

IV. Resultats

1. POSTA A PUNT DEL MODEL D'INFLAMACIÓ

Per posar a punt el model s'han realitzat 3 experiments, on s'han assajat diferents dosis i pautes d'administració de l'enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB; vegeu figura III-1 de Materials i mètodes). En el primer experiment s'ha administrat una única dosi de la toxina (50 µg de SEB/animal). En el segon disseny s'ha duplicat la quantitat de SEB administrada i s'han provat dues pautes: en l'una s'ha administrat una dosi de 100 µg de SEB i, en l'altre, s'han donat dues dosis de 50 µg SEB separades 6 dies. Finalment, en el tercer experiment s'han administrat dues dosis de 50 µg SEB a dos intervals diferents (separades 3 ó 4 dies). En tots els casos s'ha mesurat el contingut d'aigua en femtes i l'activitat mieloperoxidasa mucosal com a indicador d'infiltració de neutròfils a la mucosa intestinal. Abans de la posta a punt del model d'inflamació pròpiament dit, s'han realitzat uns experiments preliminars per tal d'assegurar que la quantificació de la mieloperoxidasa és fiable i reproduïble.

1.1. EXPERIMENTS PRELIMINARS

En aquests experiments preliminars s'ha assajat la reproductibilitat de la quantificació de l'enzim mieloperoxidasa (MPO) que hi ha a la mucosa intestinal. Aquesta reproductibilitat s'ha analitzat tant del procés d'extracció de l'enzim com de la posterior determinació de la seva activitat.

VALIDACIÓ DE L'EXTRACCIÓ

El procés d'extracció s'ha avaluat en mostres de mucosa intestinal obtingudes d'animals sans. Per a l'assaig de l'extracció s'ha seguit el procediment descrit a Materials i mètodes (vegeu apartat 2.1.1.1.) amb l'única diferència que després de la primera homogeneïtzació, la mostra s'ha dividit en tres parts iguals. A partir d'aquest punt s'ha continuat el procés d'extracció de la mieloperoxidasa de les 3 mostres de forma paral·lela.

Les tres mostres extretes i quantificades en paral·lel han donat valors similars: 1,53, 1,58 i 1,50 UMPO/g de mucosa (UMPO: unitats de mieloperoxidasa), fet que demostra que l'extracció de la mieloperoxidasa de mucosa intestinal és reproduïble.

VALIDACIÓ DE LA DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

En aquest experiment preliminar també s'ha inclòs un assaig de la linealitat de la determinació espectrofotomètrica de l'activitat mieloperoxidasa. Amb aquest assaig s'ha pretès valorar si amb la sembra de diferents quantitats dels sobrenedants (50–100–150–200 μL ; SN-2 o SN-3), els valors d'increment d'absorbància es comporten de forma lineal. En cada cas s'ha corregit el volum de tampó per a mantenir un volum final de 1,5 mL, sense variar les quantitats afegides dels altres reactius.

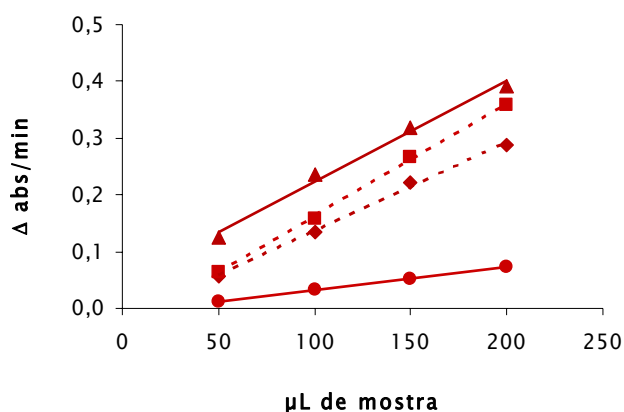


Figura IV-1. Assaig de linealitat de la determinació de mieloperoxidasa. Increment de densitat òptica en funció de la quantitat de la mostra sembrada. Cada línia correspon a un animal diferent.

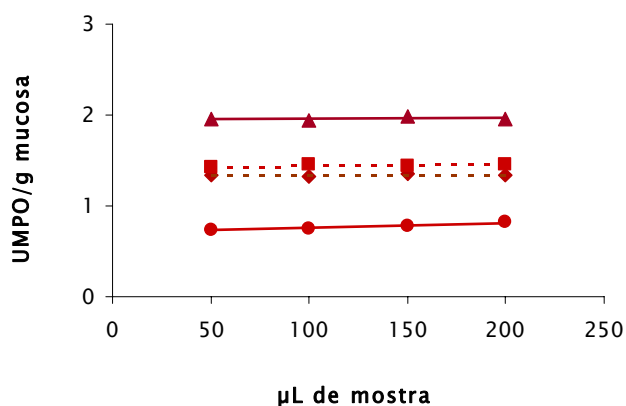


Figura IV-2. Assaig de linealitat de la determinació de mieloperoxidasa. Activitat està expressada com a unitats d'aquest enzim per g de mucosa intestinal (UMPO/g de mucosa). Els resultats corresponen als animals de la figura anterior.

Tal com es pot veure a la figura IV-1, els increments d'absorbància augmenten de forma lineal en funció de la quantitat de mostra. Això indica que el comportament de la mostra és lineal entre 50 μL i 200 μL .

Quan aquests increments es transformen en unitats d'enzim i es normalitzen pel pes humit de mucosa (UMPO/g de mucosa; Figura IV-2), en els quatre assaigs corresponents a cada animal s'obtenen valors de UMPO similars.

1.2. EXPERIMENT 1

Una vegada s'ha comprovat que el procediment d'extracció i de determinació de la mieloperoxidasa és reproduïble s'ha iniciat la posta punt del model d'inflamació. En una primera aproximació s'ha assajat una dosi de 50 µg de SEB i s'han sacrificat animals a dos temps: 12 h i 24 h.

CONTINGUT D'AIGUA EN FEMTES

Els valors de percentatge d'aigua en femtes dels animals que han estat administrats amb 50 µg de SEB no difereixen dels valors dels animals Control en cap dels temps analitzats. El contingut d'aigua en femtes dels animals Control és aproximadament del 55%, tal com es mostra en la figura IV-3.

Els animals que han estat administrats amb SEB mostren una tendència a incrementar el contingut d'aigua en femtes a les 24 h. Els animals SEB presenten un $66,4 \pm 3,59\%$ d'aigua en femtes, mentre que els animals Control al mateix temps tenen un $55,8 \pm 3,36\%$ d'aigua ($P=0,077$).

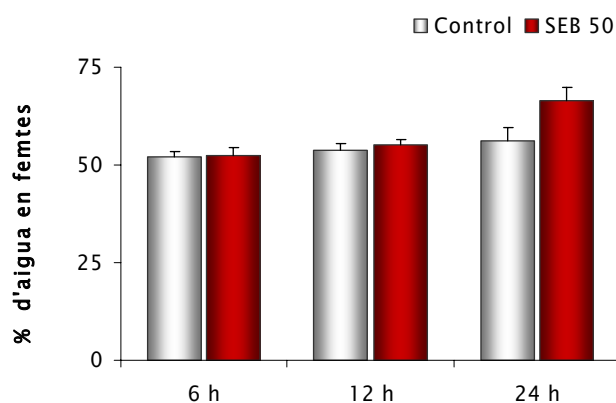


Figura IV-3. Contingut d'aigua en femtes d'animals tractats amb 50 µg de SEB. Les femtes han estat recollides a les 6, 12 i 24 h després de l'administració del SEB. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 4 animals).

ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

En animals Control s'obté un valor de $1,6 \pm 0,49$ UMPO/g mucosa (Figura IV-4). El tractament amb 50 µg de SEB no modifica significativament aquest valor ni a les 12 h ni a les 24 h després de l'administració.

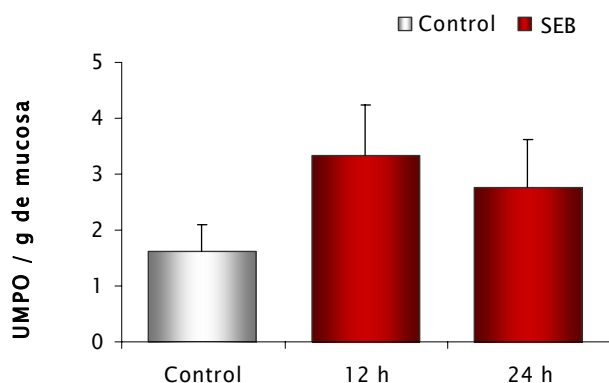


Figura IV-4. Activitat mieloperoxidasa a mucosa de jejú d'animals tractats amb 50 µg de SEB. L'activitat està expressada com a unitats d'enzim per g de mucosa (UMPO/g mucosa). Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 4 animals).

1.3. EXPERIMENT 2

En vista d'aquests resultats s'ha decidit doblar la quantitat de SEB administrada. Aquest increment s'ha aplicat en dues pautes diferents: en l'una el SEB ha estat administrat en dues dosis de 50 µg separades 6 dies i en l'altre s'ha realitzat una única administració de 100 µg de SEB. Respecte als temps de sacrifici s'han mantingut els mateixos que en l'experiment anterior (12 h o 24 h).

CONTINGUT D'AIGUA EN FEMTES

El grau d'hidratació de les femtes abans d'administrar-se l'enterotoxina és similar en ambdues pautes d'administració, amb valors propers als obtinguts en els animals control (Figura IV-5). En canvi, a les 12 h de l'administració, els animals tractats amb la doble dosi presenten un percentatge d'aigua en femtes ($66,8 \pm 3,05\%$) superior al dels animals no tractats ($54,5 \pm 1,53\%$; $P < 0,02$).

Les rates que han rebut la dosi única de 100 µg només mostren una tendència a incrementar el seu contingut d'aigua en femtes ($63,1 \pm 2,85\%$; $P = 0,068$), al cap de 12 h de l'administració. A les 24 h després d'haver injectat l'enterotoxina, el comportament d'aquests animals ha estat més variable, amb la qual cosa no s'han pogut extreure conclusions.

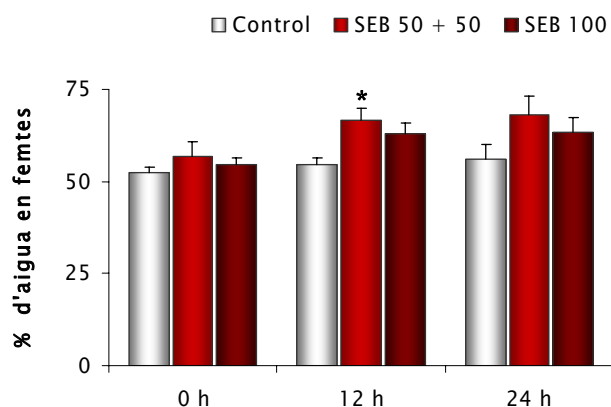


Figura IV-5. Contingut d'aigua en femtes d'animals tractats amb doble administració de 50 µg de SEB o amb administració única de 100 µg de SEB. Les dosis assajades són: doble administració de 50 µg de SEB o administració única de 100 µg de SEB. Les femtes s'han recollit a les 6, 12 i 24 h després de l'administració de SEB. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 4-8 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

L'activitat mieloperoxidasa de la mucosa intestinal presenta un patró de comportament diferent en funció de si s'ha realitzat una doble administració o una administració única, malgrat que la quantitat d'enterotoxina total administrada sigui igual en ambdós casos (Figura IV-6). En el cas de la doble administració hi ha més activitat mieloperoxidasa a les 24 h de la segona dosi que a les 12 h ($P < 0,02$). En canvi, en el cas de dosi única no hi ha diferències significatives entre els dos temps de sacrifici dels animals.

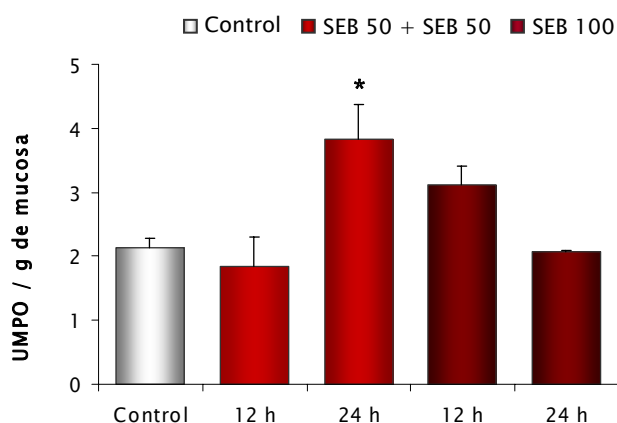


Figura IV-6. Activitat mieloperoxidasa a mucosa de jejú d'animals tractats amb doble administració de 50 µg de SEB o amb administració única de 100 µg de SEB. L'activitat està expressada en unitats d'enzim per g de mucosa (UMPO/g mucosa). Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 4 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Tal com es mostra en la figura IV-6, a les 12 h de la segona administració de SEB, encara no hi ha efecte sobre l'activitat mieloperoxidasa. En canvi, si que incrementa al cap de 24 h d'haver-se administrat la segona dosi de SEB ($3,83 \pm 0,55$ UMPO/g de mucosa en els animals tractats, respecte $2,14 \pm 0,14$ UMPO/g de mucosa en animals control; $P < 0,05$). La

dosi de 100 µg de SEB no incrementa significativament l'activitat mieloperoxidasa en cap dels temps estudiats.

1.4. EXPERIMENT 3

Els resultats anteriors han demostrat que és més efectiva una doble administració de 50 µg de SEB que una dosi única de 100 µg, pel que fa referència a increments en l'activitat mieloperoxidasa i en el contingut d'aigua en femtes. A partir d'aquest punt s'ha continuat amb la doble administració, i s'han assajat dos intervals de temps diferents entre les dues dosis. Aquests intervals han estat de 3 ó 4 dies. Com que en l'apartat anterior s'ha vist que l'activitat mieloperoxidasa és superior a les 24 h que a les 12 h de sacrifici, s'ha decidit allargar l'estudi fins a les 48 h. En aquests animals, a més, s'ha fet un seguiment de l'evolució del pes corporal i del consum de pinso.

EVOLUCIÓ DEL PES I DEL CONSUM DE PINSO

El pes corporal dels animals Control el dia del deslletament ha estat de $45 \pm 0,56$ g (Figura IV-7). L'evolució del pes és similar en tots els grups, i el creixement no s'altera en cap de les pautes d'administració de l'enterotoxina.

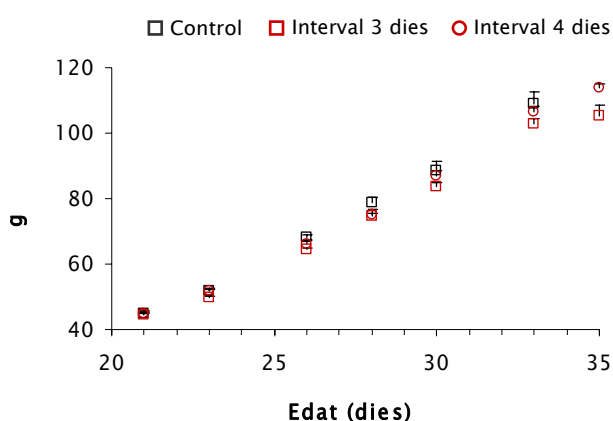


Figura IV-7. Evolució del pes en animals tractats amb una doble administració de SEB en dos intervals diferents. Les pautes d'administració assajades són doble dosi de 50 µg de SEB, separades 3 ó 4 dies. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 4 animals).

La ingesta diària de pinso en els animals control és aproximadament de 5 g per rata fins al dia 5 després del deslletament (dia 26 de vida; Figura IV-8). A partir d'aquesta edat i fins al final del període experimental, el consum per animal ha estat d'uns 10-11 g/dia. Cap de les pautes d'administració de SEB modifica el pinso consumit diàriament.

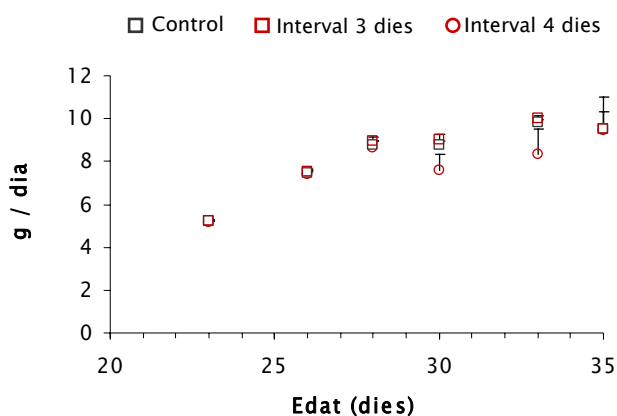


Figura IV-8. Evolució del consum de pinso en animals tractats amb una doble administració de SEB en dos intervals diferents. Consum de pinso d'animals control (administrats amb PBS) i tractats. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 4 animals).

CONTINGUT D'AIGUA EN FEMTES

El contingut d'aigua en femtes presenta un patró diferent en funció de si la separació entre les dues dosis és de 3 ó de 4 dies. Quan les dues dosis es separen 4 dies, hi ha un increment en el contingut d'aigua en femtes a les 12 h de la segona administració respecte als animals control ($62,9 \pm 2,5\%$ respecte $53,2 \pm 1,3\%$; $P < 0,05$; Figura IV-9). En canvi, quan les dues dosis de $50 \mu\text{g}$ de SEB es separen 3 dies, l'increment del contingut d'aigua en les femtes es fa més evident a les 24 h de la segona administració, amb un valor de $66,9 \pm 4,7\%$, mentre que els animals Control mostren valors de $56,7 \pm 2,4\%$, $P < 0,05$. Tal com es pot veure a la figura IV-9, el contingut hídic de les femtes en el moment d'administrar la segona dosi és similar en els tres grups experimentals, sense que aquesta variable sigui afectada per la primera dosi de l'enterotoxina.

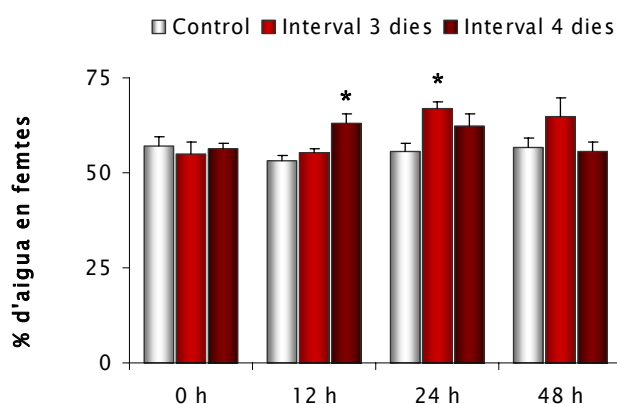


Figura IV-9. Contingut d'aigua en femtes en animals tractats amb una doble administració de SEB en dos intervals diferents. La pauta assajada és doble dosi de $50 \mu\text{g}$ de SEB, separades 3 ó 4 dies. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 4 animals). Els temps són hores després de la segona dosi. * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

Tal com es mostra en la figura IV-10, quan les dues dosis de SEB s'han separat 3 dies, l'activitat mieloperoxidasa a mucosa de jejú és més elevada que en animals sans, tan a les 24 h ($2,1 \pm 0,14$ UMPO/g de mucosa en animals sans respecte $4,9 \pm 0,76$ UMPO/g de mucosa en animals tractats; $P < 0,05$) com a les 48 h després de la segona administració de SEB ($4,8 \pm 0,68$ UMPO/g de mucosa, $P < 0,01$).

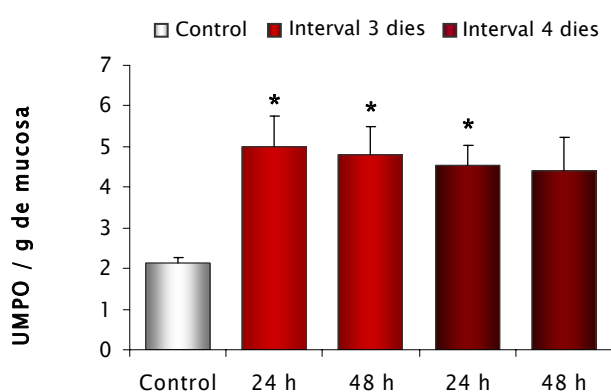


Figura IV-10. Activitat mieloperoxidasa a mucosa de jejú d'animals tractats amb una doble administració de SEB en dos intervals diferents. L'activitat està expressada com a unitats d'enzim per g de mucosa (UMPO/g mucosa). Les pautes assajades són doble dosi de 50 µg de SEB, separades 3 ó 4 dies. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 4 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Quan l'interval de separació entre les dues dosis de SEB és de 4 dies hi ha un increment de l'activitat de la MPO a les 24 h de la segona administració de SEB ($4,5 \pm 0,49$ UMPO/g de mucosa; $P < 0,05$), però en canvi, 48 h després d'aquesta segona dosi el valor que s'obté no és significativament diferent que el dels animals Control.

Davant d'aquests resultats, la resta del treball s'ha dut a terme induint la inflamació mitjançant una doble administració de 50 µg de SEB, amb una separació de 3 dies entre les dues dosis. Els animals han estat sacrificats en la majoria dels casos 48 h després de la segona dosi de SEB.

La inflamació induïda amb l'enterotoxina B de *S. aureus* és lleu ja que, a part que no altera ni l'evolució del pes corporal ni el consum de pinso, tampoc s'obtenen valors excessivament elevats d'activitat MPO, tot i que incrementen més del doble. D'altra banda, hi ha un increment del contingut d'aigua en femtes que no pot arribar a considerar-se una diarrea.

2. EFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB PLASMA ANIMAL I CONCENTRATS D'IMMUNOGLOBULINES SOBRE EL MODEL D'INFLAMACIÓ INTESTINAL

Un cop s'ha establert la pauta d'inducció del procés inflamatori, s'ha passat a desenvolupar l'objectiu principal d'aquest treball que és estudiar els efectes dels suplementes dietètics procedents de plasma animal sobre la inflamació intestinal. Els suplementes testats són concentrat de plasma (SDAP, *Spray-Dried Animal Plasma*) i concentrat d'immunoglobulines (IC, *Immunoglobulin Concentrate*).

Al llarg de tot aquest capítol els grups estan definits de la següent manera: grup Control: animals que han consumit la dieta control i han estat administrats amb PBS estèril (vehicle); grup SEB: animals que han estat alimentats amb la dieta control i han rebut una doble administració de SEB; grup SEB-SDAP: animals que han estat alimentats durant 14 dies amb la dieta suplementada amb SDAP i han estat tractats amb dues dosis de SEB; i grup SEB-IC: animals alimentats amb la dieta suplementada amb IC i tractats amb la doble dosi de SEB.

L'efecte de la doble administració del SEB s'ha analitzat comparant els animals tractats (grup SEB) amb els animals sans (grup Control). Els efectes de la suplementació dietètica s'han estudiat només en animals inflamats; per tant els grups SEB-SDAP i SEB-IC s'han comparat només amb el grup SEB.

2.1. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL I CONSUM DE PINSO

Els animals han consumit pinso experimental des del dia 21 (deslletament) fins al dia 35. Durant aquest període els animals han estat sotmesos a un control de pes i de consum de pinso. La figura IV-11 mostra l'evolució del pes corporal, que no és modificada ni pel tractament amb l'enterotoxina ni per la suplementació dietètica.

El consum diari de pinso de les rates del grup Control és aproximadament 6-8 g/dia durant la primera setmana després del deslletament; durant la segona setmana el consum de pinso és a l'entorn de 10-12 g/dia. El consum de pinso no es modifica pel tractament amb SEB ni per la suplementació dietètica (Figura IV-12). En els grups alimentats amb SDAP o amb IC, el consum estimat d'IgG actives durant el període experimental (14 dies) és a l'entorn de 1,7 g/rata.

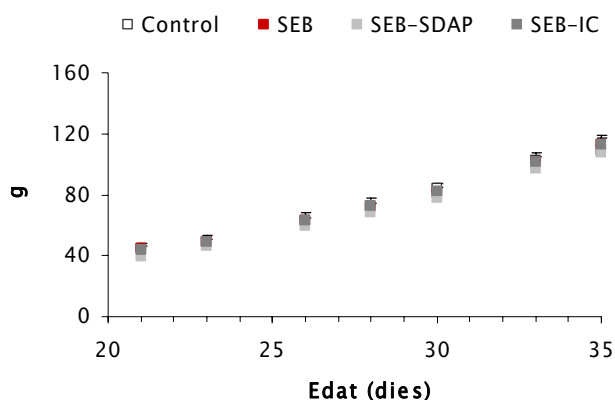


Figura IV-11. Evolució del pes corporal d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. L'evolució del pes s'ha seguit des del dia 21 (deslletament) fins al final del període experimental (14 dies de dieta). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 4-8 animals).

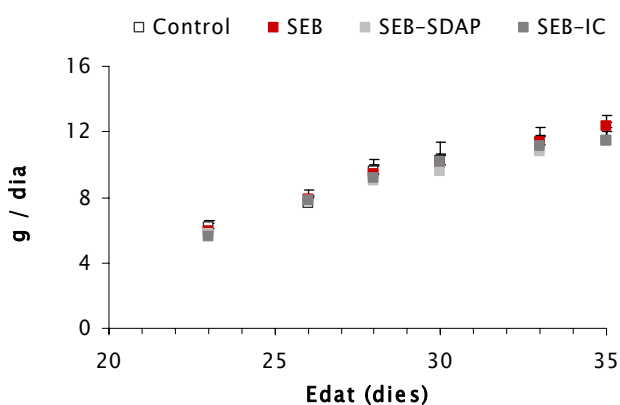


Figura IV-12. Evolució del consum de pinso d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. L'evolució del consum de pinso s'ha seguit des del dia 21 (deslletament) fins al final del període experimental (14 dies de dieta). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 8-12 animals).

2.2. CONTINGUT D'AIGUA EN FEMTES

El contingut d'aigua en femtes s'ha utilitzat com a marcador de l'evolució del procés inflamatori. Les femtes s'han recollit a diferents temps després de la segona dosi de SEB i se n'ha calculat el percentatge d'aigua.

El contingut d'aigua de les femtes just abans de la segona dosi del SEB és aproximament igual en tots els grups, fet que indica que la primera dosi de SEB (administrada el dia 30) no indueix un canvi significatiu de la hidratació fecal. Però, mentre que els animals Control obtenen valors a l'entorn del 56-57% d'aigua en femtes en tots els temps estudiats, els animals SEB obtenen valors de $70,2 \pm 3,2\%$ a les 24 h i $66,5 \pm 4,1\%$ a les 48 h després de la segona dosi de l'agent inflamatori, valors clarament superiors als dels animals sans ($P < 0,05$ en ambdós casos, Figura IV-13).

Aquest increment del percentatge d'aigua observat en els animals inflamats és previngut per la suplementació dietètica amb SDAP en els dos temps estudiats ($52,2 \pm 2,7\%$ a les 24 h i $50,4 \pm 2,1\%$ a les 48 h; $P < 0,01$ i $P < 0,05$, respectivament) i per la suplementació amb IC a les 24 h ($50,6 \pm 1,2\%$; $P < 0,01$).

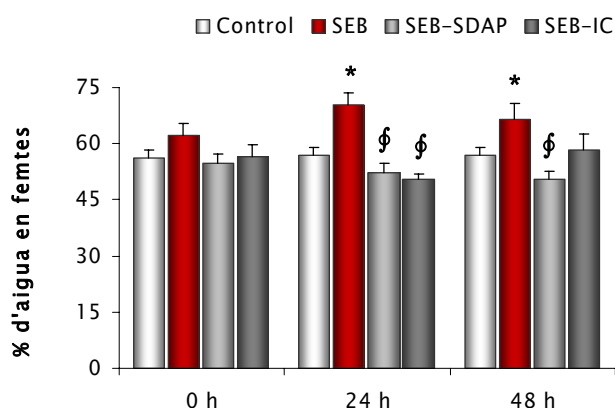


Figura IV-13. Contingut d'aigua en femtes d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard ($n = 8-10$ animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control. $\$P < 0,05$ respecte al grup SEB. El temps són hores després de la segona dosi de SEB.

2.3. ACTIVITAT MIELOPEROXIDASA

Els animals que reben SEB presenten una activitat mieloperoxidasa mucosal incrementada 1,5 vegades respecte l'activitat d'aquest enzim en animals sans ($3,0 \pm 0,41$ UMPO/g de mucosa d'animals amb inflamació intestinal i $2,0 \pm 0,13$ UMPO/g de mucosa en animals sans; $P < 0,05$; Figura IV-14). La suplementació dietètica, ja sigui amb SDAP o amb IC, no evita la infiltració de neutròfils induïda pel SEB.

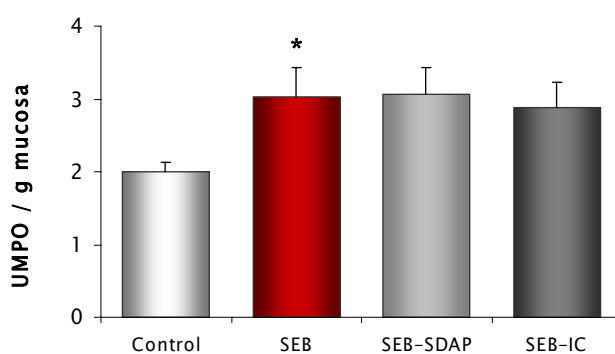


Figura IV-14. Activitat mieloperoxidasa a mucosa de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard ($n = 4-8$ animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

2.4. IMMUNOGLOBULINES A I G EN SÈRUM I IMMUNOGLOBULINA A EN MUCOSA INTESTINAL

La concentració sèrica d'immunoglobulines en el grup Control és de $12,8 \pm 0,9$ $\mu\text{g IgA/mL}$ i 975 ± 79 $\mu\text{g IgG/mL}$ (Taula IV-1). Les concentracions d'IgA i d'IgG no són alterades ni per l'administració de SEB ni per la suplementació dietètica. Finalment, en referència al contingut d'IgA a mucosa intestinal d'animals del grup Control, el valor obtingut és de $17,9 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ de mucosa, sense que s'observin diferències significatives entre els grups estudiats.

Taula IV-1. Contingut d'immunoglobulines A i G a animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

	Control	SEB	SEB-SDAP	SEB-IC
IgA secretada $\mu\text{g/g}$ mucosa	$17,9 \pm 1,2$	$17,1 \pm 1,6$	$19,1 \pm 1,6$	$18,5 \pm 1,5$
IgA sèrica $\mu\text{g/mL}$	$12,8 \pm 0,9$	$13,6 \pm 1,1$	$13,4 \pm 0,8$	$16,3 \pm 1,0$
IgG sèrica $\mu\text{g/mL}$	975 ± 79	1004 ± 63	898 ± 73	985 ± 75

Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n=14-16 animals).

2.5. VARIABLES HEMATOLÒGIQUES

Les variables hematològiques s'han determinat de forma automatitzada en un hemocítometre. El recompte de leucòcits mostra que els animals Control presenten $4,4 \pm 0,52 \cdot 10^9$ leucòcits/L, sense que aquesta variable sigui afectada ni pel tractament amb SEB ni per la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC (Taula IV-2).

El nombre d'eritròcits i el valor de l'hematòcrit ($5,9 \pm 0,16 \cdot 10^{12}/\text{L}$ i $33,0 \pm 0,4\%$, respectivament), tampoc són afectats ni pel SEB ni per cap de les dues suplementacions dietètiques.

La concentració d'hemoglobina ($10,6 \pm 0,2$ g/L), així com l'hemoglobina corpuscular mitjana ($16,7 \pm 0,5$ pg), tampoc està modificada per l'administració de SEB ni per la suplementació dietètica. Tampoc s'altera el volum corpuscular mitjà ($52,8 \pm 0,8$ fL) en cap de les condicions estudiades.

Taula IV-2. Variables hematològiques d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

	Control	SEB	SEB-SDAP	SEB-IC
Leucòcits (10⁹/L)	4,4 ± 0,52	3,6 ± 0,26	3,5 ± 0,27	3,6 ± 0,31
Eritròcits (10¹²/L)	5,9 ± 0,16	5,8 ± 0,20	5,5 ± 0,24	5,9 ± 0,19
Hemoglobina (g/L)	10,6 ± 0,2	9,5 ± 0,6	9,1 ± 0,6	10,0 ± 0,4
Hematòcrit (%)	33,0 ± 0,4	30,7 ± 1,3	29,7 ± 1,4	32,3 ± 1,5
MCV (fL)	52,8 ± 0,8	52,7 ± 1,1	53,8 ± 0,7	53,8 ± 0,3
MCH (pg)	16,7 ± 0,5	16,2 ± 0,7	16,3 ± 0,6	16,9 ± 0,5

Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=10-12 animals). MCV: volum corpuscular mitjà, MCH: hemoglobina corpuscular mitjana.

2.6. POBLACIONS LIMFOCITÀRIES

POBLACIONS LIMFOCITÀRIES DE LES PLAQUES DE PEYER

La viabilitat dels limfòcits s'ha calculat per a cada aïllament i en tots els casos s'han obtingut valors a l'entorn del 95%. En la figura IV-15 es mostra una finestra d'adquisició representativa de limfòcits de plaques de Peyer. En la taula IV-3 es mostren els percentatges obtinguts per a les diferents subpoblacions en les diferents condicions experimentals estudiades.

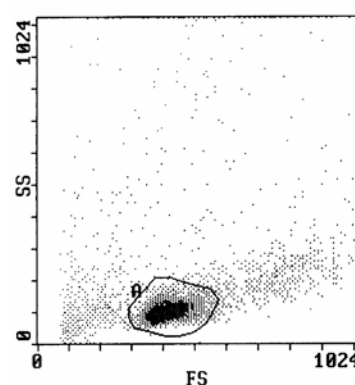


Figura IV-15. Imatge representativa d'una finestra d'adquisició de limfòcits de plaques de Peyer. Aquesta finestra es defineix en funció de la mida de les cèl·lules i de la seva rugositat.

A les plaques de Peyer, el grup SEB presenta un percentatge de limfòcits T CD3⁺ superior a l'obtingut en animals sans (40,1 ± 3,13% respecte 32,2 ± 1,32% en els animals control, $P < 0,02$; Figura IV-16). Els animals alimentats amb el pinso suplementat amb SDAP i tractats amb SEB tenen 36,2 ± 2,4% de limfòcits T, valor que no és estadísticament diferent de l'obtingut en els animals SEB. D'altra banda, els animals SEB-IC no presenten diferències respecte al grup SEB. Com que els percentatges de limfòcits T i B són complementaris s'obté una proporció disminuïda de limfòcits B en el grup inflamat (SEB; 48,2 ± 3,3%) respecte al grup Control (57,0 ± 1,0%; $P < 0,02$). La suplementació amb SDAP i IC no modifica significativament aquest percentatge de cèl·lules respecte al grup SEB.

Taula IV-3. Percentatges de les poblacions limfocitàries de plaques de Peyer d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

	Control	SEB	SEB-SDAP	SEB-IC
Limfòcits T	32,2 ± 1,3	40,1 ± 3,1*	36,2 ± 2,4	42,0 ± 1,4
Limfòcits B	57,0 ± 1,0	48,2 ± 3,3*	52,4 ± 2,2	47,3 ± 0,7
Taxa limfòcits T/B	0,57 ± 0,03	0,88 ± 0,13*	0,71 ± 0,07	0,88 ± 0,13
Limfòcits T Col·laboradors	11,9 ± 1,5	11,2 ± 1,5	13,4 ± 1,1	17,9 ± 2,1 [§]
Limfòcits T Supressors/ citotòxics	11,4 ± 1,2	14,9 ± 1,7	12,9 ± 1,3	12,9 ± 1,7
Limfòcits T αβ	19,4 ± 1,2	22,1 ± 2,4	23,1 ± 1,8	26,8 ± 2,0
Limfòcits T γδ	1,05 ± 0,12	1,52 ± 0,12*	1,32 ± 0,16	1,30 ± 0,23
Limfòcits T activats	0,66 ± 0,08	1,10 ± 0,20*	0,92 ± 0,15	0,90 ± 0,13
Limfòcits T CD4 ⁺ activats	0,37 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,56 ± 0,06
Limfòcits T CD4 ⁺ activats/ limfòcits T CD4 ⁺	3,04 ± 0,28	5,35 ± 0,66*	3,38 ± 0,14 [§]	3,49 ± 0,71
Limfòcits T CD8 ⁺ activats	0,29 ± 0,07	0,50 ± 0,12	0,36 ± 0,11	0,34 ± 0,08
Limfòcits T CD8 ⁺ activats/ limfòcits T CD8 ⁺	2,54 ± 0,52	3,52 ± 0,76	2,63 ± 0,61	2,58 ± 0,64
Cèl·lules NK totals	2,68 ± 0,23	3,44 ± 0,38	2,89 ± 0,39	3,51 ± 0,46
Cèl·lules NK CD8 ⁺	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,04
Cèl·lules NK CD8 ⁻	2,39 ± 0,20	3,09 ± 0,37	2,53 ± 0,36	3,16 ± 0,43

Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-8 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control. [§] $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

A més dels limfòcits T i B, hi ha una població no T no B que són les cèl·lules assassines naturals o *Natural Killer* (NK). Aquesta població també mostra una tendència a incrementar després del tractament amb SEB ($3,44 \pm 0,38\%$ respecte $2,68 \pm 0,23\%$ en els animals control; $P=0,094$; Figura IV-17), però no s'observa cap efecte de les dietes. També es pot veure que la major part de cèl·lules NK presents a les plaques de Peyer exhibeixen un fenotip $NK^+ CD8^-$ (Taula IV-3).

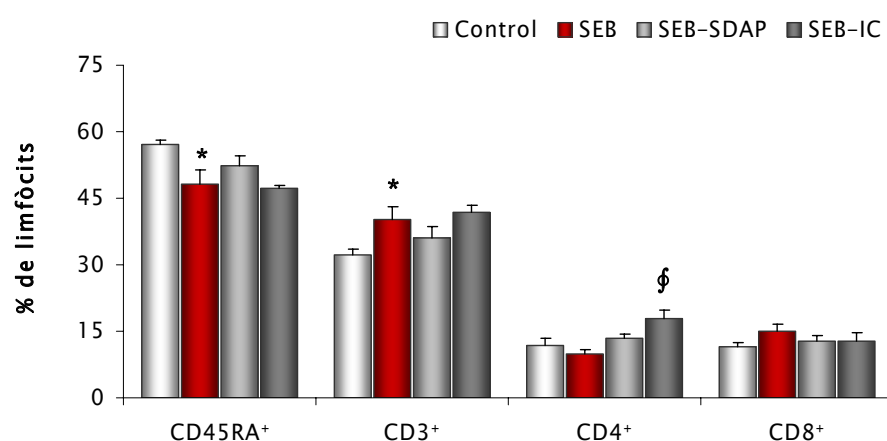


Figura IV-16. Principals poblacions limfocitàries de plaques de les Peyer d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD45RA⁺ (limfòcits B), CD3⁺ (limfòcits T), CD4⁺ (limfòcits col·laboradors) i CD8⁺ (limfòcits supressors/citotòxics). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard ($n = 6-10$ animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control. § $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

Quan s'analitzen les principals subpoblacions de limfòcits T, s'observa que els limfòcits T CD4⁺ (cèl·lules T col·laboradores) representen un $11,9 \pm 1,5\%$ del total de limfòcits i que l'administració del SEB no modifica aquest percentatge. Respecte a l'efecte dels suplementes dietètics, el percentatge d'aquesta població incrementa en el grup alimentat amb el pinso IC ($17,9 \pm 2,1\%$) quan es compara amb els valors obtinguts en els animals inflamats que prenen el pinso control ($11,2 \pm 1,5\%$, $P < 0,05$), mentre que no s'observen efectes en els animals alimentats amb el pinso suplementat amb SDAP.

En el cas dels limfòcits CD8⁺ (*i.e.* la població T supressora/citotòxica), l'administració de l'enterotoxina indueix un increment del seu percentatge ($14,9 \pm 1,7\%$ respecte $11,4 \pm 1,2\%$), tot i que no arriba a la significació estadística ($P=0,093$). No s'observa cap efecte de la suplementació dietètica en aquesta població.

Els limfòcits T també es poden diferenciar en limfòcits T $\alpha\beta^+$ i limfòcits T $\gamma\delta^+$, en funció de les cadenes polipeptídiques presents en el seu receptor de cèl·lula T (TCR). Els primers

són aproximadament un 20% del total de limfòcits presents en les plaques de Peyer i poden coexpressar la molècula CD4 o la CD8 en la seva superfície. Pel que fa als segons, els limfòcits T $\gamma\delta^+$, es troben en molt baixa proporció en aquest teixit, a l'entorn de l'1%, i sempre presenten en la seva superfície la molècula CD8.

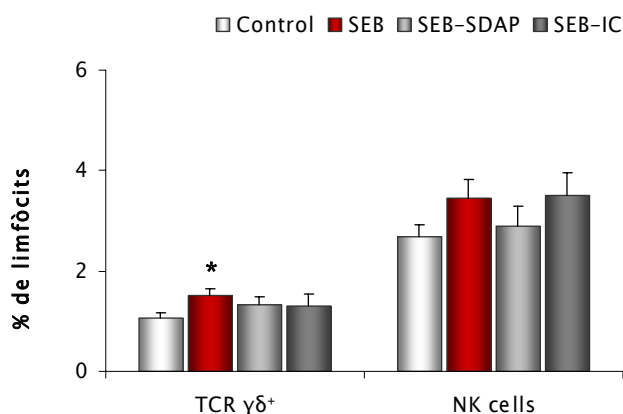


Figura IV-17. Poblacions limfocitàries minoritàries de les plaques de Peyer d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. TCR $\gamma\delta^+$ (limfòcits T $\gamma\delta$) i NK (cèl·lules *Natural Killer*). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 6-10 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Així com els percentatges de cèl·lules T $\alpha\beta^+$ no són modificats ni pel tractament amb SEB ni per la suplementació amb SDAP o amb IC, el percentatge de limfòcits que expressen les cadenes $\gamma\delta$ en el seu TCR és superior després del tractament amb SEB (Figura IV-17). Les dietes suplementades amb SDAP o amb IC no modifiquen significativament els valors obtinguts en el grup SEB, si bé hi ha una reducció d'aquesta població, que segueixen un patró molt similar a l'observat en els limfòcits T activats (Figura IV-18).

Els limfòcits T activats presenten el receptor per a la interleucina 2 (IL-2R), també anomenat CD25. En animals sans el percentatge de limfòcits T activats acostuma a ser molt baix, com en el nostre cas ($0,7 \pm 0,08\%$). Quan als animals se'ls administra SEB pràcticament doblen el percentatge d'aquesta subpoblació ($1,10 \pm 0,2\%$; $P < 0,05$; Figura IV-18). Malgrat que els animals alimentats amb les dietes suplementades amb SDAP o amb IC presenten percentatges inferiors als dels animals inflamats control, aquests valors no arriben a la significació estadística.

Quan els limfòcits T activats s'expressen com a percentatge del total de CD4, s'observen efectes tant del tractament amb SEB com de la suplementació dietètica. El tractament amb l'enterotoxina incrementa significativament el percentatge de CD4⁺ activats respecte al total de limfòcits T col·laboradors, passant de $3,0 \pm 0,28\%$ en animals Control a $5,4 \pm 0,66\%$ en animals SEB ($P < 0,01$). Aquest increment és previngut pel consum de pinso

suplementat amb SDAP, que pràcticament aconsegueix els valors presents en els animals Control ($3,4 \pm 0,14\%$; $P < 0,05$), mentre que el grup SEB-IC mostra una clara tendència a prevenir l'increment induït pel tractament amb SEB ($3,5 \pm 0,71\%$; $P = 0,080$). Les cèl·lules activades que expressen el fenotip CD8 no mostren diferències significatives en cap dels grups experimentals respecte el grup Control.

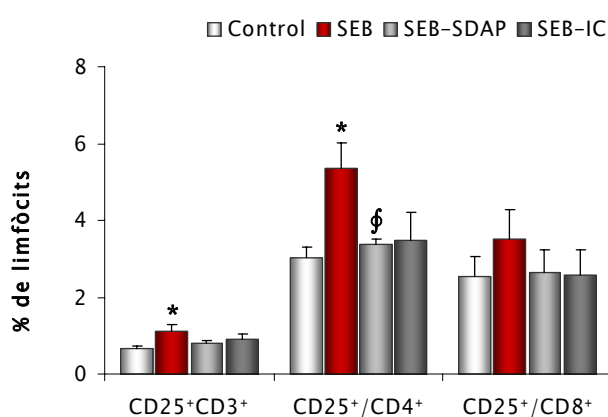
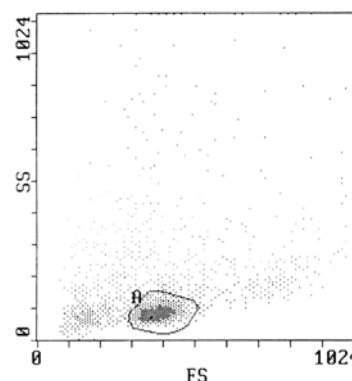


Figura IV-18. Poblacions limfocitàries activades de les plaques de Peyer d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD25+CD3+ (limfòcits T activats), CD25+/CD4+ (limfòcits T col·laboradors activats), CD25+/CD8+ (limfòcits supressors/citotòxics activats). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard ($n = 6-10$ animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control; ‡ $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

POBLACIONS LIMFOCITÀRIES DELS GANGLIS LIMFÀTICS MESENTÈRICS

La viabilitat de la població limfocitària s'ha calculat per a cada aïllament i en tots els casos s'han obtingut valors a l'entorn del 95%. A la figura IV-19 es mostra una finestra d'adquisició representativa de limfòcits de ganglis limfàtics mesentèrics. A la taula IV-4 es mostren els valors obtinguts per a les diferents poblacions i condicions experimentals.

Figura IV-19. Imatge representativa d'una finestra d'adquisició de limfòcits de ganglis limfàtics mesentèrics.



Als ganglis limfàtics mesentèrics dels animals Control, la població predominant és la població T amb el $81,5 \pm 0,8\%$ mentre que els limfòcits B només representen l' $11,1 \pm 0,4\%$. Cap de les dues poblacions és modificada ni pel tractament amb SEB ni per la suplementació dietètica (Figura IV-20). Els limfòcits T col·laboradors representen el $55,8 \pm 0,7\%$ mentre que els limfòcits T supressors/citotòxics el $16,6 \pm 0,4\%$. En cap de les dues poblacions, els percentatges no són modificats ni pel tractament amb SEB ni per la suplementació dietètica.

Taula IV-4. Percentatges de les poblacions limfocitàries de ganglis limfàtics mesentèrics d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

	Control	SEB	SEB-SDAP	SEB-IC
Limfòcits T	$81,5 \pm 0,8$	$81,7 \pm 1,6$	$82,6 \pm 0,8$	$81,6 \pm 0,4$
Limfòcits B	$11,1 \pm 0,4$	$10,8 \pm 1,3$	$12,0 \pm 0,5$	$10,8 \pm 0,3$
Relació limfòcits T/B	$7,2 \pm 0,38$	$8,4 \pm 1,17$	$7,0 \pm 0,36$	$7,3 \pm 0,14$
Limfòcits T Col·laboradors	$55,8 \pm 0,7$	$56,1 \pm 1,8$	$56,6 \pm 0,5$	$55,9 \pm 3,0$
Limfòcits T Supressors/ citotòxics	$16,6 \pm 0,4$	$15,2 \pm 0,6$	$16,4 \pm 0,4$	$15,2 \pm 0,7$
Limfòcits T $\alpha\beta$	$66,6 \pm 0,7$	$68,4 \pm 2,0$	$70,2 \pm 0,8$	$70,4 \pm 2,1$
Limfòcits T $\gamma\delta$	$1,0 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,06$
Limfòcits T activats	$1,43 \pm 0,17$	$2,04 \pm 0,25^*$	$1,94 \pm 0,28$	$2,08 \pm 0,41$
Limfòcits T CD4+ activats	$0,97 \pm 0,13$	$1,55 \pm 0,21$	$1,74 \pm 0,28$	$1,23 \pm 0,38$
Limfòcits T CD4+ activats/ limfòcits T CD4+	$1,75 \pm 0,25$	$3,13 \pm 0,33^*$	$2,67 \pm 0,46$	$2,15 \pm 0,61$
Limfòcits T CD8+ activats	$0,27 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,06$
Limfòcits T CD8+ activats/limfòcits T CD8+	$1,66 \pm 0,28$	$2,10 \pm 0,30$	$1,38 \pm 0,29$	$1,97 \pm 0,38$

Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n=6-8 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

La població de limfòcits T $\alpha\beta^+$ representa un $66,6 \pm 0,7\%$ del total de limfòcits presents en els ganglis limfàtics mesentèrics i aquest percentatge no es modifica ni pel tractament amb SEB ni per la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Pel que fa referència a les cèl·lules T $\gamma\delta^+$, el percentatge en tots els grups experimentals es troba a l'entorn de l'1% del total de limfòcits d'aquest teixit.

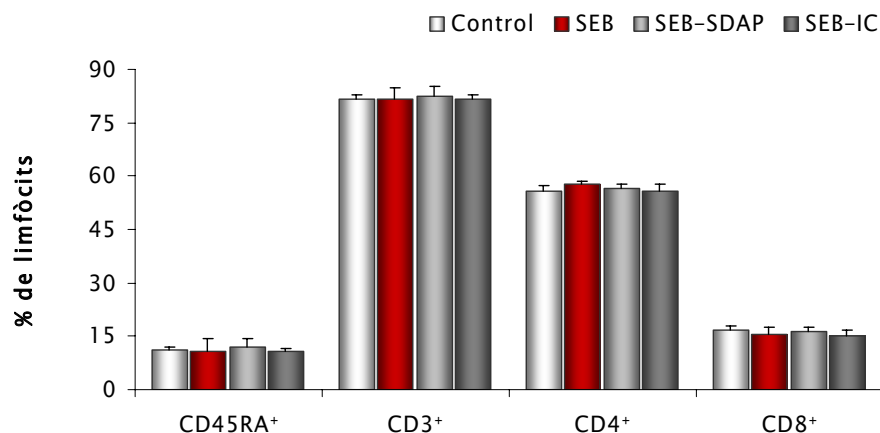


Figura IV-20. Principals poblacions limfocitàries dels ganglis limfàtics mesentèrics d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD45RA⁺ (limfòcits B), CD3⁺ (limfòcits T), CD4⁺ (limfòcits col·laboradors) i CD8⁺ (limfòcits supressors/citotòxics). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 6-10 animals).

En canvi, quan s'analitza el percentatge de limfòcits activats, es veu un clar increment induït per l'administració de SEB ($2,0 \pm 0,25\%$ en el grup SEB i $1,4 \pm 0,17\%$ en el grup Control; $P < 0,05$; Figura IV-21). Aquest increment dels limfòcits activats està protagonitzat principalment pels limfòcits T col·laboradors (CD25⁺CD4⁺) ja que han incrementat 1,8 vegades el seu percentatge respecte els animals no inflamats ($3,13 \pm 0,33\%$ en els animals SEB i $1,75 \pm 0,25\%$ en el grup Control; $P < 0,05$). Aquest increment dels limfòcits activats no es veu afectat pel consum de cap dels dos pinsos suplementats.

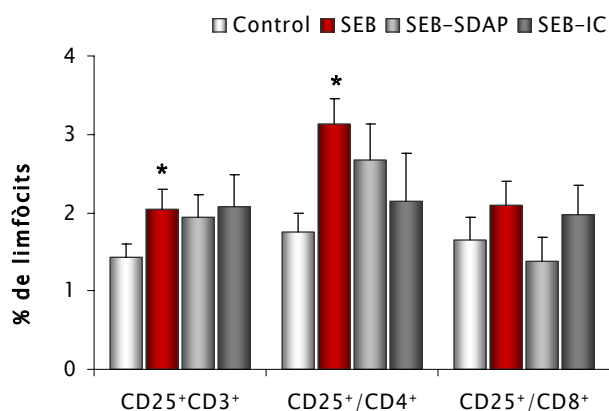


Figura IV-21. Poblacions limfocitàries activades dels ganglis limfàtics mesentèrics d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD25⁺CD3⁺ (limfòcits T activats), CD25⁺/CD4⁺ (limfòcits T col·laboradors activats), CD25⁺/CD8⁺ (limfòcits supressors/citotòxics activats). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 6-10 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Als ganglis limfàtics mesentèrics no hi ha cèl·lules assassines naturals (NK), per tant ja no s'ha realitzat aquest marcatge.

POBLACIONS LIMFOCITÀRIES DE LA MELSA

La viabilitat de la població limfocitària s'ha calculat per a cada aïllament i en tots els casos s'han obtingut valors a l'entorn de 99%. En la figura IV-22 es mostra una finestra d'adquisició representativa de limfòcits de melsa. En la taula IV-5 es mostren els valors obtinguts per a les diferents poblacions i en totes les condicions experimentals.

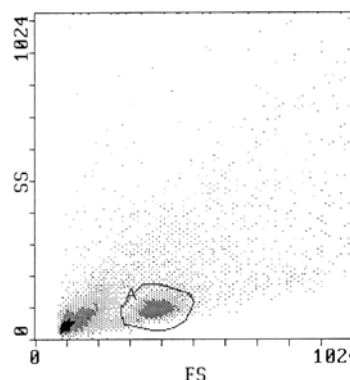


Figura IV-22. Imatge representativa d'una finestra d'adquisició de limfòcits de melsa.

A la melsa, aproximadament dos terços dels limfòcits corresponen a la població T ($57,3 \pm 2,1\%$) i un $21,5 \pm 1\%$ als limfòcits B. En cap de les dues poblacions s'observa cap efecte ni del tractament amb SEB ni de la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC (Figura IV-23).

La meitat dels limfòcits de melsa presenten la molècula CD4 en la seva superfície ($52,4 \pm 2,2\%$), és a dir, són cèl·lules T col·laboradores. Aquest percentatge no es modifica ni per l'administració de SEB ni per l'alimentació amb els pinsos suplementats amb SDAP o amb IC. Pel que fa als limfòcits T supressors/citotòxics, és a dir els CD8⁺, contribueixen en un 8% a la quantitat total de limfòcits. Aquesta població tampoc es veu afectada pel tractament amb SEB o per la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

Pel que fa a l'expressió de les diferents cadenes del TCR, els valors obtinguts són similars en tots els grups experimentals, tant pel que fa als limfòcits T $\alpha\beta^+$ com als T $\gamma\delta^+$ (Figura IV-24).

Taula IV-5. Percentatges de les poblacions limfocitàries de melsa d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

	Control	SEB	SEB-SDAP	SEB-IC
Limfòcits T	57,3 ± 2,1	58,3 ± 2,6	60,4 ± 1,5	60,8 ± 2,6
Limfòcits B	21,5 ± 1,0	23,0 ± 1,6	19,4 ± 1,1	20,8 ± 0,2
Relació limfòcits T/B	2,76 ± 0,2	2,70 ± 0,4	3,19 ± 0,2	2,81 ± 0,1
Limfòcits T Col·laboradors	52,4 ± 2,2	48,7 ± 1,9	54,0 ± 2,0	51,9 ± 0,9
Limfòcits T Supressors/citotòxics	8,1 ± 0,4	7,5 ± 0,3	7,0 ± 0,2	8,1 ± 1,2
Limfòcits T $\alpha\beta$	50,7 ± 2,2	50,8 ± 2,8	54,0 ± 1,6	55,7 ± 3,6
Limfòcits T $\gamma\delta$	0,60 ± 0,08	0,48 ± 0,06	0,54 ± 0,05	0,59 ± 0,11
Limfòcits T CD4 ⁺ activats	0,83 ± 0,07	0,93 ± 0,14	1,03 ± 0,16	1,12 ± 0,19
Limfòcits T CD4 ⁺ activats/limfòcits T CD4 ⁺	1,6 ± 0,18	2,0 ± 0,36	1,9 ± 0,35	2,5 ± 0,28
Cèl·lules NK totals	4,5 ± 0,40	4,3 ± 0,18	2,9 ± 0,40 [#]	3,3 ± 0,55
Cèl·lules NK CD8 ⁺	3,2 ± 0,34	2,9 ± 0,15	2,0 ± 0,26	2,3 ± 0,38
Cèl·lules NK CD8 ⁻	1,33 ± 0,13	1,24 ± 0,17	0,80 ± 0,11	1,05 ± 0,18

Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 6-8 animals). [#]P<0,05 respecte al grup SEB.

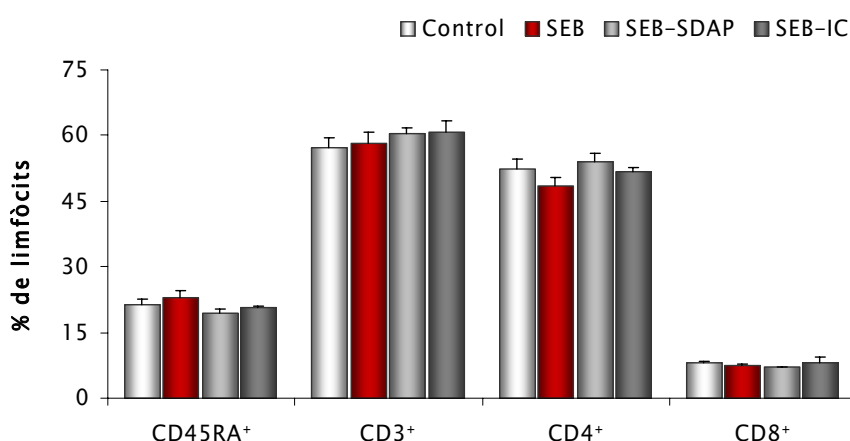


Figura IV-23. Poblacions limfocitàries majoritàries de la melsa d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD45RA⁺ (limfòcits B), CD3⁺ (limfòcits T), CD4⁺ (limfòcits col·laboradors) i CD8⁺ (limfòcits supressors/citotòxics). Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 6-10 animals).

En referència a l'activació dels limfòcits de melsa, només hi ha limfòcits T activats dins la subpoblació dels col·laboradors, mentre que la presència de limfòcits T supressors/citotòxics activats és pràcticament nul·la. El percentatge de CD4⁺ activats respecte al total de limfòcits T col·laboradors és de $0,83 \pm 0,07\%$ i no es troba incrementat en els animals inflamats; tampoc hi ha cap modificació en el seu percentatge en les rates que han estat alimentades amb els pinsos suplementats amb SDAP o amb IC (Figura IV-24).

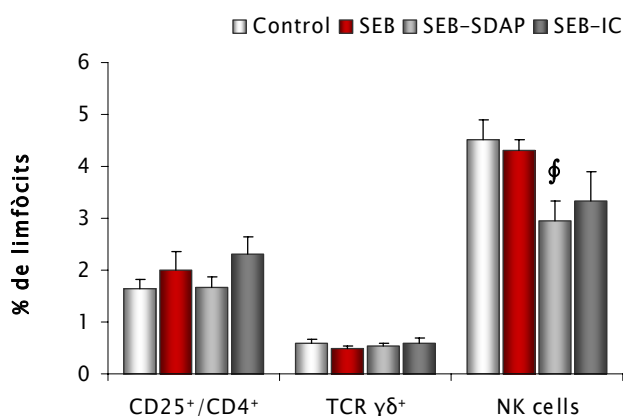


Figura IV-24. Poblacions limfocitàries minoritàries de la melsa d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. CD25⁺/CD4⁺ (limfòcits T col·laboradors activats), TCR γδ⁺ (limfòcits T γδ) i NK (cèl·lules *Natural Killer*). Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 6-10 animals). §P<0,05 respecte al grup SEB.

Tot i que en aquest teixit no hi ha cap efecte del tractament amb SEB, sí que hi ha però, un efecte molt clar del pinso suplementat amb SDAP en animals tractats amb SEB. Aquests animals presenten un percentatge de cèl·lules NK 1,5 vegades inferior al del grup SEB ($2,9 \pm 0,4\%$ i $4,3 \pm 0,2\%$, respectivament; $P<0,01$; Figura IV-24). El grup SEB-IC presenta només una tendència a reduir aquest percentatge, amb un valor de $3,3 \pm 0,6\%$ ($P=0,077$).

2.7. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB SEB I DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA SOBRE EL TRANSPORT DE NUTRIENTS

PURESA DE LES VESÍCULES DE MEMBRANA APICAL

Per tal de determinar el grau de puresa de les suspensions de vesícules de membrana apical d'enteròcit de jejú i alhora valorar la idoneïtat del mètode d'aïllament emprat s'han mesurat la concentració de proteïnes i l'activitat específica de la sacarasa (marcador de membrana apical) en les fraccions d'homogenat i de vesícules. Aquestes determinacions permeten calcular el factor d'enriquiment del marcador, així com el percentatge de

recuperació final de l'enzim i de les proteïnes. En la taula IV-6 es mostra la concentració de proteïnes, l'activitat específica de la sacarasa, el factor d'enriquiment de les vesícules i el tant per cent de recuperació final respecte l'homogenat.

L'activitat específica de la sacarasa és similar en els quatre grups experimentals, és a dir no és modificat ni per l'administració de SEB ni per la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els valors d'enriquiment i de recuperació final indiquen que les vesícules tenen una puresa adequada. Aquests valors són molt semblants en els 4 grups experimentals, la qual cosa indica que ni el SEB ni la suplementació dietètica afecta al procés d'aïllament.

En referència a l'activitat ATPasa, no hi ha diferència entre els quatre grups experimentals, ni en l'homogenat ni en les vesícules. Els baixos valors obtinguts d'enriquiment i de recuperació final, demostren que no hi ha contaminació per membrana basolateral.

Taula IV-6. Puresa de les vesícules de membrana apical.

	Condicció	Activitat específica, Concentració		Enriquiment	Recuperació final (%)
		Homogenat	Vesícules		
Sacarasa nKat/mg prot	Control	1,10 ± 0,11	12,67 ± 1,18	10,7 ± 1,9	85 ± 4
	SEB	1,14 ± 0,09	11,54 ± 1,09	9,9 ± 1,7	82 ± 5
	SEB-SDAP	0,98 ± 0,10	10,47 ± 0,97	10,0 ± 2,0	86 ± 4
	SEB-IC	1,11 ± 0,10	11,60 ± 1,19	10,5 ± 1,7	79 ± 3
Na⁺/K⁺- ATPasa nKat/mg prot	Control	0,18 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,85 ± 0,07	2,5 ± 0,3
	SEB	0,14 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,83 ± 0,11	2,0 ± 0,2
	SEB-SDAP	0,13 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,82 ± 0,08	1,8 ± 0,4
	SEB-IC	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,90 ± 0,10	2,2 ± 0,6
Proteïna mg/mL	Control	18,7 ± 1,22	15,2 ± 2,09		1,02 ± 0,07
	SEB	19,3 ± 1,39	16,1 ± 1,25		1,05 ± 0,09
	SEB-SDAP	20,0 ± 1,70	16,1 ± 1,87		1,00 ± 0,10
	SEB-IC	17,9 ± 1,42	15,4 ± 1,38		1,08 ± 0,08

Activitat específica de la sacarasa i de la Na⁺/K⁺-ATPasa a l'homogenat i a les vesícules de membrana apical. Factor d'enriquiment i recuperació final dels dos enzims. Concentració i recuperació final de proteïna a l'homogenat i a les vesícules de membrana apical. Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard (n= 6 aïllaments, 2 animals/aïllament).

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB SEB I LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB SDAP O AMB IC SOBRE EL TRANSPORTADOR SGLT-1

CINÈTICA DEL TRANSPORT DE D-GLUCOSA

El transport de la D-glucosa a través de la membrana apical d'enteròcits s'ha estudiat incubant les vesícules a diferents concentracions del monosacàrid. El flux total es pot descompondre en dos components: el transport actiu i l'entrada a les vesícules per difusió simple (Figura IV-25). De les corbes obtingudes i mitjançant el programa informàtic Enzfitter® s'han calculat les constants cinètiques que caracteritzen el procés (Taula IV-7).

Taula IV-7. Constants cinètiques del transport de la D-glucosa en vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

Condicció	V_{max}	K_m	K_d
	pmol/mg proteïna · s	mmol/L	nL/mg proteïna · s
Control	100,6 ± 1,3	0,24 ± 0,01	6,3 ± 0,1
SEB	79,7 ± 1,3*	0,26 ± 0,02	25,9 ± 0,4*
SEB-SDAP	87,7 ± 1,6‡	0,30 ± 0,02	25,3 ± 1,1
SEB-IC	82,5 ± 3,5	0,27 ± 0,03	24,8 ± 0,4

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard (n=6 aïllaments, 2 animals/aïllament). * $P < 0,05$ respecte al grup Control; ‡ $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

Tal com es pot observar a la taula IV-7, la V_{max} del grup inflammat es redueix pràcticament un 20% respecte la dels animals sans, la qual cosa vol dir que en els animals inflamats hi ha una menor entrada de D-glucosa a través del transportador SGLT-1 de la membrana apical. Quan els animals inflamats són alimentats amb el pinso suplementat amb SDAP, la V_{max} presenta un valor intermedi entre el dels animals Control i el dels animals SEB; per tant, la reducció en l'entrada de D-glucosa no és tant severa com en els animals inflamats que són alimentats amb el pinso no suplementat. Els animals alimentats amb el pinso suplementat amb IC mostren valors similars als del grup SEB.

La K_m (constant de Michaelis) per a la D-glucosa és similar en els quatre grups, fet que indica que ni el tractament amb SEB ni la suplementació dietètica amb SDAP o amb IC afecten a l'afinitat del transportador per al seu substrat.

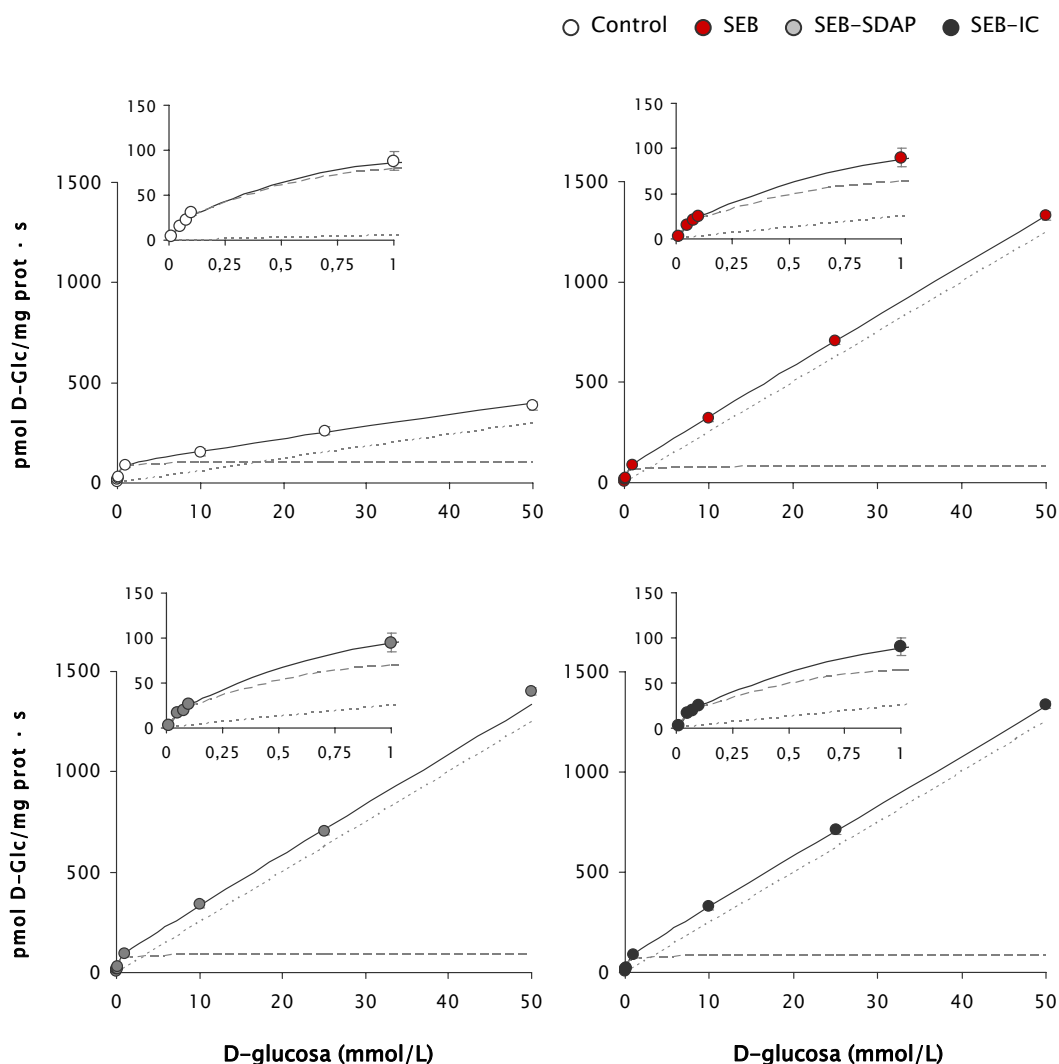


Figura IV-25. Flux d'entrada de la D-glucosa en vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n=6$ aïllaments, 2 animals/aïllament). En alguns punts, l'error és més petit que el símbol. ----- difusió simple, transport actiu, — flux total.

Tal com es pot veure a la taula IV-7, el SEB incrementa la K_d (constant de difusió) per a la D-glucosa 4 vegades respecte els animals sans. La suplementació dietètica amb SDAP o amb IC no evita aquest increment.

Aquest increment en la K_d no es pot atribuir a la presència de GLUT2 a la membrana apical, perquè inhibidors específics d'aquest transportador, com la citocalasina B o la glucosamina no tenen cap efecte sobre la captació de D-glucosa en cap de les dues

concentracions assajades (Taula IV-8). Tot i que en aquesta taula només es mostren els valors obtinguts en animals inflamats (SEB) s'observa el mateix comportament en tots els grups.

Taula IV-8. Captació de D-glucosa en presència i absència d'inhibidors de GLUT2 en vesícules de membrana apical d'animals inflamats (SEB).

Concentració de D-glucosa	Control	Citocalasina B	Glucosamina
	pmol D-glucosa/mg proteïna · s		
0,1 mmol/L	33,3 ± 1,8	32,6 ± 2,0	33,0 ± 1,7
25 mmol/L	601 ± 11	610 ± 14	607 ± 18

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard (n= 6 aïllaments, 2 animals/aïllament).

UNIÓ ESPECÍFICA A FLORRIZINA

L'assaig de la unió específica de florrizina al transportador SGLT-1 informa de l'abundància d'aquest transportador a la membrana apical dels enteròcits. En la figura IV-26 es pot observar que la abundància del transportador apical SGLT-1 en els diferents grups mostra un patró molt similar al de la V_{max} , que també es representa en la mateixa gràfica.

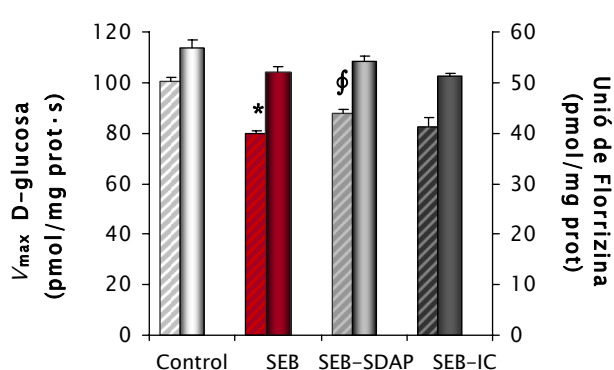


Figura IV-26. V_{max} per a la D-glucosa (columnes ratllades) i unió específica de florrizina (columnes llises) a vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n= 6 aïllaments, 2 animals/aïllament). * $P < 0,05$ respecte al grup Control; [§] $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

La unió específica de florrizina informa de la correlació entre els valors màxims de transport i el nombre de transportadors SGLT-1 a les vesícules. Tal com es mostra en la

figura IV-27, hi ha una correlació lineal entre la V_{\max} de la D-glucosa i la unió específica de florizina 50 μM , fet que indica que els canvis observats en el transport màxim de D-glucosa són atribuïbles a canvis en la densitat de transportadors a la membrana apical. Aquesta correlació entre la V_{\max} de la D-glucosa i la unió específica de la florizina està definida per l'equació $y = 3,64x - 107,41$ ($r = 0,9009$). El pendent de la recta indica el nombre de recanvis.

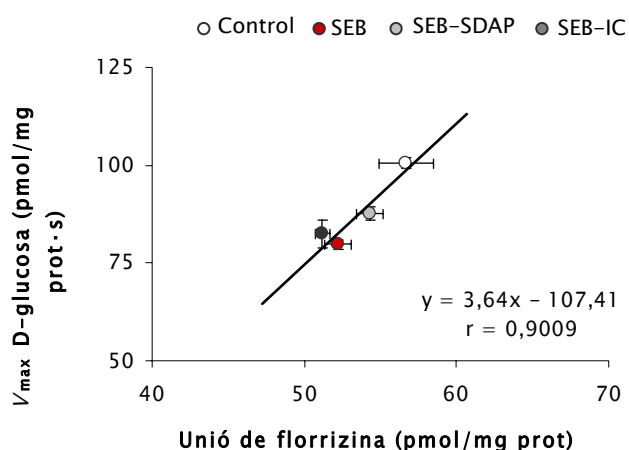


Figura IV-27. Correlació entre la V_{\max} i la unió específica de florizina a vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n=6$ aïllaments, 2 animals/aïllament).

WESTERN BLOT DEL TRANSPORTADOR SGLT-1

En la imatge del Western Blot representada a la figura IV-28 es pot apreciar l'especificitat de l'anticòs, ja que en les 4 primeres línies, l'anticòs ha estat prèviament adsorbit amb el pèptid antigènic i no ha resultat marcada cap banda. Tal com es pot observar en aquesta figura, la banda corresponent a les rates SEB (línia 6) és més prima i té un marcatge més dèbil que la corresponent als animals sans (línia 5). Els animals tractats amb SEB i que han consumit pinso suplementat amb SDAP (SEB-SDAP; línia 7), han mostrat una banda més fosca que els animals SEB, tot i que no ha arribat a la intensitat i amplada de les rates no inflamades.

Les imatges del Western blot s'han quantificat per densitometria al Laboratori d'Anàlisi i Tractament d'Imatges dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La intensitat de les bandes és indicativa de l'abundància del transportador SGLT-1 a les mostres i com es pot observar a la figura IV-29, les rates tractades amb el SEB presenten una reducció en l'expressió del transportador de més d'un 15% respecte l'expressió a les rates Control. Les rates alimentades amb el pinso suplementat amb SDAP mostren una

expressió del transportador de $91,0 \pm 1,15$ unitats arbitràries, que és clarament superior a l'expressió d'aquesta proteïna en animals inflamats ($82,5 \pm 0,50$; $P < 0,05$).



Línia 1 2 3 4 5 6 7 8

En les línies 1 i 5 hi ha mostres Control, en les línies 2 i 6 mostres SEB, en les línies 3 i 7 mostres SEB-SDAP i en les línies 4 i 8 mostres SEB-IC. Els carrils 1-4 han estat incubats amb l'anticòs prèviament adsorbit amb el pèptid antigènic. Les línies 5-8 han estat incubades amb l'anticòs sense adsorbir amb el pèptid antigènic.

Figura IV-28. Western blot del transportador SGLT-1 en vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. En les línies 1 i 5 hi ha mostres Control, en les línies 2 i 6 mostres SEB, en les línies 3 i 7 mostres SEB-SDAP i en les línies 4 i 8 mostres SEB-IC. Els carrils 1-4 han estat incubats amb l'anticòs prèviament adsorbit amb el pèptid antigènic. Les línies 5-8 han estat incubades amb l'anticòs sense adsorbir amb el pèptid antigènic.

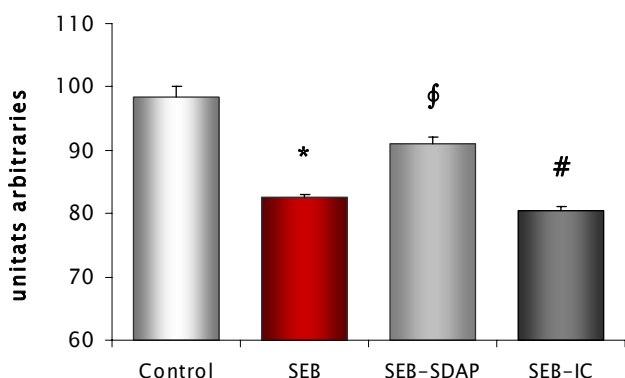


Figura IV-29. Quantificació de les bandes del Western blot corresponents al transportador SGLT-1 en vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n=3$ rates). * $P < 0,05$ respecte al grup Control. ‡ $P < 0,05$ respecte al grup SEB. # $P < 0,05$ respecte al grup SEB-SDAP.

IMMUNOLocalització DEL TRANSPORTADOR SGLT-1

En la figura IV-30 es mostren 4 imatges representatives de la immunolocalització del transportador SGLT-1 en vellositats de jejú d'animals dels quatre grups experimentals. Tal com es pot observar en aquestes imatges, el transportador es localitza a la membrana apical dels enteròcits. L'expressió màxima de SGLT-1 es produeix en els enteròcits madurs, és a dir en els de l'àpex de la vellositat. De fet, aquesta proteïna s'expressa principalment des de la meitat de la vellositat fins a l'àpex, mentre que la base de la vellositat mostra una expressió molt reduïda.

En la figura IV-30 també es pot observar que els animals tractats amb SEB presenten el transportador localitzat de forma més uniforme al llarg de la vellositat i que el marcatge és

molt més feble. Aquesta reducció de l'expressió es correlaciona amb els resultats obtinguts del Western Blot de l'SGLT-1 i de les proves cinètiques del transport de D-glucosa. En aquesta imatge també es pot observar que els animals SEB-SDAP mostren un increment de l'expressió del transportador, mentre que els animals SEB-IC presenten un patró d'expressió intermig entre els animals SEB i els SEB-SDAP.

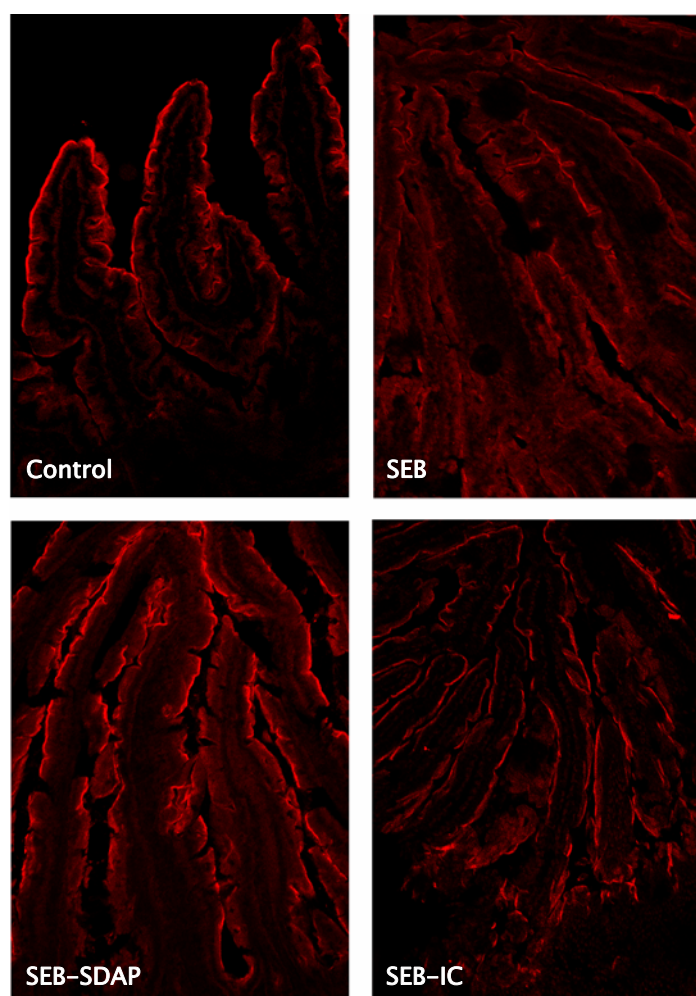


Figura IV-30. Immunolocalització del transportador SGLT-1 a la membrana apical de vellositats de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Imatges representatives dels marcatges amb anti-SGLT-1 en els diferents grups experimentals. Totes les imatges estan als mateixos augments.

La fluorescència associada al transportador SGLT-1 s'ha quantificat mitjançant el programa Image J (vegeu apartat 10.5. de Materials i mètodes). Quan la fluorescència es

quantifica de forma global es veu clarament que l'exposició al SEB redueix l'expressió de l'SGLT-1 ($78,45 \pm 1,30$ unitats arbitràries en animals Control i $67,23 \pm 2,36$ unitats arbitràries en animals SEB; $P < 0,02$; Figura IV-31). Quan els animals són suplementats amb SDAP incrementen l'expressió del transportador ($76,67 \pm 0,98$ unitats arbitràries; $P < 0,05$). La suplementació amb IC no modifica significativament la reducció de l'expressió de l'SGLT-1 induïda pel SEB.

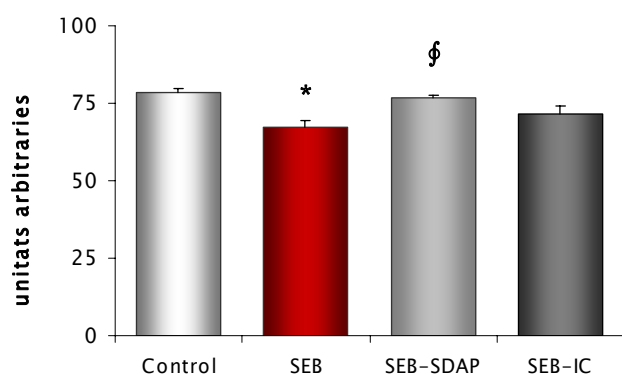


Figura IV-31. Quantificació global de la intensitat de fluorescència en la immunolocalització del transportador SGLT-1 a la membrana apical de vellositats de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n = 4$ rates, 6 vellositats/animal). * $P < 0,05$ respecte al grup Control. § $P < 0,05$ respecte al grup SEB.

La densitat de fluorescència també s'ha analitzat separatament a diferents zones de la vellositat (àpex, mig i base). En les rates Control es posa de manifest que l'expressió del transportador és elevada a l'àpex de la vellositat ($94,8 \pm 2,7$; Figura IV-32), mentre que al mig i a la base de la vellositat l'expressió és més baixa ($72,7 \pm 1,1$ i $67,8 \pm 1,0$ unitats arbitràries, respectivament). L'administració de SEB causa una reducció de l'expressió de SGLT-1 a l'àpex de la vellositat ($65,2 \pm 2,7$ unitats arbitràries; $P < 0,005$). Aquesta reducció és important ja que la D-glucosa s'absorbeix majoritàriament a través dels enteròcits de l'àpex.

Quan els animals han estat alimentats amb pinso suplementat amb SDAP, la reducció de l'expressió de SGLT-1 a l'àpex de la vellositat provocada pel SEB no és tant acusada ($78,8 \pm 2,5$ unitats arbitràries; $P < 0,05$). Els animals que han rebut la suplementació amb IC presenten una expressió de SGLT-1 intermèdia entre els animals SEB i els SEB-SDAP ($75,2 \pm 3,0$). L'expressió de SGLT-1 a la base i la zona central de la vellositat no està afectada ni per l'exposició a l'enterotoxina ni per la suplementació dietètica.

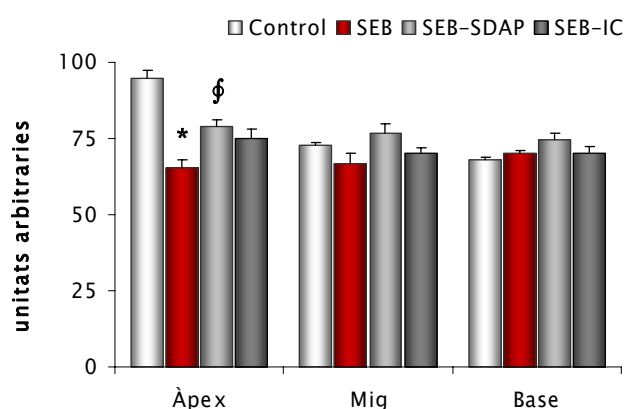


Figura IV-32. Quantificació per zones de la intensitat de fluorescència en la immuno-localització del transportador SGLT-1 a la membrana apical de vellositats de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n=4$ rates, 6 vellositats/animal). * $P<0,05$ respecte al grup Control. § $P<0,05$ respecte al grup SEB.

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB SEB I LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB SDAP O AMB IC SOBRE EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS

Tal com es pot veure a la taula IV-9, la captació dels aminoàcids L-Leucina, L-Lisina i L-Metionina no està alterada per l'administració de SEB, en cap de les dues concentracions analitzades. La suplementació dietètica amb SDAP o amb IC tampoc modifica els valors obtinguts en la captació d'aquests aminoàcids.

Taula IV-9. Captació de L-Leucina, L-Lisina i L-Metionina a vesícules de membrana apical d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC.

Condicció	L-Leucina		L-Lisina		L-Metionina	
	100 μ M	10 mM	100 μ M	10 mM	100 μ M	1 mM
Control	28,4 \pm 3,0	132 \pm 7	16,7 \pm 0,9	256 \pm 11	128 \pm 6	458 \pm 45
SEB	27,7 \pm 2,7	129 \pm 6	15,4 \pm 1,0	245 \pm 10	132 \pm 9	467 \pm 28
SEB-SDAP	26,9 \pm 2,7	134 \pm 7	16,0 \pm 0,8	244 \pm 15	140 \pm 12	444 \pm 12
SEB-IC	28,8 \pm 2,6	133 \pm 9	15,9 \pm 1,2	261 \pm 5	128 \pm 5	460 \pm 33

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard ($n=6$ aïllaments, 2 animals/aïllament), nmol/mg prot \cdot 3 s.

Els fluxos inicials d'entrada s'han determinat a dues concentracions. Totes les incubacions s'han dut a terme en presència de Na^+ per garantir la contribució de tots els sistemes de transport presents en la mucosa intestinal. L'estudi s'ha realitzat amb tres aminoàcids essencials representatius i amb una aproximació metodològica capaç de diferenciar els

efectes sobre l'afinitat del transport (utilitzant concentracions baixes d'aminoàcids) dels efectes sobre la capacitat de transport (utilitzant concentracions dins del rang mM).

2.8. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB SEB I LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA SOBRE LA PERMEABILITAT CAPIL·LAR

ESTABLIMENT PROTOCOL EVANS BLUE

El colorant *Evans Blue (EB)* és àmpliament utilitzat per valorar l'increment de la permeabilitat vascular. Quan el colorant és injectat en el torrent sanguini s'uneix molt ràpidament a proteïnes plasmàtiques (majoritàriament albúmina) i forma complexos dissociables. L'increment local de la permeabilitat a macromolècules dóna lloc a l'extravasació i deposició de complexos proteïna-EB a l'espai intersticial. La quantitat de EB extravassat pot ser estimada espectrofotomètricament.

Per tal d'establir el temps òptim per observar els efectes del SEB sobre la permeabilitat capil·lar s'han fet uns experiments preliminars, a on l'Evans Blue (EB) ha estat administrat a les 3, 6 i 24 h després de la segona administració del SEB (Taula IV-10).

Taula IV-10. Extravasació d'Evans blue (EB) a diferents temps després de la segona dosi de SEB a duodè, jejú, ili i còlon.

		Duodè	Jejú	Ili	Còlon
		µg EB/g de teixit humit			
3 h	Control	9,08 ± 1,57	8,25 ± 0,72	8,01 ± 0,61	5,67 ± 0,14
	SEB	9,44 ± 1,52	9,21 ± 0,30	8,89 ± 1,52	5,13 ± 0,15
6 h	Control	10,11 ± 0,47	11,69 ± 0,30	10,81 ± 0,38	6,71 ± 0,27
	SEB	12,17 ± 0,52*	15,82 ± 0,68*	14,87 ± 0,67*	7,39 ± 0,31
24 h	Control		7,70 ± 1,09	8,14 ± 1,31	6,20 ± 0,68
	SEB		7,42 ± 0,73	7,32 ± 0,78	6,37 ± 1,37

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard (n= 8-11 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

A les 3 h de la segona administració del SEB, l'extravasació de líquids encara no està incrementada en cap dels fragments analitzats. En aquest temps, la quantitat d'EB extravasat en animals sans és de $10,11 \pm 0,47 \mu\text{g EB/g}$ de teixit humit a duodè, $11,69 \pm 0,30 \mu\text{g EB/g}$ a jejú, $10,81 \pm 0,38 \mu\text{g EB/g}$ a ili i $6,71 \pm 0,27 \mu\text{g EB/g}$ a còlon. L'administració de SEB indueix un increment de l'extravasació d'aquest colorant a les 6 h de la segona dosi, de forma que s'obtenen valors incrementats a duodè ($12,17 \pm 0,52 \mu\text{g EB/g}$; $P < 0,05$), a jejú ($15,82 \pm 0,68 \mu\text{g EB/g}$; $P < 0,01$) i a ili ($14,87 \pm 0,67 \mu\text{g EB/g}$; $P < 0,01$), però no a còlon ($7,39 \pm 0,31 \mu\text{g EB/g}$).

A les 24 h, els valors d'EB extravasat són similars als dels animals no tractats amb SEB. Per tant el temps escollit per estudiar el possible efecte preventiu de les dietes suplementades amb SDAP o amb IC és a les 6 h després de la segona dosi de SEB.

EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB SEB I DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB SDAP O AMB IC SOBRE LA PERMEABILITAT CAPIL·LAR

Tal com es pot veure en la figura IV-33, l'administració de SEB incrementa la permeabilitat vascular a l'intestí prim 6 h després de la segona dosi de l'enterotoxina. Concretament, hi ha un increment en l'extravasació del colorant EB de quasi un 30% als fragments de jejú i d'ili, mentre que al duodè aquest increment només és del 10% ($P < 0,05$). El còlon no està afectat per l'administració de SEB.

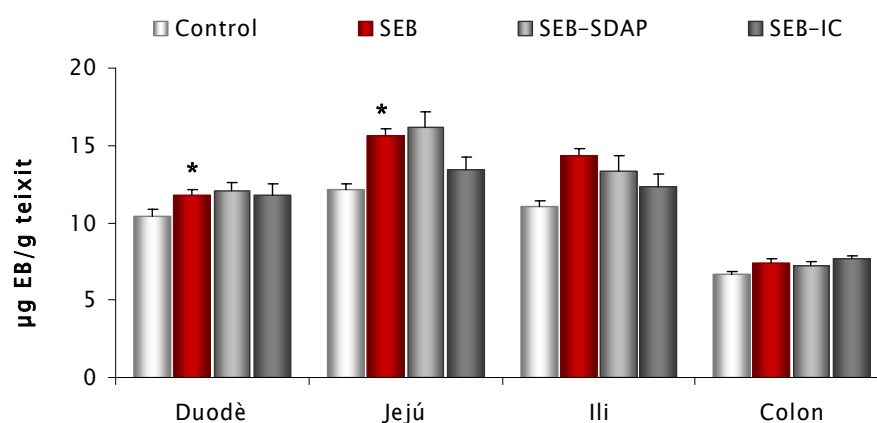


Figura IV-33. Extravasació intestinal d'Evans blue a animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard (n= 8-11 animals). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Les dietes suplementades amb SDAP o amb IC no tenen un efecte preventiu sobre l'increment de la permeabilitat capil·lar induït per l'administració de SEB. Els animals que han rebut el suplement amb SDAP mostren valors d'EB extravasat de $16,18 \pm 1,01$ $\mu\text{g EB/g}$ de teixit i de $13,38 \pm 0,94$ $\mu\text{g EB/g}$ a jejú i a ili, respectivament. Aquests valors són molt semblants als que mostren els animals SEB. En canvi, rates alimentades amb la dieta suplementada amb IC presenten una reducció del 14% en l'extravasació d'Evans Blue, en jejú i en ili, si bé no arriba a tenir significació estadística.

2.9. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB SEB I DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA SOBRE LA PERMEABILITAT EPITELIAL

EFECTES SOBRE L'EXPRESSIÓ DE ZO-1

A la figura IV-34 es mostren 4 imatges representatives de la immunolocalització de ZO-1 a vellositats de jejú d'animals dels quatre grups experimentals a les 24 h després de la segona dosi de SEB.

La ZO-1 és una proteïna de la unió estreta i es localitza a la part apical de la membrana lateral dels enteròcits. Tal com es pot observar en aquesta figura, la localització de la proteïna és homogènia al llarg de la vellositat, sense presentar una expressió diferencial al llarg de la mateixa. Els animals exposats a l'enterotoxina mostren una menor expressió de ZO-1 24 h després de la segona administració. La suplementació amb SDAP o amb IC no modifica l'expressió d'aquesta proteïna.

A les 48 h després de la segona dosi de SEB, encara hi ha una marcada reducció de l'expressió de la ZO-1 (Figura IV-35). Els animals que han rebut la suplementació amb SDAP mostren un marcatge més intens, mentre que les rates SEB-IC presenten un marcatge molt similar al dels animals SEB.

La ZO-1 forma part de la placa citoplasmàtica de la unió estreta i enllaça les proteïnes transmembrana amb els filaments d'actina del citoesquelet. Així doncs, la ZO-1 colocalitza amb l'actina, fet que s'ha utilitzat per quantificar aquesta proteïna de la unió estreta. Les imatges s'han quantificat mitjançant el programa Image J (vegeu apartat 10.5. de Materials i mètodes) i els resultats es mostren a la figura IV-36.

Tal com es pot veure en aquesta gràfica els animals tractats amb SEB mostren una menor intensitat de fluorescència a les 24 h de la segona dosi ($91,41 \pm 3,39$ unitats arbitràries; $P < 0,01$) que els animals tractats amb vehicle (Control; $101,96 \pm 1,57$). A les 48 h la

intensitat de fluorescència associada a l'expressió de la ZO-1 es manté més baixa que en els animals Control ($93,06 \pm 2,52$ unitats arbitràries; $P < 0,01$).

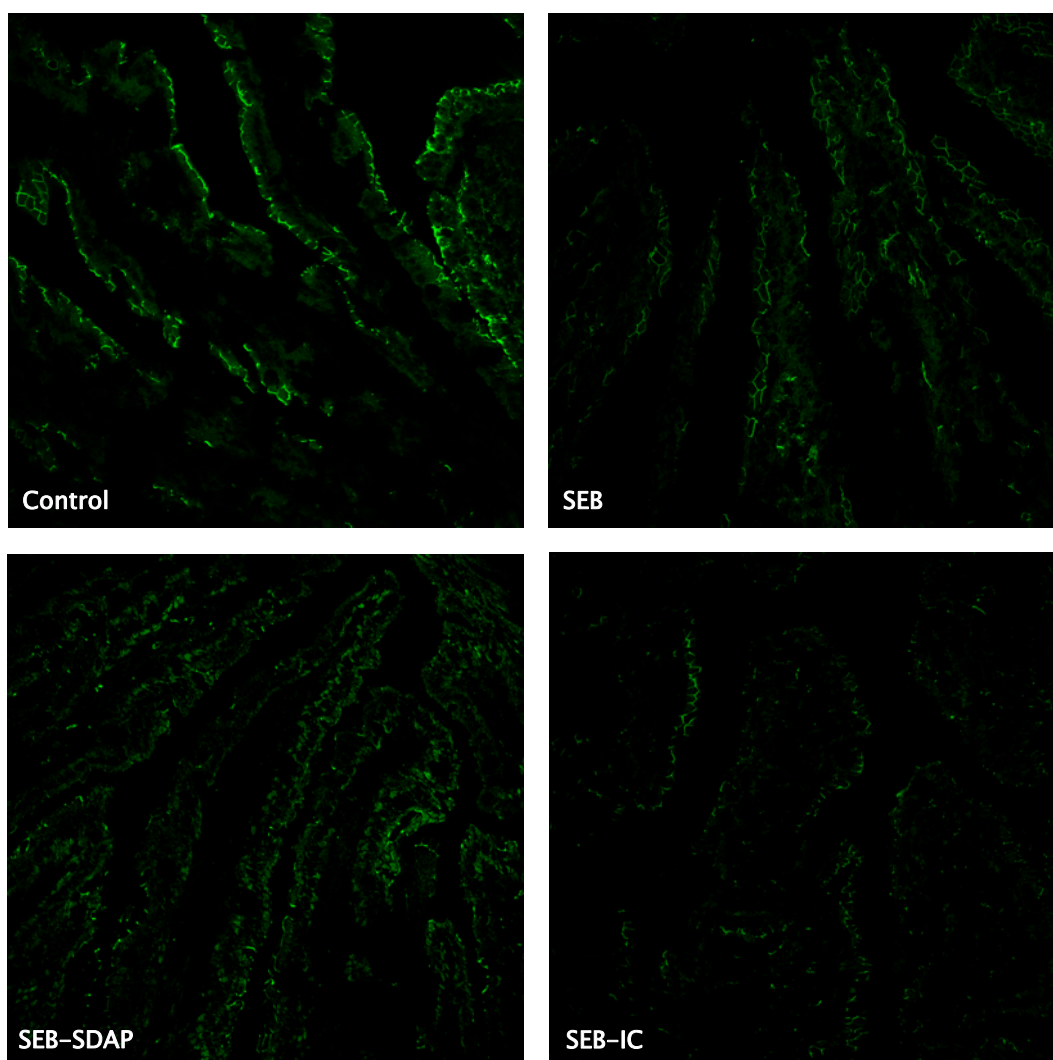


Figura IV-34. Immunolocalització de ZO-1 a vellositats de jejú d'animals 24 h després de la segona dosi de SEB i a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Imatges representatives de la immunolocalització de ZO-1 24 h després de la segona dosi de SEB. Totes les imatges estan als mateixos augments.

Cap de les dues suplementacions dietètiques modifica l'efecte induït pel tractament amb SEB. De totes maneres, a les 48 h, els animals inflamats que han consumit el pinso suplementat amb SDAP mostren uns valors de fluorescència de $99,04 \pm 2,03$ unitats arbitràries, clarament superiors als valors observats al grup SEB.

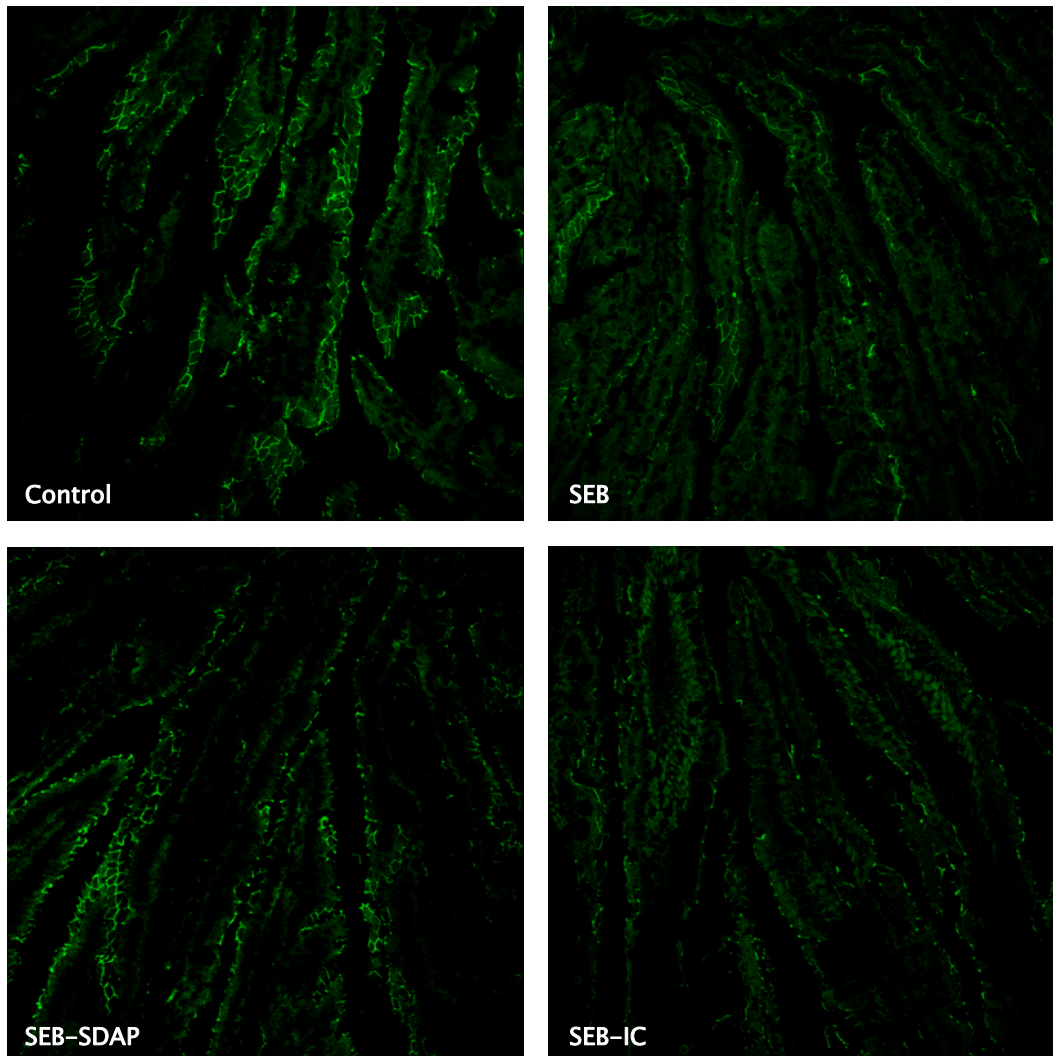


Figura IV-35. Immunolocalització de ZO-1 a vellositats de jejú d'animals 48 h després de la segona dosi de SEB i a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Imatges representatives de la immunolocalització de ZO-1 48 h després de la segona dosi de SEB. Totes les imatges estan als mateixos augments.

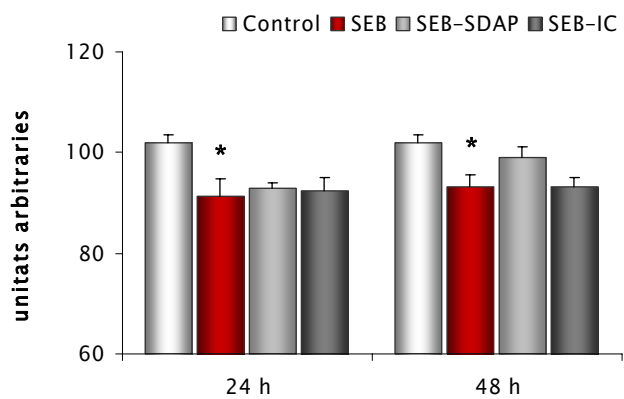


Figura IV-36. Quantificació de la intensitat de fluorescència de la immunolocalització de ZO-1 a vellositats de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. La intensitat de fluorescència s'expressa en unitats arbitràries com a mitjana \pm error estàndard (n= 5-7 animals, 4 camps/animal). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

EFFECTES SOBRE L'EXPRESSION DE β -CATENINA

A la figura IV-37 es mostren 4 imatges representatives de la immunolocalització de β -catenina a vellositats de jejú d'animals dels quatre grups experimentals 24 h després de la segona administració de SEB. Tal com es pot veure en aquesta figura, els animals exposats al SEB mostren una clara reducció de l'expressió de la β -catenina. Els animals que han rebut la suplementació amb SDAP o amb IC mostren un comportament similar.

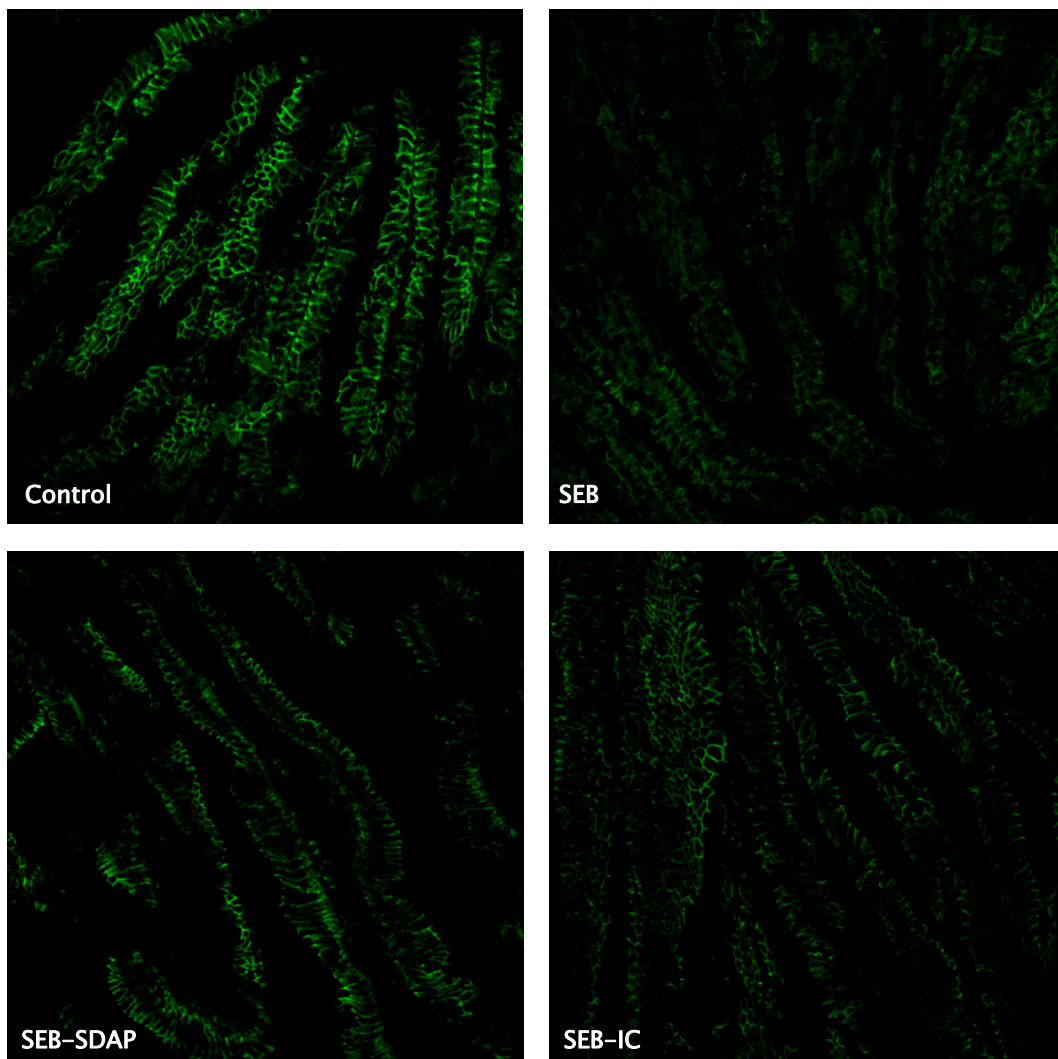


Figura IV-37. Immunolocalització de β -catenina a vellositats de jejú d'animals 24 h després de la segona dosi de SEB i a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Imatges representatives de la immunolocalització de β -catenina 24 h després de la segona dosi de SEB. Totes les imatges estan als mateixos augments.

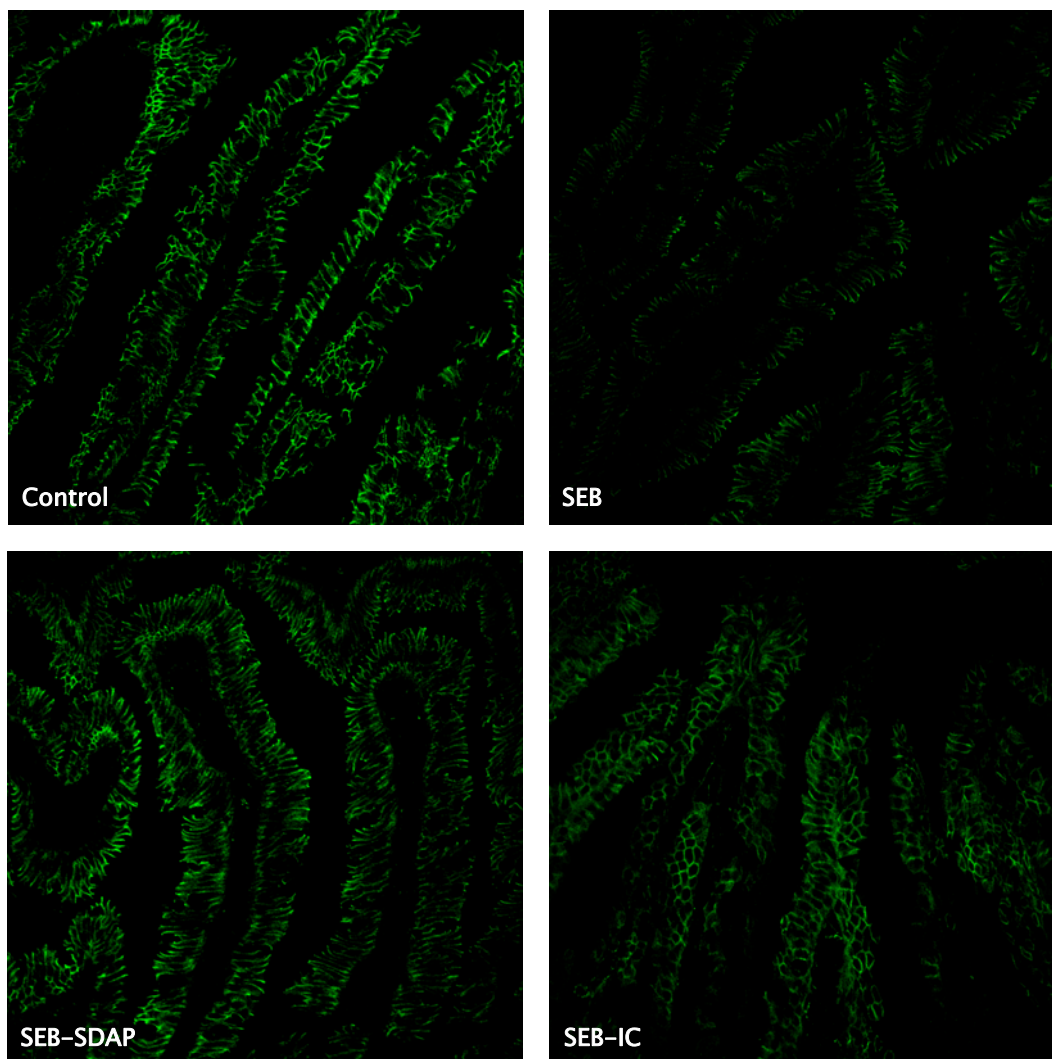


Figura IV-38. Immunolocalització de β -catenina a vellositats de jejú d'animals 48 h després de la segona dosi de SEB i a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Imatges representatives de la immunolocalització de β -catenina 48 h després de la segona dosi de SEB. Totes les imatges estan als mateixos augments.

A les 48 h de la segona dosi de l'enterotoxina el marcatge de la β -catenina encara és feble (Figura IV-38). Els animals que han rebut la suplementació dietètica recuperen una mica l'expressió d'aquesta proteïna.

La β -catenina forma part de la unió adherent, que es troba per sota de la unió estreta. Aquesta proteïna junt amb l' α -catenina, uneix l'E-cadherina al citoesquelet d'actina. En la quantificació de la fluorescència del marcatge de la β -catenina també s'ha utilitzat la colocalització amb l'actina (vegeu apartat 10.5. de Materials i mètodes). Els resultats de la quantificació es mostren en la figura IV-39.

Els animals Control mostren una intensitat de fluorescència de $98,27 \pm 2,84$ unitats arbitràries, que es redueix fins $82,38 \pm 3,31$ a les 24 h del tractament amb SEB ($P < 0,01$). A les 48 h aquest valor s'ha recuperat lleugerament, fins a $88,59 \pm 3,40$ unitats arbitràries ($P < 0,05$).

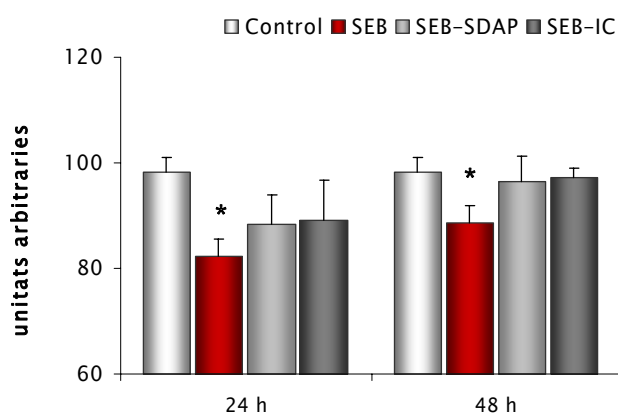


Figura IV-39. Quantificació de la intensitat de fluorescència de la immunolocalització de β -catenina a vellositats de jejú d'animals exposats a SEB i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDAP o amb IC. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries com a mitjana \pm error estàndard ($n = 5-7$ animals 4 camps/animal). * $P < 0,05$ respecte al grup Control.

Pel que fa als animals SEB-SDAP, la intensitat de fluorescència és de $88,42 \pm 5,42$ unitats arbitràries 24 h després de la segona dosi de SEB. A les 48 h, la intensitat de la fluorescència es troba incrementada respecte el mateix grup a les 24 h, amb un valor de $96,37 \pm 4,98$, molt proper al valor obtingut en els animals no inflamats; aquesta diferència però no arriba a ser estadísticament significativa.