

Efectos protectores de los β -galactomananos vegetales sobre la función barrera intestinal

Fuente: Javier Estévez & Sergi Carné. Industrial Técnica Pecuaria, S.A. (ITPSA) Departamento Técnico e Innovación. Revista: Junio 2016. Extraído de nutricionanimal.info.

La integridad de la función barrera intestinal es esencial para preservar la salud del animal, mejorando las funciones fisiológicas intestinales.

¿QUÉ es la FUNCIÓN BARRERA INTESTINAL?

El epitelio intestinal está expuesto a distintos componentes presentes en la luz del intestino, incluyendo toxinas, microorganismos y antígenos de distintos orígenes, entre otros.

La función barrera intestinal es la combinación de elementos que controlan el paso de macromoléculas o antígenos hacia el medio interno a través del epitelio intestinal, a la vez que permite el mantenimiento de las funciones fisiológicas (absorción de nutrientes, secreción, etc.) que garantizan la homeostasis.

Una adecuada función barrera evita por tanto el paso incontrolado de antígenos y microorganismos a través de los enterocitos, previniendo así un contacto excesivo con los componentes del sistema inmune entérico y la activación de respuestas inflamatorias, que tendrían un efecto negativo sobre la salud intestinal y la absorción de los nutrientes de la dieta.

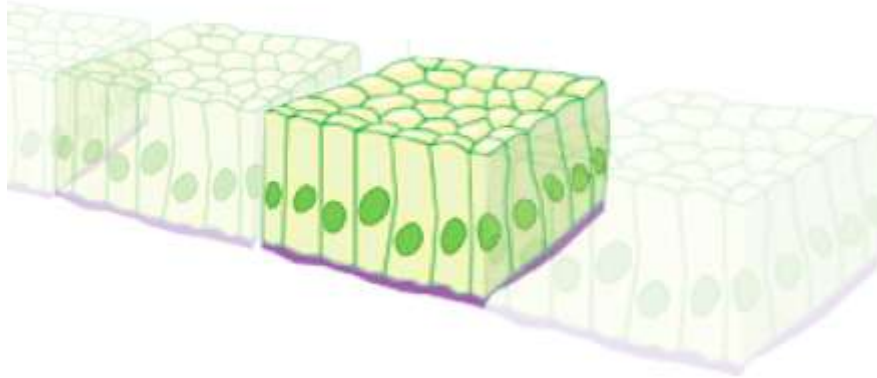
La función barrera evita el paso incontrolado de antígenos y microorganismos a través de los enterocitos

» De este modo, la barrera intestinal constituye la primera línea de defensa del organismo y dificulta la instauración de patologías infecciosas que comprometen el estado sanitario de las explotaciones y empeoran los parámetros productivos



COMPONENTES de la FUNCIÓN BARRERA INTESTINAL

La función barrera intestinal está formada por distintos niveles de protección



- Ya en el propio contenido intestinal, actúan péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas y enzimas digestivas, producidos por el propio animal, así como microorganismos de la microbiota intestinal y sus sustancias antimicrobianas.
- Otro de los componentes es el moco intestinal, secretado por las células caliciformes del epitelio, que forma una capa protectora sobre el epitelio, dificultando la adhesión y penetración de bacterias hacia el interior.
- Más internamente, el propio epitelio monoestratificado cilíndrico que forma la mucosa intestinal constituye también una barrera física formada por enterocitos unidos entre sí por complejos de adhesión formados por uniones estrechas (TJ, tight junctions), uniones adherentes (adherens junction), desmosomas y uniones gap.

Las uniones estrechas (TJ) son estructuras proteicas esenciales para el control de la función barrera epitelial del intestino. Estas estructuras regulan de forma precisa el paso de iones y macromoléculas a través del espacio paracelular, o espacio que existe entre los enterocitos.



Uniones TJ Las uniones estrechas (TJ) son estructuras proteicas esenciales para el control de la función barrera epitelial del intestino

Las TJ están formadas por proteínas transcelulares como ocludina, claudinas y proteínas JAM, y por proteínas intracelulares como Zonula Occludens (ZO)-1, -2 y -3 (figura 1).

Estas últimas unen las proteínas transcelulares con un anillo de actomiosina del enterocito, que se contrae por acción de quinasas como la quinasa de la cadena ligera de la miosina MLCK, (del inglés, Myosin Light Chain Kinase), activada por diversos estímulos, y permitiendo así la apertura del espacio paracelular, causando un aumento de la permeabilidad del epitelio.

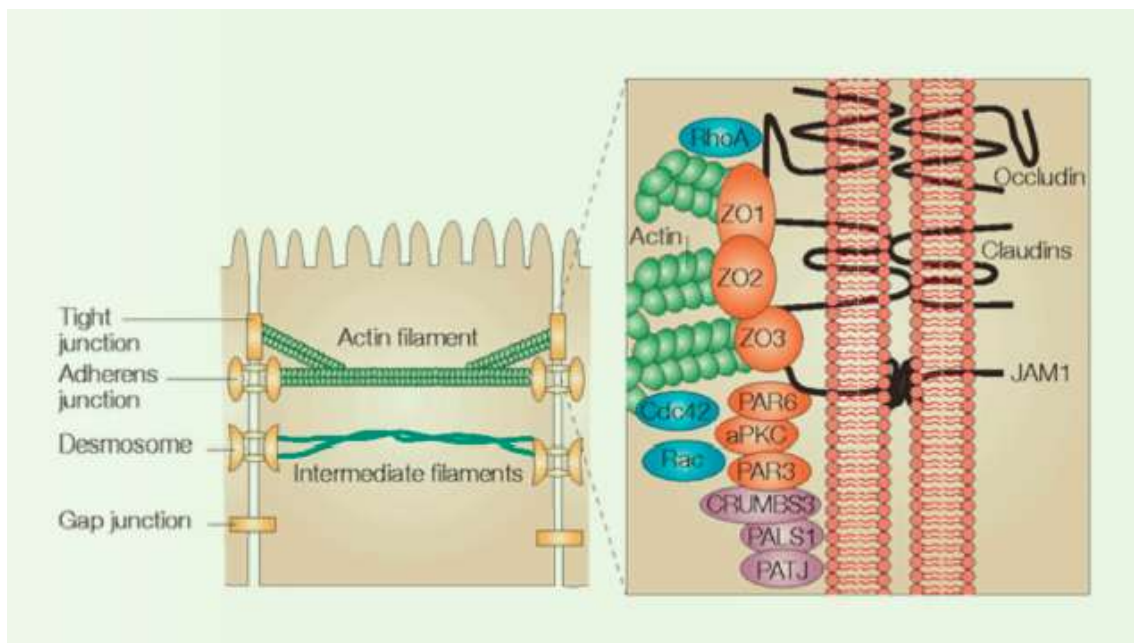


Figura 1. Esquema de las estructuras de unión intercelular y, en concreto, de las uniones estrechas (tight junctions)

EFFECTOS de las ENTEROBACTERIAS SOBRE LA FUNCIÓN BARRERA EPITELIAL

8 Muchas enterobacterias patógenas causan disfunción de la barrera epitelial con el objetivo de facilitar la colonización intestinal

Determinadas cepas patógenas de *Escherichia coli* provocan la redistribución de ZO-1 y de los filamentos de actina del citoesqueleto, lo que causa una desestructuración de la TJ.

Salmonella typhimurium, además de causar cambios en la distribución de ZO-1, activa mecanismos para causar la contracción del polo apical de la célula (Brufau et al., 2015; Sears, 2000). Con ello, aumenta la permeabilidad del

epitelio intestinal, facilitando la invasión por parte del patógeno y promoviendo estados de inflamación que pueden perpetuarse debido a un mayor contacto del sistema inmune con antígenos del contenido intestinal.

Esto causa un aumento de citoquinas proinflamatorias que, a su vez, tienen efectos negativos sobre la función barrera del epitelio intestinal, cerrando un círculo vicioso.

β -GALACTOMANANOS VEGETALES HIDROLIZADOS PARA LA MEJORA DE LA FUNCIÓN BARRERA INTESTINAL

Desde la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en 2006 por parte de la Unión Europea, han ido surgiendo diferentes estrategias para promover la salud intestinal y, por tanto, conseguir un buen estatus sanitario de los animales y la mejora de los rendimientos productivos de los mismos.

De este modo, en los últimos años han aparecido aditivos de gran utilidad como los β -galactomananos vegetales hidrolizados (β GMH).

Éstos principalmente actúan bloqueando las fimbrias de enterobacterias, como las de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), que constituyen uno de sus principales mecanismos de adhesión al epitelio, necesario para su colonización (Sharon & Lis, 1993).

La nutrición es un viaje apasionante por los caminos de la investigación y de la innovación

En ITPSA se cuida con especial esmero la nutrición animal y humana, a través de la investigación, desarrollo y elaboración de una de las gamas más extensas en complementos nutricionales de alta calidad:

- Pigmentantes
- Acidificantes
- Antioxidantes
- Enzimas
- Fungicidas
- Mejoradores de la Calidad
- Control Medioambiental
- Agentes antimicrobianos
- Saborizantes y edulcorantes
- Productos de distribución

itpsa

Industrial Técnica Pecuaria, S.A.

Av. de Roma 167, 7ª planta
08011 Barcelona
Tel. +34 934 520 330
Fax. +34 934 520 331
www.itpsa.com

El modo de acción de β GMH ha sido estudiado por Badia et al. (2012), que realizaron una serie de estudios sobre cultivos de células intestinales en presencia y ausencia de *Salmonella typhimurium* (figura 2).

La presencia de los β GMH a 0,5 μ g/mL inhibió de forma significativa la invasión de las células intestinales por la *Salmonella* en cerca del 60% respecto al control positivo. Con niveles de β GMH de 10 μ g/mL la reducción fue de más del 70% (Badia, Brufau, et al., 2012).

Estos mismos autores también evaluaron el efecto de los β GMH en la capacidad de invasión intestinal de *E. coli* K88 (Badia, Zanello, et al., 2012) en células intestinales protegidas con distintas concentraciones de β GMH hasta 20 $\mu\text{g/mL}$.

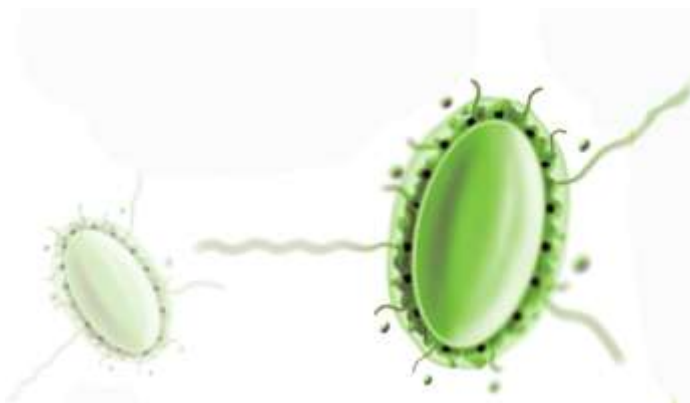
Se observó una reducción de invasión celular de hasta el 80% debido a la presencia de adhesinas sensibles a la β -galactosa en *E. coli* (figura 3).

Brufau et al. (2015) demostraron en pollos que los β GMH en la dieta aumentaban la secreción de moco intestinal por parte de las células caliciformes, no sólo respecto a los animales inoculados con 108 UFC *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, sino también respecto a los controles no inoculados.

Además, a través de microscopía electrónica, reportaron un mayor número de estas células caliciformes en aquellos animales que ingirieron β GMH en la dieta y una menor cantidad de bacterias adheridas al epitelio intestinal (figura 4).

Una capa de moco con un grosor mayor, promovida por la adición en la dieta de β GMH, podría dificultar que, tanto *Salmonella* spp., como otros patógenos, puedan adherirse al epitelio sin inducir cambios en la absorción de nutrientes y en los parámetros productivos de los animales de forma negativa (Brufau et al., 2015).

Esto facilitaría su eliminación a través de las heces, ya sin capacidad infectiva tras su unión a los β GMH, disminuyendo así el riesgo de infección.



Los β -galactomananos vegetales hidrolizados (β GMH) principalmente actúan bloqueando las fimbrias de enterobacterias

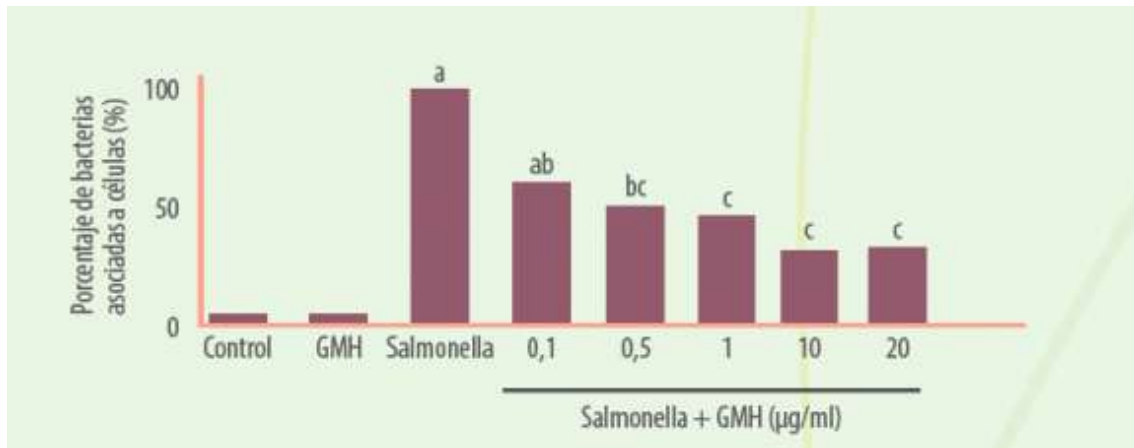


Figura 2. Porcentaje de Salmonella adherida a células epiteliales en presencia de β -galactomananos vegetales hidrolizados (SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.). Las letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$; $n = 5$). (Badia et al., 2012)

El bloqueo de las bacterias mediante β GMH promueve su eliminación en las heces sin capacidad infectiva

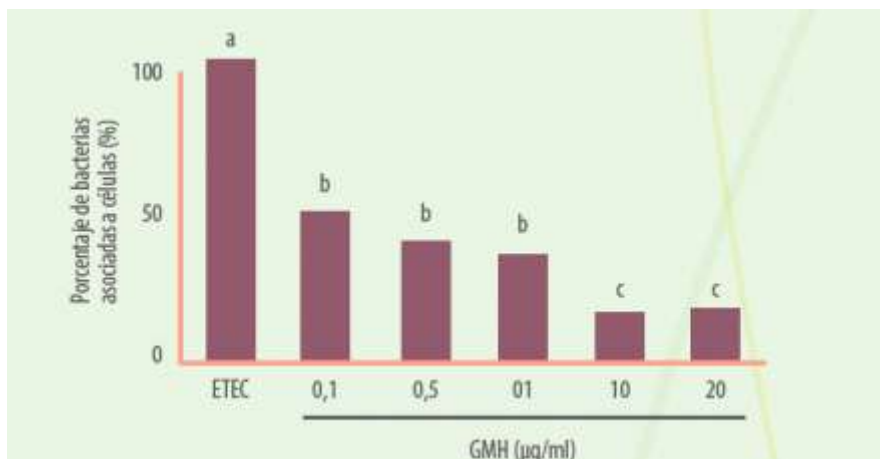


Figura 3. Porcentaje de ETEC

Figura 3. Porcentaje de ETEC – β GMH (mg/mL) adherida a células epiteliales en presencia de β -galactomananos vegetales hidrolizados (SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$; $n = 5$). (Badia et al., 2012)

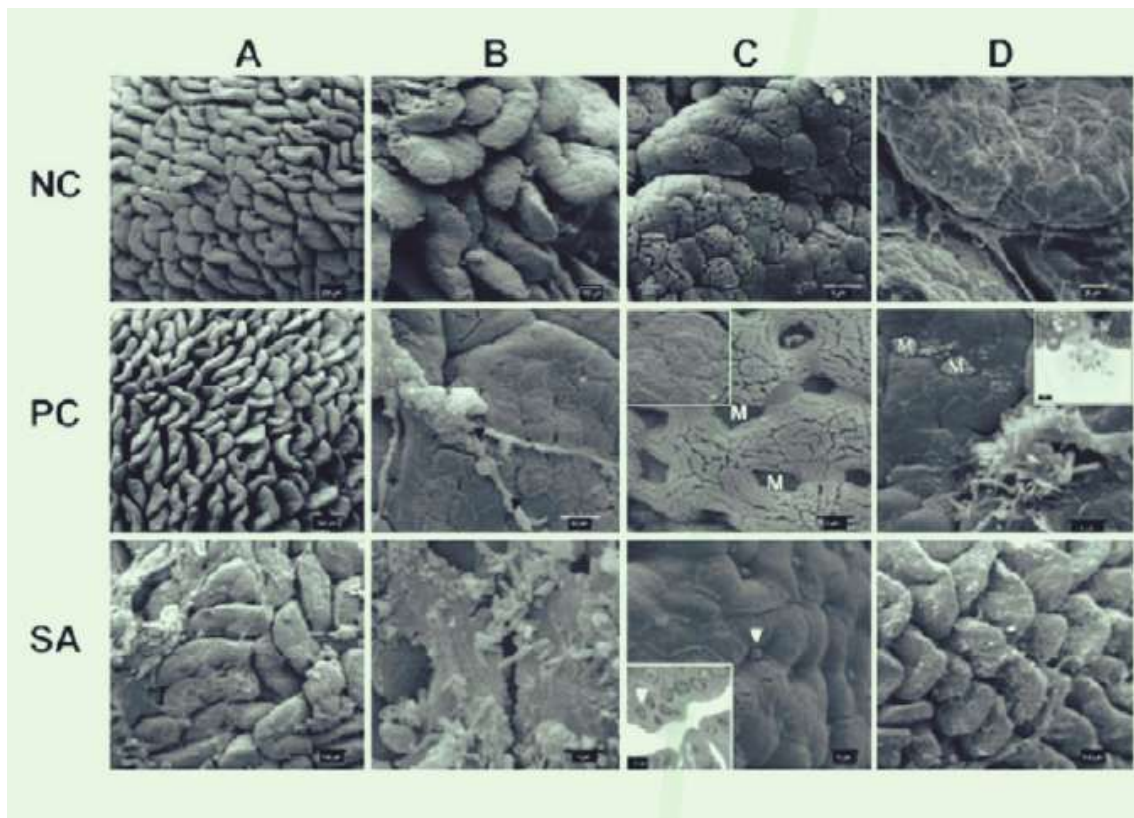


Figura 4. Microscopía electrónica del intestino de pollos: NC, no inoculación; PC: inoculación con 108 UFC de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. SA: inoculadas con *Salmonella* Enteritidis y con 1g/kg de β -galactomananos vegetales hidrolizados (SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.). Todas las imágenes corresponden a íleo, excepto NC-B, SA-B, PC-C y PC-D, que corresponden a ciego. Las flechas negras indican bacterias adheridas al moco y a lamelipodios. Las flechas blancas señalan células caliciformes y la letra M indica células M. (Brufau et al., 2015)

Esta menor interacción patógeno-epitelio queda también evidenciada en este trabajo de Brufau et al.

En condiciones de infección por *Salmonella* spp., y también por otras especies, diversos autores han descrito un aumento en el número de células epiteliales M -microfold cells- (Frost, Bland, & Wallis, 1997; Jepson & Clark, 1998; Brufau et al., 2015).

Las células M son responsables del transporte de antígenos intestinales al tejido linfóide de la mucosa intestinal y, a su vez, del paso de *Salmonella* a través de la pared intestinal.

Estas células M son responsables del transporte de antígenos intestinales al tejido linfóide de la mucosa intestinal (GALT) mediante lamelipodios, que son prolongaciones de la membrana celular vinculadas a procesos de captación de patógenos por parte de la célula.

Son también estas células M, las que contribuyen al paso de Salmonella a través de la pared intestinal tras adherirse mediante sus fimbrias.

Por tanto, el hecho de que los tejidos pertenecientes a animales que consumen β GMH muestren un menor número de células M en su epitelio, y una menor formación de lamelipodios, es indicativo de una menor interacción de Salmonella enterica con el epitelio intestinal (figura 3).

Por otro lado, tal y como hemos comentado, en condiciones de inflamación intestinal puede producirse una desestructuración de las uniones estrechas que compromete la integridad de la función barrera intestinal.

Brufau et al. (2015) comprobaron mediante microscopía confocal que los animales infectados con Salmonella enterica muestran una deslocalización de la proteína de unión estrecha ZO-1.

Sin embargo, los animales que consumen β -galactomananos previenen estos efectos de la Salmonella, mostrando una distribución de ZO-1 que coincide con la posición real de las TJ (figura 5).

Asimismo, los β GMH poseen efectos inmunomoduladores contra Salmonella typhimurium (Badia, Lizardo, Martínez, & Brufau, 2014; Badia, Brufau, et al., 2012), lo que contribuye de forma indirecta al mantenimiento de la función barrera intestinal.

En los trabajos de Badia et al. (2012 y 2014), el desafío de cultivos de células intestinales porcinas (IPI-2I) con Salmonella typhimurium induce un aumento en la expresión génica (mRNA) de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 α , TNF α and GM-CSF) y de quimiocinas (CXCL-2, -8 y -10, y CCL-2 y -20) por parte de las células epiteliales.

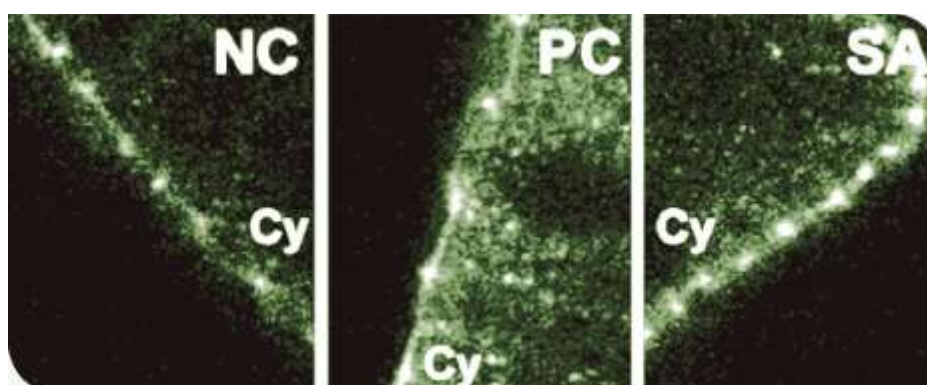


Figura 5. Imágenes de microscopía confocal con inmunolocalización de ZO-1 en íleo de pollo. NC, aves no inoculadas; PC, aves inoculadas; SA, aves inoculadas + 1 g/kg SALMOSAN (Industrial Técnica Pecuaria, S.A.). Cy: citosol. (Brufau et al., 2015)

La adición de β GMH en el medio:

Previene la inflamación causada por la infección con *Salmonella typhimurium*

Reduce la expresión de marcadores de inflamación

Favorece la salud intestinal

La adición de β GMH en el medio no sólo previene la inflamación causada por la infección con *Salmonella typhimurium*, sino que también reduce la expresión de algunos de estos marcadores de inflamación y favorece la salud intestinal en condiciones basales en ausencia del patógeno (en la figura 6 se muestran dos ejemplos representativos).

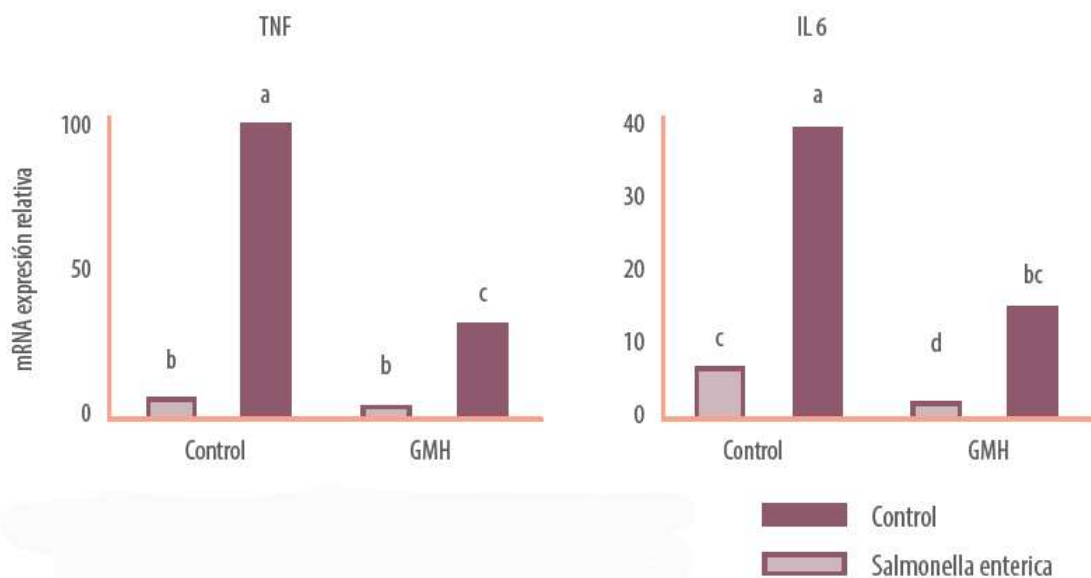


Figura 6. Efecto de los β -galactomananos vegetales hidrolizados (10 μ g/ml. SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.) sobre la expresión de mRNA de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL6) en cultivo de células epiteliales intestinales cocultivadas con *Salmonella*. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$; $n = 6$) (Badia et al., 2012)

En cultivos de células dendríticas porcinas, *Salmonella typhimurium* también incrementa la expresión génica (mRNA) de determinadas citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 y GM-CSF) y antiinflamatorias (IL-10), así como de determinadas quimiocinas (CXCL8 y CCL17) (Badia et al., 2012).

Los β GMH promueven la expresión de citoquinas antiinflamatorias y reducen la expresión de citoquinas proinflamatorias, demostrando tener un efecto inmunomodulado



A diferencia de lo que se observó en el caso de las células epiteliales, en presencia de la bacteria, el β GMH incrementó aún más la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α y de GM-CSF, y de la antiinflamatoria IL-10 ($P < 0.05$) por parte de las células dendríticas, sin variar la expresión de IL-6 o CCL17.

En ausencia de *Salmonella typhimurium* en el cultivo, el β GMH inducía la expresión de TNF α y GM-CSF, indicando así, junto a los resultados hallados en enterocitos porcinos (IPI-2I), que los β GMH podrían actuar per se como potenciales inmunomoduladores.

Recientes estudios en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universitat de Barcelona, publicado este año (J Nutr Biochem; 41: 20-24), demuestran que los efectos inmunomoduladores y sobre la función barrera intestinal de Salmosan se potencian con la incorporación de *Lactobacillus plantarum*.

En estas pruebas, se añadió lipopolisacárido (LPS) en co-cultivos Caco-2 – dTHP-1 para inducir la expresión de citoquinas inflamatorias y el deterioro de la función barrera. La incorporación de β GMH revirtió el aumento en la expresión de la citoquina inflamatoria TNF α y aumentó significativamente la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Por sí sólo, la incorporación de *Lactobacillus plantarum* en el cultivo no indujo cambios significativos en la expresión de TNF α e IL-10, aunque sí en la de la citoquina con efectos antiinflamatorios IL-6.

La combinación de β GMH y *Lactobacillus*, además de los efectos sobre TNF α e IL-10, permitió obtener un aumento en la expresión de IL-6 y restaurar significativamente a niveles basales la función barrera intestinal evaluada mediante el registro de la resistencia eléctrica transepitelial (TER, del inglés transepithelial electric resistance). Este mismo efecto beneficioso sobre la permeabilidad del intestino fue confirmado también en cultivos celulares Caco-2 a los que se les indujo un aumento de la permeabilidad incorporando TNF α (figura 7), simulando un estado de inflamación.

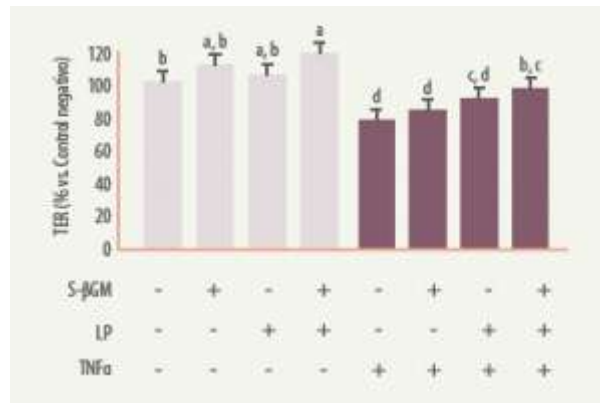


Figura 7. Efecto de los β -galactomananos vegetales hidrolizados (S- β GM, SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.) y de su combinación con *Lactobacillus plantarum* (LP) sobre la permeabilidad epitelial (TER: resistencia eléctrica transepitelial) en cultivos celulares Caco-2 en condiciones basales y de adición de TNF α en el medio. J Nutr Biochem. 2017; 41: 20-24.

Estos efectos sinérgicos entre β GMH y *Lactobacillus*, que no sólo se observan en condiciones de inflamación y deterioro de la función barrera epitelial, sino también en condiciones basales (figura 7), podrían deberse a un efecto positivo de estos polisacáridos sobre las bacterias ácidolácticas. De hecho, en este mismo artículo científico se refleja que la incorporación de β GMH en el medio de cultivo de *Lactobacillus plantarum* incrementa de manera significativa el recuento de estas bacterias probióticas (figura 8), confirmando así el efecto prebiótico de los β GMH.

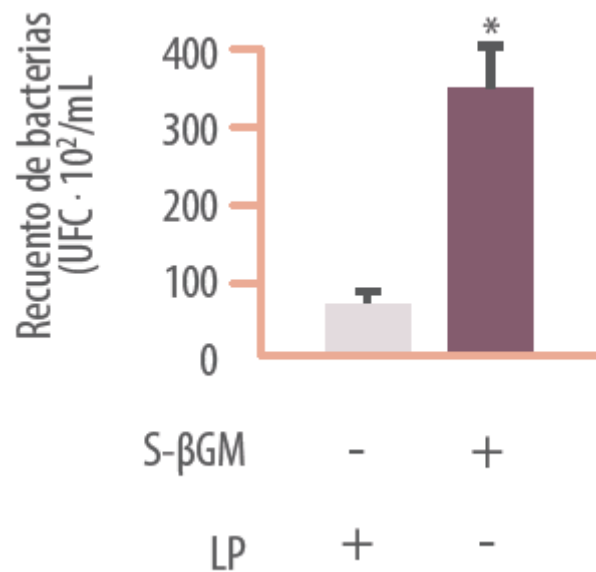


Figura 8. Efecto de los β -galactomananos vegetales hidrolizados (S- β GM, SALMOSAN. Industrial Técnica Pecuaria, S.A.) sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* (LP). J Nutr Biochem. 2017; 41: 20-24.

En condiciones in vivo, parte de los efectos sobre la función barrera intestinal podría deberse entonces a la modificación de la composición de la microbiota intestinal, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas, como las del género *Lactobacillus*, y bloqueando enterobacterias potencialmente patógenas como *Salmonella* y *E. coli*.

CONCLUSIONES

La integridad de la función barrera intestinal es esencial para preservar la salud del animal, reduciendo el riesgo de enfermedades infecciosas y contribuyendo al adecuado mantenimiento de las funciones fisiológicas intestinales.

Los β -galactomananos vegetales hidrolizados actúan uniéndose a las fimbrias de enterobacterias como *Salmonella* spp. y *E. coli*, bloqueando su mecanismo de adhesión al epitelio y evitando su colonización.

Los β -galactomananos vegetales hidrolizados presentan efecto prebiótico, promoviendo el crecimiento de *Lactobacillus*.

Los β -galactomananos vegetales hidrolizados tienen propiedades inmunomoduladoras y presentan efectos beneficiosos sobre la función barrera intestinal, tanto en condiciones de exposición a patógenos, como en condiciones basales.