



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

I. INTRODUCCIÓ

1. SISTEMA RESPIRATORI

Les funcions del sistema respiratori són la distribució de l'aire i l'intercanvi de gasos, per aportar oxigen i eliminar diòxid de carboni de les cèl·lules de l'organisme. Totes les àrees del sistema respiratori, excepte els alvèols, funcionen com a distribuïdors d'aire. Només els alvèols i els diminuts conductes alveolars que s'obren en ells funcionen com intercanviadors de gasos. A més de la distribució de l'aire i l'intercanvi de gasos, el sistema respiratori filtra, escalfa i humidifica l'aire que respirem i també ajuda a l'homeòstasi del pH de l'organisme.

El sistema respiratori pot dividir-se en tracte superior i inferior. Els òrgans del tracte respiratori superior estan localitzats per damunt del tòrax, o cavitat toràcica, mentre que els del tracte inferior es localitzen quasi per complet dins d'ell (Figura I-1).

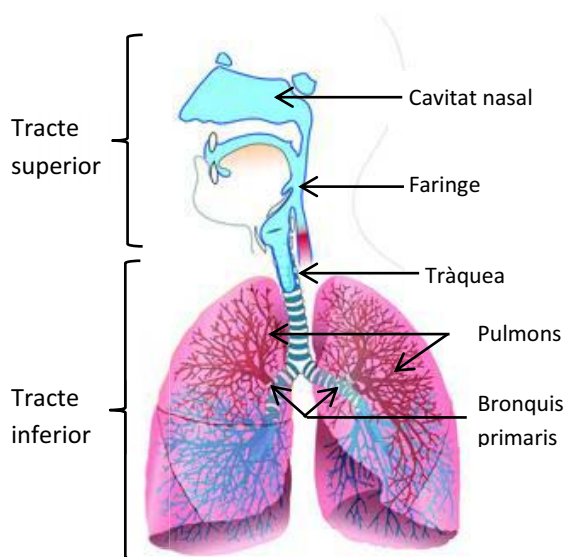


Figura I-1. Estructura del sistema respiratori.

1.1. FISIOLOGIA I ANATOMIA PULMONAR

1.1.1. Estructura pulmonar

La via aèria sublaríngia constitueix l'arbre traqueobronquial. La tràquea està localitzada en el mediastí superior i constitueix el tronc de l'arbre, aquesta es bifurca a nivell del pla toràcic transvers en dos **bronquis principals** (primaris), els quals entren a cada pulmó a través del hialí. Després que els bronquis principals penetrin als pulmons, es divideixen en **bronquis secundaris** o lobulars, entrant cadascun en un lòbul. Els lòbuls pulmonars es divideixen a la vegada en unitats funcionals denominades **segments broncopulmonars**. En l'interior de cada segment broncopulmonar existeixen múltiples tubs, el diàmetre dels quals es redueix progressivament, de manera que es forma l'arbre bronquial. Els tubs més petits acaben en les estructures més petites, però funcionalment les més importants del pulmó, els **alvèols**, on és produeix l'intercanvi de gasos.

1.1.2. Funcions dels pulmons, bronquis i alvèols

La distribució de l'aire la realitzen els conductes bronquials, mentre que els responsables de l'intercanvi de gasos entre l'aire i la sang són els alvèols i els capil·lars sanguinis que els envolten.

L'aire que entra pel nas sol estar contaminat per un o varis irritants, com pot ser el pol·len, la pols o microorganismes. El sistema respiratori consta d'un mecanisme molt perfeccionat que elimina gairebé totes les formes contaminants abans de que l'aire arribi als conductes bronquials i als alvèols. El principal mecanisme de purificació és la capa de moc protector que recobreix l'arbre bronquial, aquesta capa forma una làmina continua, que cobreix la zona per on passa l'aire. Aquesta capa de moc es desplaça des de les zones més baixes dels bronquis fins a la faringe, mitjançant el moviment dels cilis, els quals cobreixen les cèl·lules epitelials de la mucosa respiratòria i es mouen en una sola direcció.

2. TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A LES MUCOSES

El sistema immunitari mucosal és responsable de mediar les relacions simbiòtiques entre l'hoste i els microorganismes endògens (bactèries comensals), i funciona com a primera barrera física i immunològica de defensa contra els microorganismes patògens (Mestecky *et al.*, 2003; Figura I-2). El sistema immunitari mucosal manté l'homeòstasi immunològica a través de l'extensa superfície epitelial, que travessa les cavitats oral i nasal del tracte respiratori, intestinal i genito-urinari.

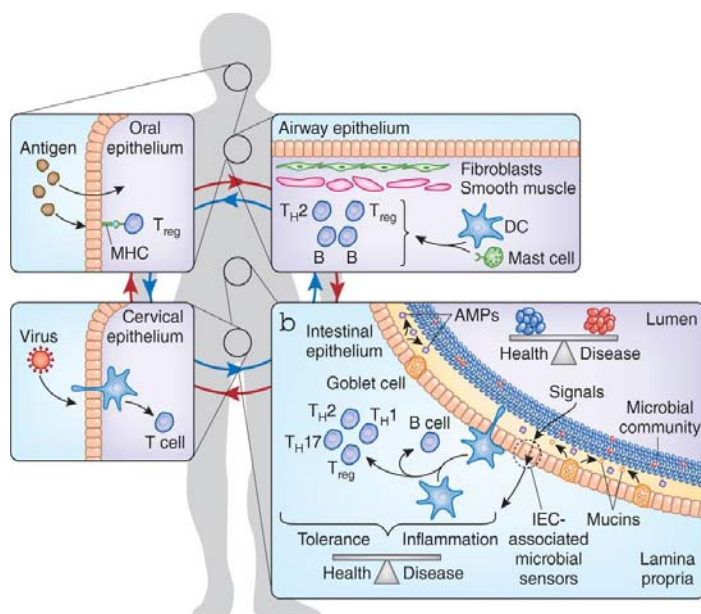


Figura I-2. Sistema immunitari mucosal comú. Diverses zones mucosals, a través de l'organisme actuen com una interfície entre l'entorn físic (alimentació, els antigens de l'aire, virus i antigens comensals) i les defenses mucoses de l'hoste. Tant l'estat de la comunitat microbiana i les cèl·lules immunitàries subjacents contribueixen a la salut o la malaltia de l'hoste. Cèl·lula dendrítica (DC); Complex major d'histocompatibilitat (MHC); cèl·lules epitelials intestinals (IEC); pèptid antimicrobià (AMP); (Gill *et al.*, 2010).

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 genito-urinari. La iniciació de les respostes immunitàries antigen-específiques és en àrees especials, que consten de cèl·lules "MICROFOLD" o cèl·lules de membrana "M", localitzades en els fol·licles de l'epiteli del teixit limfoide associat a les mucoses (MALT; *Mucosa- Associated Lymphoid Tissue*). Aquests fol·licles contenen totes les cèl·lules immunocompetents que es requereix per generar una resposta immunitària; limfòcits T, limfòcits B i cèl·lules presentadores d'antigen (APCs; *Antigen Presenting Cells*). 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 a altres teixits mucosals, on es diferencien 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 van tant a teixits mucosals com a teixits perifèrics (Brandtzaeg i Pabst, 2004).

El sistema immunitari mucosal es pot dividir en **àrees inductives**, on els antígens de les superfícies mucosals estimulen els limfòcits T i limfòcits B, i **àrees efectores**, on les cèl·lules efectores després de la seva extravasació i diferenciació inicien la resposta. Les àrees inductives de la immunitat són les plaques de Peyer (PPs) i els ganglis limfàtics, col·lectivament anomenats teixit limfoide associat a l'intestí organitzat (*Organized GALT; Organized Gut-Associated Lymphoid Tissue*), com a zones inductives pel tracte gastrointestinal, mentre que les amígdales i els adenoides, formen part del teixit limfoide nasal (NALT; *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*), del tracte respiratori superior i la cavitat oral. Les àrees efectores consisteixen en diferents compartiments histològics, incloent la *lamina propria*, l'estroma de les glàndules exocrines i les superfícies epitelials, i són on es generen les immunoglobulines secretades i on per exemple es produeix la inflamació al·lèrgica. El sistema immunitari mucosal comú (CMIS; *Common-Mucosal Immune System*) connecta les àrees inductores amb els diferents llocs efectors per a la generació d'una resposta en que es produeixen limfòcits T helper 2 (Th2) dependents de la immunoglobulina A (IgA), limfòcits T helper 1 (Th1) i limfòcits T supressors/citotòxics (Ts/c) dependents de la resposta immunitària, els quals funcionen com la primera línia de defensa de la superfície mucosal (Yuki i Kiyono, 2003; Kiyono i Fukuyama, 2004; Figura I-3).

A les vies respiratòries superiors també es troben grans agregats de fol·licles limfoides, com ara aquells que estan a l'intestí, les PPs. Aquests agregats estan descrits en una gran varietat d'espècies incloent rosegadors, pollastres, gats, conills, ovelles, porcs, hámsters, i també en humans (Beinenstock i Clancy, 2005; Beinenstock i McDermott, 2005).

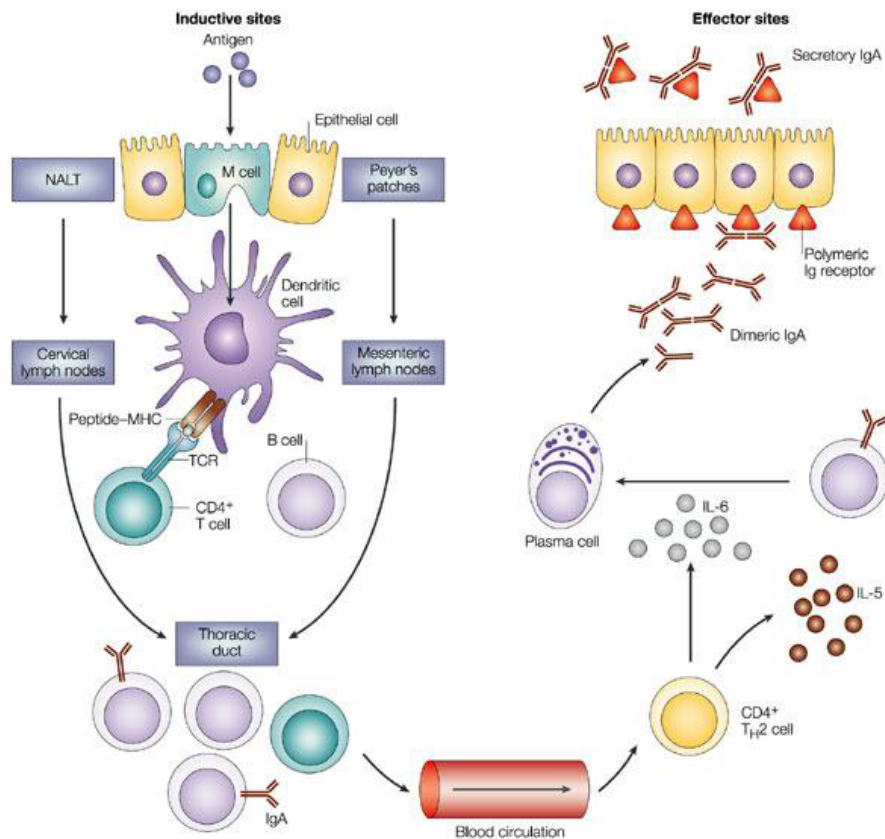


Figura I-3. Esquema del sistema immunitari mucosal comú. Els antigens són transportats al NALT o a les PPs a través de les cèl·lules M presents a l'epiteli. Les cèl·lules dendrítiques (DCs; *Dendritic Cells*) processen i presenten l'antigen a les cèl·lules T del corresponent teixit, mitjançant el receptor de cèl·lules T (TCR; *T Cell Receptor*). Els limfòcits Th estimulats per les DCs indueixen les cèl·lules B per que secretin IgA en els centres germinals del fol·licle limfoide. Aquestes cèl·lules migren del NALT o les PPs als ganglis limfàtics cervicals o els ganglis limfàtics mesentèrics, respectivament. Finalment migren als llocs efectors a través del conducte toràcic i la circulació sanguínia (Kiyono i Fukuyama, 2004).

2.1. SISTEMA IMMUNITARI PULMONAR

El teixit limfoide associat als bronquis (BALT; *Bronchus-alveolar lymphoid tissue*) i el NALT, són teixits encarregats de desenvolupar una resposta als microorganismes patògens inhalats.

El BALT va ser considerat pels primers investigadors com un teixit limfoide mucosal secundari, localitzat en les parets de les vies respiratòries (Sminia *et al.*, 1989), similar a les PPs a l'intestí prim. Tot i que el BALT no està constitutivament present en tots els mamífers, els que el tenen

més diferenciat són els ratolins i els humans (Randall, 2010). El BALT s'indueix també per l'exposició a microorganismes o agents irritants (Tshering i Pabst, 2000). El NALT està descrit principalment en els rosegadors, com a dos agregats limfoides separats. El NALT es desenvolupa després del naixement.

2.1.1. Teixit limfoide associat als bronquis

El terme BALT s'utilitza sovint per denominar un ampli ventall de teixits, distribuïts en diversos espais de tot el pulmó (Pabst, 2007). El BALT està format per un dens grup de limfòcits amb estructura fol·licular, disposat en una xarxa de cèl·lules de l'estroma i subjacent a l'epiteli broncoalveolar (Randall, 2010). El BALT forma part del sistema immunitari mucosal comú, que també inclou el GALT i el NALT, entre d'altres. El desenvolupament del BALT no està programat, comença després del naixement, i apareix en zones anatòmicament no limfocítiques. La seva formació també es pot induir en diferents malalties, com malalties inflamatòries cròniques, infeccions o malalties autoimmunes (Aloisi i Pujol-Borrell, 2006), i aleshores s'anomena BALT induïble (iBALT). Aquest iBALT no té sempre una estructura definida o un lloc rigorós al pulmó. Per exemple, el iBALT no sempre està a l'epiteli, ni es troba sempre associat a les vies respiratòries. Sinó que el iBALT pot estar localitzat al llarg de tot el pulmó, adjacent a les petites artèries pulmonars (Moyron-Quiroz *et al.*, 2006). Un zona important per la formació del iBALT és l'espai perivascular, que presenta un gran nombre de capil·lars periarterials (Pabst i Tscherning, 2002). Sovint, en la inflamació pulmonar, aquest espai està densament poblat de limfòcits.

El BALT requereix canvis estructurals com el desenvolupament d'una xarxa de cèl·lules de l'estroma, àrees de separació de cèl·lules B i cèl·lules T, la formació d'àrees de cèl·lules dendrítiques (FDCs; *Follicular Dendritic Cells*) dins dels fol·licles de cèl·lules B i el desenvolupament de vècules endotelials altes (HEVs; *High Endothelial Venules*), així com els vasos limfàtics per facilitar l'entrada i sortida de leucòcits del BALT. Les àrees de cèl·lules T es troben envoltant els fol·licles de cèl·lules B (Figura I-4; Woodland i Randall, 2004). Dins d'aquestes àrees T també es troben DCs, cèl·lules plasmàtiques (GeurstsvanKessel *et al.*, 2009), macròfags (Hiramatsu *et al.*, 2003) i ocasionalment eosinòfils i neutròfils (Lee *et al.*, 1997).

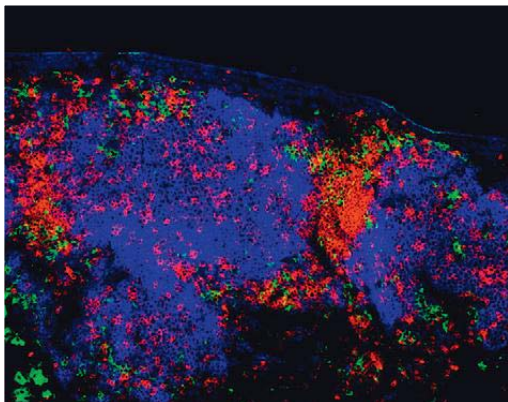


Figura I-4. Organització del BALT murí. Pulmons d'un ratolí, on les àrees blaves corresponen als fol·licles de cèl·lules B. Les àrees vermelles corresponen a les cèl·lules T, algunes estan rodejant els fol·licles i algunes dispersen en els fol·licles B. Les DCs (verd) estan localitzades principalment en les àrees de cèl·lules T (Randall, 2010).

2.1.2. Teixit limfoide associat nasal

El NALT és un teixit limfoide present només en rosegadors. En la cavitat nasal dels rosegadors existeixen unes estructures limfoides situades sobre del paladar tou i a l'entrada del conducte faringeal, són l'anàleg del *Waldeyer's ring* en humans. El NALT està format per cèl·lules epitelials associades al fol·licle (FAE; *Follicle-Associated Epithelium*), cèl·lules M, aïllades o en grups, cèl·lules presentadores d'antigen, DCs i macròfags. El NALT també està format per agregats limfoides secundaris, que estan caracteritzats per contenir àrees fol·liculars de cèl·lules B i àrees parafol·liculars de cèl·lules T (Kiyono i Fukuyama, 2004). Els agregats de limfòcits estan molt vascularitzats, amb HEVs presents sobretot en els nodes limfàtics. No hi ha vasos limfàtics aferents, i els vasos limfàtics eferents drenen cap als ganglis limfàtics cervicals a la part superior del tòrax (Andoh *et al.*, 2002). Per tant el NALT conté les cèl·lules necessàries per la inducció i regulació d'una resposta immunitària mucosal causada per la inhalació d'un antigen. Totes aquestes característiques fenotípiques indiquen que el NALT està format per cèl·lules immunocompetents que poden transitar, des de i a llocs distants (Bienenstock i McDermott, 2005).

2.1.3. Resposta immunitària del BALT i el NALT

El BALT està involucrat en la resposta immunitària als agents infecciosos i antigènics. El CMIS comporta un flux de cèl·lules del GALT a altres llocs mucosals (Bienenstock i McDermott, 2005). Ja fa més de 35 anys que Rudzik *et al.* (1975) va demostrar que els limfòcits del GALT poden poblar la mucosa bronquial i aquest procés també es pot produir en el sentit invers. Però no ha estat fins èpoques més recents, quan s'ha vist que la inflamació pulmonar s'inicia amb un increment de limfòcits B i limfòcits T a les vies respiratòries i al parènquima pulmonar. Les cèl·lules B comencen

una expansió clonal en els centres germinals, on es diferencien a cèl·lules plasmàtiques o cèl·lules B memòria (Randall, 2010). Les cèl·lules T són reclutades pel BALT i segons l'antigen inhalat es diferenciaran en el corresponent subtipus. L'epiteli expressa el complex major d'histocompatibilitat de classe I (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) de forma habitual o constitutiva, i quan hi ha inflamació també expressen el MHC de classe II i les molècules B7, proteïnes que coestimulen al limfòcit T durant l'activació immunitària (Randall, 2010).

El NALT és la primera estructura del sistema immunitari que respon als antígens inhalats. S'ha mostrat que està involucrat en la generació de senyal positius i negatius de regulació per la inducció de la immunitat específica a l'antigen i tolerància, respectivament. La resposta del NALT depèn de la identitat de l'antigen, i segons aquesta els limfòcits Th es diferencien en el subtipus corresponent. En alguns casos també es formen centres germinals, com per exemple per l'administració intranasal d'un reovirus (Zuercher *et al.*, 2002).

En els òrgans limfoides mucosals, com les PPs, es generen respostes immunitàries a través de les cèl·lules T, que produeixen la interleucina-5 (IL-5), el factor de creixement transformant- β (TGF- β ; *Transforming Growth Factor-beta*) o la IL-10 (Kiyono i Fukuyama, 2004). A més, les respostes immunitàries mucosals als antígens alimentaris o de les bacteries comensals sovint provoquen l'aparició de cèl·lules T reguladores (Treg; Fujishahi *et al.*, 2001). Aquestes dades suggereixen que el BALT podria produir una resposta mucosal mitjançant les cèl·lules Treg, a través de la diferenciació de les cèl·lules Th. De fet, s'han observat efectes directes de les cèl·lules Treg en la supressió i desenvolupament del BALT (Kocks *et al.*, 2007). En aquest estudi es mostra que els ratolins deficients del receptor de quimiocines CCR7, tenen un nombre reduït de cèl·lules Treg als nodes limfàtics bronquials i aquests animals són propensos a desenvolupar BALT sense estar exposats a cap agent immunològic. A més, el desenvolupament del iBALT s'evita amb la transferència adoptiva de cèl·lules Treg als animals CCR7^{-/-}, concretament suprimint l'activitat de les cèl·lules T autoreactives (Kocks *et al.*, 2007).

3. SISTEMA IMMUNITARI PERIFÈRIC

Els talls, les abrasions i les ferides proporcionen vies d'entrada als patògens a través de la pell. Amb poques excepcions les infeccions romanen summament localitzades i desapareixen en uns dies sense causar malaltia. En cas contrari intervé el sistema immunitari, que implica la intervenció de proteïnes solubles i receptors de la superfície cel·lular, que reconeixen al patògen i els seus productes. Un cop el patògen ha estat reconegut, la segona part de la resposta implica

l'activació dels mecanismes efectors per a la seva eliminació. La resposta immunitària és l'acció integrada d'un gran nombre de mecanismes de defensa contra aquests antigens i consta de dos tipus, la immunitat innata i la immunitat específica.

Immunitat innata (inespecífica): està constituïda per mecanismes existents amb anterioritat al desenvolupament de la infecció, capaços d'establir respostes ràpides. Els macròfags i neutròfils (principals elements 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 infeccios 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 adaptativa.

Immunitat adaptativa (específica): es caracteritza per una especificitat extraordinària per a diferents molècules i per la capacitat de "recordar" i respondre amb major intensitat després d'exposicions repetides a un mateix microorganisme. El sistema immunitari adaptatiu ha evolucionat per proporcionar una defensa més versàtil, que a més, té tendència a evitar que l'agent infeccios provoqui malaltia en una segona infecció.

3.1. IMMUNITAT INNATA

Si l'antigen aconsegueix travessar les barreres no immunològiques, s'inicia la immunitat innata, en què participen diferents elements. Per una banda, hi ha les cèl·lules fagocítiques i les cèl·lules assassines naturals (NK; *Natural Killer*). Per altra banda, intervenen unes proteïnes solubles anomenades citocines i unes glicoproteïnes, les quimiocines, que desenvolupen un paper important en la resposta inflamatòria. En relació a les cèl·lules fagocítiques trobem per una banda els monòcits i els macròfags, i per l'altra els neutròfils polimorfonuclears.

Els **macròfags** maduren contínuament a partir dels **monòcits** circulants i abandonen la circulació per migrar als teixits de tot l'organisme. Són activats per gran varietat d'estímuls i poden adquirir formes diferents. Es troben en tots els òrgans i teixits connectius i reben noms especials per designar localitzacions específiques. Per exemple, en el tracte respiratori són els "macròfags alveolars", i es troben en un nombre especialment elevat als pulmons (on es localitzen en l'interstici i als alvèols). Els fagòcits mononuclears intervenen de forma important en les interaccions bidireccionals entre la immunitat innata i l'adaptativa. Les funcions principals en la

resposta innata són: fagocitar partícules estranyes com microorganismes, macromolècules, entre elles antígens i també teixits propis que estiguin danyats o morts. També fagociten partícules recobertes per proteïnes del complement. Les substàncies fagocitades són degradades dins dels macròfags mitjançant enzims lisosomals. L'altra funció important és produir citocines que recluten a altres cèl·lules inflamatòries, especialment neutròfils, i que són responsables de molts efectes sistèmics de la inflamació, com per exemple la febre.

Els macròfags expressen l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS; *inducible Nitric Oxide Synthase*), un enzim important en la defensa immunitària front els patògens i les cèl·lules tumorals (Cary *et al.*, 2006). La iNOS produeix òxid nítric (NO; *Nitric Oxide*), una molècula que intervé en molts processos biològics. La presència de iNOS als macròfags i a les cèl·lules epitelials pulmonars és significativament més alta i pot produir entre 100 i 1000 vegades més NO que els enzims constitutius i durant períodes més llargs de temps. L'excessiva alliberació de NO produeix toxicitat cel·lular i lesió del teixit, que contribueixen a la patologia d'un gran nombre de desordres i malalties (Joubert i Malan, 2011).

La segona major família de fagòcits són els **neutròfils polimorfonuclears** (PMN; *Polymorphonuclear Neutrophils*), que es generen i es perden en grans quantitats cada dia. Són els elements principals de la resposta inflamatòria aguda i són els primers que actuen. La principal funció que desenvolupen els neutròfils és la fagocitosi, que s'inicia amb la unió a un receptor de membrana. Els neutròfils fagociten la cèl·lula diana mitjançant la formació de pseudòpodes que envolten la cèl·lula, formant un lisosoma, amb la posterior alliberació dels grànuls neutrofilics que conté en el seu citoplasma i com a resultat provoquen la mort de la cèl·lula. De grànuls neutrofilics n'hi ha de tres tipus, els primaris, secundaris i terciaris, que es diferencien pels enzims que contenen. Alguns grànuls són bactericides, mentre que altres poden degradar la matriu proteica extracel·lular. Molts neutròfils moren al lloc de la inflamació, i alliberen els enzims que contenen, que digereixen restes cel·lulars i tissulars i la fibrina extracel·lular de l'hoste. Poden ser activats per citocines produïdes principalment pels macròfags i les cèl·lules endotelials. A més, els neutròfils produeixen un gran nombre de citocines, com la IL-1 β , el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; *Tumor Necrosis Factor- α*), el factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF; *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF; *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), la IL-6 o la IL-8 entre d'altres, que poden modular la resposta immunitària. Durant el reclutament de neutròfils, la migració transepitelial té un paper molt important. Els neutròfils, que circulen en el torrent sanguini, travessen fàcilment les parets dels vasos sanguinis mitjançant un procés anomenat

diapedesi. La sortida de neutròfils des del torrent sanguini està condicionada per la secreció de la histamina (produïda pels mastòcits) i el TNF- α (produït pels macròfags).

Tant els macròfags com els neutròfils tenen un paper clau en totes les fases de defensa de l'hoste. A més de ser fagocítics posseeixen grànuls que contenen enzims, proteïnes i pèptids capaços de mediar una resposta intracel·lular antibacteriana.

Una funció important de la resposta immunitària innata és reclutar més cèl·lules fagocítiques i molècules efectores al focus de la infecció, mitjançant l'alliberació de citocines i altres mediadors. A més els fagòcits alliberen altres molècules en resposta a agents infecciosos, incloent espècies reactives d'oxigen, peròxids i NO. La funció d'aquestes molècules és oxidar les membranes i les proteïnes dels microorganismes patògens però també danyen els teixits sans de l'hoste.

Les **cèl·lules NK** són leucòcits que s'activen com a resposta a virus i a altres agents que indueixen un increment d'interferó- γ (IFN- γ ; *Interferon- γ*). Reconeixen i lisen cèl·lules infectades per virus o que presenten malignitat (càncer). Les cèl·lules NK formen sinapsis amb les cèl·lules infectades, però també amb altres leucòcits, inclosos els macròfags i les DCs, fet que els permet integrar les senyals d'activació i d'inhibició (Culley, 2009). Una vegada activades, les cèl·lules NK poden alliberar grànuls citolítics que maten la cèl·lula diana. A més són una font molt important de citocines, principalment IFN- γ , però també produeixen citocines involucrades en la resposta Th2, com la IL-5 i la IL-13, i la IL-10 (Culley, 2009).

Tal com ja hem anat veient fins ara, totes aquestes cèl·lules es comuniquen a través de citocines i quimiocines.

Les **citocines** són proteïnes solubles de baix pes molecular que s'expressen en diferents teixits. Per exemple a pulmó són expressades pels leucòcits, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules epitelials i els fibroblasts. Les citocines que tenen un paper més important durant la inflamació són el TNF- α , la IL-1, la IL-6, el G-CSF i el GM-CSF, entre d'altres. En un estat inflamatori es produeixen elevades quantitats d'aquestes citocines, i es sintetitzen durant la fase d'activació efectora de la immunitat innata. L'expressió i secreció de les citocines es regula abans i després de la transcripció, així la seva alliberació és molt ràpida.

La citocina IL-1 a més de ser un mediador de la resposta sistèmica a les infeccions i a la inflamació, com ara la febre i la hipotensió, també té un paper important en la destrucció de la matriu extracel·lular en diverses malalties, com l'artritis reumatoide i la fibrosis pulmonar (O'Neil i Dinarello, 2000). Tot i que es produïda per una gran varietat de cèl·lules, les que més en

produeixen són els monòcits i els macròfags (Chung, 2001). El TNF- α també és produït principalment per monòcits i macròfags activats, així com per cèl·lules com els limfòcits, els neutròfils, els fibroblasts i els mastòcits. És molt important pel desenvolupament de la resposta immunitària innata. És un pirogen endogen que de les moltes funcions que realitza es destaca la producció de febre i la inducció de mort per apoptosi (a través de la producció de IL-1 i IL-6).

Les **quimiocines** són una gran superfamília de proteïnes que es distingeixen pel lloc on conserven el residu N-terminal de cisteïna (Baggiolini *et al.*, 1997). Hi ha 4 grans famílies que han estat identificades, i la majoria d'aquestes proteïnes són solubles. Les 2 principals famílies comprenen els lligands CC (CCLs) i CXCLs, respectivament, mentre que les altres 2 famílies més petites inclouen lligands C i un CX₃CL, respectivament (Zlotnik i Yoshie, 2000). De les quimiocines CCLs, algunes de les més importants en la resposta innata són la CCL2 (MCP-1; *Monocyte Chemotactic Protein*), CCL3 (MIP-1 α ; *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*), CCL4 (MIP-1 β ; *Macrophage Inflammatory Protein-1 β*), CCL5 (RANTES; *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*) i la CCL11 (Eotaxin). I de les CXCLs la CXCL11 (KC; *Keratinocyte-derived Chemokine*), la CXCL8 (IL-8) i la CXCL2 (MIP-2; *Macrophage Inflammatory Protein-2 α*). La funció de les quimiocines és a múltiples nivells, durant el desenvolupament i manteniment dels canvis immunitaris i inflamatoris. La principal funció és com a quimioatracients i agonistes que regulen la migració i activació dels leucòcits durant la inflamació i la resposta immunitària (Allen *et al.*, 2007). És a dir, medien el reclutament de leucòcits efectors com ara monòcits, neutròfils, cèl·lules T, DCs i eosinòfils. També influeixen en el resultat de la resposta immunitària alterant l'estat d'activació de les cèl·lules efectores migrades. Finalment, les quimiocines sembla que regulen l'activació de les cèl·lules residents a pulmó incloent les cèl·lules alveolars epitelials, cèl·lules del múscul llis i fibroblasts. La CCL2, CCL3 i CCL5 són quimioatracients pels monòcits, limfòcits, basòfils i eosinòfils. La CXCL1 actua atraient principalment als neutròfils.

3.2. IMMUNITAT ADAPTATIVA

Les característiques de la immunitat adaptativa són l'especificitat per a molècules diferents, que la capacita per respondre de forma singular a diferents tipus de microorganismes; i la capacitat per "recordar" i 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. Els mecanismes de la resposta immunitària específica activen de forma coordinada, diferents poblacions cel·lulars (limfòcits B i T) i diferents molècules, amb la finalitat d'eliminar l'agent o substància estranya. En aquesta immunitat es produeixen dos tipus de

respostes: la humoral i la cel·lular. Tots dos mecanismes estan íntimament relacionats, col·laborant els diferents components d'un i altre (Figura I-5).

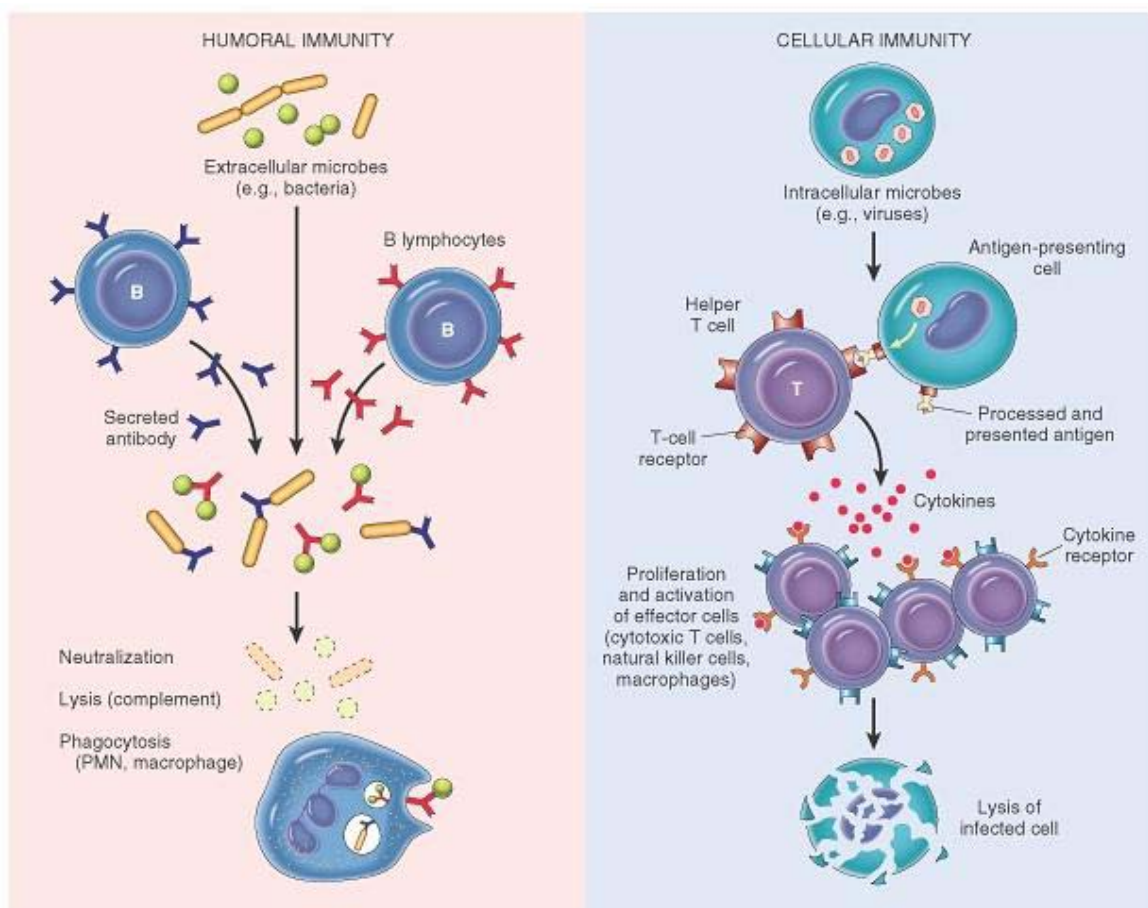


Figura I-5. Esquema de les cèl·lules implicades en la resposta adaptativa humoral i cel·lular. A l'esquerra la resposta humoral mediada per la producció d'anticossos a partir dels limfòcits B. A la dreta, la immunitat cel·lular mediada per les cèl·lules T. Els anticossos participen en la immunitat neutralitzant directament els microorganismes extracel·lulars o per l'activació del complement i les cèl·lules efectores (neutròfils i macròfags) per matar microorganismes. Les cèl·lules T poden lisar directament (limfòcits Ts/c) o dirigir la resposta a altres cèl·lules mitjançant la producció de citocines (limfòcits T helper).

3.2.1. Immunitat humoral

La immunitat humoral és el principal mecanisme de defensa contra els microorganismes extracel·lulars i les seves toxines, en el qual, els components del sistema immunitari que ataquen als antígens no són les cèl·lules directament, sinó els anticossos secretats per l'activació antigènica.

La primera fase de la immunitat humoral és el reconeixement de l'antigen dins de l'organisme per les cèl·lules B a través del seu receptor de membrana.

Limfòcits B. Els limfòcits B (Figura I-6) són un tipus cel·lular que té múltiples funcions en el manteniment de la immunitat i en la reexposició d'infeccions. Els limfòcits B s'originen i maduren en la medul·la òssia, un vegada han madurat, s'ubiquen als ganglis limfàtics, la melsa, el timus i altres estructures limfoides; on s'activen en la presència d'un agent extern, amb l'ajuda d'un altre tipus cel·lular, els limfòcits T helper; tot i que en certes circumstàncies poden fer-ho en l'absència d'aquests. Cada limfòcit B que es diferencia en la medul·la òssia està programat genèticament per sintetitzar un sol tipus d'anticòs, a la espera de contactar amb l'antigen específic. En l'activació de les cèl·lules B, d'una única cèl·lula B es poden originar un gran nombre de clons o cèl·lules idèntiques. Algunes d'aquestes cèl·lules es diferencien i passen a ser cèl·lules plasmàtiques que sintetitzen i excreten gran quantitat d'anticossos, a aquest fenomen se l'anomena expansió i selecció clonal. Altres contràriament no es diferencien sinó que romanen en el teixit limfàtic, constituint les anomenades cèl·lules B de memòria. La missió d'aquestes cèl·lules no és sintetitzar anticossos sinó romandre com reserva per si en una altra ocasió es veuen exposades a l'antigen que va provocar la seva formació, en aquest cas produiran novament cèl·lules plasmàtiques.

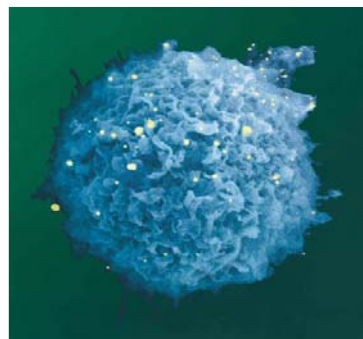


Figura I-6. Imatge microscòpica d'un limfòcit B.

3.2.2. Immunitat cel·lular

La immunitat cel·lular és una forma de resposta immunitària adaptativa mediada per limfòcits T. Aquests limfòcits T actuen com un mecanisme d'atac en contra dels microorganismes intracel·lulars, com virus i alguns bacteris, amb la capacitat de sobreviure i proliferar en l'interior dels fagòcits i altres cèl·lules de l'hoste, lloc on no tenen accés els anticossos circulants. La defensa front a aquest tipus d'infeccions depèn de la immunitat cel·lular, que indueix la destrucció del microorganisme resident en els fagòcits o en les cèl·lules infectades.

Limfòcits T. La immunitat adaptativa cel·lular està mediada pels limfòcits T (Figura I-7), aquests estructuralment s'assemblen als limfòcits B, ja que parteixen d'un progenitor limfoide comú, però aquests evolucionen en el timus. Un cop s'inicia una infecció en el sistema immunitari, els limfòcits T verges específics del patògen entren ràpidament en contacte amb els antigens del patògen. Aquest procés succeeix en els teixits limfoides secundaris, en l'interior dels quals els

patògens són transportats per la limfa als teixits perifèrics. En aquest teixits es troben amb els limfòcits T verges transportats per la sang. En els teixits limfoides secundaris mitjançant les DCs i els macròfags, el patogen es reconegut i comença la resposta adaptativa.

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 MHC. 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 APCs, com són els limfòcits B, les DCs, els macròfags i les cèl·lules de Langhergans de la pell. Les APCs presenten l'antigen processat (mitjançant el seu MHC) als limfòcits T, que el reconeixen mitjançant el receptor del limfòcits T (TCR; *T Cell Receptor*).

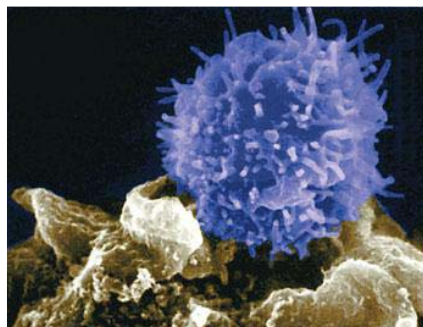


Figura I-7. Imatge microscòpica d'un limfòcit T.

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

- **Limfòcits T supressors/citotòxics (Ts/c)**, expressen una proteïna de superfície o clúster de diferenciació anomenada CD8. Encarregats de les funcions efectores de la immunitat cel·lular, mitjançant la interacció amb un complex antigen-MHC I específic situat en la superfície de la cèl·lula diana; els Ts/c reconeixen les cèl·lules infectades per un patogen al qual són específics (principalment virus) o cèl·lules tumorals. I secreten una sèrie de molècules (perforines i granzimes) que destrueixen les cèl·lules infectades i activen l'apoptosi de la cèl·lula diana.
- **Limfòcits T helper (Th)**, expressen una proteïna de superfície o clúster de diferenciació anomenat CD4 i no presenten activitat lítica, sinó que ocupen un paper central en el sistema immunitari. Són els encarregats d'iniciar la resposta immunitària coordinada mitjançant el complex antigen-MHC II. Els limfòcits Th s'uneixen al complex antigen-MHC II present a la superfície de les APCs, les quals 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 Th la producció d'IFN- γ i altres citocines, que activen les funcions de l'APC i provoquen la mort intracel·lular del paràsit. En funció del repertori de citocines que expressen, les cèl·lules Th es poden classificar en:

- ◆ **Limfòcits Th1:** secreten IL-2, IL-3, IFN- γ i TNF- α . Els limfòcits Th1 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. Les cèl·lules Th1 produeixen citocines que activen els macròfags i indueixen la inflamació, i anticossos opsonitzants que reforcen la fagocitosis del patogen. La principal citocina que es produeix és l'IFN- γ , que fixa el complement i estimula la fagocitosis per macròfags, també activa les funcions microbicides dels macròfags. Una altra citocina important que media la resposta Th1 és la IL-12 (p35-p40) que està involucrada en la proliferació de les cèl·lules T i els limfòcits NK activats. A més, la IL-12 controla la diferenciació dels limfòcits Th en Th1 i simultàniament inhibeix la generació dels limfòcits Th2 (Glimcher i Murphy, 2000). La IL-12 actua mitjançant la unió a receptors presents en les cèl·lules Th estimulades per l'antigen, activa el factor de transcripció STAT4 i indueix la diferenciació de les cèl·lules T en cèl·lules Th1. L'IFN- γ indueix el desenvolupament de les cèl·lules Th1 a l'estimular la producció de IL-12 pels macròfags i l'expressió de receptors de IL-12 funcionals en els limfòcits T. La IL-2 secretada per les cèl·lules Th1, actua com el seu propi factor de creixement autocrí, i junt amb l'IFN- γ , estimula la proliferació i diferenciació dels Ts/c, que destrueixen les cèl·lules infectades per virus i bacteries intracel·lulars, eradicant així les infeccions. Per tant, les cèl·lules Th1 estimulen les reaccions de l'hoste dependents dels fagòcits i són importants en l'eliminació de microorganismes intracel·lulars.
- ◆ **Limfòcits Th2:** secreten IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 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). La subpoblació Th2 és important per la defensa mediada per la IgE i els eosinòfils i els mastòcits i és independent de la fagocitosis, com per

exemple contra els helmints. La diferenciació de les cèl·lules T estimulades per l'antigen en la subpoblació Th2 depèn de la citocina IL-4, que actua activant la molècula STAT6, un factor de transcripció que estimula la transcripció dels gens de la IL-4 i altres citocines de les cèl·lules Th2. La infecció per al·lèrgens o helmints indueix una resposta mitjançant les Th2, incloent eosinofília i la producció de IL-4, IL-5, IL-13 i anticossos IgE. Els anticossos estimulats per les citocines de cèl·lules Th2 no indueixen la fagocitosis ni activen el complement de manera eficaç. A més, varies de les citocines produïdes per les cèl·lules Th2 (sobretot IL-4, IL-13 i IL-10) antagonitzen les accions de l'IFN- γ i inhibeixen l'activació dels macròfags. Per tant, les cèl·lules Th2 poden actuar com "cèl·lules supressores" controlant les respostes immunitàries, especialment les respostes inflamatòries mediatees per cèl·lules Th1.

Altres estímuls, a part de les citocines, també influeixen en el patró de diferenciació de les cèl·lules Th. Aquests són, entre d'altres, la quantitat d'antigen i de coestimuladors expressats en les APCs.

- ◆ **Limfòcits Th17:** Els limfòcits Th17 es caracteritzen per produir les citocines IL-17A (IL-17) i IL-17F, i també IL-21 i IL-22 (Ouyang *et al.*, 2008). Les cèl·lules Th17 tenen efectes patològics i protectors durant la inflamació (Ouyang *et al.*, 2008), sobretot desenvolupen un paper fonamental en la resposta contra bacteries de creixement extracel·lular i fongs. També s'ha descrit que presenten un efecte proinflamatori que les permet fer de pont entre la immunitat innata i la immunitat adaptativa (Serrano-Hernández, 2009). Les citocines implicades en el control de l'activitat Th17 són la IL-23, el factor de TGF- β i la IL-6. A més, el TGF- β i la IL-6 promouen la diferenciació dels limfòcits quiescent en Th17 i, un cop diferenciats, la citocina IL-23 indueix la seva proliferació.
- **Limfòcits T reguladors o Treg:** expressen els clústers de diferenciació CD4, CD25 i FoxP3. Són una subpoblació especialitzada de limfòcits T, que suprimeix l'activació del sistema immunitari. Aquestes cèl·lules mantenen la homeòstasis immunològica i afavoreixen la tolerància cap als autoantígens. Els limfòcits Treg s'originen al timus com cèl·lules CD4+ que expressen CD25 juntament amb el factor de transcripció

FoxP3. Representen aproximadament entre un 5-10% dels limfòcits Th en humans i ratolins (Sakaguchi, 2005). La senyal per desenvolupar Treg prové de la interacció del receptor de cèl·lules T i el complex MHC II. El mecanisme molecular implicat en l'acció dels limfòcits T reguladors no ha estat ben caracteritzat i és subjecte d'una intensa investigació. Experiments *in vitro* han donat resultats contradictoris en quant al requeriment de contacte cèl·lula-a-cèl·lula, per a que la cèl·lula infectada sigui suprimida. Citocines immunosupressores com el TGF- β i la IL-10 estarien també implicades en la funció del limfòcit T regulador. La IL-10, és una citocina antiinflamatòria multifuncional produïda per fagòcits mononuclears, cèl·lules NK, limfòcits Th1 i Th2 i cèl·lules B, entre d'altres. I quan hi ha una infecció els limfòcits Treg en són la principal font (Redford *et al.*, 2011). La IL-10 inhibeix la resposta inflamatòria als patògens a través del bloqueig de les citocines proinflamatòries com el TNF- α i les citocines Th2, actuant directament sobre les cèl·lules presentadores d'antigen, com els macròfags i les DCs (Redford *et al.*, 2011). A més, la IL-10 també pot inhibir la fagocitosis i la mort microbiana, limitant la producció de substàncies reactives d'oxigen i nitrogen, intermediaris en la resposta de l'IFN- γ . Per tant és una citocina que inhibeix la proliferació i la resposta de les citocines en les cèl·lules T (Jutel *et al.*, 2003). El TGF- β és una citocina pleiotròpica que regula la homeòstasi limfocítica, inhibint la resposta Th1 i Th2, promovent la diferenciació de determinades cèl·lules T, inhibint les IgE, i promocionant la producció d'IgA (Li *et al.*, 2006). La síntesi del TGF- β està implicada en un gran nombre de processos patològics, incloent tumors, aterosclerosi i fibrosi (Gordon i Blove, 2008). El TGF- β també indueix l'expressió del factor de transcripció FoxP3, que incrementa la producció de limfòcits Treg (Chen *et al.*, 2003). La IL-10 i TGF- β cooperen amb les cèl·lules Treg en la supressió i resolució de la resposta immunitària.

4. INFLAMACIÓ PULMONAR.

4.1. MODELS ANIMALS D'INFLAMACIÓ PULMONAR

Els models animals de lesió pulmonar aguda (LPA) haurien de reproduir els mecanismes i conseqüències de l'LPA en humans, incloent els canvis fisiològics i patològics que es produeixen.

Molts dels models animals de LPA estan basats en els desordres clínics associats amb l'LPA i la síndrome de dificultat respiratòria aguda (SDRA) en humans. Aquests inclouen sèpsia, múltiples

transfusions, traumes, aspiració del contingut gàstric, i reperfusió de teixits isquèmics (Hudson *et al.*, 1995; Pepe *et al.*, 1982; Taula I-1).

Taula I-1. Models animals d'inflamació pulmonar.

Model (Ref.)	Característiques
Àcid oleic (Chen <i>et al.</i> , 2008)	Bona reproductivitat. Requereix una injecció intravenosa d'àcid oleic pot ser difícil en animals petits.
LPS (Rittirsch <i>et al.</i> , 2008)	Molt reproduïble
Aspiració àcida (Safdar <i>et al.</i> , 2005)	Molt reproduïble. Poques diferències entre les dosis lesives i no lesives.
Hiperoxia (Dallas <i>et al.</i> , 2004)	Bona reproductivitat. Requereix un equipament especial per administrar i monitoritzar les concentracions de gas.
Bleomicina (Moore i Hogaboam, 2008)	Bona reproductivitat
Rentat salí (Fioretto <i>et al.</i> , 2011)	Els animals tenen que ser anestesiats, intubats, i ventilats durant tot el procediment i també després.
Pulmonar isquèmia/reperfusió (Shimoyama <i>et al.</i> , 2006)	Requereix un procediment quirúrgic complex.
No pulmonar isquèmia/reperfusió (Gao <i>et al.</i> , 2008)	Requereix material quirúrgic complex.
Bactèries intravenoses (Cross <i>et al.</i> , 1993)	Variació biològica important.
Bactèries intrapulmonars (Fox-Dewhurst <i>et al.</i> , 1997)	Variació biològica important.
Peritonitis (Matute-Bello <i>et al.</i> , 2001)	Variabilitat biològica entre la dosi letal i la dosi lesiva.
Lligació i punció cecal (Singleton <i>et al.</i> , 2005)	Variabilitat biològica i requereix material quirúrgic.

Les espècies animals més rellevants per modelitzar la lesió pulmonar són: porc, gos, ovella, conill, rata i ratolí. A nivell experimental, l'LPA pot reproduir-se per lesió pulmonar directa o indirecta. Els models per lesió pulmonar directa més habituals són els rentats pulmonars, l'administració endotraqueal d'àcid clorhídric, de xantín oxidasa, l'oxigen 100%, la irradiació i la isquèmia-reperfusió. D'exemples de lesió pulmonar indirecta tenim l'administració endovenosa de *pseudomonas*, d'enterococ, d'endotoxina d'*Escherichia coli*, d'àcid oleic, de trombina, de moll d'ós, de metil uretà, de clorur d'etil, l'administració subcutània d'endotoxina, i també la pancreatitis aguda.

Hi ha diversos models en ratolins que utilitzen el lipopolisacàrid (LPS). Aquests varien segons l'espècie de bactèria, el seu subtipus i la via d'administració. Les espècies més utilitzades són: *E.*

coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* i *Klebsiella pneumoniae*. Dins *E. coli* trobem diferents subtipus: O111:B4, O26:B6, O127:B8, O55:B5, O111:B6, entre d'altres. L'administració de LPS produeix necrosis i apoptosi en diversos òrgans. Les vies d'administració més utilitzades per provocar una inflamació aguda a nivell de pulmó són: l'administració intranasal, l'administració intratraqueal, l'administració peritoneal i la nebulització. L'LPS presenta molts avantatges com l'administració fàcil i els resultats acostumen a ser reproduïbles amb els experiments.

4.2. RESPOSTA IMMUNITÀRIA A UNA INFLAMACIÓ PULMONAR

L'LPA és un desordre agut que causa trastorns a l'endoteli pulmonar i a les barreres epitelials. La membrana alveocapilar està formada per l'endoteli microvascular, l'interstici i l'epiteli alveolar. L'LPA és caracteritzada per una pèrdua de la integritat de la membrana alveocapilar, una excessiva migració de neutròfils transepitelials i una alliberació de mediadors proinflamatoris. La fase aguda de la inflamació pulmonar està caracteritzada per un increment de proteïnes en l'espai alveolar com a conseqüència de l'elevada permeabilitat en les barreres alveolars. Els neutròfils són les primeres cèl·lules reclutades al lloc de la inflamació. Un cop activats, els neutròfils són capaços de sortir del sistema circulatori i migrar a través del interstici a l'espai alveolar. A diferència d'altres òrgans, la seqüència de reclutament de neutròfils que es produeix a pulmó és la següent: activació, segrest des de la sang a l'interstici i migració transepitelial (de l'interstici a l'espai alveolar). Una excessiva i/o prolongada activació de neutròfils contribueix a la destrucció de la membrana basal i un increment de la permeabilitat de la barrera alveocapilar. La migració d'un gran nombre de neutròfils activats es tradueix en la formació de grans ferides epitelials, degut a que aquestes cèl·lules es separen en els llocs d'unió interepitelial (Zemans *et al.*, 2009). Els neutròfils també produeixen mediadors proinflamatoris i proapoptòtics que actuen a les cèl·lules adjacents i creen lesions ulceratives (Zemans *et al.*, 2009; Downey *et al.*, 1999). L'LPA pot produir-se també en absència de neutròfils circulats, indicant que hi ha vies independents de neutròfils que poden produir dany pulmonar (Johnson i Matthay, 2010).

Els macròfags alveolars són la major font de quimiocines en l'espai alveolar. En rosegadors, les quimiocines més rellevants són la CXCL1 (KC) i la CXCL2 (MIP-2), principals quimioatracients pels neutròfils. La CCL2 (MCP-1) que atreu els monòcits, els quals són alliberats al torrent sanguini i entren en els teixits per convertir-se en macròfags tissulars. La CCL5 (RANTES) atreu cèl·lules T, eosinòfils i basòfils en l'espai alveolar. El reclutament de neutròfils també comporta l'alliberament d'un gran nombre de citocines com la IL-1, la IL-6 i el TNF- α . Els macròfags contribueixen a

l'entrada de neutròfils a l'espai alveolar mitjançant la producció de TNF- α (Gaga *et al.*, 1998). Meduri *et al.* (1995) van observar que nivells elevats i persistents de IL-6, IL-8 i TNF- α a plasma eren factors predictius de mortalitat. En la lesió pulmonar també es produeixen alteracions de la coagulació i de la fibrinòlisis, concretament de la proteïna C i l'inhibidor de l'activador del plasminogen 1.

En la lesió pulmonar es produeix un augment dels limfòcits pulmonars. Els limfòcits Th1 i Th2 es desenvolupen en diferent magnitud segons el causant de la lesió, però en la inflamació aguda es troben ambdues poblacions augmentades (Neurath *et al.*, 2002). L'acumulació de limfòcits Ts/c està descrit en la bibliografia, i s'ha vist que aquesta població és necessària per una inflamació màxima en el pulmó (Bhagwat *et al.*, 2006).

La resolució de la inflamació aguda pulmonar és un procés actiu que requereix una sèrie de passos integrats. Inclouent la transició del balanç de citocines pro i antiinflamatòries, així com l'aclariment de neutròfils dels llocs inflamats (Henson i Hume, 2006). Els limfòcits Treg s'han vist implicats en el control de les cèl·lules T *in vivo* (Sakaguchi, 2005). Els limfòcits Treg es troben augmentats en l'LPA, així com l'expressió de IL-10 i el TGF- β (Venet *et al.*, 2010). En estudis amb models de LPA s'ha proposat que en el mecanisme de resolució d'aquesta patologia intervien les cèl·lules Treg juntament amb la IL-10 i el TGF- β 1 (D'Alessio *et al.*, 2009; Venet *et al.*, 2009; Figura I-8).

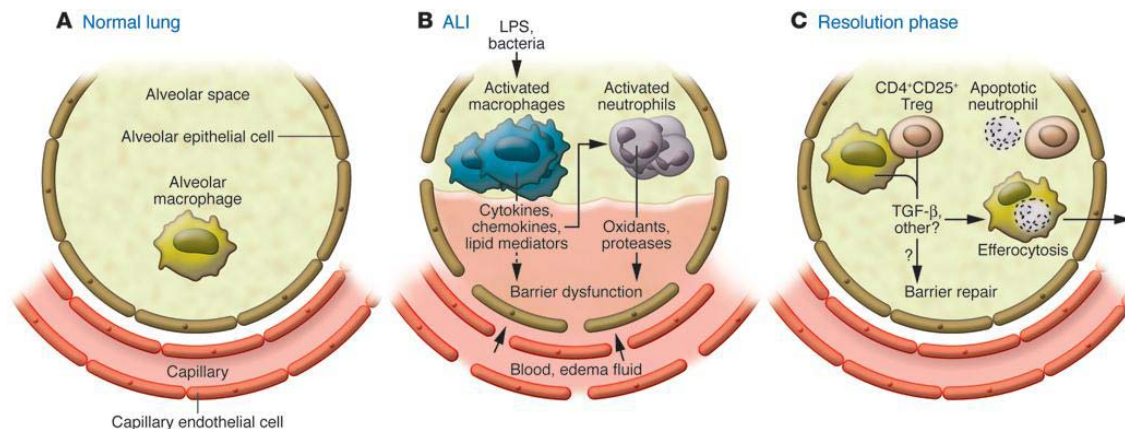


Figura I-8. Possible mecanisme amb el qual les cèl·lules Treg suprimeixen la inflamació en la LPA. (A) Alvèol en estat no patològic, només es troben macròfags. (B) Alvèol després de la inducció d'un estat inflamatori, hi ha un augment de neutròfils i macròfags, així com un increment de mediadors inflamatoris que causen lesió i edema. (C) Alvèol on els limfòcits Treg produeixen l'apoptosi i lisi dels neutròfils, i la producció de TGF- β actua a nivell de macròfags (Pietroparoli i Geodas, 2009).

4.3. LIPOPOLISÀCARID

L'LPS o endotoxina és el major component de la superfície de les bacteries gramnegatives. Està localitzat a la membrana externa de la coberta cel·lular bacteriana i juga un paper molt important en la patogènesis de les infeccions bacterianes, així com en la interacció amb l'hoste i el seu sistema de defensa. Consisteix en un heteropolisacàrid fosforilat unit a un lípid de la membrana externa que conté glucosamina, el lípid A (Figura I-9). La porció del polisacàrid que sobresurt de la membrana externa està

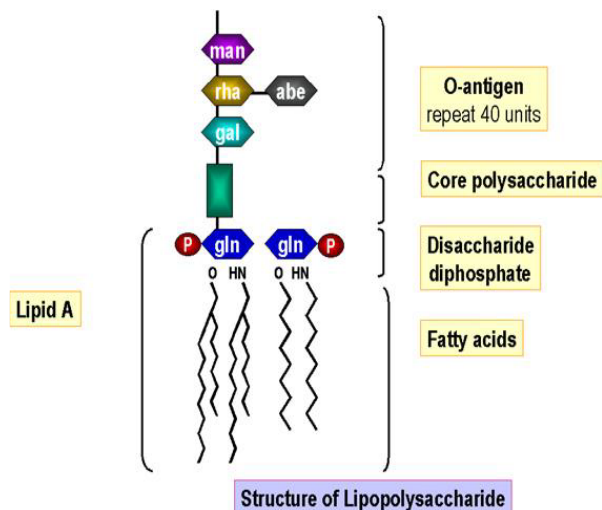


Figura I-9. Estructura de l'LPS.

dividida en dos regions principals: una regió interna o central (nucli o *Core*) i una porció externa anomenada cadena O (antigen O o polisacàrid O). La cadena O constitueix la porció immunodominant de la molècula, i la classificació serològica de la família *Enterobacteriaceae* la determina l'estructura d'aquesta regió (Davis, 1990). L'LPS endotòxic més actiu és de l'*E. Coli*-tipus A, i s'ha demostrat que constitueix el "principi endotòxic" de l'LPS (Rietschel *et al.*, 1996). Molts dels efectes biològics de l'LPS són deguts al cap del lípid A (Schrohm *et al.*, 2000), tot i que la magnitud de la resposta depèn de la presència o absència dels oligosacàrids O de l'antigen (Komuro *et al.*, 1989). El domini del lípid A de l'LPS és un potent activador dels macròfags i els leucòcits. També induïx a aquelles cèl·lules, que produeixen i alliberen citocines i radicals d'oxigen, a contribuir a la fisiopatologia del dany produït per l'LPS. S'ha demostrat que el CD14 és el receptor pel complex LPS/LPS-*binding protein* i és responsable dels senyals transmembrana.

El receptor TLR-4 és el principal component de superfície dels mamífers, involucrat en la resposta a l'LPS (Figura I-10). El TLR-4 no s'uneix directament a l'LPS. Quan l'LPS s'allibera de la superfície bacteriana, com succeeix durant la fagocitosis, és captat pel receptor de LPS, el CD14 present en la superfície dels macròfags.

Alternativament, l'LPS captat en el plasma per l'LPS-*binding protein* soluble és entregat al CD14. El dímer de TLR-4 i una altra proteïna anomenada MD-2 s'associa amb el complex de CD14 i a l'LPS per generar les senyals intracel·lulars a través del domini de senyalització citoplasmàtic del TLR-4.

Entre les citocines alliberades pel macròfag en resposta a aquestes senyals es troba el TNF- α . Un alliberament massiu de TNF- α indueix xoc sèptic. El resultat més greu de l'LPS és la sèpsia o infecció del torrent sanguini.

El TLR-4 desencadena una via de senyalització intracel·lular, en aquesta via participa una proteïna captadora anomenada MyD88 i el complex de la quinasa associada amb el receptor de interleucina-1. La seva acció condueix a la translocació del factor de transcripció conegut com factor nuclear κ B (NF κ B) del citoplasma al nucli, on dirigeix la transcripció de gens per la producció de citocines inflamatòries.

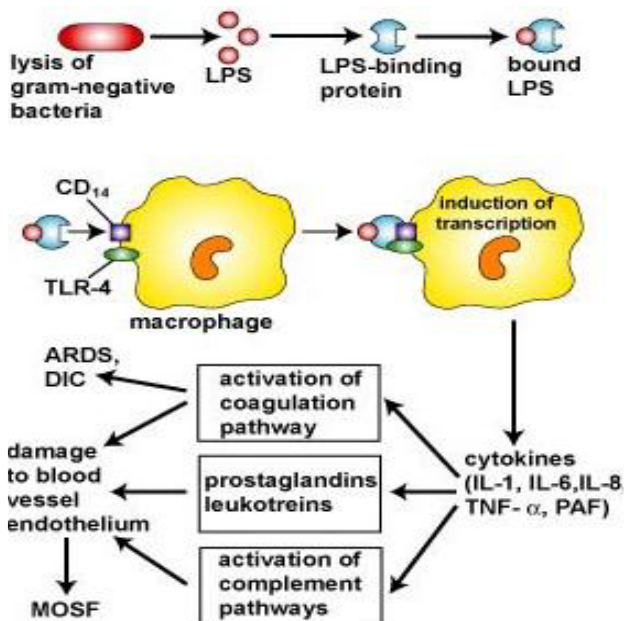


Figura I-10. Accions fisiològiques de l'LPS. LPS s'uneix a la proteïna d'unió LPS (LPS-binding protein), i interacciona amb el receptor TLR4, mitjançant el clúster de diferenciació CD₁₄. S'inicia la transcripció de mediadors, com les citocines.

BALT en la resposta pulmonar a l'exposició d'endotoxines

L'LPS a través del receptor TLR4 desencadena l'activació, la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules B en el BALT, per tal de secretar anticossos (Moore *et al.*, 2001). També activa els macròfags, les DCs, les cèl·lules epitelials i també els fibroblast per produir citocines i quimiocines (Kawai *et al.*, 2001). L'endotoxina està en el medi ambient i una l'exposició perllongada de LPS està associada amb el desenvolupament o empitjorament de l'asma (Murakami *et al.*, 2007), de la bronquitis i la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC; Mizutani *et al.*, 2009). Experimentalment, l'exposició pulmonar a l'endotoxina en rates comporta l'expansió del BALT preexistent i incrementa les cèl·lules plasmàtiques pulmonars i finalment la formació de centres germinals (Van der Brugge-Gamelkoorn *et al.*, 1985). Donat que els centres germinals són dependents de les cèl·lules T, l'LPS en aquest cas probablement actua activant les DCs, les quals migren de les vies aèries al BALT i prepara les cèl·lules B i T als antígens ambientals.

5. DIETA I SALUT ANIMAL

5.1. MALALTIES RESPIRATÒRIES ASSOCIADES AL DESLLETAMENT DE PORCS

La síndrome reproductiu i respiratori porcí (PRRS; *Porcine Respiratory Reproductive Syndrome*), una de les infeccions respiratòries més importants, causa a la indústria agroalimentària unes pèrdues de 560 milions de \$ anuals només en els EUA (Neumann *et al.*, 2005). En tot Europa una pràctica normal que es fa es deslleta els porcs més aviat, aquest fet incrementa la susceptibilitat a les infeccions (Lallès *et al.*, 2007).

El període de deslletament és un període de transició durant el qual els porcs són separats de la mare, es mesclen amb altres porcs en un nou ambient, i passen d'una alimentació líquida (molt digerible) a una alimentació sòlida més complexa. El deslletament en edats primerenques (21-35 d), com es fa en els sistemes de cria intensiva, ha augmentat el nivell general d'estrès en aquests animals immadurs, i per tant en el període post-deslletament poden aparèixer malalties respiratòries, com són el PRRS, el coronavirus respiratori porcí (PRCV; *Porcine Respiratory Corona Virus*), el virus de la grip porcina, el virus de la malaltia Aujeszky, l'*Actinobacillus pleuropneumoniae* i el *Mycoplasma hypopneumoniae* juntament amb la *Pasteurella multocida* que envaeixen els pulmons lesionats. Els quadres clínics sovint no estan clars. Alguns dels microorganismes utilitzen mecanismes eficaços que eludeixen les defenses de l'animal. En el cas del virus PRRS, aquest redueix la capacitat dels macròfags alveolars per fagocitar i destruir bacterïes, i redueix la capacitat dels macròfags intravasculars a eliminar bacterïes de la sang. *M. hypopneumoniae* i el propi *A. pleuropneumoniae* també redueixen la capacitat dels macròfags per realitzar les seves funcions. En les últimes dècades ha aparegut una nova patologia que afecta als porcs entre 5 i 12 setmanes d'edat, i que es coneix com "Síndrome de Desmedro" o PMWS (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*). Aquesta patologia està causada pel circovirus porcí tipus 2 (PCV-2; *Porcine Circovirus*), que produeix una mortalitat del 15-20% de les cries i els signes clínics són pèrdua de pes i inflamació pulmonar, entre d'altres (Gauger *et al.*, 2011).

L'origen i les causes de les malalties respiratòries actuals en els porcs és possible que tinguin més a veure amb els canvis en els sistemes de producció, que han experimentat moltes de les explotacions porcines en els últims anys, que no l'aparició de nous patògens. L'estat immunitari dels porcs, a nivell de grup o individual, es veu afectat i l'epidemiologia i transmissió de les infeccions dins de la població són més difícils de predir i controlar.

En moltes granges de producció ramadera s'havien utilitzat substituïts de la llet per alimentar els vedells i els porcells, la major part dels quals contenien antibiòtics, habitualment neomicina i oxitetraciclina (Heinrichs *et al.*, 1995; Verstegen i Williams, 2002). 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. S'aconseguia disminuir les infeccions intestinals i pulmonars en els porcs deslletats en edats joves. 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; Heuer *et al.*, 2006).

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 prohibia l'ús de qualsevol antibiòtic com a estimulador del creixement en animals. Per tant, el consell europeu de ministres de sanitat, juntament amb l'FDA (Food & Drug Administration) nord-americana, recomanen emprar productes alternatius, sempre que sigui possible.

5.2. ALTERNATIVES A L'ÚS D'ANTIBIÒTICS

Fruit d'aquesta prohibició s'han avaluat diferents productes com a possibles alternatives a l'ús d'antibiòtics en la formulació dels substituïts de la llet, que disminueixin les infeccions a nivell pulmonar. Alguns d'ells són els polifenols, els fructooligosacàrids (prebiòtics), els probiòtics i les proteïnes plasmàtiques.

Els **polifenols** s'han estudiat àmpliament en les malalties pulmonars inflamatòries agudes amb resultats beneficiosos, sobretot en la cultura asiàtica, on gran varietat de plantes són utilitzades per pal·liar les malalties més freqüents. Alguns dels polifenols estudiats són l'licariin, principal component actiu de les plantes del gènere *Epimedium* (Xu *et al.*, 2010) o el licorice present en l'arrel de *Glycyrrhiza uralensis* (Xie *et al.*, 2009). En el món occidental també s'ha estudiat l'efecte del licopè, un caroteinode amb propietats antioxidants (Hazlewood *et al.*, 2010) o el taxol, un extracte utilitzat per tractar el càncer (Mirzapozova *et al.*, 2007), entre d'altres.

S'ha observat que els **fructooligosacàrids** (prebiòtics) estimulen el creixement de bacteries beneficiosos per al tracte gastrointestinal (com per exemple els *Bifidobacterium*) i inhibeixen la colonització de microorganismes patògens (Menne *et al.*, 2000; Firmansyah *et al.*, 2011). En estudis recents s'ha vist que la suplementació dietètica amb fructooligosacàrids pot atenuar o prevenir la inflamació en infeccions i al·lèrgies pulmonars en ratolí (Yin *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2010).

El consum de **probiòtics** en el període de deslletament té com a principal efecte l'exclusió de bacteries patògenes. Aquest efecte podria ser resultat de la influència positiva en el balanç de la microbiota intestinal, la integritat de l'epiteli i una apropiada maduració del teixit intestinal (Krause *et al.*, 2010). Certes bacteries productores d'àcid làctic poden estimular les cèl·lules T reguladores del GALT que posteriorment arriben al teixit pulmonar en resposta a canvis immunològics i inflamatoris (Forsythe, 2011). L'ús de probiòtics s'ha demostrat efectiu per disminuir la inflamació al·lèrgica pulmonar en ratolins (Forsythe *et al.*, 2007), així com també redueix la bronquitis i la severitat d'una inflamació pulmonar produïda per *Streptococcus pneumoniae* (Tanaka *et al.*, 2011).

Les **proteïnes plasmàtiques** han estat àmpliament reconegudes com a ingredients funcionals 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'SDP (*Spray-Dried Plasma*). Quan es comparen els animals suplementats amb SDP amb els que reben 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.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2008). Torrallardona *et al.* (2003) observa que els efectes de la suplementació amb 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). A nivell pulmonar els suplementats amb proteïnes plasmàtiques s'han estudiat en galls d'indi (Campbell *et al.*, 2004), on s'observa que les aus que han consumit SDP presenten una mortalitat menor degut a la infecció per *Pasteurella multocida*.

5.3. SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB CONCENTRAT DE PROTEÏNES PLASMÀTIQUES

L'SDP s'obté de la sang procedent dels escorxadors i prové d'animals sans destinats al consum humà. En aquesta sang, un cop obtinguda se li afegeix anticoagulant, normalment citrat sòdic, i es centrifuga per eliminar els eritròcits. Així s'obté el plasma que posteriorment és assecat per polvorització i aquesta pols s'utilitza per a la suplementació del pinso (Russell i Weaver, 1996; Coffey i Cromwell, 2001). L'SDP està constituït per un 78% de proteïna, de la qual, aproximadament un 50% és albúmina, un 25% és globulina –(incloent α -, β - i γ -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 especulat que la fracció IgG es responsable de l'efecte de l'SDP (Van Dijk *et al.*, 2001), però s'han identificat més de 250 pèptids en el plasma (Anderson i Anderson, 2002). Moltes proteïnes de l'SDP han mostrat funcions biològiques (Borg *et al.*, 2002). Malgrat que sembla evident que la fracció IgG contribueix als efectes de l'SDP, també poden haver altres components del plasma que contribueixin a la resposta que se li ha atribuït al consum oral de l'SDP. El concentrat d'immunoglobulines (IC; *Immunoglobulin concentrate*), està format per la fracció d'immunoglobulines, conté aproximadament un 50% d'IgG i l'SDP conté un 15% d'IgG. Les immunoglobulines són bastant resistents a la digestió, i per tant funcionals al ser consumides.

S'ha observat 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. De fet, Gatnau *et al.* (1989) van veure que les immunoglobulines de l'SDP són absorbides des de la llum intestinal al torrent sanguini en porcs acabats de néixer i privats del calostre. Nollet *et al.* (1999) van observar que les immunoglobulines administrades per via oral a animals estabulats tenien un efecte protector davant la inoculació de bacteries per la mateixa via. Sánchez *et al.* (1993) exposen que les glicoproteïnes també poden estar implicades en la capacitat d'inhibir l'adherència bacteriana de l'SDP, ja que la desnaturalització per calor, la digestió proteolítica i l'eliminació dels anticossos del plasma no afecten aquesta capacitat inhibidora. En un altre estudi (Mouricot *et al.*, 1990) es 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.

S'ha vist que els vedells que s'alimenten amb pinso suplementat amb SDP presenten una mortalitat molt inferior als que no reben dietes suplementades (Morrill *et al.*, 1995; Bhandari *et*

al., 2008). En alguns estudis aquesta mortalitat està reduïda gairebé un 30% (Quigley i Wolfe, 2003). Markowska-Daniel *et al.* (2003), a més de la reducció en la mortalitat i la morbiditat i la millora del creixement, també han observat un increment en el nombre de limfòcits T, concretament en la subpoblació CD8⁺. Altres canvis que s'han vist han estat que els porcs alimentats amb SDP presenten una davallada de l'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-1 β) a l'hipotàlem, a la hipòfisi i a les glàndules suprarenals, així com a la melsa, el timus i el fetge (Touchette *et al.*, 2002). Aquests resultats demostren que porcs alimentats amb SDP presenten un menor grau d'activació de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal. Aquest eix està molt vinculat a l'activació del sistema immunitari (Carroll *et al.*, 2002).

La suplementació amb proteïnes plasmàtiques incrementa la ingesta de pinso i el pes dels animals (Coffey i Cromwell, 1995; De Rodas *et al.*, 1995; Kojima *et al.*, 2007) i també el desenvolupament intestinal (Touchette *et al.*, 1997) en porcs alimentats amb SDP.

Un punt on diferents treballs entren en conflicte és si l'SDP 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. D'altra banda, s'ha demostrat que porcs alimentats amb SDP milloren la morfologia intestinal i l'activitat enzimàtica, que s'evidencia amb un increment de l'àrea de la superfície de les vellositats (Gatnau *et al.*, 1995), l'alçada de les vellositats i una major pilositat per cripta (Touchette *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997) i un increment de l'activitat mucosal de la maltasa i la lactasa (Gatnau *et al.*, 1995). Altres autors no han pogut demostrar que l'alimentació amb SDP millori la proliferació de les cèl·lules de la cripta, la profunditat de la cripta o l'alçada de la vellositat (Jiang *et al.*, 2000; Van Dijk *et al.*, 2001, 2002). De fet, Bosi *et al.* (2004) suggereixen que l'SDP afecta l'estructura de la vellositat i la cripta només quan la integritat de la barrera intestinal es troba compromesa. En un recent estudi es demostren efectes beneficiosos de l'SDP sobre la integritat de la barrera intestinal, la inflamació mucosal i la diarrea en el període post-deslletament en porcs (Peace *et al.*, 2011).

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'SDP 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). En aquest mateix article es veu

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. Està descrit que l'SDP té efectes positius en el creixement i l'estat de salut en vedelles, gossos, pollastres i pollets (Quigley i Wolfe, 2003; Quigley *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2010).

S'han fet nombrosos estudis de l'eficàcia dels suplementos en porcs (Quigley i Drew, 2000; Torrallardona *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2008) on disminueixen la gravetat de les infeccions intestinals. En estudis en rates s'ha demostrat que les dietes suplementades amb proteïnes de plasma afecten la resposta immunitària, prevenint l'activació del GALT i dels mediadors inflamatoris de l'intestí en un model d'inflamació per l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (Pérez-Bosque *et al.*, 2004; 2008; 2010).

L'efecte de l'SDP és clarament superior en porcs criats en un entorn amb una càrrega patològica 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).

A nivell d'infeccions pulmonars els suplementos amb proteïnes de plasma estan poc estudiats. L'SDP s'ha estudiat en processos pulmonars en galls d'indi, on aquest en millora la supervivència i la recuperació durant una infecció pulmonar per *Pasteurella multocida* (Campbell *et al.*, 2004).

II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS

Les proteïnes plasmàtiques d'origen boví i porcí han estat àmpliament utilitzades com a ingredients alimentaris d'alta qualitat per als animals de granja. El suplement de plasma obtingut per polvorització (SDP) i el concentrat d'immunoglobulines (IC) han estat proposats com alternativa a l'ús dels antibiòtics com a promotors del creixement (Coffey i Cromwell, 1995). Quan es comparen els efectes sobre la salut dels suplementes de plasma amb l'efecte dels antibiòtics, s'observa que les taxes de creixement i l'eficiència de conversió del pinso consumit són similars (Torrallardona *et al.*, 2002). Durant el període posterior al deslletament hi ha un increment dels desordres intestinals i de les infeccions respiratòries, com la síndrome reproductiva i respiratòria porcina (PRRS), que són causa de grans pèrdues econòmiques (Neumann *et al.*, 2005).

L'eficàcia dels suplementes plasmàtics en els desordres intestinals ha estat molt estudiada. S'ha vist que disminueixen la gravetat de les infeccions intestinals en porcs (Quigley i Drew, 2000; Torrallardona *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2008) i en un model d'inflamació intestinal en rata, s'ha demostrat que la suplementació amb SDP i IC protegeix la mucosa intestinal d'una sobreestimulació immunitària (Pérez-Bosque *et al.*, 2004, 2006). També s'ha observat que l'SDP millora la supervivència de galls d'indi que pateixen una infecció pulmonar per *Pasteurella multocida* (Campbell *et al.*, 2004).

En vista dels efectes observats pels suplementes dietètics tant a nivell intestinal com pulmonar, i coneixent que el sistema immunitari mucosal comú connecta totes les mucoses de l'organisme, ens vam plantejar estudiar l'efecte de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària en un model d'inflamació pulmonar. Per tant, el primer objectiu va ser:

- ✓ Establir la pauta adequada per obtenir un **model d'inflamació pulmonar aguda en ratolí**.

La lesió pulmonar aguda és una síndrome associada a la disfunció respiratòria sovint causada per microorganismes patògens. Aquests agents provoquen una inflamació pulmonar, caracteritzada pel reclutament de leucòcits i lesions a l'endoteli vascular i l'epiteli alveolar que incrementen la permeabilitat dels capil·lars alveolars (Strieter *et al.*, 1999). El sistema immunitari innat representa la primera línia de defensa front els patògens. Els macròfags alveolars i els neutròfils són les primeres cèl·lules que interactuen amb els patògens invasors i les seves toxines. Aquestes cèl·lules produeixen com a resposta, mediadors proinflamatoris, incloent citocines i quimiocines, espècies reactives d'oxigen i pèptids antimicrobians, que participen en la defensa de l'hoste (Abraham *et al.*, 2000; Koay *et al.*, 2002). Un vegada es va obtenir un model d'inflamació

representatiu i reproduïble de la inflamació pulmonar aguda, el segon objectiu que ens vam plantejar va ser:

- ✓ Estudiar l'efecte del SDP i de la fracció IC sobre la modulació de la **resposta immunitària innata** en el model d'inflamació pulmonar aguda induïda mitjançant la inhalació d'un lipopolisacàrid.

La resposta adaptativa humoral i cel·lular, confereix a l'hoste una resposta immunitària específica mitjançant els limfòcits i les citocines. Segons el patogen es desenvolupa un tipus o altre de resposta (limfòcits Th1 o limfòcits Th2). La implicació dels mediadors reguladors, limfòcits i citocines antiinflamatòries, és molt important per entendre el desenvolupament i la resolució de la resposta inflamatòria. Aquests mediadors suprimeixen l'activació del sistema immunitari, i per tant són importants en la finalització i el control de la resposta immunitària. Per tal d'aprofundir més en la resposta pulmonar aguda i en els mecanismes reguladors que poden intervenir en la fase de reparació, el tercer objectiu de la tesi va ser:

- ✓ Estudiar l'efecte de l'SDP i de la fracció IC en la modulació de la **resposta immunitària adquirida** en el model d'inflamació pulmonar aguda induït pel lipopolisacàrid, així com determinar quins **mediadors reguladors** i **antiinflamatoris** hi estan implicats.