

## *II. Introducció*

---

## 1. FISIOLOGIA INTESTINAL

La funció primària de l'intestí és la digestió dels aliments i l'absorció de nutrients des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica. Durant aquest procés, l'intestí està exposat a una àmplia varietat d'antígens i microorganismes patògens provinents dels aliments, així com de bacteris residents, els quals cal limitar amb una barrera. A més, l'intestí també absorbeix macromolècules que són importants per al creixement i desenvolupament de l'individu, com són diferents factors de creixement (Weaver *et al.*, 1990) i immunoglobulines procedents de la llet materna (Simister i Rees, 1985).

La paret del tracte gastrointestinal dels mamífers consta de 4 capes, que de la part més interna a la més externa són les següents: la mucosa, la submucosa, la muscular i la serosa. Per tal de poder realitzar la seva funció principal, l'intestí ha hagut d'incrementar molt la seva superfície de contacte amb el contingut de la llum. Això ho ha aconseguit mitjançant tot un conjunt de projeccions de la mucosa cap a la llum intestinal anomenades vellositats, que és on es localitza la funció absorptiva. En la base d'aquestes hi ha les criptes, que són depressions de la mucosa i estan implicades en processos secretors. En les criptes hi ha cèl·lules indiferenciades que contínuament s'estan dividint i originen diferents llinatges cel·lulars com són els enteròcits, les cèl·lules M o cèl·lules caliciformes.

La mucosa intestinal està revestida per un epitelí compost majoritàriament per cèl·lules anomenades **enteròcits**. Aquests són cèl·lules altament polaritzades que constitueixen una barrera entre dos ambients molt diferents i, alhora, permeten el transport vectorial de nutrients a través d'elles mateixes. Els enteròcits estan units entre ells per les anomenades unions estretes, les quals, a més, delimiten dues zones de la membrana amb diferent distribució de proteïnes (Murer i Hopfer, 1977): la membrana apical i la membrana basolateral. La membrana apical és la que està en contacte amb la llum intestinal i presenta molts plegaments anomenats microvellositats, que augmenten encara més la superfície d'absorció. Aquesta zona altament replegada s'anomena vora en raspall. La membrana basolateral és la part de la membrana en contacte amb el líquid intersticial. A més dels enteròcits, dispersos en aquest epitelí, també hi ha altres tipus cel·lulars, com són les cèl·lules caliciformes, les cèl·lules de Paneth i les cèl·lules M.

Les **cèl·lules caliciformes** secreten mucus, un fluid viscos compost principalment per proteïnes altament glicosilades anomenades mucines. Aquest mucus participa en la funció de barrera a través de dos mecanismes: fixa els bacteris, amb la qual cosa ajuda a prevenir la colonització epitelial i n'accelera l'eliminació; i retarda la difusió de molècules

potencialment perilloses per als enteròcits, com poden ser diferents toxines (Specian i Oliver, 1991).

Les **cèl·lules de Paneth** són cèl·lules enteroendocrines, ja que presenten una activació colinèrgica (Sato *et al.*, 1992). Aquestes cèl·lules formen part dels mecanismes de defensa enfront de microorganismes a l'intestí, actuant de forma similar als neutròfils. Quan entren en contacte amb bacteris o antígens bacterians, secreten molècules antimicrobianes (com  $\alpha$ -defensines, lisozim i fosfolipasa A<sub>2</sub>) a l'interior de la llum de la cripta i contribueixen al manteniment de la barrera gastrointestinal (Ayabe *et al.*, 2000).

Les **cèl·lules M** són un tipus cel·lular específic de l'epiteli intestinal, que presenta unes microvellositats molt més petites que els enteròcits (*microfold*). Es troben damunt dels fol·licles limfoides i capten, mitjançant endocitosi, un gran ventall de proteïnes i pèptids antigènics. Aquestes cèl·lules no processen els antígens, sinó que només els transporten a les capes inferiors on són captats i processats per cèl·lules dendrítiques i per macròfags.

## 1.1. FUNCIÓ ABSORTIVA

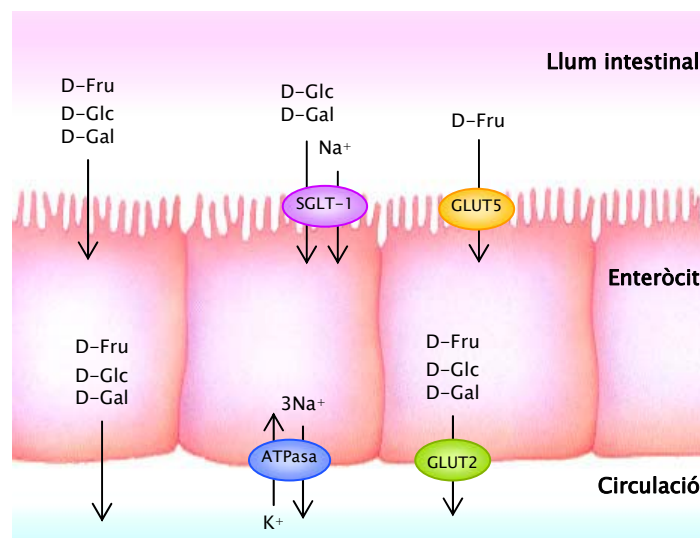
Els nutrients poden ser absorbits des de la llum intestinal a través de dues rutes: la paracel·lular i la transcel·lular. El pas a través de la via paracel·lular es produeix a través de les unions intercel·lulars i no implica despesa energètica, ja que es realitza a favor de gradient de concentració. La ruta transcel·lular implica el pas dels nutrients a través de les membranes apical i basolateral dels enteròcits. Les proteïnes transmembrana són les responsables del pas de les substàncies hidrosolubles a través de les membranes cel·lulars (Woudstra i Thompson, 2002) si bé hi ha una part que travessa la bicapa lipídica per difusió simple.

## ABSORCIÓ DE CARBOHIDRATS

La digestió i l'absorció de carbohidrats es realitza principalment al jejú, tot i que la resta de segments de l'intestí prim també presenta mecanismes per absorbir-los. Els carbohidrats de la dieta són digerits a molècules senzilles (monosacàrids), majoritàriament D-glucosa, D-galactosa i D-fructosa. La D-glucosa i la D-galactosa són transportades a través de la membrana apical mitjançant un cotransportador de Na<sup>+</sup>/glucosa (SGLT-1; Figura II-1), mentre que el pas de D-fructosa és un transport facilitat (GLUT5). A més, els tres monosacàrids poden entrar i sortir de l'enteròcit per difusió simple a través de les membranes apical i basolateral. La sortida dels tres sucres a través de la membrana basolateral es realitza mitjançant un transport facilitat (GLUT2; Walmsley *et al.*, 1998).

El transportador SGLT-1 transporta activament la D-glucosa i la D-galactosa des de la llum intestinal a l'interior de l'enteròcit en contra del seu gradient de concentració, gràcies a l'acoblament al transport de ions  $\text{Na}^+$ , els quals entren a favor del seu gradient electroquímic (Crane, 1962 i Kimmich, 1981). Aquest gradient de  $\text{Na}^+$  es manté gràcies a l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  present a la membrana basolateral dels enteròcits, que extreu  $\text{Na}^+$  contínuament cap a l'exterior de les cèl·lules epitelials. L'SGLT-1 és un transportador d'alta afinitat i baixa capacitat, l'acció del qual pot ser inhibida pel glucòsid florrizina (Alvarado i Crane, 1962). El dèficit d'aquest transportador és el responsable de la síndrome de malabsorció de la glucosa i la galactosa (Wright *et al.*, 2002).

El GLUT2 es localitza a la membrana basolateral i transporta els tres monosacàrids a favor del seu gradient de concentració (Murer i Hopfer, 1977). El GLUT2 no és sensible a la florrizina, però sí que pot ser inhibit per la floretina o per la citocalasina B (Kimmich i Randles, 1975; 1979). Des d'un punt de vista cinètic, el GLUT2 és un sistema de transport de baixa afinitat i elevada capacitat (Kimmich i Randles, 1975). La baixa afinitat d'aquest transportador fa que la seva saturació no limiti el seu funcionament, i que la quantitat de substrat transportat depengui només de la seva concentració.



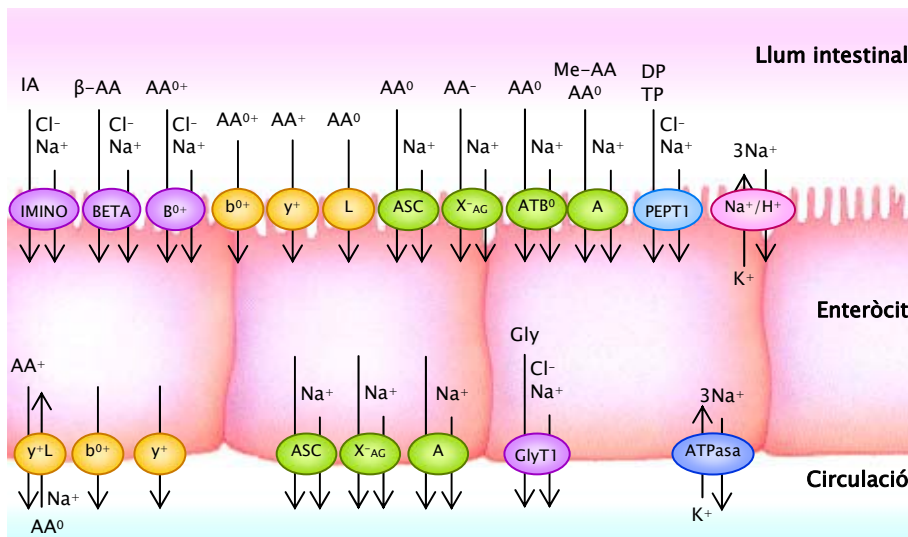
**Figura II-1. Absorció intestinal de monosacàrids.** La D-glucosa (D-Glc) i la D-galactosa (D-Gal) són transportades des de la llum intestinal a través del transportador acoblat a  $\text{Na}^+$  (SGLT-1), mentre que la D-fructosa (D-Fru) entra a través d'un transport facilitat (GLUT5). El gradient de  $\text{Na}^+$  és mantingut per l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La sortida de la cèl·lula es realitza per la membrana basolateral a través del transportador GLUT2. També hi ha un component de difusió simple a través de la membrana plasmàtica.

El GLUT5 es localitza a la membrana apical de l'enteròcit i la seva funció és la de transportar D-fructosa a favor del seu gradient de concentració (Burant *et al.*, 1992).

Aquest transportador no és inhibït per la citocalasina B (Burant *et al.*, 1992). Aquesta és una característica diferencial respecte els altres membres de la família GLUT.

## ABSORCIÓ D'AMINOÀCIDS

La digestió proteica genera aminoàcids i oligopèptids, l'absorció dels quals es produeix majoritàriament a l'ili. La membrana apical dels enteròcits presenta nombrosos transportadors d'aminoàcids (Figura II-2). Aquests transportadors apicals són els responsables de l'absorció dels aminoàcids des de la llum intestinal cap a l'interior dels enteròcits, mentre que els transportadors localitzats en la membrana basolateral faciliten el pas dels aminoàcids des de l'enteròcit a la circulació (Ray *et al.*, 2002). En general l'entrada d'aminoàcids des de la llum intestinal a l'interior de la cèl·lula es realitza a través de mecanismes de transport actiu, tot i que també hi ha mecanismes de difusió facilitada (Hyde *et al.*, 2003).



**Figura II-2. Absorció intestinal d'aminoàcids.** Principals transportadors d'aminoàcids intestinals; en lila, els transportadors dependents dels gradients de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{Na}^+$ ; en verd, els que només són dependents de  $\text{Na}^+$ ; en groc, els sistemes de transport facilitat; en blau clar, el transportador (PEPT1) de dipèptids (DP) i tripèptids (TP). IA, iminoàcids;  $\beta$ -AA,  $\beta$ -aminoàcids;  $\text{AA}^0$ , aminoàcids neutres;  $\text{AA}^+$  aminoàcids catiónics;  $\text{AA}^-$  aminoàcids aniónics; Me-AA; aminoàcids metilats. Els gradients de  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  són mantinguts per l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  i per l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , respectivament.

Els transportadors d'aminoàcids es poden classificar en diferents sistemes segons les seves característiques (especificitat de substrat, dependència de gradients electroquímics; Figura II-2). Així, hi ha els sistemes que són dependents dels gradients de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  que inclouen el sistema IMINO, que transporta iminoàcids; el sistema BETA, transportador de

$\beta$ -aminoàcids; i el sistema  $B^{0,+}$ , que transporta aminoàcids neutres i bàsics, així com alguns aminoàcids D-isòmers. També hi ha els transportadors dependents del gradient de  $Na^+$  que inclouen el sistema  $ATB^0$ , que transporta diferents aminoàcids neutres; el sistema  $X^-_{AG}$ , que transporta aminoàcids aniònics; el sistema ASC que es caracteritza per la seva preferència pels aminoàcids neutres petits com alanina, serina i cisteïna; i el sistema A, que a més d'aminoàcids neutres també transporta aminoàcids metilats. Finalment, hi ha els transportadors que no requereixen l'acoblament a l'entrada de  $Na^+$  i que inclouen el sistema  $\gamma^+$ , que reconeix als aminoàcids catiònics; el sistema  $b^{0,+}$ , que transporta cistina i aminoàcids catiònics; i el sistema L, que es caracteritza per la seva preferència pels aminoàcids neutres.

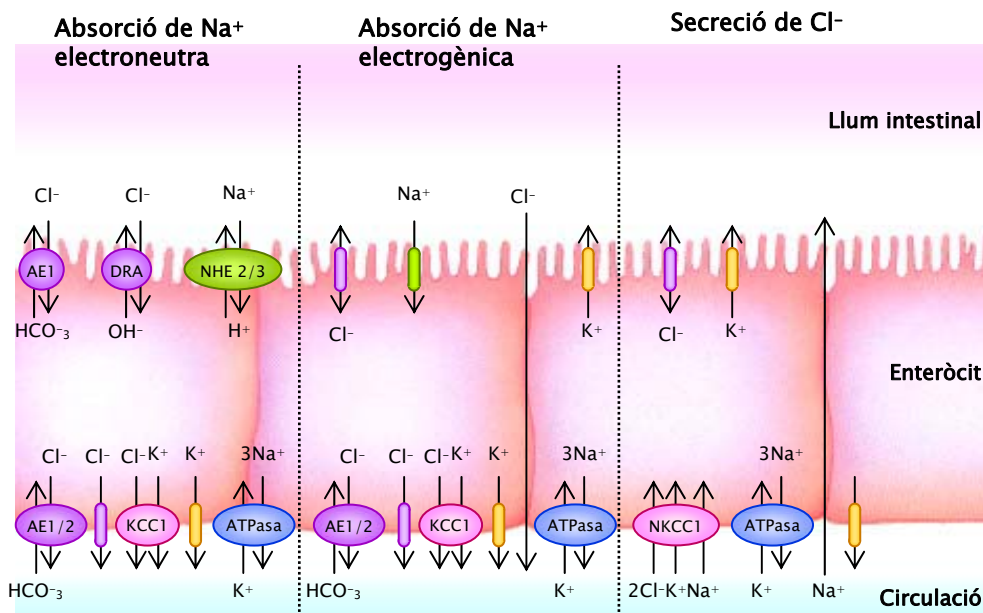
Els aminoàcids essencials neutres, com la metionina i la leucina, poden entrar a l'enteròcit per cinc sistemes transportadors (L,  $B^{0,+}$ ,  $\gamma^+$ ,  $\gamma^+L$  i  $b^{0,+}$ ). El sistema L transporta aminoàcids neutres grans amb cadenes aromàtiques, de forma independent de  $Na^+$ , en quasi tots els tipus cel·lulars (Pineda *et al.*, 1999). El sistema  $B^{0,+}$  està acoblat als gradients de  $Na^+$  i  $Cl^-$  (Van Winkle *et al.*, 1985) i presenta una elevada afinitat pels aminoàcids catiònics i neutres (Palacín *et al.*, 1998). Els sistemes  $\gamma^+$ ,  $\gamma^+L$  i  $b^{0,+}$  són transportadors d'aminoàcids catiònics com la lisina i també poden transportar aminoàcids neutres. El sistema  $\gamma^+$  presenta una elevada afinitat pels aminoàcids catiònics i els transporta de forma independent al gradient de  $Na^+$ , mentre que té una afinitat molt baixa pels aminoàcids neutres i per transportar-los requereix la presència de cations ( $Na^+$ ,  $Li^+$  o  $K^+$ ). En canvi, el  $\gamma^+L$  transporta aminoàcids catiònics i neutres amb una elevada afinitat, si bé el transport d'aminoàcids neutres depèn de la presència de  $Na^+$  (Rojas i Devés, 1999). El sistema  $b^{0,+}$  presenta una elevada afinitat pels aminoàcids catiònics i neutres i els transporta de forma independent al gradient de  $Na^+$  (Van Winkle, 1993).

Els dipèptids i els tripèptids entren a l'interior de l'enteròcit a través del transportador PEPT1 (Figura II-2). El transportador PEPT1 transfereix oligopèptids acoblats a protons. El gradient de protons es manté mitjançant l'intercanviador de  $Na^+/H^+$  de la membrana apical, responsable del manteniment d'un pH més baix en la superfície mucosal que en l'interior cel·lular. Una vegada dins l'enteròcit, aquests dipèptids i tripèptids són hidrolitzats a aminoàcids i surten de la cèl·lula a través de transportadors d'aminoàcids.

## ABSORCIÓ I SECRECIÓ D'AIGUA I ELECTRÒLITS

Els processos d'absorció i de secreció d'aigua i electròlits es realitza principalment en el còlon. L'absorció està protagonitzada pel  $Na^+$ , a través d'un mecanisme electroneutre o bé d'un mecanisme electrogènic, mentre que la secreció està conduïda pel  $Cl^-$ .

Els intercanviadors  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  i  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  són els responsables de l'absorció electroneutra del  $\text{Na}^+$ , que és la via principal al còlon (Figura II-3). Els intercanviadors  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE; *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers*) faciliten l'entrada de  $\text{Na}^+$  a favor del seu gradient electroquímic i se n'han descrit 3 isoformes en el tracte gastrointestinal. El NHE1 es localitza a la membrana basolateral dels enteròcits i està implicat en la secreció d' $\text{HCO}_3^-$  (Field, 2003). Les formes NHE2 i NHE3 s'expressen en la membrana apical dels enteròcits, amb una contribució majoritària del NHE3 en l'absorció de  $\text{Na}^+$  (Rajendran i Binder, 1990). A més dels NHE2 i NHE3, hi ha un quart tipus de NHE, que és dependent de  $\text{Cl}^-$  (Rajendran *et al.*, 1995), ja que s'ha observat una inhibició de l'intercanvi, quan s'incuben cèl·lules epitelials amb bloquejadors dels canals de  $\text{Cl}^-$  (Rajendran *et al.*, 1999). En la membrana apical dels enteròcits del còlon hi ha dos tipus d'intercanviadors de  $\text{Cl}^-$ : l'intercanviador d'anions tipus 1 (AE1; *Anion Exchanger 1*), que intercanvia  $\text{Cl}^-$  per  $\text{HCO}_3^-$ ; i una proteïna anomenada DRA (*DownRegulated in Adenoma*), que intercanvia  $\text{Cl}^-$  per  $\text{OH}^-$  (Rajendran *et al.*, 2000).



**Figura II-3. Absorció i secreció intestinal d'electròlits.** L'absorció de  $\text{Na}^+$  electroneutra es realitza a través dels intercanviadors de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE). L'activitat d'aquests NHE està compensada per l'intercanvi  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  (DRA) i  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE1). L'intercanvi d'anions a la membrana basolateral es produeix a través dels intercanviadors AE1 i AE2, tot i que també hi intervenen canals de  $\text{Cl}^-$  i el cotransportador KCl (KCC1). L'absorció de  $\text{Na}^+$  electrogènica es produeix a través dels canals epitelials de  $\text{Na}^+$  (ENaC) gràcies al gradient electroquímic del  $\text{Na}^+$  generat per l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La secreció de  $\text{Cl}^-$  pels canals apicals (CFTR) està compensada per la sortida de  $\text{K}^+$  a través de canals de membrana i per la sortida de  $\text{Na}^+$  per la via paracel·lular. El  $\text{Cl}^-$  entra per la membrana basolateral a través un cotransportador de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  (NKCC1).

Els canals epitelials de  $\text{Na}^+$  (ENaC; *Epithelial  $\text{Na}^+$  Channel*) són els responsables de l'absorció del  $\text{Na}^+$  electrogènica i es localitzen a la membrana apical dels enteròcits del còlon. L'entrada del  $\text{Na}^+$  luminal pels ENaC està dirigida per l'elevat gradient electroquímic i pel potencial de membrana, que és negatiu. L'absorció de  $\text{Na}^+$  va acompanyada per l'absorció de  $\text{Cl}^-$ . El  $\text{Cl}^-$  entra o bé pels canals localitzats a la membrana apical (CFTR; Mall *et al.*, 1998) o bé per la ruta paracel·lular (Greger *et al.*, 1997).

El  $\text{Na}^+$  que ha entrat a la cèl·lula pels diferents mecanismes és extret a través de la membrana basolateral per l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . El  $\text{Cl}^-$  que ha entrat per la membrana apical surt de la cèl·lula pels canals de  $\text{Cl}^-$  o pels intercanviadors  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  de la membrana basolateral (Greger *et al.*, 1997).

L'aigua es pot moure per diferents vies: la paracel·lular i la transcel·lular a través dels canals d'aigua, anomenats aquaporines, localitzades a les membranes apical i basolateral (Wang *et al.*, 2000). A més, el moviment d'aigua també es pot produir a través dels transportadors de nutrients (Meinild *et al.*, 1998).

Les cèl·lules epitelials secretores contenen canals de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  en les seves membranes apicals que permeten la secreció de  $\text{KCl}$ . A més, després de l'estimulació de la secreció, el transport paracel·lular de  $\text{Na}^+$  facilita la secreció de  $\text{NaCl}$  (Schultheiss i Diener, 1998). En la membrana basolateral d'aquestes cèl·lules s'expressa el cotransportador  $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$  (NKCC1) que provoca l'entrada de  $\text{Cl}^-$  acoblat a l'entrada de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Els canals basolaterals de  $\text{K}^+$  permeten el reciclatge d'aquest ió, i, per tant, contribueixen a hiperpolaritzar les cèl·lules epitelials i mantenen així la força elèctrica per a la secreció de  $\text{Cl}^-$ . L'aigua es mou osmòticament a través de la via paracel·lular i passa a través de la cèl·lula per les aquaporines (King i Agre, 1996).

## 1.2. FUNCIO DE BARRERA

La mucosa gastrointestinal forma una barrera entre l'organisme i l'ambient de la llum intestinal i la seva funció és permetre un transport eficient dels nutrients a través de l'epiteli intestinal mentre s'exclou de forma rigorosa el pas de substàncies nocives. És per això que el sistema gastrointestinal presenta diferents nivells de defensa enfront de toxines, antígens i patògens. Així, hi ha mecanismes protectors no específics a la llum intestinal; el propi epiteli intestinal actua com a sistema de barrera; i les respostes immunològiques a microorganismes i antígens formen un nivell de defensa més específic. Aquest últim serà exposat més endavant.



Els mecanismes de la llum gastrointestinal s'inicien amb l'àcid gàstric i els enzims digestius. El baix pH del suc gàstric és bactericida i els enzims pancreàtics són capaços de danyar la paret cel·lular dels bacteris (Sarker i Gyr, 1992). Addicionalment, cèl·lules presents a l'epiteli de la cripta secreten fluids a la seva llum que, combinats amb la motilitat intestinal, arrossequen i eliminen bacteris i toxines. Les grans quantitats de mucus secretat per les cèl·lules caliciformes redueixen la capacitat dels microorganismes d'adherir-se a la superfície de les cèl·lules epitelials i, per tant, en disminueixen l'accés.

Un altre mecanisme de barrera no específic implica l'alliberament de molècules protectores com és la immunoglobulina A (IgA) i uns pèptids antimicrobials, anomenats defensines. La IgA és la immunoglobulina principal secretada a l'intestí i que, a diferència d'altres immunoglobulines, no participa en les reaccions inflamatòries ni citotòxiques. La seva principal funció en la defensa de l'hoste és unir-se als antígens i ajudar en la seva eliminació (DeMeo *et al.*, 2002). Aquesta unió es produeix generalment després de la seva secreció a la llum intestinal, amb la qual cosa també es limita l'accés dels microorganismes a l'epiteli. D'altra banda, les defensines, produïdes per cèl·lules del llinatge mieloides i per les cèl·lules de Paneth, són directament tòxiques per als bacteris ja que en trenquen les membranes cel·lulars. Aquests pèptids també poden estimular la secreció de clorur en la cripta, mostrar una activitat quimiotàctica i actuar com a lligam entre la immunitat innata i l'adquirida (Bevins *et al.*, 1999).

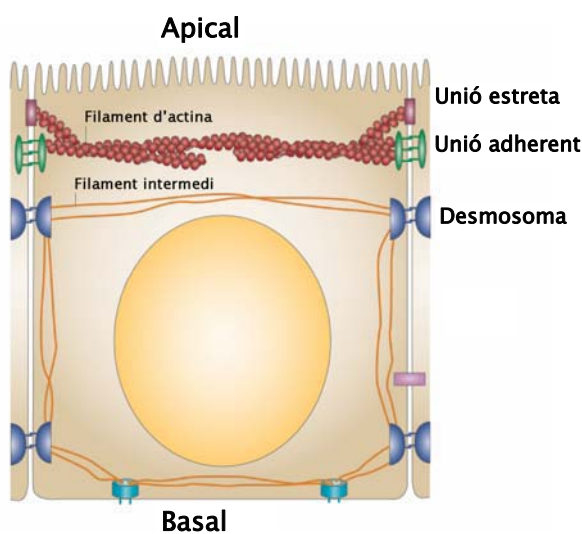
La línia de defensa següent és l'epiteli, que subministra la principal barrera física entre la llum intestinal i l'hoste. Un recanvi ràpid de les cèl·lules epitelials combinat amb la peristalsi contribueix a la funció de barrera, elimina els microorganismes adherits i els atrapa a la llum intestinal (Sarker i Gyr, 1992). L'epiteli i les seves unions estretes intercel·lulars també són barreres dinàmiques, ja que permeten el pas bidireccional de diferents soluts, possiblement incloses les cèl·lules inflamatòries.

## COMPLEXOS D'UNIÓ

Les cèl·lules epitelials estan unides entre elles per un complex d'unió epitelial (Figura II-4) que està format pels desmosomes, les unions adherents i les unions estretes (Farquhar i Palade, 1963). Les unions estretes generalment encerclen les cèl·lules en l'extrem apical de la part lateral de la membrana, formant una barrera a la difusió paracel·lular que regula la permeabilitat epitelial. Aquestes unions també actuen com a barrera a la difusió intramembranosa, ja que restringeixen la difusió de components de membrana entre la zona apical i la zona basolateral. Les unions adherents i els desmosomes són unions adhesives que estan unides al citoesquelet d'actina i als filaments intermedis,

respectivament. A l'epiteli intestinal, els components de les unions adherents estan concentrats prop de les unions estretes i colocalitzen amb un prominent cinturó d'actina, mentre que en altres tipus d'epitelis estan distribuïts al llarg de tota la membrana lateral. En canvi els desmosomes no estan restringits a una zona en particular, sinó que es distribueixen al llarg de la membrana basolateral (Matter i Balda, 2003).

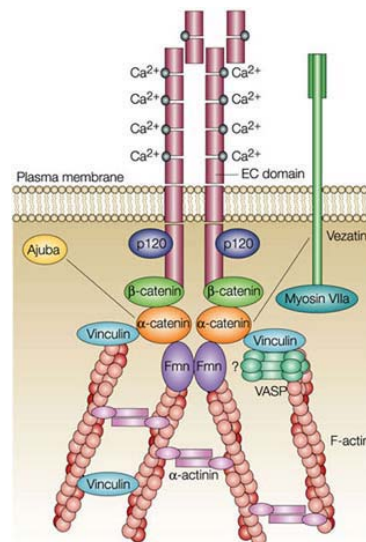
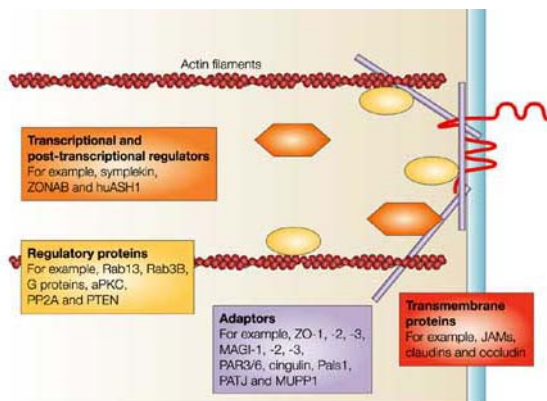
La **unió estreta** està formada per tres tipus de proteïnes transmembrana –occludina, claudina i unes proteïnes d'adhesió pertanyents a la superfamília de les immunoglobulines, les JAM (*Junctional Adhesion Molecule*)– i una placa citoplasmàtica on hi ha diferents proteïnes que formen grans complexos (Figura II-5). Les proteïnes transmembrana intervenen en l'adhesió cel·lular i es creu que constitueixen les barreres paracel·lular i intramembranosa. Les claudines i l'occludina s'associen en heteropolímers i formen les bandes intramembranoses que es veuen en les rèpliques de criofractura. S'ha proposat que en aquestes bandes hi ha canals fluctuants que permeten la difusió selectiva d'ions i de petites molècules hidrofíliques. Així doncs, la quantitat i els tipus de claudines i ocludines expressades determinen la mida i la càrrega de les substàncies que poden difondre a través de la via paracel·lular (Matter i Balda, 2003).



**Figura II-4. Unió intercel·lular epitelial.** Representació esquemàtica d'un enteròcit. Les unions estretes i les unions adherents estan unides al citoesquelet d'actina mentre que els desmosomes ho estan als filaments intermedis (Adaptat de Matter i Balda, 2003).

La placa citoplasmàtica de les unions estretes està formada per diferents tipus de proteïnes, que inclouen els adaptadors com ara les proteïnes ZO-1, -2 i -3 (*Zonula Occludens-1, -2 i -3*) i altres proteïnes reguladores i de senyalització. Les proteïnes adaptadores es creu que estan vinculades a les proteïnes transmembrana i recluten altres components citosòlics, com proteïnes quinases, GTPases i factors de transcripció (Tsukita *et al.*, 2002).

La **unió adherent** és un tipus d'unió intercel·lular membrana-citoesquelet que crea una xarxa a través de les cèl·lules, fonamental per a la coordinació del comportament d'una població cel·lular (Gottardi *et al.*, 2002). El component principal d'aquest tipus d'unió és l'E-cadherina, que presenta un domini extracel·lular responsable de les unions homofíliques dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  amb molècules d'E-cadherina de la cèl·lula adjacent, i un domini citoplasmàtic que mitjançant altres proteïnes s'uneix al citoesquelet d'actina (Figura II-5). Aquestes proteïnes intermèdies són les catenines. La que s'uneix directament a l'E-cadherina és la  $\beta$ -catenina, que al seu torn s'uneix a l' $\alpha$ -catenina (Imamura *et al.*, 1999). Aquesta última s'ha vist que es pot unir tant a l'actina com a proteïnes associades a l'actina, com la vinculina o l' $\alpha$ -actinina (Watabe-Uchida *et al.*, 1998; Nieset *et al.*, 1997). L'associació  $\alpha$ -catenina-vinculina està implicada en la formació i el manteniment tant de la unió adherent com de la unió estreta (Watabe-Uchida *et al.*, 1998).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura II-5. Unió estreta i unió adherent.** Una representació esquemàtica de les proteïnes que estan implicades en la unió estreta (Matter i Balda, 2003) i en la unió adherent (Kobiela i Fuchs, 2004) dels enteròcits.

Els **desmosomes** són estructures especialitzades necessàries per a l'establiment i manteniment de l'adhesió en teixits d'origen epitelial. Aquestes unions es troben a la superfície lateral de cèl·lules adjacents. Uns elements importants dels desmosomes són les proteïnes transmembrana, desmogleïna i desmocolina, pertanyents a la superfamília de les cadherines i que formen una estructura semblant a una cremallera en l'espai intercel·lular (Banon *et al.*, 2002). En el fragment citosòlic d'aquestes proteïnes s'hi uneix la placoglobina, que és un mediador tant per a l'associació d'aquests complexos com per a la segregació dels seus components. La placoglobina juntament amb un altre membre de

la mateixa família, la placofilina, formen la placa densa externa. Aquestes proteïnes s'uneixen als filaments intermedis mitjançant la desmoplaquina, que és el component de la placa densa interna (Huber, 2003).

## REGULACIÓ DE LES UNIONS ESTRETES I DE LES UNIONS ADHERENTS

La permeabilitat de les unions estretes està regulada dinàmicament, tant en condicions fisiològiques com patològiques. Així, per exemple, durant l'absorció de nutrients s'incrementa la permeabilitat intestinal (Ballard *et al.*, 1995). Una àmplia varietat de factors de creixement, citocines i hormones regulen la permeabilitat de les unions estretes i, per tant, la funció de barrera. Hormones com la prolactina i els àcids grassos insaturats milloren la funció de barrera mitjançant l'increment de l'expressió de l'occludina (Jiang *et al.*, 1998; Stelwagen *et al.*, 1999). En canvi, factors de creixement i citocines, com TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , incrementen la permeabilitat mitjançant una reducció en l'expressió de la ZO-1 o de l'occludina (Tsukita *et al.*, 2002; Bruewer *et al.*, 2003). Concretament, la inhibició de l'expressió de la ZO-1 en cèl·lules Caco-2 tractades amb TNF- $\alpha$  està mediada pel factor NF- $\kappa$ B (Ma *et al.*, 2004). A més, durant les respostes inflamatòries i/o immunològiques, les unions estretes de les cèl·lules epitelials són repetidament destruïdes i formades de nou durant la migració leucocitària a través de l'epiteli (Milks *et al.*, 1986).

## 2. SISTEMA IMMUNITARI PERIFÈRIC

El sistema immunitari consisteix en un conjunt de cèl·lules i molècules responsables de la protecció enfront de la infecció. La resposta immunitària és l'acció integrada d'un gran nombre de mecanismes de defensa contra substàncies i agents estranys. En general, a les substàncies estranyes (microorganismes, macromolècules com proteïnes i polisacàrids) se les anomena antígens, i són aquests els que provoquen l'activació dels mecanismes de defensa de l'organisme. El sistema immunitari consta de dos tipus de mecanismes de defensa principals:

**Immunitat innata** (inespecífica): està constituïda per mecanismes existents amb anterioritat al desenvolupament de la infecció, capaços d'establir respostes ràpides. Els macròfags i neutròfils del sistema immunitari innat proporcionen una primera línia de defensa contra molts microorganismes comuns, i són essencials per al control de les infeccions bacterianes habituals. No obstant això, la immunitat innata no sempre pot eliminar l'organisme infecciós i hi ha alguns patògens que no pot reconèixer. Les

cèl·lules del sistema immunitari innat tenen un paper crucial en la iniciació i posterior direcció de les respostes immunitàries específiques, així com en l'eliminació d'aquells patògens que han estat seleccionats per la resposta immunitària adquirida.

**Immunitat adquirida** (específica): es caracteritza per una especificitat extraordinària per a diferents molècules i per la memòria, que li permet respondre amb major intensitat després d'exposicions repetides a un mateix microorganisme. El sistema immunitari adquirit ha evolucionat per proporcionar una defensa més versàtil, la qual a més, té tendència a evitar que l'agent infeccios provoqui malaltia en una segona infecció.

## 2.1. IMMUNITAT INNATA

Si l'antigen aconsegueix travessar les barreres no immunològiques, es posa en marxa el sistema d'immunitat inespecífica, en què participen diferents elements. Per una banda, hi ha les cèl·lules de la immunitat innata, com són les cèl·lules fagocítiques i les assassines naturals (NK; *Natural Killer*). En relació a les **cèl·lules fagocítiques**, hi trobem els neutròfils polimorfonuclears, els monòcits i els macròfags. Aquests últims es diferencien a partir dels monòcits una vegada aquests arriben als teixits. La funció de tots ells és presentar i destruir els agents infecciosos que aconsegueixen travessar les superfícies epitelials. Les **cèl·lules NK** són leucòcits que s'activen com a resposta a virus i a altres agents que indueixen un increment d'IFN- $\gamma$ . Reconeixen i lisen cèl·lules infectades per virus o que presenten malignitat (canceroses).

D'altra banda, hi trobem els factors solubles, com són les proteïnes de fase aguda i el sistema del complement. Les **proteïnes de fase aguda** són proteïnes plasmàtiques sintetitzades pel fetge, la concentració de les quals augmenta en resposta a dany tissular i a inflamació. Es creu que l'augment d'aquestes proteïnes ajuda a la immunitat innata i protegeix de la lesió tissular. El **sistema del complement** és un conjunt de més de 20 proteïnes plasmàtiques, que intervenen en la lisi cel·lular gràcies a la seva polimerització i a la formació de porus sobre les superfícies cel·lulars, que trenquen la integritat de la membrana de l'agent infeccios (Janeway *et al.*, 2000).

## 2.2. IMMUNITAT ADQUIRIDA

Les característiques de la immunitat adquirida són l'especificitat per a molècules diferents, que la capacita per respondre de forma singular a diferents tipus de microorganismes; i la memòria, que permeti respondre amb més força després d'exposicions repetides al mateix

microorganisme. Els components de la immunitat específica són els limfòcits i els seus productes, entre ells els anticossos. En aquesta immunitat es produeixen dos tipus de respostes: la humoral i la cel·lular.

## IMMUNITAT ADQUIRIDA HUMORAL

Les immunoglobulines són els elements principals de la immunitat humoral i són les responsables de reconèixer als antígens i desencadenar diferents reaccions. Les immunoglobulines poden activar el sistema del complement, que condueix a la lisi del microorganisme invasor; opsonitzar els antígens, la qual cosa facilita la seva fagocitosi; i finalment, neutralitzar de forma directa certes toxines i virus.

Després d'un primer contacte amb l'antigen, el limfòcit B prolifera i es diferencia fins a donar lloc a un clon de cèl·lules plasmàtiques, que fabriquen i secreten grans quantitats de la immunoglobulina específica per a aquell antigen. Aquest fenomen es coneix amb el nom de selecció i expansió clonal (Roitt *et al.*, 1997). Aquest primer contacte confereix a l'individu una memòria immunològica, de forma que l'organisme es troba preparat per afrontar l'eventualitat d'una segona infecció del mateix agent. En la resposta secundària, la formació d'immunoglobulines és més ràpida i més intensa. Això es produeix gràcies al fet que a partir del limfòcit primari que va tenir el primer contacte, a part del clon de cèl·lules plasmàtiques (responsable de la resposta primària), es va generar en paral·lel un altre clon de cèl·lules B memòria (Abbas *et al.*, 1998).

## IMMUNITAT ADQUIRIDA CEL·LULAR

La immunitat específica cel·lular està mediada pels limfòcits T, que des del punt de vista citològic són molt similars als limfòcits B, però la seva diferenciació es duu a terme al timus. Els limfòcits T, per tal de poder reconèixer l'antigen com a tal, necessiten que estigui presentat en superfície per unes molècules específiques que pertanyen al complex major d'histocompatibilitat (MHC; *Major Histocompatibility Complex*). D'aquestes molècules, n'hi ha dos tipus: les MHC I, que presenten pèptids endògens o agents vírics, i les MHC II, que presenten pèptids exògens (Janeway *et al.*, 2000).

Les molècules MHC I estan presents en quasi totes les cèl·lules de l'organisme, mentre que les molècules MHC II tenen una distribució més restringida. Bàsicament, les expressen les cèl·lules presentadores d'antigen (APC; *Antigen Presenting Cells*), com són els limfòcits B, les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i les cèl·lules de Langerhans de la pell. Les APC presenten l'antigen processat (mitjançant el seu MHC) als limfòcits T, que el

reconeixen mitjançant el receptor dels limfòcits T (TCR; *T Cell Receptor*). S'han identificat dos tipus de TCR, ambdós constituïts per dues cadenes: el **TCR  $\alpha\beta$** , que està present en el 95% de les cèl·lules T del timus, sang i òrgans limfoides; i el **TCR  $\gamma\delta$** , que, en humans, només el presenten un 5% de les cèl·lules circulants. Es creu que, el TCR  $\gamma\delta$  pot estar relacionat amb un paper protector de les mucoses (Janeway *et al.*, 2000). El TCR es troba associat a un complex de pèptids transmembranosos, el CD3. Mentre que les cadenes  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$  són les responsables del reconeixement antigènic, el complex CD3 és el responsable de la transducció del senyal intracel·lular.

Des del punt de vista funcional, existeixen dos tipus de limfòcits T:

Els **limfòcits T supressors/citotòxics ( $T_{S/C}$ )** expressen una proteïna de superfície o clúster de diferenciació anomenada CD8. Són els principals efectors de la immunitat específica cel·lular i destrueixen cèl·lules del propi organisme infectades per virus. Cada clon de limfòcits  $T_C$  està dirigit a expressar un sol tipus de receptor TCR, i reconeix complexos antígen-MHC I específics situats en la superfície de la cèl·lula diana. D'aquesta forma, el limfòcit  $T_C$  entra en estret contacte amb la cèl·lula diana i secreta substàncies citotòxiques que la lisen.

Els **limfòcits T col·laboradors o helper ( $T_H$ )** expressen un clúster de diferenciació anomenat CD4 i no presenten activitat lítica, sinó que ocupen un paper central en el sistema immunitari. De fet, regulen l'activitat d'altres cèl·lules (macròfags, limfòcits  $T_{S/C}$  i B) mitjançant la secreció d'hormones peptídiques conegudes com a citocines.

Els limfòcits  $T_H$  s'uneixen al complex antígen-MHC II present a la superfície de les APC que tinguin en el seu interior algun paràsit que hagi aconseguit sobreviure de forma intracel·lular. En aquests casos, la cèl·lula, malgrat que no hagi aconseguit vèncer per si sola al paràsit, haurà aconseguit almenys processar i enviar a la superfície antígens de l'invasor. En unir-se a l'APC, s'indueix en el limfòcit  $T_H$  la producció d'IFN- $\gamma$  i altres citocines, que activen les funcions de l'APC que provoquen la mort intracel·lular del paràsit. En funció del repertori de citocines que expressen, les cèl·lules  $T_H$  es poden classificar en:

**$T_H1$** : secreten IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Els limfòcits  $T_H1$  són mediadors de diferents funcions relacionades amb la citotoxicitat i amb les reaccions inflamatòries locals. Per tant, aquestes cèl·lules són importants per combatre als agents patògens intracel·lulars, inclosos els virus, els bacteris i els paràsits.

**$T_H2$** : secreten IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10. Aquests limfòcits resulten més efectius que els anteriors per estimular les cèl·lules B per tal que proliferin i sintetitzin

immunoglobulines, i per tant, la seva funció principal és conferir protecció contra els microorganismes no intracel·lulars (immunitat humoral).

Com pot observar-se, la immunitat innata i l'adquirida no funcionen de forma independent l'una de l'altra, sinó que interactuen estretament entre elles en qualsevol resposta immunitària. Els macròfags i altres cèl·lules del sistema immunitari innat intervenen en l'activació de la resposta immunitària específica; a més, diversos factors solubles del sistema immunitari adquirit (citocines, components del complement) potencien l'activitat de les cèl·lules fagocítiques del sistema innat (Roitt *et al.*, 1997).

### 2.3. ÒRGANS LIMFOIDES PERIFÈRICS

Els microorganismes patògens que aconsegueixen entrar a l'organisme i iniciar una infecció es trobaran amb els limfòcits presents en els òrgans limfoides perifèrics: els ganglis limfàtics perifèrics, la melsa, i els teixits limfoides associats a les mucoses. Els limfòcits estan contínuament circulant a través d'aquests teixits, als quals també és transportat l'antigen, principalment dins de macròfags i cèl·lules dendrítiques. En els òrgans limfoides, les cèl·lules especialitzades com les cèl·lules dendrítiques madures presenten l'antigen als limfòcits.

#### GANGLIS LIMFÀTICS PERIFÈRICS

Els ganglis limfàtics són estructures altament organitzades localitzades als punts de convergència de vasos del sistema limfàtic que recull el líquid intersticial dels teixits i el retorna al torrent sanguini. Aquest fluid extracel·lular es produeix contínuament per una filtració de la sang, i s'anomena limfa. Els vasos limfàtics aferents drenen el líquid intersticial, que també duu antígens dels teixits infectats cap als ganglis limfàtics, on són atrapats. Els ganglis estan recoberts per una càpsula de teixit connectiu dens que es perllonga dins el parènquima mitjançant septes i trabècules i estan formats per tres zones clarament diferenciades: el còrtex, el paracòrtex i la medul·la (Abbas *et al.*, 1998).

#### MELSA

La melsa té dues funcions principals. Per una banda, filtra els eritròcits envellits. Aquesta funció està realitzada per les cèl·lules fagocítiques, que són capaces de capturar i destruir bacteris, paràsits i restes cel·lulars. D'altra banda, forma part del sistema immunitari específic. La primera funció és realitzada per la polpa vermella, que representa el 75% de la



melsa. La polpa blanca consisteix en agregats de teixit limfoide i és la responsable de la funció immunològica d'aquest òrgan (Chadburn, 2000).

## SISTEMA IMMUNITARI ASSOCIAT A LES MUCOSES

La major part d'antígens que entren en contacte amb el sistema immunitari ho fan a través de les mucoses dels tractes respiratori, gastrointestinal i urogenital. Els dos prototips del teixit limfoide associat a les mucoses (MALT) són el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT; *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) i l'associat a la mucosa nasal (NALT; *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*). Ambdós posseeixen APC, limfòcits T i cèl·lules B productores d'immunoglobulina A (IgA). La resposta immunitària generada per les estructures limfoides organitzades del MALT té dues conseqüències importants. Una és el desenvolupament de cèl·lules B capaces de produir immunoglobulines específiques d'antigen que poden anar als ganglis limfàtics mesentèrics i altres teixits mucosals, on es diferenciaran a cèl·lules plasmàtiques. La segona conseqüència fruit de l'entrada de l'antigen i de la seva presentació és l'activació i la diferenciació de cèl·lules T que posteriorment migraran fora del MALT i aniran tant a teixits mucosals com a teixits perifèrics (Maloy i Powrie, 2001).

El GALT correspon a més del 80% de tot el sistema immunitari mucosal i està dividit en dues grans estructures. Per una banda, hi ha el **GALT organitzat**, on es troben les plaques de Peyer, els fol·licles limfoides aïllats i els ganglis limfàtics mesentèrics, responsables de la inducció de la resposta immunitària (Figura II-6). Per l'altra, hi ha el **GALT difús**, que està format per limfòcits dispersos al llarg de l'epiteli i de la *lamina propria* de la mucosa i constitueix el lloc efector de la resposta immunitària (Kelsall i Strober, 1999).

El sistema immunitari mucosal és responsable tant de mediatitzar les relacions simbiòtiques entre l'hoste i els bacteris comensals, com de funcionar com a primera línia de defensa contra els microorganismes patògens. A través de la immunitat innata i la immunitat adquirida, el sistema immunitari mucosal manté l'homeòstasi immunològica en la gran extensió de la superfície epitelial, comprnent des de les cavitats oral i nasal fins als tractes respiratori, intestinal i genitourinari (Kiyono i Fukuyama, 2004).

## **GALT ORGANITZAT**

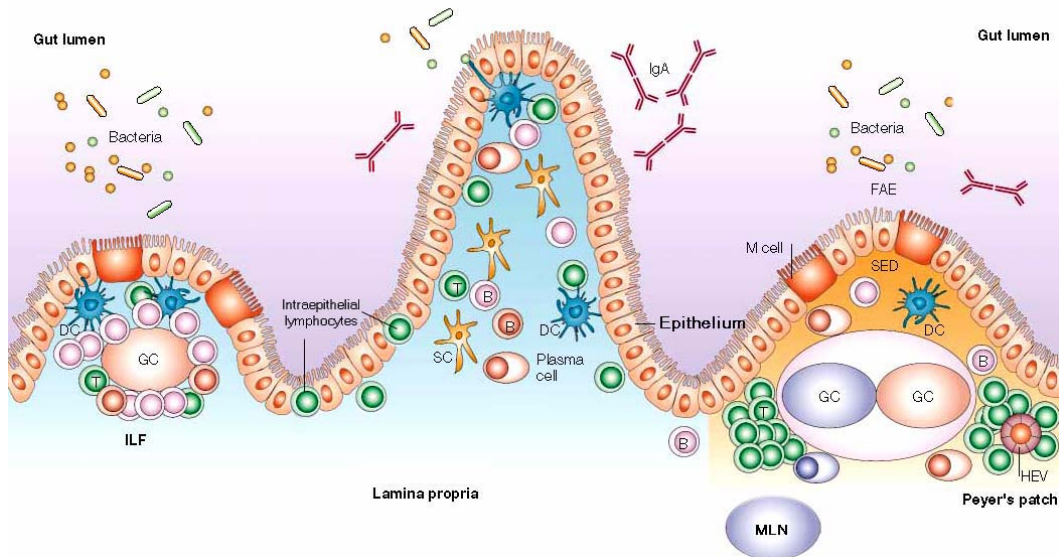
### **PLAQUES DE PEYER**

Les plaques de Peyer són agregats limfoides macroscòpics que es troben en la submucosa al llarg de l'intestí. Les plaques de Peyer madures consisteixen principalment en fol·licles rics en cèl·lules B, que estan envoltats per una àrea interfol·licular rica en cèl·lules T, on hi ha nombroses vècules endotelials altes, que permeten la migració cel·lular i la recirculació limfocítica (Kelsall i Strober, 1999). Aquestes àrees limfocítiques estan separades de la llum intestinal per una capa de cèl·lules epitelials, conegudes com a epiteli associat al fol·licle, i immediatament sota d'aquest hi ha una zona més difusa, anomenada volta subepitelial (SED).

L'**epiteli associat al fol·licle** (FAE) difereix de la resta d'epiteli intestinal en què té menys enzims digestius, una vora en raspall menys pronunciada i una absència total del receptor per a la IgA polimèrica. La característica més notable, però, és la presència de cèl·lules M. La característica principal d'aquestes cèl·lules és la seva elevada capacitat de transport transepitelial d'antígens. Aquests són captats des de la llum intestinal i són transportats intactes a la zona basolateral, on són alliberats. La superfície basolateral de les cèl·lules M és profundament invaginada per formar grans espais intraepitelials, on s'han identificat limfòcits B i T i un petit nombre de macròfags (Farstad *et al.*, 1994). S'ha suggerit que el trànsit dels limfoblasts B als espais formats per les invaginacions de les cèl·lules M podria permetre una exposició antigènica contínua i, per tant, permetria una extensió i diversificació de la resposta immunitària. Les cèl·lules presents a aquests espais podrien interactuar amb l'antigen ràpidament, en un ambient apartat de la influència moduladora de la immunitat humoral sistèmica.

Just per sota d'aquest epiteli hi ha la **volta subepitelial**, una zona difusa formada bàsicament per cèl·lules dendrítiques amb una funció principal de captació i presentació d'antígens. Aquesta zona també conté limfòcits T, cèl·lules plasmàtiques, macròfags i cèl·lules B. En estret contacte amb aquesta zona es troba l'estructura principal de les plaques de Peyer, els **fol·licles**, que contenen bàsicament cèl·lules B IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>, així com algunes cèl·lules dendrítiques fol·liculars i alguns limfòcits T CD4<sup>+</sup>, encarregats de col·laborar en el canvi d'isotip cap a IgA (Kelsall i Strober, 1999). En la zona més basal d'aquests fol·licles hi trobem els **centres germinals** de les plaques de Peyer, formats bàsicament per centròcits i centroblasts (Spencer *et al.*, 1986). Una de les característiques de les cèl·lules B d'aquests centres és que la immensa majoria expressen la IgA (Weinstein i Cebra, 1991). Un gran nombre de les respostes específiques de la IgA secretora són

generades en les plaques de Peyer i la progènie migra a la *lamina propria* (McIntyre i Strober, 1999).



**Figura II-6. Teixit limfoide associat a l'intestí (GALT).** Representació esquemàtica del GALT, amb les estructures limfoides organitzades —plaques de Peyer, fol·licles limfoides aïllats (ILF) i ganglis limfàtics mesentèrics— i el teixit difús de l'epiteli i de la *lamina propria*. Les plaques de Peyer estan formades per l'epiteli especialitzat associat al fol·licle (FAE), que conté les cèl·lules M, una volta subepitelial (SED) rica en cèl·lules dendrítiques (DC), i fol·licles que contenen cèl·lules B agrupades en centres germinals (GC). La migració de les cèl·lules B cap a la mucosa es realitza a través de les vènules endotelials altes (HEV), situades en les regions interfol·liculars de les plaques de Peyer, les quals contenen majoritàriament cèl·lules T. Els teixits difusos de la *lamina propria* contenen un gran nombre de cèl·lules plasmàtiques IgA<sup>+</sup>, cèl·lules T i B, macròfags (Mφ), cèl·lules estromatòmiques (SC) i cèl·lules dendrítiques (Adaptat de Faragasan i Honjo, 2004).

Les **zones interfol·liculars** estan caracteritzades per una important presència de cèl·lules T, però també hi ha cèl·lules dendrítiques madures, macròfags i una petita quantitat de limfòcits B. La major part dels limfòcits T d'aquesta zona són CD4<sup>+</sup>, que presenten el TCR  $\alpha\beta$  i responen als antígens de forma dependent del MHC II. Generalment, aquests limfòcits T es troben prop de les vènules endotelials altes i sovint expressen el receptor de la IL-2, cosa que suggereix que han estat recentment activats. Les cèl·lules TCR  $\alpha\beta^+$  CD8<sup>+</sup> també estan presents en la zona interfol·licular, però estan restringits en una estreta zona en la part central d'aquesta àrea. L'àrea fol·licular rica en cèl·lules B i la zona interfol·licular rica en cèl·lules T se superposen en algunes regions i són un lloc important per a les interaccions inicials entre les cèl·lules T i B (MacLennan *et al.*, 1997). La zona

interfol·licular també conté una xarxa de cèl·lules dendrítiques madures i macròfags (Kelsall i Strober, 1996).

#### FOL·LICLES LIMFOIDES AÏLLATS

Els fol·licles limfoides aïllats són agregats limfoides microscòpics que es localitzen a la mucosa intestinal. Aquests fol·licles són estructuralment i funcionalment molt similars als fol·licles que formen les plaques de Peyer i es creu que són un sistema equivalent o complementari a les plaques de Peyer per a la inducció de les respostes d'IgA generades a la mucosa intestinal (Hamada *et al.*, 2002).

#### GANGLIS LIMFÀTICS MESENTÈRICS

Els ganglis limfàtics mesentèrics tenen la mateixa estructura que la resta de ganglis perifèrics. Aquest òrgan té dues funcions principals: per una banda, actua com a filtre per als antígens i microorganismes, mitjançant les cèl·lules fagocítiques; i per l'altra, és el lloc on es presenta l'antigen al sistema immunitari. Histològicament es distingeixen tres zones diferents: el còrtex, el paracòrtex i la medul·la.

El **còrtex** és una àrea rica en limfòcits B i macròfags, on es poden diferenciar els fol·licles primaris i els secundaris. Els fol·licles primaris contenen principalment limfòcits B madurs, mentre que els secundaris (que contenen centres germinals) són llocs d'una intensa proliferació de cèl·lules B amb la consegüent síntesi de **cèl·lules B memòria**, que es queden al fol·licle i de **cèl·lules plasmàtiques** secretores d'immunoglobulines, que van a la circulació sanguínia i es distribueixen per l'organisme. El **paracòrtex** és una àrea rica en limfòcits T i cèl·lules dendrítiques. La **medul·la** conté cèl·lules plasmàtiques i macròfags.

#### *GALT DIFÚS*

##### LIMFÒCITS DE LA *LAMINA PROPRIA*

La *lamina propria* és la capa de teixit connectiu entre l'epiteli i la *muscularis mucosae*. Aquesta capa està infiltrada per un gran nombre de cèl·lules B, així com cèl·lules T, cèl·lules dendrítiques, macròfags, mastòcits i leucòcits polimorfonuclears (Kelsall i Strober, 1999). Des del punt de vista de les funcions de defensa, la *lamina propria* desenvolupa principalment una funció efectora: d'una banda prevé l'entrada de patògens a través de l'epiteli; de l'altra, elimina els microorganismes que han aconseguit entrar. En

aquest teixit també es duen a terme processos de proliferació i diferenciació cel·lular (Brandtzaeg, 2002).

Els limfòcits de la *lamina propria* són majoritàriament cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA i cèl·lules T memòria. Els limfòcits T d'aquest teixit pertanyen principalment a la subpoblació T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>) i poden desenvolupar respostes tipus T<sub>H</sub>1 o T<sub>H</sub>2 en funció de les interaccions cel·lulars amb les APC, el tipus d'antigen i les citocines secretades. En aquesta zona també hi ha limfòcits T CD8<sup>+</sup> que duen a terme funcions citotòxiques (Acheson i Luccioli, 2004). Les respostes tipus T<sub>H</sub>1 estan protagonitzades per la IL-12, que és secretada per les APC. Aquesta citocina potencia la citotoxicitat de les cèl·lules NK i indueix als limfòcits T a secretar IFN- $\gamma$ . Aquesta citocina és important en la resposta immunitària cel·lular i en la capacitat de les cèl·lules fagocítiques per eliminar patògens, ja que incrementa la producció d'agents antimicrobians com les espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen (Shiloh i Nathan, 2000). Altres citocines importants en aquesta cascada d'activació són la IL-1 i el TNF- $\alpha$ , que activen als macròfags, i la IL-8, que recluta altres cèl·lules fagocítiques com els neutròfils. Les cèl·lules T<sub>H</sub>2 generalment responen a patògens extracel·lulars i secreten IL-4, IL-5 i IL-13, que indueixen l'activació i la diferenciació de les cèl·lules B i el reclutament d'eosinòfils i de mastòcits (Paul i Seder, 1994).

### LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS

Els limfòcits intraepiteliais (IEL) són una població de cèl·lules efectores situada entre els enteròcits, per sota de les unions estretes. Aquestes cèl·lules són diferents de la població limfocítica de la circulació sistèmica i dels limfòcits de la *lamina propria* (Shanahan, 1994). Malgrat que la funció d'aquestes cèl·lules no està clarament determinada, es creu que actuen principalment com a cèl·lules citotòxiques, que proporcionen una primera línia de defensa enfront de patògens, possiblement a través de l'eliminació de cèl·lules epitelials infectades o transformades.

Els IEL són majoritàriament limfòcits T CD3<sup>+</sup>, i poden presentar un fenotip diferent en funció del TCR i dels co-receptors que expressin. Dins dels IEL hi ha tres grans categories: la subpoblació TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, els que expressen els coreceptors convencionals (CD4 i CD8  $\alpha\beta$ ) i els que expressen l'homodímer CD8 $\alpha\alpha$  (Cheroute, 2004). Del total de IEL els limfòcits T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> representen entre un 5 i un 20% (Beagley *et al.*, 1995). Una particularitat que mostren els limfòcits T  $\delta\gamma$  és que poden respondre a diferents antígens bacterians sense requerir-ne la seva presentació, fet que suggereix que aquestes cèl·lules estan implicades en la defensa innata (Williams, 1998). Els limfòcits T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> també contribueixen a la reparació del

teixit i a la regeneració cel·lular després de la resolució de la resposta immunitària, mitjançant la producció de citocines i factors de creixement (Boismenu i Havran, 1994). La major part dels limfòcits T són CD8<sup>+</sup>, i d'aquests una gran part presenta l'homodímer CD8 $\alpha\alpha$  (Guy-Grand *et al.*, 1991). La presència de limfòcits T amb aquest homodímer és característica d'aquest compartiment intraepitelial tot i que no es coneix la seva funció (Kelsall i Strober, 1999). Els limfòcits T CD4<sup>+</sup> són una població molt minoritària en aquest compartiment.

Al compartiment intraepitelial també hi ha les cèl·lules NK que es caracteritzen per l'expressió del receptor NKR-P1. Aquestes cèl·lules representen el 25% de tota la població intraepitelial i la majoria expressen el receptor per a la IL-2 (Todd *et al.*, 1999), que és un indicador d'activació.

La majoria dels IEL (85%) expressa la integrina  $\alpha\epsilon\beta_7$  que s'uneix a la E-cadherina, que s'expressa a la membrana basolateral dels enteròcits. Aquesta interacció és cabdal per a la presència i el manteniment dels limfòcits en aquesta zona mucosal (Cepek *et al.*, 1994) i col·labora en la proliferació induïda per l'estimulació a través del TCR, així com en funcions efectores (Higgins *et al.*, 1998).

### **IMMUNOGLOBULINA A**

La immunoglobulina A (IgA), a més de ser la immunoglobulina principal en les superfícies mucosals, és també molt abundant en la circulació sistèmica i en altres teixits, inclosa la *lamina propria*. En la mucosa, la IgA col·labora que les reaccions del sistema immunitari siguin menys intenses i no destorbin les funcions fisiològiques (Russell *et al.*, 1999).

Hi ha dues formes d'IgA: la IgA monomèrica (mIgA) i la dimèrica (dIgA). La mIgA està constituïda per una unitat d'IgA i, per tant, presenta dos llocs d'unió a l'antigen; aquesta IgA es troba principalment en el torrent sanguini. La dIgA està constituïda per dues unitats d'IgA, per la qual cosa presenta quatre llocs d'unió a l'antigen i es troba principalment en les secrecions. Les dues unitats d'IgA que constitueixen la dIgA estan unides entre elles mitjançant la cadena J. De fet, tot i que generalment la més abundant és la dIgA, també s'han trobat trímers i tetràmers. La cadena J també és produïda per les cèl·lules plasmàtiques i és necessària per al transport de la dIgA a través de l'epiteli. (Brandtzaeg i Prydz, 1984).

La dIgA és produïda de forma local per cèl·lules plasmàtiques residents a la *lamina propria* mucosal. La producció d'IgA per part de les cèl·lules B pot ser dependent o independent de cèl·lules T. Aquesta segona via és important en la producció de les

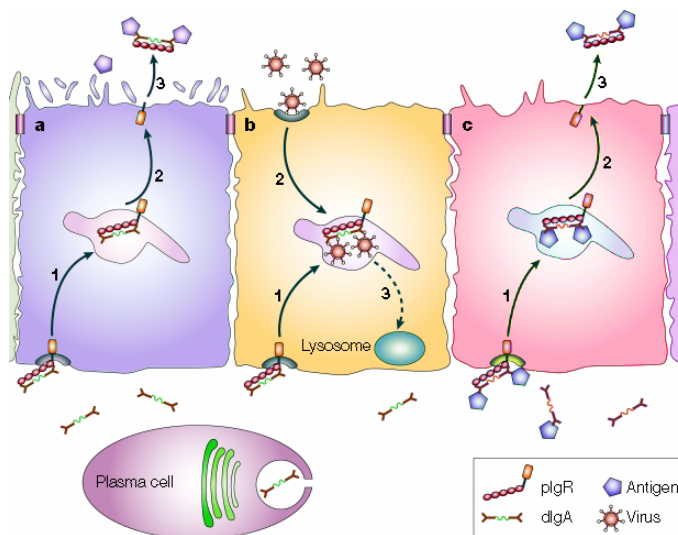
immunoglobulines que protegeixen contra els bacteris comensals que habiten l'intestí i probablement representa una forma de defensa immunitària específica primitiva (Macpherson *et al.*, 2000). Aquesta activació independent de cèl·lules T sembla que implica la presentació de l'antigen per part de les cèl·lules dendrítiques. Recentment, s'ha demostrat que aquestes cèl·lules poden agafar mostres directament de la llum intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). A causa de la gran superfície, i de la seva constant interacció tant amb la flora endògena com amb microorganismes externs, el tracte intestinal és l'òrgan que secreta més dIgA (Didierlaurent *et al.*, 2002). La dIgA també es troba a la saliva, al calostre i a les llàgrimes.

Les respostes immunitàries mucosals específiques d'antigen en el tracte gastrointestinal són iniciades amb la captura d'antígens en els llocs inductors organitzats de la mucosa, representats per les plaques de Peyer. En la superfície d'aquestes es troben les cèl·lules M, que són les responsables de transportar els antígens des de la llum intestinal fins a les cèl·lules immunocompetents presents en la pròpia placa (Iijima *et al.*, 2001). Allà, les cèl·lules B que hi ha en els centres germinals canvien el seu isotip d'IgM a IgA sota la influència de les cèl·lules T i citocines. En particular, del factor de creixement transformant- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ), que indueix l'expressió IgA i de la IL-5 que incrementa la seva producció (Janeway *et al.*, 2000). Llavors migren des de les plaques de Peyer cap als ganglis limfàtics mesentèrics, on continuen dividint-se i diferenciant-se. Finalment, surten dels nòduls limfàtics i arriben, a través del conducte toràcic, al torrent sanguini, que les retorna cap a la *lamina propria* de la mucosa intestinal. Un cop han arribat, completen la seva diferenciació cap a cèl·lules plasmàtiques madures secretores d'IgA (Lamm i Phillips-Quagliata, 2002).

Després de la secreció, la dIgA s'uneix al receptor per a immunoglobulines polimèriques (pIgR) que està localitzat a la superfície basolateral de les cèl·lules epitelials. El pIgR és una proteïna transmembrana amb una regió extracel·lular d'unió al lligand. Després de la seva síntesi el pIgR és transportat cap a la membrana basolateral, on s'unirà a la dIgA. El complex pIgR-dIgA és seguidament internalitzat (Figura II-7 a)) i transportat mitjançant compartiments endosòmics a través de la cèl·lula fins a la superfície apical. Una vegada a la superfície apical, el pIgR és escindit específicament deixant un pèptid unit a la molècula de dIgA anomenat component secretor (SC). La dIgA secretada juntament amb el SC és coneguda com a IgA secretora (sIgA; Rojas i Apodaca, 2002). Aquest component aporta resistència a la molècula de sIgA enfront de la degradació per proteases bacterianes, àcid gàstric i enzims proteolítics (Janeway *et al.*, 2000).

Les funcions principals de la IgA són les següents:

**Evitar la unió luminal dels patògens.** Després de la transcitosi i la secreció a la llum intestinal (Figura II-7 a)), la sIgA pot unir-se a antígens com ara bacteris, virus, paràsits i toxines (Fubara i Freter, 1973). La sIgA evita la seva adhesió a la superfície mucosal i, per tant, la seva invasió, interferint en la seva motilitat –inhibint la funció flagel·lar o induint l'agregació microbiana– i competint amb el patògen pels llocs d'unió en la superfície apical de les cèl·lules epitelials (Williams i Gibbons, 1972). Finalment, la seva presència luminal pot neutralitzar la toxicitat de productes patogènics com ara toxines bacterianes (Vaerman *et al.*, 1985).



**Figura II-7. Transport i funcions de la IgA.** a) *Transport de la sIgA.*

La dIgA secretada per les cèl·lules plasmàtiques s'uneix al plgR de la membrana basolateral dels enteròcits i és transportada cap a la membrana apical, on és alliberada. La dIgA, unida al fragment del receptor tallat, forma la sIgA. En les secrecions, la sIgA interacciona amb antígens o patògens, i en neutralitza la capacitat per causar una infecció.

b) *Neutralització de virus intracel·lulars.* Els complexos plgR-dIgA són transferits a compartiments endocítics on es troben amb els virus. La

interacció dels complexos plgR-dIgA amb els virus n'evita la sortida de la cèl·lula, possiblement dirigint-los cap als lisosomes on seran destruïts. c) *Secreció d'antigen.* Els antígens patogènics que han entrat a l'epiteli i a la *lamina propria* són units a plgR-dIgA, internalitzats, transportats a través de la cèl·lula i alliberats en el pol apical de la cèl·lula on són eliminats. dIgA, IgA dimèrica; plgR, receptor de la immunoglobulina polimèrica; sIgA, IgA secretora (Rojas i Apodaca, 2002).

**Neutralització intracel·lular de virus.** A més d'evitar l'adhesió i la invasió de les cèl·lules per patògens, estudis *in vivo* i *in vitro* recolzen el possible paper de la dIgA en la neutralització intracel·lular de virus (Figura II-7 b)). Una vegada la dIgA és internalitzada mitjançant els endosomes, pot desenvolupar aquesta funció per dues vies: en l'una inhibeix l'associació de les proteïnes víriques a nivell intracel·lular (Fujioka *et al.*, 1998); i en l'altra, evita la sortida del virus, redirigint els endosomes (als quals s'hagin fusionat) cap als lisosomes (Mazanec *et al.*, 1992). Per tant, la neutralització intraepitelial de virus mediada per la IgA pot aportar un altre mecanisme per prevenir infeccions.



**Secreció d'antígens.** La tercera línia de defensa mediada per la IgA ocorre en la *lamina propria*. Els antígens patogènics entren a l'epiteli, des d'on arriben a la *lamina propria* i d'aquí a la circulació sistèmica. La dIgA que és secretada contínuament per les cèl·lules plasmàtiques s'uneix a antígens en la *lamina propria* (Figura II-7 c) i una vegada units, els complexos de dIgA-antigen són secretats per transcitosi a la llum mucosal, on són posteriorment eliminats (Kaetzel *et al*, 1991).

Les formes d'IgA que es troben a plasma i a teixit són molècules d'una elevada adaptabilitat funcional, capaces d'actuar en funció de les necessitats locals. En absència de patògens invasors, la IgA pot modular les respostes inflamatòries del complement i l'activació de les cèl·lules fagocítiques, i possiblement les reaccions mitjançades per la IgE. En canvi, quan es produeixen senyals d'alarma que provenen de microorganismes i del sistema immunitari innat, la IgA pot promoure una forta resposta inflamatòria.

### **INDUCCIÓ I REGULACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA MUCOSAL**

L'entrada dels antígens i dels microorganismes a la mucosa intestinal indueix una resposta immunitària mucosal. Els antígens poden entrar a través de les cèl·lules M, cèl·lules epitelials especialitzades en la captació i el transport d'antígens luminals, o bé a través dels enteròcits que poden actuar com a APC no professionals.

Els antígens captats a través de les cèl·lules M són transportats intactes fins a espais subepitelials, on són captats i processats per les APC. Aquestes cèl·lules migren cap les àrees T interfol·liculars i/o als fol·licles de cèl·lules B de les plaques de Peyer, on presentaran l'antigen als limfòcits. Seguidament, els limfòcits T activats secreten TGF- $\beta$ , que inhibeix la producció d'IgG i d'IgM i indueix als limfòcits B a realitzar un canvi d'isotip a IgA. Les cèl·lules T precursoras específiques d'antigen, i les cèl·lules B precursoras de cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA abandonen la placa de Peyer i migren als ganglis mesentèrics, on maduren i pateixen una expansió clonal. Aquestes cèl·lules entren a la circulació sistèmica a través del conducte toràcic i retornen a l'epiteli intestinal i altres zones mucosals, on exerciran la seva funció com a cèl·lules efectores (Figura II-8; Mowat, 2003).

Les cèl·lules B arriben a la *lamina propria* on, sota la influència de cèl·lules T i de citocines secretades, completen la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA. Els limfòcits T activats migren a diferents zones efectores de la mucosa intestinal, gràcies a complexes interaccions entre selectines i integrines de la seva membrana i els seus lligands presents a la superfície de les cèl·lules endotelials de la *lamina propria* (Kelsall i Strober, 1999).

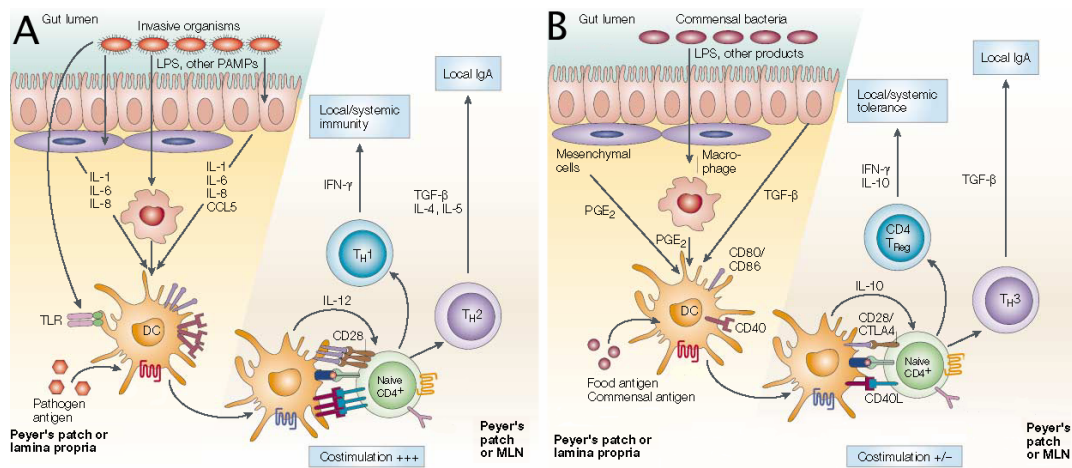
Les cèl·lules epitelials de la mucosa intestinal poden actuar com a APC no professional. Els antígens proteics solubles poden travessar els enteròcits de forma no específica mitjançant pinocitosi, o de forma específica a través de receptors. Els enteròcits capturen els antígens a través de la membrana apical i els presenten als IEL per la membrana basolateral o als LPL mitjançant projeccions que emeten a través de porus presents en la membrana basal (Hershberg i Mayer, 2000). Els enteròcits, en condicions normals, presenten MHC II només a la membrana apical mentre que durant un procés inflamatori s'expressa a les membranes apical i basolateral. En aquestes situacions, la major expressió de MHC-II pot afavorir la presentació d'antígens a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria* realitzada pels enteròcits, i contribuir directament a l'activació del sistema immunitari (Kelsall i Strober, 1999).

Els antígens luminals també poden entrar a la mucosa per la via paracel·lular, juntament amb molècules d'aigua i electròlits. Aquesta via d'entrada està restringida gràcies a l'eficàcia de les unions estretes, però es troba alterada en determinats estats patològics, com ara la inflamació intestinal. L'augment de la permeabilitat intestinal afavoreix el pas d'antígens a la mucosa, on són captats per les APC (cèl·lules dendrítiques i macròfags) que, seguidament, processen l'antigen i l'expressen a la seva superfície per iniciar la resposta immunitària (Shanahan, 1994).

La resposta immunitària adaptativa s'indueix principalment per la presentació d'antígens a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. L'activació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> causa una producció de citocines i amplifica ambdós sistemes de defensa: la innata i l'adquirida. Aquesta activació condueix a una diferenciació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> a cèl·lules efectores. Les citocines secretades i, per tant, la via de diferenciació que segueixen depèn de l'ambient immunitari local. Una via dirigeix la diferenciació cap a les cèl·lules efectores tipus T<sub>H1</sub> i T<sub>H2</sub> d'una resposta immunitària, mentre que una altra porta cap a cèl·lules T supressores que intervenen en la tolerància oral (Figura II-8).

Bacteris intracel·lulars, productes bacterians i alguns paràsits estimulen als macròfags i a les cèl·lules dendrítiques a produir IL-12, que indueix la diferenciació de les cèl·lules CD4 verges cap a cèl·lules tipus T<sub>H1</sub> (Decker *et al.*, 2002). Aquestes cèl·lules principalment produeixen IFN- $\gamma$  (Wolk *et al.*, 2000), que amplifica la resposta proinflamatòria a través de l'activació de macròfags. L'exposició a helmints i a al·lèrgens provoca la diferenciació de les cèl·lules T CD4 verges a cèl·lules tipus T<sub>H2</sub>. Aquesta diferenciació està dirigida per la IL-4, que causa una baixa producció de IL-12 i suprimeix l'activació dels macròfags (Robinson, 2000).

A més d'aquests dos tipus cel·lulars, també hi ha les cèl·lules T tipus  $T_H3$  i les cèl·lules T reguladores ( $T_{Reg}$ ). Les cèl·lules  $T_H3$  produeixen TGF- $\beta$  i juguen un paper molt important en el desenvolupament de la tolerància oral. Les cèl·lules  $T_{Reg}$  produeixen IL-10 i TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  suprimeix les funcions  $T_H1$  i  $T_H2$ , macròfags, cèl·lules NK i indueix el canvi d'isotip a IgA als limfòcits B. Les conseqüències immunològiques de l'activació d'aquestes cèl·lules ( $T_H3$  i  $T_{Reg}$ ) és la producció local d'IgA i homeòstasi immunitària local.



**Figura II-8. Inducció i regulació de la resposta immunitària.** **A)** Els microorganismes patògens o els seus productes indueixen una inflamació local a través de l'activació de macròfags, cèl·lules dendrítiques (DC) i cèl·lules epitelials. Aquests productes s'uneixen a uns receptors anomenats Toll-like (TLR). Les cèl·lules dendrítiques de les plaques de Peyer o de la *lamina propria*, una vegada han captat l'antigen, maduren completament i produeixen IL-12. Després de migrar als ganglis limfàtics mesentèrics, aquestes cèl·lules dendrítiques estimulen a les cèl·lules T tipus  $T_H1$ , que produeixen IFN- $\gamma$  i provoquen inflamació. **B)** Les cèl·lules dendrítiques (DC) de les plaques de Peyer o de la *lamina propria* capturen productes dels bacteris residents i sota la influència del TGF- $\beta$  (secretada per les cèl·lules epitelials en absència d'inflamació) i de la PGE<sub>2</sub> (secretada constitutivament pels macròfags) maduren parcialment. Després, l'antigen és presentat a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> verge de les plaques de Peyer o dels ganglis limfàtics mesentèrics (MLN). Aquestes cèl·lules T es diferencien cap a cèl·lules T reguladores, que produeixen IL-10 i IFN- $\gamma$ , i/o cap a cèl·lules  $T_H3$ , que produeixen TGF- $\beta$ . Les conseqüències immunològiques són la producció local d'IgA i homeòstasi immunitària local. (Adaptat de Mowat, 2003).

### DESENVOLUPAMENT POSTNATAL DEL SISTEMA IMMUNITARI INTESTINAL

Els òrgans limfoides primaris, timus i moll de l'os estan ben desenvolupats i contenen les cèl·lules progenitores de la línia limfomieloide des d'estadis primerencs del desenvolupament (Kelly i Coutts, 2000). En aquests estadis, ja hi ha una xarxa de vasos limfàtics, que aporten un sistema circulatori funcional que distribueix aquestes cèl·lules precursors als llocs d'inducció, plaques de Peyer i ganglis limfàtics mesentèrics, i així

asseguren el desenvolupament en paral·lel dels òrgans limfoides primaris i secundaris (Husband i Gleeson, 1996). Les cèl·lules implicades en la resposta immunitària innata, com ara macròfags i neutròfils, ja estan desenvolupades en els estadis inicials de la gestació, però la seva infiltració en l'intestí requereix una estimulació antigènica postnatal.

A l'inici de la vida postnatal, doncs, ja hi ha els components cel·lulars del sistema immunitari i, a més, es poden generar respostes humorals (tant sistèmiques com mucosals). No obstant això, persisteix una certa deficiència funcional, tant en la immunitat innata com en l'adquirida durant algun temps després del naixement, que deixa al nouat susceptible a infeccions bacterianes i virals. A l'inici de la vida postnatal hi ha una permeabilitat intestinal més elevada i encara no s'han desenvolupat del tot les funcions de les cèl·lules T i de les cèl·lules B (Insoft *et al.* 1996). En el nouat hi ha deficiències en la presentació d'antígens, concretament en la funcionalitat del sistema CD1 de les APC. Això actua limitant el desenvolupament d'una resposta immunitària adequada (Fairhurst *et al.*, 1998). El sistema CD1 està reconegut com el tercer sistema de presentació d'antigen, a més dels sistemes MHC I i MHC II, i es creu que pot ser important en la presentació d'antígens no peptídics i proporcionar així un vincle entre la immunitat innata i l'adquirida (Jullien *et al.*, 1997). Les molècules CD1 s'han trobat en timòcits, APC, incloent-hi les cèl·lules dendrítiques (Jullien *et al.*, 1997); en les cèl·lules B de la *lamina propria*; i en cèl·lules epitelials (Fairhurst *et al.*, 1998).

Així doncs, durant el període neonatal, el principal responsable de l'eliminació d'antígens són les cèl·lules del sistema immunitari innat, predominantment macròfags, neutròfils i cèl·lules NK. En nous, malgrat que les cèl·lules implicades en la immunitat innata són funcionals, estan presents en baix nombre, són menys quimiotàctiques i els seus enzims tenen menys activitat que en els adults (Kovarik i Siegrist, 1998).

### 3. INFLAMACIÓ INTESTINAL

La inflamació és una resposta a la infecció, a l'entrada d'antígens o al dany tissular, que està dirigida a l'eliminació dels agents que els causen i a potenciar la reparació del teixit. La inflamació pot ser dividida en dues categories principals –crònica i aguda– en funció de la durada i de les característiques patològiques dels teixits afectats. Les malalties inflamatòries cròniques inclouen l'artritis reumatoide i la malaltia inflamatòria intestinal, entre d'altres. Aquests desordres estan caracteritzats per una durada perllongada (setmanes, mesos o anys), durant la qual es produeix de forma simultània, inflamació, destrucció tissular i una regeneració dels teixits inflamats (Liew, 2003). La infiltració de

cèl·lules mononuclears i la fibrosi són característiques de la inflamació crònica (Davies *et al.*, 2003). La inflamació aguda és un procés de curta durada (hores o dies) i està caracteritzada per vasodilatació, edema i migració cel·lular (principalment neutròfils) cap al lloc afectat (Stojadinovic *et al.*, 1997) i, en alguns casos, activació de la cascada de la coagulació (Spletstoesser i Schuff-Werner, 2002).

### 3.1. INFLAMACIÓ INTESTINAL AGUDA

La vasodilatació és una característica de la inflamació aguda i la seva finalitat és facilitar l'alliberament local de mediadors solubles i de cèl·lules inflamatòries. La vasodilatació és mediada principalment per l'òxid nítric i per prostaglandines vasodilatadores. L'òxid nítric es forma a partir de la L-arginina mitjançant l'òxid nítric sintasa (NOS), de la qual s'han descrit 3 isoformes: l'endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) i la induïble (iNOS). Les dues primeres s'expressen constitutivament i l'última l'expressen els leucòcits activats, després de l'exposició a productes microbians o a citocines proinflamatòries (Vallance i Chan, 2001).

Un altre signe primerenc d'inflamació és l'edema. Diferents mediadors inflamatoris (com la histamina, la bradiquinina, els leucotriens o components del complement, entre d'altres) provoquen la sortida d'un fluid ric en proteïnes des del compartiment intravascular cap a l'espai intersticial (Friedl *et al.*, 1989; Denzlinger, 1985). Aquests factors alteren l'estructura de l'endoteli vascular i aleshores incrementa la permeabilitat dels capil·lars i de les vècules a l'aigua i a les proteïnes (Demling *et al.*, 1982). D'aquesta manera s'alliberen factors solubles com ara immunoglobulines i proteïnes de fase aguda al teixit afectat.

La vasodilatació i l'exudació de líquid s'acompanyen de la migració de leucòcits. Els neutròfils són els primers leucòcits que arriben al lloc de la inflamació. El fenomen de la transmigració està dividit en diferents fases: marginació, rodament, adhesió, diapedesi i quimiotaxi. La marginació és el procés pel qual el neutròfil va des del centre del torrent sanguini a la perifèria del vas (Blix *et al.*, 1985). Després de la marginació, es desenvolupa una interacció feble entre els neutròfils i les cèl·lules endotelials vasculares que permet el rodament dels leucòcits. Aquestes interaccions adhesives són facilitades per les selectines i els seus lligands. A mesura que el rodament progressa, es desenvolupa una interacció adhesiva d'elevada afinitat coneguda com a adhesió. L'adhesió és necessària per a les posteriors diapedesi i quimiotaxi dels neutròfils, i és mediada per les integrines i els seus lligands. Tant les integrines com els seus lligands estan presents de forma constitutiva a la superfície dels neutròfils i de les cèl·lules endotelials, però la seva expressió s'incrementa

durant els períodes d'inflamació, fet que promou la transició de rodament a adhesió (Carlos i Harlan, 1990). Després de l'adhesió, els neutròfils han de passar a través de l'endoteli i a la membrana basal per anar a la zona extravascular inflamada. Els neutròfils passen a través de les unions de les cèl·lules endotelials, un procés que és facilitat per la retracció endotelial (Del Maschio *et al.*, 1996) i per la presència de noves molècules d'adhesió (Berman i Muller, 1995).

Els neutròfils i altres leucòcits també requereixen molècules quimiotàctiques per facilitar la seva migració als teixits inflamats. Els quimioatracients són molècules solubles com ara productes bacterians, components del complement i quimiocines que serveixen per atraure els leucòcits als teixits inflamats. Molts quimioatracients són específics per a determinades subpoblacions leucocitàries i poden ser classificats en funció d'aquesta especificitat (Bray *et al.*, 1981). Un exemple de quimiocina és la IL-8 que és un potent quimioatracient per als neutròfils.

La inflamació intestinal pot ser induïda per diferents microorganismes o per les seves toxines. Aquests comprenen un ampli rang que inclou virus (rotavirus, adenovirus), bacteris (*Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*) i paràsits (*Cryptosporidium*, *Giardia*).

Una de les característiques que sol presentar la inflamació intestinal és la diarrea. Aquesta pot ser causada tant per lesions epitelials (exudació i reducció de la capacitat absorbiva) com per l'acció de mediadors inflamatoris estimulants la secreció. La citocina principal en aquestes circumstàncies és el TNF- $\alpha$ , que indueix un alliberament massiu de prostaglandines i altres estímuls secretors (Field, 2003). Les prostaglandines són productes del metabolisme de l'àcid araquidònic. La producció de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) està catalitzada per la prostaglandina H sintasa (Weymer *et al.*, 1985). Així per exemple, patògens com *C. parvum* provoquen diarrea (Hunt *et al.*, 2002) per un mecanisme que inclou la inducció de l'expressió de la prostaglandina H sintasa i, per tant, s'incrementen els seus productes PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Les dues prostaglandines indueixen un augment en la secreció de clorur cap a la llum intestinal (Eckmann *et al.*, 1997) que va acompanyada per un increment de la sortida d'aigua.

En la inflamació intestinal també s'incrementa la permeabilitat intestinal, de manera que s'altera la funció de barrera. Diferents toxines i mediadors inflamatoris intervenen en aquest efecte; per exemple, toxines de *Clostridium* i de *Vibrio* afecten el complex d'unió, o bé translocant diferents proteïnes de la unió, com la ZO-1 o l'occludina (Chen *et al.*, 2002), o bé reduint el nombre de bandes a la unió estreta (Sonoda *et al.*, 1999). A més d'aquest efecte directe sobre les unions intercel·lulars, les toxines també poden actuar a través de l'activació de la secreció de citocines proinflamàtores com són l'IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$ .

Aquestes citocines incrementen la permeabilitat epitelial mitjançant una reducció de l'expressió de la ZO-1 i de l'occludina (Tsukita *et al.*, 2002; Bruewer *et al.*, 2003).

En els processos inflamatoris hi ha una reducció en l'absorció de nutrients que entren a la cèl·lula a través de mecanismes dependents del gradient de Na<sup>+</sup>. En diferents estats inflamatoris s'ha observat una reducció de l'activitat de l'ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de la membrana basolateral (Wild i Thomson, 1995; Sekikawa *et al.*, 2003), que és la principal responsable del manteniment del gradient de Na<sup>+</sup>. A més d'aquesta reducció en el gradient de Na<sup>+</sup>, el cotransport de Na<sup>+</sup>/glucosa també està inhibit a causa de la reducció en el nombre de transportadors (Sundaram *et al.*, 1997). En altres estudis també s'ha observat una reducció en el nombre de transportadors de fructosa (GLUT5), així com en el d'alguns aminoàcids (Sekikawa *et al.*, 2003).

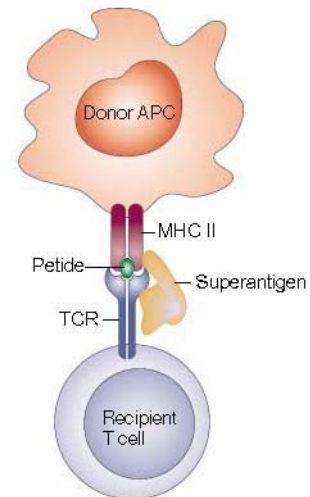
### 3.2. ENTEROTOXINA B D'*Staphylococcus aureus*

L'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB) és un superantigen i com a tal difereix en diferents aspectes dels antigens convencionals. Aquests últims són processats per les APC en petits pèptids que són presentats mitjançant el MHC a la superfície de la pròpia cèl·lula. Els pèptids units al MHC són específicament reconeguts pels limfòcits T a través del solc format per les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  del TCR. Per tant, cada pèptid de l'antigen processat està destinat a ser reconegut, en el context del MHC, per TCR d'afinitat específica. Conseqüentment, quan un antigen s'introdueix dins l'organisme, el nombre de cèl·lules T que presentaran el TCR adequat per reconèixer el pèptid serà molt baix; es troba en un rang d'1 a 100 cèl·lules per cada milió (Müller-Alouf *et al.*, 2001).

Els superantígens s'uneixen a les regions no variables del MHC II, per fora del solc d'unió al pèptid (Figura II-9) i aquests són presentats com a proteïnes no processades (és a dir, intactes) als limfòcits T, que expressen les seqüències apropiades en la regió variable de la cadena  $\beta$  ( $V\beta$ ) del TCR. En humans el repertori de TCR comprèn 24 tipus principals de  $V\beta$  (Champagne *et al.*, 1993). Com a conseqüència, els superantígens estimulen una gran quantitat de limfòcits T, més del 30% de les cèl·lules T en humans. El percentatge de limfòcits T activats depèn del nombre de famílies que poden interactuar amb un determinat superantigen, així com de la freqüència de l'expressió d'aquestes famílies en un repertori individual (Müller-Alouf *et al.*, 2001).

Els superantígens estimulen de forma molt potent els limfòcits T CD4<sup>+</sup> i els T CD8<sup>+</sup>, i algunes vegades els limfòcits T  $\gamma\delta$  (Müller-Alouf *et al.*, 2001). Aquesta activació condueix a una gran producció de citocines, que sovint està protagonitzada per TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-2 (Onai i Kudo, 2001; Litton *et al.*, 1994). Un altre tipus cel·lular que pot estar implicat en la

inflamació induïda per SEB és el de les cèl·lules NK, ja que s'ha vist que algunes subpoblacions d'aquestes cèl·lules expressen el MHC II i, per tant, podrien actuar com a APC. El percentatge d'aquestes cèl·lules a la circulació perifèrica s'incrementa quan entren en contacte amb el SEB (D'Orazio i Stein-Streilein, 1996). Aquesta activació del sistema immunitari i el posterior alliberament de citocines altera tant la funció de barrera com la de transport intestinal (Lu *et al.*, 1998).



**Figura II-9. Reconeixement del pèptid antigènic i del superantigen.** El pèptid de l'antigen convencional és reconegut a través dels solcs del MHC i del TCR (reconeixement restringit). El superantigen s'uneix fora del solc de restricció; per tant, pot activar moltes més cèl·lules T que l'antigen convencional. Adaptat de Lechler *et al.*, 2003.

A més d'aquest efecte sobre les poblacions limfocitàries, el SEB induïx una inflamació aguda, caracteritzada per edema i per infiltració de neutròfils (Franco-Penteado *et al.*, 2001). Els neutròfils són considerats el principal tipus cel·lular de la defensa innata implicat en la defensa contra *S. aureus* (Hill *et al.*, 1996); i l'acumulació de neutròfils és una característica prominent de la gastroenteritis induïda per enterotoxines estafilocòcciques (Zehavi-Willner *et al.*, 1984).

## 4. DIETA I SALUT ANIMAL

### 4.1. ANTIBIÒTICS EN L'ALIMENTACIÓ DELS ANIMALS DE GRANJA

En porcells i en vedells, el deslletament sovint està associat a malalties infeccioses i a diarrees causades principalment per *Escherichia coli* enterotoxigènica. Aquestes infeccions freqüentment incrementen la mortalitat en les granges (Osek, 1999). Per això en moltes granges de producció ramadera s'utilitzen substituïts de la llet per a alimentar els vedells i



els porcells, la major part dels quals contenen antibiòtics, habitualment neomicina i oxitetraciclina (Heinrichs *et al.*, 1995). Els efectes primaris associats a la inclusió d'antibiòtics en els pinsos són la prevenció de molèsties intestinals, la millora de l'eficiència dels nutrients i del rendiment de l'animal. Els efectes secundaris inclouen una reducció en la pèrdua de nutrients i una reducció en els costos de la producció animal (Close, 2000). Els avantatges principals associats a la inclusió dels antibiòtics en els pinsos és la reducció de la població microbiana en el tracte gastrointestinal, així com un canvi de patògens cap a bacteris beneficiosos. Això resulta en una millor absorció de nutrients, menys substrat per a la proliferació d'organismes patògens i una millora en la integritat del tracte gastrointestinal. D'altra banda, estudis recents mostren que l'ús continuat d'antibiòtics en la ramaderia genera metabòlits d'aquests que es dipositen a la carn i que contribueixen al desenvolupament i al manteniment de les resistències bacterianes als antibiòtics (Fey *et al.*, 2000; Tollefson *et al.*, 1999). Dunlop *et al.* (1998) conclouen que reduint la suplementació amb antibiòtics d'ampli espectre dels porcs destinats a consum, es pot reduir la prevalença d'*E. coli* resistent.

El 15 de febrer de 1998, la indústria de l'aviram danesa va decidir de forma voluntària deixar d'utilitzar antibiòtics com a promotors del creixement. Poc després la Unió Europea (UE) va prendre mesures per minimitzar l'ús de fàrmacs antimicrobians en ramaderia. Concretament, al desembre de 1998, els ministres de sanitat de la UE van prohibir els quatre antibiòtics més àmpliament utilitzats (bacitracina de zinc, espiramicina, tilosina i virginamicina) com a promotors del creixement dels animals. Aquesta prohibició es va fer efectiva per als quinze estats membres de la UE l'1 de juliol de 1999; i a partir de l'1 de gener de 2006 es prohibirà l'ús de qualsevol antibiòtic com a estimulador del creixement en animals. Per tant, el consell europeu de ministres de sanitat, juntament amb la FDA (*Food & Drug Administration*) nord-americana, recomanen emprar productes alternatius, sempre que sigui possible. Fruit d'aquesta recomanació s'han avaluat diferents productes com a possibles alternatives a l'ús d'antibiòtics en la formulació dels substituïts de la llet. Alguns d'ells són els llevats i els seus cultius, els fructooligosacàrids i els derivats del plasma animal, entre d'altres.

Estudis recents realitzats amb llevats com a suplementes dietètics han aportat resultats contradictoris. En alguns s'ha observat que milloren la taxa de creixement i que modulen la resposta immunitària de porcells acabats de deslletar (Davis *et al.*, 2004), mentre que en altres estudis no es veuen efectes remarcables (Quigely *et al.*, 1992), o bé s'obtenen resultats variables entre diferents experiments (Van Heugten *et al.*, 2003). Aquesta variabilitat en els resultats pot estar associada a diferències en les soques emprades, les dosis, les condicions d'emmagatzematge, la composició de la dieta, interaccions amb fàrmacs i diferències en les estratègies d'alimentació (Chesson, 1994).

Pel que fa als fructooligosacàrids, s'ha observat que aquests compostos estimulen el creixement de bacteris beneficiosos per al tracte gastrointestinal (com per exemple els *Bifidobacterium*) i inhibeixen la colonització de patògens (Menne *et al.*, 2000). En la mateixa línia, Hosono *et al.* (2003) conclouen que els canvis en la microbiota intestinal promoguts pels fructooligosacàrids afecten el sistema immunitari mucosal, concretament incrementant la secreció d'IgA.

Finalment, pel que fa a les proteïnes plasmàtiques, aquestes han estat àmpliament reconegudes com a ingredients alimentaris d'alta qualitat per als animals de granja, incloent-hi el bestiar porcí i boví. Un exemple d'aquestes proteïnes és el suplement amb plasma assecat, l'SDAP (*Spray-Dried Animal Plasma*). Quan es compara la suplementació amb SDAP i la suplementació amb antibiòtics com a promotors del creixement, es pot observar que les taxes de creixement i l'eficiència del pinso consumit són similars en ambdós casos (Torrallardona *et al.*, 2002). Aquest mateix grup observa que els efectes de la suplementació, tant amb antibiòtics com amb les proteïnes plasmàtiques, es produeixen sobretot durant els 14 primers dies després del deslletament. Això pot estar motivat pel fet que els porcells són més sensibles a desordres patològics durant les dues primeres setmanes després del deslletament, ja sigui per l'estrès que comporta la pròpia separació de la mare (Pluske *et al.*, 1997) o bé perquè ja no tenen la immunitat passiva materna (Deprez *et al.*, 1986).

## 4.2. SUPLEMENTACIÓ DE DIETES AMB CONCENTRAT DE PLASMA

La sang d'on s'obté l'SDAP es recull en escorxadors i prové d'animals sans destinats a consum humà. Seguidament, se li afegeix anticoagulant, normalment citrat sòdic, i s'eliminen els eritròcits per centrifugació. El plasma obtingut és assecat per polvorització i utilitzat per a la suplementació del pinso (Russell i Weaver, 1996; Coffey i Cromwell, 2001). L'SDAP està constituït per un 78% de proteïna, de la qual, aproximadament un 50% és albúmina, un 25% és globulina (incloent  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -globulina), un 5% fibrina i un 20% altres proteïnes, incloent-hi haptoglobulina, transferrina, factors de creixement i altres proteïnes i pèptids (Howell i Lawrie, 1983).

S'ha pogut observar que aquestes proteïnes plasmàtiques retenen la seva activitat biològica en l'animal i que per tant conserven la seva capacitat d'induir-hi una resposta fisiològica. L'SDAP conté més d'un 15% d'IgG, les quals poden ser funcionals quan són consumides per l'animal, ja que les immunoglobulines són relativament resistents a la digestió. De fet, Gatnau *et al.* (1989) van veure que les immunoglobulines de l'SDAP són absorbides des de la llum intestinal al torrent sanguini en porcs acabats de néixer i privats

del calostre. Nollet *et al.* (1999a) van observar que les immunoglobulines administrades per via oral a animals estabulats tenen un efecte protector davant la inoculació de bacteris per la mateixa via. Sánchez *et al.* (1993) exposen que en la capacitat d'inhibir l'adherència bacteriana de l'SDAP no només hi estan implicades les immunoglobulines, sinó que hi ha les glicoproteïnes, ja que la desnaturalització per calor, la digestió proteolítica i l'eliminació dels anticossos del plasma no afecten aquesta capacitat inhibidora. D'altra banda, Mouricot *et al.* (1990) van tractar vedells que presentaven una diarrea induïda per una infecció amb *E. coli* enterotoxigènica amb glicoproteïnes derivades de plasma boví i l'adhesió bacteriana a l'intestí es va reduir dos ordres de magnitud. Per tant, en aquesta inhibició de l'adherència de patògens a més d'estar implicades les immunoglobulines també intervenen les glicoproteïnes.

Els vedells alimentats amb pinso suplementat amb SDAP presenten una mortalitat molt inferior a aquells que no reben la suplementació (Morrill *et al.*, 1995). La morbiditat també està reduïda, pràcticament en un 30%, en aquells animals alimentats amb el pinso suplementat amb proteïnes plasmàtiques (Quigley i Wolfe, 2003). Markowska-Daniel *et al.* (2003), a més de la reducció en la mortalitat i la morbiditat i la millora en el creixement, també han observat un increment en el nombre de limfòcits T, concretament en la subpoblació CD8<sup>+</sup>. D'altra banda, Touchette *et al.* (2002) mostren que els porcs alimentats amb SDAP presenten uns nivells d'expressió de citocines proinflamatòries (com són TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) més baixos a l'hipotàlam, a la hipòfisi i a les glàndules adrenals, així com en melsa, timus i fetge. També veuen nivells d'expressió reduïts d'IL-6 a les glàndules adrenals, a la hipòfisi i a la melsa. Aquesta reducció en l'activació del sistema immunitari, es veu corroborada pel fet que porcs alimentats amb SDAP també presenten un menor grau d'activació de l'eix hipotàlam-hipòfisi-adrenal. Aquest eix està molt vinculat a l'activació del sistema immunitari (Carroll *et al.*, 2002).

Un punt on diferents treballs entren en conflicte és si l'SDAP promou o no el creixement intestinal i la seva robustesa. Aquest seria un possible mecanisme que proporcionaria una millor barrera i, per tant, es podria prevenir l'entrada de possibles patògens des de la llum intestinal. Per una banda, Spencer *et al.* (1997) i Touchette *et al.* (1997) observen que hi ha una millora de l'alçada de la vellositat i de la relació vellositat-cripta. D'altra banda, diferents autors (Jiang *et al.*, 2000; Van Dijk *et al.*, 2001a, 2002a) no han pogut demostrar que l'alimentació amb SDAP millori la proliferació de les cèl·lules de la cripta, la profunditat de la cripta o l'alçada de la vellositat. De fet, Bosi *et al.* (2004) suggereixen que l'SDAP afecta l'estructura de la vellositat i la cripta només quan la integritat de la barrera intestinal es troba compromesa.

Així doncs, la millora del creixement es creu que és resultat d'una menor estimulació del sistema immunitari. Aquesta hipòtesi està recolzada per estudis que demostren que una activació immunitària produeix una reducció en la ingesta d'aliments, així com un increment del consum de nutrients per part del sistema immunitari (Williams *et al.*, 1997). Els efectes de l'SDAP sobre el creixement es produeixen principalment en el deslletament, és a dir en la transició entre l'alimentació amb llet i la ingesta de pinso sòlid (Jiang *et al.*, 2000). Recentment, Jiang *et al.* (2000) indiquen que la suplementació amb plasma animal dels pinsos per a porcells acabats de deslletar incrementa l'eficiència de l'ús de les proteïnes i hi ha un increment del creixement net dels teixits. Aquesta resposta és mediada parcialment per una reducció del catabolisme dels aminoàcids.

### 4.3. EFECTE DE LES DIETES EN UN PROCÉS INFLAMATORI

L'efecte de l'SDAP és clarament superior en porcs criats en un entorn amb una càrrega patogènica important, com pot ser una granja convencional, que en porcs que han estat en condicions experimentals i, per tant, amb un grau d'higiene relativament elevat (Coffey i Cromwell, 1995). Així doncs, sembla que l'SDAP presenta un efecte estimulador del creixement superior en aquells porcs que estan en condicions menys favorables. Això ha comportat que a més dels estudis realitzats en animals sans també s'hagin dut a terme investigacions per avaluar el possible efecte de l'SDAP en animals que pateixen processos infecciosos experimentals.

Un exemple d'això és l'estudi realitzat per Nollet *et al.* (1999b) en vedells acabats de néixer, als quals s'ha induït una diarrea mitjançant l'administració via oral d'*E. coli* de les soques F5+ i F17+. En els animals suplementats amb plasma animal, la diarrea i la febre són menys severes que en els animals no suplementats. Posteriorment, s'han desenvolupat altres estudis on s'ha comparat l'efecte de l'SDAP amb el dels antibiòtics en animals infectats amb *E. coli*. Tant en el cas de vedells inoculats amb *E. coli* enteroxigènica (Quigley i Drew, 2000) com en el cas de porcs administrats amb *E. coli* K99 (Torrallardona *et al.*, 2003), hi ha una millora en l'estat general dels animals, tant si el pinso ha estat suplementat amb antibiòtics com si ho ha estat amb SDAP.

En el cas de porcells acabats de deslletar inoculats amb *E. coli* O139:K82 i alimentats amb una dieta suplementada amb SDAP, presenten un increment de pes i de consum de pinso diari substancialment superior als animals alimentats amb un pinso no suplementat. A més, els porcells que consumien el pinso suplementat generalment presentaven una femta en millors condicions i una aparença més saludable que els animals que no han rebut el suplement (Van Dijk *et al.*, 2002b). En la mateixa línia es mantenen Bosi *et al.* (2004), que

han observat que els animals suplementats amb plasma animal i infectats amb *E. coli* K88+ presenten una notable reducció en l'expressió d'IL-8 i TNF- $\alpha$  a l'intestí, respecte aquells animals que han consumit el pinso no suplementat. Així doncs, conclouen que alimentar porcells amb SDAP en millora el creixement i els protegeix contra l'*E. coli* K88 enterotoxigènica mitjançant el manteniment de la integritat mucosal i reduint l'expressió de diferents citocines pro-inflamatòries a l'intestí (Bosi *et al.*, 2004).