

# PERMEABILIDAD INTESTINAL Y PATOLOGÍAS AUTOINMUNES

María del Carmen Franco García

Grado en Farmacia, Facultad de  
Farmacia, Universidad de Sevilla



Trabajo Fin de Grado

Septiembre 2016



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Farmacia**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Título del trabajo: Permeabilidad Intestinal y Enfermedades Autoinmunes.**

**Autor: María del Carmen Franco García**

**Fecha: En Sevilla, a 19 de Septiembre de 2016.**

**Lugar de presentación: Sala de Juntas**

**Grado en Farmacia**

**Departamento de Fisiología**

**Tutora: Dra. Ana Ilundáin Larrañeta**

**Tipología del Trabajo de Fin de Grado: Revisión Bibliográfica**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>SISTEMA DE DEFENSA ADQUIRIDO.....</b>	<b>5</b>
<b>Sistema inmune secretor de IgA.....</b>	<b>5</b>
<b>SISTEMA DE DEFENSA INNATO.....</b>	<b>6</b>
<b>El epitelio intestinal .....</b>	<b>6</b>
<i>Estructura del epitelio .....</i>	<i>6</i>
<i>El moco .....</i>	<i>7</i>
<i>Proteínas y péptidos antimicrobianos.....</i>	<i>7</i>
<i>Receptores PPRs.....</i>	<i>8</i>
<b>LAS UNIONES OCLUYENTES O TIGHT JUNCTIONS (TJs) .....</b>	<b>8</b>
<b>La zonulina.....</b>	<b>10</b>
<i>Estructura de zonulina.....</i>	<i>11</i>
<i>Mecanismo de acción intestinal de la zonulina.....</i>	<i>11</i>
<b>PATOLOGÍAS AUTOINMUNES.....</b>	<b>12</b>
<b>La enfermedad celíaca (celiac disease o CD) .....</b>	<b>12</b>
<b>Diabetes Mellitus .....</b>	<b>13</b>
<b>Asma .....</b>	<b>14</b>
<b>Esclerosis múltiple (MS) .....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS del TFG.....</b>	<b>15</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>Efecto de las bacterias sobre la producción de zonulina.....</b>	<b>17</b>
<b>La zonulina y la enfermedad celíaca.....</b>	<b>18</b>
<b>La zonulina y la diabetes tipo 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>La zonulina y el asma .....</b>	<b>22</b>
<b>La zonulina y la esclerosis múltiple (ME) .....</b>	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>
<b>Bibliografía consultada no referenciada en el texto .....</b>	<b>29</b>

## **RESUMEN**

El epitelio intestinal separa el interior y el exterior del organismo. Supone una barrera que limita el paso a agentes patógenos que pueden comprometer la salud del individuo, pero a su vez debe permitir la absorción de nutrientes y sustancias necesarias o beneficiosas para el mismo.

El moco que recubre todo el epitelio intestinal, la IgA secretada por el epitelio y retenida en el moco, las sustancias antimicrobianas secretadas por las Células Paneth y otras células epiteliales constituyen la primera barrera físico-química. Una vez superada, los microorganismos deben atravesar el epitelio, bien a través de las células o bien a través de los espacios que dejan entre ellas. Las uniones ocluyentes sellan los espacios entre células adyacentes y dotan al epitelio de una permeabilidad paracelular, impidiendo la penetración de microorganismos y moléculas patógenas. Si estas estructuras se alteran, pueden acceder al interior estas especies e iniciar una respuesta autoinmune en el organismo.

El único regulador fisiológico de las uniones ocluyentes conocido es la zonulina, secretada por el epitelio intestinal en respuesta a microorganismos y el gluten. Actúa en el epitelio intestinal abriendo dichas uniones y provocando un aumento de permeabilidad intestinal. Exceso de zonulina puede suponer una permeabilidad intestinal excesiva que posibilitaría el paso de moléculas patógenas hacia el interior y activaría el sistema inmune del individuo. En el presente trabajo hemos hecho una revisión bibliográfica y hemos observado una relación entre la concentración de zonulina en plasma y el desarrollo de patologías autoinmunes como la enfermedad celíaca, la diabetes, el asma o la esclerosis múltiple

Concluimos que la zonulina puede suponer un marcador y/o una diana tanto para el diagnóstico, como para el tratamiento o la prevención de este tipo de enfermedades.

**Palabras clave: zonulina - permeabilidad intestinal - uniones ocluyentes- enfermedad autoinmune**

## INTRODUCCIÓN

La mucosa intestinal está formada por el epitelio y la lámina propia, que a su vez está formada por tejido conjuntivo laxo. La mucosa intestinal representa una importante barrera frente a la invasión de microorganismos y al paso de macromoléculas patógenas hacia el interior del organismo a nivel del tracto gastrointestinal. El sistema de defensa de la mucosa podemos dividirlo en sistema innato (respuesta inmediata) y el sistema adquirido (respuesta mediada por células B y T que tardan entre 3-5 días en responder) (Figura 1).

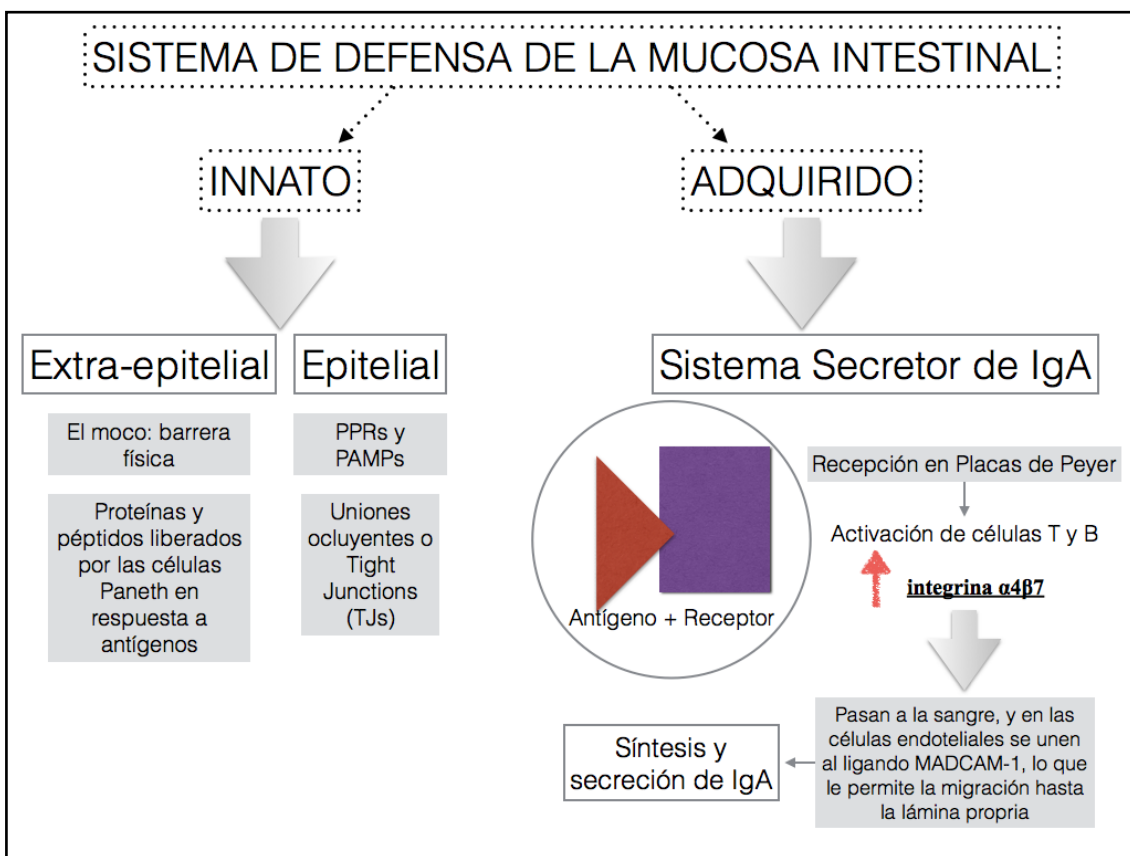


Figura 1. Sistema de defensa de la mucosa intestinal.

## SISTEMA DE DEFENSA ADQUIRIDO

El sistema adquirido se corresponde con el sistema inmune adquirido del que destaca el sistema inmune secretor de IgA.

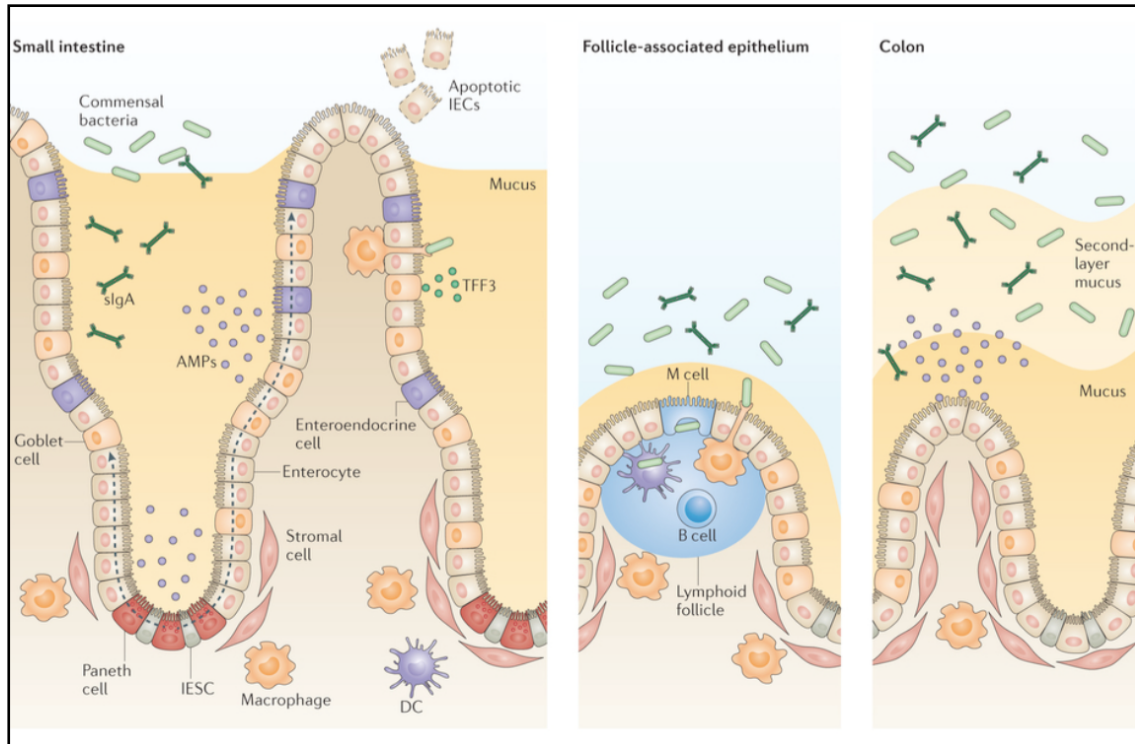


Figura 2. Estructura del epitelio intestinal (Tomada de Lance y cols., 2014).

### Sistema inmune secretor de IgA

La IgA está inmersa en la capa de moco e impide la adherencia y penetración de bacterias hacia los tejidos inertes del organismo. En humanos, la mayoría de las células secretoras de IgA se encuentran en la mucosa intestinal. Las células plasmáticas que se acumulan en la lámina propia secretan IgA en su forma polimérica (pIgA) (Zhang Q y cols., 2015) la cual debe ser transportada hacia el lumen intestinal a través de las células epiteliales (en la sangre la IgA predomina en su forma monomérica). Este proceso está mediado por el receptor pIgR presente en la membrana basolateral de las células epiteliales. En mamíferos, la expresión de este receptor está mediada por múltiples citocinas proinflamatorias, como interferón-gamma, TNF o IL-3 (Zhang Q y cols., 2015). La microbiota, a su vez, puede regular directamente, o a través de sus productos de fermentación, la actividad de esta barrera.

De esta manera, cuando el antígeno de un microorganismo es reconocido en los

folículos linfáticos de la mucosa, ya sean individuales o congregados en lo que se denomina “Placa de Peyer”, se activan las células B y T de la Placa de Peyer que migran a la sangre y de aquí, ya transformadas en células plasmáticas, a la lámina propia (Elphick DA, Mahida YR., 2005). Una vez allí, la lámina propia se llena de células plasmáticas secretoras de IgA que actúan contra los microorganismos.

## **SISTEMA DE DEFENSA INNATO**

### **El epitelio intestinal**

El epitelio intestinal está compuesto por una capa simple de células que forman una barrera entre el exterior y el interior de nuestro organismo, la cual está en constante contacto con diferentes nutrientes y microorganismos presentes en nuestro tracto gastrointestinal (Zhang K y cols., 2015). Esta barrera debe discernir entre aquellos agentes perjudiciales para la integridad del individuo y aquellos pertenecientes a la flora intestinal, así como permitir el paso de aquellas sustancias necesarias (nutrientes) y/o ventajosas para el organismo. Para mantener este complejo equilibrio, el epitelio intestinal cuenta con una serie de barreras físicas y químicas decisivas para la integridad del organismo.

#### *Estructura del epitelio*

El epitelio intestinal se renueva totalmente cada 3-4 días mediante una secuencia bien organizada en el espacio y en el tiempo de proliferación, diferenciación, muerte y descamación celular. La continua renovación celular se abastece mediante células madre multipotentes, localizadas en las criptas, que generan cuatro líneas celulares: las Paneth, los enterocitos, las Goblet y las enteroendocrinas (Figura 3). Más recientemente se han descrito otros dos tipos celulares: las células M (Miller y cols., 2007) y las brush (Sbarbati y Osculati, 2005).

La proliferación celular cesa en la unión cripta-vellosidad y la vellosidad constituye el compartimento de diferenciación y funcionalidad celular. Las nuevas células, o bien descienden y se sitúan en la parte más profunda de las criptas (células Paneth), o migran a lo largo del eje cripta-vellosidad diferenciándose morfológica y funcionalmente en las diferentes células antes mencionadas. Una vez alcanzada la punta de la vellosidad, las células entran en apoptosis o sufren anoikis, y se exfolian a la luz del intestino (ver revisión de van der Flier y Clevers, 2009).

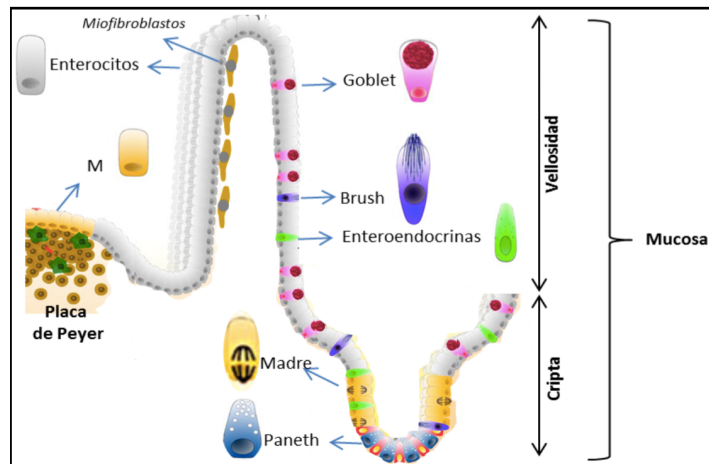


Figura 3. Células del epitelio intestinal. (Esquema adaptado de Gerbe y cols., 2011).

### *El moco*

La primera línea de defensa es el moco que recubre toda la capa de células epiteliales. El moco es producido por las células Goblet y está compuesto mayoritariamente por una glicoproteína llamada mucina 2 (MUC 2) (Zhang Q y cols., 2015) y por factores “trébol”, entre otros. Estudios en ratones señalan que una disminución de mucina se relaciona con un aumento de la permeabilidad intestinal, con la colitis y con otras alteraciones a nivel intestinal.

### *Proteínas y péptidos antimicrobianos*

La inmunidad innata cuenta con proteínas y péptidos antimicrobianos que actúan sobre la pared de los patógenos, atrapándolos en el moco y permitiendo su eliminación a través del peristaltismo intestinal.

En la secreción de estas sustancias tienen especial importancia las células Paneth, localizadas en el fondo de las “criptas de Lieberkühn”. Estas células responden a la estimulación bacteriana liberando proteínas y péptidos antimicrobianos. Ejemplos importantes son la lisozima, las defensinas y la fosfolipasa A2 (Elphick DA, Mahida YR., 2005).

La lisozima es una proteína que actúa frente a bacterias Gram (+), y lo hace rompiendo enlaces glicosídicos del peptidoglicano y comprometiendo la integridad de la pared bacteriana. Las defensinas son pequeños péptidos catiónicos que se sintetizan como precursores polipeptídicos y que, en su forma activa forman un poro en la



membrana del microorganismo provocando la lisis del mismo. La fosfolipasa A posee actividad bactericida contra *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.

### Receptores PRRs

Por otro lado, a nivel del epitelio intestinal, existen los llamados PRRs (pattern recognition receptors) que reconocen lo que se denominan PAMPs (pathogen associated molecular patterns), moléculas características de un gran número de microorganismos patógenos (p.e. lipopolisacáridos o peptidoglicanos) pero no de aquellos propios de la microbiota. Se trata de receptores inespecíficos que reconocen a un gran número de agentes patógenos.

En mamíferos, TLRs (toll-like receptors) y NOD (nucleotid binding oligomerisation domain) son dos tipos de PRRs (Elphick DA, Mahida YR., 2005). El primero es un receptor transmembrana, que reconoce a los patógenos que entran en contacto con la mucosa e inicia en el interior celular una cascada de señalización para generar una respuesta frente al patógeno. El segundo es una proteína citosólica que reconoce a aquellos antígenos que ya han invadido el interior celular. El NOD2, por ejemplo, está expresado en las Células Paneth (Elphick DA, Mahida YR., 2005).

### LAS UNIONES OCLUYENTES O TIGHT JUNCTIONS (TJs)

Además de toda esta compleja barrera contra agentes patógenos, es muy importante que el epitelio intestinal permita el paso de agua y moléculas hacia el interior y evite el paso de los patógenos. Esto se consigue sellando los espacios entre las células adyacentes y dotando al epitelio intestinal de permeabilidad (figura 4).

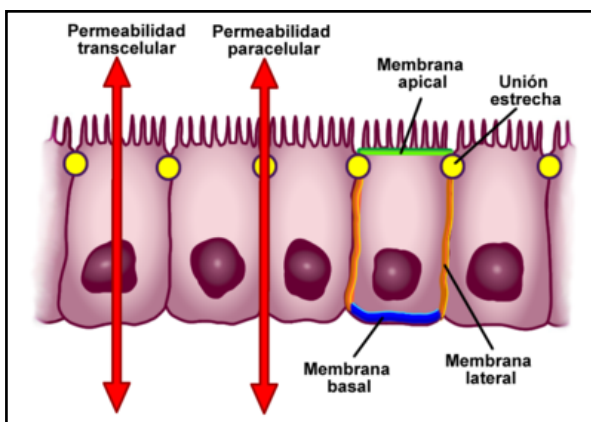


Figura 4. El epitelio intestinal regula el paso de moléculas y líquidos a través de las células (permeabilidad transcelular) y los espacios entre ellas (permeabilidad paracelular).

Las células que componen el epitelio están fijadas a la membrana basal mediante las uniones focales (integrinas que se concentran en zonas de la membrana basal

formando uniones con la matriz extracelular), y a su vez se unen entre ellas mediante uniones intercelulares. En el epitelio intestinal las uniones intercelulares que lo forman son de barrera (uniones ocluyentes o estrechas) y de conexión (adherentes y desmosomas) (Figura 5). Las uniones ocluyentes forman una especie de cinturón alrededor de las células, mientras que las adherentes y los desmosomas son uniones puntuales. Estas tres uniones están formadas por proteínas transmembrana cuyos extremos extracelulares contactan (células ocluyentes o TJ) o se solapan (células adherentes y desmosomas) con las proteínas contiguas y por su extremo citosólico se unen al citoesqueleto. Las uniones ocluyentes y adherentes contactan con los filamentos de actina del citoesqueleto, mientras que los desmosomas lo hacen a los filamentos intermedios. No se trata de estructuras estáticas, sino que representan micro-dominios altamente dinámicos que responden a señales tanto intra- como extra-celulares modificando su función. El ensamblaje de estas uniones es esencial para la integridad estructural del epitelio intestinal y su alteración puede tener graves consecuencias como diarrea, edema e infección, o desarrollo de patologías intestinales y autoinmunes. (Capaldo. y cols., 2014).

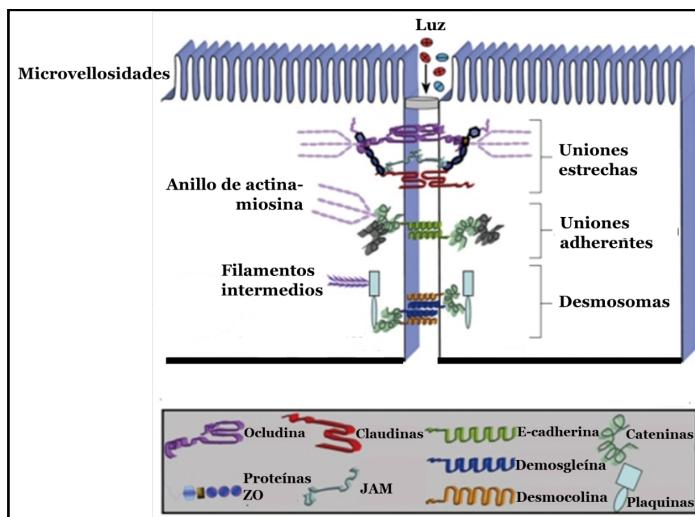


Figura 5. Esquema de las uniones intercelulares de la membrana lateral del epitelio intestinal (esquema adaptado por Laukoetter y cols., 2008)

Las funciones más estudiadas de las uniones ocluyentes son el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y la regulación de la permeabilidad paracelular. Así, las uniones ocluyentes controlan el paso de sustancias por carga y tamaño limitando el paso de macromoléculas al interior del organismo. Al mismo tiempo mantienen la polaridad celular al evitar la difusión intermembrana entre dominios de la membrana apical y basolateral de las células (Shin y cols., 2006). Sus proteínas

transmembrana son: ocludinas, claudinas, moléculas de adhesión intercelular (JAM) y tricelulinas (Figura 6). Éstas últimas las encontramos allí donde contactan tres células. El extremo citosólico de las proteínas transmembrana se une al citoesqueleto de actina a través de las proteínas ZO (zonula occludens) 1, 2 y 3, entre otras. A su vez, otros filamentos de actina están unidos a filamentos de miosina que cuando se activan desencadenan la contracción y apertura de la vía paracelular. Las claudinas son las responsables de determinar y regular la permeabilidad paracelular a sustratos y agua, y las ocludinas de mantener la polaridad epitelial. Diversos factores pueden afectar a la integridad y funcionamiento de estas uniones, entre ellos las citocinas inflamatorias TNF o interleucinas. Estos factores inducen la fosforilación de la cadena ligera de miosina (Miosyn Light Chain o MLC) por la MLCK (Miosyn Light Chain Kinase), el citoesqueleto de actina se contrae y se abren las vías paracelulares y se produce un aumento de la permeabilidad (Lee, 2015). Participan también en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular (Shin y cols., 2016)

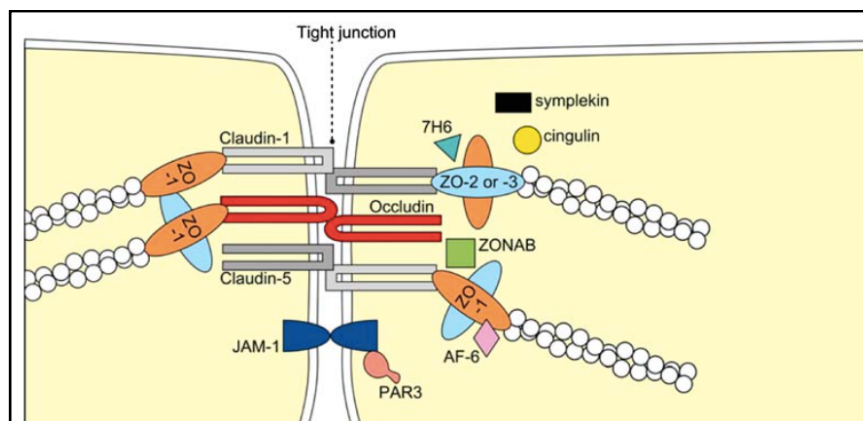


Figura 6. Proteínas de las TJs. La proteína transmembrana ocludin, las claudins y JAM-1 constituyen la barrera formada por las TJs sellando los espacios paracelulares. (Tomado de Förster, 2008).

### La zonulina

A día de hoy, la zonulina es el único regulador fisiológico de las TJs conocido. Se descubrió que una enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* (toxina zonula occludens o Zot) abría reversiblemente las TJs (Fasano, 2012). A pesar de que la estructura de las TJs es bien sabida, el papel fisiológico del sistema de zonulina está aun por establecer. Es probable que este sistema esté implicado en varias funciones, incluyendo la

regulación de las TJs responsable del movimiento de fluidos, macromoléculas y leucocitos entre los compartimentos del cuerpo (Fasano, 2008) separados por el epitelio intestinal.

### *Estructura de zonulina*

La zonulina ha sido identificada como una pre-haptoglobina (Pre-HP) 2 o precursor inactivo de HP2, que es una de las dos variantes genéticas conocidas (junto con HP1) en humanos. Las HPs humanas son glicoproteínas plasmáticas heterodiméricas: poseen una cadena alfa, de la que existen dos formas ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), y un polipéptido  $\beta$  constante. Según la presencia de una u otra cadena, surgen tres fenotipos distintos:

- \* HP1-1 homocigótico
- \* HP2-1 heterocigótico
- \* HP2-2 homocigótico

La única función conocida de las HPs es evitar el daño tisular oxidativo formando complejos con la hemoglobina (HP-Hb). Se secretan de manera inusual y se procesan proteolíticamente en el retículo endoplasmático.

### *Mecanismo de acción intestinal de la zonulina*

La zonulina se detecta en forma no escindida en el suero humano regulando la permeabilidad intestinal por trans-activación del receptor EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) a través de PAR2 (Rittirsch D y cols., 2013) y abriendo las TJs. El mecanismo por el cual la zonulina modifica la permeabilidad intestinal se muestra en la figura 7.

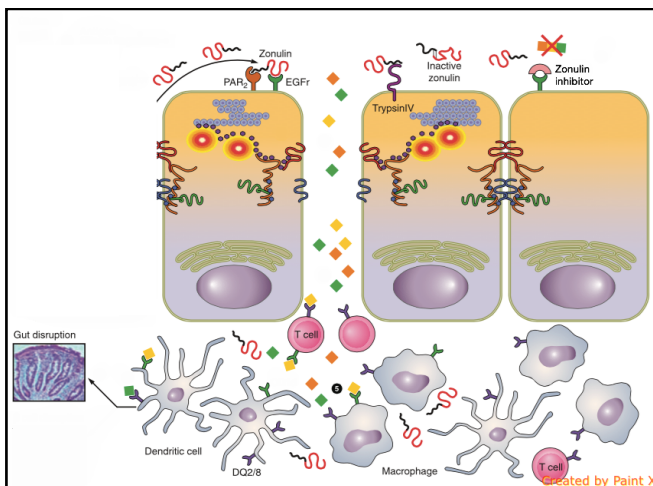


Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para zonulina en el intestino (modificada de Fasano, 2011).

Una posible función fisiológica de la zonulina es la protección contra la colonización de microorganismos (Fasano, 2008) a través de la apertura de las TJs y la secreción masiva de agua para eliminar los patógenos de la luz intestinal por “lavado”. Sin embargo, el aumento de los niveles de zonulina y la apertura de las TJs, además de la secreción de agua al la luz intestinal, puede permitir el paso de moléculas hacia interior del organismo que pueden ser reconocidas por parte del organismo como antígenos. La similitud estructural de algunas de estas moléculas con moléculas propias del organismo puede confundir a éste y los anticuerpos liberados por el sistema inmune pueden atacar tanto a los antígenos como a células propias del individuo ocasionando la patología autoinmune.

## **PATOLOGÍAS AUTOINMUNES**

La función del sistema inmune es proteger al organismo de infecciones y otras enfermedades, pero cuando el sistema inmune se convierte en el agresor, ataca a las células del propio organismo destruyendo tejidos y órganos. Son enfermedades autoinmunes la celiaquía, la diabetes, el asma o la esclerosis múltiple entre otras.

### **La enfermedad celíaca (celiac disease o CD)**

Es una enfermedad enteropática crónica y sus manifestaciones son muy distintas según el individuo. Esta enfermedad está ligada a un gen (gen HLA) que determina el riesgo de padecer la enfermedad.

Algunos individuos predispuestos reconocen una glucoproteína (gliadina) del gluten proveniente del trigo como un antígeno (puede ocurrir también con proteínas que son similares, como la de la cebada o el centeno). El gluten está formado por gliadina y gluteninas y existen al menos 50 epítomos diferentes en péptidos del gluten que son tóxicos para los celíacos y que pueden actuar como citotóxicos, inmunomoduladores o pro-inflamatorios (Fasano, 2012) provocando cambios en las vellosidades del intestino. Cuando la gliadina atraviesa el epitelio y llega a los macrófagos de la submucosa intestinal se inicia la respuesta por parte del organismo que induce la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias (citocinas) que provocan inflamación intestinal y aumento de la permeabilidad (Thomas, 2006). Las vellosidades del epitelio se dañan y se pierde la función de la barrera intestinal. Hasta hace unos años se desconocía cómo los péptidos del gluten atraviesan el epitelio intestinal. Actualmente, el único

tratamiento para los pacientes con CD es eliminar el gluten de la dieta ya que la respuesta intestinal disminuye e incluso acaba por desaparecer. El estudio de los mecanismos por el cual el organismo responde a la exposición de gliadina es clave a la hora de buscar alternativas para un posible tratamiento de la CD.

### **Diabetes Mellitus**

Se trata de una enfermedad crónica que puede deberse bien a una incapacidad del organismo de sintetizar insulina o bien por la aparición de una resistencia a la insulina. La insulina es una hormona polipeptídica que se sintetiza y se secreta por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Se libera en situación post-prandial y permite que la glucosa que ingerimos en la dieta se acumule en las células en forma de glucógeno, grasas y proteínas. Los pacientes que sufren esta enfermedad padecen hiperglucemia. Existen varios tipos de diabetes, entre los que destacan la diabetes tipo 1 y tipo 2.

En la diabetes tipo 1 o diabetes juvenil se produce una respuesta inmune del organismo que ataca a las células beta del páncreas encargadas de la síntesis de insulina. Por ello, los pacientes que sufren este tipo de diabetes no tienen (o tienen muy poca) insulina. Se les llama también insulino-dependientes: deben inyectarse insulina cada día para controlar sus niveles de glucemia en sangre. Otro tipo de diabetes es la tipo 2 o diabetes no insulino-dependiente. Puede darse a cualquier edad y suele estar relacionada con la obesidad. Se caracteriza por una resistencia a la insulina y, como respuesta, el organismo aumenta la síntesis de ésta. La continua estimulación de las células beta-pancreáticas llega a destruirlas y terminan por ser insulino-dependientes.

La obesidad es un factor que afecta directamente al metabolismo y al sistema inmune. Una hiperlipidemia induce al organismo a aumentar la captación de ácidos grasos en el músculo, y se producen metabolitos que estimulan la inflamación. El TNF-alfa es una citocina pro-inflamatoria que en pacientes con obesidad está sobreexpresada en el tejido adiposo. Una inflamación crónica, aunque sea de bajo grado, puede producir una resistencia a la insulina porque las señales intracelulares que se activan en la inflamación inhiben las vías de señalización de la insulina (Miranda, 2008). Aunque se sabe que la obesidad y la inflamación están relacionadas se desconoce aún la relación causa-efecto entre ambas y conocerla es objeto de estudio ya que podría suponer un

gran avance a la hora de conocer la fisiopatología de la diabetes y mejorar el modo en el que se trata.

### **Asma**

Se trata de una enfermedad crónica en la que se produce una inflamación de las vías respiratorias que disminuye el diámetro de éstas. Produce una limitación (aguda o crónica) del flujo de aire hacia los alvéolos como resultado de una bronco-constricción, edema y exceso de secreción de mucosa. Es una enfermedad multifactorial en la cual existe una interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso autónomo (Río-Navarro y cols., 2009).

### **Esclerosis múltiple (MS)**

Es una enfermedad crónica en la que se afecta la vaina de mielina o materia blanca del sistema nervioso central. Con el progreso de la enfermedad se producen placas escleróticas en el sistema nervioso que impiden el normal funcionamiento de las fibras nerviosas. Las diversas manifestaciones de esta enfermedad tienen que ver con la parte del cerebro que se ve afectada, es decir, el lugar donde se forman las placas escleróticas. Además existen varios tipos diferentes de esclerosis múltiple según el desarrollo de la enfermedad entre las que destacan la esclerosis múltiple remitente-recurrente (RRMS) y la esclerosis primaria progresiva (PPMS). La RRMS es la más frecuente y tras un brote, aunque no se llega a alcanzar el estado inicial, existe una mejoría. En la PPMS no existen brotes y tampoco hay mejoría: el paciente va perdiendo capacidad neuronal de manera continua.

## **OBJETIVOS del TFG**

Los objetivos a alcanzar en esta revisión bibliográfica son conocer:

1. La relación entre la zonulina y la permeabilidad intestinal.
2. La relación entre la zonulina y patologías autoinmunes.



## **METODOLOGÍA**

Se ha realizado una revisión bibliográfica sobre la barrera intestinal y patologías autoinmunes. Para la localización de los documentos bibliográficos que se han utilizado en dicha revisión se ha acudido a bases de datos “on-line”. La búsqueda de artículos se realizó entre los meses enero y junio de 2016 en “PubMed” y “Mendeley”. Se emplearon las palabras clave: permeabilidad intestinal, uniones ocluyentes, zonulina y enfermedad autoinmune.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación vamos a describir una serie de experimentos que relacionan las bacterias entéricas y algunas patologías autoinmunes con un aumento en la permeabilidad intestinal inducida por zonulina.

### Efecto de las bacterias sobre la producción de zonulina

Para determinar si las bacterias afectaban a la producción de zonulina por el epitelio intestinal de mamíferos y a la permeabilidad paracelular del epitelio, se realizaron experimentos *in vitro* empleando monocapas de células intestinales. Éstas fueron expuestas a enterobacterias patógenas y no patógenas.

Los resultados se representan en la Figura 10 y muestran un aumento en la secreción de zonulina, independiente del tipo de bacteria (patógena o inocua). El aumento de zonulina fue seguida por una disminución en la resistencia eléctrica epitelial (Transepithelial Electrical Resistance o TEER), que es una medida de la permeabilidad paracelular.

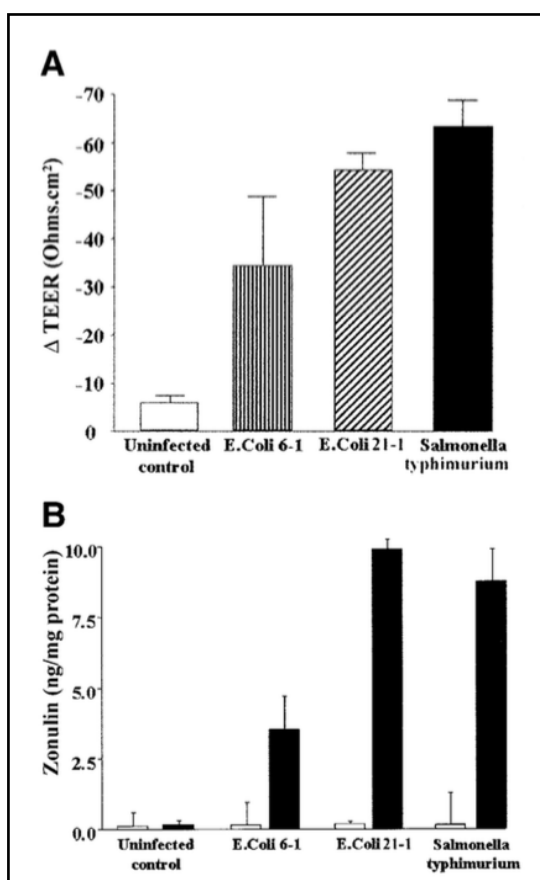


Figura 10. (A) Variaciones en la TEER en el intestino delgado de conejos que fueron expuestos durante 3 horas a *Escherichia coli* 6.1, (no patógena), *E.coli* 21-13 (patógena) o *Salmonella typhimurium*. Se muestra un grupo control sin infectar para la comparación. (B) Concentración media de zonulina recogida del intestino delgado de los conejos expuestos durante tres horas a *Escherichia coli* 6.1, (no patógena), *E.coli* 21-13 (patógena) o *Salmonella typhimurium*. Se muestran tejidos no infectados como grupo control para la comparación. (Tomada de El Asmar y cols., 2003)

## La zonulina y la enfermedad celíaca

Para demostrar que existe una relación entre la celiquía y la zonulina, se realizó un estudio con técnicas de inmunofluorescencia para detectar el receptor de gliadina (CXCR3) usando como muestras células humanas del intestino delgado procedentes de pacientes celíacos y no celíacos. En la Figura 12A pueden observarse los resultados de los cuales podemos concluir que en individuos celíacos los receptores de gliadina se expresan en mayor cantidad que en individuos sanos.

Estos resultados fueron confirmados usando una PCR para medir cuantitativamente y en tiempo real la expresión de los genes que codifican para CXCR3. La PCR, además de confirmar que en pacientes celíacos la expresión del receptor CXCR3 está aumentada, reveló que tras eliminar el gluten de la dieta, la expresión de estos receptores disminuía (Figura 12B).

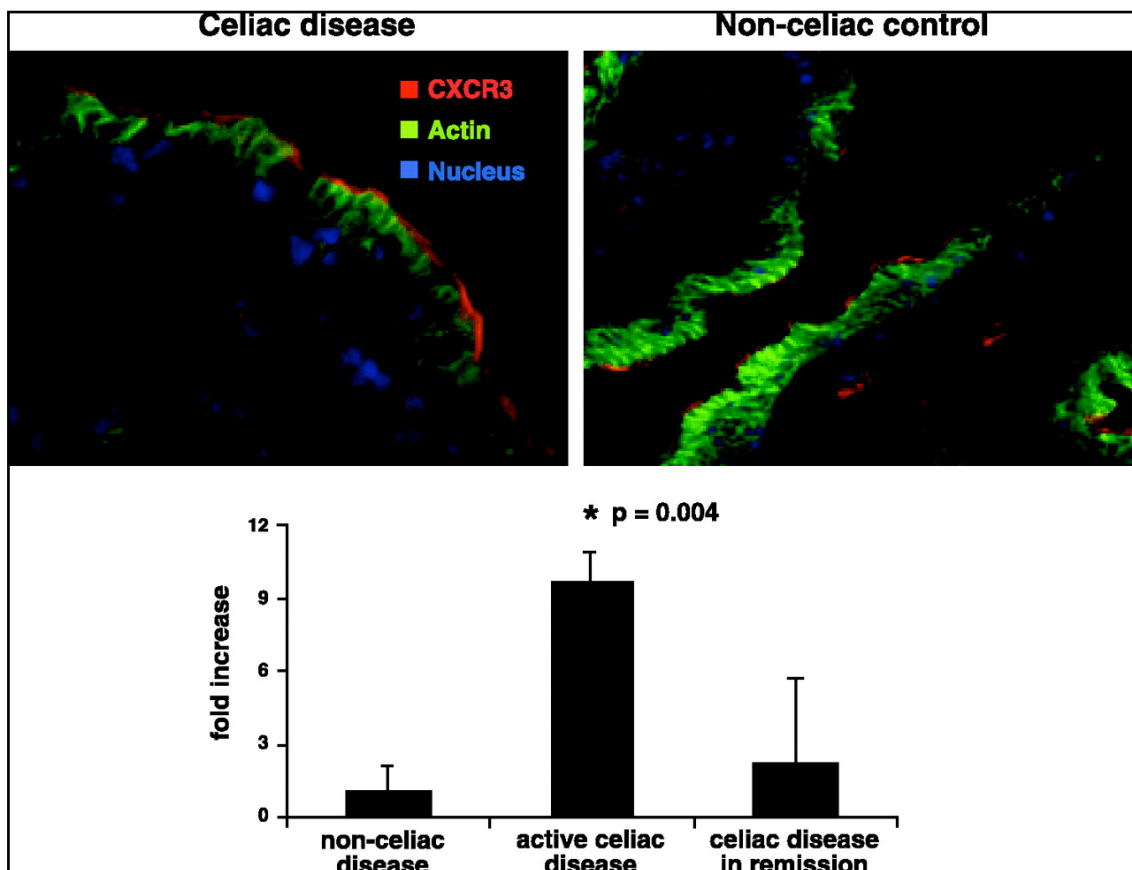


Figura 12A. Microscopía de inmunofluorescencia de CXCR3 en pequeñas biopsias intestinales humanas obtenidas a partir de un individuo celíaco y un individuo no celíaco (control). Figura 12B. Resultados cuantitativos de la expresión del receptor CXCR3 mediante PCR ( Tomada de Fasano, 2011).

Para confirmar una relación entre la gliadina y la estructura de las uniones ocluyentes fueron observadas células humanas del intestino delgado: control, expuestas a gliadina y expuestas a caseína (la caseína es una proteína derivada de alimentos que se usó como control negativo). Se marcó con fluorescencia la proteína ZO-1, componente de las uniones ocluyentes, y se observaron por microscopía. Los resultados se muestran en la Figura 13 y podemos observar cómo el grupo control muestra la típica localización de ZO-1 en la periferia de las células. Sin embargo, las células expuestas a gliadina mostraron una distribución diferente de ZO-1, con áreas del borde de la célula que perdieron o vieron reducida la tinción de ZO-1 y áreas donde no se detectaron cambios significativos. En el grupo expuesto caseína no se detectaron cambios en la localización de ZO-1 (Drago, 2006). Estas observaciones indican que la gliadina desestructura las uniones ocluyentes.

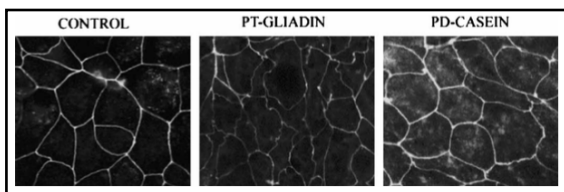


Figura 13. Efectos de gliadina sobre la distribución de ZO-1 en células CaCO<sub>2</sub> (Tomada de Drago, 2006).

También se realizaron experimentos para determinar si los celíacos presentan altas concentraciones de zonulina y aumentada la permeabilidad paracelular. Se emplearon biopsias duodenales de humanos, que se obtuvieron durante endoscopias rutinarias de diagnóstico tanto en pacientes celíacos en remisión como en pacientes no celíacos. Se monotorizó la TEER basal en ambos tipos de tejidos, así como los niveles de zonulina. Seguidamente ambas fueron expuestas a gliadina y a controles negativos y se volvió a medir la TEER y los niveles de zonulina. Los resultados pueden verse en la Figura 14 donde se puede observar una disminución significativa en la TEER en tejidos procedentes de pacientes celíacos tras la exposición a gliadina, y un aumento de la concentración de zonulina.

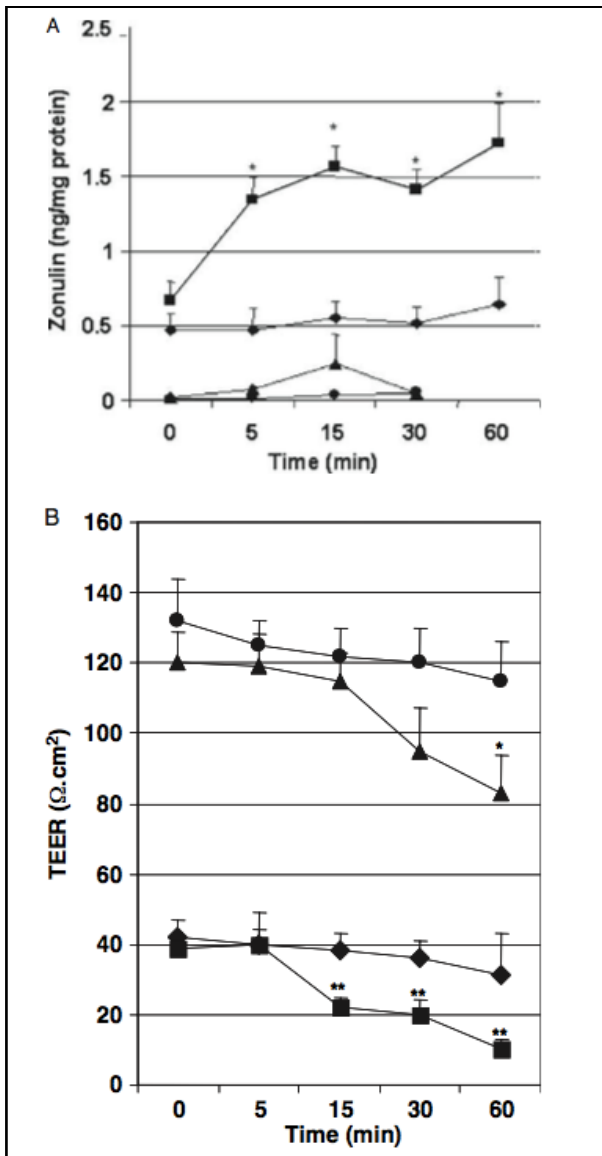


Figura 14. Variaciones en los niveles de zonulina y en la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en biopsias intestinales obtenidas de pacientes celíacos (CD), pacientes en remisión y pacientes no celíacos expuestas a gliadina. A.Variaciones de zonulina. Tras la exposición a gliadina, los tejidos obtenidos de pacientes celíacos mostraron un aumento en los niveles de zonulina en el lumen (cuadrado), pero no serológico (rombo). Por otro lado, las biopsias de pacientes no celíacos mostraron un aumento transitorio en la mucosa (triángulo) pero no en suero (círculo) B.Cambios en la TEER. Los tejidos obtenido de pacientes celíacos en remisión y pacientes no celíacos mostraron una disminución temporal de la TEER (triángulo) comparada con la TEER basal (círculo) asociado al aumento en los niveles de zonulina. En tejidos procedentes de pacientes celíacos se observó un descenso significativo de la TEER (cuadrado) comparado con su TEER basal (rombo) tras 15 minutos desde la exposición a gliadina (Tomada de Drago, 2006).

Estos y otros estudios han llevado a proponer el siguiente mecanismo de acción por el cual la gliadina induce cambios en la estructura del epitelio intestinal (Figura 15).

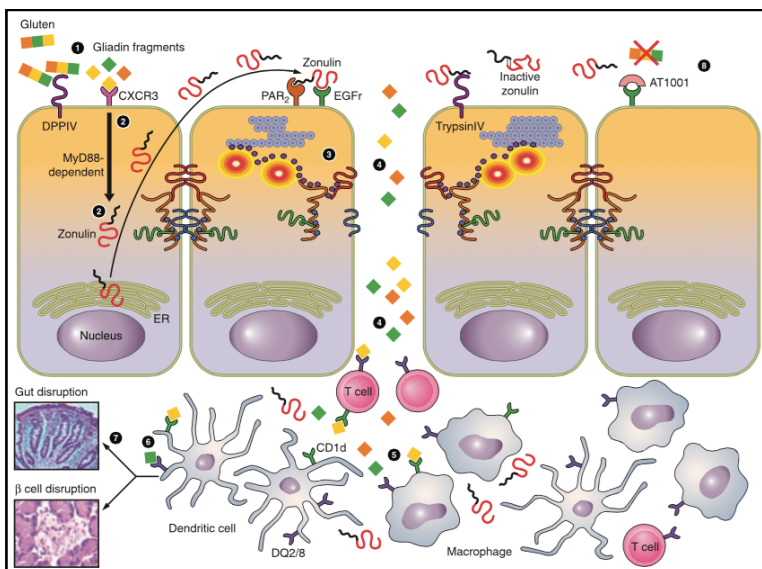


Figura 15. Mecanismo de acción de gliadina (Tomada de Fasano, 2011)

## La zonulina y la diabetes tipo 1

Para verificar la asociación entre los niveles de zonulina y el aumento de permeabilidad intestinal en pacientes con DT1 se han realizado estudios retrospectivos para determinar la relación temporal entre el aumento de concentración de zonulina y la aparición de diabetes tipo 1. Se emplearon muestras serológicas de pacientes con riesgo de padecer la enfermedad (con antecedentes familiares y que presentaban el HLA compatible con la enfermedad). Las muestras se clasificaron según su origen en tres grupos:

1. Muestras de pacientes ya diagnosticados.
2. Muestras de pacientes con riesgo de padecer la enfermedad y con expresión de anticuerpos específicos.
3. Muestras de pacientes con riesgo pero sin expresión de anticuerpos específicos.

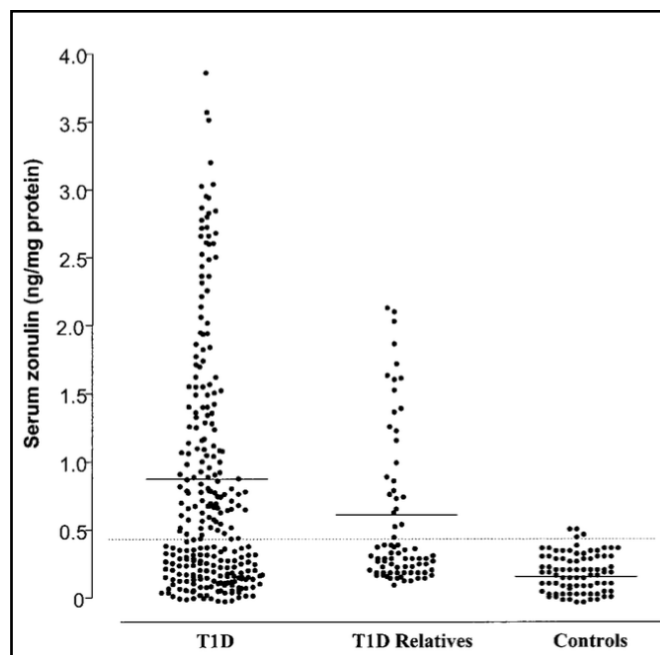


Figura 16. Niveles de zonulina en muestras de pacientes con diabetes tipo 1 (DT1; n=339), pacientes familiares de primer grado (N=89) y pacientes control de edad y sexo (n=97). (Tomada de Sapone y cols., 2006)

En la Figura 16 se observan los resultados y podemos señalar una diferencia significativa entre los niveles de zonulina en pacientes con TD1 y los niveles de zonulina en sus familiares y el grupo control. Además de observar que en pacientes con DT1 los niveles séricos de zonulina están aumentados con respecto a los otros grupos, no se establece ninguna correlación con la edad de diagnóstico ni con el sexo.

Para comprobar la existencia de modificaciones en la permeabilidad intestinal en pacientes con diabetes tipo 1, se midió mediante PCR la expresión de los genes que codifican para proteínas de las TJs. Se utilizaron muestras de tejido intestinal procedentes de pacientes con TD1 (n=5), de sus familiares (n=3) y de un grupo control (n=5). Los resultados que se muestran en la figura 17 hacen referencia a los resultados del grupo que padece TD1 en comparación con el grupo control y no revelan grandes cambios en los niveles de ZO-1 o de ocludina. Sin embargo se aprecia un aumento de la expresión de claudina-1 y miosina de aproximadamente el doble, y una disminución de la expresión de claudina-2. Aunque podemos a priori pensar que en pacientes con TD1 la expresión de dichas proteínas está incrementada, este estudio se ve limitado por la pequeña dimensión de las muestras que impide la obtención de resultados estadísticamente significativos.

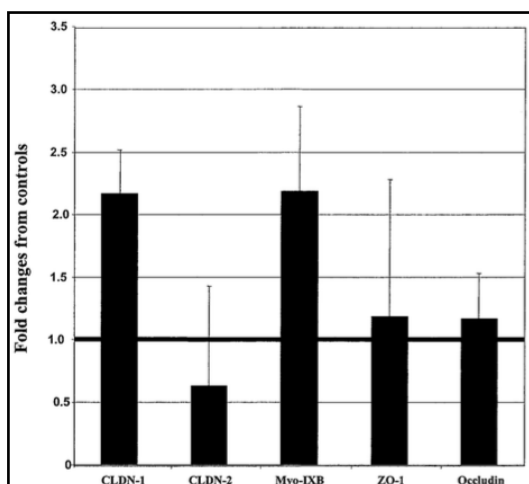


Figura 17. Expresión de genes que codifican para las proteínas de membrana de las TJs ocludina, claudina-1 (CLDN-1) y claudina-2 (CLDN-2), y para zonulina (ZO-1) y miosina (Myo-IXB. (Tomada de Sapone y cols., 2006).

### La zonulina y el asma

Aunque los mecanismo exactos que provocan la inflamación y obstrucción de los bronquios no es bien conocida, se sabe que en la inflamación intervienen células del sistema inmune, concretamente linfocitos T. La incidencia de inflamación intestinal en pacientes asmáticos induce a pensar en una posible relación entre el sistema inmune de la mucosa intestinal y la inflamación de los bronquios, pudiéndose dar la migración de linfocitos T de un sitio a otro (Hijazi y cols., 2004). Se piensa que un aumento en la permeabilidad intestinal en los asmáticos puede contribuir a la susceptibilidad a los alérgenos ambientales, proporcionando una ruta alternativa para la entrada de los antígenos a través de las TJs de la mucosa (Fasano, 2012).

Con el fin de conocer la incidencia de un aumento en la permeabilidad intestinal en pacientes con asma, se realizó un estudio en niños con asma diagnosticados en no menos de un año antes del estudio. Se excluyeron del estudio niños con evidencias de enfermedades digestivas, alergias a alimentos u otros condicionantes que pudieran asociarse con una inflamación intestinal. Además, se escogió un grupo control sometido a los mismos criterios de exclusión. A ambos grupos se le administró una solución de 10 ml con 1 gramo de lactulosa (molécula de alto PM que no es absorbida por el intestino) y 1 gramo de manitol (molécula de bajo PM absorbida por el intestino). A las cinco horas se tomaron muestras de orina y se analizaron las cantidades de los diferentes azúcares que fueron absorbidos. Los resultados se presentan en la Tabla 1 y muestran que el porcentaje de manitol excretado en orina es prácticamente similar en los dos grupos experimentales, pero existe un mayor porcentaje de lactulosa excretada en orina en el grupo con asma respecto al grupo control. Esto indica un aumento de la permeabilidad intestinal en los pacientes con asma ya que, en condiciones fisiológicas, la lactulosa no es absorbida por el intestino. Sólo si la integridad de éste se ve afectada y se aumenta la permeabilidad se posibilita la absorción de moléculas de mayor peso molecular como la lactulosa.

	Patients (n = 32)	Controls (n = 32)	p value
Volume of urine (l)	0.25 (0.11–0.45)	0.15 (0.08–0.27)	NS
L	2.29 (0.91–4.07)	0.69 (0.45–1.08)	0.002
M	11.82 (5.70–15.65)	11.28 (6.38–16.82)	NS
L:M	0.20 (0.11–0.40)	0.06 (0.04–0.09)	0.001

Results expressed as median (interquartile range).

Tabla 1. Porcentaje de lactulosa y manitol recogidos en orina y relación lactulosa/manitol (Tomada de Hijazi Z y cols., 2004)

### La zonulina y la esclerosis múltiple (ME)

Se sospecha que un virus, probablemente el virus de Epstein-Barr (VEB) u otro antígeno es el desencadenante de una respuesta inmune contra el sistema nervioso del propio individuo. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) se ve aumentada para permitir el paso de linfocitos que atacan y destruyen la mielina que



recubre los axones neuronales. Por ello se piensa que pacientes con MS podrían también experimentar un aumento de la permeabilidad intestinal (Fasano, 2011).

Para probar esta hipótesis se midieron los niveles de zonulina en pacientes con distintos subtipos de SM. En la Figura 18 se representan los resultados obtenidos comparando los niveles de zonulina en pacientes con MS con respecto a un grupo control y los niveles de zonulina en pacientes con MS en remisión con respecto a pacientes con brotes de MS.

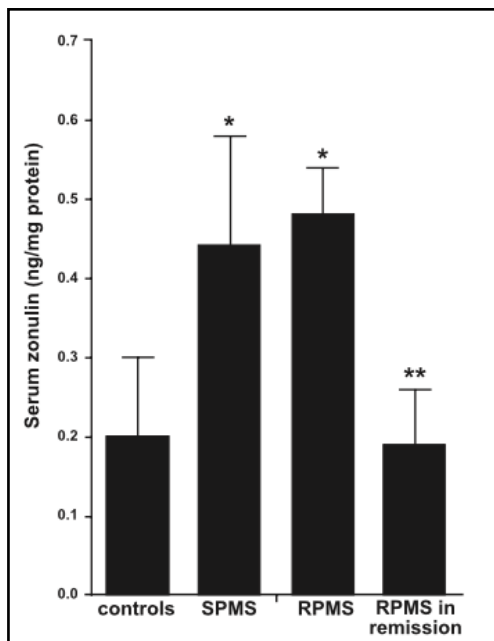


Figura 18. Niveles séricos de zonulina en pacientes con distintos tipos de esclerosis múltiple: pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente (RPMS) durante la exacerbación de la enfermedad (n=30) y durante la remisión (RPMS en remisión) (n=14), pacientes con esclerosis múltiple secundaria progresiva (SPMS) (n=18) y controles sanos (n=171). Los datos se presentan en comparación con los controles (\*) y en comparación con RPMS (\*\*). (Tomada de Fasano, 2011).

Cabe señalar el aumento de los niveles séricos de zonulina en pacientes que están desarrollando la enfermedad, así como los niveles normales de zonulina en pacientes con SM en remisión.

Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de mantener una barrera intestinal en condiciones óptimas de manera que las nuevas hipótesis relacionadas con las enfermedades autoinmunes establecen tres principios necesarios para que se de la enfermedad:

1. Una falta de comunicación entre el sistema inmune innato y el adquirido, es decir, una predisposición genética.
2. La presencia de un agente externo. En las primeras teorías lo consideraban tan solo un desencadenante de la enfermedad, pero con las nuevas hipótesis es considerado

un hecho necesario, por lo cual la eliminación del agente externo puede conllevar a la desaparición de la enfermedad.

3. Además del factor genético y ambiental, el tercer principio que debe existir es una pérdida de la función de la defensa de la mucosa gastrointestinal.

Mientras que la predisposición genética es dependiente de cada individuo concreto y el agente externo varía entre las diferentes enfermedades autoinmunes, la pérdida de función de la barrera intestinal parece ser un punto común en el desarrollo de estas patologías. Esto nos lleva a pensar en la barrera intestinal como un elemento clave para el estudio de nuevas técnicas terapéuticas. El desarrollo de mecanismos que impidan la secreción anormal de zonulina por parte del organismo podría suponer un gran avance en la calidad de vida de los pacientes que sufren estas enfermedades.

## **CONCLUSIONES**

1. Las bacterias y la gliadina estimulan la producción de zonulina por la mucosa intestinal.
2. Un aumento de la producción de zonulina se acompaña de un aumento en la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal.
3. Diversas patologías autoinmunes tienen en común que se acompañan de un aumento en la concentración de zonulina y permeabilidad paracelular.
4. El mantenimiento de la barrera intestinal es esencial para la homeostasis del organismo.
5. La zonulina puede ser un marcador y/o una diana tanto para el diagnóstico, como para el tratamiento o la prevención de enfermedades.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Capaldo CT, Farkas AE, Hilgarth RS, Krug SM, Wolf MF, Benedik JK, et al. Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins. *Mol Biol Cell*. 2014; 25(18): 2710-9.
2. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006; 41(4): 408-19
3. El Asmar R, Panigrahi P, Bamford P, Berti I, Not T, Coppa G V, et al. Erratum: Host dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterol*. 2002; 123: 1607-15.
4. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*. 2005; 54(12): 1802–9.
5. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 42(1): 71–8.
6. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *Am J Pathol*. 2008; 173(5): 1243–52.
7. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011; 91(1): 151–75.
8. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1258(1): 25–33.
9. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130(1): 55–70.
10. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *Cell Biol*. 2011; 192(5): 767-80. doi: 10.1083/jcb.201010127.
11. Hijazi Z, Molla AM, Al-Habashi H, Muawad WM, Sharma PN. Intestinal permeability is increased in bronchial asthma. *Arch Dis Child*. 2004; 89(3): 227–9.
12. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on

- Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res.* 2015; 13(1): 11-18.
13. Miranda-Garduño LM, Reza-Albarrán A. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac Med Mex.* 2008; 144(1): 39–46.
  14. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology.* 2014; 14: 141–153. doi: 10.1038/nri3608.
  15. Río-Navarro BE, Hidalgo-Castro EM, Sienna-Monge JJJ. Asma. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2009; 66(1): 3–33.
  16. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang MS, Grailer JJ, et al. Zonulin as prehepato-globin2 regulates lung permeability and activates the complement system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013; 304(12): L863–72.
  17. Sapone A, De Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* 2006; 55(5): 1443–9.
  18. Sbarbati A, Osculati F. A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat.* 2005; 206: 349-58.
  19. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 207–35.
  20. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are Myd88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J Immunol.* 2006; 176: 2512–21.
  21. Van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009; 71: 241-60. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
  22. Zhang K, Hornef MW, Dupont A. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell Microbiol.* 2015; 17(11): 1561–9.
  23. Zhang Q, Eicher SD, Applegate TJ. Development of intestinal mucin 2, IgA, and polymeric Ig receptor expressions in broiler chickens and Pekin ducks. *Poult Sci.* 2015; 94: 172–80.

### **Bibliografía consultada no referenciada en el texto**

24. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000; 358: 1518–19.
25. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell*. 2014; 388: 203–210. doi: 10.1007/s11010-013-1911-4.
26. Pizzuti D, Bortolami M, Mazzon E, et al. Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet. *Dig Liver Dis*. 2004; 36: 337-41. doi: 10.1016/j. dld.2004.01.013.
27. Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2015; 107(11): 686–96.
28. Wei X, Yang Z, Rey FE, Ridaura VK, Davidson NO, Gordon JI, et al. Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. *Cell Host Microbe*. 2012; 11(2): 140–52.