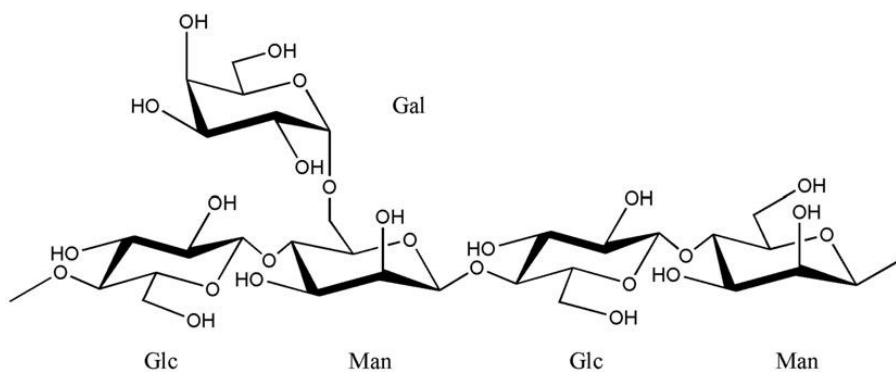


Figura 23. Estructura dels galactoglucomannans. Adaptat de Yamabhai et al. (2016). Glc, D-glucosa; Man, D-mannosa.

5. Capítol de llibre 1

Epithelial barrier function in inflammatory bowel disease

Raquel Martín-Venegas, M. José Rodríguez-Lagunas, Ana M. Guerrero-Zamora, M.
Teresa Brufau, Ruth Ferrer

Gastrointestinal Disorders. (2012). Editors: Battik M i Grimaldi N. Nova York: Nova
Science Publishers, 201-211.

Aquest capítol de llibre és una revisió sobre l'estructura i la permeabilitat selectiva de la unió estreta en condicions de salut i a la malaltia inflamatòria intestinal.

6. Capítol de llibre 2

Loss of intestinal epithelial barrier function in *Salmonella* Enteritidis infection

Raquel Martín-Venegas, Teresa Brufau, Ruth Ferrer

Recent advances in pharmaceutical sciences IV. (2014). Editors: Muñoz-Torres D, Vázquez-Carrera M i Estelrich J. Kerala: Transworld Research Network, 73-83.

En aquest capítol de llibre es revisa la disrupció de la funció epitelial de barrera causada per la presència de *S. Enteritidis*.

II. OBJECTIUS

A partir dels anys 50, la inclusió d'AGP en els pinsos per animals de granja va ser una estratègia extensament utilitzada per a la prevenció d'infeccions i per promoure el creixement de l'animal. La inclusió d'aquests additius al pinso va reduir els costos de producció, però la creixent aparició de bacteris resistents a antibiòtics va comportar que l'any 2006 la UE prohibís l'ús dels AGP en la nutrició animal. Aquest fet va potenciar la cerca d'alternatives nutricionals de productes capaços d'induir efectes sistèmics beneficiosos per la salut de l'animal i així suplir els efectes que s'obtenien amb els AGP (Hajati and Rezaei, 2010; Lebeer et al., 2010; Dongarrà et al., 2013; Wu et al., 2016). En aquest sentit, els MOS, FOS i GOS han guanyat interès en la darrera dècada com a potencials promotors de salut i com a alternatives als AGP.

El Salmosan® (S- β GM) és un β -MOS ric en β -galactomannans (β GM) obtingut a partir de la llavor del garrofer (*Ceratonia siliqua*) i de la goma guar de *Cyamopsis tetragonoloba*. Aquest producte ha estat desenvolupat per l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA, Generalitat de Catalunya) i regulat en base a la patent WO2009/144070 A2 (veure annex). Actualment, el produeix i comercialitza l'empresa Industrial Tècnica Pecuària S.A. (ITPSA, Barcelona, Espanya). La composició del S- β GM consta d'un 77,7% de polisacàrids no digeribles dels quals un 98% són β GM amb una proporció galactosa:mannosa de 1:4. En el procés industrial de producció, s'addiciona β -mannanasa que hidrolitza els β GM amb l'objectiu de reduir la viscositat del contingut intestinal (Vilà et al., 2012). La β -mannanasa allibera oligosacàrids, principalment mannobiosa i mannotriosa (Malgas et al., 2015). En aquest sentit, s'ha observat que són els oligosacàrids i no la D-mannosa lliure els responsables dels efectes del S- β GM (Badia et al., 2013).

En un estudi previ (veure Article previ), es va determinar que el S- β GM redueix l'adhesió de *S. Typhimurium* a les cèl·lules epitelials d'ili de porc (IPI-2I) i modula l'expressió de citocines i quimiocines en IPI-2I i DC, tant en absència com en presència del bacteri. Tenint en compte aquest estudi i les propietats descrites prèviament per als MOS, la hipòtesi plantejada en aquesta tesi és doncs, si el S- β GM pot exercir efectes beneficiosos sobre la funció intestinal de barrera compromesa per la infecció per *Salmonella* de tal forma que pugui ser considerat una bona alternativa als AGP.

Així, l'objectiu general d'aquesta tesi ha estat **determinar l'efecte del S- β GM sobre la funció intestinal de barrera en les infeccions per *Salmonella*.**

D'aquest objectiu general, se'n deriven els següents objectius específics:

- 1. Determinar l'efecte de diversos MOS rics en β GM (S- β GM, Goma Duraió, Goma Cassia i parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae*) sobre la morfologia intestinal de pollastres d'engreix infectats amb *S. Enteritidis*.** Aquest estudi s'ha realitzat a l'ili, ja que és el segment de l'intestí prim amb la major capacitat per a l'absorció de nutrients (Ferrer et al., 1994), i a la tonsil·la cecal, que és l'òrgan limfoide del tracte gastrointestinal del pollastre on s'ha descrit que *S. Enteritidis* inicia la invasió de la resta de teixits de l'organisme (Chappell et al., 2009).
- 2. Investigar el paper del S- β GM en la prevenció de la disrupció de la funció epitelial de barrera induïda per la colonització de cultius de cèl·lules intestinals Caco-2 per diferents serotips de *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*).** Les cèl·lules Caco-2, procedents d'un adenocarcinoma humà, en ser cultivades en les condicions adients, formen un epiteli polaritzat amb moltes de les característiques estructurals i funcionals dels enteròcits de l'intestí prim (Hidalgo et al., 1989). Aquest model experimental *in vitro* és àmpliament utilitzat avui en dia, tant per a la caracterització de la funció epitelial de barrera com per a l'estudi de la seva regulació per components de la dieta (Walker et al., 1998). Així doncs, tenint en compte les dificultats que comporta l'estudi de la funció intestinal de barrera en animals, la utilització d'aquests cultius constitueix una bona alternativa.
- 3. Avaluat la capacitat del S- β GM per a protegir la funció epitelial de barrera, independentment de la seva capacitat per aglutinar *S. Enteritidis*, en dos models *in vitro* d'inflamació intestinal: co-cultius de cèl·lules Caco-2 i macròfags estimulats amb LPS de *S. Enteritidis* i cultius de cèl·lules Caco-2 estimulades amb TNF α .** En aquests dos models s'ha volgut determinar si el S- β GM, en interaccionar amb l'epiteli intestinal, podia exercir altres efectes sobre la funció epitelial de barrera a banda de la seva capacitat per reduir la invasió de l'epiteli per *S. Enteritidis*.

- 4. Investigar el paper de la combinació de S- β GM amb el probiòtic *L. plantarum* en la prevenció de la disrupció de la funció epitelial de barrera en els dos models d'inflamació descrits a l'objectiu anterior. A més dels possibles efectes beneficiosos que pot exercir la combinació sobre la funció epitelial de barrera, també s'ha volgut investigar si el S- β GM promou el creixement d'aquesta soca probiòtica i per tant, podria ser un bon candidat per a constituir un simbiòtic.**

Article previ

β -galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate immune response against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cell

Roger Badia, M. Teresa Brufau, Ana M. Guerrero-Zamora, Rosil Lizardo, Irina Dobrescu, Raquel Martin-Venegas, Ruth Ferrer, Henri Salmon, Paz Martínez and Joaquim Brufau

Clinical and Vaccine Immunology (2012) 19: 368–376

doi: 10.1128/CVI.05532-11

Índex d'impacte 2012 (*Journal Citation Report*): 2,598

Categoria: Microbiology (53/116, 2r quartil)

En aquest article es varen estudiar els efectes del S- β GM, en comparació amb el probiòtic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, sobre la invasió i la producció de citocines i quimiocines en cèl·lules epitelials d'ili de porc (IPI-2I) i DC inoculades amb *S. Typhimurium*. En aquest treball, la participació de M. Teresa Brufau va consistir en l'estudi de la interacció del S- β GM o del probiòtic amb *S. Typhimurium* per microscòpia electrònica de rastreig.

III. RESULTATS

Article 1

Dietary β -galactomannans have beneficial effects on the intestinal morphology of chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

M. Teresa Brufau, Raquel Martín-Venegas, Ana M. Guerrero-Zamora, Anna M. Pérez-Vendrell, Borja Vilà, Joaquim Brufau, Ruth Ferrer

Journal of Animal Science (2015) 93:238-246

doi: 10.2527/jas2014-7219

Índex d'impacte 2015 (*Journal Citation Report*): 2,014

Categoria: Agriculture, Dairy & Animal Science (5/58, 1r quartil)

Els resultats d'aquest article han estat presentats als següents congressos:

- Efecto del Salmosan® en el epitelio intestinal de pollos infectados con *Salmonella* Enteritidis. III Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, Castelldefels (Espanya), desembre de 2011. Comunicació oral.
- Effect of Salmosan®, Duraió gum and Cassia gum on the presence of M cells in the intestinal epithelium of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. IV Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, Madrid (Espanya), gener de 2013. Pòster. Publicat a *Nutrición Hospitalaria* 2013;28(supp I):23.

Resum

Objectiu. L'objectiu d'aquest treball era investigar l'efecte de diversos productes rics en β GM sobre la morfologia intestinal de pollastres inoculats amb *S. Enteritidis*.

Material i mètodes. Per avaluar aquest efecte, un total de 280 pollastres mascles d'engreix (Ross 308) es van distribuir en 7 tractaments (40 animals per tractament distribuïts en 5 gàbies). Els tractaments eren: control negatiu (NC), animals no inoculats alimentats amb la dieta basal; control positiu (PC), animals inoculats alimentats amb la dieta basal; S- β GM (SA), animals inoculats alimentats amb la dieta basal suplementada amb S- β GM (1 g/kg); Goma Duraió (DU), animals inoculats alimentats amb la dieta basal suplementada amb goma Duraió (1 g/kg); Goma Cassia (CA), animals inoculats alimentats amb la dieta basal suplementada amb goma Cassia (1 g/kg); parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae* (SC), animals inoculats alimentats amb la dieta basal suplementada amb parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae* (1 g/kg) i Colistina (CO), animals inoculats alimentats amb la dieta basal suplementada amb l'antibiòtic colistina. Les aus es van alimentar amb aquestes dietes del dia 1 al 23 amb excepció dels animals del tractament CO, que només van rebre l'antibiòtic del dia 5 a l'11. La inoculació amb *S. Enteritidis* es va dur a terme el dia 7 per administració oral de 10^8 unitats formadores de colònies (CFU). L'observació de l'ili i de la tonsil·la cecal a diferents magnituds (microscòpia òptica, electrònica de rastreig, electrònica de transmissió i confocal) es va realitzar en 5 animals de cada tractament (1 animal per gàbia). El seguiment del pes corporal es va determinar en la totalitat dels animals.

Resultats. En les imatges dels animals que van seguir una dieta suplementada amb β GM (tractaments SA, DU, CA i SC) s'observa la presència de més moc, efecte que es pot associar amb l'observació de més cèl·lules caliciformes. A més a més, les imatges també revelen una reducció en la presència de cèl·lules M, característica dels animals infectats amb *S. Enteritidis* (tractament PC). Pel que fa referència als paràmetres morfomètrics, les dades revelen que en els animals dels tractaments DU i CA, les vellositats són significativament més llargues que les dels animals del grup PC. En canvi, els resultats no posen de manifest cap efecte sobre la llargària i el diàmetre dels microvil·lis, com tampoc

no es varen observar diferències estadísticament significatives en el pes corporal dels animals. L'observació de la localització de la proteïna ZO-1 de la unió estreta suggereix la capacitat de tots els productes testats per reduir la presència de fluorescència al citosol observada en els animals PC.

Conclusions. Els resultats obtinguts posen de manifest efectes beneficiosos dels productes rics en β GM sobre la morfologia intestinal: un increment de la producció de moc, que constitueix una superfície d'adhesió i una barrera física per a l'accés dels bacteris a l'epiteli, i un increment de la superfície epitelial per a l'absorció de nutrients.

Article 2

Salmosan[®], a β -galactomannan-rich product, protects epithelial barrier function in Caco-2 cells infected by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis*

M. Teresa Brufau, Joan Campo-Sabariz, Ricard Bou, Sergi Carné, Joaquim Brufau, Borja Vilà, Ana M. Marqués, Francesc Guardiola, Ruth Ferrer, Raquel Martín-Venegas

Journal of Nutrition (2016) 146:1492-1498

doi: 10.3945/jn.116.232546

Índex d'impacte 2015 (*Journal Citation Report*): 3,740

Categoria: Nutrition & Dietetics (17/78, 1r quartil)

*Aquest article ha estat seleccionat per l'editor de la revista com a article recomanat del volum 146.

Els resultats d'aquest article han estat presentats als següents congressos:

- β -Galactomannans protect epithelial barrier function disruption induced by *Salmonella* Enteritidis in human intestinal Caco-2 cells. 6th International Immunonutrition Workshop, Palma de Mallorca (Espanya), octubre de 2012. Pòster.
- Salmosan[®] protects intestinal epithelial barrier function disrupted by *Salmonella* Enteritidis. 19th European Symposium on Poultry Nutrition, Potsdam (Alemanya), agost de 2013. Pòster.
Publicat a Proceedings de l'European Symposium on Poultry Nutrition.
<http://www.wpsa.com/index.php/wpsa-proceedings/2013/19th-european-symposium-on-poultry-nutrition/1552-salmosan-protects->

intestinal-epithelial-barrier-function-disrupted-by-salmonella-enteritidis/file. (darrer accés, 19 d'octubre de 2016).

- Salmosan® reduces oxidative stress induced by *Salmonella* Enteritidis in intestinal Caco-2 cell cultures. V Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, València (Espanya), gener de 2014. Pòster.
- Epithelial barrier function disrupted by *Salmonella* Dublin is protected by Salmosan®. VI Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, Oviedo (Espanya), febrer de 2015. Pòster.
Publicat a *Nutrición Hospitalaria* 2015;31(supp I):132.
- Intestinal infection by *Salmonella* Enteritidis is prevented by Salmosan®. VI Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, Oviedo (Espanya), febrer de 2015. Pòster.
Publicat a *Nutrición Hospitalaria* 2015;31(supp I):132.

Resum

Objectiu. L'objectiu d'aquest treball era investigar el paper protector del S- β GM sobre la funció epitelial de barrera en un model *in vitro* de cèl·lules intestinals Caco-2 inoculades amb *S. Enteritidis* i *S. Dublin*.

Material i Mètodes. El cultiu de cèl·lules Caco-2 diferenciades es van incubar durant 3 h amb *S. Enteritidis* o *S. Dublin* a una multiplicitat d'infecció (MOI) de 10 i 3, respectivament. En aquests cultius, es va avaluar l'efecte del S- β GM (500 μ g/mL) sobre la permeabilitat paracel·lular, per determinació de la resistència elèctrica transepitelial (TER), els fluxos de D-mannitol i de dextrà (*Fluorescein isothiocyanate–Dextran*, FD4) i la localització de les proteïnes de la unió estreta i de l'actina del citoesquelet per microscòpia confocal. Aquests experiments també es van realitzar incubant els cultius amb *S. Dublin*. A més a més, es va avaluar l'efecte de la *S. Enteritidis* sobre la formació de ROS i els productes de peroxidació lipídica. Finalment, es va estudiar l'efecte del S- β GM sobre la invasió, adhesió i viabilitat de la *S. Enteritidis*. A més a més, l'adhesió de *S. Enteritidis* a les cèl·lules Caco-2 i la invasió del cultiu es varen visualitzar per microscòpia electrònica de rastreig i de transmissió, respectivament.

Resultats. La inoculació del cultiu amb *S. Enteritidis* redueix significativament la TER (30%) i incrementa significativament els fluxos de D-mannitol i d'FD4 (374% i 54%, respectivament). En aquestes condicions, l'addició de S- β GM reverteix aquest efecte, completament en el cas de la TER i del flux d'FD4 i parcialment en el cas del flux de D-mannitol. Aquest paper protector del S- β GM es va confirmar amb la localització de l'occludina, de la ZO-1 i de l'actina del citoesquelet; en presència de S- β GM es recupera la fluorescència de la unió estreta i se'n redueix la citoplasmàtica. En el cas de *S. Dublin*, es va observar que el S- β GM també exerceix un paper protector molt similar al descrit per a *S. Enteritidis* sobre la permeabilitat paracel·lular. També es va observar la capacitat del S- β GM per a reduir la producció de ROS fins als valors dels cultius control, tot i que no s'afecta la formació de productes de peroxidació lipídica. A més a més, el S- β GM té capacitat per aglutinar el bacteri reduint així la invasió del cultiu per *S. Enteritidis* en un 32%.

Conclusions. Els resultats obtinguts demostren que el S- β GM té un efecte protector sobre la funció epitelial de barrera malgrat la inoculació de

cèl·lules Caco-2 amb *S. Enteritidis* i *S. Dublin*. En el cas de *S. Enteritidis*, aquest efecte es pot associar a una reducció de la invasió del cultiu i de la producció de ROS i a una modulació de la *leak pathway*.

Resultats no publicats 1: Efecte del Salmosan® sobre la permeabilitat paracel·lular en cultius de cèl·lules Caco-2 inoculades amb *Salmonella* Typhimurium

1.1. Introducció

Les infeccions per *S. Typhimurium* són la segona causa de salmonel·losi a la UE. Aquestes infeccions estan associades al consum de carn de porc i de boví contaminades (EFSA, 2011). L'objectiu d'aquest treball era estudiar el paper protector del S-βGM sobre la funció epitelial de barrera malmesa per la inoculació de cultius de cèl·lules Caco-2 amb *S. Typhimurium* tal i com s'ha descrit per a *S. Enteritidis* i *S. Dublin* a l'Article 2.

1.2. Material i Mètodes

Les cèl·lules intestinals Caco-2 diferenciades es van incubar durant 3 h amb *S. Typhimurium* a diferents MOI (3-50). En aquests cultius, es va avaluar l'efecte del S-βGM (10-1000 µg/mL) sobre la permeabilitat paracel·lular, mitjançant la determinació de la TER, els fluxos de D-mannitol i d'FD4. En paral·lel, es va determinar l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH) del medi, com a indicador de la viabilitat cel·lular.

1.3. Resultats

En primer lloc, es va determinar quina MOI de les assajades produïa una disminució de la TER i un augment del flux de D-mannitol, sense afectar la viabilitat cel·lular. Els resultats revelen que una MOI de 3 modifica la permeabilitat paracel·lular i que un increment de la MOI, afecta negativament la viabilitat del cultiu (Figura 1).

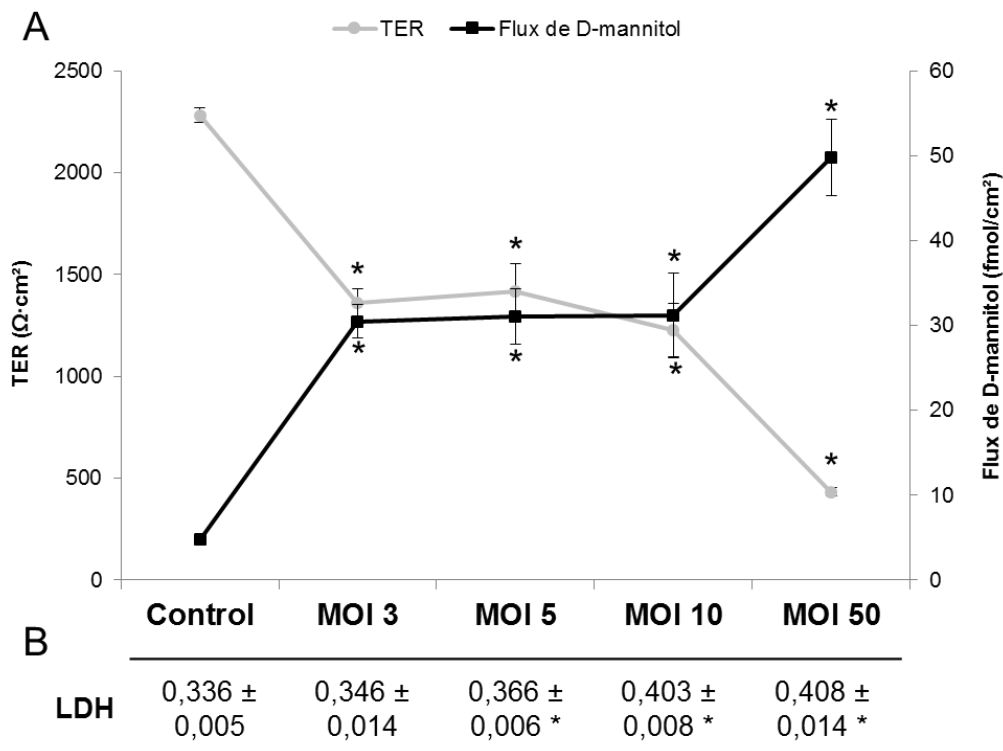


Figura 1. TER i flux de D-mannitol (A) i activitat LDH (B) després de 3 h d'incubació del cultiu amb *S. Typhimurium* a MOI creixents (3-50) en comparació amb els cultius no inoculats (Control). Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 15 filtres (5 experiments per triplicat). *, diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) respecte la condició Control (test *post hoc* Dunnett).

La presència de S-βGM, a totes les concentracions testades, no va modificar ni la TER ni el flux de D-mannitol (Figura 2A i 2B). En canvi, el S-βGM reverteix completament l'increment del flux d'FD4 provocat per la inoculació dels cultius amb *S. Typhimurium* (Figura 2C).

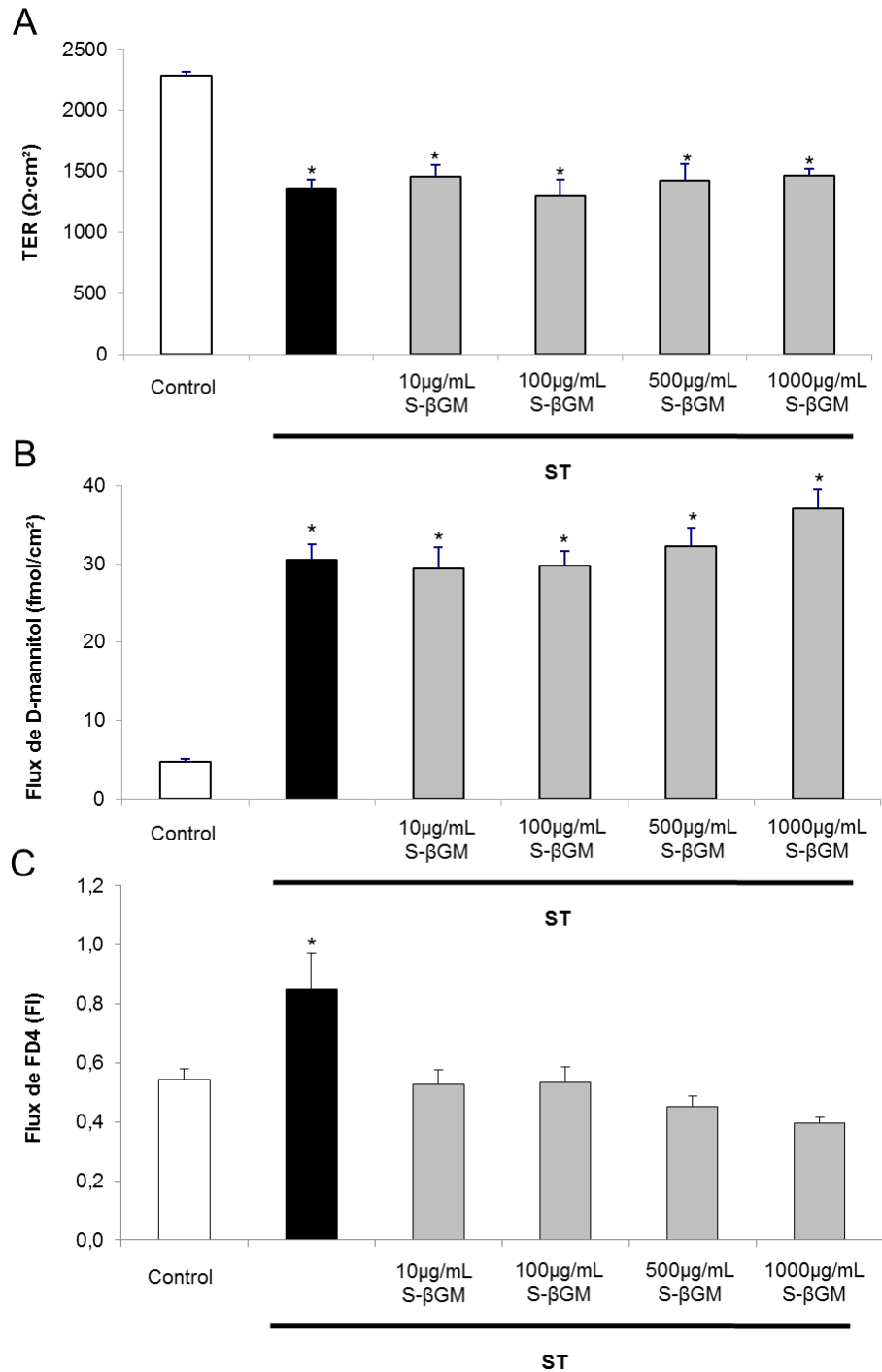


Figura 2. TER (A), fluxos de D-mannitol (B) i d'FD4 (C) després de 3 h d'incubació del cultiu amb *S. Typhimurium* (ST) a una MOI de 3 en absència o presència de S-βGM (10 μg/mL – 1000 μg/mL). També s'inclouen els resultats obtinguts en cultius no inoculats (Control). Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 12 filtres (4 experiments per triplicat). *, diferències estadísticament significatives (p < 0,05) respecte la condició Control (test *post hoc* Bonferroni). FI, intensitat de fluorescència.

1.4. Conclusions

El S-βGM és capaç de revertir de forma significativa el flux d'FD4, confirmant la participació del S-βGM en la modulació de la *leak pathway*. Tanmateix, no és capaç de prevenir totalment la disrupció de la funció epitelial de barrera causada per *S. Typhimurium*, ja que no modifica ni la TER ni el flux de D-mannitol.

1.5. Bibliografia

European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2009. EFSA Journal. 2011;9:2090. En línia a <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/pub/2090>. Darrer accés, 20 de setembre de 2016.

Resultats no publicats 2: Efecte dels SCFA sobre la invasió de cèl·lules Caco-2 per *Salmonella* Enteritidis

2.1. Introducció

És un fet abastament demostrat (Power et al., 2014; Pourabedin i Zhao, 2015) la capacitat de la microbiota per a protegir l'epiteli intestinal a través de la producció SCFA. Un dels efectes d'aquests àcids grassos és inhibir el creixement de patògens a través de la reducció del pH del contingut intestinal. A més a més, tal i com revelen els resultats de l'Article 2, el S-βGM disminueix un 32% la capacitat invasiva de *S. Enteritidis* en cèl·lules intestinals Caco-2. L'objectiu d'aquest treball era estudiar l'efecte d'aquests àcids grassos sobre la invasió dels cultius de cèl·lules Caco-2 per *S. Enteritidis* i el possible efecte sumatori en presència del S-βGM. Els àcids que es van estudiar van ser l'àcid làctic, produït majoritàriament per la microbiota intestinal dels gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*; l'àcid butíric, l'àcid gras produït per la microbiota intestinal com a resultat de la digestió de carbohidrats de la dieta i l'àcid fòrmic, additiu acceptat per ser utilitzat com a conservant del pinso (Goodarzi Boroojeni et al., 2014; Reglament CE n. 1831/2003 del Parlament Europeu i del Consell).

2.2. Material i Mètodes

Les cèl·lules intestinals Caco-2 es van incubar durant 3 h amb *S. Enteritidis* en absència o presència de S-βGM (500 µg/mL) i/o àcid làctic, àcid butíric o àcid fòrmic (20 mmol/L). Posteriorment, el cultiu es va incubar durant una 1 h amb medi de cultiu amb antibiòtic per tal d'eliminar els bacteris que no han envaït l'epiteli i es va seguir el protocol descrit a l'Article 2 per tal de determinar la invasió del bacteri per al recompte de les CFU que s'han format en cada placa.

2.3. Resultats

Com a referència, a la Figura 1A es mostren els resultats corresponents a la invasió del cultiu de l'Article 2, així com la capacitat del S-βGM de reduir-la. L'efecte dels diferents àcids grassos sobre la invasió de *S. Enteritidis* es mostra a la Figura 1B. En presència d'àcid làctic es va produir una reducció de la invasió del 35% i en el cas de l'àcid butíric i de l'àcid fòrmic, es va obtenir una reducció del 57% i del 63%, respectivament. Les dades també posen de manifest que

l'addició de S-βGM en presència d'aquests àcids no exerceix cap efecte addicional.

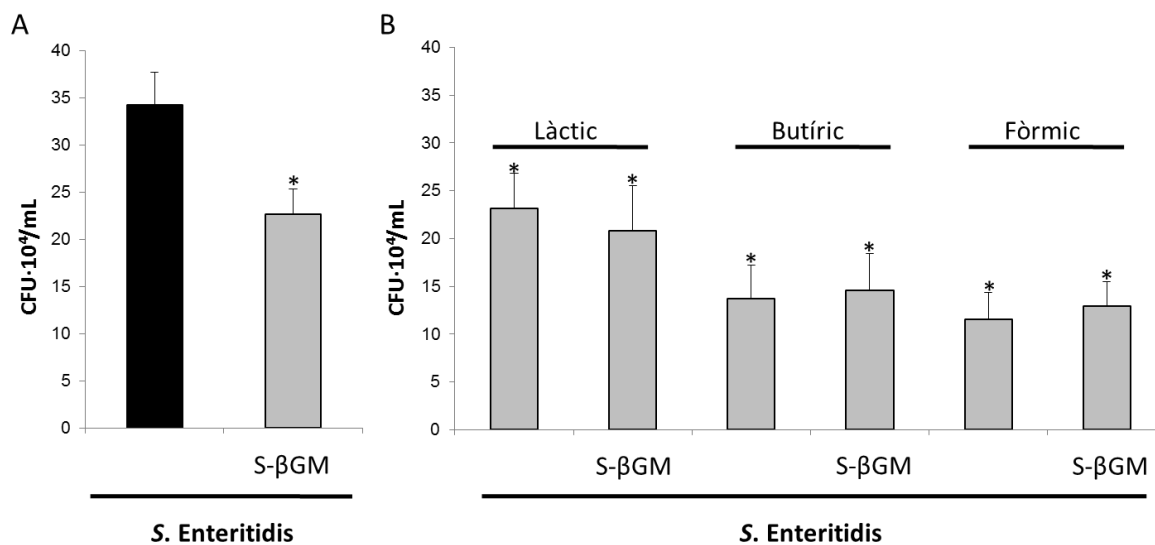


Figura 1. Número d'unitats formadores de colònies (CFU) corresponents als bacteris que han envaït els cultius de cèl·lules Caco-2 després de 3 h d'incubació amb *S. Enteritidis* a una MOI de 10 en presència de 500 µg/mL de S-βGM (A, 500 µg/mL), àcid làctic (20 mmol/L), àcid butíric (20 mmol/L), àcid fòrmic (20 mmol/L) o la combinació de S-βGM (500 µg/mL) amb aquests àcids (B). Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 30 plaques (10 experiments per triplicat) per les condicions de la figura A i n = 15 plaques (5 experiments per triplicat) per les condicions de la figura B. * , diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte a la condició a la que no s'ha afegit cap additiu (test *post hoc* Dunnett).

2.4. Conclusions

Els resultats confirmen l'efecte prèviament descrit per als SCFA sobre la invasió de l'epiteli intestinal per *S. Enteritidis* però la combinació d'aquests àcids amb el S-βGM no comporta cap efecte addicional. Així doncs, l'acció del S-βGM és independent del pH del medi mentre que la *S. Enteritidis* n'és sensible.

2.5. Bibliografia

Goodarzi Boroojeni F, Vahjen W, Mader A, Knorr F, Ruhnke I, Röhe I, Hafeez A, Villodre C, Männer K, Zentek J. The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poult Sci.* 2014;93:1440-1452.

Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr.* 2014;111:387-402.

Pourabedin M, Zhao X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362:fnv122.

Resultats no publicats 3: Establiment del co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i macròfags com a model *in vitro* d'inflamació intestinal

3.1. Introducció

L'objectiu de l'Article 3 era estudiar la capacitat del S-βGM per a protegir la funció epitelial de barrera en un model *in vitro* d'inflamació intestinal, independentment de la seva capacitat per aglutinar bacteris patògens. Per assolir aquest objectiu, ha estat necessari establir el model *in vitro* d'inflamació intestinal que consisteix en l'estimulació amb LPS de macròfags co-cultivats amb cèl·lules Caco-2 (Figura 1).

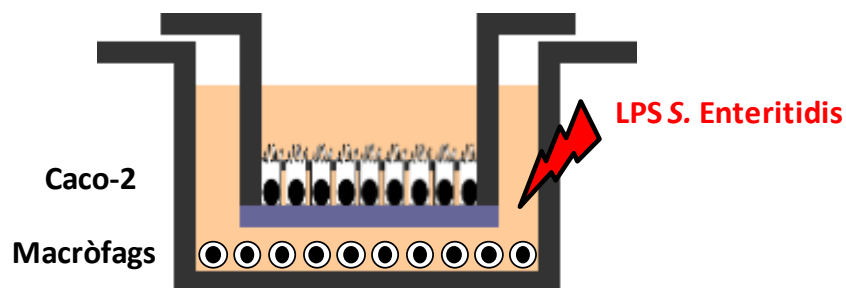


Figura 1. Dibuix del co-cultiu amb cèl·lules Caco-2 i macròfags estimulats amb LPS de *S. Enteritidis*.

Primer de tot, es va posar a punt el cultiu de macròfags utilitzant macròfags murins RAW 264.7 i monòcits humans THP-1. Aquests darrers, cal estimular-los amb *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) perquè es diferenciïn a macròfags. Un cop establerts aquests cultius, es va procedir a la posta a punt del co-cultiu.

3.2. Material i Mètodes

3.2.1. Cultiu de cèl·lules RAW 264.7

El cultiu de macròfags murins RAW 264.7 es manté a 37°C en una atmòsfera de 5% de CO₂, tal i com es descriu a Sintès et al. (2010). Aquestes cèl·lules es mantenen en flascons sembrats a una densitat de 40.000 cèl·lules/cm² en medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) que conté 4.5 g/L de D-glucosa i 2 mmol/L de L-glutamina i que es suplementa amb 10% (v:v) de sèrum fetal boví (FBS) inactivat per calor, 100 U/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina. Un cop transcorreguts 2 dies de manteniment en els flascons, el cultiu es raspa amb una rasqueta i les cèl·lules resultants es

sembren en plaques de cultiu de 12 pous a diferents densitats (40.000, 100.000 i 200.000 cèl·lules/cm²) i es mantenen en aquestes condicions durant 24 h.

3.2.2. Cultiu de cèl·lules THP-1

El cultiu de monòcits THP-1 d'origen humà es manté a 37°C en una atmòsfera de 5% de CO₂, tal i com es descriu a Martínez et al. (2013). Aquestes cèl·lules, sembrades a una dilució 1:3 del passatge anterior, es mantenen en suspensió en plaques de Petri en medi de cultiu *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) que conté 2 g/L de D-glucosa i 2 mmol/L de L-glutamina i que es complementa amb 10% (v/v) de FBS inactivat per calor, 100 UI/mL de penicil·lina, 100 µg/mL d'estreptomicina i 0,05 mmol/L de β-mercaptoetanol. Un cop transcorreguts 4 dies de manteniment en les plaques, les cèl·lules es sembren en plaques de 12 pous a diferents densitats (150.000, 300.000 i 500.000 cèl·lules/cm²). Els cultius es mantenen en aquestes condicions durant 72 h en presència de 100 nmol/L de PMA per tal d'activar la PKC (Kim et al., 2011) i així estimular la seva diferenciació a macròfags que queden adherits a la superfície de la placa de cultiu.

3.2.3. Recompte de cèl·lules viables

El recompte de les cèl·lules viables es duu a terme per a les dues línies cel·lulars per tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi tot seguint la metodologia descrita per Parks et al. (1979).

3.2.4. Determinació de l'activitat LDH

Com a indicador de la viabilitat cel·lular, s'ha determinat l'activitat de l'enzim LDH alliberat al medi de cultiu tal i com es descriu a l'Article 2.

3.2.5. Establiment del co-cultiu com a model d'inflamació intestinal

El model *in vitro* d'inflamació intestinal consisteix en el co-cultiu de cèl·lules epitelials intestinals Caco-2 d'origen humà i macròfags de ratolí o humans estimulats amb LPS. Per al co-cultiu s'ha seguit el protocol descrit per Nishitani et al. (2009). El co-cultiu es realitza en filtres de policarbonat (Transwells®, 12 mm de diàmetre i 0.4 µm de diàmetre de porus). Per a l'establiment del co-cultiu, les diferents línies cel·lulars es sembren tal i com es descriu a continuació:

- Cultiu de cèl·lules Caco-2: quan el cultiu assoleix aproximadament el 80% de la confluència (després de 7 dies en cultiu en flascó), es tripsinitza i les

cèl·lules resultants es sembren en Transwells® a una densitat de 100.000 cèl·lules/cm². El co-cultiu s'inicia quan aquestes cèl·lules assoleixen la diferenciació (19-21 dies després de la sembra).

- Cultiu de cèl·lules RAW 264.7: un cop transcorreguts 2 dies de manteniment en els flascons, el cultiu es raspa i es sembra en plaques de 12 pous a 200.000 cèl·lules/cm² i es manté durant 24 h.
- Cultiu de cèl·lules THP-1: un cop transcorreguts 4 dies de manteniment en les plaques, el cultiu es sembra en plaques de 12 pous a una densitat de 300.000 cèl·lules/cm² i es manté durant 72 h en presència de 100 nmol/L de PMA.

Per a l'establiment del co-cultiu, primer de tot es comprova que les cèl·lules Caco-2 estiguin completament diferenciades a través de la determinació de la TER. Seguidament, el co-cultiu es posa en marxa en introduir cadascun dels filtres on ha crescut el cultiu de cèl·lules Caco-2 en un pou amb macròfags. Per estimular la producció de citoquines per part dels macròfags, s'addicionen diferents concentracions d'LPS de *S. Enteritidis* al compartiment basolateral durant 48 h.

La validació del model d'inflamació s'ha dut a terme a través de l'estudi de la viabilitat de les cèl·lules Caco-2 (determinació de l'activitat LDH), de la permeabilitat paracel·lular i de la quantificació de TNF α en el compartiment basolateral.

3.3. Resultats

3.3.1. Creixement del cultiu de cèl·lules RAW 264.7

A la Figura 2A es mostren els resultats del seguiment del cultiu de cèl·lules RAW 264.7 sembrades a diferents densitats durant 24 h. Les dades revelen que per a les densitats de 40.000 i 100.000 cèl·lules/cm², el percentatge del recompte cel·lular respecte a les cèl·lules sembrades (en una superfície de creixement de 3.8 cm²) és del 80% mentre que per a la densitat més elevada, aquest valor es superior al 100%. En aquest cas, no s'han detectat diferències significatives en l'activitat LDH (Figura 2B).

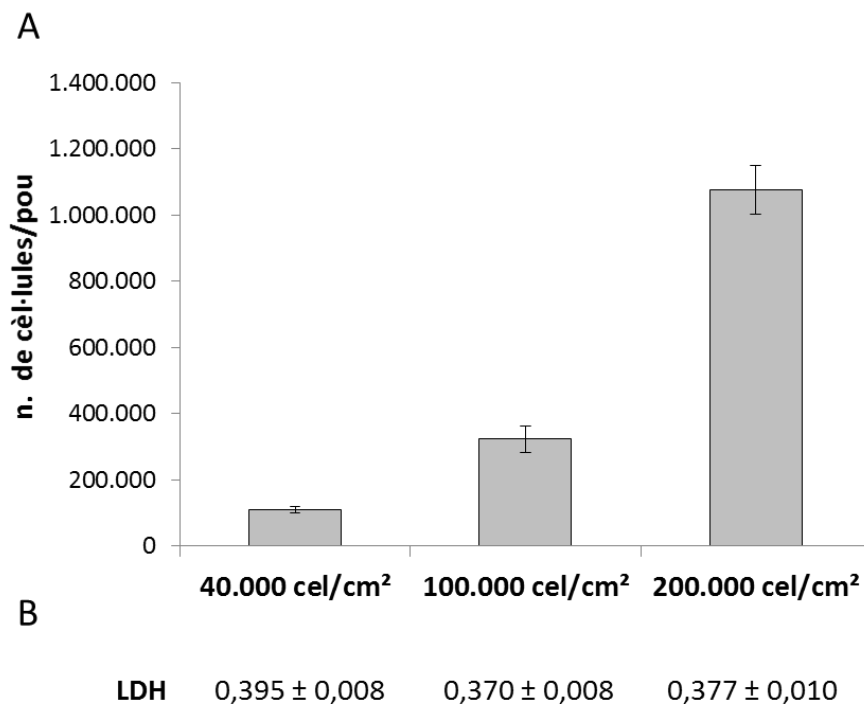


Figura 2. Recompte de cèl·lules RAW 264.7 en funció de la densitat de la sembra (A). A la figura també es mostren les dades de l'activitat LDH (B). Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 20 - 23 cultius.

3.3.2. Posta a punt del co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i RAW 264.7

Per a la posta a punt del co-cultiu, es varen realitzar els experiments utilitzant una densitat de sembra de les cèl·lules RAW 264.7 de 200.000 cèl·lules/cm². Els resultats obtinguts (Figura 3) posen de manifest una reducció de la TER en els cultius Control en els que també s'observa una producció creixent de TNF α .

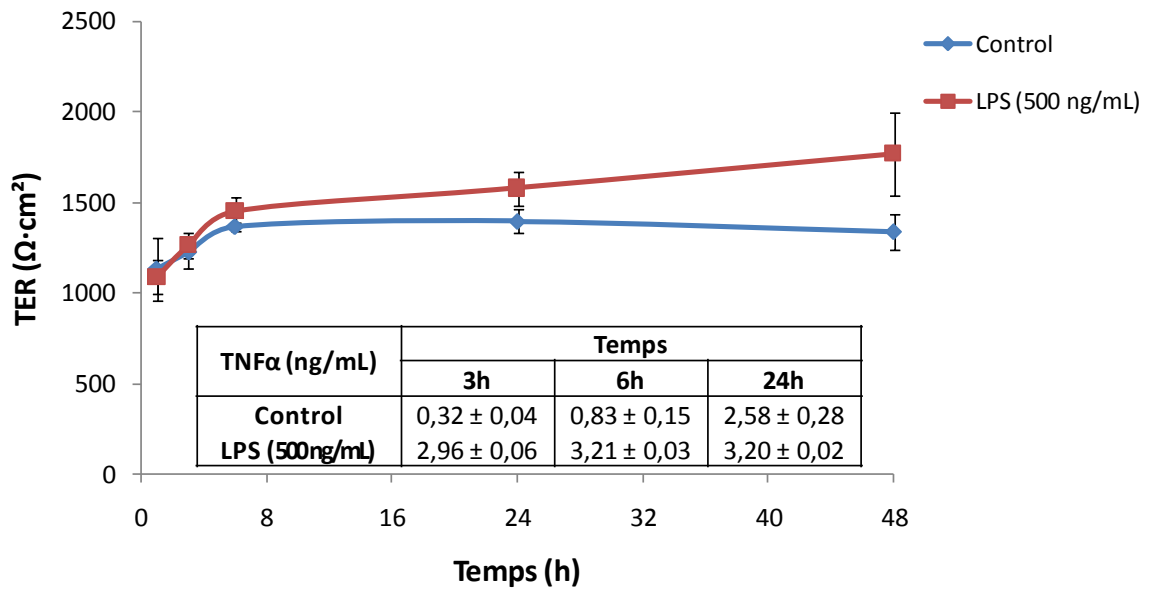


Figura 3. Evolució de la TER durant 48 h en els co-cultius de cèl·lules Caco-2 i RAW 264.7 (200.000 cèl·lules/cm²) estimulats al compartiment basolateral amb LPS de *S. Enteritidis* (500 ng/mL). El Control correspon a un co-cultiu no estimulat amb LPS. També s'inclouen els resultats obtinguts en la quantificació de TNFα. Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 5 - 6 filtres.

3.3.3. Creixement i diferenciació del cultiu de cèl·lules THP-1

A la Figura 4 es mostren els resultats obtinguts en el seguiment dels cultius de cèl·lules THP-1 sembrades a diferents densitats durant 72 h en presència de PMA. Els resultats mostren que a mesura que augmenta la densitat del cultiu s'obtenen un nombre superior de cèl·lules diferenciades (macròfags dTHP-1). Tanmateix, en calcular el percentatge de cèl·lules diferenciades, i per tant recomptades, respecte al nombre de cèl·lules sembrades (en una superfície de creixement de 3.8 cm²) s'observa que aquest valor es troba al voltant del 40%. Pel que fa a la determinació de l'activitat de la LDH com a indicador de la viabilitat del cultiu (Taula 1), no s'han observat diferències significatives entre les diferents densitats assajades, com tampoc s'han observat diferències significatives entre les diferents densitats assajades respecte a aquells cultius que no se'ls va aplicar PMA.

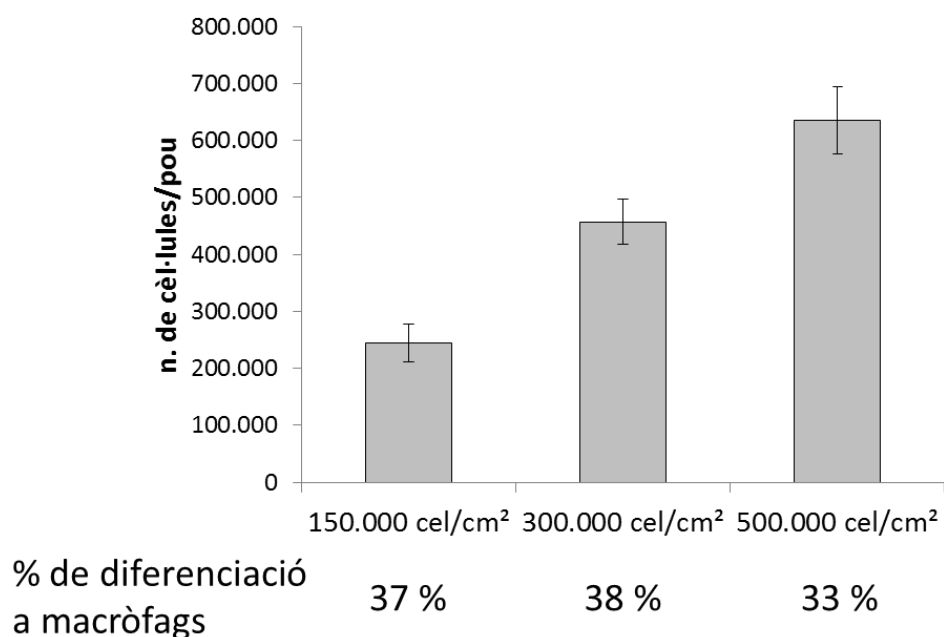


Figura 4. Recompte de dTHP-1 en funció de la densitat de la sembra. A la figura també es mostren el percentatge de macròfags obtinguts en funció de la densitat sembrada de monòcits. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 12 - 21 cultius.

Taula 1. Activitat LDH de monòcits THP-1 en absència de PMA i de macròfags dTHP-1 en presència de PMA.¹

	150.000 cel/cm ²	+ 100 nM PMA	300.000 cel/cm ²	+ 100 nM PMA	500.000 cel/cm ²	+ 100 nM PMA
LDH	0,171 \pm 0,007	0,169 \pm 0,005	0,170 \pm 0,007	0,177 \pm 0,005	0,184 \pm 0,006	0,181 \pm 0,003

¹Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 12 - 21 cultius. *, diferències estadísticament significatives (p<0,05) respecte la corresponent condició en absència de PMA (test ANOVA).

3.3.4. Posta a punt del co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i dTHP-1

Per a la posta a punt del co-cultiu, es varen realitzar uns experiments previs estimulats des del compartiment basolateral amb LPS de *S. Enteritidis* a diferents concentracions (100, 250, 500 i 1000 ng/mL). En aquests co-cultius es va determinar la TER al llarg de 48 h i es va determinar la producció de TNF α en el compartiment basolateral a les 24 h com a indicadors de validació del model d'inflamació. A més de la condició Control, que és un co-cultiu que no s'ha

estimulat amb LPS, s'ha estudiat una condició amb cèl·lules Caco-2 incubades amb LPS de *S. Enteritidis* (500 ng/mL) al compartiment basolateral en absència de macròfags per tal de comprovar si l'LPS pot modificar la funció epitelial de barrera tot exercint el seu efecte directament sobre les cèl·lules Caco-2.

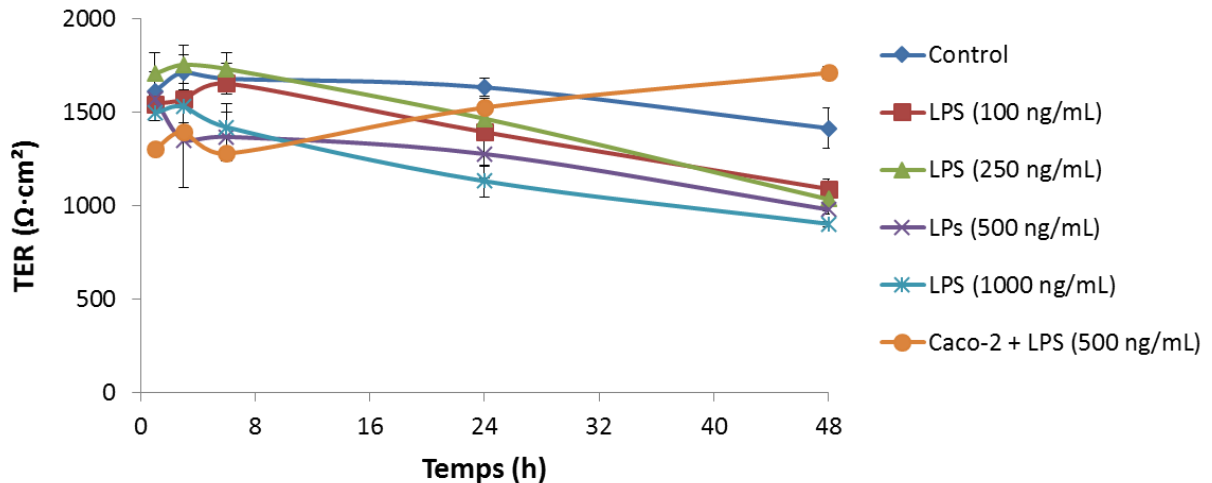


Figura 5. Evolució de la TER durant 48 h dels co-cultius de cèl·lules Caco-2 i dTHP-1 estimulats al compartiment basolateral amb concentracions diferents d'LPS de *S. Enteritidis*. El Control correspon a un co-cultiu no estimulat amb LPS i la condició Caco-2 + 500 ng/mL d'LPS correspon a un cultiu de cèl·lules Caco-2 incubades amb LPS de *S. Enteritidis* al compartiment basolateral. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 3 - 12$ filtres.

Els resultats obtinguts en aquestes condicions (Figura 5) revelen que a les 6 h d'incubació s'inicia la reducció de la TER en els co-cultius tractats amb LPS. En el Control i en els cultius de Caco-2 incubats amb LPS no es modifica la TER.

Pel que fa a la producció de $\text{TNF}\alpha$ (Taula 2) els resultats mostren que els co-cultius estimulats amb LPS secreten la citocina, en canvi, ni en els cultius Control ni en els cultius de cèl·lules Caco-2 estimulats amb LPS s'incrementa la producció d'aquesta citocina en cap dels temps estudiats.

Taula 2. Producció de TNF α en el compartiment basolateral del co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i dTHP-1 estimulats al compartiment basolateral amb concentracions diferents d'LPS de *S. Enteritidis*.¹

TNF α (ng/mL)	Temps		
	3h	6h	24h
Control	nd	nd	nd
LPS (100 ng/mL)	0,33 \pm 0,08	2,04 \pm 0,42	0,30 \pm 0,12
LPS (250 ng/mL)	1,84 \pm 0,55	3,64 \pm 1,32	1,74 \pm 0,36
LPS (500 ng/mL)	0,28 \pm 0,21	3,40 \pm 0,98	2,66 \pm 0,36
LPS (1000 ng/mL)	8,09 \pm 2,68	15,21 \pm 0,91	16,83 \pm 0,70
Caco-2 + LPS (500 ng/mL)	nd	nd	nd

¹Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 3 – 12 filtres.

3.4. Conclusions

A partir d'aquests resultats es va prendre la decisió de descartar el co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i macròfags RAW 264.7, degut a la producció de TNF α en la condició Control i la no alteració de la TER i es va escollir el co-cultiu de cèl·lules Caco-2 i macròfags dTHP-1 per a l'establiment del model d'inflamació intestinal *in vitro*. Així, per aquest co-cultiu les condicions experimentals més adequades escollides per procedir amb l'estudi són: estimular amb 250 ng/mL d'LPS de *S. Enteritidis* els macròfags dTHP-1 sembrats a 300.000 cèl·lules/cm².

3.5. Bibliografia

Kim JA, Ahn BN, Kong CS. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages. *Inflamm Res.* 2011;60:1131-1138.

Martínez V, Galbiati V, Corsini E, Martin-Venegas R, Vinardell MP, Mitjans M. Establishment of an *in vitro* photoassay using THP-1 cells and IL-8 to discriminate photoirritants from photoallergens. *Toxicol In Vitro.* 2013;27:1920-1927.

Nishitani Y, Tanoue T, Yamada K, Ishida T, Yoshida M, Azuma T, Mizuno. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* 2009;141:1702-1709.

Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:1962-1966.

Sintes J, Romero X, de Salort J, Terhorst C, Engel P. Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;88:687-697

Article 3

Salmosan[®], a β -galactomannan-rich product, contributes to restore intestinal epithelial barrier function by modulating the inflammatory response

M Teresa Brufau, Joan Campo-Sabariz, Sergi Carné, Ruth Ferrer, Raquel Martín-Venegas

Journal of Nutritional Biochemistry, en primera revisió (2016)

Índex d'impacte 2015 (*Journal Citation Report*): 4,668

Categoria: Nutrition & Dietetics (8/78, 1r quartil)

Els resultats d'aquest article han estat presentats al següent congrés:

- Protective role of Salmosan[®] in an *in vitro* model of intestinal inflammation. VII Workshop Probióticos, Prebióticos y salud. Evidencia científica, Sevilla (Espanya), gener de 2016. Pòster.

Resum

Objectiu. L'objectiu d'aquest treball era investigar el paper protector del S- β GM, sol o en presència del probiòtic *Lactobacillus plantarum*, sobre la funció epitelial de barrera independentment de la seva capacitat per aglutinar bacteris patògens.

Material i Mètodes. La permeabilitat paracel·lular es va estudiar en dos models *in vitro*: el primer va consistir en el co-cultiu de cèl·lules Caco-2 diferenciades i macròfags (dTHP-1) estimulats amb LPS de *S. Enteritidis* (250 ng/mL) i el segon, en el cultiu de cèl·lules Caco-2 diferenciades estimulades amb TNF α (200 ng/mL). En ambdós casos, es va avaluar la TER en presència de S- β GM (500 mg/ml), *L. plantarum* (MOI 10) o la combinació d'ambdós. A més a més, en el co-cultiu es va determinar la producció de citocines (IL-10, IL-6 i TNF α). Finalment, es va estudiar la capacitat del S- β GM per modificar el creixement de *L. plantarum*.

Resultats. En tots dos models, l'estimulació amb LPS o TNF α produeix una disminució estadísticament significativa la TER que no es modifica per la presència de S- β GM o *L. plantarum*. En canvi, la combinació d'ambdós, recupera la TER fins als valors de les cèl·lules no estimulades. A més a més, la incubació dels cultius de cèl·lules Caco-2 no estimulats amb la combinació de S- β GM i *L. plantarum*, incrementa significativament els valors de TER. En el co-cultiu, l'estimulació amb LPS incrementa significativament la producció de TNF α i no modifica la d'IL-10 ni la d'IL-6. L'adició de S- β GM redueix significativament la producció de TNF α i incrementa significativament la d'IL-10. En canvi, l'adició de *L. plantarum* incrementa significativament la producció d'IL-6 i no modifica la producció de les altres citocines. També es va observar que l'adició de la combinació de S- β GM i *L. plantarum* redueix significativament la producció de TNF α i incrementa significativament la d'IL-10 i la d'IL-6. Aquests efectes es varen atribuir al S- β GM en el cas de TNF α i IL-10 i a *L. plantarum*, en el cas d'IL-6. D'altra banda, també es va observar que el S- β GM estimula el creixement de *L. plantarum*.

Conclusions: Els resultats obtinguts posen de manifest que el S- β GM protegeix la funció epitelial de barrera a través de l'estimulació del creixement del probiòtic i de la modulació de la resposta immunitària.

IV. DISCUSSIÓ

Una de les primeres propietats atribuïdes als MOS és la seva capacitat de ser reconeguts per les lectines específiques per a la mannanosa de la fímbria de tipus 1 dels bacteris gramnegatius (Duguid et al., 1966; Bäumlner et al., 1997). Les fímbrries de tipus 1 consisteixen en una estructura en forma de vareta d'1 a 2 mm amb una subunitat de suport estructural FimA sobre la que s'acoblen diverses subunitats: FimF, FimG i FimH (Aprikian et al., 2011). La FimH conté les lectines que reconeixen els residus de mannanosa presents a les glicoproteïnes de la membrana de les cèl·lules eucariotes (Kisiela et al., 2006; Guo et al., 2009; Aprikian et al., 2011; Dwyer et al., 2011; Yue et al., 2012; Grzymajło et al., 2013). Per tant, la unió dels patògens als MOS redueix l'adhesió i la consegüent invasió del patogen a l'epiteli intestinal (Spring et al., 2000; Iji et al., 2001; Burkey et al., 2004; Solis de los Santos et al., 2007). En un estudi previ (Article previ - Badia et al., 2012a), en cèl·lules intestinals porcines (IPI-2I) infectades amb *S. Typhimurium* es va confirmar que el S- β GM també exerceix aquest efecte. Així, en afegir aquest producte, *S. Typhimurium* s'adhereix a la superfície del MOS i, consegüentment, es redueix l'adhesió a l'epiteli. En canvi, en cèl·lules intestinals Caco-2 (Article 2), tot i que es va observar l'adhesió de la *S. Enteritidis* al S- β GM (les imatges de microscòpia electrònica de rastreig són molt similars a les obtingudes a l'Article previ), en determinar el nombre de bacteris adherits a la capa de cèl·lules no es va obtenir cap reducció significativa. Tanmateix, els estudis d'invasió (Article 2) si que demostren que el S- β GM disminueix la presència de *S. Enteritidis* a l'interior de la cèl·lula. A més a més, les imatges obtingudes a l'intestí de pollastres (Article 1) alimentats amb dietes riques en β GM (S- β GM, Goma Duraió, Goma Cassia i parets cel·lulars de llevats de *Sacharomyces cerevisiae*), revelen que la presència de cèl·lules M, característiques de l'intestí dels animals infectats (Frost et al., 1997; Jepson i Clark, 1998), és menor respecte als animals infectats i no tractats. En aquests darrers animals, tant a l'ili com a les tonsil·les cecals, també es va observar la formació de lamel·lipodis, tret característic de la infecció per *Salmonella* quan aquesta expressa les proteïnes efectores codificades per SPI-1 i SPI-2. Per tant, un cop demostrat que el S- β GM redueix la invasió de *S. Enteritidis*, una possible hipòtesi per explicar la manca d'efecte sobre l'adhesió en cultius de cèl·lules Caco-2 podria ser que el S- β GM s'uneixi en més proporció a les cèl·lules Caco-2 que no pas a les IPI-2I. Per aquesta raó, el S- β GM, amb les salmonel·les adherides, romandria adherit a l'epiteli i les salmonel·les serien comptades com

a adherides a les cèl·lules. De fet, s'ha descrit la presència de receptors de mannososa a l'epiteli intestinal de les vellositats (Uemura et al., 2002; Martínez-Pomares, 2012; Witoonsaridsilp et al., 2012) que poden reconèixer el S-βGM. Per tant, les diferències en els resultats d'adhesió entre les Caco-2 i les IPI-2I es podrien explicar per una diferent expressió d'aquests receptors o d'altres estructures capaces de reconèixer mannososa entre ambdues cèl·lules intestinals.

Els estudis d'invasió també es van dur a terme en presència de SCFA (Resultats no publicats 2) tals com l'àcid làctic i butíric, generats per la microbiota intestinal (Flint et al., 2015), i l'àcid fòrmic utilitzat com a conservant del pinso (Goodarzi Boroojeni et al., 2014; Reglament CE n. 1831/2003 del Parlament Europeu i del Consell). Tal com era d'esperar, la presència dels àcids va disminuir la invasió de *S. Enteritidis*, però en combinar-los amb el S-βGM no es va obtenir cap efecte addicional. De fet, el pH àcid que s'assoleix en aquests cultius afecta la viabilitat de la salmonel·la i per tant, la capacitat per unir-se a l'epiteli i envair-lo (Salsali et al., 2006) i, probablement, també la seva capacitat per adherir-se al S-βGM.

En els estudis in vitro en cèl·lules intestinals Caco-2, es van utilitzar tres serotips diferents de *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*) i els resultats de l'estudi de la viabilitat de les cèl·lules Caco-2 en presència del patògen revelen que *S. Enteritidis* és la menys agressiva, seguida de *S. Dublin* i *S. Typhimurium*. Les dades posen de manifest que cap de les MOI estudiades per a *S. Enteritidis* (3-50) va afectar la viabilitat del cultiu mentre que per a *S. Dublin* i *S. Typhimurium* una MOI 50 i una MOI 5, respectivament, ja incrementaven l'activitat LDH. A una MOI que no compromet la viabilitat del cultiu de cèl·lules intestinals, els tres serotips envaeixen les cèl·lules Caco-2 i provoquen l'obertura de la via paracel·lular (Article 2 i Resultats no publicats). La mínima MOI que, de forma estadísticament significativa, augmenta la permeabilitat paracel·lular és la de 10 per a *S. Enteritidis*, mentre que només és necessària una MOI de 3 per als altres dos serotips, confirmant així la menor agressivitat de *S. Enteritidis*. En presència d'aquestes MOI, els tres serotips disminueixen la TER i augmenten els fluxos de D-mannitol i d'FD4. En estudiar la permeabilitat paracel·lular utilitzant la TER i el fluxos de D-mannitol i FD4 es posa de manifest la presència de les diferents vies de difusió descrites per Watson et al. (2001). La *pore pathway*, present a l'epiteli en condicions

fisiològiques, i la *leak pathway* que s'obre en resposta a agents externs capaços d'alterar les unions estretes. Així doncs, la mesura de la TER i del flux de D-mannitol no permet determinar la selectivitat de les dues vies (*leak* i *pore*). En canvi, l'increment observat per al flux d'FD4 amb els tres serotips posa de manifest que la salmonel·la provoca la obertura de la *leak pathway* que té un diàmetre superior i pot ésser, per tant, utilitzada per aquest substrat de pes molecular més elevat. L'obertura d'aquesta via es pot associar a la deslocalització de la ZO-1 i de l'occludina de la unió estreta (Figura 13). Els resultats obtinguts en cultius incubats amb *S. Enteritidis* i *S. Dublin* permeten confirmar la deslocalització d'ambdues proteïnes (Article 2). A l'intestí dels pollastres infectats amb *S. Enteritidis* (Article 1) també es va observar la deslocalització de la ZO-1. En aquesta espècie animal també es va intentar estudiar l'efecte de la infecció sobre la localització de l'occludina però cap dels anticossos assajats han presentat reactivitat en aquesta espècie animal.

Està descrit que l'increment de la permeabilitat paracel·lular causat per l'estrès oxidatiu està associat a la fosforilació de residus de tirosina tant de l'occludina com de la ZO-1 (Rao et al., 2002). Així, en els estudis *in vitro* es va observar que la infecció per *S. Enteritidis* genera estrès oxidatiu (Article 2). A més a més, també es va testar l'efecte de la genisteïna, un inhibidor de tirosina-cinases (Peterson, 1995). En afegir la genisteïna en els cultius infectats amb *S. Enteritidis*, es van recuperar completament els valors de la TER i parcialment els del flux de D-mannitol (Article 2), fet que demostra la implicació de l'estrès oxidatiu en la regulació de la unió estreta però que no descarta la participació d'altres mecanismes implicats en la regulació de la via paracel·lular.

En els cultius (Article 2), tal i com descriuen altres autors, també es va observar la formació d'agregats citoplasmàtics d'actina (Jepson et al., 1995; La Regione et al., 2003) que posen de manifest la contracció de l'anell d'actina del citoesquelet. En estudis realitzats amb *S. Typhimurium*, Wells et al. (1999) i Murli et al. (2001), relacionen l'obertura de la via paracel·lular amb la reorganització de l'actina del citoesquelet com a conseqüència de l'acció de les proteïnes efectores codificades tant per SPI-1 com per SPI-2. Aquestes proteïnes efectores activen la família Rho i la via MAPK que acaben provocant la secreció de diferents citocines per part de la cèl·lula epitelial, entre les que cal destacar IL-1 β per la seva implicació en la regulació de la permeabilitat de la

unió estreta (veure Taula 2). Aquesta citocina disminueix l'expressió d'occludina i activa la MLCK, que al seu torn, posa en marxa l'activitat de la miosina, la contracció de l'anell d'actina i conseqüentment, l'obertura de la unió estreta. Així doncs, la secreció de diferents citocines proinflamàtòries induïda pel patogen també contribueixen a la obertura de la via paracel·lular.

En afegir el S- β GM als cultius de cèl·lules Caco-2 infectats amb *S. Enteritidis* (Article 2), la producció de ROS, la TER, el flux d'FD4 i la localització de la ZO-1 i l'actina varen recuperar els valors control. En els pollastres (Article 1), la internalització observada per la ZO-1 en els animals infectats no es va visualitzar en els animals que havien estat sotmesos a una dieta suplementada amb els productes rics en β GM, com tampoc en els animals que havien estat tractats amb l'antibiòtic, confirmant així que el S- β GM és capaç de recuperar la distribució de ZO-1. La recuperació total de la producció de ROS posa de manifest que el S- β GM pot protegir l'obertura de la via paracel·lular ocasionada per l'estrès oxidatiu generat pel patogen. A més a més, la recuperació total del flux d'FD4 posa de manifest que el S- β GM té capacitat per a restablir l'obertura de la *leak pathway*, mentre que la recuperació parcial del flux de D-mannitol posa de relleu que la funcionalitat de la *pore pathway* no està plenament restablerta. En aquest sentit, el fet que l'occludina i la peroxidació lipídica no recuperin els valors dels controls, indica que el S- β GM, en aquest model *in vitro* de cèl·lules intestinals en cultiu, no reverteix tots els mecanismes activats per *S. Enteritidis*. Caldria doncs considerar la inducció de la secreció de citocines proinflamàtòries que contribueixen en l'obertura de la via paracel·lular. Cal destacar que mentre l'efecte protector del S- β GM també s'observa per a la infecció amb *S. Dublin* (Article 2), en el cas de infecció per *S. Typhimurium*, tot i que el S- β GM reverteix totalment el flux d'FD4, cap concentració d'aquest producte és capaç de revertir ni la TER ni el flux de D-mannitol (Resultats no publicats 1). Aquestes diferències en la protecció exercida pel S- β GM segons el serotip posen de manifest la heterogeneïtat en la virulència. Aquestes diferències es podrien atribuir a diferències genètiques que determinarien la resistència a antibiòtics (Kisiela et al., 2012; Yue i Schifferli, 2014), diferències en la configuració de la subunitat FimH de la fímbria tipus 1, diferències en la capacitat per a induir l'expressió de citocines i/o en la capacitat de replicació en els macròfags, entre d'altres (Okamura et al., 2005; Setta et al., 2012; Dhanani et al., 2015; Pan et al., 2015). En aquest sentit, està descrit que la secreció d'IL-

1 β induïda per *S. Typhimurium* és més elevada que en el cas de *S. Enteritidis* (Ktsoyan et al., 2013), fet que podria explicar la menor protecció observada per al S- β GM en el cas de *S. Typhimurium* en els cultius de cèl·lules Caco-2.

Així doncs, la protecció que exerceix el S- β GM en la infecció per *S. Enteritidis* en cultius de cèl·lules intestinals Caco-2 es pot explicar per la seva capacitat per a disminuir la invasió del patogen, la seva capacitat per regular la *leak pathway* i la reducció de l'estrès oxidatiu. A més de ser reconegut pel bacteri, el S- β GM també pot ser reconegut pels receptors de mannososa presents a l'epiteli intestinal. Aquests receptors, en reconèixer residus de mannososa, tal i com descriuen Netea i van der Meer (2011), activen la via del NF- κ β , tot i que els mecanismes i les conseqüències d'aquesta activació encara es desconeixen (Hoving et al., 2014). Badia et al. (2012a), varen observar que el S- β GM disminueix l'expressió de diferents citocines i quimiocines (IL-1 α i IL-6, entre d'altres) en ser addicionat al medi de cultiu de cèl·lules intestinals IPI-2I, tot demostrant que aquest producte interacciona amb les cèl·lules intestinals i indueix una resposta també en absència de patogen. La IL-1 α té capacitat per a iniciar la secreció de citocines i quimiocines sense necessitat d'un estímul extern (Rider et al., 2013; Garlanda et al., 2013; Di Paolo i Shayakhmetov, 2016) i en interaccionar amb el seu receptor estimula la secreció de citocines proinflamatòries inclús la seva pròpia secreció. Brody i Durum (1989) van observar que la D-mannosa impedeix l'alliberament d'IL-1 α , limitant així la seva sobre-expressió i la subseqüent secreció d'altres citocines proinflamatòries. Està descrit que la secreció d'IL-1 α provoca una disminució de la TER, del flux d'inulina i una deslocalització de la ZO-1, de manera que aquesta citocina també podria estar implicada en l'obertura de la via paracel·lular exercida pel bacteri (Nilsson et al., 1998). Així doncs, la capacitat del S- β GM per a reduir l'expressió d'IL-1 α a les cèl·lules intestinals també podria contribuir al seu efecte protector sobre la via paracel·lular. En un altre estudi però, els mateixos autors (Badia et al., 2012b) no van obtenir els mateixos resultats pel que fa aquesta citocina, posant de manifest la variabilitat de la resposta que pot induir el S- β GM .

L'estimulació del sistema immunitari és un altre dels mecanismes descrits pels quals els MOS exerceixen la seva funció promotora de salut intestinal (Ferket et al., 2002; Gaggia et al., 2010). Cal tenir en compte que els receptors de

mannosa estan presents també en gran quantitat a les cèl·lules del sistema immunitari de la làmina pròpia, com els macròfags i les DC. Així, es va posar a punt un model *in vitro* que consisteix en el co-cultiu de Caco-2 i macròfags dTHP-1 estimulats amb LPS de *S. Enteritidis* (Resultats no publicats 3). Amb aquest estímul es polaritzen els monòcits cap a macròfags de tipus M1 que secreten citocines proinflamatòries (Guha i Mackman, 2001), tal com es descriu a l'Article 3. En aquest model de co-cultiu, el S- β GM s'afegeix al compartiment apical on hi ha els enteròcits, mentre que la producció de citocines es determina al compartiment basolateral on estan presents els macròfags estimulats amb LPS. Es tracta, doncs, d'un model en el que es simulen les condicions fisiològiques de l'intestí. L'estimulació amb LPS incrementa la permeabilitat paracel·lular de manera que aquest model permet investigar el paper protector del S- β GM sobre la funció epitelial de barrera independentment de la seva capacitat per a reduir la invasió de les cèl·lules epitelials per *S. Enteritidis*. Els resultats mostren que, en el co-cultiu estimulat amb LPS, el S- β GM incrementa la producció d'IL-10, citocina secretada per macròfags M2. Una hipòtesi per explicar aquest augment de la secreció d'IL-10 és que el S- β GM indueixi la polarització dels macròfags M1 a M2. Aquesta polarització podria ser causada per la interacció del S- β GM amb les Caco-2, ja sigui a través dels receptors de mannososa o d'altres estructures, amb la conseqüent activació de vies de senyalització de la cèl·lula epitelial que es tradueixi en un estímul al compartiment basolateral capaç d'induir la polarització d'M1 a M2. Tampoc es pot descartar que els oligosacàrids del S- β GM alliberats per l'efecte de la β -mannanasa arribin al compartiment basolateral per l'espai intercel·lular com a conseqüència de l'obertura de la via paracel·lular i que s'uneixin als receptors de mannososa presents als macròfags, tot afavorint així la seva diferenciació a M2. Cal tenir en compte, a més, que la pròpia IL-10 secretada per aquests macròfags també és capaç d'induir la seva pròpia polarització a M2 (Rószler, 2015). L'estimulació de la producció d'IL-10 per part del S- β GM ja havia estat observada per Badia et al. (2012a) en DC. Aquesta citocina està implicada en la modulació de la producció i de les propietats del moc (Pelaseyed et al., 2014). En els pollastres alimentats amb la dieta suplementada amb productes rics en β GM (Article 1) es va observar un increment de la presència de cèl·lules caliciformes i de la producció de moc. Per tant, aquest efecte es podria atribuir a la capacitat d'aquests productes per a

estimular la producció d'IL-10. L'increment de la producció de moc ja ha estat observat per altres autors per a productes rics en MOS (Baurhoo et al., 2007; Chichlowski et al., 2007; Leforestier et al., 2009; Chee et al., 2010). A més a més, la IL-10 també s'ha descrit que pot inhibir la producció d'altres citocines proinflamatòries (Shuai i Liu, 2003; Hu et al., 2007). Aquesta citocina en interaccionar amb el seu receptor activa la via cinasa Janus (JAK)-transductor de senyal i activador de la transcripció (STAT), que donal·loc a la translocació al nucli de STAT3. Aquest factor, és el que mitjançant un seguit de reaccions acaba inhibint la producció de citocines proinflamatòries en inhibir la via de NF- κ B (Shuai i Liu, 2003; Hu et al., 2007; Levast et al., 2015). Tanmateix, malgrat la inducció de la secreció d'IL-10 per part del S- β GM (Article 3), no s'ha observat una protecció de la funció epitelial de barrera en co-cultius incubats en presència d'aquest producte.

Els estudis *in vivo* no permeten determinar si la suplementació amb MOS produeix una millora de la funció intestinal de barrera per acció directa del MOS sobre l'epiteli intestinal o aquest efecte ha de ser atribuir a la microbiota intestinal. En aquest sentit, tot i no haver caracteritzat la composició de la microbiota intestinal dels pollastres, a les imatges obtingudes es va observar un increment del nombre de bacteris adherits al moc en els animals que van seguir les dietes suplementades amb productes rics en β GM (Article 1). Per tant, aquesta observació podria suggerir un efecte prebiòtic per al S- β GM. Si aquest producte estimula el creixement de la microbiota intestinal això comportaria la competició per l'espai i els nutrients entre la microbiota i els patògens, fet que es pot traduir en el desplaçament i eliminació de la salmonel·la. Per aquesta raó, també s'ha estudiat l'efecte de *L. plantarum*, un probiòtic àmpliament utilitzat com a suplement de dietes per a pollastres (Dec et al., 2014; Feng et al., 2016) sobre la funció intestinal de barrera en els models *in vitro*. Un primer resultat interessant ha estat que el S- β GM estimula el creixement *L. plantarum* (Article 3). Per tant, se li poden atribuir funcions com a prebiòtic. Pel que fa a l'estudi de la funció epitelial de barrera, les dades indiquen que en els co-cultius estimulats amb LPS, la presència de *L. plantarum* incrementa la producció d'IL-6 (Article 3), tot i que en aquest cas tampoc s'observa la recuperació de la permeabilitat paracel·lular. En tractar-se d'una citocina pleiotròpica, el paper de la IL-6 en la funció intestinal de barrera és molt controvertida. Així, hi ha autors que en condicions *in vitro* observen que

incrementa la permeabilitat paracel·lular, sobretot per a ions de baix pes molecular (Suzuki et al., 2011; Al-Sadi et al., 2014). En canvi, d'altres autors, en models d'inflamació intestinal *in vivo*, observen un efecte protector (Al-Sadi et al., 2009). La possible explicació per aquesta dualitat està relacionada amb l'equilibri entre l'activació d'STAT1 i STAT3. Aquesta citocina, en interaccionar amb el seu receptor, activa la via JAK-STAT donant lloc a la translocació al nucli de STAT1 i STAT3. STAT1 és un inductor de la via NK- κ B mentre que, tal i com s'ha comentat anteriorment, STAT3 l'inhibeix.

Així, malgrat que la presència de S- β GM o de *L. plantarum* no reverteix l'obertura de la via paracel·lular ocasionada per LPS, la combinació dels dos productes sí que dona lloc a la recuperació completa dels valors de TER (Article 3). Una possible hipòtesi per a l'efecte positiu observat per a aquesta combinació és que la producció conjunta d'IL-10 i d'IL-6 decanti l'equilibri cap a STAT3, el que provocaria la inhibició de la producció de citocines proinflamàtores i la consegüent restauració de la funció epitelial de barrera. De fet, tal i com es mostra a l'Article 3, la combinació de S- β GM i *L. plantarum* produeix una disminució significativa de la secreció de TNF α . Tal com s'ha comentat a la introducció, el TNF α activa MLCK, que fosforila MLC, el que provoca la contracció de l'anell d'actina i per tant la consegüent obertura de la via paracel·lular (Cunningham i Turner, 2012). A més a més, cal destacar que la combinació del S- β GM i el probiòtic també recupera els valors de la TER dels cultius de cèl·lules Caco-2 (sense la presència de macròfags) estimulades amb TNF α (Article 3), on la inhibició de la producció d'aquesta citocina proinflamàtores és, però, irrellevant. Així, la protecció de la funció epitelial de barrera exercida per la combinació S- β GM i *L. plantarum* no només es pot explicar per la inhibició de la secreció de TNF α , si no que els resultats també suggereixen que s'hauria de produir la inhibició de l'efecte d'aquesta citocina proinflamàtores sobre la funció epitelial de barrera. A l'hora d'interpretar aquests resultats cal tenir en compte les propietats com a prebiòtic del S- β GM sobre el creixement de *L. plantarum*. D'aquest probiòtic n'és coneguda la capacitat per a regular l'estat de les unions estretes per inhibició de l'activació d'ERK (Ko et al., 2007; Liu et al., 2011), per inhibició de la via p38, així com també per la inhibició de la via NF- κ B a causa de la inhibició de la ubiquitinització de I κ B fosforilada (Kim et al., 2012; Wu et al., 2016). ERK i la via p38 formen part de la família MAPK. ERK s'uneix directament amb la regió C

terminal de l'occludina i en regula la localització (Basuroy et al., 2006) i com la via p38, en estar activades comporten la translocació al nucli de la proteïna activadora 1 (AP1), que és un factor de transcripció (Kim et al., 2012; Wu et al., 2016). Per tant, el probiòtic *L. plantarum* és un potent inhibidor dels factors de transcripció que comporten l'inici de la resposta immunitària.

Per últim, està descrit que alguns MOS incrementen la superfície epitelial per a l'absorció de nutrients (Solis de los Santos et al., 2005; Baurhoo et al., 2007; Chichlowski et al., 2007; Morales-López et al., 2009). En el cas del S-βGM, no s'observa cap efecte morfomètric a l'intestí de pollastre (Article 1). En canvi, si que es va observar un increment de la llargària de les vellositats per als pollastres que van seguir la dieta suplementada amb Goma Duraió i Goma Cassia. Tot i que Cheled-Shoval et al., (2011) descriuen com l'administració de MOS a embrions de pollastre *in ovo* milloren la maduració i el desenvolupament de l'intestí dels animals, la digestibilitat i la funció barrera, aquest efecte es podria atribuir també als efectes dels MOS sobre la microbiota intestinal. En aquest sentit, s'ha descrit que la suplementació de la dieta amb *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* incrementen la superfície epitelial per a l'absorció de nutrients (Hajati i Rezaei, 2010).

V. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts es poden extreure, per a cadascun dels objectius plantejats, les següents conclusions:

1. Determinar l'efecte de diversos MOS rics en β GM (S- β GM, Goma Duraió, Goma Cassia i parets cel·lulars de *Saccharomyces cerevisiae*) sobre la morfologia intestinal de pollastres d'engreix infectats amb *S. Enteritidis*.

- La suplementació de la dieta dels animals amb β GM comporta un augment de la presència de cèl·lules caliciformes de l'ili i de les tonsil·les cecals amb el conseqüent increment de la producció de moc. Aquest moc constitueix una barrera física per a l'accés dels bacteris a l'epiteli, fet que es correlaciona amb una reducció de la presència de cèl·lules M.
- La suplementació de la dieta dels animals amb Goma Duraió i Goma Cassia comporta un increment de la llargària de les vellositats amb el conseqüent increment de la superfície epitelial per a l'absorció de nutrients.
- Tots els productes testats tenen la capacitat de per prevenir la deslocalització de la proteïna ZO-1 de la unió estreta observada en els animals infectats amb *S. Enteritidis*.

Aquests resultats obtinguts per al pollastre consitueixen una primera prova dels efectes beneficiosos del S- β GM i d'altres MOS rics en β GM sobre la funció intestinal de barrera a través de mecanismes que inclourien la reducció de la invasió per *S. Enteritidis*, la secreció de moc i la protecció de la unió estreta.

2. Investigar el paper del S- β GM en la prevenció de la disrupció de la funció epitelial de barrera induïda per la colonització de cultius de cèl·lules intestinals Caco-2 per diferents serotips de *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*).

- El S- β GM té un efecte protector sobre la funció epitelial de barrera malmesa per la inoculació de cèl·lules Caco-2 amb *S. Enteritidis*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*. En el cas de *S. Enteritidis*, aquest efecte es

pot associar a la reducció de la invasió del cultiu i de la producció de ROS i a la modulació de la *leak pathway* de la via paracel·lular.

- La combinació d'àcid làctic, butíric o fòrmic amb el S-βGM no comporta cap efecte addicional sobre la invasió de cèl·lules Caco-2 per *S. Enteritidis*.

Aquests resultats obtinguts en cultius de cèl·lules Caco-2, permeten confirmar la capacitat del S-βGM per aglutinar el bacteri i reduir la invasió de l'epiteli i per a protegir la funció epitelial de barrera, tal i com s'ha observat en el pollastre. A més a més, l'efecte específic sobre la *leak pathway* permet atribuir a aquest producte un efecte addicional que exerceix directament sobre la permeabilitat paracel·lular.

3. Avaluar la capacitat del S-βGM per a protegir la funció epitelial de barrera, independentment de la seva capacitat per aglutinar *S. Enteritidis*, en dos models *in vitro* d'inflamació intestinal: co-cultius de cèl·lules Caco-2 i macròfags dTHP1 estimulats amb LPS de *S. Enteritidis* i cultius de cèl·lules Caco-2 estimulades amb TNFα.

- En el model dels co-cultius estimulats amb LPS, el S-βGM incrementa la producció d'IL-10 i disminueix la de TNFα però no reverteix l'obertura de la via paracel·lular.
- En el model de cèl·lules Caco-2 estimulades amb TNFα, el S-βGM tampoc exerceix cap efecte beneficiós sobre la permeabilitat paracel·lular.

4. Investigar el paper de la combinació de S-βGM amb el probiòtic *L. plantarum* en la prevenció de la disrupció de la funció epitelial de barrera en els dos models d'inflamació descrits a l'objectiu anterior.

- L'addició de la combinació de S-βGM i *L. plantarum* als cultius de cèl·lules Caco-2 no estimulades redueix la permeabilitat paracel·lular.
- L'addició de *L. plantarum* als co-cultius estimulats amb LPS i als cultius estimulats amb TNFα no reverteix l'obertura de la via paracel·lular.

- L'addició de *L. plantarum* als co-cultius estimulats amb LPS incrementa la producció d'IL-6.
- El S- β GM estimula el creixement del *L. plantarum*.
- La combinació de S- β GM i *L. plantarum* incrementa la producció d'IL-10 i IL-6 i en disminueix la de TNF α en els co-cultius estimulats amb LPS.
- La combinació de S- β GM i *L. plantarum* reverteix l'obertura de la via paracel·lular en els co-cultius estimulat amb LPS i en els cultius estimulats amb TNF α .

La capacitat de la combinació d'ambdós productes per a protegir la funció epitelial de barrera es podria explicar per la modulació de la secreció de citocines implicades en la regulació de la unió estreta. A més a més, el fet que el S- β GM estimuli el creixement de *L. plantarum* li atorga un valor addicional com a simbiòtic.

Així doncs, el S- β GM, un MOS ric en β GM, exerceix uns efectes beneficiosos sobre la funció intestinal de barrera que permeten considerar-lo un bon candidat com a alternativa als AGP.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:131-144.

Agunos A, Ibuki M, Yokomizo F, Mine Y. Effect of dietary beta1-4 mannoiose in the prevention of *Salmonella enteritidis* infection in broilers. *Br Poult Sci*. 2007;48:331-341.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 4a edició (2004). Barcelona: Ediciones Omega, S.A.

Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2765-2778.

Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol*. 2011;300:G1054-G1064.

Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, Ma TY. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One*. 2014;9:e85345.

Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*. *Infect Immun*. 2003;71:6446-6452.

Aprikian P, Interlandi G, Kidd BA, Le Trong I, Tchesnokova V, Yakovenko O, Whitfield MJ, Bullitt E, Stenkamp RE, Thomas WE, Sokurenko EV. The bacterial fimbrial tip acts as a mechanical force sensor. *PLoS Biol*. 2011;9:e1000617.

Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491.

Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Front Microbiol*. 2016;7:464.

Assimakopoulos SF, Papageorgiou I, Charonis A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011;2:123-137.

Badia R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Lizardo R, Dobrescu I, Martin-Venegas R, Ferrer R, Salmon H, Martínez P, Brufau J. β -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clin Vaccine Immunol.* 2012a;19:368-376.

Badia R, Zanello G, Chevaleyre C, Lizardo R, Meurens F, Martínez P, Brufau J, Salmon H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged *in vitro* with *Escherichia coli* F4 (K88). *Vet Res.* 2012b;43:4.

Badia R, Lizardo R, Martínez P, Brufau J. Oligosaccharide structure determines prebiotic role of β -galactomannan against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium *in vitro*. *Gut Microbes.* 2013;4:72-75.

Bahar B, O'Doherty JV, Maher S, McMorrow J, Sweeney T. Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells. *Mol Immunol.* 2012;51:283-291.

Barreau F, Hugot JP. Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17:91-98.

Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 2006;393:69-77

Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:402593.

Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 1997;412:149-158.

Bäumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016;535:85-93.

Baurhoo B, Phillip L, Ruiz-Feria CA. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult Sci*. 2007;86:1070–1078.

Berge AC, Wierup M. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal*. 2012;6:557-564.

Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:303-310.

Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol*. 1989;143:1183-1187.

Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*. 2012;3:62-70.

Burkey TE, Dritz SS, Nietfeld JC, Johnson BJ, Minton JE. Effect of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Anim Sci*. 2004;82:397-404.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-253.

Callegari MA, Dalto DB, da Silva CA. A Review of Prevention and Control Methods of *Salmonella* species in Swine Production and the Role of Dietary Non-Nutritional Additives. *Asian J Anim Vet Adv*. 2005;10:803-829.

Casteleyn C, Doom M, Lambrechts E, Van den Broeck W, Simoens P, Cornillie P. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. *Avian Pathol* 2010;39:143-150.

Castoldi A, Favero de Aguiar C, Moraes-Vieira PM, Olsen Saraiva Câmara N1. They Must Hold Tight: Junction Proteins, Microbiota And Immunity In Intestinal Mucosa. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16:655-671.

Céniat MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:1981-1992.

Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*. 2010;10:735-744.

Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128:53-59.

Chee SH, Iji PA, Choct M, Mikkelsen LL, Kocher A. Functional interactions of manno-oligosaccharides with dietary threonine in chicken gastrointestinal tract. I. Growth performance and mucin dynamics. *Br Poult Sci*. 2010; 51:658–666.

Cheled-Shoval SL, Amit-Romach E, Barbakov M, Uni Z. The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre- and posthatch periods in chickens. *Poult Sci*. 2011;90:2301-2310.

Chen HQ, Yang J, Zhang M, Zhou YK, Shen TY, Chu ZX, Zhang M, Hang XM, Jiang YQ, Qin HL. *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G1287-G1297.

Chichlowski M, Croom WJ, Edens FW, McBride BW, Qiu R, Chiang CC, Daniel L R, Havenstein GB, Koci MD. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. *Poult Sci*. 2007; 86:1121–1132.

Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A, Mullin JM. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41:283-301.

Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2014;262:153-166.

Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850:236-252.

Corr SC, Palsson-McDermott EM, Grishina I, Barry SP, Aviello G, Bernard NJ, Casey PG, Ward JB, Keely SJ, Dandekar S, Fallon PG, O'Neill LA. MyD88 adaptor-like (Mal) functions in the epithelial barrier and contributes to intestinal integrity via protein kinase C. *Mucosal Immunol*. 2014;7:57-67.

Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258:34-42.

de Geus ED, Vervelde L. Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. *Dev Comp Immunol*. 2013;41:341-351.

De Santis S, Cavalcanti E, Mastronardi M, Jirillo E, Chieppa M. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front Immunol*. 2015;6:612.

Dec M, Puchalski A, Urban-Chmiel R, Wernicki A. Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poult Sci*. 2014;93:2464-2472.

Deuring JJ, de Haar C, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ. The cell biology of the intestinal epithelium and its relation to inflammatory bowel disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:798-806.

Dhanani AS, Block G, Dewar K, Forgetta V, Topp E, Beiko RG, Diarra MS. Genomic Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. *PLoS One*. 2015;10:e0128773.

Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol*. 2016;17:906-913.

Dongarrà ML, Rizzello V, Muccio L, Fries W, Cascio A, Bonaccorsi I, Ferlazzo G. Mucosal immunology and probiotics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13:19-26.

Duguid JP, Anderson ES, Campbell I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J Pathol Bacteriol*. 1966;92:107-138.

Dunkley KD, Callaway TR, Chalova VI, McReynolds JL, Hume ME, Dunkley CS, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 2009;15:26-35.

Dwyer BE, Newton KL, Kisiela D, Sokurenko EV, Clegg S. Single nucleotide polymorphisms of fimH associated with adherence and biofilm formation by serovars of *Salmonella enterica*. *Microbiology*. 2011;157:3162-3171.

Ebersbach T, Andersen JB, Bergström A, Hutkins RW, Licht TR. Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes in vitro. *Res Microbiol*. 2012;163:22-27.

European Food Safety Authority. Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus*. 2009. En línia a <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1036> Darrer accés, 20 de setembre de 2016.

European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2009. *EFSA Journal*. 2011;9:2090. En línia a <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/pub/2090>. Darrer accés, 20 de setembre de 2016.

European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. 2012;10:2597. En línia a <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/pub/2597>. Darrer accés, 20 de setembre de 2016.

European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal*. 2015;13:4329. En línia a <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal/pub/4329>. Darrer accés, 20 de setembre de 2016.

Farhadi A, Keshavarzian A, Ranjbaran Z, Fields JZ, Banan A. The role of protein kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:1-7.

Feng J, Wang L, Zhou L, Yang X, Zhao X. Using In Vitro Immunomodulatory Properties of Lactic Acid Bacteria for Selection of Probiotics against *Salmonella* Infection in Broiler Chicks. PLoS One. 2016;11:e0147630.

Ferket PR, Parks CW, Grimes JL. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. In: Proc. Multi-State. Meet., Indianapolis, 2002. IN. p. 63-76.

Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2012;1:10-16.

Ferrer R, Gil M, Moretó M, Oliveras M, Planas JM. Hexose transport across the apical and basolateral membrane of enterocytes from different regions of the chicken intestine. Pflugers Arch. 1994;426:83-88.

Flannigan KL, Geem D, Harusato A, Denning TL. Intestinal Antigen-Presenting Cells: Key Regulators of Immune Homeostasis and Inflammation. Am J Pathol. 2015;185:1809-1819.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9:577-589.

Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. Proc Nutr Soc. 2015;74:13-22.

Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci. 2008;86:E173-E187.

Frost A J, Bland AP, Wallis TS. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella* Typhimurium. Vet Pathol. 1997;34:369-386.

Fung TC, Artis D, Sonnenberg GF. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. Immunol Rev. 2014;260:35-49.

Gaggia F, Mattaelli P, Biavatti. Probiotics and prebiotics in animal feeding for sale food production. Int J Food Microbiol. 2010;141:S15-S28.

García-Ponce A, Citalán-Madrid AF, Velázquez-Avila M, Vargas-Robles H, Schnoor M. The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity. *Thromb Haemost.* 2015;113:20-36.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39:1003-1018.

Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology.* 2009;214:554-561.

Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:465-479.

Gill N, Wlodarska M, Finlay BB. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cell Microbiol.* 2011;13:660-669.

Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, Trotta MC, Elisei W, Penna A, Lecca PG, Picchio M, Tursi A. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res.* 2015;2015:501361.

Goodarzi Boroojeni F, Vahjen W, Mader A, Knorr F, Ruhnke I, Röhe I, Hafeez A, Villodre C, Männer K, Zentek J. The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poult Sci.* 2014;93:1440-1452.

Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev.* 2012;245:147-163.

Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:3-20.

Grzymajło K, Ugorski M, Kolenda R, Kędzierska A, Kuźmińska-Bajor M, Wieliczko A. FimH adhesin from host unrestricted *Salmonella* Enteritidis binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than FimH adhesins from host restricted *Salmonella* Abortus-ovis, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Dublin. *Vet Microbiol.* 2013;166:550-557.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13:85-94.

Guo A, Cao S, Tu L, Chen P, Zhang C, Jia A, Yang W, Liu Z, Chen H, Schifferli DM. FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. *Microbiology*. 2009;155:1623-1633.

Hajati H, Rezaei M. The Application of Prebiotics in Poultry Production. *Int J Poult Sci*. 2010;9:298-304.

Hammer AM, Morris NL, Earley ZM, Choudhry MA. The First Line of Defense: The Effects of Alcohol on Post-Burn Intestinal Barrier, Immune Cells, and Microbiome. *Alcohol Res*. 2015;37:209-222.

Han GG, Kim EB, Lee J, Lee JY, Jin G, Park J, Huh CS, Kwon IK, Kil DY, Choi YJ, Kong C. Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerplus*. 2016;5:911.

Hand TW. Interleukin-18: The Bouncer at the Mucosal Bar. *Cell*. 2015;163:1310-1312.

Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:53-66.

Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:1206-1237.

Harrison OJ, Srinivasan N, Pott J, Schiering C, Krausgruber T, Ilott NE, Maloy KJ. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3⁺ Treg cell function in the intestine. *Mucosal Immunol*. 2015;8:1226-1236.

Hevia A, Delgado S, Sánchez B, Margolles A. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front Microbiol*. 2015;6:1285.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96:736-749.

Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol.* 2014;16:185-194.

Howarth GS. Probiotic-derived factors: probiotaceuticals? *J Nutr.* 2010;140:229-230.

Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2007;82:237-243.

Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol.* 2014;5:481.

Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J.* 2011;187:182-188.

Iji PA, Saki AA, Tivey DR. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J Sci Food Agric.* 2001;81:1186-1192.

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015;16:343-353.

Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2012;153:216-222.

Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL. Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun.* 1995;63:356-359.

Jepson MA, Clark MA. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* 1998;6:359-365.

Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:352-361.

Johnson-Henry KC, Pinnell LJ, Waskow AM, Irrazabal T, Martin A, Hausner M, Sherman PM. Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate

inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury. *J Nutr.* 2014;144:1725-1733.

Kadlec R, Jakubec M. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *J Dairy Sci.* 2014;97:1983-1990.

Kato K, Ishiwa A. The role of carbohydrates in infection strategies of enteric pathogens. *Trop Med Health.* 2015;43:41-52.

Kawashima T, Hayashi K, Kosaka A, Kawashima M, Igarashi T, Tsutsui H, Tsuji NM, Nishimura I, Hayashi T, Obata A. *Lactobacillus plantarum* strain YU from fermented foods activates Th1 and protective immune responses. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:2017-2024.

Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.* 2005;26:326-333.

Kim H, Jung BJ, Jung JH, Kim JY, Chung SK, Chung DK. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid alleviates TNF- α -induced inflammation in the HT-29 intestinal epithelial cell line. *Mol Cells.* 2012;33:479-486.

Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12:319-330.

Kinnebrew MA, Pamer EG. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. *Immunol Rev.* 2012;245:113-131.

Kisiela D, Laskowska A, Sapeta A, Kuczkowski M, Wieliczko A, Ugorski M. Functional characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology.* 2006;152:1337-1346.

Kisiela D, Chattopadhyay S, Libby SJ, Karlinsey JE, Fang FC, Tchesnokova V, Kramer JJ, Beskhlebnaya V, Samadpour M, Grzymajło K, Ugorski M, Lankau EW, Mackie RI, Clegg S, Sokurenko EV. Evolution of *Salmonella enterica* Virulence via Point Mutations in the Fimbrial Adhesin. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002733.

Ko JS, Yang HR, Chang JY, Seo JK. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor-alpha. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1962-1965.

Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci.* 2007;109:161-165.

Kovacs-Nolan J, Kanatani H, Nakamura A, Ibuki M, Mine Y. β -1,4-mannobiose stimulates innate immune responses and induces TLR4-dependent activation of mouse macrophages but reduces severity of inflammation during endotoxemia in mice. *J Nutr.* 2013;143:384-391.

Krumbeck JA, Maldonado-Gomez MX, Ramer-Tait AE, Hutkins RW. Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Curr Opin Gastroenterol.* 2016;32:110-119.

Ktsoyan Z, Ghazaryan K, Manukyan G, Martirosyan A, Mnatsakanyan A, Arakelova K, Gevorgyan Z, Sedrakyan A, Asoyan A, Boyajyan A, Aminov R. Inflammatory Responses to Salmonella Infections Are Serotype-Specific. *Int J Bacteriol.* 2013;2013:168179.

Kunisawa J, Kurashima Y, Kiyono H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:523-530.

La Ragione RM, Cooley WA, Velge P, Jepson MA, Woodward MJ. Membrane ruffling and invasion of human and avian cell lines is reduced for aflagellate mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Int J Med Microbiol* 2003;293:261–272.

Lamichhane A, Azegamia T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 2014;32:6711-6723.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:171-184.

Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res.* 2015;13:11-18.

Leforestier G, Blais A, Blachier F, Marsset-Baglieri A, Davila-Gay AM, Perrin E, Tomé D. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *Eur J Nutr.* 2009;48:457–464.

Levast B, Li Z, Madrenas J. The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance. *Cytokine*. 2015;75:291-301.

Liu Z, Shen T, Zhang P, Ma Y, Qin H. *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep*. 2011;38:3471-3480.

Lutful Kabir SM. The role of probiotics in the poultry industry. *Int J Mol Sci*. 2009;10:3531-3546.

Malgas S, van Dyk JS, Pletschke BI. A review of enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015;31:1167-1175.

Mancabelli L, Ferrario C, Milani C, Mangifesta M, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Viappiani A, Ossiprandi MC, van Sinderen D, Ventura M. Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environ Microbiol*. 2016 Apr 30. En premsa.

Martinez FO i Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2016;6:13.

Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012;92:1177-1186.

McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9:265-278.

Min YW, Rhee PL. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin Ther*. 2015;37:968-975.

Mitjans M, Barniol G, Ferrer R. Mucosal surface area in chicken small intestine during development. *Cell Tissue Res*. 1997;290:71-78.

Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778:670-691.

Morales-López R, Auclair E, García F, Esteve-García E, Brufau J. Use of yeast cell walls, β -1, 3/1, 6-glucans, and mannoproteins in broiler chickens diets. *Poult. Sci*. 2009;88:601-607.

Moreira LR, Filho EX. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79:165-178.

Murli S, Watson RO, Galán JE. Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* 2001;3:795–810.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41:14-20.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfealler MA. *Microbiología médica.* 2006. 5a ed. Barcelona: Elsevier.

Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr Polym.* 2007;68:587-597.

Netea MG, van der Meer JW. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med.* 2011;364:60-70.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a006049J

Nilsson M, Husmark J, Björkman U, Ericson LE. Cytokines and thyroid epithelial integrity: interleukin-1 α induces dissociation of the junctional complex and paracellular leakage in filter-cultured human thyrocytes. *Clin Endocrinol Metab.* 1998 Mar;83:945-52.

Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One.* 2014;9:e108827.

Nishiyama K, Nakazato A, Ueno S, Seto Y, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. Cell surface-associated aggregation-promoting factor from *Lactobacillus gasseri* SBT2055 facilitates host colonization and competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol.* 2015;98:712-726.

Ohno H, Kanaya T, Williams IR. M cell differentiation: distinct lineage or phenotypic transition? *Salmonella* provides answers. *Cell Host Microbe*. 2012;12:607-609.

Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA, Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;107:327-335.

Onyiah JC, Colgan SP. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73:4203-4212.

Ortega-González M, Ocón B, Romero-Calvo I, Anzola A, Guadix E, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O. Nondigestible oligosaccharides exert nonprebiotic effects on intestinal epithelial cells enhancing the immune response via activation of TLR4-NFκB. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:384-393.

Pan D, Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 2014;5:108-119.

Pan D, Rostagno MH, Ebner PD, Eicher SD. Differential innate immune responses of bovine peripheral blood leukocytes to *Salmonella enterica* serovars Dublin, Typhimurium, and Enteritidis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015;165:14-21.

Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014;260:8-20.

Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* 1995;125:784S–789S.

Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:141-153.

Possemiers S, Pinheiro I, Verhelst A, Van den Abbeele P, Maignien L, Laukens D, Reeves SG, Robinson LE, Raas T, Schneider YJ, Van de Wiele T,

Marzorati M. A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against inflammation, as studied in an integrated *in vitro* approach. *J Agric Food Chem*. 2013;61:9380-9392.

Pourabedin M, Zhao X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:fmv122.

Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*. 2014;111:387-402.

Qiu Y, Yang H. Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33:551-562.

Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100:29-34.

Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J*. 2002 Dec 1;368(Pt 2):471-81.

Reis RS, Horn F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog*. 2010;2:8.

Rezaian M, Hamed S. Histological study of the caecal tonsil the cecum of 4-6 months of age White Leghorn chicks. *Am J Anim Vety Sci*. 2007;2:50-54.

Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1 α . *Semin Immunol*. 2013;25:430-438.

Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*. 2007;137:830S-837S.

Robinson K, Deng Z, Hou Y, Zhang G. Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides. *Front Vet Sci*. 2015;2:57.

Rószter T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:816460.

Roto SM, Rubinelli PM, Ricke SC. An Introduction to the Avian Gut Microbiota and the Effects of Yeast-Based Prebiotic-Type Compounds as Potential Feed Additives. *Front Vet Sci.* 2015;2:28.

Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol.* 2009;9:268.

Saint-Cyr MJ, Haddad N, Taminiau B, Poezevara T, Quesne S, Amelot M, Daube G, Chemaly M, Dousset X, Guyard-Nicodème M. Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *Int J Food Microbiol.* 2016 Jul 8. En premsa.

Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:362-381.

Salsali HR, Parker WJ, Sattar SA. Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Can J Microbiol.* 2006;52:279-86.

Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut.* 2002;50:III2-III8.

Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012;28:124-129.

Santos FB, Sheldon BW, Santos AA Jr, Ferket PR. Influence of housing system, grain type, and particle size on *Salmonella* colonization and shedding of broilers fed triticale or corn-soybean meal diets. *Poult Sci.* 2008;87:405-420.

Schauer D. Indigenous microflora: Paving the way for pathogens? *Curr Biol.* 1997;7:R75-R77.

Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol.* 2016;7:235.

Sethiya NK. Review on Natural Growth Promoters Available for Improving Gut Health of Poultry: An Alternative to Antibiotic Growth Promoters. *Asian J Poult Sci.* 2016;10:1-29

Setta A, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF- κ B signalling and cell cytotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;146:212-224.

Shah DH, Zhou X, Kim HY, Call DR, Guard J. Transposon mutagenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis identifies genes that contribute to invasiveness in human and chicken cells and survival in egg albumen. *Infect Immun.* 2012;80:4203-4215.

Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:283-309.

Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:900-911.

Solis de los Santos F, Farnell MB, Téllez G, Balog JM, Anthony NB, Torres-Rodriguez A, Higgins S, Hargis BM, Donoghue AM. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. *Poult. Sci.* 2005;84:1092–1100.

Solis de los Santos F, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poult supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). *Poult Sci.* 2007;86:921-930.

Sood N, Baker WL, Coleman CI. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:1167-1175.

Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the cecae of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult Sci.* 2000;79:205-211.

Storek KM, Monack DM. Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation. *Immunol Rev.* 2015;265:112-129.

Sturkie D. *Avian Physiology*. 5a edició. (2000). Londres: Academic Press.

Suárez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp.* 2015;31 Suppl 1:3-9.

Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol.* 2015;8:969-978.

Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv Immunol.* 2010;107:153-185.

Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011;286:31263-31271.

Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:631-659.

Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Malterer G, Donaldson DS, Wang D, Tan A, Gillespie TL, O'Shea M, Roe AJ, Shaw DJ, Gally DL, Lengeling A, Mabbott NA, Haas J, Mahajan A. *Salmonella* transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe.* 2012;12:645-656.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16:3-9.

Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes.* 2010;1:148-163.

Torres-Flores JM, Arias CF. Tight Junctions Go Viral! *Viruses.* 2015;7:5145-5154.

Troxell B, Petri N, Daron C, Pereira R, Mendoza M, Hassan HM, Koci MD. Poultry body temperature contributes to invasion control through reduced expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:8192-8201.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:285-293.

Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:799-809.

Turner JR, Buschmann MM, Romero-Calvo I, Sailer A, Shen L. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:204-212.

Uemura K, Saka M, Nakagawa T, Kawasaki N, Thiel S, Jensenius JC, Kawasaki T. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol.* 2002;169:6945-6950.

Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr.* 2011;141:769-776.

Van Immerseel F, Russell J, Flythe M, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: A mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* 2006;35:182-188.

Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:157-165.

Vastano V, Pagano A, Fusco A, Merola G, Sacco M, Donnarumma G. The *Lactobacillus plantarum* Eno A1 Enolase Is Involved in Immunostimulation of Caco-2 Cells and in Biofilm Development. *Adv Exp Med Biol.* 2016;897:33-44.

Vendrig JC, Coffeng LE, Fink-Gremmels J. In vitro evaluation of defined oligosaccharide fractions in an equine model of inflammation. *BMC Vet Res.* 2013;9:147.

Verma S, Srikanth CV. Understanding the complexities of *Salmonella*-host crosstalk as revealed by in vivo model organisms. *IUBMB Life.* 2015;67:482-497.

Vilà B, de Queiroz D, Badiola I, Pérez-Vendrell A, Brufau J. Effects of carob bean gum on performance, nutrient digestibility and *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* colonisation in chickens. *Food Res Int.* 2012;45:1133-1138.

Vilà B, Fontgibell A, Badiola I, Esteve-Garcia E, Jiménez G, Castillo M, Brufau J. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. *Poult Sci.* 2009;88:975-979.

Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:1075-1084.

Walker D, Thwaites DT, Simmons NL, Gilbert HJ, Hirst BH. Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol.* 1998;507:697-706.

Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 2000;36:997-1005.

Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* 2014;588:4120-4130.

Wang L, Lilburn M, Yu Z. Intestinal Microbiota of Broiler Chickens As Affected by Litter Management Regimens. *Front Microbiol.* 2016;7:593.

Watson CJ, Rowland M, Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C388–C397.

Wells CL, Jechorek RP, Kinneberg KM, Debol SM, Erlandsen SL. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. *J Nutr* 1999;129:634–640.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:4607-4614.

Wickramasinghe S, Pacheco AR, Lemay DG, Mills DA. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 2015;15:172.

Wisner AL, Desin TS, Koch B, Lam PK, Berberov EM, Mickael CS, Potter AA, Köster W. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system: role in intestinal

colonization of chickens and systemic spread. *Microbiology*. 2010;156:2770-2781.

Witoonsaridsilp W, Paeratakul O, Panyarachun B, Sarisuta N. Development of mannosylated liposomes using synthesized N-octadecyl-D-mannopyranosylamine to enhance gastrointestinal permeability for protein delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13:699-706.

Wu Y, Zhu C, Chen Z, Chen Z, Zhang W, Ma X, Wang L, Yang X, Jiang Z. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;172:55-63.

Wu Z, Kaiser P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. *Immunobiology*. 2011;216:1177-1183.

Yamabhai M, Sak-Ubol S, Srila W, Haltrich D. Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36:32-42.

Yeung CY, Chiang Chiau JS, Chan WT, Jiang CB, Cheng ML, Liu HL, Lee HC. *In vitro* prevention of *Salmonella* lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various *Lactobacillus* strains. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:973209.

Yu S, Gao N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:3343-3353.

Yue M, Rankin SC, Blanchet RT, Nulton JD, Edwards RA, Schifferli DM. Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PLoS One*. 2012;7:e38596.

Yue M, Schifferli DM. Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence *Front Microbiol*. 2014;4:419.

Zalewski BM, Chmielewska A, Szajewska H. The effect of glucomannan on body weight in overweight or obese children and adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition*. 2015;31:437-442.

Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*. 2014;26:192-197.

VII. ANNEX

