



Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària en un model d'inflamació pulmonar aguda en ratolí

Mònica Maijó Ferré

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals
Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia
Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB

**EFFECTES DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB
PROTEÏNES PLASMÀTIQUES SOBRE LA RESPOSTA
IMMUNITÀRIA EN UN MODEL D'INFLAMACIÓ PULMONAR
AGUDA EN RATOLÍ**

Programa de Doctorat: **Biotecnologia Molecular**

Directors:

Dra. Anna Pérez Bosque
Professora associada de Fisiologia

Dr. Miquel Moretó Pedragosa
Catedràtic de Fisiologia

Dr. Javier Polo Pozo
Responsable I+D, APC Europe SA

Mònica Maijó Ferré
Barcelona 2011

IV. DISCUSSIÓ

Els concentrats de plasma porcí i boví són suplementes dietètics destinats a animals de granja, concretament a animals acabats de deslletar. En aquest període el sistema immunitari mucosal encara no està totalment desenvolupat i per tant aquests animals són més susceptibles a patir infeccions que els animals adults (Pluske *et al.*, 1997). De fet, el deslletament d'animals de granja sovint està associat a malalties infeccioses, que freqüentment n'incrementen la mortalitat (Osek, 1999). L'estudi es va fer durant el període immediatament posterior al deslletament, perquè en aquesta edat el sistema immunitari mucosal encara és immadur i més susceptible a infeccions (Bailey *et al.*, 2005), i per tal que el nostre model sigui comparable als animals de granja que reben aquest suplement. A més, també s'ha demostrat en rates, que els suplementes de plasma són efectius en aquest període (Pérez-Bosque *et al.*, 2004).

Els efectes de la suplementació dietètica amb aquests concentrats sobre els desordres intestinals han estat molt estudiats (Bosi, *et al.*, 2004; Pérez-Bosque *et al.*, 2004; 2008; 2010). En canvi, els efectes sobre altres teixits no ho han estat tant. Tenint en compte que les infeccions pulmonars tenen una prevalença molt elevada en els animals de granja, i sabent que el sistema immunitari mucosal comú connecta àrees distants de l'organisme, i per tant, és possible modular la resposta pulmonar a través de la nutrició (Brandtzaeg i Pabst, 2004), ens va semblar interessant estudiar el possible paper dels concentrats de plasma en la prevenció de la inflamació pulmonar. Amb aquest objectiu hem posat a punt un model d'inflamació pulmonar en ratolí. La inflamació pulmonar originada per agents ambientals, incloent el lipopolisacàrid, juga un paper molt important en el desenvolupament i la progressió de les malalties respiratòries cròniques com per exemple l'asma (Liu, 2004). La inhalació d'endotoxines causa la síndrome respiratòria aguda, amb reclutament de neutròfils, dany a l'epiteli alveolar i a l'endoteli amb un gran alliberament de proteïnes a l'espai alveolar (Reutershan *et al.*, 2005). L'administració intranasal d'endotoxina produeix una inflamació pulmonar aguda, amb producció de TNF- α , infiltració alveocapil·lar i broncoconstricció en ratolins C57BL/6 (Lefort *et al.*, 2001; Schnyder-Candrian *et al.*, 2005). El receptor Toll-like 4 (TLR-4) i el CD14 juguen un paper clau en la resposta pulmonar a l'administració sistèmica de l'LPS (Andonegui *et al.*, 2003). L'exposició aerogènica a l'LPS també induïx el reclutament de neutròfils a l'espai alveolar (Lefort *et al.*, 2001) amb l'activació de la proteïna mitogen-activada quinasa (MAPK) i la secreció de TNF- α i altres citocines proinflamatòries i quimiocines (Schnyder-Candrian *et al.*, 2005).

El model d'inflamació pulmonar aguda induïda per l'LPS no reflecteix la complexitat d'una malaltia pulmonar, ja que no considera malalties preexistents, el reflux de fluids i la ventilació mecànica, entre d'altres. Tot i això, la infecció per bacteries gramnegatives i l'exposició a la seva part

patogènica juguen un paper important en el desenvolupament d'una malaltia respiratòria (Markowicz *et al.*, 2000).

El reclutament de neutròfils als pulmons i al BALF ha estat extensament estudiat en molts models de LPA (Zarbock *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009). El model de LPS s'ha utilitzat en nombrosos estudis de models d'inflamació pulmonar per tal d'estudiar l'acció de dietes i/o compostos en la inflamació, com per exemple el taxol (Mirzapoiazova *et al.*, 2007) o els flavonoides (Xie *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). El model d'inflamació induïda per LPS també s'ha utilitzat àmpliament en models d'asma, que s'aconsegueixen mitjançant l'administració de ovoalbúmina (OVA) i LPS conjuntament (Hazlewood *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2011).

L'LPS és un potent activador de la resposta immunitària innata, com s'ha vist en els nostres resultats. L'arquitectura natural i química del domini bioactiu dels LPS és molt conegut. Els LPS que s'utilitzen per induir models inflamatoris pulmonars, provenen de diferents bacteries, com les procedents de *E. coli* i *S. enterica*, entre d'altres. L'estructura molecular de l'LPS d'aquestes dues bacteries ha estat àmpliament estudiada (Heinrichs *et al.*, 1998; Hug i Feldman, 2011). Tot i que el LPS procedent de *S. enterica* produeix una resposta inflamatòria pulmonar important (Zarbock *et al.*, 2008; Reutershan *et al.*, 2005), els models més habituals utilitzen l'LPS d'*E. coli* com a agent inductor de la inflamació. Per tal d'escollir el model més adequat s'ha tingut en compte els resultats obtinguts en la posta a punt, així com la informació descrita. Així doncs, s'ha escollit l'LPS d'*E. coli* per dur a terme la resta d'experiments, degut a que en general els seus efectes han estat més evidents en comparació a l'LPS de *S. enterica*, i perquè aquesta bactèria ha estat molt més estudiada.

Els resultats obtinguts mostren una resposta a l'exposició a l'LPS notable però aguda. L'administració intranasal de l'endotoxina produeix canvis fisiològics, ja que els animals perden pes 24 h després de l'administració de l'LPS, fet que evidencia l'estat patològic dels ratolins. De fet, a les 6 h ja és produeixen canvis en el perfil de les cèl·lules estudiades al BALF. S'observa un alliberament de proteïnes i una infiltració de cèl·lules evident pels dos LPS estudiats i molt major a les 24 h de la seva administració. En aquest temps, trobem un augment considerable de neutròfils i monòcits a l'espai broncoalveolar, efecte àmpliament descrit per l'LPS (Skerrett *et al.*, 2004; Mikhak *et al.*, 2009). També hi ha un increment notable dels limfòcits Th i Ts/c. En el teixit pulmonar, la infiltració de neutròfils i monòcits mostra un perfil similar al trobat al BALF. Els efectes de l'LPS sobre el teixit pulmonar es caracteritzen per una primera infiltració de cèl·lules T a les 6 h i posteriorment hi ha un increment de monòcits i neutròfils. Tot i així, les diferències

entre els efectes a les 6 h i a les 24 h no són tant evidents com a l'espai broncoalveolar, però si respecte els animals no inflamats. A sang, un dels efectes més clars de l'LPS és l'increment de cèl·lules sobretot a les 6 h. L'LPS també augmenta de forma important el percentatge de limfòcits Th activats, fet que reflecteix l'estat d'activació de la resposta immunitària. Per tant hem aconseguit activar els mediadors involucrats en la resposta inflamatòria, tant de la immunitat innata (neutròfils i monòcits) i com de la resposta adaptativa (cèl·lules T).

Dels dos temps de sacrifici estudiats, 6 i 24 h, s'ha escollit el temps de sacrifici de 24 h per fer l'anàlisi de les poblacions leucocitàries, ja que a les 6 h no totes les poblacions estan afectades. El sacrifici a les 6 h després de l'administració de l'LPS s'ha afegit per fer l'estudi de mediadors proinflamatoris com ara citocines i quimiocines, degut a que aquests tenen un temps d'aparició molt ràpid.

El pinso suplementat amb proteïnes plasmàtiques millora la funció de la barrera intestinal i el creixement animal (Campbell *et al.*, 2010). En rates, aquestes proteïnes protegeixen l'intestí d'una sobreestimulació immunitària causada per l'administració intraperitoneal de l'enterotoxina B de *S. aureus* (Moretó i Pérez-Bosque, 2009, Pérez-Bosque i Moretó, 2010). En humans, els suplementes amb proteïnes del plasma redueixen els efectes clínics de la criptosporidiosis associada a la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA; Greenberg i Cello, 1996).

A més dels efectes en la homeòstasis intestinal i en la modulació del GALT (Moretó i Pérez-Bosque, 2009), els suplementes amb plasma també poden afectar a poblacions limfocítiques d'altres parts de l'organisme i a l'expressió de citocines a diferents teixits extra-intestinals, com ara la melsa i el fetge (Touchette, 2002), o els pulmons (Campbell *et al.*, 2004). Aquestes observacions ens han fet plantejar la hipòtesi que els suplementes dietètics amb plasma podrien ser efectius en la modulació de la resposta immunitària en teixits allunyats de l'intestí, com la mucosa nasal i broncoalveolar. Aquesta hipòtesi es sosté gràcies a l'existència del sistema immunitari mucosal comú que connecta els llocs inductors (en aquest cas el GALT) amb les llocs efectors (teixits limfoides nasal i brocoalveolar) per la generació de respostes Th2 específiques a l'antigen, respostes Th1 i dels limfòcits T citotòxics, la funció dels quals és com a primera línia de defensa de la barrera mucosal (Kiyono i Fukuyama, 2004).

En el model d'inflamació pulmonar aguda a ratolí, la resposta pulmonar està caracteritzada per una primera activació de monòcits i neutròfils que comporta un alliberament massiu de citocines i quimiocines proinflamatòries. Aquestes recluten i activen a més monòcits i neutròfils, així com limfòcits, a l'espai alveolar i al teixit pulmonar (Yeh *et al.*, 2007; Reutershan *et al.*, 2005). Es va

estudiar els efectes de les dietes SDP i IC sobre la resposta innata perquè aquesta intervé en la defensa front els patògens, detecta el teixit danyat i regula la integritat del teixit (Chaudhuri i Sabroe, 2008). Però la resposta immunitària integra també la resposta adaptativa mitjançant les cèl·lules T (Th i Ts/c) i les cèl·lules reguladores. Aquesta resposta és crucial per entendre el progrés de la inflamació pulmonar i la seva resolució. Per tant l'estudi es va realitzar a tenint en compte la resposta inflamatòria innata, adaptativa i reguladora. El model utilitzat en l'estudi està basat en l'administració intranasal de l'LPS, que s'ha utilitzat àmpliament en diferents estudis dietètics i farmacològics (Yeh *et al.* 2007, Reutershan *et al.*, 2005).

L'efecte de l'SDP sobre les variables metabòliques, com el creixement de l'animal i el consum de pinso, ha estat àmpliament estudiada en porcs acabats de deslletar (Zhao *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2005; Nofrarías *et al.*, 2006; Bosi *et al.*, 2004). En estudis previs en rates, no s'ha observat diferències en el creixement dels animals suplementats amb proteïnes plasmàtiques (Pérez-Bosque *et al.*, 2004). La digestibilitat de les proteïnes plasmàtiques a l'ili han estat estudiades per Gottlob *et al.* (2006) i observen que els aminoàcids d'aquesta dieta presenten una elevada digestibilitat. En el nostre estudi, els ratolins alimentats amb la dieta suplementada amb SDP presenten un increment de pes superior al dels animals alimentats amb el pinso control. Els animals suplementats amb SDP també presenten una major ingesta d'aliment, sobretot en els darrers dies de l'estudi. Per tant podem confirmar que la suplementació dietètica en SDP millora el creixement dels ratolins en el període posterior al deslletament.

Les primeres cèl·lules que actuen en la resposta inflamatòria són els neutròfils. Aquests entren als pulmons en resposta a diferents mediadors de la inflamació aguda (Guo i Ward, 2002), i ho fan a través dels capil·lars i mitjançant la unió a les molècules d'adhesió que hi ha en la superfície de les cèl·lules endotelials. Una vegada han arribat als pulmons, incrementen l'expressió de receptors per les quimiocines, que provoca la migració cel·lular al lloc de la inflamació. A més de les quimiocines, algunes toxines com l'LPS són quimiotàctics pels neutròfils (Arndt *et al.*, 2005). Poques hores després de l'aparició dels canvis vasculars, els neutròfils han migrat des de la sang, i comencen a fagocitar els patògens presents al parènquima pulmonar (Thacker, 2006). La quantitat de neutròfils activats també incrementa i estimula la producció de substàncies reactives d'oxigen i nitrogen que ajuden a eliminar els patògens (Korhonen *et al.*, 2005; Segal, 2005). Però a més d'oxidar les proteïnes dels microorganismes patògens, aquestes substàncies reactives d'oxigen també lesionen els teixits de l'hoste. Simultàniament, apareixen cèl·lules fagocítiques activades, sobretot macròfags, importants en l'atracció i activació dels neutròfils. Aquests

produeixen citocines proinflamàtòries que regulen l'expressió de molècules d'adhesió implicades en la quimiotaxis dels neutròfils i monòcits (Thacker, 2006).

En ratolins no exposats a l'LPS hi ha pocs leucòcits infiltrats a l'espai alveolar, amb un clar predomini dels monòcits sobre els neutròfils. L'administració de LPS incrementa el reclutament de cèl·lules a l'espai alveolar, sobretot de neutròfils, que augmenten un 70%. Aquest resultat són consistents amb els mostrats per Reutershan *et al.* (2005), que utilitza un model d'inflamació pulmonar similar. La primera funció dels neutròfils durant la resposta innata és contenir i eliminar els microorganismes patògens invasors (Nathan, 2006), i la seva concentració a l'espai broncoalveolar és màxima 24 h després de l'administració de l'LPS (Reutershan *et al.*, 2005). Tant a BALF com a teixit pulmonar, l'LPS incrementa la proporció de neutròfils i monòcits activats, com a conseqüència de l'alliberament de moltes quimiocines, fet que també ha estat observat anteriorment (Yeh *et al.*, 2007). Les dietes SDP i IC atenuen els efectes de l'LPS sobre el nombre de leucòcits al BALF, per tant hi ha menys infiltració cel·lular, consistent amb el descens de la infiltració d'eosinòfils i la menor desgranulació observada a l'intestí de les rates estimulades amb l'enterotoxina B d'*S. aureus* (Moretó i Pérez-Bosque, 2009). Ambdós suplementes disminueixen el percentatge de neutròfils i monòcits activats a l'espai bronco-alveolar, que sumat al menor reclutament i activació de cèl·lules proinflamàtòries al teixit pulmonar, podrien reduir el dany potencial a l'epiteli respiratori i l'endoteli vascular associat a la resposta inflamatòria.

Els principals efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques s'observa a l'espai alveolar, tot i que també hi ha efectes remarcables al teixit pulmonar i a sang perifèrica. Concretament, hi ha una disminució notable dels monòcits i neutròfils residents al pulmó, fet que implica una reducció en l'estat proinflamatori fisiològic associat al sistema mucosal (Suzuki *et al.*, 2008). Ambdues dietes disminueixen el percentatge de monòcits i neutròfils activats en els animals inflamats, tant localment (teixit pulmonar) com sistèmicament (circulació sanguínia). Els efectes sistèmics induïts per l'LPS posen de manifest la migració dels neutròfils i monòcits circulants, des de la sang perifèrica al teixit inflammat, en aquest cas al pulmó. El fet que les dietes redueixin aquestes cèl·lules a sang comportaria el seu descens posterior als teixits inflamats.

En el nostre model, la inhalació de LPS incrementa la concentració de citocines i quimiocines a BALF i l'expressió de la iNOS a teixit pulmonar, de forma similar al que succeeix a altres estudis (Yeh *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010). La inflamació pulmonar acostuma a anar acompanyada d'un alliberament massiu d'òxid nítric (NO), que està involucrat en una gran varietat de processos biològics, incloent la defensa de l'hoste, la inflamació, la regulació immunitària o l'agregació

plaquetària (Ricciardolo *et al.*, 2006). Pot ser produït per la sintasa de l'òxid nítric induïble (iNOS) o la constitutiva. La síntesi de la iNOS és estimulada per moltes citocines proinflamàtòries i és un enzim que s'expressa en una gran varietat de cèl·lules inflamatòries (Prado *et al.*, 2011). A més de les citocines, l'exposició a productes microbians també n'indueix la síntesi, amb la consegüent producció de NO. Aquesta elevada formació de NO reacciona amb espècies reactives de nitrogen i superòxid amb la consegüent formació de radicals lliures com el peroxinitrit (Joubert i Malan, 2011). La toxicitat cel·lular dels radicals lliures es deguda a la oxidació de l'ADN i les proteïnes. Per tant l'increment de la iNOS associada als processos inflamatoris, a part de destruir microorganismes patògens, també pot danyar les cèl·lules de l'hoste. Les dietes suplementades, SDP i IC, redueixen l'expressió de la iNOS, fet que comportaria una menor formació de radicals lliures i per tant una disminució de les conseqüències deletèries de la inflamació que presenten aquests animals.

Les citocines proinflamatòries són produïdes principalment pels monòcits i els macròfags, tot i que altres tipus cel·lulars, com ara les cèl·lules epitelials i els fibroblasts també en produeixen (Murtaugh *et al.*, 1996). Tot i que hi ha diferents citocines implicades en la inflamació, les primeres citocines que es produeixen al lloc de la inflamació són el TNF- α , la IL-1 (α i β) i la IL-6. Aquestes citocines activaran l'expressió de les quimiocines, que tenen efectes redundants i per tant contribueixen a la inflamació. Altres citocines proinflamatòries com el G-CSF i el GM-CSF també tenen un paper important en la resposta inflamatòria, ja que estimulen la producció de granulòcits i monòcits. A més, el GM-CSF és important en el desenvolupament de la patogènesis de les malalties pulmonars agudes i cròniques (Puljic *et al.*, 2007). L'LPS de les bacteries gramnegatives és l'inductor més potent del TNF- α en totes les espècies (Halloy *et al.*, 2005; Brigham *et al.*, 1986), i també augmenta la producció de IL-1 (α i β), que encara que la seva activitat és similar a la del TNF- α , no és tant citotòxica (Murtraugh, 1996). El TNF- α intervé en la regulació de les cèl·lules immunitàries i indueix l'apoptosi cel·lular, entre d'altres funcions. L'increment sostingut del TNF- α està implicat en molts processos inflamatoris patològics. A més, en el models d'inflamació pulmonar per LPS, l'alliberació de TNF- α indueix una infiltració i activació de neutròfils als pulmons (Bae *et al.*, 2010).

La IL-1 juntament amb el TNF- α i la IL-6 produeixen febre, és a dir, són pirògens endògens. La IL-1, a més, contribueix en la leucocitosi mitjançant la proliferació de neutròfils a la medul·la òssia i indueix la síntesi d'altres citocines i quimiocines, incloent la IL-6, la IL-8, la CCL5, el GM-CSF i el TNF- α (Chung, 2001). Molts dels efectes de la IL-1 β són similars als del TNF- α com pot ser l'estimulació de les cèl·lules epitelials de les vies respiratòries per produir citocines, com la CCL5,

IL-8 i el GM-CSF. Tant el TNF- α com la IL-1 β indueixen els fibroblasts a proliferar, i la IL-1 β incrementa la síntesi de fibronectina i col·lagen, responsables de la fibrosi que caracteritza a un teixit inflammat (Chung, 2001). El TNF- α i la IL-1 β s'alliberen durant els primers 30-90 min després de l'exposició a l'LPS. La producció de TNF- α i IL-1 β fa que gran varietat de cèl·lules com els monòcits/macròfags, cèl·lules endotelials, fibroblasts i cèl·lules del múscul llis produeixin IL-6 (Cohen, 2002). Aquesta citocina indueix la producció de proteïnes de fase aguda i redueix els nivells d'albumina i transferrina (Castell *et al.*, 1989).

Un altre paper molt important de la IL-1 és l'activació de l'expressió de molècules d'adhesió, com la molècula 1 d'adhesió intercel·lular (ICAM-1) o la molècula 1 d'adhesió cel·lular vascular (VCAM1), a les cèl·lules endotelials, que facilita l'adhesió de neutròfils i eosinòfils a l'endoteli vascular i a l'epiteli respiratori, primer pas per la migració d'aquestes cèl·lules als teixits.

Una excessiva secreció de citocines proinflamatòries pot alterar l'estructura de l'epiteli respiratori i vascular, la qual cosa comprometria l'intercanvi de gasos. Per exemple, elevades concentracions de TNF- α provoquen danys severes al parènquima pulmonar i poden aparèixer malalties sistèmiques que pot portar a la mort de l'hoste (Thacker, 2006).

Els nostres resultats mostren que l'administració de LPS incrementa dràsticament la concentració de TNF- α al BALF a les 6 h, i que els valors no són tant elevats a les 24 h, consistent amb estudis previs (Larsson *et al.*, 2000). A més del TNF- α , també hi ha altres citocines proinflamatòries que tenen una concentració molt elevada al BALF (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, G-CSF i GM-CSF) a les 6 h, que confirmen les observacions de Yeh *et al.* (2007). Els efectes dels suplementos plasmàtics són molt importants a les 6 h i més modestos a les 24 h.

El principal paper de les quimiocines durant un procés inflamatori és l'atracció dels leucòcits als teixits inflamats, i són per tant un bon indicador de l'estat inflamatori (Allen *et al.*, 2007). Mentre que algunes quimiocines són expressades constitutivament, altres són induïdes durant la inflamació. Les quimiocines que s'activen durant la inflamació són produïdes típicament en resposta a la infecció d'agents patògens i a factors d'estrès mediambientals (Thacker, 2006). Com a resultat de l'activació de les quimiocines, els leucòcits de diversos teixits migren als teixits pulmonars afectats. En la inflamació pulmonar les principals quimiocines que apareixen són la CXCL1, 2 i 3 (KC, MIP-2a i MIP-2b, respectivament), que atreuen i activen els neutròfils (Aoki *et al.*, 2002). Altres quimiocines com la CCL2, 3, 4 i 11 (MCP-1, MIP-1a, MIP-1b i eotaxina, respectivament) tenen efectes similars sobre els monòcits, macròfags o els eosinòfils (Bisset i Schmid-Grendelmeier, 2005). Per exemple, la CCL2 actua sobre monòcits, limfòcits i basòfils,

ahora que activa mastòcits i basòfils (Puneet *et al.*, 2005). Les quimiocines CCL5 i CCL11 (RANTES i eotaxina, respectivament) atreuen eosinòfils i basòfils, entre d'altres cèl·lules, als teixits inflamats i la seva expressió augmenta en processos al·lèrgics, com l'asma (Rogerio *et al.*, 2010; Bisset i Schmid-Grendelmeier, 2005). El patró de resposta de les quimiocines al BALF és similar que el de les citocines, excepte per la CCL2 que és molt més elevada a les 24 h. Ambdós suplementos atenuen l'increment de l'expressió de les quimiocines, efecte molt rellevant ja que les quimiocines indueixen la migració cel·lular en l'espai alveolar durant la inflamació. A més el model de LPS tot i no ser un model d'asma, afecta els components propis de les reaccions al·lèrgiques.

La reducció de l'expressió de les citocines i quimiocines estudiades denota que aquests suplementos modulen la magnitud de la resposta, sense prevenir-la completament. Aquesta reducció en la fase més aguda explicaria la menor infiltració de cèl·lules proinflamatòries al teixit pulmonar i al BALF.

La IL-17 també està involucrada en el reclutament de neutròfils a l'espai alveolar després de la inhalació de LPS, principalment durant la fase de mobilització (Miyamoto *et al.*, 2003). Així doncs, la IL-17 se la considera com un dels nexes d'unió entre la immunitat innata i l'adaptativa (Lindén *et al.*, 2005). En el nostre model, s'observa un reclutament massiu de neutròfils al BALF i al pulmó (Maijó *et al.*, 2011). Les dietes SDP i IC prevenen els efectes de l'LPS sobre la resposta Th1 i redueixen l'alliberament de la IL-17. Això podria explicar el menor reclutament i activació dels neutròfils observat en els animals que han estat suplementats amb proteïnes plasmàtiques. Yeh *et al.* (2007) mostra efectes similars del tractament amb Gingyo-San, una fórmula medicinal tradicional Xinesa, sobre un model inflamació pulmonar.

En les infeccions bacterianes o víriques pulmonars, el reclutament de les cèl·lules T va precedida per la infiltració de neutròfils (D'Ambrossio *et al.*, 2001). En models d'inflamació al·lèrgica, la resposta de les cèl·lules T també va sempre a continuació de la dels neutròfils, monòcits i eosinòfils i s'acumulen lentament al llarg d'uns dies (Randolph *et al.*, 1999). Les cèl·lules T immadures del torrent sanguini són reclutades als òrgans limfoides mitjançant les vècules endotelials altes (HEV) on entren en contacte amb les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) lligades a l'antigen. En els teixits pulmonars inflamats, les cèl·lules dendrítiques són mobilitzades per transportar els antigens als òrgans limfàtics, on estimulen les cèl·lules T específiques, que es diferencien a cèl·lules T helper (Th) i secreten IL-2 (Glimcher i Murphy, 2000). L'LPS augmenta el limfòcits Th activats a pulmó i a sang. Aquest increment va acompanyat d'un alliberament de IL-2 (citocina produïda exclusivament pels limfòcits Th activats), que promou la proliferació de

limfòcits, macròfags i cèl·lules NK (Gaften i Liu, 2004). Ambdós suplementos són efectius en reduir el percentatge de limfòcits Th activats i en la prevenció de l'alliberament de IL-2. Aquests efectes són consistents amb la resposta antiinflamatòria prèviament descrita dels suplementos de proteïnes plasmàtiques (Pérez-Bosque *et al.*, 2010).

L'activació i diferenciació de les cèl·lules Th requereix de com a mínim dues senyals. La primera senyal l'origina el receptor de cèl·lules T després de la seva interacció amb el complex major d'histocompatibilitat (MHC) a les cèl·lules presentadors d'antigen (APCs). La segona senyal és produïda per coestimuladors o molècules accessòries a les cèl·lules APC que interactuen amb els seus lligands a les cèl·lules T. Les citocines juguen un paper crític en la polarització de les cèl·lules Th. Hi ha moltes citocines que controlen la diferenciació a Th1 i Th2, les més representatives de cada tipus són la IL-12 (p35-p40) i la IL-4, respectivament. Aquestes dues citocines indueixen la generació del seu propi tipus Th, i simultàniament inhibeixen la producció del subtipus contrari (Neurath *et al.*, 2002).

Una característica important de les cèl·lules Th1 és la capacitat d'aquestes cèl·lules a arribar ràpidament al lloc de la infecció i inflamació, on elles dirigeixen la defensa contra els microorganismes patògens i la resposta inflamatòria tipus Th1 (Mikhak *et al.*, 2009). Les cèl·lules Th1 són un subtipus de cèl·lules Th, que estimulades per l'entrada de patògens o les seves toxines secreten IFN- γ , una potent citocina que influeix en una gran varietat de respostes immunològiques per tal de protegir l'hoste front els patògens invasors. Aquesta citocina disminueix l'apoptosi dels neutròfils i incrementa l'expressió de les molècules MHC de classe I i II de les cèl·lules APCs, entre d'altres funcions (Schoenborn i Wilson, 2007). L'administració de LPS ha incrementat el percentatge de limfòcits Th1 pulmonars, així com també l'expressió de citocines involucrades en la resposta Th1 (IFN- γ i IL-12) al BALF, com mostra l'estudi de Mikhak *et al.* (2009). Aquestes cèl·lules a més amplifiquen la resposta dels neutròfils iniciada per l'LPS a les vies respiratòries i juguen un paper crític en la defensa front els patògens i la patogènesis de moltes malalties (Mikhak *et al.*, 2009). Uns altres elements importants en la resposta Th1, són els limfòcits T citotòxics, que tenen un paper molt important en les infeccions víriques del sistema respiratori (Vallbracht *et al.*, 2006). L'administració de l'LPS incrementa la resposta dels limfòcits T citotòxics, tot i que no amb la mateixa magnitud que els limfòcits Th i les dietes estudiades no modifiquen la seva resposta

L'administració de l'LPS també incrementa la resposta Th2. La subpoblació Th2 és important en la resposta immunitària humoral ja que estimula les cèl·lules B i participa en les respostes

al·lèrgiques i en les infeccions parasitàries (Anthoni *et al.*, 2007). Aquestes cèl·lules també promouen l'arribada d'eosinòfils a pulmó i l'activació de mastòcits. Tots aquest factors contribueixen a la patologia de les infeccions pulmonars, que inclouen reclutament de cèl·lules inflamatòries, dany epitelial i secreció de mucus (Nakae *et al.*, 2007). La resposta immunitària Th2 als aeroal·lèrgens és essencial en la iniciació i progressió de la resposta inflamatòria (Wills-Karp *et al.*, 1998). Inicialment es creia que aquesta patologia estava causada per un increment de les cèl·lules Th2 i una disminució de la resposta immunitària Th1. Però altres estudis mostren que els pacients d'asma tenen augmentats ambdós subtipus de poblacions (Th1 i Th2). Els suplementes de plasma redueixen els efectes de l'LPS sobre les cèl·lules Th2, de forma similar a la suplementació dietètica amb licopè en un model d'asma en ratolí (Hazlewood *et al.*, 2011). Les principals citocines associades a la resposta Th2 són la IL-4, IL-5, la IL-9 i la IL-13. La IL-4 és la principal citocina que intervé en la diferenciació de les cèl·lules Th a Th2, a més, participa en la proliferació i diferenciació dels limfòcits B i és una potent citocina inhibidora de l'apoptosi. Una altra funció a destacar, és que la seva acció disminueix la producció de cèl·lules Th1, de macròfags, d'IFN- γ i de cèl·lules dendrítiques. Per tant, està implicada en la regulació de la resposta immunitària humoral i cel·lular. La funció principal de la IL-5 és promoure l'expansió, el reclutament i la supervivència d'eosinòfils, i la IL-4 actua de manera sinèrgica amb la IL-5 en la inflamació eosinofílica (Rosenberg *et al.*, 2007). La IL-9 induïx la producció de mucus en les cèl·lules epitelials pulmonars per mitjà de la síntesi de la IL-13 a les cèl·lules hematopoètiques (Steenwinckel *et al.*, 2009). L'administració de LPS produeix un augment de l'expressió d'aquestes citocines, així com també de les cèl·lules Th2. Els grups suplementats amb SDP i IC disminueixen l'increment de l'expressió d'aquestes citocines principalment a les 6 h després de l'administració del LPS. Aquesta reducció de les citocines a les 6 h, va seguida d'un menor reclutament de cèl·lules Th1 i Th2 a les 24 h.

La resposta immunitària humoral també es veu afectada per l'LPS. Les cèl·lules responsables d'aquesta resposta principalment són els limfòcits B. Els limfòcits B formen entre 1-10% de la població limfocitària pulmonar (Twigg, 2005). Un cop les cèl·lules B productores d'anticossos s'han diferenciat al teixit limfoide associat de mucoses, migren al teixit infectat. Aquest moviment de limfòcits entre diferents àrees mucosals ha estat àmpliament estudiat (Twigg, 2005). Els resultats obtinguts mostren poc efecte tant de l'LPS com del tractament dietètic sobre els limfòcits B residents al pulmó. En canvi, els ratolins administrats amb l'LPS sí que tenen incrementats el nombre de limfòcits B activats. L'activació dels limfòcits B depèn, en la majoria dels casos, dels limfòcits Th2. La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques redueix el reclutament dels limfòcits Th2, fet que explicaria la menor activació dels limfòcits B.

La inflamació origina un dany tissular i per tant l'última fase de la resposta inflamatòria és la necessària reparació del teixit. Quan una resposta inflamatòria és excessiva i està fora de control resulta en un dany major. Les citocines juguen un molt paper important en la modulació de la inflamació. Les citocines proinflamatòries, com l'IFN- γ i la IL-12, promouen la inflamació, ja que activen els leucòcits i indueixen l'expressió d'agents quimioatracients. En contra, les citocines antiinflamatòries, com la IL-10 o el TGF- β 1, supprimeixen l'expressió d'elements proinflamatoris i els seus efectes. Les alteracions de l'expressió de citocines pot ser molt perjudicial per la salut, i per tant les cèl·lules efectores Th (centrals en la modulació de la resposta immunitària) estan fortament regulades, per tal de mantenir la homeòstasis del sistema immunitari i controlar la resposta inflamatòria excessiva (Jaffar *et al.*, 2009). La resolució d'una lesió és un procés actiu que requereix una sèrie de passos integrats, incloent una transició del balanç de citocines pro- i antiinflamatòries, així com un aclariment dels neutròfils dels llocs inflamats (Savill, 1997; Henson i Hume, 2006). Els limfòcits Treg, un cop activats a través del seu receptor de cèl·lula T, supprimeixen la proliferació dels limfòcits Th i Ts/c (Piccirillo i Shevach, 2001). A més, s'ha observat que els limfòcits Treg estan implicats en el control de les cèl·lules T autoreactives *in vivo* (Sakaguchi, 2005), i que tenen efectes supressors sobre una gran varietat de canvis fisiopatològics (Miyara i Sakaguchi, 2007; Shevach, 2002), com la regulació de la resposta immunitària després de cremades en ratolins (Murphy *et al.*, 2005), o d'infeccions cròniques com ara l'aspergil·losi pulmonar (Montagnoli *et al.*, 2006), o la pneumònia *Pneumocistis* (McKinley *et al.*, 2006). També poden participar en la resolució de la inflamació induïda per LPS, tal com també ho indica Forsythe (2011). Els limfòcits Treg pulmonars també regulen l'activació de les cèl·lules T durant una exposició crònica als al·lèrgens en rates (Navarro *et al.*, 2011).

L'SDP i l'IC incrementen el percentatge de les cèl·lules Treg al teixit pulmonar i a sang, en ambdós teixits s'observa una reducció de la relació entre els limfòcits Th activats i els T reguladors. Les cèl·lules reguladores inhibeixen la inflamació a través del descens dels efectes d'altres cèl·lules, com les Th i fan contribucions importants per suprimir la resposta immunitària innata i adaptativa, com és la reducció de les APCs (Sakaguchi i Powrie, 2007; Shevach *et al.*, 2006). En humans, la generació de cèl·lules Treg i l'increment de la producció de IL-10 i TGF- β han mostrat ser essencials en la immunoteràpia específica, ja que supprimeixen la proliferació de les cèl·lules T i l'expressió de citocines Th1 (IFN- γ) i Th2 (IL-5 i IL-13) (Akdis *et al.*, 1998; Jutel *et al.*, 2003). En ratolins s'ha vist que l'activitat supressora de les cèl·lules Treg depèn de la inducció de la producció de IL-10 i TGF- β 1 (Joetham *et al.*, 2007).

El TGF- β 1 inhibeix la diferenciació de les cèl·lules Th1 (Li *et al.*, 2006), és essencial en el desenvolupament de les cèl·lules reguladores i manté l'homeòstasi dels limfòcits Th. Una altra funció del TGF- β 1 és que un cop activat s'uneix als macròfags alveolars i suprimeix la producció de citocines (Takabayashi *et al.*, 2006). En els resultats obtinguts, els ratolins administrats amb LPS mostren una reducció del TGF- β 1 madur. Aquest efecte es previngut per la suplementació amb SDP i IC, i d'aquesta forma podria atenuar l'increment induït per l'LPS sobre els limfòcits Th1. Aquest increment del TGF- β 1 també estaria implicat en la regulació de les citocines a través dels macròfags alveolars.

La IL-10 és produïda per diferents tipus cel·lulars, incloent les cèl·lules B, els mastòcits, els eosinòfils, els macròfags, les cèl·lules dendrítiques, els limfòcits Ts/c, Treg i Th (O'Garra *et al.*, 2008). La IL-10 produïda pels Th (Th1 o Th2) té un paper important com a reguladora del control de la patologia associada a la resposta inflamatòria. En particular és una citocina immunosupressiva amb propietats antiinflamatòries, ja que inhibeix els macròfags i les cèl·lules dendrítiques; sobretot la producció de citocines proinflamatòries, l'expressió de coestimuladors, el MHC de classe II i les seves funcions com a APCs (O'Garra *et al.*, 2008). Cuzzocrea *et al.* (2002) han mostrat que la IL-10 té un paper important durant la inflamació aguda pulmonar, ja que inhibeix l'alliberament de mediadors proinflamatòris com ara la IL-6 (Heyen *et al.*, 2000) i l'expressió d'iNOS (Orgando *et al.*, 2004). A diferència de la lleugera resposta induïda per l'enterotoxina B d'*S. aureus* a l'intestí, els efectes de l'LPS al pulmó estan caracteritzats per un fort reclutament de leucòcits i un dràstic augment de la producció de citocines i quimiocines. No obstant, ambdós suplementes SDP i IC redueixen la resposta immunitària durant una inflamació aguda, fet que indica que la modulació dietètica de la proliferació de limfòcits intestinals (Pérez-Bosque *et al.*, 2004) i l'expressió de citocines (Pérez-Bosque *et al.*, 2010) pot atenuar la resposta inflamatòria en mucoses distants, a través del sistema immunitari mucosal comú. Les dietes SDP i IC incrementen la producció de IL-10 als pulmons dels animals inflamats. Altres estudis amb un model d'inflamació pulmonar en rates demostren que el tractament amb IL-10 després de la instil·lació de l'endotoxina protegeix front el dany pulmonar, possiblement per la supressió de la infiltració pulmonar de neutròfils activats (Wu *et al.*, 2009). En el model de la inflamació intestinal induïda per SEB, es va demostrar que les dietes modulaven la inflamació intestinal per mitjà de l'increment de la IL-10, la qual reduïa l'alliberament de citocines proinflamatòries (Pérez-Bosque *et al.*, 2010). En el model d'inflamació pulmonar aguda, la determinació de la IL-10 a pulmó i a jejú mostren resultats similars als trobats en rata. Segons aquests resultats proposem que els canvis en l'expressió intestinal de la IL-10 modifica la resposta pulmonar aguda. L'anàlisi de la IL-10 en el teixit pulmonar indica que els suplementes poden incrementar significativament la seva expressió,

fet que reforça la idea que els suplementes amb proteïnes plasmàtiques poden modular l'expressió de citocines antiinflamatòries en teixits allunyats de l'intestí.

El mecanisme d'acció de les proteïnes funcionals, com les presents en el plasma, no és molt conegut. L'SDP conté pèptids biològicament actius i proteïnes funcionals incloent immunoglobulines, albúmina i factors de creixement (Borg *et al.*, 2002). Aquestes proteïnes són més efectives quan els animals estan exposats a una elevada càrrega patogènica o a canvis ambientals o immunològics. El suplement IC està enriquit en immunoglobulines, tot i que també conté una petita part d'albúmina. S'ha suggerit que les immunoglobulines són la responsable dels efectes de l'SDP (Van Dijk *et al.*, 2002), però s'ha de tenir en compte la contribució d'altres components actius del plasma. El plasma conté més de 250 pèptids actius (Anderson i Anderson 2002), que conserven la major part de l'activitat biològica després de l'assecat del plasma (Borg *et al.*, 2002). Els principals efectes de les dietes SDP i IC estan en la regulació mucosal del GALT, que pot ser el resultat d'un menor contacte de la mucosa amb els antígens luminals, possiblement mediat per les glicoproteïnes del plasma (Van Dijk *et al.*, 2002). Els efectes sobre el GALT també poden ser atribuïts a canvis en el perfil de la microflora intestinal (Bhandari *et al.*, 2008; Forsythe, 2011; Martin-Orué *et al.*, 2008), o fins i tot, a l'activitat biològica d'altres components del plasma que podrien interactuar amb les extensions luminals de les cèl·lules dendrítiques o travessar l'epiteli a través de les cèl·lules M o dels complexos d'unió. Tot i que la interacció de l'SDP i l'IC amb la mucosa intestinal no s'ha clarificat encara, està demostrat que aquests suplementes poden modular l'expressió de les citocines proinflamatòries al GALT de porcs (Bosi *et al.*, 2004) i de rates (Pérez-Bosque *et al.*, 2010) i que modulen la flora intestinal (Bhandari *et al.*, 2008; Martin-Orué *et al.*, 2008). Els estudis realitzats en un model d'inflamació intestinal aguda en rata indiquen que el mecanisme amb el qual els suplementes del plasma redueixen l'activació del GALT involucra la modulació de les citocines (Pérez-Bosque *et al.*, 2010). Aquest efecte sobre l'expressió de citocines també s'observa en el model d'inflamació pulmonar al ratolí.

A més, les dietes suplementades amb proteïnes plasmàtiques augmenten la flora intestinal beneficiosa i proporcionen més estabilitat a la diversitat de la microbiota del tracte digestiu (Bhandari *et al.*, 2008; Martin-Orué *et al.*, 2008). Un estudi recent relaciona l'efecte de la microflora intestinal, la qual augmentaria la producció de limfòcits Treg al GALT i aquests a través del sistema immunitari comú mucosal arribarien al teixit pulmonar on atenuarien la inflamació (Forsythe, 2011). En un altre estudi, l'administració oral de bacteres ha incrementat el nombre de limfòcits Treg tant a la *làmina pròpia* intestinal, com a la mucosa de les vies respiratòries (Navarro *et al.*, 2011). Kwon *et al.* (2010) ha demostrat que una mescla de probiòtics poden

suprimir la progressió de la malaltia inflamatòria intestinal, la dermatitis atòpica i l'artritis reumatoide, mitjançant la generació de DCs i Tregs a la mucosa intestinal, que alhora incrementa les Tregs també a les regions inflamades. Aquests estudis recents dels efectes de la microbiota intestinal sobre el sistema immunitari associat al tracte respiratori són molt interessants i seria un dels possibles mecanismes d'acció de les dietes, mitjançant el qual augmentarien els limfòcits Treg a la mucosa broncoalveolar.

Aquest treball s'ha centrat en els possibles beneficis de la suplementació amb concentrats de proteïnes plasmàtiques d'origen animal en la prevenció dels símptomes d'una inflamació pulmonar experimental induïda per una toxina bacteriana. Els resultats d'aquest treball mostren que l'SDP (així com IC, encara que en menor grau) protegeix el BALT i el NALT de l'activació causada per l'LPS. No es pot realitzar una extrapolaració lineal dels resultats obtinguts en animals de laboratori als animals de granja, ja que els ratolins de laboratori no estan exposat a la mateixa càrrega de patògens en que es troben els animals de granja. Tot i això, els resultats d'aquest estudi indiquen que els suplementes amb proteïnes plasmàtiques són efectius i podrien limitar la resposta immunitària en patologies pulmonars.

v. CONCLUSIONS

L'administració nasal de l'LPS d'*E. coli* produeix una inflamació pulmonar aguda, que es caracteritza per:

- ✓ La pauta d'administració de l'endotoxina indueix una inflamació pulmonar moderada, sense afectar ni el consum de pinso ni el creixement dels animals.
- ✓ Una migració de leucòcits i un alliberament massiu de citocines i quimiocines pro-inflamatòries, que recluten i activen monòcits i neutròfils a l'espai alveolar i al teixit pulmonar.
- ✓ Una menor estimulació de la immunitat adquirida, en la qual hi ha un increment considerable dels limfòcits T activats, així com una gran producció de les citocines associades.
- ✓ Induir pocs canvis sobre els mecanismes reguladors, com els limfòcits reguladors i les citocines antiinflamatòries.

L'estudi dels efectes de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques (SDP o IC) sobre una inflamació pulmonar aguda induïda per l'LPS, permet concloure que:

- ✓ Els animals alimentats amb la dieta SDP presenten una ingesta major de pinso amb el consegüent increment en el pes d'aquests animals.
- ✓ Les dietes SDP i IC disminueixen el reclutament de leucòcits, sobretot els neutròfils i els monòcits. Tot i que la resposta innata és més extensa, les dietes presenten un major efecte en sobre la resposta adquirida on redueixen les poblacions limfocitàries estimulades per l'LPS a pulmó i a sang.
- ✓ Les dietes SDP i IC redueixen de forma notable l'expressió de citocines i quimiocines pro-inflamatòries al BALF induïdes per l'administració de l'LPS, sobretot a les 6 h d'estudi. Aquesta reducció de mediadors en la fase més aguda de la inflamació explicaria la menor infiltració de cèl·lules inflamatòries al teixit pulmonar.
- ✓ Els efectes de l'SDP i l'IC estan mediat per canvis en l'expressió de citocines antiinflamatòries, ja que augmenten la concentració de IL-10 a pulmó i a jejú, i la del TGF- β a pulmó. Ambdues dietes redueixen el balanç entre els limfòcits Th activats i els limfòcits T reguladors, i així atenuen la magnitud de la resposta inflamatòria i augmenten la concentració de mediadors essencials per la reparació del teixit.

- ✓ Els nostres resultats mostren que un possible mecanisme d'acció de les dietes seria que, les dietes modularien la immunitat intestinal, i que a través del sistema immunitari mucosal comú, reduirien la inflamació pulmonar. Els resultats corroboren que la intervenció dietètica amb proteïnes plasmàtiques podria ser una nova estratègia per prevenir i/o atenuar la inflamació pulmonar.