



# UNIVERSITAT DE BARCELONA

## Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària i el deteriorament cognitiu en un model d'envelliment

Alba Garcia Just

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**UNIVERSITAT DE  
BARCELONA**

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació  
Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària  
Departament de Bioquímica i Fisiologia  
Secció de Fisiologia  
Grup de Fisiologia Intestinal i Adaptacions Nutricionals**

**Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes  
plasmàtiques sobre la resposta immunitària i el  
deteriorament cognitiu en un model d'envelliment**

**Alba Garcia Just  
2017**





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació  
Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària  
Departament de Bioquímica i Fisiologia  
Secció de Fisiologia  
Grup de Fisiologia Intestinal i Adaptacions Nutricionals

Programa de doctorat:  
Alimentació i Nutrició

**Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes  
plasmàtiques sobre la resposta immunitària i el  
deteriorament cognitiu en un model d'envelliment**

Memòria presentada per **Alba Garcia Just** per optar al títol de doctor per la  
universitat de Barcelona

Dra. Anna Pérez Bosque   Dra. Lluïsa Miró Martí   Dr. Miquel Moretó Pedragosa   Alba Garcia Just  
(Directora)                      (Directora)                      (Tutor)                      (Doctoranda)

**Alba Garcia Just**  
**2017**







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Secció de Fisiologia  
Departament de Bioquímica i Fisiologia

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació  
Av. Joan XXIII, 27-31 ,Edifici B, 3ª planta  
08028 Barcelona

ANNA PÉREZ BOSQUE, professora lectora de Fisiologia, i LLUÏSA MIRÓ MARTÍ, professora associada de Fisiologia, ambdues del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN:

Que la memòria titulada **“Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària i el deteriorament cognitiu en un model d’envelliment”** presentada per Alba Garcia Just per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació i, considerant-la concludosa, autoritzen la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per què així consti, signem la present a Barcelona, el dia 19 de maig de 2017.

Dra. Anna Pérez Bosque

Dra. Lluïsa Miró Martí



Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes "*Effects of SDP on age-related variables in a mice model of accelerated senescence (SAM)*" i "*Effects of SDP on cognitive functions in SAMP8 mice*". Empresa finançadora: APC Europe S.L.U., Granollers (Barcelona). Projectes gestionats per la fundació Bosch i Gimpera de la Universitat de Barcelona, ref. 307200 i 308134, respectivament (Període 2014-2017). El grup forma part del grup consolidat Fisiologia i Nutrició Experimental (2014SGR1221; Generalitat de Catalunya). Durant la realització d'aquesta tesi, l'autora ha gaudit d'un contracte predoctoral (Període 2014-2017). L'assistència a congressos ha estat subvencionada amb borses de viatge concedides per la Comissió de Recerca de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona. Aquesta tesi s'ha realitzat en el Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació.



# ÍNDEX

---

---



<b>ÍNDEX</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDEX DE FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDEX DE TAULES</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>XIII</b>
<b>RESUM DE LA TESI</b> .....	<b>XIX</b>
<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Envelliment</b> .....	<b>3</b>
1.1. Teories de l'envelliment .....	3
1.1.1. Teories de l'envelliment deterministes .....	4
1.1.2. Teories de l'envelliment estocàstiques .....	4
1.2. Marcadors moleculars d'envelliment .....	5
1.3. Envelliment i patologies .....	9
<b>2. Fisiologia intestinal</b> .....	<b>11</b>
2.1. Teixit limfoide associat a les mucoses .....	13
2.1.1. GALT organitzat .....	14
2.1.2. GALT difús .....	16
2.1.3. Inducció i regulació de la resposta immunitària .....	17
2.2. Envelliment del sistema immunitari .....	19
<b>3. Sistema nerviós central</b> .....	<b>21</b>
3.1. Fisiologia cerebral .....	22
3.2. Memòria i deteriorament cognitiu .....	23
3.3. Envelliment del sistema nerviós central .....	24
3.3.1. Alteracions estructurals .....	25
3.3.2. Alteracions en la barrera hematoencefàlica .....	26



3.3.3. Neuroinflamació .....	27
3.3.4. Estrès oxidatiu .....	29
<b>4. Dieta i envelliment .....</b>	<b>30</b>
4.1. Dieta i envelliment del sistema immunitari .....	31
4.2. Dieta i envelliment del sistema nerviós central .....	32
4.3. Efectes de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques .....	34
<b>II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS .....</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Animals .....</b>	<b>43</b>
<b>2. Pinsos experimentals .....</b>	<b>43</b>
<b>3. Disseny experimental .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Aïllament i marcatge limfocitari .....</b>	<b>46</b>
4.1. Aïllament de leucòcits dels ganglis limfàtics mesentèrics .....	47
4.2. Aïllament de leucòcits de les plaques de Peyer .....	47
4.3. Recompte i viabilitat cel·lular .....	48
4.4. Marcatge fenotípic de limfòcits per immunofluorescència .....	49
4.5. Anàlisi de les poblacions limfocitàries .....	50
<b>5. Quantificació de citocines per citometria de flux .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Anàlisi conductual .....</b>	<b>54</b>
6.1. Test de reconeixement d'objectes .....	54
6.2. Laberint d'aigua de Morris .....	57
<b>7. Expressió gènica .....</b>	<b>58</b>
7.1. Obtenció de l'RNA i del cDNA .....	59
7.2. Reacció en cadena de la polimerasa en temps real o RT-PCR .....	60
<b>8. Determinació de la permeabilitat cerebral amb blau d'Evans .....</b>	<b>61</b>

<b>9. Determinació de proteïnes</b> .....	<b>63</b>
9.1. Homogeneïtzació de les mostres .....	63
9.2. Determinació de proteïnes .....	63
<b>10. Determinació de peròxid d'hidrogen</b> .....	<b>64</b>
<b>11. Determinació de malondialdehid</b> .....	<b>65</b>
<b>12. Western Blot</b> .....	<b>65</b>
12.1. Preparació de la mostra .....	66
12.2. Electroforesi .....	66
12.3. Transferència.....	67
12.4. Immunodetecció .....	68
<b>13. Anàlisi estadística</b> .....	<b>69</b>
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>71</b>
<b>1. Caracterització del model SAM</b> .....	<b>73</b>
1.1. Estudi morfològic dels ratolins SAMR1 i SAMP8.....	73
1.1.1. Pes dels ratolins.....	73
1.1.2. Morfometria intestinal .....	74
1.2. Estudi del teixit limfoide associat a l'intestí en SAMR1 i SAMP8 .....	74
1.2.1. Ganglis limfàtics mesentèrics .....	75
1.2.2. Plaques de Peyer .....	77
1.2.3. Expressió de citocines a la mucosa intestinal.....	79
<b>2. Efecte de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques front una inflamació intestinal aguda</b> .....	<b>81</b>
2.1. Evolució del pes corporal i consum de pinso .....	81
2.2. Ganglis limfàtics mesentèrics .....	82
2.3. Plaques de Peyer .....	85
2.4. Expressió de citocines a la mucosa intestinal .....	87

<b>3. Efecte de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques sobre el teixit cerebral .....</b>	<b>90</b>
3.1. Memòria a curt i llarg termini .....	90
3.2. Capacitat d'aprenentatge i memòria espacial .....	93
3.3. Inflamació a còrtex i hipocamp .....	97
3.3.1. Expressió de citocines.....	97
3.3.2. Activació d'NF- $\kappa$ B.....	99
3.3.3. Expressió de molècules d'adhesió .....	100
3.3.4. Relació entre inflamació i memòria a curt termini.....	100
3.4. Estrès oxidatiu a còrtex i hipocamp .....	102
3.4.1. Concentració d'elements oxidants .....	103
3.4.2. Expressió d'enzims antioxidants.....	104
3.5. Barrera hematoencefàlica .....	105
3.4.1. Permeabilitat vascular a blau d'Evans.....	106
3.4.2. Expressió de proteïnes del complex d'unió.....	106
3.6. Integritat neuronal .....	107
3.6.1. Abundància de sirtuïna-1 .....	108
3.6.2. Abundància de sinaptofisina .....	108
3.6.3. Abundància de $\beta$ -amiloide.....	109
3.6.4. Abundància de Tau .....	110
3.7. Citocines plasmàtiques .....	110
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONS.....</b>	<b>127</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. ANNEX .....</b>	<b>167</b>

**INDEX DE FIGURES**

**Figura 1.1.** Esquema de les característiques moleculars i cel·lulars de l’envelliment ..... 6

**Figura 1.2.** Teixit limfoide associat a l’intestí (GALT) ..... 14

**Figura 1.3.** Imatge representativa d’una neurona sana (A) i una malmesa (B) ..... 22

**Figura 1.4.** Estructura de la barrera hematoencefàlica ..... 26

**Figura 1.5.** Representació esquemàtica de la relació entre el microbioma intestinal i el deteriorament cognitiu en l’envelliment ..... 33

**Figura 3.1.** Disseny experimental emprat en l’estudi de la inflamació aguda induïda amb SEB. .... 45

**Figura 3.2.** Disseny experimental emprat en l’estudi de l’anàlisi conductual ..... 46

**Figura 3.3.** Citograma d’una suspensió cel·lular ..... 52

**Figura 3.4.** Representació gràfica de l’immunocomplex tipus sandvitx lligar a la microesfera ..... 52

**Figura 3.5.** Citograma d’una suspensió de microesferes ..... 54

**Figura 3.6.** Imatge de dos laberints on es realitza el NORT ..... 55

**Figura 3.7.** Representació dels elements necessaris per realitzar el test de MWM..... 57

**Figura 3.8.** Representació del sistema de perfusió ..... 62

**Figura 4.1.** Evolució del pes corporal dels ratolins R1 i P8 a diferents edats..... 73

**Figura 4.2.** Longitud de l’intestí prim de ratolins R1 i P8 a diferents edats ..... 74

**Figura 4.3.** Longitud del còlon de ratolins R1 i P8 a diferents edats..... 74

**Figura 4.4.** Recompte de leucòcits als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats ..... 75

**Figura 4.5.** Percentatge de limfòcits Th als GLM dels ratolins R1 i P8 a diferents edats .. 75

**Figura 4.6.** Percentatge de limfòcits Th activats als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats ..... 76

**Figura 4.7.** Percentatge de limfòcits Treg als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats ..... 76

**Figura 4.8.** Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats ..... 77

<b>Figura 4.9.</b> Recompte de leucòcits a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats.....	77
<b>Figura 4.10.</b> Percentatge de limfòcits Th a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats.....	78
<b>Figura 4.11.</b> Percentatge de limfòcits Th activats a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats .....	78
<b>Figura 4.12.</b> Percentatge de limfòcits Treg a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats.....	79
<b>Figura 4.13.</b> Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats .....	79
<b>Figura 4.14.</b> Expressió de la IL-6 a la mucosa de jejú de ratolins R1 i P8 a diferents edats.....	80
<b>Figura 4.15.</b> Expressió del TNF- $\alpha$ a la mucosa de jejú de ratolins R1 i P8 a diferents edats.....	80
<b>Figura 4.16.</b> Evolució del pes corporal dels ratolins alimentats amb pinso control i pinso SDP durant 4 mesos .....	82
<b>Figura 4.17.</b> Evolució del consum de pinso dels ratolins alimentats amb pinso control i pinso SDP durant 4 mesos .....	82
<b>Figura 4.18.</b> Recompte de leucòcits als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	83
<b>Figura 4.19.</b> Percentatge de limfòcits Th als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	83
<b>Figura 4.20.</b> Percentatge de limfòcits Th activats als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	84
<b>Figura 4.21.</b> Percentatge de limfòcits Treg als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	84
<b>Figura 4.22.</b> Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	85
<b>Figura 4.23.</b> Recompte de leucòcits a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	85

<b>Figura 4.24.</b> Percentatge de limfòcits Th a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	86
<b>Figura 4.25.</b> Percentatge de limfòcits Th activats a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	86
<b>Figura 4.26.</b> Percentatge de limfòcits Treg a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	87
<b>Figura 4.27.</b> Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	87
<b>Figura 4.28.</b> Expressió de la IL-6 a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	88
<b>Figura 4.29.</b> Expressió del TNF- $\alpha$ a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	88
<b>Figura 4.30.</b> Expressió de l'IFN- $\gamma$ a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	89
<b>Figura 4.31.</b> Expressió de la IL-10 en la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos.....	89
<b>Figura 4.32.</b> Índex d'exploració realitzat durant la fase de familiarització .....	91
<b>Figura 4.33.</b> Preferència d'objecte dels ratolins durant la fase de familiarització .....	91
<b>Figura 4.34.</b> Índex de discriminació obtingut en el primer test de retenció.....	92
<b>Figura 4.35.</b> Percentatge de ratolins amb memòria a curt termini .....	92
<b>Figura 4.36.</b> Índex de discriminació obtingut en el segon test de retenció .....	93
<b>Figura 4.37.</b> Percentatge de ratolins amb memòria a llarg termini.....	93
<b>Figura 4.38.</b> Efecte de l'envelliment sobre l'evolució de l'aprenentatge .....	94
<b>Figura 4.39.</b> Efecte de l'SDP sobre l'evolució de l'aprenentatge .....	94
<b>Figura 4.40.</b> Trajectòries realitzades durant el test de MWM .....	95
<b>Figura 4.41.</b> Nombre d'entrades a la zona de la plataforma .....	95
<b>Figura 4.42.</b> Temps de permanència a la zona de la plataforma .....	96
<b>Figura 4.43.</b> Temps de permanència al quadrant diana .....	96

<b>Figura 4.44.</b> Expressió de la IL-1 $\beta$ al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	97
<b>Figura 4.45.</b> Expressió de la IL-6 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	98
<b>Figura 4.46.</b> Expressió del TNF- $\alpha$ al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	98
<b>Figura 4.47.</b> Expressió del TGF- $\beta$ al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	99
<b>Figura 4.48.</b> Concentració de la IL-10 al còrtex.....	99
<b>Figura 4.49.</b> Abundància relativa del p-NF- $\kappa$ B respecte l'NF- $\kappa$ B total al còrtex .....	100
<b>Figura 4.50.</b> Expressió d'ICAM-1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	100
<b>Figura 4.51.</b> Expressió de VCAM-1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	101
<b>Figura 4.52.</b> Correlació entre l'índex de discriminació del primer test de retenció i l'expressió de la IL-6 (A), del TNF- $\alpha$ (B) i la concentració de la IL-10 (C) al còrtex....	102
<b>Figura 4.53.</b> Concentració d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	103
<b>Figura 4.54.</b> Concentració de malondialdehid al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	104
<b>Figura 4.55.</b> Correlació entre la concentració de malondialdehid i d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al còrtex .....	104
<b>Figura 4.56.</b> Expressió de catalasa al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	105
<b>Figura 4.57.</b> Expressió de superòxid dismutasa al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).....	105
<b>Figura 4.58.</b> Ratolí P8 abans de l'administració d'EB (A) i una hora després de l'administració (B) .....	106
<b>Figura 4.59.</b> Concentració d'EB al cervell.....	106
<b>Figura 4.60.</b> Abundància relativa de ZO-1 al cervell.....	107
<b>Figura 4.61.</b> Abundància relativa d'E-cadherina al cervell.....	107
<b>Figura 4.62.</b> Abundància relativa de sirtuína 1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	108
<b>Figura 4.63.</b> Abundància relativa de sinaptofisina al còrtex (A) i a l'hipocamp (B) .....	109
<b>Figura 4.64.</b> Abundància relativa de $\beta$ -amiloide al cervell.....	109
<b>Figura 4.65.</b> Abundància relativa de p-Tau respecte la Tau total al cervell .....	110
<b>Figura 4.66.</b> Concentració plasmàtica de la IL-6 .....	110
<b>Figura 4.67.</b> Concentració plasmàtica del TNF- $\alpha$ .....	111
<b>Figura 4.68.</b> Concentració plasmàtica de la IL-10 .....	111

## INDEX DE TAULES

<b>Taula 3.1.</b> Composició de pinsos experimentals.....	44
<b>Taula 3.2.</b> Composició del colorant vital.....	48
<b>Taula 3.3.</b> Anticossos emprats en el marcatge fenotípic de les poblacions limfocitàries .....	50
<b>Taula 3.4.</b> Seqüències dels encebadors utilitzats.....	61
<b>Taula 3.5.</b> Composició del tampó de lisi .....	63
<b>Taula 3.6.</b> Composició del tampó 5x Laemmli .....	66
<b>Taula 3.7.</b> Composició del tampó d'electroforesi .....	67
<b>Taula 3.8.</b> Composició del tampó de transferència .....	68
<b>Taula 3.9.</b> Llistat d'anticossos utilitzats en el Western Blot.....	69
<b>Taula 4.1.</b> Temps de permanència a cada quadrant de la piscina .....	96





## **ABREVIATURES**

---

---



APC	Cèl·lula presentadora d'antigen <i>Antigen presenting cell</i>
APS	Persulfat amònic <i>Ammonium persulfate</i>
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barrera hematoencefàlica
BHT	Butilhidroxitoluè
BSA	Albúmina sèrica bovina <i>Bovine serum albumin</i>
DHA	Àcid docosahexaenòic <i>Docosahexaenoic acid</i>
DTT	Ditiotreitòl
EB	Blau d'Evans <i>Evans blue</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPA	Àcid eicosapentaenòic <i>Eicosapentaenoic acid</i>
FBS	Sèrum fetal boví <i>Fetal bovine serum</i>
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Dispersió frontal <i>Forward scatter</i>
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GLM	Ganglis limfàtics mesentèrics
GPx	Glutatió peroxidasa
HPRT1	Fosforibosiltransferasa hipoxantina 1 <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1 <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>

## ABREVIATURES

---

ID	Índex de discriminació
IEL	Limfòcit intraepitelial <i>Intraepithelial lymphocyte</i>
IFN- $\gamma$	Interferó $\gamma$
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
MALT	Teixit limfoide associat a la mucosa <i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MDA	Malondialdehid
MHC-II	Complex major d'histocompatibilitat de classe II <i>Major histocompatibility complex class II</i>
MWM	Laberint d'aigua de Morris <i>Morris water maze</i>
NE	Nord-est
NK	Cèl·lules assassines naturals <i>Natural killer</i>
NO	Nord-oest
NORT	Test de reconeixement d'objectes <i>Novel object recognition test</i>
P8	SAMP8
PBS	Solució amortidora de fosfats <i>Phosphate buffer solution</i>
PE	Ficoeritrina <i>Phicoerythrin</i>
PerCP	Proteïna de clorofil·la peridina <i>Chlorofil peridine protein</i>
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PP	Placa de Peyer
PVDF	Fluorur de polivinil <i>Polyvinylidene fluoride</i>
R1	SAMR1

ROS	Espècies reactives d'oxigen <i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa en temps real <i>Real time polymerase chain reaction</i>
SAM	Ratolí amb senescència accelerada <i>Senescence accelerated mouse</i>
SAMP8	Ratolí propens a la senescència accelerada 8 <i>Senescence accelerated mouse prone 8</i>
SAMR1	Ratolí resistent a la senescència accelerada 1 <i>Senescence accelerated mouse resistant 1</i>
SDP	Plasma assecat per polvorització <i>Spray-dried plasma</i>
SDS	Sodi dodecil sulfat
SE	Sud-est
SEB	Enterotoxina B d' <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus Enterotoxin B</i>
SIRT	Sirtuïna
SNC	Sistema nerviós central
SO	Sud-oest
SOD	Superòxid dismutasa
SSC	Dispersió lateral <i>Side scatter</i>
TBA	Àcid tiobarbitúric <i>Thiobarbituric acid</i>
TEMED	N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina
TGF- $\beta$	Factor de creixement transformador $\beta$ <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Th	T col·laboradors <i>T helper</i>
TMP	1,1,3,3-Tetrametoxipropà
TN	Temps d'exploració de l'objecte nou
TNF- $\alpha$	Factor de necrosi tumoral $\alpha$ <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TV	Temps d'exploració de l'objecte vell

## ABREVIATURES

---

Treg	T reguladors
Ts/c	T supressors/citotòxics
VCAM-1	Molècula d'adhesió de cèl·lules vasculares 1 <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
ZO-1	<i>Zona occludens 1</i>

## RESUM DE LA TESI

---

---





En els últims anys s'ha produït un increment de l'esperança de vida que ha despertat un gran interès en promoure un envelliment saludable. Habitualment, la senescència va acompanyada de diferents trastorns i malalties en la base de les quals hi ha una desregulació del sistema immunitari. Aquesta desregulació implica un increment de l'activació basal del sistema immunitari que comporta un augment de l'estat inflamatori de baixa intensitat, conegut com a *inflammaging*. Alguns suplementes dietètics redueixen l'activació del sistema immunitari, prevenint el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment a través d'una connexió entre l'intestí i el cervell. En animals acabats de deslleter, la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques (SDP) millora la funció de barrera de la mucosa intestinal i modula el grau d'activació del teixit limfoide associat a l'intestí durant un procés inflamatori. En aquest estudi hem demostrat que, als 6 mesos d'edat, els ratolins amb envelliment accelerat (SAMP8) presenten una activació inespecífica del sistema immunitari intestinal així com una menor capacitat de resposta front a l'enterotoxina B d'*S. aureus*. La suplementació dietètica amb SDP durant 4 mesos disminueix l'activació inespecífica del sistema immunitari intestinal dels ratolins senescents, ja que hi ha una menor expressió de citocines proinflamàtores; a més, la resposta immunitària intestinal d'aquests animals front a l'enterotoxina B d'*S. aureus* és similar a la dels ratolins joves. Els ratolins SAMP8 de 6 mesos presenten un deteriorament de la memòria a curt i a llarg termini que s'associa a un increment en l'expressió de citocines proinflamatòries, a la presència d'agents oxidants a l'encèfal i a una major permeabilitat de la barrera hematoencefàlica. Els ratolins senescents presenten una major fosforilació de la proteïna Tau que els ratolins joves, fet que està relacionat amb trastorns cognitius com els que s'observen en la malaltia d'Alzheimer. La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques atenua la majoria d'aquests efectes de l'envelliment sobre la funcionalitat cerebral, gràcies a la connexió que existeix entre el sistema immunitari intestinal i altres mucoses i òrgans sistèmics.

En los últimos años ha incrementado la esperanza de vida, lo que ha generado un gran interés en promover un envejecimiento saludable. Habitualmente, la senescencia va acompañada de distintos trastornos y enfermedades, en la base de los cuales hay una desregulación del sistema inmunitario. Esta desregulación implica un incremento de la activación basal del sistema inmunitario que conlleva un aumento del estado inflamatorio de baja intensidad conocido como *inflammaging*. Algunos suplementos dietéticos reducen la activación del sistema inmunitario, previniendo incluso el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento a través de una conexión entre el intestino y el cerebro. En animales recién destetados, la suplementación dietética con proteínas plasmáticas (SDP) mejora la función de barrera de la mucosa intestinal y modula el grado de activación del tejido linfoide asociado al intestino durante un proceso inflamatorio. En este estudio hemos demostrado que, a los 6 meses de edad, los ratones con envejecimiento acelerado (SAMP8) presentan una activación inespecífica del sistema inmunitario intestinal así como una menor capacidad de respuesta frente a la enterotoxina B del *S. aureus* (SEB). La suplementación dietética con SDP durante 4 meses disminuye la activación inespecífica del sistema inmunitario intestinal en los ratones senescentes, reduciendo la expresión de citocinas proinflamatorias; y además, la respuesta inmunitaria intestinal de estos animales frente al SEB es similar a la de los ratones jóvenes. Los ratones SAMP8 de 6 meses presentan un deterioro en la memoria a corto y a largo plazo que se asocia a un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias, a la presencia de agentes oxidantes en el cerebro y a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Los ratones senescentes presentan una mayor fosforilación de la proteína Tau que los ratones jóvenes, lo que se relaciona con trastornos cognitivos como los observados en la enfermedad de Alzheimer. La suplementación dietética con proteínas plasmáticas atenúa la mayoría de estos efectos del envejecimiento sobre la funcionalidad cerebral, gracias a la conexión entre el sistema inmunitario intestinal y otras mucosas y órganos sistémicos.

The increase in life expectancy that has occurred in recent years has generated a great interest in promoting a healthy aging. Usually, senescence is accompanied by different disorders and diseases, at the base of which there is a deregulation of the immune system. This deregulation implies an increase in the basal activation of the immune system which involves an increment of the low intensity inflammatory state known as *inflammaging*. Some dietary supplements may reduce the activation of the immune system, preventing the cognitive deterioration associated with aging through the connection between the intestine and the brain. In weaned animals, plasma protein dietary supplementation (SDP) improves the barrier function of the intestinal mucosa and modulates the degree of activation of the intestinal lymphoid tissue during an intestinal inflammation. In this study we have demonstrated that, at 6-month-old, mice with accelerated aging (SAMP8) present a non-specific activation of the intestinal immune system as well as a lower response capacity to *S. aureus* enterotoxin. Dietary supplementation with SDP for 4 months decreases nonspecific activation of the intestinal immune system of senescent mice, as there is a lower expression of proinflammatory cytokines. In addition, the intestinal immune response of these animals to *S. aureus* enterotoxin is similar to that of young mice. The 6-month-old SAMP8 mice present short-term and long-term memory impairment associated with increased proinflammatory cytokines, the presence of oxidizing agents in the brain and increased permeability of the blood-brain barrier. Senescent mice show higher phosphorylation of Tau protein than young mice, which is related to cognitive disorders such as those observed in Alzheimer's disease. Dietary supplementation with plasma proteins attenuates most of these effects of aging on brain functionality, through the connection between the intestinal immune system and other mucosal and systemic organs.



# I. INTRODUCCIÓ

---

---



## 1. ENVELLIMENT

En les últimes dècades, l'interès per l'estudi de l'envelliment s'ha incrementat, no només perquè les persones d'edat avançada constitueixen un col·lectiu cada vegada més nombrós de la població, sinó també degut a la necessitat de conèixer els mecanismes que promouen o retarden l'envelliment, amb l'objectiu de mantenir una bona qualitat de vida.

Actualment, no es disposa d'una definició per l'envelliment que sigui universalment acceptada, sinó que la seva explicació es troba oberta a diferents interpretacions evolutives, comparatives i ontogèniques (Carey i Zou, 2007). Tot i així, en termes generals es pot considerar l'envelliment com el declivi funcional dependent del temps que afecta a la majoria dels organismes vius (López-Otín *et al.*, 2013). És un procés **universal**, ja que té lloc en els individus de totes les espècies; **progressiu**, és a dir, que s'esdevé de forma gradual en el temps; **intrínsec**, degut a que té un origen endogen; i **deleter**, ja que comporta una disminució en la capacitat funcional de l'individu (Viña *et al.*, 2007).

Degut a la variabilitat de les manifestacions clíniques de la senescència es pot observar des d'un envelliment saludable, en el qual no s'observen discapacitats o disfuncionalitats fisiològiques, cognitives o socials; fins a un envelliment que va acompanyat de diferents alteracions i malalties (Rai i Troen, 2011).

### 1.1. TEORIES DE L'ENVELLIMENT

Tot i que encara no s'ha establert una causa específica de l'envelliment, hi ha diverses teories. De fet, es van descriure més de 300 teories sobre l'envelliment segons la revisió de Medvedev (1990) i aquest valor ha anat augmentant des d'aleshores (Miquel, 2009).

Un dels principals reptes pels gerontòlegs consisteix en discernir entre les causes de l'envelliment i els seus efectes en sistemes tan complexos com els organismes vius. Les teories que han sorgit al respecte es poden agrupar en dos grans grups: teories deterministes i teories estocàstiques.



### 1.1.1. Teories de l'envelliment genèticament programat o deterministes

Aquestes teories consideren que l'envelliment és el resultat d'un programa genètic predeterminat que controla el creixement, desenvolupament i senescència dels organismes (Kanungo, 1975).

Les dues teories deterministes principals serien la del **límit mitòtic** i la teoria de l'**escurçament dels telòmers**. La primera va ser proposada per Hayflick i Moorhead (1980) i defensa que l'envelliment és un fenomen cel·lular i orgànic, i que la pèrdua de les capacitats funcionals dels individus reflecteix la suma de la davallada de capacitat funcional de les cèl·lules individuals. La segona, proposada per Harley *et al.* (1990), es fonamenta en que la cèl·lula, en cada divisió, perd una determinada quantitat de DNA telomèric, de manera que el final de la divisió cel·lular es produeix quan s'arriba a l'escurçament total dels telòmers.

### 1.1.2. Teories estocàstiques o epigenètiques

Les teories estocàstiques es diferencien en dos grups: les teories dels sistemes fisiològics i les teories metabòliques. Les teories de l'envelliment dels sistemes fisiològics es basen en la disminució del rendiment funcional que es produeix durant la senescència i es relacionen amb el sistema nerviós, endocrí i immunitari. En canvi, les teories metabòliques se centren en les alteracions que experimenta el metabolisme al llarg del temps.

La principal teoria dels sistemes fisiològics és la relativa al **sistema immunològic**, que postula que l'envelliment és degut a una disminució de les defenses de l'organisme davant d'infeccions i agents estranys (Walford, 1969; Makinodan i Kay, 1980; Walford *et al.*, 1981). S'ha observat que durant la senescència hi ha una menor resposta funcional de les cèl·lules T i que, a més, es produeix un desequilibri en favor dels limfòcits T memòria. D'aquesta manera, la proporció de limfòcits T verges es redueix, així com la resistència front a malalties infeccioses (Miller, 1996). Aquest fet comporta que, durant l'envelliment, el sistema immunitari perdi la capacitat per produir respostes immunitàries específiques i incrementin les respostes inespecífiques. Així, en la senescència, s'esdevé una inflamació crònica de baixa intensitat o *inflammaging* que contribueix al desenvolupament i progressió de diverses malalties associades a l'envelliment (Franceschi *et al.*, 2007). A més, com a conseqüència de la desregulació del sistema immunitari també incrementen les malalties autoimmunitàries, en les que es produeix

un augment dels nivells d'autoanticossos (Walford, 1974). En referència a les alteracions del **sistema neuroendocrí**, es postula que la disminució funcional de les neurones i les hormones associades alteren la fertilitat i l'homeòstasi dels òrgans reproductius. A més, aquesta disfunció neuroendocrina també comporta una disminució de la força muscular, menor capacitat de recuperació de les situacions d'estrès i una alteració funcional de l'activitat cardiovascular i respiratòria (Carey i Zou, 2007).

La principal **teoria metabòlica** proposa que totes les cèl·lules postmitòtiques acumulen, amb el pas del temps, productes de rebuig que no poden ser eliminats i provoquen una pèrdua d'eficiència de l'organisme (Carey i Zou, 2007).

En els darrers anys, ha guanyat importància la teoria de l'**estrès oxidatiu** o dels radicals lliures, que va ser postulada per Harman (1956). Segons aquesta, durant l'envelliment, es produeix un increment de compostos inflamatoris, de manera que hi ha una estreta relació entre oxidació i inflamació (Sarkar i Fisher, 2006; Salminen *et al.*, 2008a; Cannizo *et al.*, 2011). Els agents oxidants endògens produïts per les cèl·lules donen lloc a danys moleculars que s'acumulen i causen la majoria de canvis observats en l'envelliment. El metabolisme aeròbic genera espècies reactives d'oxigen (ROS; *Reactive oxygen species*) que reaccionen amb macromolècules i promouen dany intracel·lular que dona lloc a la davallada fisiològica pròpia de l'envelliment (Sohal i Weindruch, 1996). S'ha descrit que l'increment de compostos proinflamatoris durant l'envelliment genera un estrès inflamatori que comporta la pèrdua de la funcionalitat que té lloc en la senescència, i que es coneix amb el terme "*oxiinflamaging*" (De la Fuente i Miquel, 2009).

## 1.2. MARCADORS MOLECULARS D'ENVELLIMENT

La pèrdua progressiva de la integritat fisiològica pròpia de l'envelliment es pot dividir en nou característiques moleculars i cel·lulars comuns en diferents organismes (López-Otín *et al.*, 2013; **Figura 1.1**). Aquestes característiques compleixen els següents requisits: es produeixen en un procés d'envelliment normal i el seu empitjorament o millora experimental accelera o retarda l'envelliment, respectivament.



**Figura 1.1. Esquema de les característiques moleculars i cel·lulars de l'envelliment.** Inestabilitat genòmica, escurçament dels telòmers, alteracions epigenètiques, pèrdua de la homeòstasi proteica, desregulació de la detecció de nutrients, disfunció mitocondrial, senescència cel·lular, esgotament de les cèl·lules mare i comunicació intercel·lular alterada. (Adaptat de López-Otín *et al.*, 2013)

### INESTABILITAT GENÒMICA

L'acció continua d'agents endògens i exògens comprometen la integritat i estabilitat del DNA i dona lloc a mutacions puntuals, translocacions cromosòmiques, delecions, duplicacions o integració de DNA de virus o transposons (Moskalev *et al.*, 2012). Els organismes han desenvolupat mecanismes de reparació del DNA capaços de fer front a la major part dels danys, tot i que amb l'edat disminueixen la seva eficiència (Lord i Ashworth, 2012).

### ESCURÇAMENT DE TELÒMERS

Els telòmers són seqüències especialitzades de DNA que protegeixen els extrems dels cromosomes. La majoria de cèl·lules somàtiques dels mamífers no expressen la telomerasa i, per tant, pateixen una pèrdua progressiva dels telòmers a cada replicació del DNA. De manera que cada vegada que la cèl·lula es divideix perd nucleòtids dels extrems dels cromosomes fins que aquests són defectuosos i la cèl·lula no pot dividir-se més. Aquest fenomen es coneix amb el nom de senescència cel·lular replicativa (Campisi, 1997) i s'ha observat durant l'envelliment tant en humans com en ratolins (Blasco, 2007).

## ALTERACIONS EPIGENÈTIQUES

Al llarg de la vida s'observen alteracions epigenètiques en cèl·lules i teixits (Talens *et al.*, 2012), que inclouen alteracions en la metilació del DNA, modificacions post-translacionals d'histones i remodelació de la cromatina. La rellevància causal d'aquestes alteracions de la cromatina en l'envelliment és recolzada pel fet de que les mosques amb mutacions de pèrdua de funció en la proteïna heterocromatina 1a tenen una vida mitjana més curta, mentre que la sobreexpressió d'aquesta proteïna augmenta la longevitat de les mosques i retarda el deteriorament muscular característic de l'envelliment (Larson *et al.*, 2012).

## PÈRDUA DE L'HOMÈOSTASI PROTEICA

L'homeòstasi proteica implica mecanismes d'estabilització del correcte plegament de proteïnes, de regulació de la família de proteïnes del xoc tèrmic i de degradació de proteïnes mal plegades o danyades mitjançant el sistema ubiquitina-proteosoma i el sistema lisosomal d'autofagia (Mizushima *et al.*, 2008; Hartl *et al.*, 2011; Koga *et al.*, 2011). Durant l'envelliment es produeix un funcionament inadequat d'aquests mecanismes, que pot generar agregats proteics tòxics (Bishop *et al.*, 2010) i contribueixen al desenvolupament d'algunes patologies relacionades amb l'edat, com la malaltia d'Alzheimer i la malaltia de Parkinson, entre d'altres (Powers *et al.*, 2009).

## DESREGULACIÓ DE LA DETECCIÓ DE NUTRIENTS

Durant l'envelliment, es veuen afectats els sistemes detectors de nutrients com la via de senyalització de la insulina, que participa en la detecció de glucosa i està implicada en la regulació del metabolisme anabòlic (Laplante i Sabatini, 2012). També es produeixen alteracions en la regulació del catabolisme de nutrients, com en la via del AMPK i de la sirtuïna 1 (SIRT1), que detecten estats de baixa energia mitjançant la detecció d'alts nivells de NAD i actuen en la direcció oposada de la via de senyalització de la insulina (Houtkooper *et al.*, 2010). Aquestes vies estan interconnectades i relacionades amb l'envelliment, de manera que els seus canvis s'han relacionat amb l'envelliment prematur, tant en models animals com en humans (Barzilai *et al.*, 2012). En conjunt, les investigacions disponibles fins al moment recolzen la idea de que la senyalització anabòlica accelera l'envelliment, mentre que la seva disminució incrementa la longevitat (Fontana *et al.*, 2010).

### DISFUNCIÓ MITOCONDRIAL

L'envelliment cel·lular disminueix l'eficàcia de la cadena respiratòria mitocondrial, que augmenta la pèrdua d'electrons i redueix la generació d'ATP (Green *et al.*, 2011). A mesura que s'envelleix, l'estrès cel·lular i l'augment de dany cel·lular fan que incrementi l'abundància de ROS, en un intent de mantenir la supervivència. Finalment, aquest increment de les ROS comporta un empitjorament del dany cel·lular associat a l'edat (Hekimi *et al.*, 2011).

### SENESCÈNCIA CEL·LULAR

La senescència cel·lular s'ha definit com una aturada del cicle cel·lular simultània a un conjunt de canvis fenotípics característics (Kuilman *et al.*, 2010). La detecció de dany al DNA o la presència de  $\beta$ -galactosidasa s'associa inicialment a la senescència (Dimri *et al.*, 1995). L'eficiència del reemplaçament cel·lular, que implica l'eliminació de la cèl·lula senescent i la mobilització de cèl·lules progenitores, es redueixen amb l'edat, donant lloc a una acumulació de cèl·lules senescentes que contribueixen activament al procés d'envelliment a través de la secreció massiva de citocines proinflamatòries (Kuilman *et al.*, 2010; Rodier i Campisi, 2011).

### ESGOTAMENT DE CÈL·LULES MARE

El dany al DNA que s'acumula durant l'envelliment fa que se sobreexpressin proteïnes inhibidores del cicle cel·lular, com la  $p16^{INK4a}$  (Janzen *et al.*, 2006) que afecten especialment a les cèl·lules mare adultes (Flores i Blasco, 2010). Això implica que hi hagi una degeneració dels compartiments d'aquestes cèl·lules mare i, per tant, hi ha una disminució de la regeneració dels teixits (Gruber *et al.*, 2007; Conboy i Rando, 2012).

### ALTERACIÓ DE LA COMUNICACIÓ INTERCEL·LULAR

L'envelliment també altera la comunicació intercel·lular, ja sigui endocrina, neuroendocrina o neuronal (Laplante i Sabatini, 2012; Zhang *et al.*, 2013). La senyalització neurohormonal tendeix a desregular-se en l'envelliment, quan les reaccions inflammatòries incrementen, l'eficiència del sistema immunitari decau i la composició dels medis intra i extracel·lulars canvien (López-Otín *et al.*, 2013).

### 1.3. ENVELLIMENT I PATOLOGIES

L'*inflammaging* associat a l'envelliment es relaciona amb l'aparició de determinades patologies. Les més freqüents són el càncer, les malalties cardiovasculars, l'Alzheimer, la sarcopènia, la diabetis tipus II i l'osteoporosi, així com una major incidència de malalties infeccioses.

#### CÀNCER

L'edat promig del diagnòstic de càncer en els països industrialitzats es produeix al voltant dels 70 anys (Gloeckler *et al.*, 2003). De fet, els factors més importants en el desenvolupament del càncer en les últimes etapes de la vida són l'exposició prolongada a carcinògens, l'increment de la susceptibilitat als carcinògens ambientals i la immunosenescència (Finkel *et al.*, 2007; Derhovanessian *et al.*, 2008). A més, la inflamació crònica també s'ha associat a l'aparició del càncer (Coussens i Werb, 2002). S'ha observat que diferents tipus cel·lulars de la immunitat innata envolten determinats tipus de tumors (Mantovani *et al.*, 2008).

Les cèl·lules canceroses reprogramen els macròfags, fent que sobreexpressin citocines proinflamatòries i factors de creixement, que actuen com a promotors dels tumors. Els macròfags produeixen el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ), que activa el factor NF- $\kappa$ B a les cèl·lules cancerígenes, que atura l'apoptosi i activa la proliferació cel·lular (Palma *et al.*, 2015). Les ROS també estan involucrades en la carcinogènesi perquè malmeten el DNA i de modifiquen i regulen la transcripció de proteïnes relacionades amb el càncer (Hussain *et al.*, 2003).

#### MALALTIES CARDIOVASCULARS I ATEROSCLEROSI

Durant l'envelliment incrementa la disfunció endotelial, que implica una major expressió de molècules d'adhesió de cèl·lules vasculars (VCAM-1; *Vascular cell adhesion molecule 1*) i d'adhesió intercel·lular (ICAM-1; *Intercellular adhesion molecule 1*) (Rescigno *et al.*, 2017). Això comporta un increment en l'adhesió i migració de monòcits i cèl·lules T, que acaba produint una inflamació crònica als vasos grans i mitjans (Epstein i Ross, 1999). Gairebé el 50 % de les morts en els països desenvolupats i al voltant del 25 % en els països en vies de desenvolupament estan relacionades amb malalties cardiovasculars.

### DETERIORAMENT COGNITIU I ALZHEIMER

La malaltia d'Alzheimer és la malaltia neurodegenerativa més comú en els països occidentals. Aquesta malaltia cursa amb un deteriorament progressiu de la memòria i de les capacitats intel·lectuals, dificultat en l'execució de tasques i de la parla i desorientació (Rescigno *et al.*, 2017). La inflamació podria ser el promotor del desenvolupament de les plaques amiloides i de la neurodegeneració típiques de la malaltia d'Alzheimer (Koyama *et al.*, 2013).

### SARCOPÈNIA

La sarcopènia és l'atrofia muscular associada a l'envelliment que comporta una limitació funcional, discapacitat i mortalitat (Cawthon *et al.*, 2014; McLean *et al.*, 2014). Aquesta atrofia muscular s'origina pel desequilibri entre la síntesi proteica i la seva degradació en el teixit muscular (Fielding *et al.*, 2011). S'ha demostrat que l'*inflammaging* és un dels factors principals que contribueixen a la sarcopènia (Toth *et al.*, 2005). Diversos estudis han demostrat que la interleucina 6 (IL-6) i la proteïna C reactiva estan relacionades amb la pèrdua de massa i força muscular (Schaap *et al.*, 2006 i 2009). A més, alguns estudis han observat que un increment de TNF- $\alpha$  incrementa el catabolisme muscular (Frost i Lang, 2007).

### MALALTIES INFECCIOSES

Durant l'envelliment hi ha un increment en la incidència d'infeccions i malalties inflamatòries que, a més, requereixen més temps per superar-les i causen una major mortalitat. Aquests canvis s'atribueixen a la desregulació del sistema immunitari, que incrementa la seva activació basal inespecífica i disminueix la capacitat de resposta. L'estat nutricional i la ingesta de components bioactius de la dieta influeixen en aquests factors (Shlisky *et al.*, 2017).

### DIABETIS TIPUS II

La sobreexpressió de citocines proinflamatòries i proteïnes de la fase aguda estan involucrades en la patogènesi i origen de la diabetis de tipus II (Stuart i Baune, 2012; Pickup, 2004). Nombrosos estudis han demostrat que la IL-6, el TNF- $\alpha$  i la proteïna C reactiva estan correlacionats amb la resistència a la insulina, els triglicèrids circulants i l'aterosclerosi (Hogue *et al.*, 2008).

## OSTEOPOROSI

Un elevat nombre de citocines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-11, IL-15 i IL-17) estimulen l'activitat osteoclàstica, fet que relaciona l'*inflammaging* amb la destrucció de massa òssia (Wallin *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2003).

## 2. SISTEMA IMMUNITARI

El sistema immunitari està constituït per cèl·lules i molècules responsables de la immunitat, és a dir, de la defensa front a microorganismes infecciosos i/o substàncies estranyes, anomenats també antígens. Inclou una gran varietat de cèl·lules (leucòcits) i molècules capaces de reconèixer i eliminar un gran nombre d'antígens. El conjunt de mecanismes que es posen en marxa per dur a terme aquesta funció es coneix com resposta immunitària, la qual es pot dividir en tres fases: el reconeixement de l'antigen, l'activació i regulació del sistema immunitari i la fase efectora per la destrucció de l'antigen, que implica la generació d'un procés d'inflamació i oxidació que permetrà aquesta eliminació antigènica. Tant important és generar una bona resposta immunitària capaç d'eliminar els agents infecciosos i cèl·lules malignes, com poder finalitzar aquesta resposta una vegada ha complert la seva missió. De no aconseguir-se, es genera un estat inflamatori que pot donar lloc a patologia.

Els mecanismes de defensa de l'organisme es poden classificar en dos grups: mecanismes de defensa innata i reaccions d'immunitat adaptativa o específica.

- **Immunitat innata:** constitueix la primera línia de defensa contra microorganismes i està constituïda per mecanismes de defensa cel·lulars i bioquímics existents amb anterioritat al desenvolupament de la infecció, capaços d'establir respostes ràpides (Abbas *et al.*, 2008). Si l'antigen aconsegueix travessar les barreres no immunològiques es posa en funcionament el sistema immunitari innat, en que participen diferents elements. Per una banda hi ha cèl·lules fagocítiques i cèl·lules assassines naturals (NK; *Natural killer*). Per altra banda, intervenen citocines i quimiocines que desenvolupen un paper important en la resposta inflamatòria. La immunitat innata no sempre pot eliminar l'organisme infeccios però té un paper crucial en la iniciació i posterior desenvolupament de les respostes immunitàries específiques o adaptatives.



- **Immunitat adaptativa:** es caracteritza per una especificitat extraordinària a diferents molècules i per la capacitat de “recordar” i respondre amb major intensitat després d’exposicions repetides a un mateix antigen. El sistema immunitari adaptatiu ha evolucionat per proporcionar una defensa versàtil que, a més, té tendència a evitar que l’agent infeccióis provoqui malaltia en una segona infecció. Els components de la immunitat específica són els limfòcits i els seus productes, entre ells els anticossos. En aquesta immunitat es produeixen dos tipus de resposta: la humoral, on hi intervenen els limfòcits B i els anticossos que secreten; i la cel·lular, on hi intervenen els limfòcits T. Des del punt de vista funcional, existeixen diferents tipus de **limfòcits T**:
  - Limfòcits T supressors/citotòxics (Ts/c): expressen una proteïna de superfície o clúster de diferenciació anomenat CD8. Reconeixen les cèl·lules infectades per un patògen al qual són específics (principalment virus) o cèl·lules tumorals i secreten una sèrie de molècules (perforines i granzimes) que destrueixen les cèl·lules infectades i activen l’apoptosi de la cèl·lula diana.
  - Limfòcits T col·laboradors (Th; *T helper*): expressen una proteïna de superfície o clúster de diferenciació anomenat CD4. S’encarreguen d’iniciar la resposta immunitària coordinada mitjançant el complex antigen-complex major d’histocompatibilitat de classe II (MHC-II; *Major histocompatibility complex class II*), present en la superfície de les cèl·lules presentadores d’antigen (APC; *Antigen presenting cell*), al qual s’uneixen. Aquesta unió indueix en el limfòcit Th la producció d’interferó  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i altres citocines que activen les funcions de l’APC i que provoquen la mort dels microorganismes paràsits que havien aconseguit sobreviure intracel·lularment.
  - Limfòcits T reguladors (Treg): expressen els clústers de diferenciació CD4, CD25 (ambdós de superfície) i FoxP3 (intracel·lular). Són una subpoblació especialitzada de limfòcits T que suprimeix l’activació del sistema immunitari. Aquestes cèl·lules mantenen l’homeòstasi immunològica i afavoreixen la tolerància cap als autoantígens. Quan es produeix una infecció, les Treg són la principal font d’IL-10, que és una citocina antiinflamatòria multifuncional. La IL-10 inhibeix la resposta inflammatòria a través del bloqueig de les citocines proinflammatòries com el TNF- $\alpha$ , actuant directament sobre les APCs (Redford *et al.*, 2011). A més, la IL-10 també pot inhibir la fagocitosi i la mort microbiana, limitant la producció de ROS,

intermediaris en la resposta de l'IFN- $\gamma$ . Per tant, la IL-10 inhibeix la proliferació i la resposta de les cèl·lules T (Jutel *et al.*, 2003).

## 2.1. TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A LES MUCOSES

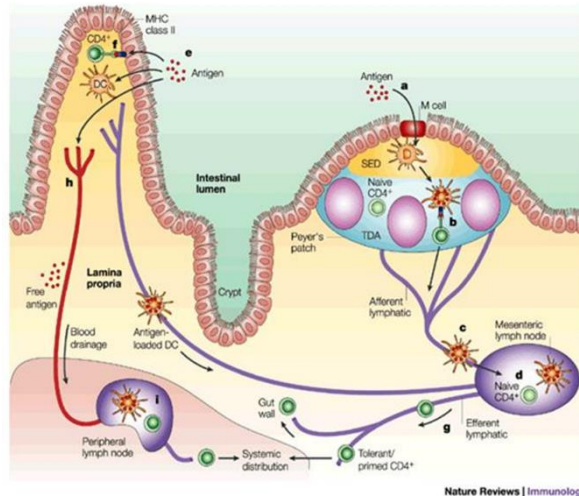
La funció principal de l'intestí és la digestió dels aliments i l'absorció de nutrients des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica. Durant aquest procés, l'intestí està exposat a una àmplia varietat d'antígens i microorganismes patògens provinents dels aliments, així com de bacteris residents, als quals cal limitar amb una barrera.

La mucosa gastrointestinal forma una barrera entre l'organisme i l'ambient de la llum intestinal i ha de permetre un transport eficient dels nutrients a través de l'epiteli intestinal mentre exclou de forma rigorosa el pas de substàncies nocives. És per això que el sistema gastrointestinal presenta diferents nivells de defensa front a toxines, antígens i patògens. Així, hi ha mecanismes protectors no específics a la llum intestinal, com el propi epitelí intestinal, que actua com a sistema de barrera; i mecanismes de defensa específics, com les respostes immunitàries a microorganismes i antígens.

El sistema immunitari associat a les mucoses (MALT; *Mucosa-associated lymphoid tissue*) és el responsable de mediar les relacions simbiòtiques entre l'hoste i els microorganismes endògens (bacteris comensals) i funciona com a primera barrera física i immunològica de defensa contra els microorganismes patògens (Mestecky *et al.*, 2003). El sistema immunitari mucosal manté l'homeòstasi immunològica a través de l'extensa superfície epitelial. El MALT constitueix un òrgan limfoide que pot dividir-se en subàrees connectades funcionalment. Aquestes inclouen el teixit limfoide associat a l'intestí, a la nasofaringe, als bronquis, a l'aparell genito-urinari, a les glàndules salivals, a la glàndula lacrimal i a la laringe.

La major part d'antígens que entren en contacte amb el sistema immunitari ho fan a través de les mucoses dels tractes gastrointestinal, respiratori i genito-urinari. La resposta immunitària generada a les estructures limfoides organitzades del MALT té dues conseqüències importants. Una d'elles és el desenvolupament de cèl·lules B capaces de produir immunoglobulines específiques d'antigen que poden anar als ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) i a altres teixits mucosals, on es diferencien a cèl·lules plasmàtiques. La segona conseqüència, fruit de l'entrada de l'antigen i de la seva presentació, és l'activació i la diferenciació de cèl·lules T que posteriorment migraran fora del MALT i aniran tant a teixits mucosals com a teixits perifèrics (Brandzaeg i Pabst, 2004).

El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT; *Gut-associated lymphoid tissue*) es pot dividir en àrees inductives, on els antígens de les superfícies mucosals estimulen els limfòcits T i B, i àrees efectores, on les cèl·lules efectores, després de la seva extravasació i diferenciació, executen la resposta (**Figura 1.2**). Les àrees inductives de la immunitat intestinal són les plaques de Peyer (PPs) i els GLM, col·lectivament anomenats teixit limfoide associat a l'intestí organitzat (GALT organitzat). Les àrees efectores consisteixen en cèl·lules disperses en la *lamina propria* mucosal, així com en el compartiment epitelial, conegut com a teixit limfoide associat a l'intestí difús (GALT difús). El sistema immunitari mucosal comú connecta les àrees inductores amb els diferents llocs efectors per a la generació d'una resposta comuna i protegir totes les mucoses (Yuki i Kiyono, 2003; Kiyono i Fukuyama, 2004).



**Figura 1.2. Teixit limfoide associat a l'intestí (GALT).** Representació esquemàtica del GALT organitzat (Adaptat de Mowat, 2003).

### 2.1.1. GALT organitzat

#### PLAQUES DE PEYER

Les PP constitueixen el principal teixit limfoide organitzat de l'intestí prim i es localitzen a l'ili i al jejú en humans i rosegadors. Cada PP consta d'un gran nombre de fol·licles rics en cèl·lules B amb centres germinals, que estan envoltats per una àrea interfol·licular rica en cèl·lules T, on hi ha nombroses vècules endotelials altes que permeten la migració cel·lular i la recirculació limfocítica (Kelsall i Strober, 1996). Aquestes àrees limfocítiques

estan separades de la llum intestinal per una capa de cèl·lules epitelials, conegudes com a epiteli associat al fol·licle.

L'epiteli associat al fol·licle conté cèl·lules epitelials convencionals de l'intestí, anomenades enteròcits, i un gran nombre de cèl·lules epitelials especialitzades anomenades cèl·lules M. La característica principal d'aquestes cèl·lules és la seva elevada capacitat de transport transepitelial d'antígens. Les cèl·lules M, a diferència dels enteròcits, no secreten enzims digestius ni muc i tampoc presenten un glucocàlix de superfície gruixut, de manera que són fàcilment accessibles a microorganismes i partícules de la llum intestinal i són la via mitjançant la qual l'antigen entra a la PP (Janeway *et al.*, 2000).

Just per sota d'aquest epiteli hi ha la volta subepitelial, formada bàsicament per cèl·lules dendrítiques que, principalment, capten i presenten antígens. Aquesta zona també conté limfòcits T, cèl·lules plasmàtiques, macròfags i cèl·lules B.

En contacte amb la volta subepitelial es troben els fol·licles, que contenen bàsicament cèl·lules B IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>, així com cèl·lules dendrítiques fol·liculars i limfòcits T CD4<sup>+</sup>, encarregats de col·laborar en el canvi d'isotip cap a IgA (Kelsall i Strober, 1996).

Les zones interfol·liculars estan caracteritzades per una important presència de cèl·lules T, majoritàriament CD4<sup>+</sup>, que responen als antígens de forma dependent del MHC-II. L'àrea fol·licular rica en cèl·lules B i la zona interfol·licular rica en cèl·lules T se superposen en algunes regions i són un lloc important per a les interaccions inicials entre les cèl·lules B i T (MacLennan *et al.*, 1997).

### FOL·LICLES LIMFOIDES AÏLLATS

Els fol·licles limfoides aïllats són agregats limfoides microscòpics que es localitzen a la *lamina propria* de l'intestí prim. Aquests fol·licles són estructural i funcionalment molt similars als fol·licles que formen les PP, tot i que, a diferència d'aquestes, es desenvolupen després de la colonització bacteriana de l'intestí (Suzuki *et al.*, 2010). Estan formats per un fol·licle de limfòcits B envoltat per cèl·lules dendrítiques i algun limfòcit T CD4<sup>+</sup> (Fagarasan *et al.*, 2010). Es creu que són un sistema equivalent o complementari a les PP per a la inducció de les respostes d'IgA generades a la mucosa intestinal (Hamada *et al.*, 2002).

### GANGLIS LIMFÀTICS MESENTÈRICS

Els GLM tenen la mateixa estructura que la resta de ganglis perifèrics. Són estructures ovoides lleugerament aplanades que es troben ubicades en el mesenteri i constitueixen un punt de trobada entre l'antigen, les APCs i els limfòcits procedents de la sang (Mowat, 2003).

Aquest òrgan té dues funcions principals: per una banda actua com a filtre pels antígens i microorganismes mitjançant cèl·lules fagocítiques; i, per l'altra, és on es presenta l'antigen al sistema immunitari. Histològicament es distingeixen tres zones diferents: el còrtex, el paracòrtex i la medul·la.

El còrtex és una àrea rica en limfòcits B i macròfags, on es poden diferenciar els fol·licles primaris i secundaris. Els fol·licles primaris contenen principalment limfòcits B madurs, mentre que els secundaris (que contenen centres germinals) són llocs d'una intensa proliferació de cèl·lules B amb la posterior generació de cèl·lules B memòria, que es queden al fol·licle, i de cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines, que van a la circulació sanguínia i es distribueixen per l'organisme. El paracòrtex és una àrea rica en limfòcits T i cèl·lules dendrítiques i la medul·la conté cèl·lules plasmàtiques i macròfags.

Els limfòcits T verges circulants arriben als GLM guiats per quimiocines produïdes per les cèl·lules dendrítiques. Les cèl·lules dendrítiques de l'escorça capten i processen els antígens que arriben per la limfa, i migren al paracòrtex, on presenten l'antigen als limfòcits verges Th o Ts/c, que es convertiran en els limfòcits T efectors, i activen la resposta immunitària adaptativa (Crivellato *et al.*, 2004).

#### **2.1.2. GALT difús**

##### LIMFÒCITS DE LA LAMINA PROPRIA

La *lamina propria* és la capa de teixit connectiu entre l'epiteli i la *muscularis mucosae*. Aquesta capa està infiltrada per un gran nombre de cèl·lules B i T, cèl·lules dendrítiques, macròfags, mastòcits i leucòcits polimorfonuclears (Kelsall i Strober, 1996). Des del punt de vista de les funcions de defensa, la *lamina propria* desenvolupa principalment una funció efectora: d'una banda prevé l'entrada de patògens a través de l'epiteli; de l'altra, elimina els microorganismes que han aconseguit entrar. En aquest teixit també es duen a terme processos de proliferació i diferenciació cel·lular (Brandzaeg, 2002).

Els limfòcits de la *lamina propria* són majoritàriament cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA i cèl·lules T memòria. Els limfòcits T d'aquest teixit pertanyen principalment a la subpoblació T CD4<sup>+</sup> (Th) i poden desenvolupar respostes tipus Th1 o Th2 en funció de les interaccions cel·lulars amb les APC, el tipus d'antigen i les citocines secretades. En aquesta zona també hi ha limfòcits T CD8<sup>+</sup> (Ts/c) que duen a terme funcions citotòxiques (Acheson i Luccioli, 2004).

### LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS

Els limfòcits intraepiteliais (IELs; *Intraepithelial lymphocyte*) són una població de cèl·lules efectores situada entre els enteròcits, per sota de les unions estretes. Aquestes cèl·lules són diferents de la població limfocítica de la circulació sistèmica i dels limfòcits de la *lamina propria* (Shanahan, 1994). Malgrat que la funció d'aquestes cèl·lules no està clarament determinada, es creu que actuen principalment com a cèl·lules citotòxiques que proporcionen una primera línia de defensa enfront de patògens, possiblement a través de l'eliminació de cèl·lules epitelials infectades o transformades. Els IELs són majoritàriament limfòcits T però també es poden trobar cèl·lules NK.

#### **2.1.3. Inducció i regulació de la resposta immunitària mucosal**

L'entrada dels antígens i dels microorganismes a la mucosa intestinal indueix una resposta immunitària mucosal. Els antígens poden entrar a través de les cèl·lules M, cèl·lules epitelials especialitzades en la captació i el transport d'antígens luminals, o bé a través dels enteròcits que poden actuar com a APC no professionals.

Els antígens captats a través de les cèl·lules M són transportats intactes fins a espais subepiteliais, on són captats i processats per les APC. Aquestes cèl·lules migren cap a les àrees interfol·liculars i/o als fol·licles de les PP, on presentaran l'antigen als limfòcits. Seguidament, els limfòcits T activats secreten factor de creixement transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ; *Transforming growth factor*  $\beta$ ), que inhibeix la producció d'immunoglobulines G (IgG) i IgM i indueix als limfòcits B a realitzar un canvi d'isotip a IgA. Les cèl·lules T precursoras específiques d'antigen i les cèl·lules B precursoras de cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA abandonen les PP i migren als GLM, on maduren i pateixen una expansió clonal. Aquestes cèl·lules entren a la circulació sistèmica a través del conducte toràcic i retornen a l'epiteli intestinal i altres zones mucosals, on exerciran la seva funció com a cèl·lules efectores (Mowat, 2003).

Les cèl·lules B arriben a la *lamina propria* on, sota la influència de les cèl·lules T i de citocines secretades, completen la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA. Els limfòcits T activats migren a diferents zones efectores de la mucosa intestinal, gràcies a complexos interaccions entre selectines i integrines de la seva membrana i els seus lligands presents a la superfície de les cèl·lules endotelials de la *lamina propria* (Kelsall i Strober, 1996).

Les cèl·lules epitelials de la mucosa intestinal poden actuar com a APC no professionals. Els antígens proteics solubles poden travessar els enteròcits de forma no específica mitjançant pinocitosi, o de forma específica a través de receptors. Els enteròcits capten antígens a través de la membrana apical i els presenten als IELs per la membrana basolateral o als limfòcits de la *lamina propria* mitjançant projeccions que emeten a través de porus presents en la membrana basal (Hershberg i Mayer, 2000). Els enteròcits, en condicions normals, presenten MHC-II només a la membrana apical mentre que durant un procés inflamatori s'expressa a les membranes apical i basolateral. En aquestes situacions, la major expressió de MHC-II pot afavorir la presentació d'antígens a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (Th) de la *lamina propria* realitzada pels enteròcits, i contribuir directament a l'activació del sistema immunitari (Kelsall i Strober, 1996).

Els antígens luminals també poden entrar a la mucosa per la via paracel·lular, juntament amb molècules d'aigua i electròlits. Aquesta via d'entrada està restringida gràcies a l'eficàcia de les unions estretes, però es troba alterada en determinats estats patològics, com ara la inflamació intestinal. L'augment de la permeabilitat intestinal afavoreix el pas d'antígens a la mucosa, on són captats per les APCs que, seguidament, processen l'antigen i l'expressen a la seva superfície per iniciar la resposta immunitària (Shanahan, 1994).

La resposta immunitària adaptativa s'indueix principalment per la presentació d'antígens a les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Ts/c). L'activació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> causa una producció de citocines i amplifica ambdós sistemes de defensa: innat i adaptatiu. Aquesta activació condueix a una diferenciació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> a cèl·lules efectores. Les citocines secretades i, per tant, la via de diferenciació que segueixen depèn de l'ambient immunitari local. Una via dirigeix cap a les cèl·lules efectores tipus Th1 i Th2 d'una resposta immunitària, mentre que una altra porta cap a cèl·lules T reguladores que intervenen en la tolerància oral.

## 2.2. ENVELLIMENT DEL SISTEMA IMMUNITARI

La funció del sistema immunitari és garantir la integritat de l'organisme, gràcies a la seva capacitat per identificar amb una elevada especificitat el que és propi del que és estrany. Amb l'edat, aquest sistema es deteriora i incrementa la susceptibilitat i severitat d'infeccions així com en la incidència de fenòmens autoimmunitaris i el càncer (Yancik i Ries, 1991; Hirokawa *et al.*, 1992). De fet, els processos infecciosos són una de les principals causes de l'elevada taxa de morbiditat i mortalitat en persones d'edat avançada, fet que s'atribueix als canvis que s'originen en els components del sistema immunitari amb l'edat, el que es denomina immunosenescència (Pawelec *et al.*, 1995).

La immunosenescència és un procés que afecta a pràcticament tots els components cel·lulars (monòcits, macròfags, neutròfils, cèl·lules NK i limfòcits) i no cel·lulars (mediadors solubles o citocines) de la immunitat innata i adaptativa (DelaRosa *et al.*, 2006). Durant aquest procés, el sistema immunitari experimenta una remodelació amb l'edat, on algunes funcions es redueixen i altres augmenten o es mantenen sense canvis (De la Fuente i Miquel, 2009). A més, és un procés continu que inclou complexes reorganitzacions i mecanismes compensatoris (Globerson i Effros, 2000).

En els individus joves hi ha un equilibri entre la generació dels llinatges mieloide (monòcits, neutròfils, basòfils i eosinòfils) i limfoide (limfòcits T, B i NK). Durant l'envelliment hi ha un desequilibri en la producció d'aquests dos llinatges, mostrant una tendència cap als progenitors mieloides en detriment dels limfoides (Linton i Dorshkind, 2004; Shaw *et al.*, 2010).

La immunosenescència també comporta canvis en la immunitat innata. Així, en els ancians s'ha observat una davallada de l'activitat fagocítica i en la producció de ROS dels neutròfils i macròfags i, per tant, en la seva capacitat microbida (Tortorella *et al.* 2007).

L'envelliment del sistema immunitari deteriora la resposta immunitària adaptativa, de manera que hi ha una menor proliferació de limfòcits T i B; fet que modifica les seves subpoblacions i la producció de citocines (Straub *et al.*, 2001). Els canvis més profunds es produeixen en les funcions efectores en els limfòcits T i B i en la regulació dels limfòcits T (Thoman i Weigle, 1989; Candore *et al.*, 1992).

L'envelliment afecta principalment la funcionalitat dels limfòcits T i especialment la dels limfòcits Th (Pawelec *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 2007). Una de les funcions més importants dels limfòcits T és l'expansió clonal o proliferació en resposta a un antigen



específic. En l'envelliment disminueix la capacitat proliferativa en resposta a mitògens, tant en humans com en ratolins (Pawelec *et al.*, 2002).

La recerca realitzada en les últimes dècades apunten a l'estrès oxidatiu com a principal contribuent a l'envelliment; i estaria a la base de la immunosenescència, així com de la patogènesi de nombroses malalties relacionades amb l'edat, com el càncer, la hipertensió, l'aterosclerosi o les malalties neurodegeneratives (De la Fuente i Miquel, 2009; Salminen i Kaarniranta, 2010).

Les nombroses fonts de compostos oxidants, tant endògenes (com a conseqüència de la respiració aeròbia o la derivada de la resposta leucocítica) com exògenes (com la dieta o l'exposició ambiental) fan necessaris mecanismes de defensa antioxidants, enzimàtics i no enzimàtics, que es troben presents a totes les cèl·lules i fluids de l'organisme (Ames *et al.*, 1993). No obstant això, durant la senescència es perd la capacitat de mantenir un equilibri redox adequat degut a l'increment de substàncies oxidants i/o de la disminució d'antioxidants. Aquest fet origina l'aparició de l'estrès oxidatiu, esdeveniment que causa el dany a lípids, proteïnes, carbohidrats i àcids nucleics (Pandey i Rizvi, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011). Les cèl·lules immunitàries, i especialment aquelles que formen part de la immunitat innata, constitueixen una de les principals fonts de radicals lliures, ja que en elles es generen grans quantitats de ROS que actuen com a components microbicides molt reactius (Morel *et al.*, 1991).

L'estrès oxidatiu i la inflamació es troben estretament relacionats, ja que l'excés de radicals lliures pot induir la resposta inflamatòria, i els radicals lliures en si mateixos són efectors de la inflamació (Vida *et al.*, 2014). Una producció excessiva o descontrolada de radicals lliures pot induir una resposta inflamatòria. A més, l'NF-κB és un factor de transcripció sensible a l'estat redox que juga un paper central en la regulació de processos inflamatoris i en l'*inflammaging* (Salminen i Kaarniranta, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011). De fet, en l'actualitat es considera que moltes patologies associades a l'envelliment, com la hipertensió i la disfunció endotelial, l'aterosclerosi i les malalties neurodegeneratives, inclouen en la seva patogènesi no només processos oxidatius, sinó també un component inflamatori de baix grau perllongat en el temps (De la Fuente *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007).

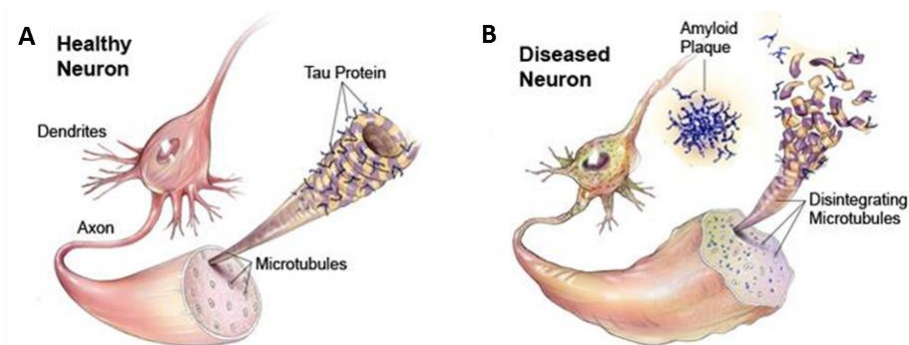
Tot i que la inflamació no és un fenomen negatiu en si mateix, quan els compostos inflamatoris excedeixen els antiinflamatoris, es produeix un desequilibri que dona lloc a l'estrès inflamatori (Kulinsky, 2007). De fet, la inflamació crònica és el principal factor de

risc per a l'envelliment prematur i l'aparició de malalties associades a la senescència. Cal destacar a més, que els compostos inflamatoris com el TNF- $\alpha$  poden, al seu torn, activar l'NF- $\kappa$ B, entrant en una espiral viciosa (Gupta i Gollapudi, 2005; De la Fuente i Miquel, 2009). D'aquesta manera, l'equilibri entre els efectors proinflamatoris, necessaris per fer front als agents patògens i els components antiinflamatoris, és fonamental per a una resposta immunitària adequada, el manteniment de la salut i l'envelliment saludable (Franceschi, 2007).

### 3. SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

El sistema nerviós central (SNC) desenvolupa funcions cognitives com el raonament o la memòria, però també regula diferents funcions vegetatives. Les malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer o la malaltia de Parkinson, sovint comporten el deteriorament de les funcions cognitives, sobretot de l'aprenentatge i de la memòria. Els factors de risc més comuns per la majoria de malalties neurodegeneratives són els polimorfismes genètics i l'edat avançada, tot i que les causes que ocasionen la degeneració neuronal encara no es coneixen amb profunditat. La hipòtesi predominant és que els agregats de proteïna com la  $\beta$ -amiloide, l'acumulació de la qual forma les plaques  $\beta$ -amiloïdes, o la hiperfosforilació de la proteïna Tau, que desestabilitza els microtúbuls i desencadenen una cascada d'esdeveniments que dona lloc a neurodegeneració i apoptosi neuronal (**Figura 1.3**), importants en la progressió de la malaltia d'Alzheimer (Diack *et al.*, 2016). Altres mecanismes que poden estar implicats en la patogènesi de trastorns neurodegeneratius inclouen la inflamació crònica, factors vasculars, l'estrès oxidatiu i una disponibilitat reduïda de factors tròfics a l'encèfal (Sochocka *et al.*, 2016).

Durant molts anys s'ha considerat l'encèfal com un òrgan immunoprivilegiat, aïllat del sistema immunitari i separat de la resta de l'organisme per la barrera hematoencefàlica (BHE). Estudis recents han canviat aquesta concepció, ja que s'ha observat que el SNC es comunica constantment amb el sistema immunitari a través de múltiples vies (Ellwardt *et al.*, 2016; Quan i Banks, 2007). En aquest context, la inflamació crònica pot ser considerada com el resultat de la desregulació d'aquests dos grans sistemes adaptatius per resoldre una inflamació aguda que, al seu torn, pot promoure l'envelliment (Elenkov *et al.*, 2005). La interacció entre l'envelliment, la predisposició genètica i les exposicions a agents ambientals comporta canvis metabòlics i reaccions inflamatòries que predisposen als individus a malalties neurodegeneratives (Deleidi *et al.*, 2015).



**Figura 1.3. Imatge representativa d'una neurona sana (A) i una malmesa (B).** A la neurona sana la proteïna Tau està unida als microtúbuls i promou la seva estabilitat. A la neurona malmesa la hiperfosforilació de Tau promou la disgregació dels microtúbuls i la deposició de plaques de  $\beta$ -amiloide.

### 3.1. FISIOLOGIA CEREBRAL

El SNC està format per l'encèfal, que es localitza a l'interior del crani i conté uns 100.000 milions de neurones, i la medul·la espinal, connectada a l'encèfal. El teixit nerviós consta de dos tipus cel·lulars: les neurones i la glia. Les neurones realitzen la majoria de les funcions pròpies del sistema nerviós, com el pensament, la memòria, el control de l'activitat muscular o la regulació de les secrecions glandulars. Les cèl·lules de la glia són més petites però superen en nombre a les neurones (fins a 25 vegades més). S'encarreguen de sostenir, nodrir i protegir les neurones, així com de produir i mantenir el líquid intersticial que les envolta. Hi ha sis tipus de cèl·lules glials, dels quals quatre (astròcits, oligodendròcits, micròglia i cèl·lules ependimàries) només es troben al SNC. Els altres dos tipus restants (cèl·lules de Schwann i cèl·lules satèl·lit) estan presents en el sistema nerviós perifèric

L'encèfal adult presenta quatre regions principals: el tronc encefàlic, el cerebel, el diencèfal i el cervell.

El còrtex és una regió de substància gris que forma la part externa del cervell que conté milers de milions de neurones. Aquesta regió està replegada sobre si mateixa formant girs o circumvolucions, els més profunds s'anomenen fissures i els més superficials solcs. La fissura longitudinal és la més profunda i divideix el cervell en una meitat dreta i una esquerra, anomenades hemisferis cerebrals, que es connecten internament mitjançant el cos callós. En determinades regions de l'escorça cerebral es processen senyals

específiques de naturalesa sensitiva, motora i d'associació. Les àrees sensibles acostumen a rebre informació d'aquestes característiques i estan vinculades amb la percepció o coneixement conscient d'una sensació. Les àrees motores inicien els moviments i les àrees d'associació es correlacionen amb funcions d'integració més complexes, com la memòria, les emocions o el raonament (Tortora *et al.*, 2012).

### 3.2. MEMÒRIA I DETERIORAMENT COGNITIU

La memòria es pot classificar en diferents categories en funció del tipus d'informació i el temps de retenció. Si la memòria es classifica segons el tipus d'informació trobem:

- **Memòria declarativa o explícita**, també anomenada d'aprenentatge conscient. La memòria declarativa implica el record conscient d'una informació emmagatzemada de forma inconscient. Pot referir-se a esdeveniments (memòria episòdica), o a dades aïllades (memòria semàntica). Com que la recuperació de la informació és conscient, aquest tipus de memòria implica les regions corticals i l'hipocamp.
- **Memòria no declarativa o implícita**, també anomenada d'aprenentatge no conscient (Sweatt, 2003). L'emmagatzematge de la informació corresponent a la memòria implícita és inconscient, però la recuperació de la mateixa pot ser conscient o inconscient. S'ha descrit que les regions implicades en aquest tipus de memòria són principalment l'escorça prefrontal, el nucli accumbens, l'amígdala, cos estriat, cerebel, tàlem i escorça motora. Aquest tipus de memòria inclou la memòria de procediment, que consisteix en la capacitat d'adquirir hàbits i habilitats motores.

La memòria també es pot classificar segons el temps en què la informació es manté (Baddeley, 1992):

- **Memòria a curt termini**. En aquesta categoria es troba la memòria de treball que es refereix al record a curt termini d'informació específica necessària per a l'execució d'una tasca determinada. La memòria de treball implica el processament plenament conscient de la informació (Sweatt, 2003). Les regions cerebrals implicades en aquest tipus de memòria són l'escorça cerebral, l'hipocamp, el cos estriat, l'amígdala i el cerebel.

- **Memòria a llarg termini.** Aquesta memòria pot mantenir la informació per hores, dies o anys, perquè és més estable i menys làbil.

Una de les regions més implicades en la memòria i l'aprenentatge és l'hipocamp, especialment en la memòria espacial (Morris *et al.*, 1982). Aquesta està involucrada principalment en la formació de mapes cognitius detallats del context en què es produeix l'aprenentatge (lloc d'aprenentatge).

Les funcions cognitives més afectades per l'edat són l'atenció, la memòria i l'aprenentatge. Aquestes funcions depenen de la percepció, que mostra un declivi durant l'envelliment atribuïble a disfuncions dels òrgans dels sentits (Peters, 2002). El deteriorament en la percepció, l'atenció i la memòria afecta negativament altres funcions cognitives més complexes com l'aprenentatge (Wilson *et al.*, 2006). Això es deu a que l'aprenentatge i la memòria són dos processos cognitius relacionats, que inclouen la capacitat d'adquirir (atenció i percepció), codificar, emmagatzemar, mantenir i recuperar informació procedent de l'entorn (Sweatt, 2003).

S'ha demostrat que hi ha una pèrdua de funcionalitat de l'hipocamp amb l'edat, el que origina deteriorament de la memòria (Driscoll i Sutherland, 2005). L'hipocamp i el cos estriat poden actuar en paral·lel formant un sistema dinàmic de memòria per a optimitzar el comportament basat en experiències anteriors (Kim i Baxter, 2001; Poldrack i Packard, 2003).

### **3.3. ENVELLIMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

L'envelliment de l'encèfal s'esdevé en paral·lel al dels altres teixits perifèrics dels mamífers. Les característiques úniques tant de l'encèfal com de les neurones els fan especialment vulnerables a l'envelliment. La comparació entre el cervell d'un individu adult i un senescent revela canvis morfològics, bioquímics, metabòlics i funcionals específics.

L'encèfal és un dels òrgans que acumula més estrès oxidatiu amb l'edat (Möller *et al.*, 2010). Algunes de les raons principals d'aquest fenomen es deuen a que a l'encèfal hi ha un elevat consum d'oxigen (necessari per mantenir un alt rendiment energètic), un major nombre de mitocondries i membranes cel·lulars riques en àcids grassos poliinsaturats, que són fàcilment peroxidats. Aquest fenomen és agreujat per una manca de quantitats adequades de sistemes de defensa antioxidants, que també disminueixen a causa de

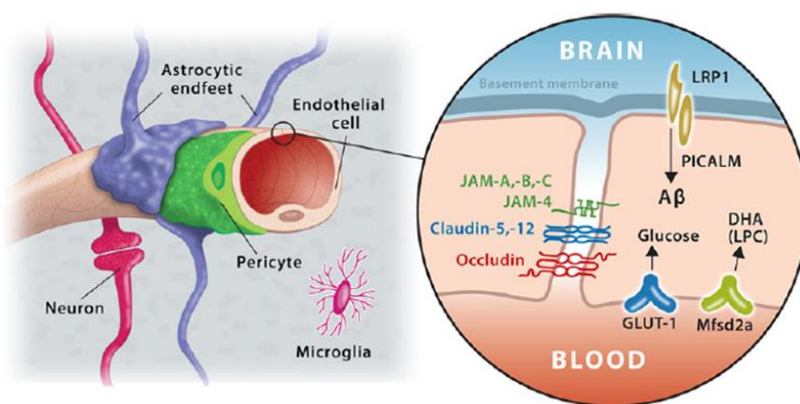
l'estrès oxidatiu (Mariani *et al.*, 2005; Freeman i Keller, 2012). Tot això pot contribuir a l'acumulació del dany neuronal amb l'edat (Yankner *et al.*, 2008). Per aquest motiu l'estrès oxidatiu és considerat en nombrosos estudis com un col·laborador important en el desenvolupament i la patogènesi d'una àmplia varietat de malalties neurodegeneratives, així com en el deteriorament cognitiu relacionat amb l'envelliment (Bishop *et al.*, 2010).

### **3.3.1. ALTERACIONS ESTRUCTURALS**

Durant l'envelliment, es produeixen alteracions morfològiques neuronals (Burke *et al.*, 2006), que consisteixen en canvis de la mida del soma neuronal i la pèrdua i/o deteriorament de dendrites i espines dendrítiques, que modifiquen les sinapsis (Hedden i Gabrieli, 2004, Zindler i Zipp, 2010). La sirtuina-1 (SIRT1) és una proteïna clau pel desenvolupament neuronal, ja que promou l'elongació axonal de les neurones i la ramificació dendrítica (Herskovitz i Guarente, 2014). A més, en l'envelliment hi ha una disminució de la sinaptofisina (Del Valle *et al.*, 2012). Aquesta és una proteïna de les vesícules sinàptiques que, juntament amb la SIRT1, regula la plasticitat sinàptica de les neurones, de manera que la seva disminució comporta pèrdua de les capacitats cognitives (Li *et al.*, 2017). D'altra banda, durant l'envelliment, els axons pateixen una desmielinització que altera la conductivitat neuronal. També hi ha alteracions de la densitat de receptors neuronals per a neurotransmissors (Rizzo *et al.*, 2015). Malgrat tot això i en contrast amb la idea que amb l'edat hi ha una pèrdua neuronal irreversible, en les últimes dècades s'ha demostrat que, en àrees específiques de l'encèfal, les neurones són contínuament regenerades a partir de cèl·lules mare indiferenciades. Aquesta regeneració no és indefinida i arriba un moment en que els danys ocasionats com a conseqüència de l'envelliment o de les malalties neurodegeneratives són superiors que la capacitat regeneradora del teixit neuronal (Zindler i Zipp, 2010). L'envelliment també provoca alteracions funcionals sobre la neuròglia, sense observar-se canvis importants en el nombre total de cèl·lules (Pakkenberg i Gundersen, 1997). En aquest context, les cèl·lules principalment afectades per l'envelliment són la micròglia i els oligodendròcits, sent aquests últims els més susceptibles a patir alteracions morfològiques i funcionals pels canvis que pateixen en les capes de mielina (Peters, 2002).

### 3.3.2. ALTERACIONS EN LA BARRERA HEMATOENCEFÀLICA

Els vasos sanguinis cerebrals formen la BHE, que restringeix el pas de substàncies de la circulació sistèmica a l'encèfal (Rosenberg, 2014). Diversos tipus cel·lulars interaccionen per formar la BHE, que es coneix amb el nom d'unitat neurovascular, i està composta per cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis cerebrals, làmina basal, astròcits i perícits (**Figura 1.4**) (Iadecola i Nedergaard, 2007). Degut a la unió de les cèl·lules endotelials per les proteïnes del complex d'unió, la via paracel·lular queda pràcticament estanca i les substàncies de pes molecular superior a 180 Da han de creuar l'endoteli cerebral per la via cel·lular (Grieb *et al.*, 1985; Mitic i Anderson, 1998).



**Figura 1.4. Estructura de la barrera hematoencefàlica.** Unitat neurovascular formada per cèl·lules endotelials, làmina basal, perícits i astròcits. Les cèl·lules endotelials presenten les proteïnes del complex d'unió que segellen la via paracel·lular (Adaptat de Keaney i Campbell, 2015).

Entre les principals proteïnes del complex d'unió, destaquen la claudina, l'occludina o la E-cadherina. A més, les proteïnes *zonula occludens* (ZO) 1, 2 i 3, juntament amb la cingulina han estat identificades com a proteïnes citoplasmàtiques que uneixen les proteïnes de la membrana amb l'actina, responsable de la integritat estructural i funcional de l'endoteli (Ballabh *et al.*, 2004).

Durant l'envelliment, es produeixen alteracions en el sistema circulatori com poden ser canvis en el diàmetre i permeabilitat dels capil·lars i/o canvis histològics en la vascularitat de l'encèfal, que afecten el pas de substàncies i nutrients al cervell. A més, els principals factors de risc vascular, com la hipertensió, la diabetis tipus II o el tabac poden alterar a la BHE, magnificant les alteracions causades per l'envelliment, de manera que poden

afectar la comunicació neuronal i, per tant, a les funcions cognitives i motores (Rizzo *et al.*, 2015). L'envelliment incrementa la permeabilitat de la BHE, ja que hi ha un augment de la concentració d'albumina al líquid cefaloraquídi en persones d'edat avançada. Aquesta concentració d'albumina en el líquid cefaloraquídi encara és més elevada en els pacients de demència vascular (Blennow *et al.*, 1990).

### 3.3.3. NEUROINFLAMACIÓ

La neuroinflamació es refereix a una resposta inflamatòria originada al SNC després d'una lesió per agents, que poden ser infecciosos, amb acumulació de cèl·lules glials (micròglia, astròcits). Les conseqüències fisiològiques, bioquímiques i conductuals de la neuroinflamació depenen del seu origen i del seu curs (DiSabato *et al.*, 2016). La neuroinflamació i els seus mecanismes reguladors s'inicien en resposta a una alteració de l'homeòstasi neuronal. Una inflamació aguda al SNC és causada per diferents proteïnes tòxiques o agents infecciosos que activen ràpidament les cèl·lules glials i condueix a la reparació de l'àrea danyada de l'encèfal. No obstant això, si els agents nocius persisteixen, aquesta inflamació aguda es converteix en crònica, de manera que l'activació de les cèl·lules glials és exagerada, i es desencadena la degeneració del teixit. A més, la inflamació crònica de l'encèfal altera els mecanismes reguladors que eliminen proteïnes neuronals mal plegades o danyades. L'augment de mediadors proinflamatoris, com la IL-1 $\beta$ , la IL-6 o el TNF- $\alpha$ , està estretament relacionat amb el deteriorament dels mecanismes de l'eliminació de les ROS. La sobreproducció de ROS condueix a l'estrès oxidatiu i indueix l'activació d'NF- $\kappa$ B, un mediador clau de les reaccions inflamatòries (Sochocka *et al.*, 2016).

La micròglia regula contínuament el microambient mitjançant la producció de factors que influencien als astròcits i a les neurones adjacents, particularment en resposta a la infecció o lesió de cèl·lules neuronals. L'activació immunitària al SNC, que està fortament controlada en comparació amb la perifèria, inclou sempre a astròcits i a la micròglia que, en condicions no patològiques, contribueixen a la regulació de l'homeòstasi del teixit cerebral. Les cèl·lules endotelials i els macròfags perivasculars també són importants per a la propagació de senyals inflamatòries del SNC (DiSabato *et al.*, 2016). Això condueix a l'activació d'una resposta inflamatòria transitòria i autolimitada del sistema immunitari que repara el teixit lesionat. En condicions patològiques, quan els mecanismes normals de resolució fallen, hi ha una activació anormal del sistema immunitari i una sobreproducció de factors proinflamatoris, que condueix a l'estat de neuroinflamació



crònica i a la conseqüent aparició i progressió d'alteracions neurodegeneratives (Sochocka *et al.*, 2016).

L'exposició crònica a mediadors d'inflamació pot alterar la BHE i permetre que cèl·lules immunitàries i nombroses citocines proinflamàtores arribin al parènquima cerebral, on estimulen la micròglia i afavoreixen la inflamació cerebral de baix grau (Di Benedetto *et al.*, 2017). La micròglia i els astròcits activats canvien la seva morfologia i funció i produeixen citocines proinflamàtores com la IL-1 $\beta$ , la IL-6 i el TNF- $\alpha$ . Nombrosos estudis han confirmat que en les malalties neurodegeneratives cròniques, la concentració de citocines proinflamàtores està elevada, fet que contribueix significativament en la seva progressió (Smith *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2016). A més, generalment, l'expressió de citocines antiinflamàtores com ara la IL-4, la IL-10 i la IL-13 està disminuïda. Aquesta davallada de les molècules antiinflamàtores sensibilitza el teixit cerebral a diferents factors d'estrès. En aquest entorn, disminueix la neurogènesi a partir de cèl·lules precursors neuronals i provoca una davallada de la capacitat d'aprenentatge i de la memòria (Chen *et al.*, 2016).

Generalment, les citocines proinflamàtores contribueixen directament en la degeneració neuronal, ja que poden induir l'apoptosi neuronal i de cèl·lules gials, augmentar la permeabilitat de la BHE i promoure el tràfic de cèl·lules immunitàries perifèriques al SNC. A més, aquestes citocines promouen l'augment de la producció de factors que són tòxics per a les neurones, com les ROS o l'òxid nítric (Smith *et al.*, 2012; Hsieh i Yang, 2013). En aquest sentit, el TNF- $\alpha$  és la citocina neuroinflamàtoira més important, ja que pot reclutar cèl·lules immunitàries perifèriques al teixit neuronal a través de la BHE. La presència de TNF- $\alpha$  al parènquima cerebral està implicada en la inflamació crònica i s'ha associat a malalties neurodegeneratives. Cal destacar a més, que el TNF- $\alpha$  pot activar l'NF- $\kappa$ B, entrant en una espiral viciosa (Gupta i Gollapudi, 2005; De la Fuente i Miquel, 2009).

Estudis recents suggereixen que la micròglia pateix un procés de senescència similar al de les cèl·lules immunitàries perifèriques. S'ha detectat micròglia senescent i hiperreactiva a l'encèfal d'individus d'edats avançades (Deleidi *et al.*, 2015). L'encèfal envellit pot actuar sobre el sistema immunitari i afavorir el reclutament de leucòcits, que contribueixen a la immunosenescència i a la neuroinflamació (Gemechu i Bentivoglio, 2012). Tot i que en cada malaltia neurodegenerativa els mecanismes que condueixen a la neurodegeneració són diferents, la inflamació crònica sol ser una característica predominant en la naturalesa progressiva de la neurodegeneració. De fet, la inflamació

crònica és el principal factor de risc subjacent a l'envelliment i a les malalties associades a l'edat.

A més, en els darrers anys, s'ha evidenciat una estreta relació entre l'oxidació i la inflamació. Un estat crònic d'inflamació, on el factor de transcripció proinflamatori i sensible a l'estat redox NF- $\kappa$ B està sobre activat, promou la producció excessiva de radicals lliures (Salminen *et al.*, 2008a; Salminen i Kaarniranta, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011). Així, els radicals lliures podrien ser considerats com a conseqüència de la inflamació i, tot i que la inflamació no és un fenomen negatiu per si mateix, quan els compostos inflamatoris excedeixen als antiinflamatoris, es produeix un desequilibri que dóna lloc a l'estrès inflamatori (Kulinsky, 2007).

### **3.3.4. ESTRÈS OXIDATIU**

El sistema nerviós i, més concretament, l'encèfal són els que pateixen més dany oxidatiu durant l'envelliment (Möller *et al.*, 2010) degut a l'elevat consum d'oxigen i uns nivells més baixos d'enzims antioxidants, entre altres factors (Mariani *et al.*, 2005; Freeman i Keller, 2012).

Les ROS poden desencadenar efectes beneficiosos si la seva producció és limitada, o nocius, si la seva producció és excessiva (Bosmann i Ward, 2013). Amb l'edat es perd la capacitat de mantenir un equilibri redox adequat a causa de l'augment de substàncies oxidants i/o de la disminució d'antioxidants. Aquest fet resulta en l'aparició de l'estrès oxidatiu, esdeveniment que malmet diverses biomolècules com els lípids, les proteïnes, els carbohidrats i els àcids nucleics (Pandey i Rizvi, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011).

Una de les conseqüències de l'elevat estrès oxidatiu és la peroxidació lipídica o lipoperoxidació per l'acció de les ROS sobre els lípids. Aquesta degradació oxidativa, que afecta principalment als àcids grassos poliinsaturats, causa el deteriorament funcional de les membranes biològiques i altera la seva estructura, integritat, fluïdesa i permeabilitat (Pandey i Rizvi, 2010).

Tot i que els organismes aerobis pateixen lesions oxidatives, també tenen la capacitat de reduir o inhibir l'atac de les ROS i eliminar-ne l'excés per a protegir la fisiologia cel·lular, i ho fan a través dels antioxidants (Halliwell i Gutteridge, 2006). Els agents antioxidants poden ser de tipus enzimàtic o no enzimàtic i contribueixen a mantenir l'homeòstasi redox cel·lular (Halliwell i Gutteridge, 2006). Les principals defenses enzimàtiques són les

que interaccionen directament amb les ROS com la catalasa, la superòxid dismutasa (SOD) i la glutatió peroxidasa (GPx).

La SOD elimina el radical superòxid, generant peròxid d'hidrogen (Naudí *et al.*, 2009) que, tot i ser tòxic i altament oxidant no ho és tant com el radical superòxid. A continuació, la catalasa i la GPx, que són dos enzims diferents però cinèticament complementaris, eliminen el peròxid d'hidrogen. Mentre que la catalasa s'activa quan hi ha una concentració elevada de peròxid d'hidrogen, la GPx és més eficaç a concentracions més baixes, ja que presenta un elevada afinitat però una baixa taxa catalítica (Naudí *et al.*, 2009).

Es considera que l'estrès oxidatiu pot ser una de les causes originàries de l'envelliment i de l'aparició de malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, l'esclerosi lateral amiloide, l'esclerosi múltiple, el trastorn cognitiu lleu o la malaltia de Huntington. A més, el declivi cognitiu que acompanya l'envelliment es correlaciona amb una disminució de la concentració d'antioxidants cerebrals (Berr, 2000). D'aquesta manera, s'associa l'envelliment cerebral amb un desequilibri progressiu entre les defenses antioxidants i les concentracions intracel·lulars de ROS (Reiter, 1998).

## 4. DIETA I ENVELLIMENT

Nombrosos estudis evidencien que l'estil de vida influeix en el desenvolupament de patologies associades a l'envelliment, com l'aterosclerosi, la hipertensió o la diabetis tipus II, entre d'altres. Concretament, la dieta té un fort impacte en l'aparició o evolució de patologies com la immunosenescència o el deteriorament cognitiu (Maijó *et al.*, 2014).

La dieta millora la salut a través de la regulació de processos específics, contrarestant l'*inflammaging* i/o revertint canvis epigenètics produïts durant l'envelliment (Bacalini *et al.*, 2014; Jeffery i O'Toole, 2013). Nombrosos estudis mostren el potencial de components dietètics, tant els macronutrients (carbohidrats, proteïnes, greixos i fibra) com els micronutrients (antioxidants, vitamines i minerals), com a primera línia d'intervenció en la prevenció i tractament del càncer i altres patologies associades a l'envelliment (Eilat-Adar i Goldbourt, 2010; Milner, 2004).

La restricció calòrica, una intervenció dietètica en la que es restringeix la quantitat de calories ingerides però mantenint un aport adequat de micronutrients, allarga la vida mitjana de les rates, fenomen que es va descobrir fa més de 75 anys (McKay *et al.*, 1998).

Des de llavors, la restricció calòrica ha demostrat que incrementa la vida mitjana en molts models d'organismes (Colman *et al.*, 2014; Greer i Brunet 2009). Els mecanismes específics implicats en els efectes de la restricció calòrica encara no es coneixen, tot i que s'ha vist que aquests tipus d'intervencions dietètiques redueixen la inflamació (Chung *et al.*, 2001) i l'estrès oxidatiu (Sohal i Weindruch, 1996), modifiquen la funció neuroendocrina i el sistema nerviós simpàtic, així com també disminueixen la despesa energètica (Bordone i Guarente, 2005).

S'ha observat que un bon manteniment de la microbiota intestinal és essencial per prevenir malalties com el càncer de còlon (Langille *et al.* 2014), la diabetis o els trastorns neurodegeneratius (Vaiserman *et al.*, 2017; Bischoff, 2016). Dietes riques en àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ -3, com l'àcid  $\alpha$ -linolènic, l'àcid eicosapentainòic (EPA; *Eicosapentaenoic acid*) i l'àcid docosahexaenòic (DHA; *Docosahexaenoic acid*) milloren l'evolució de malalties cardiovasculars, neurodegeneratives, inflamatòries i autoimmunitàries (Pae *et al.*, 2012). Compostos antioxidants com els polifenols o els flavonoides redueixen l'estrès oxidatiu i, per tant, milloren l'evolució i el pronòstic de malalties cardiovasculars, malalties neurodegeneratives i càncer (Singh *et al.*, 2015).

#### **4.1. DIETA I ENVELLIMENT DEL SISTEMA IMMUNITARI**

La majoria dels paràmetres afectats per la immunosenescència estan sota el control genètic (Franceschi *et al.*, 1999). Tot i així, factors com l'estat nutricional, l'activitat física o l'estrès poden influenciar la capacitat per generar una resposta immunitària efectiva davant d'una infecció (Lesourd, 2006). Concretament, la immunocompetència està directament afectada pels aliments que mengem i, deficiències en determinades vitamines i minerals, una malnutrició proteica o la ingesta excessiva d'àcids grassos saturats, poden comprometre la resposta immunitària (Lesourd, 2006; Pae *et al.*, 2012).

En edats avançades, hi ha bacteries beneficioses que solen estar reduïdes degut a una menor secreció d'IgA específica d'antigen. El consum de prebiòtics i probiòtics promou el creixement d'aquestes bacteries beneficioses (Nova *et al.*, 2007; Ouwehand *et al.*, 2009) i, en conseqüència, generen un impacte important en el GALT, així com en les cèl·lules immunitàries circulants (Hamilton-Miller, 2004). A més, determinades soques de probiòtics milloren la resposta immunitària innata, com la fagocitosi i la citotoxicitat en persones ancianes (Gill *et al.*, 2001a, 2001b).

D'altra banda, compostos antioxidants com els polifenols (que es troben en un gran nombre de fruits i vegetals) mostren efectes beneficiosos pel sistema immunitari, com l'atenuació de la inflamació, causada per una disminució en l'alliberació de citocines proinflamatòries per part dels limfòcits T (Ford *et al.*, 2016). Entre aquests compostos destaca el resveratrol, present a la pell del raïm i a les baies, que incrementa el nombre de cèl·lules Th en rates envellides (Yuan *et al.*, 2012) i disminueix la neuroinflamació inhibint l'activació de la micròglia proinflamatòria (Yang *et al.*, 2017).

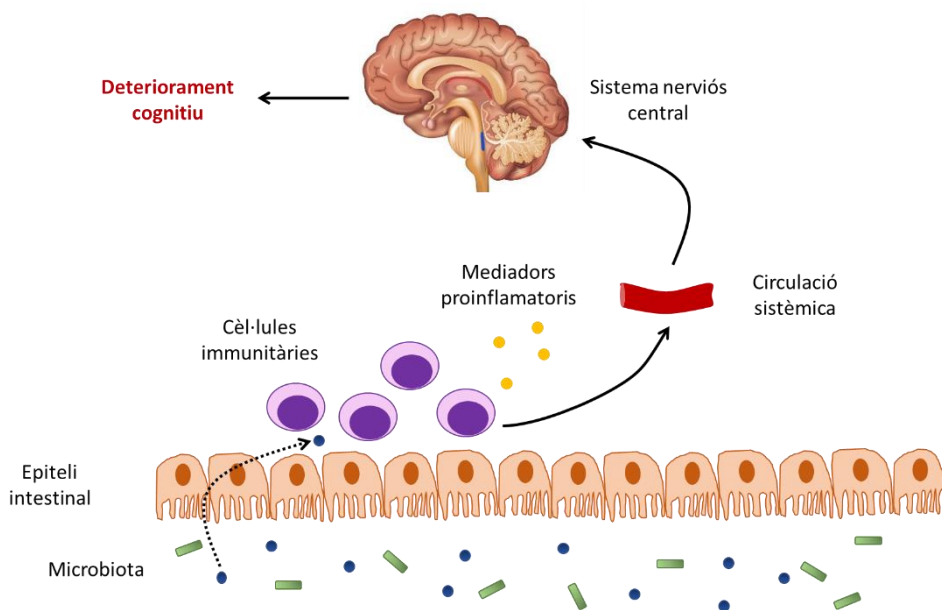
En la població senescent, les dietes riques en àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ -3 redueixen l'*inflammaging*. La seva administració oral redueix la IL-1 $\beta$  i la IL-6 plasmàtiques (Vedin *et al.*, 2008), una menor resposta proliferativa del limfòcits T (Han *et al.*, 2012; Thies *et al.*, 2001a) i una reducció de l'activitat de les cèl·lules NK (Thies *et al.*, 2001b). A més, els àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ -3 disminueixen la producció de citocines proinflamatòries a macròfags mitjançant la inactivació de la via NF- $\kappa$ B (Calder, 2015) i inhibeixen la formació d'eicosanoids, quimiocines (IL-8, MCP1), molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1) i ROS (Calder, 2010; Galli i Calder, 2009).

## 4.2. DIETA I ENVELLIMENT DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

En els últims anys s'han realitzat nombrosos treballs sobre suplementes dietètics i el deteriorament cognitiu característic d'edats avançades i/o en relació a malalties neurodegeneratives (Caracciolo *et al.*, 2014). L'encèfal és un òrgan complex amb un metabolisme i un consum de nutrients elevat (Morris, 2012). En els darrers anys s'ha establert l'eix intestí-cervell, que mostra la relació existent entre la dieta, el microbioma i el manteniment de la funció cognitiva (**Figura 1.5**). La modificació del microbioma durant l'envelliment dóna lloc a una inflamació intestinal de baixa intensitat, fet que promou l'alliberació de mediadors inflamatoris sistèmics. Aquestes substàncies proinflamatòries poden activar les cèl·lules gials i promoure neuroinflamació, que afavoreix el deteriorament cognitiu (Caracciolo *et al.*, 2014).

Estudis epidemiològics han demostrat que el consum de fruita i vegetals retarden el deteriorament cognitiu. En nombrosos estudis, aliments com el raïm, el tomàquet o la soja, que presenten un elevat contingut en antioxidants i substàncies antiinflamatòries com els polifenols o les isoflavones, han demostrat els seus efectes neuroprotectors (Miller i Shukitt-Hale, 2012). Agents com el resveratrol i les proantocianidines no només milloren els dèficits cognitius sinó que, a més, incrementen l'esperança de vida de

ratolins SAMP8 mitjançant l'activació de la SIRT1 (Porquet *et al.*, 2013; Yokozawa *et al.*, 2009). Per altra banda, els nabius, també presenten un gran nombre d'antioxidants. De fet, millora tant la memòria espacial com la memòria a curt termini de ratolins C57BL/6 envellits (Beracochea *et al.*, 2016). Diversos estudis mostren que el consum de pèptids de soja milloren el deteriorament cognitiu associat a l'edat gràcies al seu efecte sobre els factors neurotròfics (Katayama *et al.*, 2014).



**Figura 1.5. Representació esquemàtica de la relació entre el microbioma intestinal i el deteriorament cognitiu en l'envelliment.**

Nombrosos estudis suggereixen que compostos fitoquímics com el DHA (Wu *et al.*, 2008), els ginsenosíds (Zhao *et al.*, 2009) o la catequina (Li *et al.*, 2009) atenuen la pèrdua de la memòria durant l'envelliment. S'ha demostrat que aquests compostos incrementen la síntesi de proteïnes relacionades amb la plasticitat sinàptica, incloent el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF; *Brain-derived neurotrophic factor*) i el CREB, crítics per l'aprenentatge i la memòria (Gómez-Pinilla *et al.*, 2007).

### 4.3. EFECTES DE LA SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES

Les proteïnes plasmàtiques d'origen boví i porcí han estat àmpliament utilitzades com a ingredients alimentaris d'alta qualitat per als animals de granja i s'utilitzen com a alternativa a l'ús dels antibiòtics com a promotors del creixement (Coffey i Cromwell,

1995). De fet, les taxes de creixement i l'eficiència de conversió de pinso consumit són molt similars entre els animals que han consumit pinso suplementat amb plasma assecat per polvorització (SDP; Spray-dried plasma) i pinso amb dosis subterapèutiques d'antibiòtics (Torrallardona *et al.*, 2003).

L'SDP s'obté de la sang d'animals sans destinats al consum humà en els escorxadors. A aquesta se li afegeix anticoagulant, generalment citrat sòdic, i es centrifuga per eliminar els eritròcits. D'aquesta manera s'obté el plasma que, posteriorment, és assecat per polvorització. La pols obtinguda s'utilitza per la suplementació de pinso (Russell i Weaver, 1996; Coffey i Cromwell, 2001). L'SDP està constituït en un 78 % per proteïna, de la qual aproximadament un 50 % és albúmina, un 25 % globulina (incloent  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -globulina), un 5 % fibrina i un 20 % altres proteïnes, on s'inclou l'haptoglobulina, la transferrina, factors de creixement i altres proteïnes i pèptids (Howell i Lawrie, 1983).

S'ha observat que les proteïnes presents a l'SDP retenen la seva activitat biològica en l'animal i, per tant, conserven la seva capacitat per induir una resposta fisiològica. Gatnau *et al.* (1989) van veure que les immunoglobulines presents en l'SDP són absorbides des de la llum intestinal al torrent sanguini en porcs acabats de néixer i privats de calostre.

Nollet *et al.* (1999) van observar que les immunoglobulines administrades per via oral a animals establats tenien un efecte protector davant la inoculació, per la mateixa via, de bacteries. També s'ha vist que els vedells alimentats amb pinso suplementat amb SDP presenten una mortalitat molt inferior als que no reben dietes suplementades (Morrill *et al.*, 1995; Bhandari *et al.*, 2008). En alguns estudis aquesta mortalitat està reduïda gairebé un 30 % (Quigley i Wolfe, 2003). Markowska-Daniel *et al.* (2003) van observar una reducció en la mortalitat i la morbiditat, una millora en el creixement i un increment en el nombre de limfòcits T.

L'eficàcia dels suplementos plasmàtics en els desordres intestinals ha estat molt estudiada. S'ha vist que disminueixen la gravetat de les infeccions intestinals en porcs (Quigley i Drew, 2000; Torrallardona *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2008) i en un model d'inflamació intestinal en rata s'ha demostrat que la suplementació amb SDP protegeix la mucosa intestinal d'una sobreestimulació immunitària (Pérez-Bosque *et al.*, 2004 i 2006).

A més, els efectes beneficiosos de l'SDP no només s'han observat en la mucosa intestinal, sinó també a altres mucoses més allunyades com la pulmonar o la genitourinària, que es comuniquen gràcies al sistema immunitari mucosal comú. En concret, Campbell *et al.*

(2004) van observar que l'SDP millorava la supervivència de galls d'indi que patien una infecció pulmonar per *Pasteurella multocida*. Altres resultats mostren que l'SDP redueix la resposta immunitària pulmonar en un model murí d'inflamació pulmonar aguda, a través de mediadors antiinflamatoris. Aquests efectes es deuen a la interacció amb les cèl·lules del GALT i mitjançant el sistema immunitari mucosal comú (Maijó *et al.*, 2012a i 2012b). A més, l'SDP millora la taxa d'èxit en femelles gestants gràcies als seus efectes antiinflamatoris tant a la mucosa genitourinària, disminuint el TNF- $\alpha$  i el IFN- $\gamma$  i incrementant el TGF- $\beta$ 1 uterins, com els seus efectes sistèmics, reduint el TNF- $\alpha$ , la proteïna C reactiva i el cortisol sanguinis (Song *et al.*, 2015).

D'altra banda, també s'ha vist que els porcs alimentats amb SDP presenten una davallada de l'expressió de citocines proinflamatòries TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  a l'hipotàlem, la hipòfisi i les glàndules suprarenals, així com a la melsa, el timus i el fetge (Touchette *et al.*, 2002). Aquests resultats demostren que porcs alimentats amb SDP presenten un menor grau d'activació de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal, eix que està molt vinculat a l'activació del sistema immunitari (Carroll *et al.*, 2002).

En base a que en nombrosos estudis ha quedat demostrat l'efecte antiinflamatori i regulador del sistema immunitari, fa del SDP un possible candidat per prevenir la immunosenescència i l'*inflammaging* característics de l'envelliment.





## **II. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS**

---

---



Al llarg dels darrers anys, ha incrementat l'interès per promoure un envelliment saludable degut a una esperança de vida més llarga. A mida que s'envelleix, hi ha una desviació de l'homeòstasi i un increment de la vulnerabilitat a l'estrès ambiental que condueix al desenvolupament de patologies com la diabetis, les malalties cardiovasculars o els trastorns neurodegeneratius, entre d'altres.

Durant l'envelliment incrementa l'activació basal inespecífica del sistema immunitari que condueix a un estat inflamatori de baixa intensitat però perllongat en el temps, que es coneix com "*inflammaging*" (Franceschi *et al.*, 2007). Aquesta inflamació cursa amb un increment sostingut de citocines proinflamatòries i altres mediadors de la inflamació, que contribueixen al desenvolupament i progressió de malalties associades a l'envelliment.

El teixit limfoide associat a l'intestí és una primera línia de defensa de l'hoste davant de microorganismes patògens. Durant l'envelliment es redueix la integritat de l'epiteli intestinal així com la secreció de mucosa, fins i tot, canvia el microbioma que, juntament amb l'*inflammaging* implica una disminució de la capacitat de defensa de l'organisme. Per tant, com a primer objectiu s'ha plantejat:

- **Caracteritzar l'activació basal inespecífica del teixit limfoide associat a l'intestí durant l'envelliment en ratolins amb senescència accelerada.**

En els darrers anys s'ha demostrat que la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques atenua la inflamació intestinal induïda per l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB) i modula la resposta immunitària intestinal en diferents models de rosegadors (Pérez-Bosque *et al.*, 2006 i 2016a). Durant l'envelliment, hi ha una davallada progressiva de la funcionalitat del sistema immunitari, que es coneix com a immunosenescència, que dificulta la capacitat de generar respostes adaptatives contra patògens específics (Fujihashi i Kiyono, 2009). Els individus d'edat avançada, per tant, són més susceptibles a patir infeccions sistèmiques. Davant les propietats antiinflamatòries i immunomoduladores de les proteïnes plasmàtiques s'ha proposat el següent objectiu:

- **Estudiar l'efecte de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària intestinal front l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* en ratolins senescents.**

Tal com s'ha comentat anteriorment, durant la senescència s'incrementa l'activació immunitària basal i inespecífica que pot donar lloc a alteracions cognitives. Diferents suplementes dietètics poden reduir l'activació basal del teixit immunitari associat a l'intestí i, a través de la connexió que existeix entre l'intestí i el cervell, millorar les disfuncions cognitives associades a l'envelliment. Diversos estudis han demostrat que amb una intervenció dietètica adient es pot millorar la capacitat cognitiva, com és el cas de les dietes riques en polifenols (Porquet *et al.*, 2013) o en àcids grassos  $\omega$ -3 (Wu *et al.*, 2008). Fruit d'aquestes observacions en la prevenció del deteriorament cognitiu s'ha plantejat el tercer objectiu:

- **Determinar els efectes de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques sobre les alteracions estructurals i funcionals del sistema nerviós central durant l'envelliment.**

### **III. MATERIAL I MÈTODES**

---

---



## 1. ANIMALS

S'han utilitzat mascles de la soca de ratolins amb senescència accelerada (SAM; *Senescence accelerated mouse*) procedents d'una colònia plenament consolidada a la Unitat d'Experimentació Animal de Farmàcia dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Els ratolins s'han mantingut en condicions controlades de temperatura (18 - 22°C), humitat relativa (55 %) i en cicles de llum/fosc de 12 h.

Els ratolins SAM són consanguinis i s'han desenvolupat a partir de la soca AKR/J (Takeda *et al.*, 1981). En concret, la soca de ratolins propensa a la senescència accelerada (SAMP8; *Senescence accelerated mouse prone 8*) està especialment indicada per a estudis sobre dèficits d'aprenentatge i memòria, així com per a estudis sobre la resposta immunitària (Takeda *et al.*, 1997). La soca resistent a la senescència accelerada (SAMR1; *Senescence accelerated mouse resistant 1*) s'ha utilitzat com a animals de referència en la caracterització del model.

La manipulació dels animals al llarg de tot el procés experimental, així com en el seu sacrifici, s'ha dut a terme segons els procediments autoritzats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA, 374/12 i 503/14) de la Universitat de Barcelona i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DAAM: 6559 i 7939) seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (Guillen, 2012).

## 2. PINSOS EXPERIMENTALS

Fins al moment d'iniciar l'estudi, els ratolins han estat alimentats amb pinso estàndard de laboratori (Envigo, Itàlia). L'estudi s'ha fet emprant dos pinsos experimentals, un suplementat amb plasma porcí assecat per polvorització (SDP; *Spray-dried plasma*) i un pinso control on s'ha substituït aquest suplement per proteïnes làctiques (**Taula 3.1**). Els pinsos han estat preparats en forma de *pellet* per APC-Europe, S.L.U. (Espanya) i formulats per contenir un 18 % de proteïna, per tal de satisfer els requeriments nutricionals d'animals de laboratori d'acord amb el *National Research Council* (1995).

El pinso SDP conté 80 g d'SDP per kg. La sang per produir l'SDP es recull en escorxadors i prové de porcs sans destinats a consum humà. Seguidament, se li afegeix anticoagulant, normalment citrat sòdic, i s'eliminen els eritròcits per centrifugació (Russell i Weaver, 1996; Coffey i Cromwell, 2001).



Aquest ingredient ha estat assecat per polvorització per obtenir un producte en pols estable que conté immunoglobulines (17,5 % d'IgG), l'activitat de les quals ha estat demostrada per Borg *et al.* (2002).

**Taula 3.1. Composició dels pinsos experimentals.**

Ingredient (g/kg)	Control	SDP
SDP	---	80
Blat de moro	199,3	308,8
Llet descremada en pols	530,7	340,5
Sacarosa	94,5	94,5
Oli de soja	70	70
Cel·lulosa	50	50
AIN-93-G-MX (94046)*	35	35
AIN-93 VX (94047)*	15	15
DL-Metionina	2,5	3,2
Bitartrat de colina	3	3

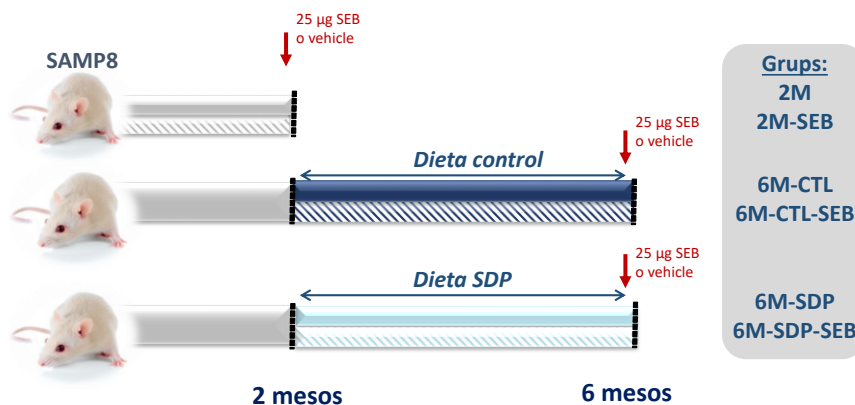
\*Subministrat per Envigo (Itàlia).

### 3. DISSENY EXPERIMENTAL

Per a la caracterització del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT; *Gut-associated lymphoid tissue*) durant l'envelliment, s'han utilitzat ratolins de la soca SAMP8 (P8) i de la soca SAMR1 (R1) de 2, 6 i 9 mesos d'edat, alimentats amb pinso estàndard d'estabulari. Al final del període experimental s'han sacrificat els ratolins, s'ha extret l'intestí prim i el còlon i se n'ha mesurat la seva longitud. També s'ha analitzat el percentatge de limfòcits T col·laboradors (Th; *T helper*) activats i T reguladors (Treg) als ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) i a les plaques de Peyer (PP).

Per estudiar els efectes de la suplementació dietètica enfront una inflamació intestinal aguda induïda amb l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB; *Staphylococcus aureus enterotoxin B*) en animals envellits s'han utilitzat 3 grups experimentals: un grup de referència de 2 mesos d'edat (**2M**), alimentat amb pinso estàndard, i dos grups de 6 mesos d'edat, alimentats amb pinso estàndard fins als 2 mesos i, posteriorment, amb el pinso experimental control o bé amb el pinso experimental suplementat amb SDP durant 4 mesos, és a dir, fins als 6 mesos d'edat (**6M-CTL** i **6M-SDP**, respectivament). Cada grup consta d'un subgrup que ha rebut una dosi de 25 µg de SEB intraperitoneal

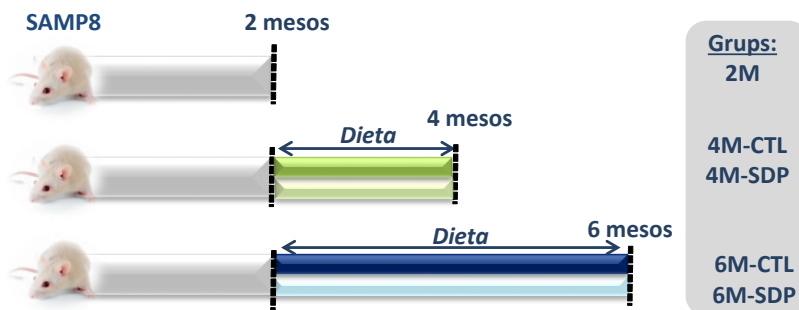
(i.p.) 24 h abans del sacrifici i d'un subgrup que únicament ha rebut vehicle (**Figura 3.1**). Els ratolins s'han mantingut en gàbies individuals a partir dels 2 mesos d'edat.



**Figura 3.1. Disseny experimental emprat en l'estudi de la inflamació aguda induïda amb SEB.** Grup **2M**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso estàndard i administrats via i.p. amb vehicle (PBS) 24 h abans del sacrifici; grup **2M-SEB**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso estàndard i administrats via i.p. amb SEB 24 h abans del sacrifici; grup **6M-CTL**: animals alimentats amb pinso experimental control dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats via i.p. amb vehicle 24 h abans del sacrifici; grup **6M-CTL-SEB**: animals alimentats amb pinso experimental control dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats via i.p. amb SEB 24 h abans del sacrifici; grup **6M-SDP**: animals alimentats amb pinso experimental SDP dels 2 als 6 mesos i administrats via i.p. amb vehicle 24 h abans del sacrifici; grup **6M-SDP-SEB**: animals alimentats amb pinso experimental SDP dels 2 als 6 mesos i administrats via i.p. amb SEB 24 h abans del sacrifici. i.p.: intraperitoneal; SEB: enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus*.

Pels estudis conductuals s'han mantingut els tres grups experimentals (**2M**, **6M-CTL** i **6M-SDP**) i, a més, s'ha afegit un grup experimental de 4 mesos d'edat alimentat amb pinso control (**4M-CTL**) i un altre alimentat amb pinso SDP (**4M-SDP**) des dels 2 mesos fins als 4 mesos d'edat (**Figura 3.2**).

Finalment, l'anàlisi dels efectes de la suplementació dietètica sobre variables moleculars del sistema nerviós central (SNC) d'animals envellits s'ha realitzat sobre els grups **2M**, **6M-CTL** i **6M-SDP**.



**Figura 3.2. Disseny experimental emprat en l'estudi de l'anàlisi conductual.** Grup **2M**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso estàndard; grup **4M-CTL**: animals alimentats amb pinso experimental control dels 2 als 4 mesos; grup **4M-SDP**: animals alimentats amb pinso experimental SDP dels 2 als 4 mesos; grup **6M-CTL**: animals alimentats amb pinso experimental control dels 2 als 6 mesos; grup **6M-SDP**: animals alimentats amb pinso experimental SDP dels 2 als 6 mesos.

Els animals s'han sacrificat en la mateixa franja horària (entre les 8 i les 11 h del matí) per evitar les variacions degudes al ritme circadiari. Els ratolins s'han anestesiat per via i.p. amb una barreja de xilacina (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Leverkusen, Alemanya) amb ketamina (Imalgene<sup>®</sup>, Rhone Mèrieux, França) a una proporció 1:9 mg/kg. La sang s'ha extret per punció cardíaca, que comporta la mort de l'animal per hipovolèmia. L'extracció dels GLM s'ha realitzat a la zona propera al cec. Seguidament, s'ha extret l'intestí prim, des de l'esfínter pilòric fins a la unió ileocecal. S'ha injectat solució amortidora de fosfat (PBS; *Phosphate buffer solution*) fred a la llum intestinal per eliminar el contingut intestinal. A continuació, s'ha dipositat l'intestí en una superfície freda per obtenir el jejú i s'ha descartat el duodè i l'ili. El jejú s'ha obert longitudinalment per obtenir les PP. Als apartats 4.1 i 4.2 es descriu el procediment per aïllar els leucòcits dels GLM i les PP. Posteriorment, s'han obtingut mostres de la mucosa de jejú. Per l'obtenció dels hemisferis i del còrtex i l'hipocamp, primerament s'han retirat els ossos cranials i, posteriorment, s'ha extret l'encèfal, que s'ha dipositat immediatament sobre una superfície antiadherent a 4°C. S'ha separat l'hipocamp i el còrtex de cada hemisferi. Les mostres s'han congelat amb nitrogen líquid i, posteriorment, s'han mantingut a -80°C fins al seu processat.

## 4. AÏLLAMENT I MARCATGE LIMFOCITARI

L'obtenció de limfòcits i el seu posterior marcatge amb anticossos específics permet determinar el percentatge de les diferents subpoblacions en un òrgan determinat i, per

tant, el seu perfil limfocític. L'aïllament consisteix en una disgregació mecànica i digestió del teixit.

El percentatge de les diferents subpoblacions s'estableix en funció de l'expressió de diferents marcadors cel·lulars, que s'anomenen clústers de diferenciació. Aquests marcadors són reconeguts per anticossos específics que estan conjugats a fluorocroms. Finalment, aquestes cèl·lules són comptabilitzades mitjançant un citòmetre de flux, que les diferencia en funció de la seva mida, rugositat i intensitat de fluorescència emesa.

#### **4.1. AÏLLAMENT DE LEUCÒCITS DELS GANGLIS LIMFÀTICS MESENTÈRICS**

En l'aïllament de leucòcits dels GLM no es necessari cap procés de purificació ni de separació cel·lular. En aquest teixit, la suspensió leucocítica s'obté per disgregació mecànica. Aquesta suspensió s'ha de deixar reposar per tal que sedimentin les restes de teixit.

##### Procediment:

Els GLM s'extreuen i es dipositen en RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, EUA) suplementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (FBS; *Fetal bovine serum*; Gibco-Invitrogen) fred. Els GLM s'han disgregat mecànicament mitjançant un èmbol de xeringa sobre un colador d'acer col·locat sobre una placa de Petri de plàstic, en gel i addicionant PBS suplementat amb un 5 % (v/v) de FBS (PBS-FBS 5 %). En aquest punt s'eliminen els macròfags, ja que queden adherits al plàstic. Seguidament, s'ha recollit la suspensió de limfòcits de la placa de Petri mitjançant una pipeta *Pasteur* de vidre i s'ha dipositat en un tub. La suspensió obtinguda s'ha deixat reposar durant 10 min en gel, per tal que les restes de teixit sedimentin, i s'ha traspasat el sobrenedant a un altre tub. La suspensió cel·lular s'ha centrifugat a 600 g durant 10 min a 4°C i s'ha descartat el sobrenedant. Finalment, les cèl·lules s'han resuspès en 1 mL de medi PBS-FBS 5 % i s'han mantingut a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i el posterior marcatge fenotípic (apartats 4.3 i 4.4, respectivament).

#### **4.2. AÏLLAMENT DE LEUCÒCITS DE LES PLAQUES DE PEYER**

De les PP de l'intestí prim, a més de limfòcits també es poden obtenir altres tipus cel·lulars, com les cèl·lules epitelials. Per tal d'enriquir la suspensió de limfòcits es realitza una purificació mitjançant un gradient de Percoll™.

**Procediment:**

Després de retirar els GLM, s'ha extret l'intestí prim, s'ha descartat el duodè, i s'ha rentat amb PBS fred. L'intestí s'ha dipositat sobre una superfície de vidre a 4°C, s'ha eliminat el mesenteri i s'ha obert longitudinalment. Després de l'eliminació del moc mitjançant una gasa amarada amb PBS, s'han localitzat i retallat totes les PP.

Seguidament, les PP s'han disgregat mecànicament, igual que en l'apartat anterior (apartat 4.1), i s'ha recollit la suspensió cel·lular. Aquesta suspensió s'ha centrifugat a 600 g durant 10 min a 4°C i, després de descartar el sobrenedant, s'han resuspès les cèl·lules amb Percoll™ (GE Healthcare, Regne Unit) diluït al 40 % en medi RPMI (Gibco-Invitrogen). La suspensió s'ha dipositat lentament en un tub de vidre sobre Percoll™ diluït al 80 %. S'ha centrifugat a 600 g durant 30 min a temperatura ambient i s'ha recollit l'anell de limfòcits de la interfase. S'ha tornat a centrifugar a 600 g durant 10 min a 4°C i s'ha descartat el sobrenedant. Finalment, les cèl·lules s'han resuspès en medi PBS-FBS 5 % i s'han mantingut a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i posterior marcatge fenotípic.

**4.3. RECOMPTE I VIABILITAT CEL·LULAR**

La viabilitat aporta informació sobre la idoneïtat del procediment seguit durant l'aïllament dels limfòcits. Per discriminar les cèl·lules vives de les mortes s'utilitzen dues substàncies fluorescents, taronja d'acridina i bromur d'etidi.

Las cèl·lules vives són capaces d'incorporar el colorant taronja d'acridina a través d'un mecanisme de transport actiu, en canvi, les cèl·lules mortes capten bromur d'etidi per difusió passiva.

**Procediment:**

El procediment consisteix en combinar la suspensió cel·lular a la dilució adequada amb el colorant vital (**Taula 3.2**), en una relació 1:1.

**Taula 3.2. Composició del colorant vital.**

Reactiu	Concentració	Casa comercial
Taronja d'acridina	3,3 µmol/L	Merck
Bromur d'etidi	50,7 µmol/L	Sigma

Merck (Alemanya), Sigma (EUA).

El recompte s'ha realitzat mitjançant una cambra de recompte estandarditzada (Fast Read® 10; Sarstedt, Alemanya). Aquesta cambra es comercialitza amb el cobreobjectes fix i així s'evita la variació de volum a causa de diferències en l'alçada entre el cobreobjectes i el portaobjectes. A l'observar les cèl·lules al microscopi de fluorescència sota llum ultraviolada es veuen les cèl·lules vives tenyides de color verd i les cèl·lules mortes de color taronja.

La viabilitat cel·lular s'expressa com el nombre de cèl·lules vives respecte al total de cèl·lules comptades. A més, s'ha realitzat el recompte cel·lular, que s'expressa com a nombre de leucòcits vius per  $\mu\text{L}$ . La fórmula utilitzada és la següent:

$$\text{n}^\circ \text{ leucòcits}/\mu\text{L suspensió} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de leucòcits vius} \times \text{dilució}}{\text{n}^\circ \text{ de quadres comptats}} \times 160$$

a on: 160 és el nombre de quadres que ocupa 1  $\mu\text{L}$  de suspensió.

Les viabilitats cel·lulars obtingudes en totes les tandes experimentals que s'han dut a terme són, com a mínim, del 75 %.

#### 4.4. MARCATGE FENOTÍPIC DE LIMFÒCITS PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Una vegada obtingudes les suspensions cel·lulars es realitza el marcatge. La caracterització fenotípica de les subpoblacions limfocitàries es realitza mitjançant el marcatge amb anticossos monoclonals específics per determinades molècules de ratolí. Gràcies als diferents marcadors cel·lulars, és a dir, als clústers de diferenciació, és possible discriminar les diferents subpoblacions limfocítiques d'una suspensió cel·lular. En aquest cas s'ha determinat el percentatge de limfòcits Th ( $\text{CD4}^+$ ), de limfòcits Th activats ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$ ) i de limfòcits Treg ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ ).

##### Procediment:

El marcatge fenotípic s'ha realitzat amb  $3 \times 10^5$  i  $1,5 \times 10^5$  cèl·lules de les suspensions obtingudes en els apartats anteriors (4.1 i 4.2, respectivament). Primerament, s'ha realitzat el marcatge directe amb els anticossos primaris específics per a molècules de la superfície cel·lular ( $\text{CD4}$  i  $\text{CD25}$ ; **Taula 3.3**) durant 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Seguidament, les cèl·lules s'han rentat amb PBS-FBS 2 % per descartar l'anticòs no unit i s'han centrifugat a 600 g durant 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , descartant posteriorment el sobrenedant. A continuació, s'ha afegit el paraformaldehid (Sigma, EUA) al 4 % en PBS a cada tub i s'ha resuspès amb l'ajuda d'un vòrtex. Per realitzar el marcatge intracel·lular amb l'anticòs

monoclonal dirigit contra FoxP3 s'ha de permeabilitzar la mostra amb PBS suplementat a l'1 % amb tritó (Fluka, Suïssa) durant 20 min a 4°C. Posteriorment, les mostres s'han rentat amb PBS-FBS 2 % i s'han tornat a centrifugar a 600 g durant 5 min a 4°C, descartant el sobrenedant. Posteriorment, les cèl·lules s'han incubat amb l'anticòs monoclonal contra una proteïna intracel·lular (FoxP3). Per últim, s'ha procedit a la fixació i conservació de les mostres amb paraformaldehid. Els tubs s'han conservat a 4°C protegits de la llum fins al moment de l'anàlisi per citometria de flux (apartat 4.5).

**Taula 3.3. Anticossos emprats en el marcatge fenotípic de les poblacions limfocitàries.**

Antigen	Clon	Fluorocrom	Casa comercial
CD4	RM4-5	PerCP	eBioscience
CD25	PC61.5	FITC	eBioscience
FoxP3	FJK-16s	PE	eBioscience

eBioscience (EUA). PerCP: proteïna de clorofil·la peridinina; FITC: isotiocianat de fluoresceïna; PE: ficoeritrina.

## 4.5. ANÀLISI DE LES POBLACIONS LIMFOCITÀRIES

Les suspensions de limfòcits marcats amb anticossos monoclonals s'han analitzat en un citòmetre de flux Gallios Flow cytometer (Beckman Coulter, EUA) de la Unitat de Citometria dels Centres Científics i Tecnològics del Parc Científic de Barcelona. Aquest aparell permet diferenciar les cèl·lules en funció de la seva mida i de la seva rugositat, així com en funció de la fluorescència emesa, en el cas de que es tractin de partícules marcades amb fluorocroms.

### Procediment:

La suspensió cel·lular marcada s'introdueix en una cambra de flux amb un volum molt més gran de solució salina, amb la finalitat de crear un corrent capil·lar de líquid que disposi a les cèl·lules separades entre sí. Quan una cèl·lula passa a través d'un feix de làser, fa que la llum es dispersi; si hi ha molècules de fluorocrom unides a la cèl·lula, aquestes seran excitades i emetran fluorescència. A continuació, els fotomultiplicadors detecten les propietats òptiques, tant de la llum dispersada (que proporciona informació sobre la mida i la rugositat de cada cèl·lula) com de l'emissió de fluorescència (que aporta informació dels anticossos marcats units a la cèl·lula i, per tant, de la presència de les proteïnes estudiades).

## CONFIGURACIÓ DEL CITÒMETRE DE FLUX

Per poder realitzar una anàlisi reproduïble i fiable, és necessari posar a punt la configuració de l'equip per tal d'adaptar-lo a la mostra.

L'excitació s'ha realitzat amb un làser d'ió argó, d'una longitud d'ona de 488 nm, a 15 mW de potencia.

Els paràmetres adquirits han estat els següents:

**FSC (*forward scatter*):** representa la dispersió frontal, la quantitat de llum desviada en la mateixa direcció que el feix de llum incident. Aquest paràmetre aporta informació sobre la mida de la cèl·lula.

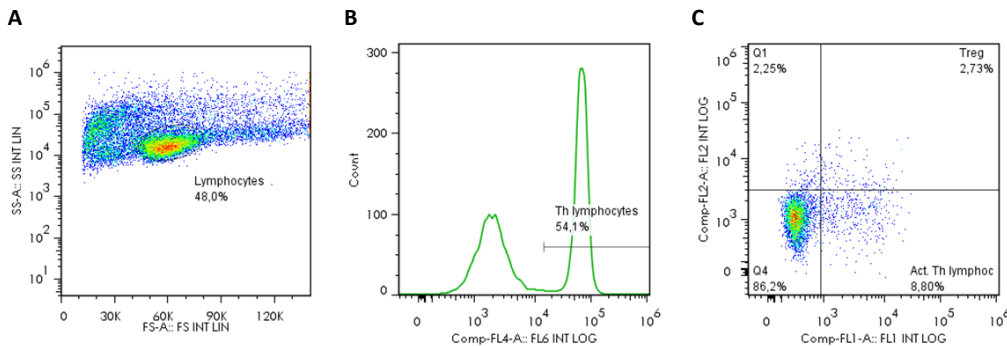
**SSC (*side scatter*):** representa la dispersió lateral, la quantitat de llum desviada 90° respecte la direcció del feix de llum incident. Aquest paràmetre discrimina en funció de les característiques morfològiques de la cèl·lula, com la rugositat o el nombre d'òrgànuls.

**Fluorescència:** la fluorescència verda (FITC) es mesura amb un filtre de pas de banda de 525 nm; la fluorescència taronja (PE) es mesura amb un filtre de pas de banda de 575 nm; i la fluorescència vermella (PerCP) es mesura amb un filtre de pas de banda de 695 nm. Aquest paràmetre aporta informació sobre la quantitat d'anticòs que està unit a cada cèl·lula, per tant, el percentatge de cèl·lules que expressen cada marcador.

El citograma FSC/SSC, és a dir, la dispersió frontal respecte la dispersió en angle recte, proporciona una gràfica que conté tots els elements presents en la mostra (**Figura 3.3A**). La finestra d'adquisició s'estableix en funció de la mida i la rugositat de les cèl·lules i delimita la població a estudiar, en aquest cas la població limfocitària.

Les cèl·lules ubicades dins de la finestra d'adquisició són representades mitjançant un histograma que les representa en funció de la quantitat de fluorescència emesa en la llum vermella (PerCP), que en aquest cas marca la presència de CD4 (**Figura 3.3B**). Tal com es pot observar en la figura es defineixen dues poblacions, una negativa (CD4<sup>-</sup>) i una positiva (CD4<sup>+</sup>, limfòcits Th). A continuació, les cèl·lules CD4<sup>+</sup> són representades mitjançant un citograma biparamètric de dispersió, en el qual la fluorescència de cada cèl·lula per l'anticòs específic per CD25 es confronta amb el marcatge de FoxP3 (**Figura 3.3C**). Els resultats s'han analitzat utilitzant el Software Flowjo (Treestar Inc., EUA).



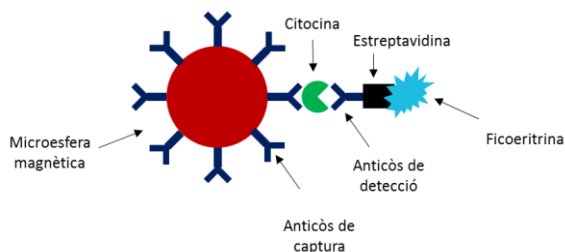


**Figura 3.3. Citograma d'una suspensió cel·lular.** A: Finestra d'adquisició; aquesta finestra es defineix en funció de la mida de les cèl·lules i de la seva rugositat i estableix la població limfocitària. B: Histograma de fluorescència. Aquesta gràfica representa les cèl·lules en funció de la presència de CD4; CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (limfòcits Th). C: Citograma biparamètric. En aquest diagrama es confronta la presència de CD25 amb la de FoxP3.

## 5. QUANTIFICACIÓ DE CITOCINES PER CITOMETRIA DE FLUX

La quantificació de citocines en mostres sèriques i de còrtex s'ha realitzat mitjançant la tècnica de citometria de flux amb microesferes utilitzant el Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays (Bio-Rad, EUA).

Aquesta tècnica es fonamenta en la reacció de l'anticòs específic contra l'antigen (citocina). L'immunocomplex format resta lligat a una microesfera portadora de l'anticòs de captura específic. En funció de la concentració d'analit present a la mostra hi haurà una major o menor unió a la microesfera. En afegir l'anticòs de detecció conjugat a biotina i dirigit contra l'analit a determinar es forma un complex tipus sandvitx. Finalment, la immunoreacció es pot visualitzar per l'addició d'estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE; *Phicoerythrin*), que és el marcador fluorescent (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4. Representació de l'immunocomplex tipus sandvitx lligat a la microesfera.**

El Bio-Plex Pro™ és un assaig multiplexat que inclou microesferes que permeten la detecció simultània de diferents molècules solubles en una mateixa mostra, en aquest cas citocines de ratolí.

Aquestes microesferes, recobertes d'anticossos de captura específics per a una determinada proteïna, es diferencien entre si per la seva emissió/intensitat de fluorescència. D'aquesta manera, cada intensitat de fluorescència està associada a una citocina concreta.

A cada població de microesferes se li assigna una posició alfanumèrica en una matriu, en funció de la seva intensitat de fluorescència, indicant la seva posició en relació a les altres microesferes.

Finalment, la quantitat de citocina que ha quedat lligada a cada microesfera és detectada mitjançant un anticòs de detecció específic conjugat a un fluorocrom, en aquest cas la PE.

#### Procediment:

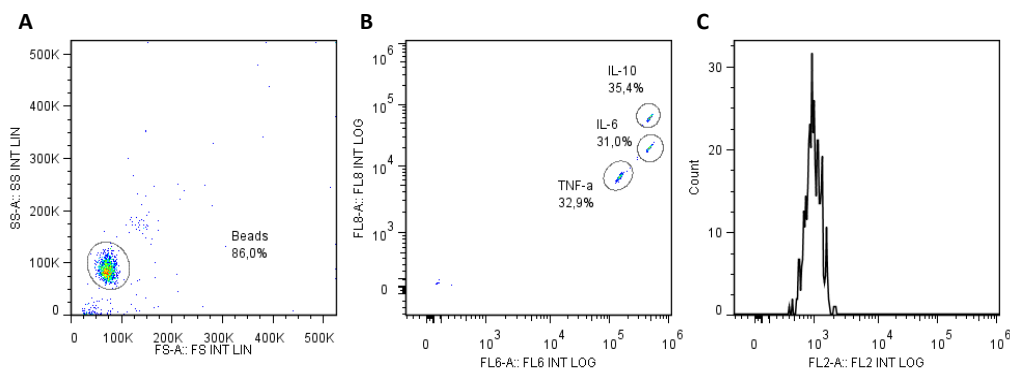
Abans d'iniciar l'assaig, cal preparar les dilucions seriades de l'estàndard i les mescles corresponents de les microesferes de captura i dels anticossos de detecció conjugats a PE.

Un cop preparats els estàndards, les mostres problema i els reactius a utilitzar en aquest assaig, es barreja la mescla de microesferes de captura amb l'estàndard o mostra problema, i s'incuba durant 30 min a temperatura ambient i en agitació constant. Passat aquest temps, s'afegeix la mescla d'anticossos de detecció, es barregen suaument i s'incuben 30 min, a temperatura ambient, en agitació i en foscor. Posteriorment, s'addiciona l'estreptavidina-PE i s'incuba 10 min, en agitació i protegit de la llum. Finalment s'analitza per citometria de flux.

La quantificació de les mostres s'ha realitzat amb el citòmetre de flux Gallios Flow cytometer (Beckman Coulter, EUA) de la Unitat de Citometria dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Els resultats s'han analitzat utilitzant el Software Flowjo (Treestar Inc.).

Per tal de visualitzar de forma gràfica l'adquisició i anàlisi final de les mostres objecte d'estudi, a la **Figura 3.5** es mostren histogrames representatius obtinguts a partir d'una

mostra problema determinada. A la **Figura 3.5A** s’observa la població total de microesferes, la qual se selecciona en base a la seva mida (FSC) i complexitat de superfície (SSC). A la **Figura 3.5B** es mostra la localització alfanumèrica diferencial de les 3 microesferes emprades per a la quantificació de les citocines IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ , en funció dels senyals emesos pels detectors APC (representat en abscisses) i APC-Cy7 (representat en ordenades). A la **Figura 3.5C** es pot observar l’histograma de la fluorescència emesa per cada una de les microesferes quantificades i s’obté la mitjana geomètrica de la fluorescència emesa pel conjunt de microesferes per cada citocina. Aquests histogrames s’obtenen per cadascuna de les mostres.



**Figura 3.5. Citograma d’una suspensió de microesferes.** A: Finestra d’adquisició; aquesta finestra es defineix en funció de la mida i la rugositat de les microesferes. B: Citograma biparamètric. En aquest diagrama es localitzen els 3 tipus de microesferes emprades per a la quantificació de les citocines IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ , en funció la fluorescència emesa pels diferents tipus de microesferes. C: Histograma de la fluorescència emesa per cada conjunt de microesferes, indicativa de la quantitat de citocina detectada.

## 6. ANÀLISI CONDUCTUAL

Per estudiar els efectes de la suplementació amb SDP sobre les funcions cognitives, s’ha realitzat el test de reconeixement d’objectes (NORT; *Novel object recognition test*) i el laberint d’aigua de Morris (MWM; *Morris water maze*). Els ratolins han realitzat una única vegada aquests tests i cada vegada han realitzat el NORT prèviament al MWM.

### 6.1. TEST DE RECONeixEMENT D’OBJECTES

El NORT s’ha utilitzat per estudiar els efectes del pinso suplementat amb SDP sobre la memòria a curt i a llarg termini. Aquest test consisteix en determinar la diferència de

temps d'exploració entre un objecte nou i un objecte familiar. Aquesta prova es basa en la capacitat exploratòria espontània dels rosegadors davant un objecte nou.

Ennaceur i Delacour (1988) van estudiar per primer cop la prova de reconeixement d'objectes en rosegadors i ha esdevingut un model àmpliament utilitzat per la investigació de les alteracions de memòria després de dany cerebral o de tractaments farmacològics o dietètics, entre d'altres (Khan *et al.*, 2016; Dal-Pan *et al.*, 2016; Saykally *et al.*, 2012).

Quan els animals estan en contacte amb un objecte familiar i un de nou, tenen una tendència espontània a passar més temps amb l'objecte nou (Ennaceur, 2010). Prèviament a la realització del test, hi ha un període d'habitució al laberint on es realitzarà la prova. L'habitució és necessària perquè l'ambient on es realitza el test pot modificar la conducta de l'animal. La preferència per l'objecte nou significa que la presentació de l'objecte familiar existeix en la memòria de l'animal i, per tant, el que es mesura és la memòria episòdica, que consisteix en la capacitat de recordar successos ocorreguts amb anterioritat durant un cert període de temps (Ennaceur, 2010).

#### Procediment:

El test s'ha realitzat en un laberint de metacrilat negre de dos braços de 25 cm de llarg x 5 cm d'amplada x 20 cm d'alçada disposats en un angle de 90° (**Figura 3.6**). A l'extrem de cada braç del laberint s'ha col·locat un objecte que pot ser igual al de l'altre braç o diferent en forma i color, depenent de la fase de l'experiment. El laberint i els objectes es netegen amb etanol 70 % abans de començar el test, per tal d'eliminar olors.



**Figura 3.6.** Imatge de dos laberints on es realitza el NORT.

Aquest test consta de les següents fases:

- **Habitució:** per tal d'acostumar els ratolins a l'espai on s'ha realitzat el test, s'ha col·locat cada animal en el laberint durant 10 min diaris, 3 dies previs a la realització de la fase de la familiarització.
- **Familiarització:** s'han situat dos objectes idèntics (de 5 cm d'alçada), un a cada extrem del laberint. A continuació, s'ha col·locat el ratolí en el punt d'intersecció dels dos braços del laberint, s'ha permès l'exploració dels objectes durant 10 min i s'ha anotat el temps d'exploració de cada objecte. S'ha considerat com a temps d'exploració el temps en que el nas del ratolí està a menys d'1 cm de distància de l'objecte, sense que el rosegui. Durant aquesta fase els dos objectes han estat nous i, per tant, el temps transcorregut en l'exploració dels dos objectes ha de ser similar. Els objectes són de plàstic, de formes irrellevants i desconegudes pels ratolins.
- **Primer test de retenció:** que avalua la memòria a curt termini. Aquest test s'ha realitzat 2 h després de la fase de familiarització. En un dels extrems del laberint s'ha mantingut l'objecte familiar (emprat en la fase anterior), mentre que en l'altre extrem del laberint s'ha disposat d'un objecte diferent. Novament, s'ha col·locat el ratolí en el punt d'intersecció dels dos braços del laberint, s'ha permès l'exploració dels objectes durant 10 min i s'ha anotat el temps d'exploració de cada objecte. En aquesta fase s'ha calculat l'índex de discriminació (ID), entès com:

$$ID = \frac{TN - TV}{TN + TV}$$

On TN és el temps d'exploració de l'objecte nou i TV el temps d'exploració de l'objecte vell.

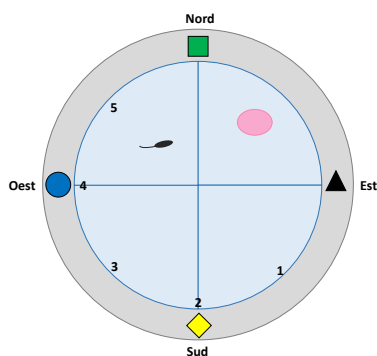
- **Segon test de retenció:** que avalua la memòria a llarg termini. Aquests test s'ha realitzat 24 h després de la fase de familiarització. S'ha mantingut l'objecte conegut de les fases anteriors en la mateixa posició i s'ha canviat l'objecte nou (del primer test de retenció) per un altre de diferent. Es procedeix igual que en la prova de memòria a curt termini i també s'ha calculat l'ID.

## 6.2. LABERINT D'AIGUA DE MORRIS

La memòria espacial consisteix en múltiples mecanismes especialitzats en codificar, emmagatzemar i recuperar informació sobre rutes, configuracions i localitzacions espacials (Kessels *et al.*, 2001). El laberint d'aigua va ser dissenyat per Morris *et al.* (1982) i és un dels models més utilitzats per a l'estudi de la memòria espacial en els rosegadors. En aquest laberint els animals han de nedar per localitzar una plataforma oculta. Aquest test resulta d'especial interès, ja que no necessita de la privació d'aigua o menjar per motivar la conducta (Vicens *et al.*, 2003). Tot i això, la immersió en aigua pot incrementar el nivell d'estrès dels animals, fet que s'ha de tenir en compte quan s'aplica aquest model.

### Procediment:

El test s'ha realitzat en una piscina circular de 100 cm de diàmetre per 50 cm d'alçada i omplerta amb aigua fins la meitat, a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . S'han definit dos eixos perpendiculars que travessen la piscina, de manera que aquesta ha quedat dividida en quatre quadrants: nord-est (NE), sud-est (SE), sud-oest (SO) i nord-oest (NO). S'han col·locat 4 pistes visuals de diferent forma i color a les parets de la piscina, una en cada eix perpendicular, per tal de possibilitar l'orientació espacial dels ratolins (**Figura 3.7**). S'ha afegit làtex (Latex Compound Española S.A., Espanya) a l'aigua de la piscina per tal de tornar-la opaca i, d'aquesta manera, ocultar la plataforma blanca (de 10 cm de diàmetre) situada en el mig del quadrant nord-est i submergida 1 cm per sota de la superfície de l'aigua. A més, s'han establert 5 punts d'inici dels assajos, repartits entre els 3 quadrants on no estava la plataforma, des d'on els ratolins han començat el recorregut cap a la plataforma.



**Figura 3.7.** Representació dels elements necessaris per realitzar el test de MWM. Inclou la piscina circular, dividida en 4 quadrants, on cada número indica els 5 punts d'inici dels assajos, les pistes visuals situades a la paret de la piscina, i localització de la plataforma en el quadrant NE, representada per una el·lipse rosa.

Les trajectòries recorregudes s'han enregistrat mitjançant una càmera de vídeo situada al sostre, en el centre de la piscina. Les dades s'han analitzat amb SMART v3.0 (Panlab S.L., Espanya).

El test s'ha realitzat sempre en la mateixa franja horària (17-20 h) per evitar variacions associades al ritme circadiari.

Aquest test consta de les següents fases:

- **Fase d'aprenentatge:** en aquesta fase s'han realitzat 5 assajos durant 6 dies consecutius. Els ratolins s'han introduït a la piscina des de 5 punts diferents cada dia, en ordre aleatori i sense temps de descans entre cada assaig. En cada assaig, el ratolí s'ha col·locat a la piscina suaument i mirant cap a la paret d'aquesta i se li ha permès nedar durant 60 s. Si en aquest temps no ha trobat la plataforma oculta se l'ha guiat fins a ella. En cada assaig s'ha deixat que el ratolí romangués durant 30 s a sobre de la plataforma per fomentar l'orientació espacial. Durant aquesta fase s'ha avaluat diàriament el temps que han trigat els ratolins en trobar la plataforma i s'ha calculat la mitjana dels 5 assaigs per cada dia i per cada ratolí. A partir d'aquestes dades s'ha establert la corba d'aprenentatge.
- **Test:** aquesta fase s'ha realitzat el setè dia d'experiment, 24 h després de l'últim assaig de la fase d'aprenentatge. S'ha retirat la plataforma de la piscina i s'ha deixat el ratolí des del punt més allunyat del quadrant diana (quadrant nord-est), des del punt 3. Els ratolins han nedar durant 60 s. En aquesta fase s'ha avaluat el temps que l'animal ha passat en cada quadrant així com en la zona de plataforma, les vegades que el ratolí ha creuat per la zona de la plataforma i, finalment, també s'han obtingut la trajectòria realitzada per cada ratolí. Si l'animal ha aconseguit aprendre estarà més temps en la zona diana que en la resta de quadrants.

## 7. EXPRESSIÓ GÈNICA

La quantitat d'RNA d'un gen determinat indica el grau d'expressió d'aquest gen. En primer lloc cal aïllar tot l'RNA d'una mostra i posteriorment cal sintetitzar una còpia en DNA (cDNA) de l'RNA aïllat, ja que el DNA és molt més estable que l'RNA. A continuació s'amplifica la seqüència d'interès per quantificar l'RNA d'interès. Aquesta quantitat

d'RNA es normalitza amb l'expressió d'un gen de referència no modificat per les nostres condicions.

## 7.1. OBTENCIÓ DE L'RNA I DEL CDNA

L'RNA de les mostres s'ha obtingut mitjançant el mètode d'extracció fenòlica. Aquest mètode es basa en l'ús d'una solució monofàsica de fenol i isocianat de guanidina per la lisis de les cèl·lules i la separació de la mostra en dues fases (aquosa i orgànica). A continuació, a partir de la fase aquosa es fa una precipitació de l'RNA total amb isopropanol. Una vegada s'ha aïllat l'RNA s'ha retrotranscrit a DNA complementari (cDNA). El pas d'RNA a cDNA s'aconsegueix per acció d'una retrotranscriptasa, enzim capaç de sintetitzar una cadena de DNA utilitzant RNA com a motlle.

### Procediment:

Per extreure l'RNA, s'han homogeneïtzat les mostres amb Purezol™ (Bio-Rad) i s'ha deixat actuar durant 5 min. A continuació, s'ha afegit cloroform (Sigma) i s'ha centrifugat a 12000 g a 4°C durant 15 min. Seguidament, s'ha recollit la fase aquosa en un tub nou i s'ha afegit la mateixa proporció d'isopropanol fred (Sigma). S'ha agitat i s'ha incubat durant 10 min per tal que precipiti l'RNA. Posteriorment, s'ha tornat a centrifugar a 12000 g a 4°C durant 15 min i el precipitat s'ha rentat amb etanol 70 % (Sigma). S'ha centrifugat a 8500 g a 4°C durant 5 min i s'ha eliminat l'etanol. Finalment, s'han resuspès les mostres amb aigua lliure d'RNAsa (Invitrogen, EUA). Durant tot el procés les mostres s'han mantingut en gel per evitar la degradació de l'RNA.

L'RNA s'ha quantificat amb el Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA). Per determinar la concentració d'RNA s'ha mesurat l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. L'absorbància a 260 nm indica la concentració d'RNA i el quocient entre l'absorbància a 260 nm i a 280 nm indica la puresa de la mostra, que cal que sigui molt proper a 2. Totes les mostres han obtingut un quocient superior a 1,94.

S'han retrotranscrit 5 µg d'RNA mitjançant el kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).



## 7.2. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TEMPS REAL O RT-PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR; *Polimerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* per a la síntesi de seqüències de DNA. La tècnica de PCR, a més d'utilitzar-se com una tècnica qualitativa, també pot emprar-se quantitativament per comparar l'abundància d'un gen d'interès respecte un gen de referència.

Per comparar l'expressió del gen d'interès amb l'expressió d'un gen control de referència, cal que aquest no variï entre les diferents condicions experimentals. S'ha utilitzat com a gen de referència  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) per la caracterització del GALT i per l'estudi dels efectes de l'SDP enfront una inflamació intestinal aguda induïda per SEB; i el gen fosforibosiltransferasa hipoxantina 1 (HPRT1; *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) per l'estudi dels efectes de l'SDP sobre el teixit cerebral.

En la PCR a temps real, els processos d'amplificació i detecció es produeixen de forma simultània. La quantitat d'RNA amplificat en cada cicle es mesura mitjançant l'emissió de fluorescència, ja que el marcador fluorescent s'activa quan es forma un dúplex de DNA.

### Procediment:

Per a la PCR en temps real, s'han utilitzat els encebadors per cada gen d'interès (**Taula 3.4**) a 0,2  $\mu\text{mol/L}$  i SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad).

La PCR en temps real s'ha dut a terme amb MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad). Les mostres s'han determinat per duplicat i la mitjana dels valors s'ha utilitzat per a la quantificació que s'ha dut a terme seguint el mètode  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak i Schmittgen, 2001).

Taula 3.4. Seqüències dels encebadors utilitzats.

Gen	Forward	Reverse	Mida
Catalasa	5'-TTTCACTGACGAGATGGCAC-3'	5'-GTGGGTGACCTCAAAGTATCC-3'	100 bp
Icam-1	5'-CTGTGAAATGCCACCTTTTGA-3'	5'-GAGTCAAAGGTTTGAAGCAG-3'	98 bp
IFN- $\gamma$	5'-CCTTCTCAGCAACAGCAAGGCG-3'	5'-CTTGGCGCTGGACCTGTGGG-3'	87 bp
IL-1 $\beta$	5'-TGTGAAATGCCACCTTTTGA-3'	5'-GGTCAAAGGTTTGAAGCAG-3'	94 bp
IL-6	5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'	5'-TGATGCACTGCAGAAAACA-3'	109 bp
IL-10	5'-GGCGCTGTCATCGATTTCTCCC-3'	5'-TGGCCTTGTAGACACCTTGGTCTT-3'	102 bp
SOD	5'-ACAATACACAAGGCTGTACCAGT-3'	5'-CCAGGTCTCCAACATGCCTC-3'	99 bp
TGF- $\beta$	5'-CAGTGGCTGAACCAAGGAGACGG-3'	5'-CCCCGACGTTTGGGGCTGATC-3'	119 bp
TNF- $\alpha$	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	103 bp
Vcam-1	5'-CCTCGCTAGGTTACACAGTGG-3'	5'-TGGGGGCAACGTTGACATA-3'	86 bp
GUSB	5'-CCG ATT ATC CAG AGC GAG TAT G-3'	5'-CTC AGC GGT GAC TGG TTC G-3'	97 bp
HPRT1	5'-TGGATACAGGCCAGACTTTGTT-3'	5'-CAGATTCAACTTGCCTCATC-3'	163 bp

Icam-1: molècula d'adhesió intercel·lular 1; GUSB:  $\beta$ -glucuronidasa; IFN- $\gamma$ : interferó  $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10; SOD: superòxid dismutasa; TGF- $\beta$ : factor de creixement transformador  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : factor de necrosi tumoral  $\alpha$ ; Vcam-1: molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars 1; HPRT1: fosforibosiltransferasa hipoxantina 1.

## 8. DETERMINACIÓ DE LA PERMEABILITAT CEREBRAL AMB BLAU D'EVANS

La barrera hematoencefàlica limita i regula l'intercanvi de substàncies entre la sang i el parènquima cerebral, de manera que la seva integritat és imprescindible per al manteniment de l'homeòstasi del SNC. Per a la determinació de la permeabilitat cerebral és habitual la utilització de marcadors fluorescents, en aquest cas s'ha utilitzat blau d'Evans (EB; *Evans blue*, Sigma), que s'uneix ràpidament a l'albumina plasmàtica. La seva extravasació al parènquima cerebral indica una alteració de la barrera hematoencefàlica.

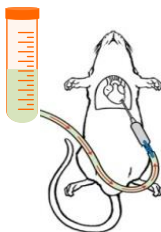
### Procediment:

S'ha seguit el mètode descrit per Yanai *et al.* (2016). S'ha preparat una suspensió estèril al 2,5 % d'EB (p/v) en NaCl 0,9 %, que s'ha mantingut en agitació i protegida de la llum.

Una hora abans del sacrifici s'ha administrat la suspensió d'EB a una dosi de 0,125 g/kg per la vena caudal, per tal de que la molècula difongués per tot l'organisme i així aconseguir una bona distribució d'aquest marcador.

Els ratolins han estat anestesiats amb una barreja de xilacina/ketamina (1:9 mg/kg). Una vegada comprovada l'absència de reflexos, s'ha realitzat la perfusió dels animals amb PBS (pH = 7,4).

Per realitzar la perfusió s'ha obert la caixa toràcica del ratolí i s'ha inserit una agulla acoblada a una xeringa amb 50 mL de PBS al ventricle esquerre (**Figura 3.8**). Seguidament, s'ha tallat l'aurícula dreta per iniciar la perfusió de l'organisme per gravetat.



**Figura 3.8.** Representació del sistema de perfusió.

Un cop acabada la perfusió, s'han extret els ossos cranials per deixar al descobert el cervell i s'han separat els 2 hemisferis. Les mostres s'han congelat amb nitrogen líquid immediatament i s'han mantingut a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a ser processades.

Una vegada pesades, les mostres de cervell s'han homogeneïtzat a raó de 1:5 (p/v) amb un polítró PRO (Scientific Inc, EUA) amb una solució al 50 % (p/v) d'àcid tricloroacètic (TCA, Sigma) i NaCl 0,9 % (Fluka). A continuació, s'ha centrifugat a 20000 g durant 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Per la seva determinació s'ha preparat una recta patró a partir de la solució mare d'EB 25 mg/mL, i s'han fet dilucions seriades amb la solució al 50 % (p/v) de TCA en NaCl 0,9 % fins a obtenir diferents concentracions d'EB compreses entre 0,016 i 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A continuació, s'ha traspasat la mostra o el patró a una placa de 96 pous i, posteriorment, s'ha afegit etanol 95 % (J. T. Baker, EUA) per estabilitzar la mostra. La determinació de la fluorescència ( $\lambda_{\text{ex}} = 620$  i  $\lambda_{\text{em}} = 680$  nm) s'ha realitzat amb el fluorímetre Modulus II (Turner Biosystems, EUA). La concentració d'EB de cada mostra s'ha calculat interpolant el valor de fluorescència de la mostra a la recta patró. Els resultats s'han expressat com a  $\mu\text{g}$  d'EB per g de teixit.

## 9. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES

Pels estudis sobre la determinació de peròxid d'hidrogen, de malondialdehid (MDA) així com per la realització de la tècnica de Western Blot (apartats 10, 11 i 12, respectivament), s'ha requerit conèixer la concentració de proteïnes de les mostres d'estudi. Prèviament a aquesta determinació, s'han homogeneïtzat les mostres.

### 9.1. HOMOGENEÏTZACIÓ DE LES MOSTRES

Es coneix com el procés de disrupció d'una cèl·lula o teixit per mitjans mecànics i/o químics i la dispersió dels seus components en un medi aquós. En aquest treball s'han utilitzat mostres d'hemisferi cerebral, de còrtex i d'hipocamp.

#### Procediment:

Les mostres s'han homogeneïtzat mitjançant un politró PRO (Scientific Inc) a 20000 rpm en tampó de lisi (**Taula 3.5**). Els homogenats s'han centrifugat a 20000 *g* i a 4°C durant 20 min amb la Centrifuge 5417R (Eppendorf, Alemanya) i s'han conservat a -80°C fins el moment de realitzar les determinacions.

**Taula 3.5. Composició del tampó de lisi.**

Reactiu	Concentració	Casa comercial
Tris-HCl	50 mM	Sigma
NaCl	150 mM	Sigma
EDTA	2 mM	Sigma
Tritó	1 %	Sigma
PMSF	1 mM	Sigma
DTT	1 mM	Sigma
Còctel inhibidor de proteases	2 %	Sigma

Sigma (EUA). DTT: ditiotreitòl; EDTA: àcid etilendiaminotetracètic; PMSF: fluorur de fenilmetilsulfonil.

### 9.2. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES

La concentració de proteïnes s'ha determinat seguint el mètode descrit per Bradford (1976), on s'utilitza l'albumina sèrica bovina (BSA; *Bovine serum albumin*; Sigma) com a estàndard. S'ha emprat el reactiu Bio-Rad® (Bio-Rad), que conté Coomassie Brilliant Blue

G-250 que, en medi àcid, es combina ràpidament amb les proteïnes i forma un complex de color blau que és estable durant aproximadament 1 h.

### Procediment:

El procediment seguit ha estat el mateix per la recta patró que per a les mostres a determinar. S'ha preparat una recta patró a partir de la solució mare de BSA 1 mg/mL, i s'han fet dilucions seriades amb PBS fins a obtenir diferents concentracions de BSA compreses entre 15,6 i 1000 µg/mL. Tot seguit, s'ha preparat el colorant Bio-Rad®, diluint-lo amb aigua miliQ a una proporció 1:5 i filtrant-lo a través d'un filtre Whatman® (Whatman International, Regne Unit). A continuació, s'ha barrejat l'àcid fòrmic, la mostra diluïda o l'estàndard i, posteriorment, s'ha afegit el reactiu Bio-Rad diluït. S'ha mesurat l'absorbància en un espectrofotòmetre a 595 nm Sunrise (Tecan, Suïssa). La concentració de proteïnes de cada mostra s'ha calculat interpolant el valor d'absorbància de la mostra a la recta patró de BSA que s'ha preparat per cada assaig.

## 10. DETERMINACIÓ DE PERÒXID D'HIDROGEN

El peròxid d'hidrogen és una espècie reactiva d'oxigen (ROS, *Reactive oxygen species*) produïda a través del metabolisme molecular de l'oxigen i actua com a missatger en la senyalització intracel·lular i com a font d'estrès oxidatiu. Una producció elevada de ROS contribueix al dany cel·lular. S'ha determinat la concentració de peròxid d'hidrogen en els homogenats de còrtex i d'hipocamp mitjançant el *Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit* (Sigma). El kit utilitza un substrat de la peroxidasa que genera un producte amb fluorescència vermella després de reaccionar amb el peròxid d'hidrogen.

### Procediment:

Abans d'iniciar l'assaig, s'han preparat les dilucions seriades de l'estàndard, a partir del peròxid d'hidrogen subministrat pel propi kit. La recta patró ha inclòs des de 0,01 fins a 10 µM. Seguidament, les mostres s'han diluït a 1/10 i s'han afegit a cada pou d'una placa de 96 pous negra. A continuació, s'ha preparat la barreja de reacció, que és estable durant 2 h, s'ha afegit i s'ha incubat durant 30 min a temperatura ambient, en agitació i protegit de la llum. Finalment, s'ha determinat la intensitat de fluorescència ( $\lambda_{\text{ex}} = 540$  i  $\lambda_{\text{em}} = 590$  nm) amb el fluorímetre Modulus II (Turner Biosystems). Els resultats s'han expressat com a nmol de peròxid d'hidrogen per g de proteïna.

## 11. DETERMINACIÓ DE MALONDIALDEHID

Com a conseqüència del metabolisme cel·lular normal es produeixen radicals lliures que, generalment, són eliminats per enzims antioxidants. Aquests radicals també poden interaccionar amb els àcids nucleics, les proteïnes o els lípids, i en provoquen la seva peroxidació. Per la determinació de la lipoperoxidació de mostres de còrtex i d'hipocamp s'ha utilitzat una tècnica basada en la reacció del malondialdehid (MDA). Aquest es genera durant l'oxidació lipídica, amb l'àcid 2-tiobarbitúric (TBA; *Thiobarbituric acid*; Sigma) per formar adductes cromògens i fluorescents de MDA-TBA molt estables i que es poden quantificar per espectrofotometria d'absorció visible o per fluorimetria.

### Procediment:

Per a la seva determinació s'ha utilitzat el mètode descrit per Ohkawa *et al.* (1979) amb lleugeres modificacions.

Primerament, s'ha preparat una recta patró amb 1,1,3,3-tetrametoxipropà 20 % (TMP, Fluka), mitjançant dilucions seriadades de 160 a 0,625  $\mu\text{M}$  en aigua miliQ. Seguidament, s'han preparat les mostres d'homogenat de còrtex o d'hipocamp o l'estàndard, a les quals s'ha afegit l'antioxidant butil-hidroxitoluè 1 % (BHT, Sigma) en àcid acètic (Scharlab, Espanya), la solució de sodi dodecil sulfat 8,1 % (SDS, Bio-Rad), la solució d'àcid acètic 20 % per assolir el medi àcid on tindrà lloc la reacció, i 0,8 % de TBA com a cromogen. La barreja s'ha incubat durant 1 h a 95°C. Seguidament, s'ha afegit l'n-butanol (Sigma) i s'ha centrifugat a 850 g durant 10 min a 4°C. S'ha recuperat la fase butanòlica i s'ha mesurat l'absorbància obtinguda en l'espectrofotòmetre Sunrise (Tecan) a una longitud d'ona de 532 nm. La concentració de MDA de cada mostra s'ha calculat interpolant el valor d'absorbància de la mostra a la recta patró que s'ha preparat en cada assaig.

## 12. WESTERN BLOT

La tècnica del Western Blot (Towbin *et al.*, 1979) permet detectar i identificar proteïnes específiques en una mostra complexa mitjançant el reconeixement específic per anticossos. Aquesta tècnica consta de diferents fases la primera de les quals és la preparació i solubilització de les proteïnes. Seguidament, es realitza una electroforesi, en la qual se separen les proteïnes per pes molecular, hidrofobicitat i estructura. A

continuació, es transfereixen a una membrana (suport sòlid) i, finalment té lloc, la immunodetecció mitjançant anticossos específics per la proteïna d'interès.

### 12.1. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

Per tal de facilitar la migració de les proteïnes dins del gel on es duu a terme l'electroforesi, prèviament es realitza una desnaturalització de les mostres. Aquest procés desfà l'estructura tridimensional de les proteïnes i resta tan sols la cadena polipeptídica lineal, que és més soluble en el tampó de mostra i permet una millor separació.

#### Procediment:

Per solubilitzar la mostra s'ha barrejat la quantitat de mostra corresponent a 50 µg de proteïna en un tampó 5X Laemmli (**Taula 3.6**) i s'ha fet bullir durant 10 min. Les mostres s'han mantingut en gel per evitar que tornessin a l'estructura tridimensional.

**Taula 3.6 Composició del tampó 5X Laemmli.**

Reactiu	Concentració	Casa comercial
Tris (pH 6,8)	30 % (v/v)	Sigma
SDS	10 % (p/v)	Bio-Rad
Glicerol	50 % (v/v)	Sigma
Blau de bromofenol	0,001 % (p/v)	Sigma

Bio-Rad (EUA); Sigma (EUA). SDS: dodecilsulfat sòdic.

### 12.2. ELECTROFORESI

En primer lloc, es preparen els gels de poliacrilamida formats per la copolimerització dels compostos d'acrilamida i bisacrilamida (Bio-Rad). Aquests dos compostos confereixen l'estructura al gel, el qual comença a polimeritzar just després d'afegir els catalitzadors persulfat amònic (APS; *Ammonium persulfate*; Sigma) i N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED; Bio-Rad). En aquests gels hi ha dues zones; la superior que està formada pel gel concentrador, la finalitat del qual és concentrar i agrupar la mostra a la mateixa posició de sortida abans de començar a separar-se i, després, es troba el gel separador, que permet separar les proteïnes pel seu pes molecular i la seva càrrega elèctrica. La composició del gel concentrador sempre és la mateixa, mentre que

la del gel separador varia en funció del pes molecular de la proteïna que es vol determinar.

Procediment:

Primer s'ha preparat el gel separador del 12,5 %, format per acrilamida/bisacrilamida (30 %) 33 %, Tris 1,5 mol/L 25 %, SDS (10 %) 1 %, APS (10 %) 0,4 % i TEMED 0,1 %, i s'ha abocat a l'espai que formen dos vidres per tal que el gel tingui el mateix gruix. A continuació, s'ha afegit una mica d'aigua destil·lada, ja que l'absència d'oxigen afavoreix la polimerització dels gels. Transcorreguts 20 min a temperatura ambient s'ha retirat l'aigua i s'ha afegit el gel concentrador, que conté acrilamida/bisacrilamida (30 %) 12,3 %, Tris 1 mol/L 12,3 %, SDS (10 %) 0,1 %, APS (10 %) 0,5 % i TEMED 0,24 %. Els pous s'han format amb una pinta de plàstic i s'ha incubat 20 min a temperatura ambient perquè polimeritzés.

Una vegada polimeritzats els gels, s'ha muntat la cubeta d'electroforesi Mini-Protean III Cell® (Bio-Rad) omplerta amb el tampó d'electroforesi (**Taula 3.7**). Posteriorment, s'han carregat les mostres i el pes molecular. Tot seguit, les proteïnes s'han sotmès a un camp elèctric (80 V) per tal de facilitar que les proteïnes es disposin en el mateix punt de sortida. Seguidament, el voltatge s'ha incrementat fins a 100 V, de manera que es separessin en funció del seu pes molecular i de la seva càrrega. Les proteïnes de menor pes molecular avancen més ràpidament mentre que les de major pes queden retingudes més a prop del pou on s'ha sembrat la mostra.

**Taula 3.7. Composició del tampó d'electroforesi.**

Reactiu	Concentració	Casa comercial
Tris	25 mM	Sigma
SDS	1 %	Bio-Rad
Glicina	192 mM	Sigma

Bio-Rad (EUA); Sigma (EUA). SDS: dodecilsulfat sòdic.

### 12.3. TRANSFERÈNCIA

Després de separar les proteïnes per electroforesi, aquestes es transfereixen a una membrana de fluorur de polivinil (PVDF; *Polyvinylidene fluoride*) mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric.



Procediment:

Primer de tot, cal activar les membranes de PVDF amb metanol. Al mateix temps, s'ha amarat el material a utilitzar amb el tampó de transferència. Tot seguit s'ha desmuntat el suport de vidre, i s'ha col·locat el gel sobre dos papers de filtre. A sobre s'ha afegit la membrana de PVDF i dos papers de filtre més. A continuació, el conjunt s'ha envoltat amb dues esponges i s'han muntat dins d'un suport de plàstic, que s'ha submergit dins d'una cubeta de transferència Mini Trans-Blot Cell® (Bio-Rad) plena de tampó de transferència (**Taula 3.8**). Seguidament, s'ha iniciat la transferència a 300 mA durant 2 h a 4°C.

**Taula 3.8. Composició del tampó de transferència.**

Reactiu	Concentració	Casa comercial
Tris	25 mM	Sigma
SDS	20 %	Bio-Rad
Glicina	192 mM	Sigma
Metanol	20 %	Baker

Baker (Països Baixos); Bio-Rad (EUA); Sigma (EUA). SDS: dodecilsulfat sòdic.

## 12.4. IMMUNODETECCIÓ

Una vegada es transfereixen les proteïnes, es bloquegen tots els possibles llocs d'unió inespecífics de la membrana i es realitza una immunodetecció mitjançant anticossos específics per la proteïna d'interès.

Procediment:

La membrana s'ha submergit en una solució de blocatge (llet en pols al 5 %) en agitació constant durant 1,5 h i, seguidament, s'ha realitzat la immunodetecció emprant anticossos específics contra les proteïnes que es volen determinar.

Les membranes s'han incubat amb els anticossos primaris corresponents (**Taula 3.9**) durant tota la nit, a 4°C i en agitació orbital.

Després de rentar les membranes per eliminar l'excés d'anticòs, s'han incubat durant 2 h, en agitació orbital i protegit de la llum amb un anticòs secundari anti-ratolí o anti-conill conjugat a peroxidasa (Sigma).

Finalment, després de tornar a rentar per eliminar l'excés d'anticòs, les bandes de proteïna s'han visualitzat utilitzant el kit de detecció Clarity chemiluminescence (Bio-Rad). Aquest assaig s'ha dut a terme d'acord a les instruccions de la casa comercial. La captació de les bandes s'ha fet amb l'aparell ChemiDOC XRS (Bio-Rad) ubicat al departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica, de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació (Universitat de Barcelona), i s'han quantificat amb el programa Image Lab® (Bio-Rad).

**Taula 3.9. Llistat d'anticossos utilitzats en el Western Blot.**

Anticòs	Hoste	Dilució	Casa comercial
<b><math>\beta</math>-amiloide</b>	Conill	1/1500	Abcam
<b>E-cadherina</b>	Conill	1/400	Santa Cruz
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Conill	1/1000	Cell signaling
<b>p-NF-<math>\kappa</math>B</b>	Conill	1/1000	Cell signaling
<b>Tau</b>	Ratolí	1/1000	Millipore
<b>p-Tau</b>	Ratolí	1/1000	Invitrogen
<b>Sinaptofisina</b>	Ratolí	1/3000	Dako
<b>SIRT1</b>	Ratolí	1/1000	Abcam
<b>ZO-1</b>	Conill	1/300	Zymed
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Ratolí	1/30000	Sigma

Abcam (Regne Unit), Cell signaling (EUA), Dako (Espanya), Invitrogen (EUA), Millipore (EUA), Santa Cruz (Regne Unit), Sigma (EUA), Zymed (EUA). NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B; SIRT1: sirtuïna 1; ZO-1: zona ocludens 1.

## 13. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els diferents tests estadístics s'han realitzat amb el programa estadístic GraphPad Prism® software ver. 6 (GraphPad Software, Inc., EUA) i seguint l'assessorament estadístic de la Dra. Concepció Arenas (Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).

Totes les variables analitzades han presentat una distribució normal i, per tant, s'han aplicat tests paramètrics. En el cas que les variables no presentessin una distribució homogènia de la variança entre els grups, s'ha aplicat una transformació de les dades. La representació gràfica sempre s'ha realitzat de les dades originals, tot i que l'anàlisi impliqui la seva transformació.

Les variables estudiades en la caracterització de les soques SAMR1 i SAMP8 s'han analitzat mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA) de dos factors, la soca de ratolins (SAMR1 i SAMP8) i l'edat (2, 6 i 9 mesos). A continuació, s'ha aplicat el test post hoc de Fisher, per comparar les diferents edats. Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de  $P < 0,05$ . S'ha establert el valor de  $P$  entre 0,05 i 0,1 com a tendència significativa (Curran-Everett i Benos, 2004).

En l'estudi dels efectes de la suplementació dietètica amb SDP en una inflamació intestinal aguda induïda amb SEB també s'ha realitzat una ANOVA de dos factors, el SEB (vehicle i SEB) i els grups experimentals (2M, 6M-CTL i 6M-SDP) i la seva interacció. A continuació s'ha aplicat el test de Fisher per comparar els diferents grups experimentals. Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de  $P < 0,05$  i el valor de  $P$  entre 0,05 i 0,1 com a tendència significativa.

Finalment, en l'estudi conductual i les variables neuronals, les dades s'han analitzat mitjançant una ANOVA d'una via seguit del test post hoc de Fisher per comparar els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP. En el cas concret de l'estudi de les corbes d'aprenentatge del MWM s'ha aplicat l'anàlisi de la variança de dos factors, el grup experimental (2M, 4M-CTL, 4M-SDP, 6M-CTL i 6M-SDP) i el dia d'aprenentatge (dies 1-6), de mesures repetides (ja que cada animal s'ha valorat cada dia) i seguit del test post hoc de Fisher per comparar els diferents grups. També s'ha realitzat el test de correlació de Pearson per estudiar la relació entre les concentracions d' $H_2O_2$  i de malondialdehid i la relació entre l'abundància de les citocines IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-10 a còrtex i l'índex de discriminació realitzat en el primer test de retenció del NORT. Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de  $P < 0,05$  i el valor de  $P$  entre 0,05 i 0,1 com a tendència significativa.

## **IV. RESULTATS**

---

---



## 1. CARACTERITZACIÓ DEL MODEL SAM

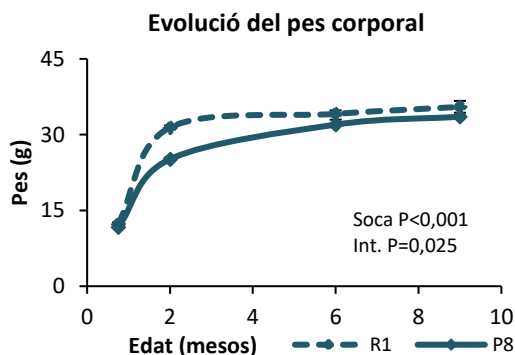
En aquest apartat es mostren els resultats de la caracterització del model de ratolins amb envelliment accelerat (soca SAMP8; P8) i els ratolins resistents a l'envelliment accelerat (soca SAMR1; R1) a diferents edats, concretament als 2, 6 i 9 mesos. Per aquesta caracterització s'han considerat paràmetres morfomètrics (corporals i intestinals), l'activació del teixit immunitari intestinal i el grau d'inflamació de la mucosa intestinal. La finalitat d'aquests experiments és establir el període experimental adequat per a realitzar una intervenció dietètica amb proteïnes plasmàtiques per la prevenció del procés d'envelliment.

### 1.1. ESTUDI MORFOMÈTRIC DELS RATOLINS SAMR1 I SAMP8

En una primera aproximació al model de ratolins P8, s'ha estudiat l'evolució del pes corporal, així com la longitud de l'intestí prim i del còlon, degut a que l'intestí és la via d'entrada de qualsevol intervenció dietètica i juga un paper fonamental en la defensa de l'organisme.

#### 1.1.1. Pes dels ratolins

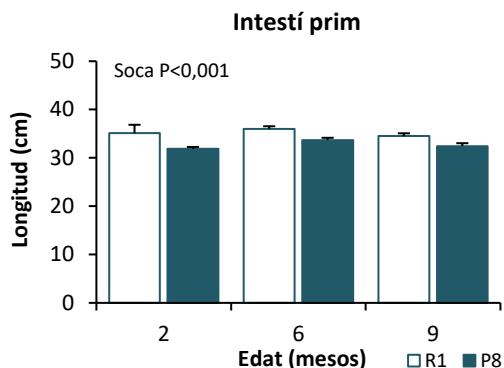
El pes corporal dels ratolins el dia del deslletament (als 21 dies d'edat) és molt similar en ambdues soques. Els ratolins P8 parteixen d'un pes d' $11,7 \pm 0,5$  g i els R1 de  $12,4 \pm 0,3$  g (**Figura 4.1**). Les dues soques de ratolins tenen una evolució del pes corporal diferent ( $P=0,025$ ); mentre que els ratolins R1 presenten un màxim de pes ja als 2 mesos d'edat, els ratolins P8 no el tenen fins als 6 mesos. A més, el guany de pes dels ratolins R1 és superior que el dels ratolins P8 ( $P<0,001$ ).



**Figura 4.1. Evolució del pes corporal dels ratolins R1 i P8 a diferents edats.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents. Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

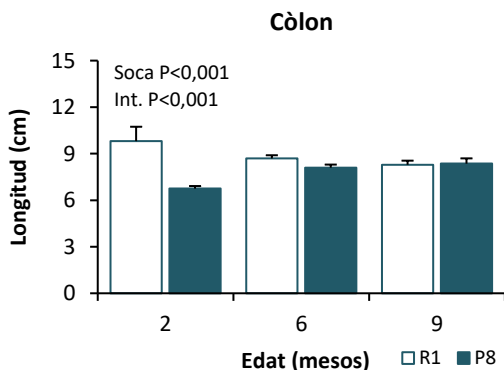
### 1.1.2. Morfometria intestinal

Els ratolins P8 tenen un intestí prim més curt que el dels ratolins R1 en les diferents edats estudiades ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.2**). A més, l'envelliment no modifica la seva longitud.



**Figura 4.2. Longitud de l'intestí prim de ratolins R1 i P8 a diferents edats.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-8$ ). Dades representatives de tres experiments diferents.

Pel que fa a la longitud del còlon, als 2 mesos d'edat es produeix la màxima diferència entre les dues soques ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.3**). L'evolució d'aquesta variable en el temps és diferent en funció de la soca ( $P < 0,001$ ) ja que als 6 mesos d'edat no hi ha diferències entre els ratolins P8 i R1.



**Figura 4.3. Longitud del còlon de ratolins R1 i P8 a diferents edats.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-8$ ). Dades representatives de tres experiments diferents. Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

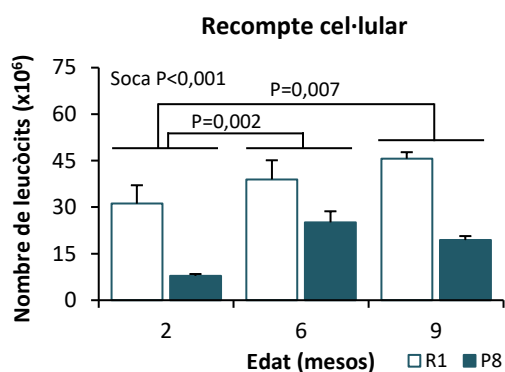
## 1.2. ESTUDI DEL TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A L'INTESTÍ EN SAMR1 I SAMP8

El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) és essencial en la resposta immunitària dels organismes. Com s'ha comentat a la Introducció, durant l'envelliment hi ha una inflamació generalitzada de baix grau coneguda com a *inflammaging*. En aquest apartat

es mostra el recompte de leucòcits i el percentatge de limfòcits T col·laboradors (Th; *T helper*), Th activats i T reguladors (Treg) als ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) i a les plaques de Peyer (PP).

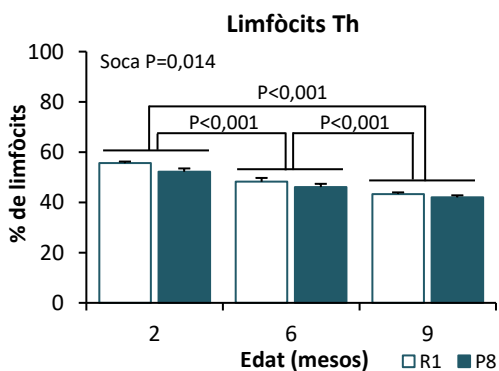
### 1.2.1. Ganglis limfàtics mesentèrics

El nombre de leucòcits als GLM incrementa amb l'edat, ja que és més elevat als 6 i als 9 mesos respecte als 2 mesos d'edat en ambdues soques ( $P=0,002$  i  $P=0,007$ , respectivament; **Figura 4.4**). Els ratolins P8 presenten un menor nombre de leucòcits als GLM en comparació amb els ratolins R1 ( $P<0,001$ ).



**Figura 4.4.** Recomppte de leucòcits als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents.

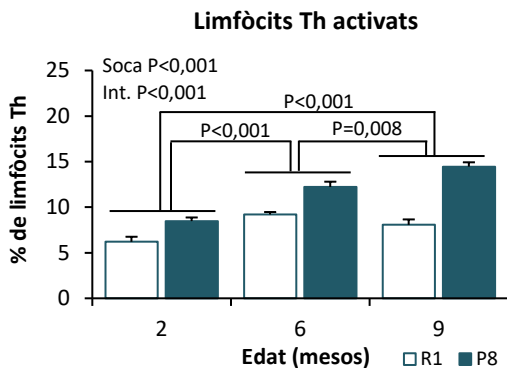
El percentatge de limfòcits Th disminueix amb l'edat i segueix el mateix patró en ambdues soques ( $P<0,001$ ; **Figura 4.5**). A més, els ratolins P8 presenten un percentatge de limfòcits Th menor respecte els ratolins R1 en les diferents edats estudiades ( $P=0,014$ ).



**Figura 4.5.** Percentatge de limfòcits Th als GLM dels ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents.

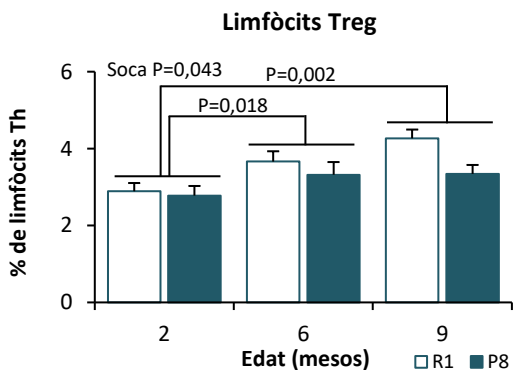


L'envelliment incrementa el percentatge de limfòcits Th activats als GLM ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.6**) i aquest increment és superior en els ratolins P8 ( $P < 0,001$ ). La diferència entre ratolins R1 i P8 és màxima als 9 mesos d'edat ( $8,1 \pm 0,6 \%$  i  $14,5 \pm 0,5 \%$ , respectivament;  $P < 0,001$ ).



**Figura 4.6.** Percentatge de limfòcits Th activats als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents. Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

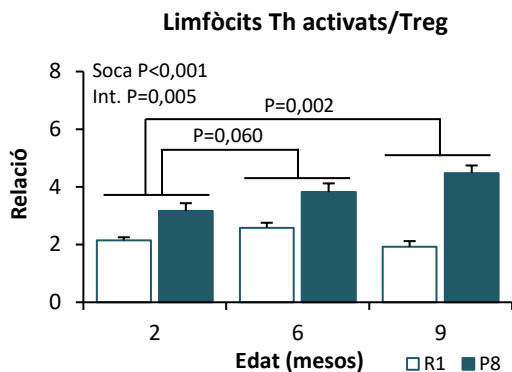
Ambdues soques de ratolins presenten un percentatge de limfòcits T reguladors (Treg) similar als 2 mesos d'edat, que incrementa durant l'envelliment ( $P=0,018$  als 6 mesos i  $P=0,002$  als 9 mesos, respecte els ratolins joves; **Figura 4.7**). Aquest percentatge de limfòcits Treg és inferior en els ratolins P8 sobretot a partir dels 9 mesos d'edat respecte dels ratolins R1 ( $P=0,043$ ).



**Figura 4.7.** Percentatge de limfòcits Treg als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents.

La proporció dels limfòcits Th activats respecte els limfòcits Treg incrementa gradualment amb l'envelliment ( $P=0,060$  als 6 mesos i  $P=0,002$  als 9 mesos d'edat; **Figura 4.8**). A més, els ratolins P8 presenten un perfil més activat que els ratolins R1 en les diferents edats estudiades ( $P < 0,001$ ). Aquest efecte és encara més evident als 9 mesos d'edat, on els ratolins P8 doblen la relació entre aquestes poblacions limfocitàries respecte als ratolins R1 ( $4,5 \pm 0,2$  i  $2,2 \pm 0,2$ , respectivament). Com es pot

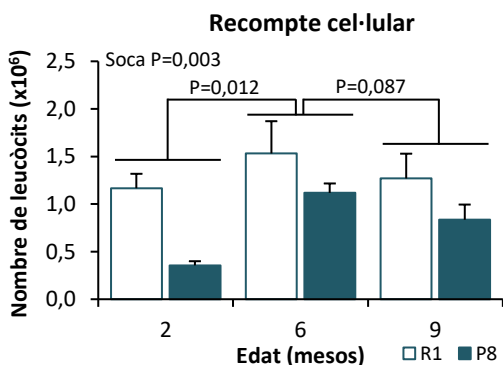
observar, les dues soques evolucionen de forma diferent al llarg de l'estudi ( $P=0,005$ ), mentre en els ratolins R1 la relació entre les dues poblacions limfocitàries no varia massa, aquesta incrementa en els ratolins P8.



**Figura 4.8. Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg als GLM de ratolins R1 i P8 a diferents edats.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents. Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

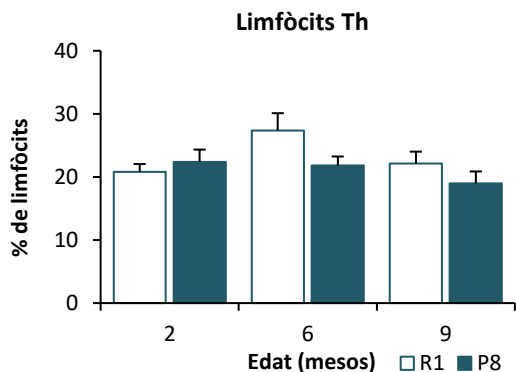
### 1.2.2. Plaques de Peyer

Els ratolins P8 presenten un menor nombre de leucòcits a les PP respecte els ratolins R1 a les diferents edats estudiades ( $P=0,003$ ; **Figura 4.9**). Ambdues soques mostren un lleuger increment en el recompte de leucòcits als 6 mesos d'edat ( $P=0,012$ ).



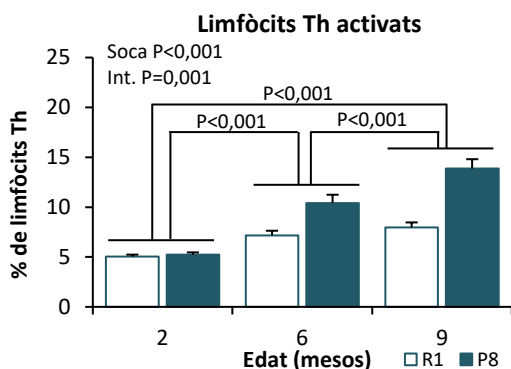
**Figura 4.9. Recompte de leucòcits a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=6-11$ ). Dades representatives de tres experiments diferents.

Ni l'envelliment, ni la soca de ratolí modifica el percentatge de limfòcits Th a les PP (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10.** Percentatge de limfòcits Th a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-10). Dades representatives de tres experiments diferents.

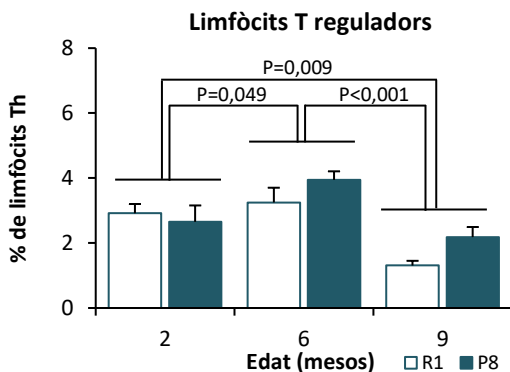
En canvi, el percentatge de limfòcits Th activats incrementa de forma progressiva a mida que els ratolins envelleixen ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.11**) i és més pronunciat en els ratolins P8 ( $P = 0,001$ ). A més la soca P8 sempre manté un percentatge de limfòcits Th activats superior a la soca R1 ( $P < 0,001$ ).



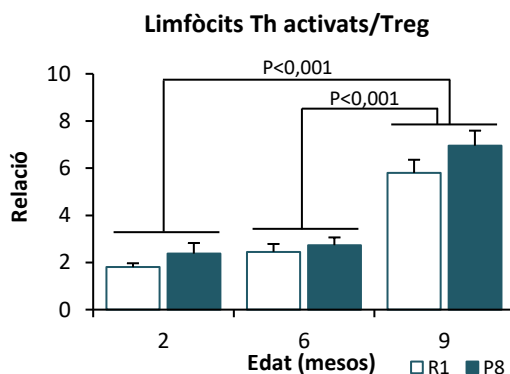
**Figura 4.11.** Percentatge de limfòcits Th activats a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-10). Dades representatives de tres experiments diferents. Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

Als 6 mesos d'edat, ambdues soques de ratolins mostren un increment del percentatge de limfòcits Treg a les PP ( $P = 0,009$ , **Figura 4.12**). El percentatge d'aquests limfòcits disminueix als 9 mesos d'edat fins assolir valors inferiors als dels 2 mesos d'edat.

Als 9 mesos d'edat, ambdues soques de ratolins mostren un biaix evident en l'activació dels limfòcits Th respecte els Treg amb l'edat ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.13**).



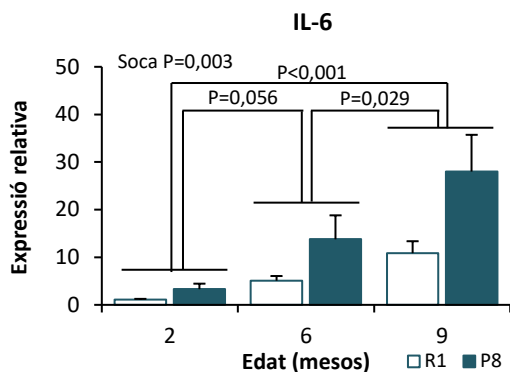
**Figura 4.12.** Percentatge de limfòcits Treg a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-10). Dades representatives de tres experiments diferents.



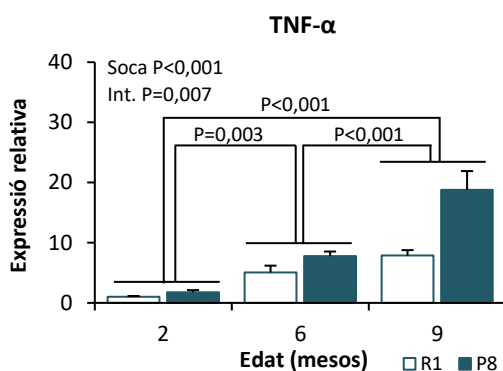
**Figura 4.13.** Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg a les PP de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-10). Dades representatives de tres experiments diferents.

### 1.2.3. Expressió de citocines a la mucosa intestinal

Tant la IL-6 com el TNF- $\alpha$  són dues citocines proinflamàtores, l'expressió de les quals incrementa a la mucosa intestinal a mida que els ratolins d'ambdues soques envelleixen ( $P < 0,001$  ambdues citocines; **Figures 4.14 i 4.15**, respectivament). Als 2 mesos d'edat, l'expressió d'aquestes dues citocines és molt similar entre ambdues soques. En canvi, als 6 i 9 mesos d'edat, els ratolins P8 dupliquen l'expressió d'IL-6 respecte els ratolins R1 ( $P = 0,003$ ), mentre que l'efecte sobre el TNF- $\alpha$  és més acusat als 9 mesos d'edat ( $P < 0,001$ ).



**Figura 4.14.** Expressió de la IL-6 a la mucosa de jejú de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-7).



**Figura 4.15.** Expressió del TNF- $\alpha$  a la mucosa de jejú de ratolins R1 i P8 a diferents edats. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-7). Int., interacció entre la soca i l'edat dels animals.

En base als resultats obtinguts, es pot concloure que als 2 mesos d'edat, els ratolins R1 i P8 presenten un perfil d'activació molt similar al GALT, quan encara no s'observen els canvis característics associats a l'envelliment. En canvi, als 6 mesos d'edat, ja s'observen canvis immunitaris en els ratolins de la soca P8, com l'increment de l'activació limfocitària intestinal i de l'expressió de citocines proinflamatòries, que s'associen a l'*inflammaging* propi d'edats avançades.

Per estudiar els efectes de la suplementació amb plasma assecat (SDP) s'ha establert el període experimental dels 2 als 6 mesos d'edat, prenent com a referència jove els ratolins P8 de 2 mesos i, com a animals senescents, els ratolins P8 de 6 mesos d'edat.

## 2. EFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES FRONT UNA INFLAMACIÓ INTESTINAL AGUDA

Una vegada establert el període experimental adequat per estudiar la inclusió d'aliments funcionals en l'evolució de l'envelliment, s'ha procedit a desenvolupar el segon objectiu d'aquest treball. Aquest consisteix a estudiar els efectes del plasma porcí assecat per polvorització (SDP) en una inflamació intestinal aguda induïda per l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB) en ratolins senescents.

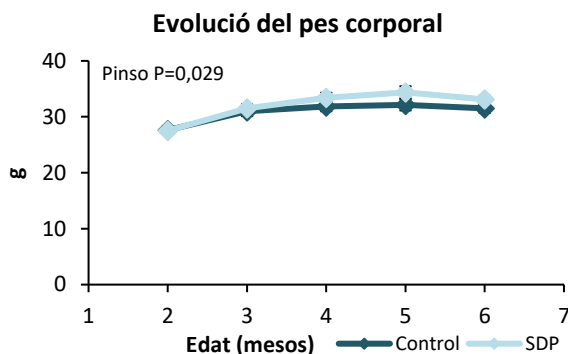
En aquest bloc de resultats es mostren els efectes de l'SDP sobre el teixit limfoide mucosal i s'avalua la resposta immunitària generada als GLM i a les PP front una inflamació intestinal aguda amb SEB, així com també l'expressió de citocines a la mucosa de jejú.

Al llarg d'aquest capítol s'han utilitzat animals P8 i els grups s'han definit de la següent manera: grup **2M**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso estàndard i administrats amb vehicle; grup **2M-SEB**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso estàndard i administrats amb SEB; grup **6M-CTL**: animals alimentats amb pinso control dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats amb vehicle; grup **6M-CTL-SEB**: animals alimentats amb pinso control dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats amb SEB; grup **6M-SDP**: animals alimentats amb pinso SDP dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats amb vehicle; grup **6M-SDP-SEB**: animals alimentats amb pinso SDP dels 2 als 6 mesos d'edat i administrats amb SEB.

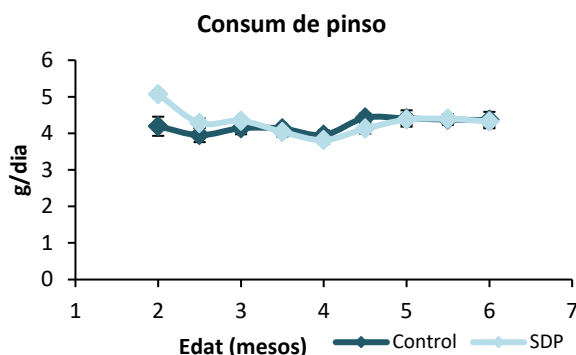
### 2.1. EVOLUCIÓ DEL PES CORPORAL I CONSUM DE PINSO

Tant els ratolins alimentats amb pinso control com els alimentats amb pinso SDP augmenten el seu pes corporal fins els 4 mesos d'edat ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.16**), moment a partir del qual s'estabilitzen. El grup alimentat amb pinso SDP mostra un guany de pes superior al del grup alimentat amb pinso control ( $P = 0,029$ ).

La ingesta diària de pinso al llarg de l'estudi ha estat entre 4-5 g de pinso al dia i no hi ha grans diferències entre els dos grups d'animals (**Figura 4.17**).



**Figura 4.16.** Evolució del pes corporal dels ratolins alimentats amb pinso control i pinso SDP durant 4 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=11-12).

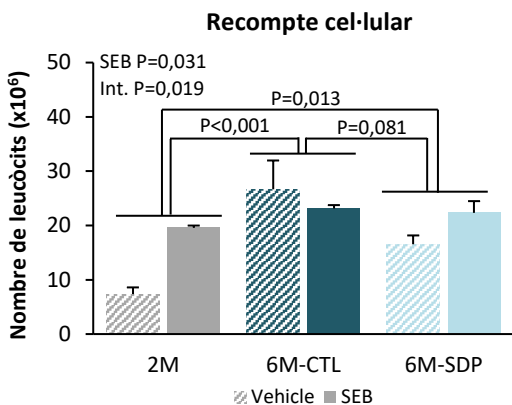


**Figura 4.17.** Evolució del consum de pinso dels ratolins alimentats amb pinso control i pinso SDP durant 4 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=9-10).

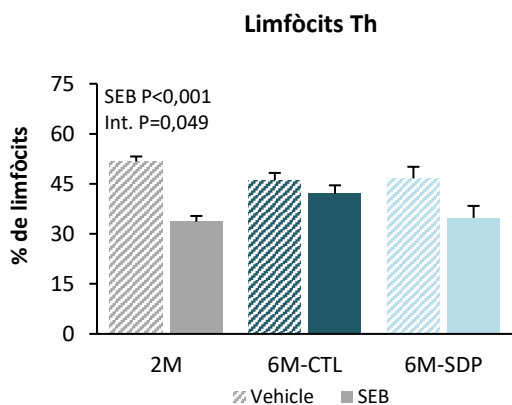
## 2.2. GANGLIS LIMFÀTICS MESENTÈRICS

L'envelliment augmenta el nombre de leucòcits als GLM ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.18**), mentre que el pinso SDP tendeix a prevenir aquest efecte ( $P = 0,081$ ). L'administració de l'enterotoxina incrementa el nombre de leucòcits ( $P = 0,031$ ) però no de la mateixa forma a tots els grups, ja que els animals vells alimentats amb pinso control no presenten aquest increment ( $P = 0,019$ ).

Ni l'envelliment ni el tipus de pinso consumit modifica el percentatge de limfòcits Th als GLM (**Figura 4.19**). En canvi, l'administració del SEB redueix el percentatge d'aquesta població de limfòcits ( $P < 0,001$ ). Aquesta reducció és major en els animals joves (2M) i en els ratolins de 6 mesos d'edat que han rebut el pinso SDP ( $P = 0,049$ ).



**Figura 4.18.** Recompte de leucòcits als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

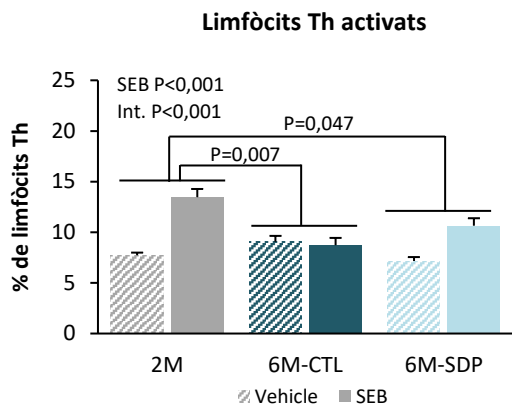


**Figura 4.19.** Percentatge de limfòcits Th als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

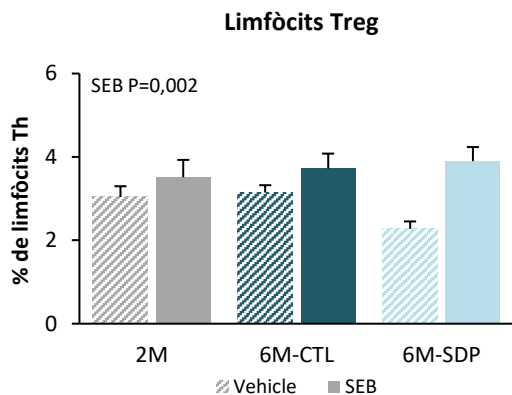
L'administració de l'enterotoxina modifica el percentatge de limfòcits Th activats ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.20**), tot i que tots els grups no responen de la mateixa manera ( $P < 0,001$ ). Els ratolins envellits mostren una menor resposta al SEB respecte als animals joves, tant si han consumit el pinso control ( $P = 0,007$ ), com si han consumit el pinso SDP ( $P = 0,047$ ).

Ni l'envelliment ni la suplementació dietètica modifiquen el percentatge de limfòcits Treg (**Figura 4.21**). En canvi, l'administració del SEB incrementa el percentatge d'aquesta població ( $P = 0,002$ ).



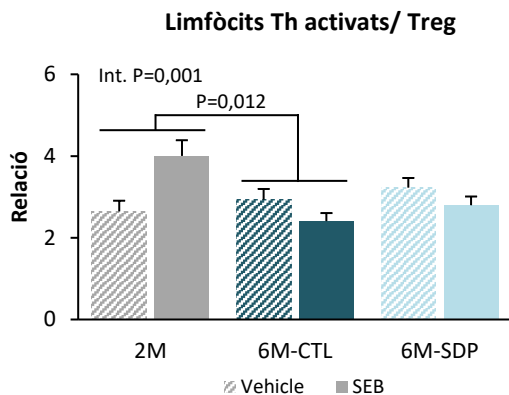


**Figura 4.20.** Percentatge de limfòcits Th activats als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.



**Figura 4.21.** Percentatge de limfòcits Treg als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-8).

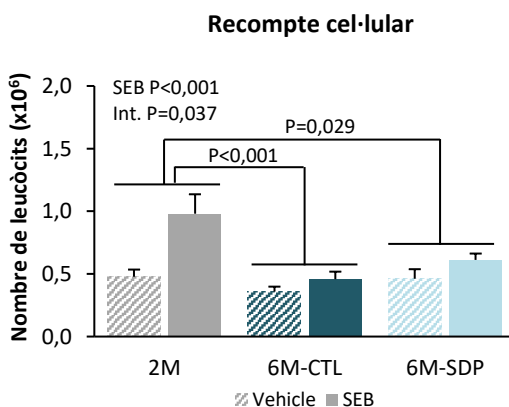
La relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg disminueix durant l'envelliment ( $P=0,012$ , **Figura 4.22**). Els ratolins suplementats amb SDP mostren una relació que no es diferencia ni de la del grup 2M ni de la del grup 6M-CTL. A més, hi ha una interacció entre l'edat i la resposta originada front al SEB ( $P<0,001$ ) ja que, en els ratolins joves, la relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg incrementa després de l'administració de la toxina i, en canvi, no s'observa en els ratolins envellits, on aquesta relació disminueix.



**Figura 4.22.** Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg als GLM d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

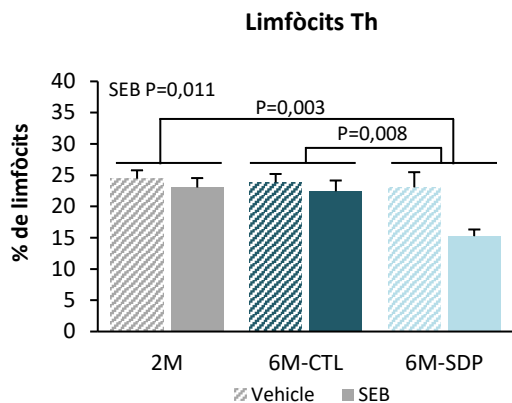
### 2.3. PLAQUES DE PEYER

Durant l'envelliment, els ratolins mostren una disminució en el nombre de leucòcits a les PP ( $P < 0,001$ ; **Figura 4.23**) i la suplementació amb SDP no atenua aquesta davallada. L'administració del SEB incrementa el reclutament de leucòcits en tots els grups experimentals ( $P < 0,001$ ), tot i que en els animals senescents, independentment del pinso consumit, la resposta és menor que en els ratolins de 2 mesos d'edat (6M-CTL i 6M-SDP).



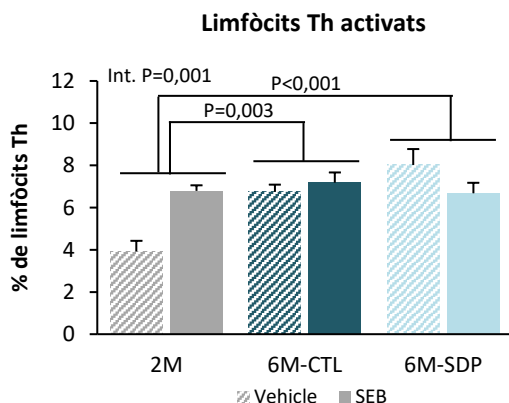
**Figura 4.23.** Recòmpte de leucòcits a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

L'envelliment no modifica el percentatge de limfòcits Th a les PP (**Figura 4.24**). A més, els ratolins joves i vells responen de forma similar a l'administració de l'enterotoxina ( $P = 0,011$ ). En canvi, els ratolins alimentats amb SDP mostren una reducció en el percentatge d'aquestes cèl·lules respecte els ratolins 6M-CTL ( $P = 0,008$ ).



**Figura 4.24.** Percentatge de limfòcits Th a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-8).

D'altra banda, l'envelliment incrementa el percentatge de limfòcits Th activats a les PP, independentment del pinso consumit (6M-CTL:  $P=0,003$  i 6M-SDP:  $P<0,001$ ; **Figura 4.25**). L'administració de la toxina incrementa aquesta població en els ratolins joves però, en canvi, no s'observa aquest efecte en els animals envellits ( $P=0,001$ ).

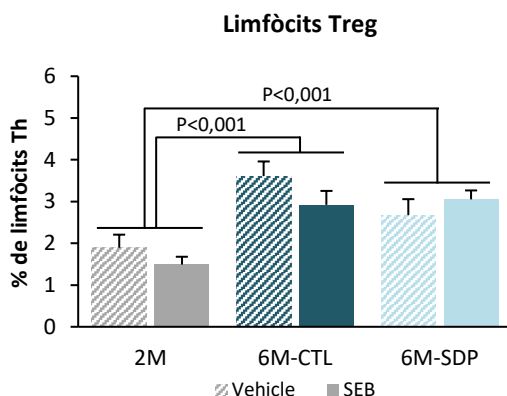


**Figura 4.25.** Percentatge de limfòcits Th activats a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

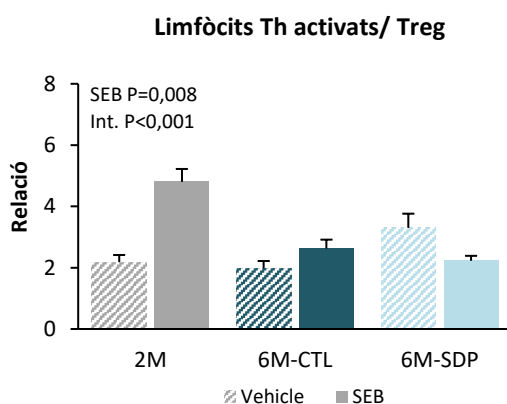
L'envelliment incrementa el percentatge de limfòcits Treg ( $P<0,001$ ; **Figura 4.26**), i el consum de pinso amb SDP no ho modifica. A més, l'administració del SEB no comporta canvis en aquesta població de limfòcits en cap dels grups inflamats.

L'administració de l'enterotoxina genera una resposta en la relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg en els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP ( $P=0,008$ ), tot i que aquesta resposta és diferent en cada grup ( $P<0,001$ ; **Figura 4.27**). Mentre que en els ratolins joves el SEB incrementa la relació entre els limfòcits activats i els Treg, en els ratolins senescents que han rebut el pinso control aquesta relació gairebé no es veu

modificada. D'altra banda, l'enterotoxina disminueix la relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg en el grup que ha rebut el pinso SDP.



**Figura 4.26.** Percentatge de limfòcits Treg a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-8).



**Figura 4.27.** Relació entre els limfòcits Th activats i els limfòcits Treg a les PP d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6-8). Int., interacció entre l'administració de SEB i els grups 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

## 2.4. EXPRESSIÓ DE CITOCINES A LA MUCOSA INTESTINAL

La senescència incrementa l'expressió de les citocines proinflamatòries IL-6 i TNF- $\alpha$  a la mucosa de jejú (P=0,002 i P=0,020; **Figura 4.28** i **Figura 4.29**, respectivament) i la ingesta del pinso SDP és capaç de reduir l'expressió d'aquestes citocines (P=0,040 i P=0,016, respectivament). A més, l'administració de l'enterotoxina indueix un increment major en l'expressió d'aquestes citocines en els grups 2M i 6M-SDP respecte el grup 6M-CTL.

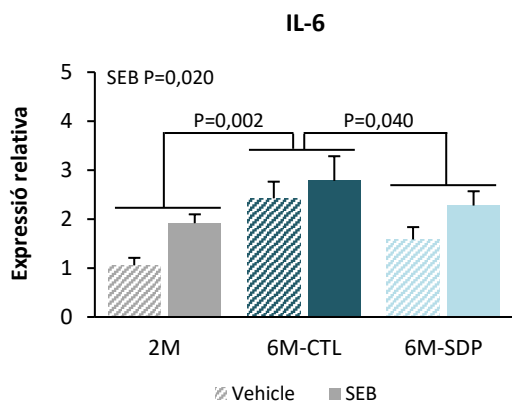


Figura 4.28. Expressió de la IL-6 a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-6).

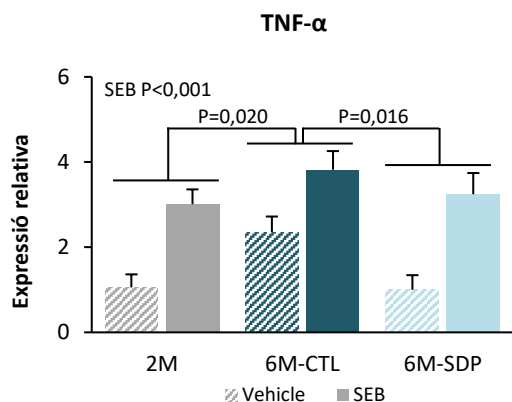


Figura 4.29. Expressió del TNF- $\alpha$  a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-6).

Ni l'envelliment ni la suplementació dietètica amb SDP modifica l'expressió d'IFN- $\gamma$  a la mucosa de jejú (**Figura 4.30**). En canvi, l'administració del SEB incrementa l'expressió d'aquesta citocina proinflamatòria tant en ratolins joves com en envellits ( $P=0,015$ ).

Durant l'envelliment disminueix l'expressió de la citocina antiinflamatòria IL-10 a la mucosa de jejú ( $P=0,021$ ; **Figura 4.31**). L'administració del SEB incrementa l'expressió d'aquesta citocina en els animals joves i en els que han rebut la suplementació amb SDP. D'altra banda, en els animals senescents alimentats amb el pinso control es modifica molt poc l'expressió de la IL-10 entre els animals que han rebut el vehicle i els que han rebut l'enterotoxina.

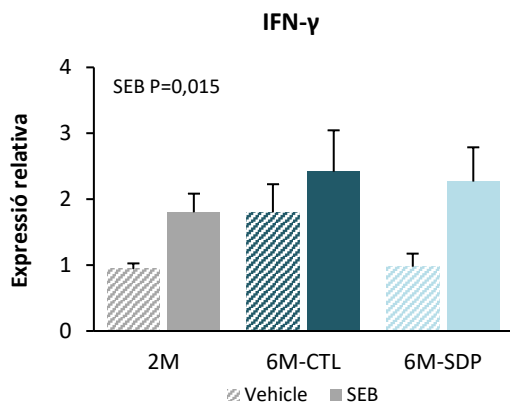


Figura 4.30. Expressió de l'IFN- $\gamma$  a la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-6).

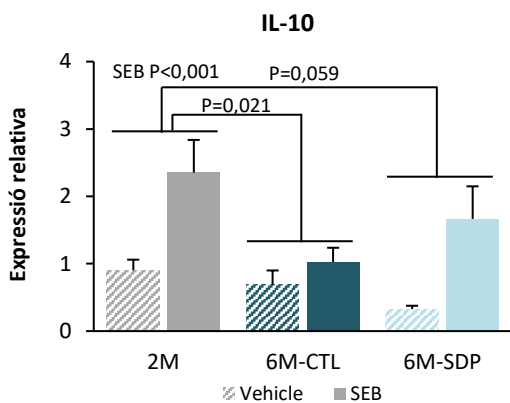


Figura 4.31. Expressió de la IL-10 en la mucosa de jejú d'animals exposats al SEB i alimentats amb els pinsos experimentals dels 2 als 6 mesos. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-6).

### 3. EFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES SOBRE EL TEIXIT CEREBRAL

L'efecte de la suplementació dietètica amb SDP sobre les funcions cognitives durant l'envelliment s'ha estudiat mitjançant l'aplicació de dos tests de comportament a ratolins SAMP8 (P8) de 2, 4 i 6 mesos d'edat. Els grups experimentals estudiats en els tests de conducta són: 2M, 4M-CTL, 4M-SDP, 6M-CTL i 6M-SDP (veure disseny experimental pàg. 43). Els tests de comportament aplicats són: el test de reconeixement d'objectes (NORT) que valora la memòria a curt i a llarg termini; i el laberint d'aigua de Morris (MWM), que avalua la memòria espacial i la capacitat d'aprenentatge dels ratolins. S'han utilitzat diferents ratolins per cada edat d'estudi (2, 4 i 6 mesos), ja que s'ha comprovat que els ratolins retenen part de l'aprenentatge un cop han fet el test.

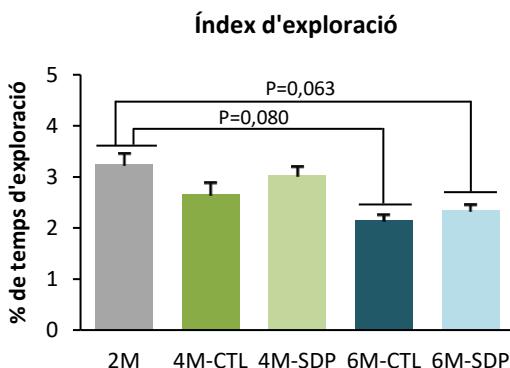
A més, s'ha analitzat si la suplementació dietètica amb SDP indueix canvis moleculars en l'estat inflamatori i oxidatiu al còrtex i a l'hipocamp, en la barrera hematoencefàlica i en la neurodegeneració. Les variables de barrera hematoencefàlica, així com marcadors de neurodegeneració s'han analitzat a l'hemisferi sencer. En aquest cas, els grups estudiats han estat: 2M, 6M-CTL i 6M-SDP.

#### 3.1. MEMÒRIA A CURT I LLARG TERMINI

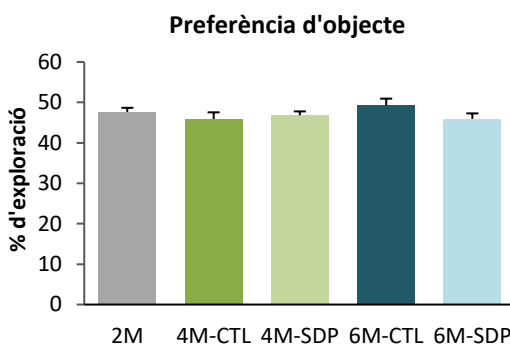
El NORT consta de quatre fases (veure pàg. 52): la fase d'aclimatació al laberint, la fase de familiarització als objectes i el primer i el segon test de retenció (que avaluen la memòria a curt i llarg termini, respectivament).

Durant la fase de familiarització s'ha analitzat l'índex d'exploració, entès com el temps que els ratolins exploren els objectes que hi ha a cada extrem del laberint, respecte el temps total que hi romanen dins. Als 2 mesos d'edat (2M), els ratolins exploren els objectes  $3,2 \pm 0,6$  % del temps, i l'envelliment tendeix a reduir aquest índex, ja que als 6 mesos d'edat els ratolins exploren  $2,1 \pm 0,2$  % del temps ( $P=0,063$ , **Figura 4.32**). Els ratolins de 4 mesos d'edat (4M-CTL) presenten valors intermedis entre els animals de 2 mesos (2M) i els de 6 mesos (6M-CTL). La suplementació dietètica amb l'SDP no modifica l'índex d'exploració.

A més, com s'observa a la **Figura 4.33**, els ratolins P8 destinen un temps d'exploració semblant entre els dos objectes, és a dir, tots els grups experimentals presenten una preferència similar per explorar els dos objectes.



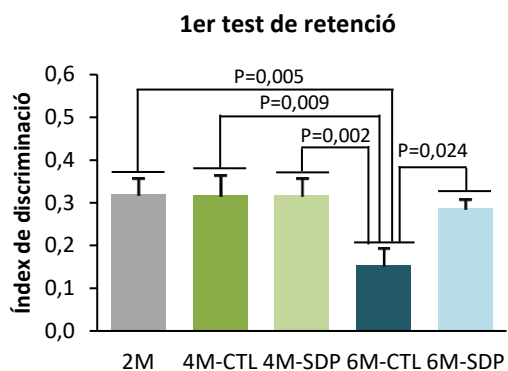
**Figura 4.32.** Índex d'exploració realitzat durant la fase de familiarització. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.



**Figura 4.33.** Preferència d'objecte dels ratolins durant la fase de familiarització. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.

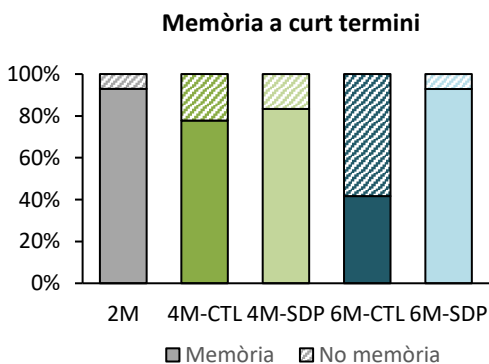
En el primer test de retenció (que avalua la memòria a curt termini) els ratolins exploren més l'objecte nou que el familiar, fet que concorda amb el comportament d'exploració innat dels ratolins (**Figura 4.34**). En aquest test, l'índex de discriminació decau als 6 mesos d'edat (2M:  $0,30 \pm 0,03$  i 6M-CTL:  $0,15 \pm 0,04$ ;  $P=0,005$ ), que indica una disminució de la memòria a curt termini d'aquests ratolins en comparació als ratolins de 2 i 4 mesos d'edat (4M-CTL). En canvi, els ratolins de 6 mesos d'edat alimentats amb el pinso SDP (6M-SDP) prevenen aquesta pèrdua de memòria a curt termini ( $P=0,024$ ).





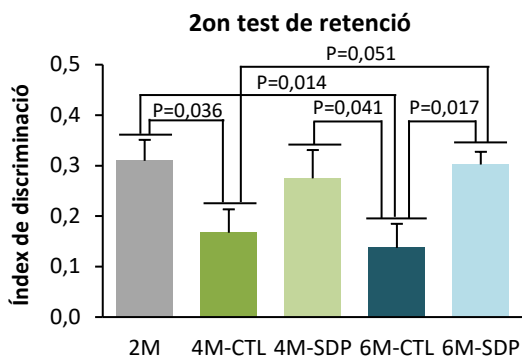
**Figura 4.34.** Índex de discriminació obtingut en el primer test de retenció. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.

S’ha establert que quan els ratolins presenten un índex de discriminació superior a 0,2, és a dir, que els ratolins exploren l’objecte nou el doble de temps que l’objecte vell, tenen suficient memòria com per discriminar l’objecte nou del vell. En la **Figura 4.35** es representa el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació superior a 0,2 en el primer test de retenció (memòria a curt termini). Als 2 mesos d’edat, el 87,5 % dels ratolins conserven la memòria a curt termini i s’observen valors similars dels ratolins de 4 mesos d’edat. En canvi, només el 40 % dels ratolins de 6 mesos d’edat (6M-CTL) presenten un índex de discriminació superior a 0,2 mentre que un 92,9 % dels ratolins de 6 mesos d’edat alimentats amb pinso SDP (6M-SDP) mantenen la memòria a curt termini.



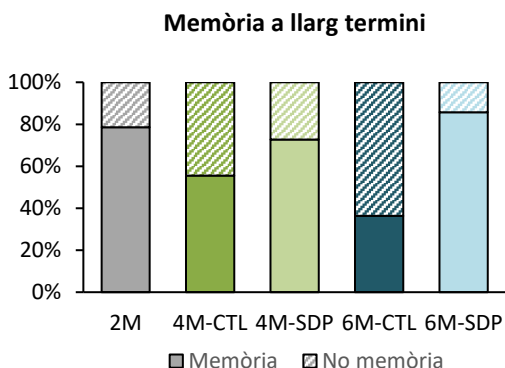
**Figura 4.35.** Percentatge de ratolins amb memòria a curt termini. Les barres de color llis representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació superior 0,2 en el primer test de retenció; les barres a ratlles mostren el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació inferior a 0,2 (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.

En el segon test de retenció (que avalua la memòria a llarg termini), realitzat 24 h després del primer test, s’observa una davallada de la memòria, ja que els ratolins de 4 i 6 mesos d’edat (4M-CTL i 6M-CTL) tenen un índex de discriminació més baix que els ratolins de 2 mesos (P=0,036 i P=0,014, respectivament; **Figura 4.36**). La suplementació dietètica amb SDP prevé l’efecte de l’envelliment sobre la memòria a llarg termini als 6 mesos d’edat (P=0,017).



**Figura 4.36.** Índex de discriminació obtingut en el segon test de retenció. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.

El 70 % del ratolins de 2 mesos d’edat obtenen un índex de discriminació superior a 0,2 en el segon test de retenció (memòria a llarg termini, **Figura 4.37**). Aquest percentatge disminueix amb l’envelliment, ja que només el 55 % dels ratolins de 4 mesos d’edat (4M-CTL) i el 36 % dels de 6 mesos d’edat (6M-CTL) conserven la memòria a llarg termini. La suplementació amb SDP incrementa el percentatge de ratolins amb memòria a llarg termini als 4 mesos (72,7 %) i als 6 mesos d’edat (85,7 %).



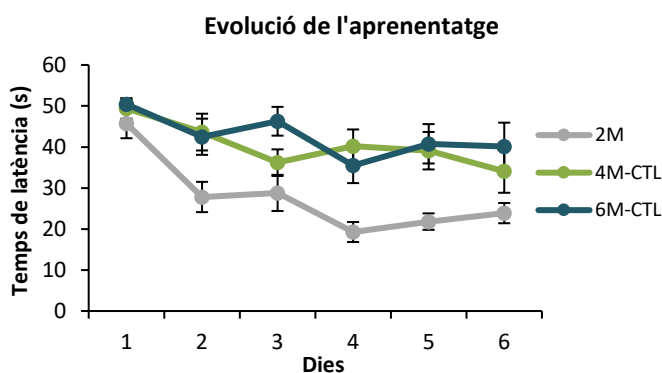
**Figura 4.37.** Percentatge de ratolins amb memòria a llarg termini. Les barres de color llis representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació superior a 0,2 en el segon test de retenció; les barres a ratlles mostren el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació inferior a 0,2 (n=9-14). Dades representatives de dos experiments diferents.

### 3.2. CAPACITAT D’APRENTATGE I MEMÒRIA ESPACIAL

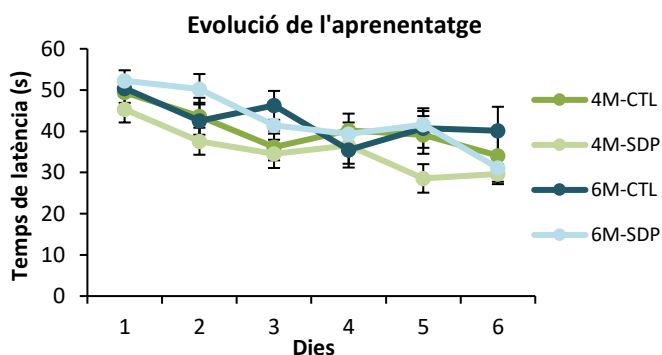
El test de MWM consta de dues fases: una primera fase d’aprenentatge, que es realitza durant sis dies consecutius, en la qual els ratolins aprenen a localitzar una plataforma oculta; i una segona fase (test), que es realitza el setè dia d’experiment, on s’elimina la plataforma.

L’efecte de l’envelliment sobre la corba d’aprenentatge es mostra a la **Figura 4.38**, mentre que l’efecte de la suplementació dietètica es mostra a la **Figura 4.39**. Els animals

que mantenen la capacitat d'aprenentatge, cada dia realitzen el test més ràpid, mentre que els animals que tenen dificultats en l'aprenentatge redueixen poc el temps de realització del test. El primer dia de la fase d'aprenentatge tots els grups experimentals requereixen el mateix temps per arribar a la plataforma (entre 43 i 50 s). Durant aquesta fase, els ratolins de 4 i 6 mesos d'edat necessiten un temps significativament superior per arribar a la plataforma oculta respecte als ratolins joves ( $P=0,002$  i  $P<0,001$ , respectivament; **Figura 4.38**), que indica una menor capacitat d'aprenentatge durant l'envelliment. La suplementació amb SDP no modifica la capacitat d'aprenentatge dels ratolins senescents (**Figura 4.39**).



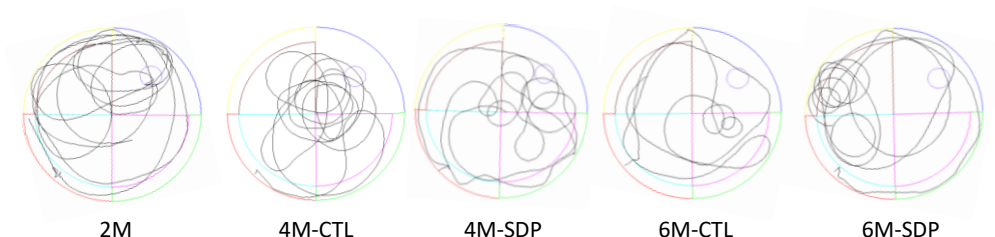
**Figura 4.38. Efecte de l'envelliment sobre l'evolució de l'aprenentatge.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=8-9$ ). Dades representatives de dos experiments diferents.



**Figura 4.39. Efecte de l'SDP sobre l'evolució de l'aprenentatge.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=8-12$ ). Dades representatives de dos experiments diferents.

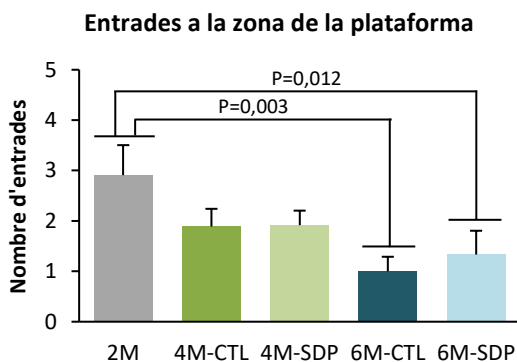
Els ratolins de tots els grups experimentals nedien a la mateixa velocitat abans de la realització del MWM (16,3 - 18,5 cm/s), de manera que les diferències observades en l'evolució de l'aprenentatge respecte a l'envelliment no són degudes a diferències en la velocitat de natació entre ratolins joves i envellits.

Durant el test, els ratolins naden durant 1 min a la piscina i s'enregistren les trajectòries que realitzen. A la **Figura 4.40** es mostren imatges representatives de trajectòries de cada grup experimental, on s'observa que cap ratolí està predominantment en el quadrant de la plataforma.



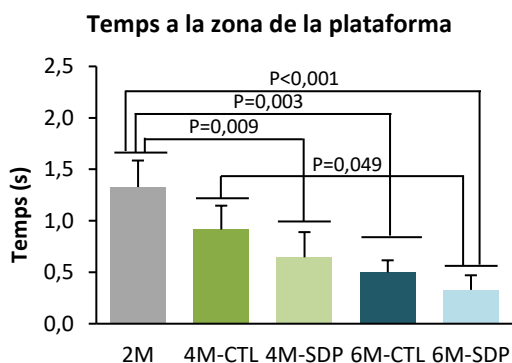
**Figura 4.40. Trajectòries realitzades durant el test de MWM.** Imatge representativa de la trajectòria realitzada per un animal de cada un dels grups experimentals. El quadrant diana (quadrant superior dret) és on hi havia la plataforma, indicada amb una circumferència.

Als 2 mesos d'edat, els ratolins travessen la zona on estava situada la plataforma  $2,9 \pm 0,6$  vegades (**Figura 4.41**). Als 4 mesos d'edat (4M-CTL) aquest paràmetre es manté similar a l'obtingut en els ratolins joves (2M), mentre que als 6 mesos d'edat (6M-CTL) hi ha una davallada del nombre d'entrades a aquesta zona ( $P=0,003$ ). La suplementació dietètica amb l'SDP no modifica aquest paràmetre.



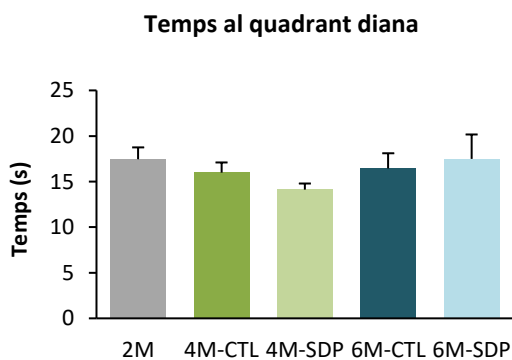
**Figura 4.41. Nombre d'entrades a la zona de la plataforma.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=9-12$ ). Dades representatives de dos experiments diferents.

Els ratolins de 2 mesos d'edat (2M) són els que recorden millor on es trobava situada la plataforma i, per tant, hi romanen més temps (**Figura 4.42**). En canvi, els ratolins de 6 mesos d'edat, independentment de la dieta que hagin rebut, hi estan menys temps ( $P<0,005$ ).



**Figura 4.42. Temps de permanència a la zona de la plataforma.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=7-11). Dades representatives de dos experiments diferents.

Els ratolins de tots els grups experimentals romanen el mateix temps en el quadrant on estava situada la plataforma (quadrant diana), entre 14,1 - 17,5 s (**Figura 4.43**), el que indica que cap grup presenta una preferència clara per aquest quadrant. Tampoc hi ha diferències en els temps que els ratolins estan als altres quadrants (**Taula 4.1**).



**Figura 4.43. Temps de permanència al quadrant diana.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=10-12). Dades representatives de dos experiments diferents.

**Taula 4.1. Temps de permanència a cada quadrant de la piscina.**

Grup	Quadrant SO	Quadrant NO	Quadrant SE	Quadrant NE
2M	12,0 ± 1,0 (12)	18,0 ± 1,9 (12)	11,0 ± 1,4 (12)	17,5 ± 1,3 (12)
4M-CTL	14,5 ± 1,8 (9)	15,6 ± 1,9 (9)	12,1 ± 1,9 (9)	16,0 ± 1,1 (9)
4M-SDP	15,0 ± 1,1 (10)	16,1 ± 1,8 (10)	14,0 ± 1,3 (10)	14,1 ± 0,7 (10)
6M-CTL	15,1 ± 1,1 (9)	13,9 ± 1,3 (9)	14,0 ± 1,2 (9)	16,4 ± 1,7 (9)
6M-SDP	12,6 ± 1,5 (10)	17,7 ± 2,0 (10)	9,6 ± 1,9 (10)	17,5 ± 2,7 (10)

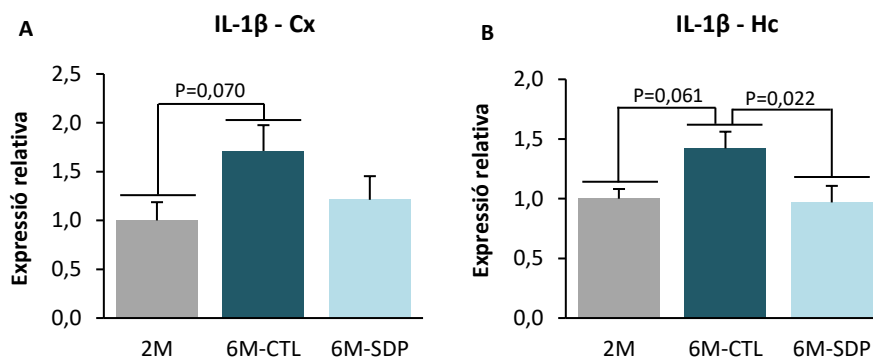
Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n). SO: Sud-oest; NO: Nord-oest; SE: Sud-est; NE: Nord-est (quadrant diana).

### 3.3. INFLAMACIÓ A CÒRTEX I HIPOCAMP

L'envelliment neuronal s'associa a un estat d'inflamació crònica, que afecta la seva funcionalitat. Per aquest motiu s'ha estudiat l'expressió de citocines proinflamatòries (IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i antiinflamatòries (IL-10 i TGF- $\beta$ ), així com el grau de fosforilació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B, que és un element clau de diferents vies d'inflamació. També s'ha estudiat l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1 al còrtex i a l'hipocamp, i s'ha correlacionat l'abundància de les citocines IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-10 amb la memòria a curt termini dels ratolins.

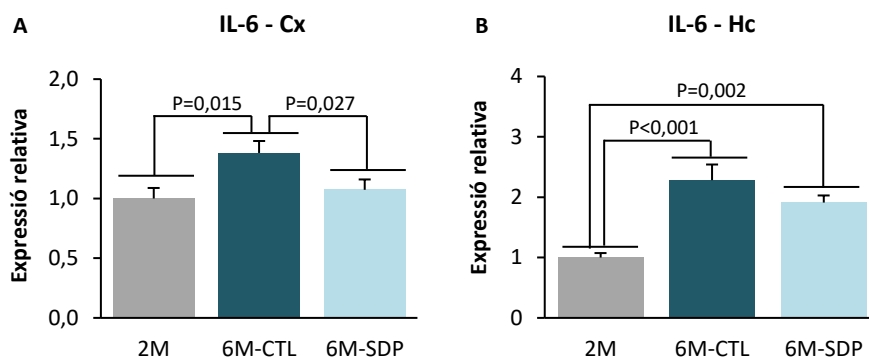
#### 3.3.1. Expressió de citocines

L'expressió de la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  tendeix a incrementar durant l'envelliment tant al còrtex com a l'hipocamp dels ratolins senescents ( $P=0,070$  i  $P=0,061$ , respectivament; **Figura 4.44**). La suplementació dietètica amb SDP atenua l'efecte de l'envelliment sobre la IL-1 $\beta$  a l'hipocamp ( $P=0,022$ ), però no al còrtex.



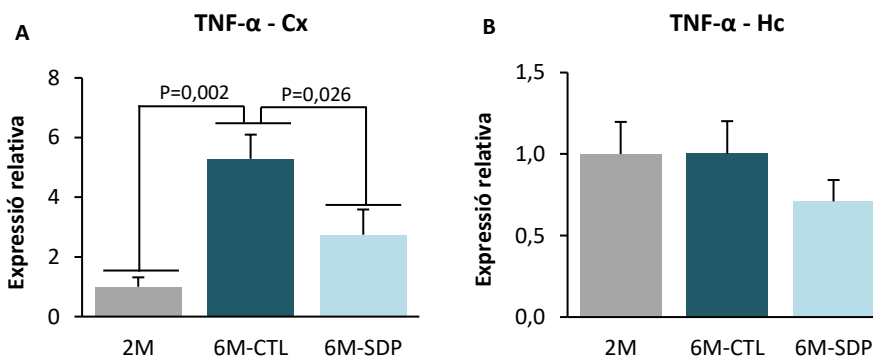
**Figura 4.44.** Expressió de la IL-1 $\beta$  al còrtex (A) i a l'hipocamp (B). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-9$ ). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

L'envelliment incrementa l'expressió de la citocina IL-6 tant al còrtex com a l'hipocamp dels animals senescents en comparació amb els joves ( $P=0,015$  i  $P<0,001$ , respectivament; **Figura 4.45**). Al còrtex, la suplementació dietètica amb SDP prevé l'increment en l'expressió de la IL-6 associat a l'envelliment ( $P=0,027$ ), però no s'observa aquest efecte a l'hipocamp.



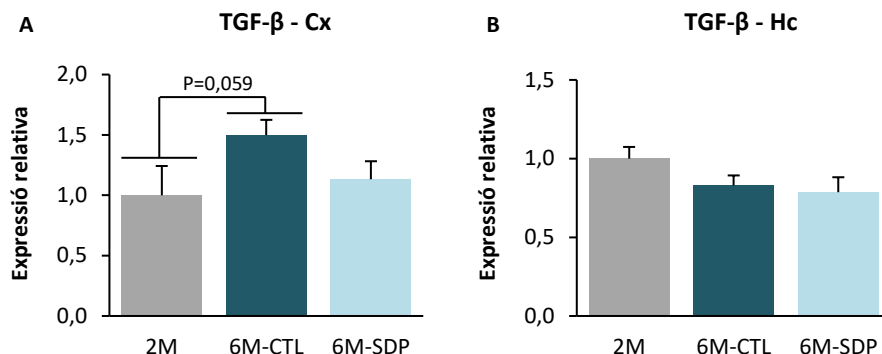
**Figura 4.45. Expressió de la IL-6 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-10). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

Els animals envellits presenten una major expressió de la citocina TNF- $\alpha$  en el teixit cortical respecte els animals joves ( $P=0,002$ ; **Figura 4.46**). La suplementació amb SDP redueix l'efecte de l'envelliment sobre l'expressió d'aquesta citocina ( $P=0,026$ ). En canvi, ni l'envelliment ni la suplementació amb SDP modifica l'expressió d'aquesta citocina a l'hipocamp.



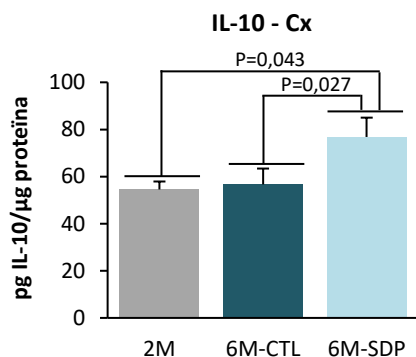
**Figura 4.46. Expressió del TNF- $\alpha$  al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=5-9). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

Al còrtex, l'expressió del TGF- $\beta$  tendeix a incrementar als 6 mesos d'edat respecte el grup de 2 mesos d'edat ( $P=0,059$ ; **Figura 4.47**). La suplementació dietètica amb SDP no modifica la seva expressió respecte el grup de ratolins de 6 mesos d'edat alimentats amb el pinso control. D'altra banda, a l'hipocamp, ni l'edat ni el pinso modifica l'expressió d'aquesta citocina.



**Figura 4.47. Expressió del TGF-β al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-10). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

L'expressió de la IL-10 és indetectable tant al còrtex com a l'hipocamp. L'envelliment no modifica la concentració d'IL-10 al còrtex, però la suplementació amb SDP n'incrementa la seva concentració (P=0,027; **Figura 4.48**).

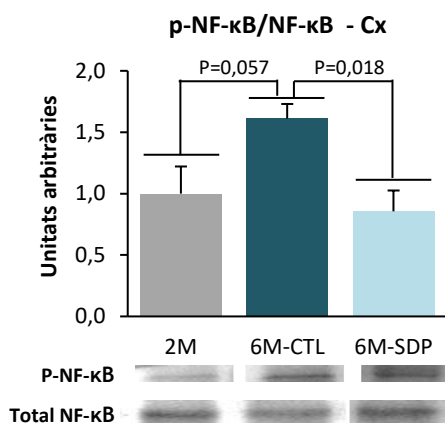


**Figura 4.48. Concentració de la IL-10 al còrtex.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6). Cx: Còrtex.

### 3.3.2. Activació d'NF-κB

L'NF-κB és un factor de transcripció molt important en la via de senyalització proinflamàtoria i s'activa per fosforilació (p-NF-κB). L'abundància proteica de l'NF-κB no es modifica amb la senescència. En canvi, els ratolins de 6 mesos d'edat tendeixen a presentar un increment en l'activació d'aquest factor al còrtex (P=0,057; **Figura 4.49**). La suplementació dietètica amb SDP prevé l'activació d'aquest factor associada a l'envelliment (P=0,018).

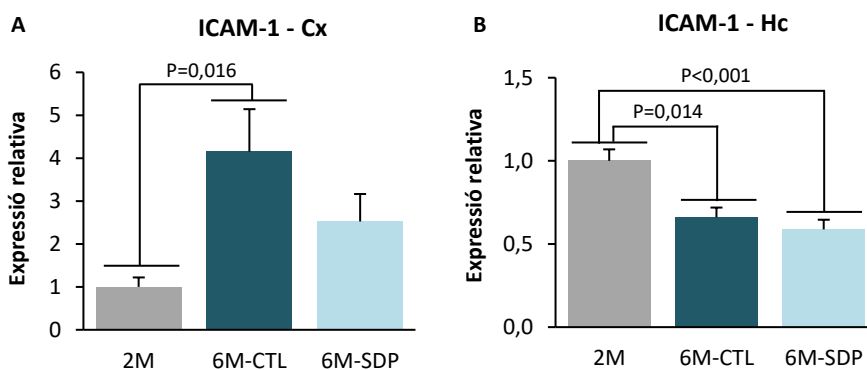




**Figura 4.49. Abundància relativa del p-NF-κB respecte l'NF-κB total al còrtex.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=3-4). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot del p-NF-κB i del NF-κB total. Cx: Còrtex.

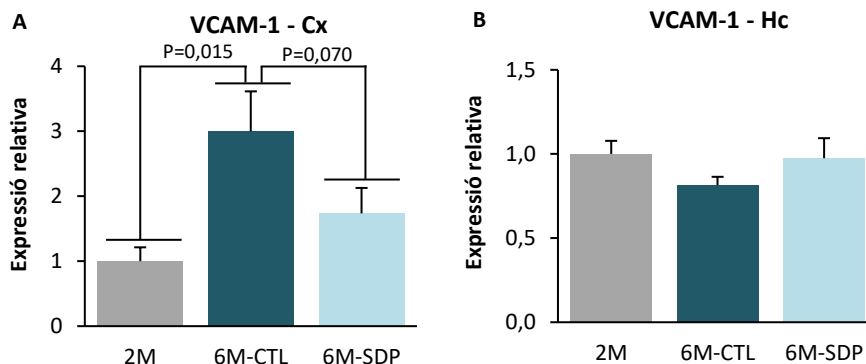
### 3.3.3. Expressió de molècules d'adhesió

Les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1 participen en l'adhesió i reclutament de leucòcits i, per tant, estan molt involucrades en la neuroinflamació. Al còrtex, l'expressió d'ICAM-1 incrementa en els ratolins senescents respecte als ratolins joves (P=0,016; **Figura 4.50**). La suplementació dietètica amb SDP no modifica aquest efecte de l'envelliment. D'altra banda, l'envelliment redueix l'expressió d'aquesta molècula d'adhesió a l'hipocamp, independentment de la dieta consumida (P=0,014 en el grup 6M-CTL i P<0,001 en el grup 6M-SDP).



**Figura 4.50. Expressió d'ICAM-1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-10). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

L'expressió de VCAM-1 també incrementa al còrtex dels ratolins envellits respecte els joves ( $P=0,015$ ; **Figura 4.51**). El consum del pinso SDP tendeix a evitar l'augment d'aquesta molècula d'adhesió ( $P=0,070$ ). A l'hipocamp, en canvi, ni l'envelliment ni la suplementació dietètica amb SDP modifica l'expressió de VCAM-1.



**Figura 4.51. Expressió de VCAM-1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-10$ ). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

### 3.3.4. Relació entre inflamació i memòria a curt termini

Degut al paper que juga la neuroinflamació en el deteriorament cognitiu, s'ha avaluat la correlació existent entre dues citocines proinflamatòries (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i una antiinflamatòria (IL-10) amb l'índex de discriminació del primer test de retenció (memòria a curt termini). Com es pot observar, a la **Figura 4.52** hi ha una clara correlació entre l'expressió de citocines proinflamatòries al còrtex i la pèrdua de memòria a curt termini, com succeeix en el cas de la IL-6 ( $P=0,042$ ) i del TNF- $\alpha$  ( $P=0,066$ ). D'altra banda, una concentració elevada de la citocina IL-10 al còrtex dels ratolins es correlaciona amb la preservació d'aquest tipus de memòria ( $P=0,029$ ).

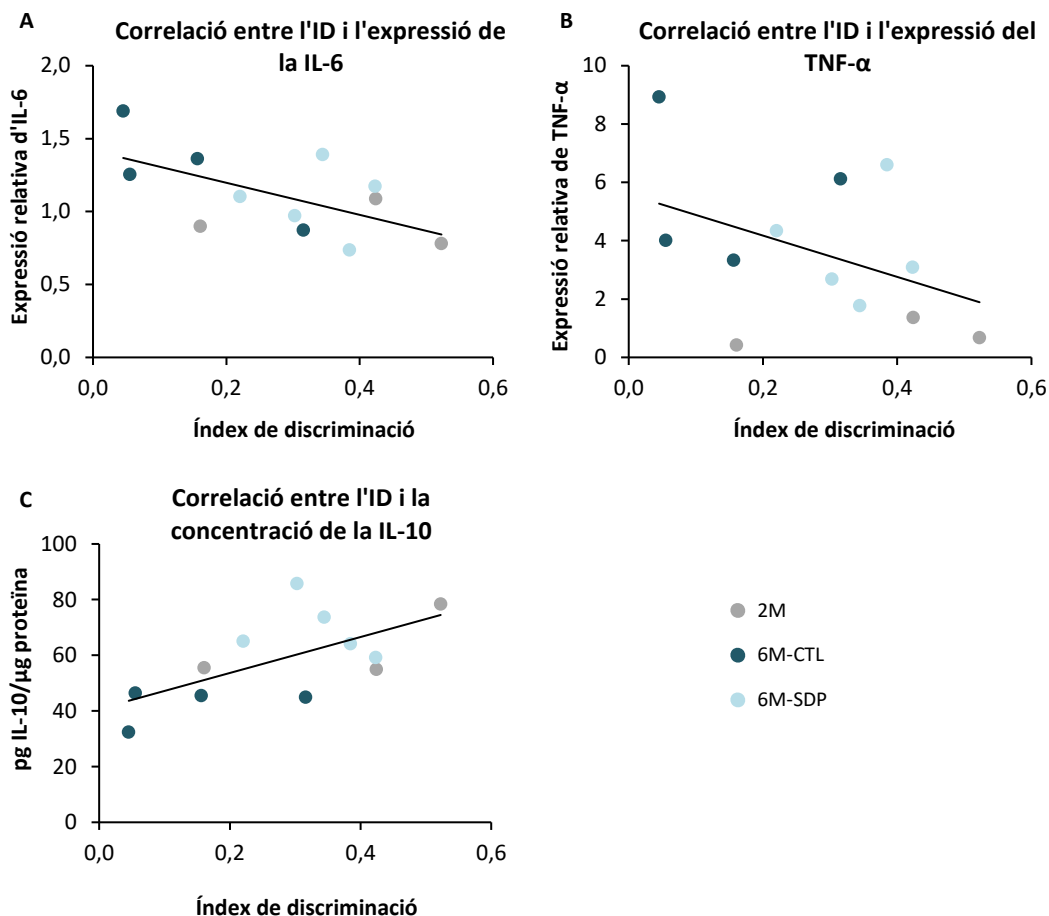


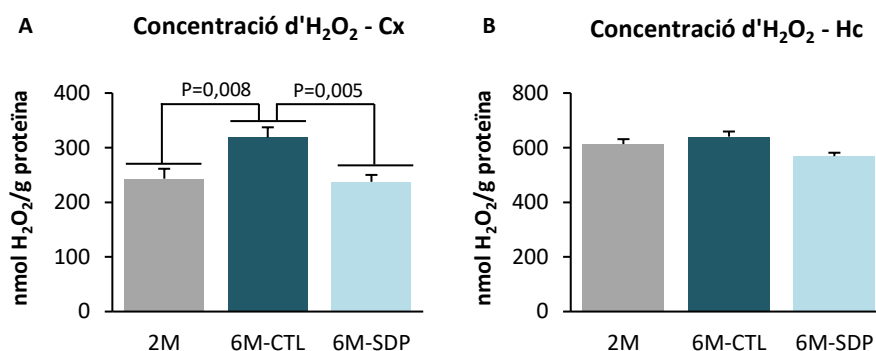
Figura 4.52. Correlació entre l'índex de discriminació del primer test de retenció i l'expressió de la IL-6 (A), del TNF-α (B) i la concentració de la IL-10 (C) al còrtex. Correlació de Pearson P=0,042; P=0,066; P=0,029, respectivament. ID: Índex de discriminació.

### 3.4. ESTRÈS OXIDATIU A CÒRTEX I HIPOCAMP

Durant l'envelliment hi ha un increment de l'estat oxidatiu del teixit, que pot estar implicat en la davallada cognitiva associada a la senescència. Per aquest motiu s'ha determinat la concentració cerebral del peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i la del malondialdehid (MDA) dels ratolins dels diferents grups experimentals. També s'ha estudiat l'expressió d'enzims antioxidants com la catalasa i la superòxid dismutasa (SOD).

### 3.4.1. Concentració d'elements oxidants

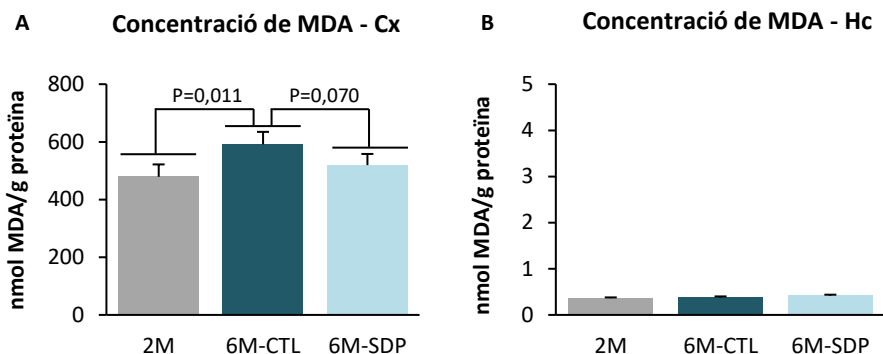
Els ratolins de 6 mesos d'edat presenten una concentració d' $H_2O_2$  al teixit cortical més elevada que els ratolins de 2 mesos d'edat ( $318,7 \pm 18,6$  nmol/g proteïna i  $243,2 \pm 18,17$  nmol/g proteïna; respectivament,  $P=0,008$ ; **Figura 4.53A**). El consum de pinso SDP prevé aquest efecte de l'envelliment ( $P=0,005$ ). D'altra banda, ni l'envelliment ni la suplementació amb SDP modifiquen la concentració d' $H_2O_2$  a l'hipocamp, on tots els grups tenen una concentració similar, propera als 600 nmol/g proteïna (**Figura 4.53B**).



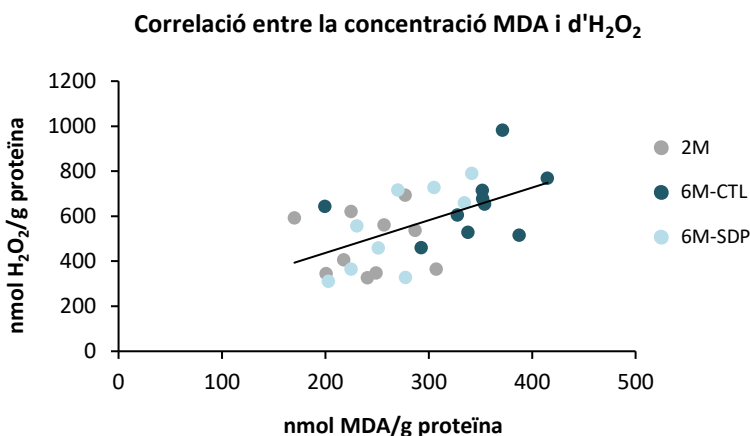
**Figura 4.53. Concentració d' $H_2O_2$  al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-10$ ). Dades representatives de dos experiments diferents. Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

La concentració d'MDA a còrtex augmenta amb l'edat ( $P=0,011$ ; **Figura 4.54A**), el que indica que hi ha una major lipoperoxidació del teixit cortical. La suplementació amb SDP tendeix a atenuar aquest increment associat a l'envelliment ( $P=0,070$ ). En canvi, la concentració de malondialdehid a l'hipocamp és indetectable (**Figura 4.54B**).

L'increment en la peroxidació lipídica cortical durant l'envelliment està associada a un augment de la concentració del  $H_2O_2$ , tal com indica la correlació de Pearson entre les dues variables ( $P=0,0022$ ; **Figura 4.55**).



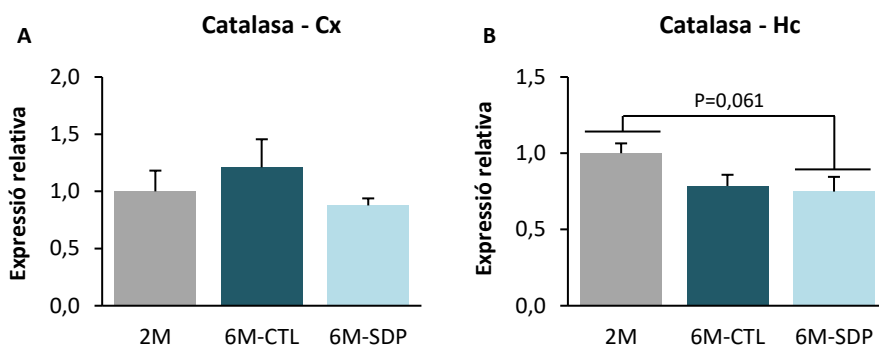
**Figura 4.54. Concentració de malondialdehid al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-13). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp; MDA: malondialdehid.



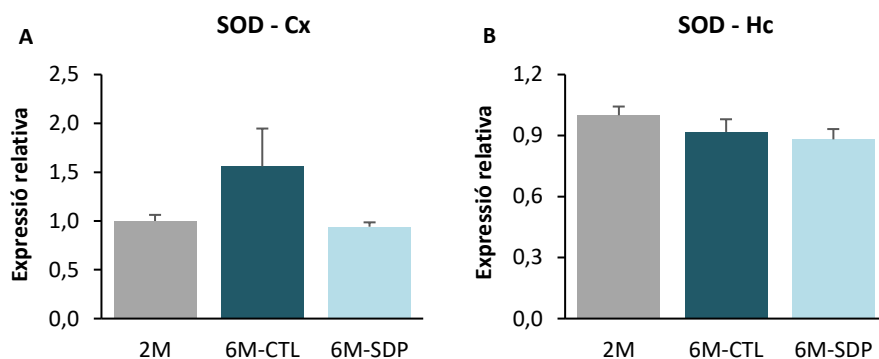
**Figura 4.55. Correlació entre la concentració de malondialdehid i d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al còrtex.** Correlació de Pearson P=0,0022; MDA: malondialdehid.

### 3.4.2. Expressió d'enzims antioxidants

La catalasa i la SOD són dos enzims que converteixen espècies oxidants en altres molècules menys nocives per l'organisme. L'envelliment no modifica l'expressió d'aquests enzims en cap de les àrees estudiades (**Figura 4.56 i 4.57**, respectivament). L'administració del pinso SDP només tendeix a reduir l'expressió de la catalasa a l'hipocamp (P=0,061; **Figura 4.56B**).



**Figura 4.56. Expressió de catalasa al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=5-10). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.



**Figura 4.57. Expressió de superòxid dismutasa al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=4-10). Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp; SOD: superòxid dismutasa.

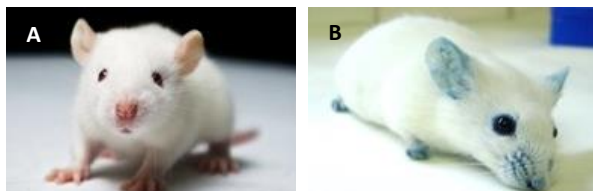
### 3.5. BARRERA HEMATOENCEFÀLICA

La barrera hematoencefàlica protegeix l'encèfal contra agents que puguin alterar l'homeòstasi cerebral, incloent mediadors d'inflamació o productes farmacèutics. Durant l'envelliment, hi ha una davallada de la integritat de la barrera hematoencefàlica i, per tant, incrementa la permeabilitat vascular.

En aquest apartat s'ha estudiat el pas de blau d'Evans (EB; *Evans blue*) com a marcador de la funcionalitat de la barrera hematoencefàlica i l'expressió de proteïnes del complex d'unió.

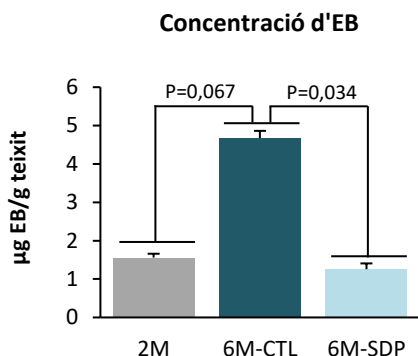
### 3.5.1. Permeabilitat vascular a blau d'Evans

L'EB es distribueix per tot l'organisme donant una coloració blavosa visible a les mucoses. A la **Figura 4.58** es pot veure el ratolí abans de l'administració d'EB i una hora després d'aquesta.



**Figura 4.58.** Ratolí P8 abans de l'administració d'EB (A) i una hora després de l'administració (B).

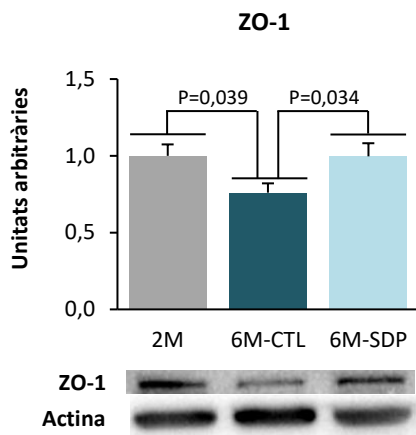
L'envelliment tendeix a incrementar la permeabilitat capil·lar i, per tant, s'acumula més EB al cervell ( $P=0,067$ ; **Figura 4.59**) i el pinso suplementat amb SDP prevé els efectes de l'envelliment sobre aquesta variable ( $P=0,034$ ).



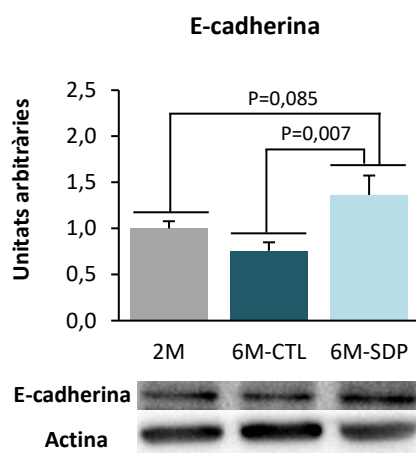
**Figura 4.59.** Concentració d'EB al cervell. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=5-7$ ). EB: Evans blue.

### 3.5.2. Expressió de proteïnes del complex d'unió

Les proteïnes del complex d'unió participen en el manteniment de la integritat de la barrera hematoencefàlica al SNC. L'abundància de ZO-1 i E-cadherina a l'encèfal de ratolins de 6 mesos d'edat és inferior que als de 2 mesos d'edat ( $P=0,039$ , **Figura 4.60A** i  $P=0,085$ , **Figura 4.61A**, respectivament). La suplementació dietètica amb SDP prevé la davallada de la ZO-1 associada a l'envelliment ( $P=0,034$ ) i incrementa l'expressió de l'E-cadherina ( $P=0,007$ ) en aquest teixit.



**Figura 4.60. Abundància relativa de ZO-1 al cervell.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-7). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de la ZO-1 i de l'actina.



**Figura 4.61. Abundància relativa d'E-cadherina al cervell.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=7). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de l'E-cadherina i de l'actina.

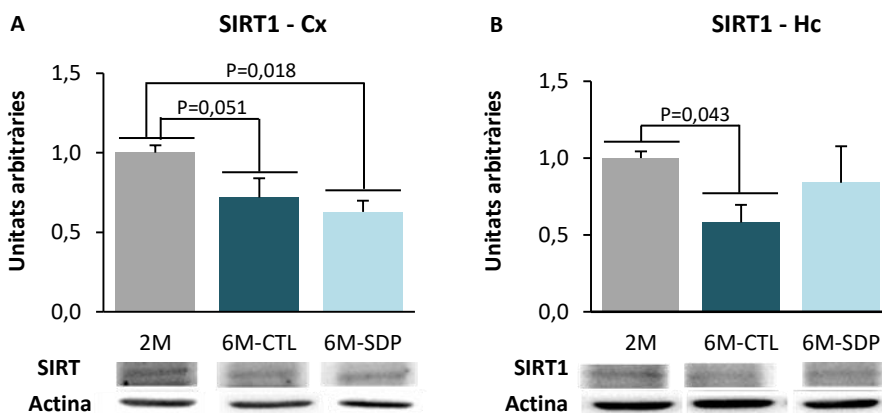
### 3.6. INTEGRITAT NEURONAL

En aquest apartat s'estudia els efectes de l'envelliment sobre diferents proteïnes involucrades en el procés d'envelliment neuronal. Per una banda, la sirtuïna 1 (SIRT1) és un enzim desacetilasa que està implicat en processos *d'inflaminging* a través de la desacetilació de proteïnes com l'NF-κB. D'altra banda, la sinaptofisina és una proteïna de les vesícules sinàptiques utilitzada com a marcador d'abundància de sinapsis. La proteïna β-amiloide està molt implicada en la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer, en la que també hi ha una hiperfosforilació de la proteïna Tau, de manera que es desestabilitza i no pot mantenir units els microtúbuls i, finalment, es desintegren en cabdells neurofibril·lars.



### 3.6.1. Abundància de sirtuïna 1

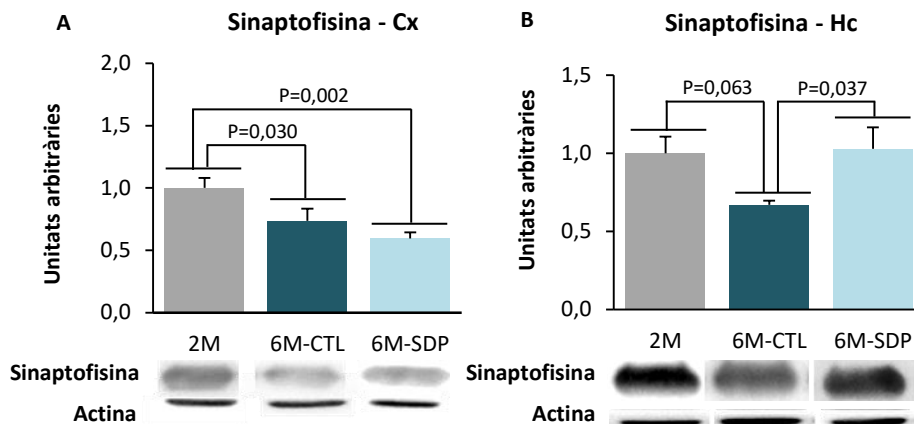
L'abundància relativa de la SIRT1 es troba disminuïda als 6 mesos d'edat, en comparació amb els de 2 mesos d'edat, tant en el còrtex com en l'hipocamp ( $P=0,051$  i  $P=0,043$ , respectivament; **Figura 4.62**). La suplementació dietètica no modifica aquest efecte de l'envelliment sobre la SIRT1 cerebral.



**Figura 4.62. Abundància relativa de sirtuïna 1 al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=6-8$ ). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de la sirtuïna 1 i de l'actina. SIRT1: sirtuïna 1; Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

### 3.6.2. Abundància de sinaptofisina

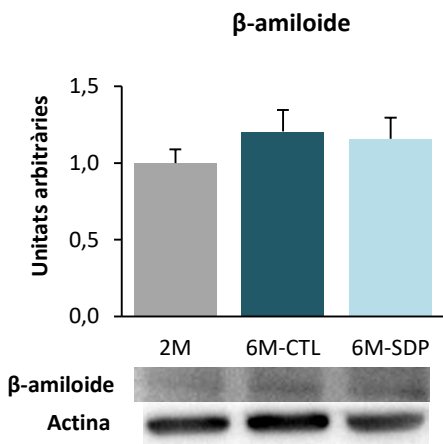
L'abundància relativa de la sinaptofisina disminueix en els ratolins envellits, ( $P=0,030$  i  $P=0,053$  al còrtex i a l'hipocamp, respectivament; **Figura 4.63**). La suplementació dietètica amb SDP exerceix efectes diferents en funció de l'estructura cerebral. Mentre que al còrtex aquesta suplementació dietètica no té cap efecte sobre l'expressió de la sinaptofisina, a l'hipocamp és prevé la seva disminució associada a l'envelliment ( $P=0,037$ ).



**Figura 4.63. Abundància relativa de sinaptofisina al còrtex (A) i a l'hipocamp (B).** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-8). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de la sinaptofisina i de l'actina. Cx: Còrtex; Hc: Hipocamp.

### 3.6.3. Abundància de β-amiloide

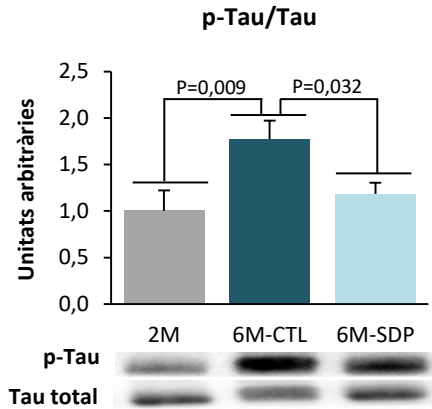
L'abundància relativa de β-amiloide no es modifica als 6 mesos d'edat (6M-CTL) respecte als ratolins joves (**Figura 4.64**). L'SDP tampoc exerceix cap efecte sobre aquesta proteïna.



**Figura 4.64. Abundància relativa de β-amiloide al cervell.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard (n=6-7). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de la β-amiloide i de l'actina.

### 3.6.4. Abundància de Tau fosforilada

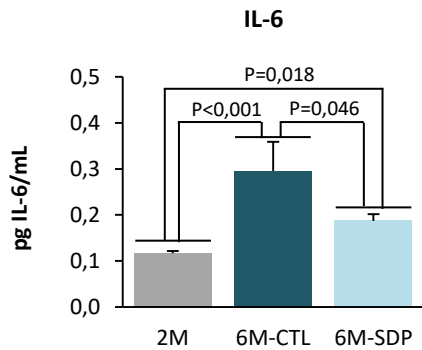
La Tau fosforilada incrementa als 6 mesos d'edat respecte dels ratolins de 2 mesos d'edat ( $P=0,009$ ; **Figura 4.65**). D'altra banda, la suplementació dietètica amb SDP disminueix aquesta fosforilació ( $P=0,032$ ).



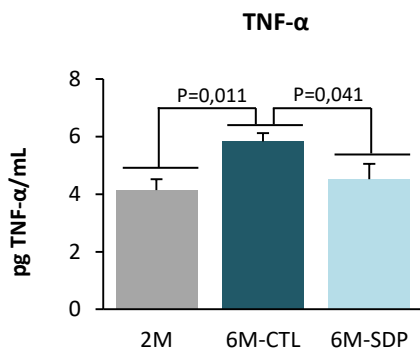
**Figura 4.65. Abundància relativa de p-Tau respecte la Tau total al cervell.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=4-5$ ). A la part inferior de la figura es mostren imatges representatives del Western Blot de la p-Tau i de la Tau total.

### 3.7. CITOCINES PLASMÀTIQUES

Durant l'envelliment, incrementa la concentració plasmàtica de les citocines proinflamatòries IL-6 i TNF- $\alpha$ , assolint concentracions tres vegades superiors als 6 que als 2 mesos d'edat com succeeix en el cas de la IL-6 (**Figura 4.66**). A més, la suplementació dietètica amb SDP redueix aquest increment tant en el cas de la IL-6 ( $P=0,046$ ), com en el cas del TNF- $\alpha$  ( $P=0,041$ ; **Figura 4.67**).

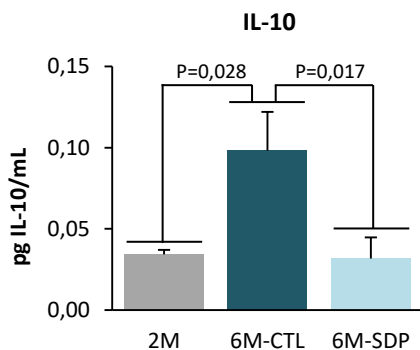


**Figura 4.66. Concentració plasmàtica de la IL-6.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard ( $n=6$ ).



**Figura 4.67. Concentració plasmàtica del TNF- $\alpha$ .** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=6).

Els ratolins P8 envellits presenten un increment de la concentració plasmàtica de la citocina IL-10 (P=0,028, **Figura 4.68**). Els ratolins alimentats amb el pinso d'SDP mostren la meitat d'IL-10 plasmàtica que els ratolins envellits i alimentats amb pinso control (P=0,017).



**Figura 4.68. Concentració plasmàtica de la IL-10.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard (n=4-5).



## V. DISCUSSIÓ

---

---



La senescència es caracteritza per un augment de l'estat inflamatori basal, que contribueix al desenvolupament i progressió de diverses malalties associades a l'envelliment com, per exemple, les malalties cardiovasculars i les alteracions cognitives. Aquest increment de l'estat inflamatori condueix a una davallada de la funcionalitat del sistema immunitari i a una capacitat de resposta reduïda davant d'infeccions i d'agressions externes, que es coneix amb el nom d'immunosenescència (Larbi *et al.*, 2011). A més, aquesta davallada es caracteritza per una inflamació de baixa intensitat sostinguda en el temps, coneguda com *inflammaging* i que cursa amb un augment de la producció de citocines proinflamatòries i d'altres mediadors de la inflamació (Franceschi, 2007; Larbi *et al.*, 2008). La prevenció d'aquest *inflammaging* és de gran importància per evitar l'aparició de malalties associades a l'envelliment, com les cardiovasculars o els trastorns neurodegeneratius (Larbi *et al.*, 2008).

En els darrers anys, s'ha demostrat en models experimentals d'inflamació aguda (Pérez-Bosque *et al.*, 2006, 2008, 2016a) i crònica (Pérez-Bosque *et al.*, 2016b) que la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques d'origen porcí (SDP) millora la funció de barrera de la mucosa intestinal en les etapes inicials del desenvolupament i modula el grau d'activació del teixit limfoide associat a l'intestí.

Aquest estudi s'ha realitzat en ratolins que envelleixen de forma accelerada (SAMP8). Primerament, s'ha caracteritzat el grau d'activació del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) i, posteriorment, s'ha avaluat la capacitat de resposta immunitària intestinal de ratolins senescents i els efectes de l'SDP front a una toxina bacteriana. Finalment, s'ha estudiat els possibles efectes de la suplementació dietètica amb SDP sobre les funcions cognitives en els ratolins SAMP8, ja que la inflamació crònica pot influir en l'aparició de trastorns neurodegeneratius (Barrientos *et al.*, 2012).

#### EFFECTE DE L'ENVELLIMENT SOBRE EL TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A L'INTESTÍ

Així doncs, en el present treball de tesi s'han estudiat els canvis del sistema immunitari associat a l'intestí durant l'envelliment, en ratolins propensos a la senescència accelerada (SAMP8) i en ratolins control (SAMR1); ambdues soques s'utilitzen àmpliament per la recerca sobre l'envelliment (Takeda *et al.*, 2013).

El sistema immunitari és fonamental pel manteniment de l'homeòstasi de l'organisme però es deteriora a mida que envellim, fenomen conegut com a immunosenescència (Larbi *et al.*, 2011). Com a conseqüència, es produeix un increment en la susceptibilitat i



en la severitat de processos infecciosos, autoimmunitaris i cancerígens (Yancik i Ries, 1991; Hirokawa *et al.*, 1992). Per tant, un coneixement més profund de les alteracions que s'esdevenen durant l'envelliment del sistema immunitari permetria dissenyar estratègies d'actuació per endarrerir la immunosenescència i disminuir la incidència de les patologies associades.

Els nostres resultats mostren que als 2 mesos d'edat, la majoria de variables estudiades en els ratolins SAMP8 i SAMR1 tenen valors similars, si bé ja es pot observar una disminució en el recompte de limfòcits tant als ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) com a les plaques de Peyer (PP) en els ratolins SAMP8 respecte els SAMR1. Aquesta diferència augmenta amb l'edat, quan el deteriorament del sistema immunitari és més evident.

Tot i que l'envelliment es relaciona amb disfuncions tant de les cèl·lules B com de les cèl·lules T, aquestes últimes són les més susceptibles a la immunosenescència (Castle, 2000; Globerson i Effros, 2000). Això és degut a que amb l'edat es produeix una involució tímica i s'esdevé un biaix cap a l'augment de les subpoblacions de cèl·lules T efectores i memòria en detriment de les cèl·lules T verges (Pawelec i Larbi, 2008; Weng, 2006). Els nostres resultats mostren que l'envelliment disminueix el percentatge de limfòcits Th als GLM en els ratolins SAMP8 però no succeeix el mateix a les PP. Martinet *et al.* (2014) van observar efectes similars de l'envelliment en ratolins C57BL/6. A més, s'han descrit defectes cel·lulars que influeixen sobre la capacitat de resposta de les cèl·lules T (Larbi *et al.*, 2011), com alteracions de la membrana cel·lular (Larbi *et al.*, 2006), expressió de molècules de la superfície cel·lular implicades en l'activació limfocítica, expressió de receptors de citocines i també alteracions transcripcionals (Chen *et al.*, 2013).

Durant l'envelliment, es produeix una alteració en la producció de citocines, les quals juguen un paper central en la remodelació del sistema immunitari, ja que regulen el creixement i diferenciació dels leucòcits i presenten nombroses activitats biològiques (McNerlan *et al.*, 2002). Diversos estudis han demostrat que, a mida que s'envelleix, hi ha un increment de la producció de citocines proinflamatòries com la IL-6, la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , que promouen una inflamació crònica en els ancians (Bruunsgaard *et al.*, 2003; Ershler i Keller, 2000) i que afavoreixen l'aparició i progressió de malalties degeneratives que sovint acompanyen l'edat avançada (Ponnappan i Ponnappan, 2011). Els nostres resultats mostren que en els ratolins SAMP8 es produeix una inflamació intestinal perllongada de baixa intensitat, que s'evidencia per un increment en

l'expressió de les citocines proinflamatòries IL-6 i TNF- $\alpha$  a la mucosa de jejú a mesura que els ratolins envelleixen i que va acompanyat per un augment del percentatge de limfòcits Th activats.

Les persones d'edat avançada mostren dificultats per resoldre les infeccions degut a la inflamació basal inespecífica que presenten (Nacionales *et al.*, 2015), fet que incrementa la mortalitat (Nacionales *et al.*, 2014; Weng, 2006; Solana *et al.*, 2006). Juntament amb la pèrdua de la capacitat per generar una resposta específica de les cèl·lules T, els limfòcits T reguladors (Treg) són menys eficients inhibint les activitats proinflamatòries d'altres tipus cel·lulars i, per tant, en prevenir l'*inflammaging* (Larbi *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007). Els nostres resultats demostren que el percentatge de limfòcits Treg incrementa als GLM dels ratolins SAMP8 i SAMR1 durant l'envelliment. En aquest sentit, diversos estudis en ratolins Balb/c i C57BL/6 han demostrat una major presència dels limfòcits Treg en els òrgans limfoides d'animals vells en comparació amb animals joves, mentre que el nombre de Treg a la sang es manté inalterat (Zhao *et al.*, 2007; Lages *et al.*, 2008).

#### EFFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ AMB SDP SOBRE EL TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A L'INTESTÍ EN L'ENVELLIMENT

La dieta pot jugar un paper molt important en la prevenció i l'evolució de patologies associades a l'envelliment (Maijó *et al.*, 2014), ja que pot reduir l'*inflammaging* mitjançant canvis epigenètics (Bacalini *et al.*, 2014).

Tal com s'ha comentat anteriorment, durant l'envelliment, els ratolins SAMP8 presenten una inflamació intestinal de baixa intensitat que es manifesta, principalment, per un increment del percentatge de limfòcits activats a les PP i de l'expressió de citocines proinflamatòries a la mucosa de jejú. La suplementació dietètica amb SDP redueix l'augment de l'expressió de les citocines IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  a la mucosa intestinal. Aquest efecte antiinflamatori de l'SDP concorda amb el que s'havia observat anteriorment, tant en un model experimental d'inflamació intestinal aguda induïda per l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB) en rata (Pérez-Bosque *et al.*, 2006) i ratolí (Pérez-Bosque *et al.*, 2016a), com en un model genètic de colitis en ratolí (Pérez-Bosque *et al.*, 2015, 2016b).

El SEB és un superantigen capaç d'activar la resposta immunitària cel·lular mitjançant l'estimulació policlonal de cèl·lules T (Kappler *et al.*, 1989) amb un especial tropisme per

l'intestí (McKay *et al.*, 1998) i, per tant, activa al GALT (Pérez-Bosque *et al.*, 2004, 2008, 2016). L'administració de la toxina provoca un increment en el nombre de limfòcits i el percentatge de limfòcits Th activats en els ratolins SAMP8 joves, tant als GLM com a les PP, fet que indica que el teixit limfoide associat a l'intestí respon a la toxina. A més, es produeix un augment de l'expressió de les citocines proinflamàtores IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  a la mucosa de jejú, així com de la citocina antiinflamàtoira IL-10 als ratolins SAMP8 de 2 mesos. Aquest efecte sobre l'alliberació de citocines proinflamàtores en ratolins joves ha estat descrit per diversos autors (Pérez-Bosque i Moretó, 2010; Krakauer *et al.*, 2010).

Degut a que l'*inflammaging* comporta una dificultat per resoldre les infeccions (Nacionales *et al.*, 2015), els ratolins envellits generen una menor resposta immunitària davant del SEB. En aquests ratolins el nombre de limfòcits, tant als GLM com a les PP, no varia després de l'administració de l'enterotoxina i, a més, no incrementa la sub població de limfòcits Th activats. S'ha observat que en els ratolins de 6 mesos d'edat, l'administració del SEB només incrementa l'expressió del TNF- $\alpha$ , indicant que aquests animals no poden generar una resposta específica contra un agent patogènic.

Els ratolins que han rebut el suplement amb SDP generen una resposta immunitària intestinal contra la toxina, que es manifesta amb un increment del percentatge de limfòcits Th activats i de l'expressió de citocines a la mucosa intestinal. L'efecte de l'SDP pot ser degut a que disminueix l'*inflammaging* i, per tant, al reduir l'activitat basal inespecífica del sistema immunitari intestinal, permet una resposta immunitària eficaç contra el SEB, similar a l'observada en els ratolins joves. Aquest efecte està mediat per un increment en el percentatge de limfòcits Treg i la principal citocina antiinflamàtoira, la IL-10. Aquests resultats immunomoduladors són similars als descrits anteriorment (Pérez-Bosque *et al.*, 2010, 2016).

Tot i que la connexió entre els fenòmens que tenen lloc a la llum intestinal, com a conseqüència de la suplementació amb SDP, i la resposta del GALT encara no és del tot coneguda, hi ha diversos mecanismes mitjançant els quals l'SDP pot modular la resposta immunitària intestinal. Probablement hi estan involucrats pèptids bioactius presents a l'SDP, una disminució de la càrrega antigènica de la llum intestinal i un perfil beneficiós de la microbiota intestinal (Petschow *et al.*, 2015). En aquest sentit, en el tracte intestinal, la microbiota i el GALT mantenen l'homeòstasi (Neish, 2009). L'*inflammaging* pot trencar aquesta condició donant lloc a canvis en la composició del microbioma (Guigoz *et al.*, 2008). L'SDP pot contrarestar la infectivitat de patògens a través de la

reducció de l'adhesió dels patògens a la mucosa intestinal gràcies a les immunoglobulines i glicoproteïnes presents en l'SDP, que poden unir-se a antígens potencials en la llum de l'intestí i impedir la seva adhesió a la mucosa (Van Dijk *et al.*, 2001; Bosi *et al.*, 2004). Aquestes immunoglobulines també poden originar canvis en la microbiota intestinal, augmentant la riquesa de l'ecosistema, com suggereixen Martin-Orúe *et al.* (2008). En aquest sentit, s'ha vist que la suplementació dietètica amb SDP durant 2 mesos disminueix la diversitat d'espècies microbianes en les femtes dels ratolins SAMP8, el que reforça la hipòtesi de que els efectes antiinflamatoris del suplement estarien mediat per canvis en el microbioma intestinal (Moretó *et al.*, 2015). D'altra banda, degut a que l'SDP és una barreja complexa de factors de creixement, citocines i compostos biològicament actius, s'hauria de considerar el paper d'aquestes proteïnes interactuant amb les cèl·lules immunitàries presents a la mucosa, canviant així el perfil de citocines mucosals (Pérez-Bosque i Moretó, 2010).

#### EFFECTE DE L'SDP SOBRE EL TEIXIT CEREBRAL

Una de les característiques de l'envelliment cerebral és l'aparició de deteriorament cognitiu com a conseqüència, en part, d'una inflamació de baixa intensitat perllongada en el temps. Aquesta inflamació crònica contribueix a una major producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que generen dany oxidatiu que s'acumula a lípids, proteïnes i àcids nucleics al llarg de la vida (Butterfield *et al.*, 2006; Haider *et al.*, 2014). Aquestes alteracions desencadenen canvis neuronals que provoquen una pèrdua de les funcions cognitives (Azcoitia *et al.*, 2005). En l'envelliment hi ha una pèrdua de la memòria (Ramis *et al.*, 2013, 2016) i de la capacitat d'aprenentatge (Wilson *et al.*, 2002), dos processos estretament relacionats.

L'increment de l'esperança de vida en els països desenvolupats, ha promogut la recerca per aconseguir noves estratègies per atenuar la pèrdua de memòria (Morrison i Chein, 2011; Shipstead *et al.*, 2010). Diverses investigacions mostren que l'administració continuada de suplementos rics en antioxidants poden tenir efectes antiinflamatoris. La quercetina, les mores o extractes del té verd, poden millorar la memòria i la capacitat d'aprenentatge en rosegadors vells (Shukitt-Hale *et al.*, 2009; Blaylock i Maroon, 2012).

La soca de ratolins SAMP8 presenta un deteriorament cognitiu progressiu (Shih *et al.*, 2010), que els fa molt útils per estudiar trastorns neurodegeneratius. En les nostres condicions, els ratolins SAMP8 envellits interaccionen menys amb els objectes, ja que als 6 mesos d'edat es redueix el temps d'exploració. A més, els ratolins SAMP8 de 4 i 6

mesos han discriminat menys entre l'objecte nou i l'objecte vell (al 1r i 2on test de retenció), que indica que als 4 mesos d'edat ja hi ha una davallada de la memòria a curt i a llarg termini. Els resultats d'aquest test estan molt influïts per les lesions de l'hipocamp i de l'escorça cerebral (Buckmaster *et al.*, 2004, Aggleton *et al.*, 2010).

A més, s'ha estudiat la capacitat d'aprenentatge i la memòria espacial mitjançant el laberint d'aigua de Morris (MWM; Morris water maze). En l'envelliment hi ha una disminució de la capacitat d'aprenentatge, com indica el fet de que els ratolins de 6 mesos d'edat triguin més temps a trobar la plataforma que els ratolins joves. A més, hem observat que els ratolins SAMP8 de 2 mesos d'edat presenten certa pèrdua de la memòria espacial, ja que després de 6 dies d'aprenentatge no són capaços de recordar on estava situada la plataforma.

La suplementació dietètica amb SDP a partir dels 2 mesos d'edat prevé la pèrdua de memòria a curt i llarg termini en els ratolins senescents i, en canvi, no promou una millora en la memòria espacial ni en la capacitat d'aprenentatge. Altres suplementacions dietètiques amb caràcter antiinflamatori iniciades en edats més primerenques sí que presenten un efecte beneficiós sobre la memòria espacial. Concretament, Palomera-Avalós *et al.* (2016) han vist que la suplementació dietètica amb resveratrol des de les 6 fins a les 14 setmanes d'edat prevé el deteriorament de la memòria espacial i de la memòria a curt termini en ratolins SAMP8 als quals s'ha induït estrès metabòlic. D'altra banda, un estudi de Nakai *et al.* (2016) ha mostrat que els ratolins SAMP8 de 3 mesos d'edat, alimentats durant un mes amb un suplement de gingebre conserven una memòria espacial similar a la dels ratolins SAMR1, fet que està correlacionat amb l'increment de la neurogènesi a l'hipocamp dels ratolins SAMP8. L'administració d'altres suplementes amb efectes antiinflamatoris, com el ginseng vermell, també prevé la pèrdua de la memòria a llarg termini i la memòria espacial en ratolins C57BL/6 envellits (Lee i Oh, 2015).

Les alteracions cognitives que es desenvolupen durant l'envelliment i que poden donar lloc a malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer (Liu i Chan, 2014), l'esquizofrènia (Wonodi i Schwarcz, 2010), la malaltia de Parkinson o l'esclerosi múltiple (Simi *et al.*, 2007; Van Eldik *et al.*, 2007) són degudes en gran part a una inflamació crònica de baixa intensitat (Barrientos *et al.*, 2012). La neuroinflamació és un mecanisme de defensa que protegeix el sistema nerviós central (SNC) d'infeccions (Spencer *et al.*, 2012). Quan es produeix un desequilibri de la resposta inflamatòria, la neuroinflamació es converteix en un procés perjudicial per l'organisme que, fins i tot, pot generar mort neuronal

(Mawhinney *et al.*, 2011). La neuroinflamació associada a l'envelliment pot ser conseqüència de múltiples causes, com la disminució de la resposta immunitària innata i adaptativa front a patògens (que resulta en una cronificació de la infecció), cèl·lules alterades o la secreció de citocines proinflamàtòries per part de les cèl·lules senescentes (Deeks, 2011; Salminen *et al.*, 2008a, 2008b). Aquestes alteracions activen diverses vies de senyalització proinflamàtòries, com la via del NF- $\kappa$ B o la del complex multiproteic anomenat inflamàsoma que promou l'activació de la IL-1 $\beta$  (Spencer *et al.*, 2012). El factor NF- $\kappa$ B és una de les vies de senyalització més importants en la inflamació ja que estimula la transcripció de gens proinflamatoris i, per tant, perpetua la inflamació (Salminen *et al.*, 2008a, 2008b). A l'encèfal, l'NF- $\kappa$ B s'expressa tant en neurones com en cèl·lules de la glia i afecta la plasticitat sinàptica i la memòria (Williams *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2006). La inhibició farmacològica d'NF- $\kappa$ B redueix la inflamació característica de l'envelliment, fenomen que també s'ha observat en models *knock out* de la senyalització d'NF- $\kappa$ B (Osorio *et al.*, 2012; Tilstra *et al.*, 2012). Generalment, les citocines proinflamàtòries contribueixen directament a la degeneració neuronal, indueixen l'apoptosi de neurones i cèl·lules gials, incrementen la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica i promouen la migració de cèl·lules del sistema immunitari perifèric al SNC (Smith *et al.*, 2012). A més, les citocines proinflamàtòries incrementen la producció de ROS i òxid nítric, que són factors tòxics per les neurones (Hsieh i Yang, 2013). Entre les citocines proinflamàtòries, el TNF- $\alpha$  és la citocina neuroinflamàtòria més important, ja que és un potent activador de les cèl·lules del sistema immunitari. En la inflamació crònica hi ha concentracions elevades de TNF- $\alpha$  en el teixit cerebral, que s'associen a malalties neurodegeneratives (Sochocka *et al.*, 2016).

Al considerar-se la neuroinflamació com un factor clau en el procés d'envelliment cerebral moltes estratègies per prevenir l'envelliment estan orientades cap a l'atenuació de l'activació immunitària basal inespecífica. En les nostres condicions, els ratolins SAMP8 envellits mostren un increment en l'expressió de les citocines proinflamàtòries IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  al teixit cerebral, així com un augment en l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B al còrtex. A més, els ratolins SAMP8 de 6 mesos d'edat també presenten un increment de la concentració plasmàtica de les citocines IL-6 i TNF- $\alpha$ , que podrien estar potenciant la inflamació cerebral. En les nostres condicions, l'SDP atenua l'estat de neuroinflamació associat a l'envelliment ja que, a més de reduir l'activació del factor NF- $\kappa$ B, també disminueix l'expressió d'IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ , tant al còrtex com a la sang, tal i com també succeeix a l'intestí dels ratolins envellits. Lee i Oh (2015) han demostrat l'eficàcia de la suplementació dietètica amb ginseng vermell per

reduir l'abundància de citocines proinflamatòries en ratolins C57BL/6 de 20 mesos d'edat. A més, ratolins suplementats amb resveratrol presentaven una capacitat de memòria superior que la dels ratolins que no havien rebut el suplement, que estaria correlacionat amb una menor producció de citocines proinflamatòries (Lee i Oh, 2015). En aquest sentit, els nostres resultats mostren que la major expressió de les citocines IL-6 i TNF- $\alpha$  es correlaciona amb índexs de discriminació més baixos en el primer test de retenció del NORT. Aquest fet indica que la neuroinflamació redueix la memòria a curt termini i que els efectes de l'SDP observats en el manteniment de la memòria poden ser deguts al seu efecte antiinflamatori.

A l'encèfal, el TGF- $\beta$  afavoreix la supervivència cel·lular, és neuroprotector i redueix l'activació de la microglia i de la producció de ROS per part d'aquesta (Dhandapani i Brann, 2003; Abutbul *et al.*, 2012). D'altra banda, s'ha descrit un augment del TGF- $\beta$  cerebral en individus d'edats avançades (Werry *et al.*, 2010). Aquest increment del TGF- $\beta$  cerebral no s'acompanya dels seus efectes protectors ja que, durant l'envelliment, disminueix la sensibilització de la cascada de senyalització d'Smad3 a causa de l'augment dels processos inflamatoris i aquests esdevenen més oxidatius i citotòxics (Tichauer *et al.*, 2014; Schmierer i Hill, 2007). En les nostres condicions, hem observat un increment de TGF- $\beta$  en el còrtex dels ratolins SAMP8 de 6 mesos d'edat. La suplementació dietètica amb SDP redueix aquest increment de TGF- $\beta$  associat a la senescència de manera que es manté una expressió d'aquesta citocina similar a la dels ratolins joves.

En la inflamació també intervenen molècules d'adhesió, com les molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM) i les d'adhesió de cèl·lules vasculars (VCAM), que actuen com a lligands dels leucòcits. Quan s'expressen en les cèl·lules endotelials cerebrals, estimulen la migració leucocitària al SNC (Kim *et al.*, 2004). Durant l'envelliment, augmenta l'expressió d'aquestes molècules d'adhesió, així com en malalties neuronals com l'encefalomielitis autoimmunitària (Seo *et al.*, 2015). En els ratolins SAMP8 envellits incrementa l'expressió d'ICAM-1 i de VCAM-1 al teixit cortical. La suplementació dietètica amb SDP atenua aquest augment, que podria ser degut a la disminució del TNF- $\alpha$  que s'esdevé en els ratolins que han rebut el suplement. Aquest mecanisme d'acció el presenten altres suplementes dietètics amb propietats antiinflamatòries, com els extractes de la fulla de ginkgo, que redueix l'expressió de TNF- $\alpha$  que, al seu torn, comporta una menor activació del factor NF- $\kappa$ B i una reducció de l'expressió de VCAM-1 i ICAM-1 (Chen *et al.*, 2003).

La suplementació amb SDP incrementa la concentració de la citocina antiinflamatòria IL-10 al còrtex. Aquesta citocina suprimeix gens que indueixen la resposta proinflamatòria (Murray, 2006), promou la supervivència neuronal i d'altres tipus cel·lulars a través de l'activació de proteïnes antiapoptòtiques i incrementa l'expressió de les proteïnes del complex d'unió de la barrera hematoencefàlica (BHE) (Sochocka *et al.*, 2016). Pérez *et al.* (2017) han observat que la IL-10 incrementa a l'hipocamp de ratolins envellits després d'una suplementació dietètica continuada rica en quercetina i àcid docosahexaenoic (DHA) i que, aquests animals, milloren la memòria i l'aprenentatge. A més, la suplementació amb EPA/DHA incrementa l'expressió d'IL-10 que s'acompanya amb una reducció d'IL-6, IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$  (Monk *et al.*, 2016). Aquests estudis indiquen que la disminució de la resposta proinflamatòria podria ser la base de la millora cognitiva. A més, els nostres resultats mostren que una major concentració d'IL-10 cortical es correlaciona amb índexs de discriminació més elevats en el primer test de retenció del NORT.

La BHE limita i regula l'intercanvi de substàncies entre la sang i el parènquima cerebral i la seva integritat és imprescindible per al manteniment de l'homeòstasi del SNC. En l'envelliment, s'ha descrit una alteració de la permeabilitat, acompanyada d'una disminució de l'expressió de les proteïnes del complex d'unió (Elahy *et al.*, 2015; Enciu *et al.*, 2013). A més, la majoria de malalties que comporten alteracions del SNC com l'encefalitis, la meningitis (Tunkel i Scheld, 1993) o l'esclerosi múltiple (Moor *et al.*, 1994) cursen amb pèrdua de la BHE i poden ser causades per un increment en l'estat inflamatori típic de l'envelliment. S'ha vist que l'activació de la micròglia i l'expressió de citocines proinflamatòries, com el TNF- $\alpha$ , produeixen un increment de la permeabilitat vascular cerebral (Sumi *et al.*, 2010; Nishioku *et al.*, 2010). En les nostres condicions, els ratolins envellits mostren una major permeabilitat de la BHE que es correlaciona amb una reducció de l'abundància proteica de la ZO-1. La suplementació amb SDP prevé l'efecte de l'envelliment sobre la BHE, que protegiria el teixit cerebral de la possible arribada d'agents nocius i per tant contribuiria a preservar la integritat neuronal. Aquests efectes podrien ser deguts a la disminució de l'estat inflamatori dels ratolins que han rebut la suplementació dietètica ja que, com s'ha comentat, l'expressió de TNF- $\alpha$  o NF- $\kappa$ B redueixen l'expressió de proteïnes del complex d'unió de la BHE, mentre que la citocina o la IL-10 incrementaria l'expressió d'aquestes. Estudis dels efectes de l'SDP sobre l'intestí de rosegadors mostren que la suplementació dietètica té efectes anàlegs sobre la barrera epitelial durant de processos inflamatoris (Pérez-Bosque *et al.*, 2016a).



La neuroinflamació també s'associa a una producció excessiva de ROS (Fischer i Maier, 2015). Els rosegadors envellits mostren déficits de memòria com a conseqüència de l'estrès oxidatiu (Godbout *et al.*, 2005). Durant l'envelliment es produeix un desequilibri entre la generació de ROS i la seva eliminació a través de molècules antioxidants (Johnson *et al.*, 1999; Rikans i Hornbrook, 1997). L'encèfal és un dels òrgans més susceptibles a l'estrès oxidatiu degut al seu alt contingut en àcids grassos poliinsaturats, l'elevat consum d'oxigen i una activitat reduïda dels enzims antioxidants superòxid-dismutasa (SOD), que redueix l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen; i la catalasa i la glutatió peroxidasa, que redueixen el peròxid d'hidrogen a aigua mitjançant dos mecanismes diferents (Halliwell, 1989).

Els nostres resultats mostren que els ratolins SAMP8 senescents presenten un increment de l'estrès oxidatiu al SNC. La concentració de peròxid d'hidrogen i de malondialdehid, un dels productes finals de la peroxidació lipídica (Venkataraman *et al.*, 2013), és més elevada al còrtex dels ratolins envellits respecte els ratolins joves. En canvi, l'expressió dels enzims antioxidants SOD i catalasa no es modifica amb l'edat, com ja s'havia descrit en altres estudis (Pallàs, 2012). En aquest sentit, la dieta amb SDP redueix la formació tant del peròxid d'hidrogen com de malondialdehid, però no modifica l'expressió d'enzims antioxidants. Diversos estudis han demostrat la relació existent entre la inflamació i l'aparició d'estrès oxidatiu (Hsieh i Yang, 2013). Així, gran varietat de marcadors proinflamatoris, com citocines proinflamatòries, pèptids bacterians o infeccions virals incrementen la concentració de ROS, de manera que augmenten l'estrès oxidatiu (Hsieh i Yang, 2013). Per tant, la reducció de la concentració d'espècies oxidants en els ratolins que han rebut la suplementació dietètica amb SDP podria ser deguda a que aquest suplement disminueix l'estat inflamatori i, com a conseqüència, es redueix la producció de substàncies oxidants.

En les nostres condicions, els ratolins SAMP8 senescents tenen una menor abundància de la SIRT1, tant al còrtex com a l'hipocamp, de forma similar al que observem en l'envelliment humà (Shimida i Hasegawa-Ishii, 2011). Aquestes observacions són importants ja que, en els últims anys, diversos estudis han considerat que la davallada en l'expressió de la SIRT1, o la inhibició de la seva activitat, podria contribuir a l'envelliment i a la inflamació, amb conseqüències negatives sobre l'aprenentatge i la memòria (Qin *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2012) i afavorint el desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Herskovist i Guarente, 2013, 2014). La suplementació dietètica amb SDP no atenua la disminució de la SIRT1, que indicaria que l'efecte beneficiós de l'SDP sobre la memòria no estaria utilitzant aquesta via de senyalització.

En canvi, s'ha vist que dietes clarament antioxidants, com les suplementades amb vitamina E, afavoreixen la recuperació dels nivells de SIRT1 en teixit cerebral (Wu i Gómez-Pinilla, 2006).

La plasticitat sinàptica juga un paper important en l'aprenentatge i la memòria així com en la prevenció de l'aparició i progressió de neurodegeneratives (Cao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2008; Pilato *et al.*, 2012). Les sinapsis són responsables de la consolidació de la memòria i disminueixen durant l'envelliment (Che *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). La sinaptofisina és la proteïna transmembrana més abundant a les vesícules presinàptiques i s'utilitza àmpliament com a marcador de la sinaptogènesi (Kwon i Chapman, 2011). Els nostres resultats mostren que l'envelliment redueix l'abundància d'aquesta proteïna tant al còrtex com a l'hipocamp dels ratolins SAMP8, de forma similar a l'observat per Del Valle *et al.* (2012). L'SDP prevé la disminució de la sinaptofisina a l'hipocamp de ratolins envellits i podria explicar la preservació de la memòria dels ratolins SAMP8 alimentats amb el pinso suplementat.

Les plaques amiloides, formades per dipòsits de la proteïna  $\beta$ -amiloide, i els cabdells neurofibril·lars originats per la fosforilació de la proteïna Tau, són les principals característiques patològiques de la malaltia d'Alzheimer (Zhang *et al.*, 2016). A més, s'ha descrit que la reducció cerebral de  $\beta$ -amiloide i de la fosforilació de Tau millora l'aprenentatge i la memòria en els ratolins SAMP8 vells (Dobarro *et al.*, 2013). En les nostres condicions, els ratolins SAMP8 no presenten canvis en l'abundància proteica de  $\beta$ -amiloide entre els 2 i els 6 mesos d'edat. De fet, un gran nombre d'estudis on s'analitza l'expressió de  $\beta$ -amiloide utilitzen ratolins SAMP8 d'una edat superior als 8 mesos (Zhang *et al.*, 2016; Katayama *et al.*, 2016), quan els canvis en aquesta proteïna són més fàcilment detectables.

Tau és una proteïna associada als microtúbuls, que s'expressa principalment en les neurones i la funció principal de la qual és la d'estabilitzar el citoesquelet neuronal (Imahori i Uchida, 1997; Tajés *et al.*, 2008). S'ha descrit que la proteïna Tau fosforilada pot conduir a la desestabilització de microtúbuls, a l'alteració axonal i, fins i tot, a la mort neuronal (Arriagada *et al.*, 1992). Els nostres resultats mostren que la fosforilació de Tau incrementa en els ratolins de 6 mesos d'edat respecte els ratolins joves i que aquesta hiperfosforilació disminueix amb la suplementació dietètica amb SDP, que es podria considerar com un efecte neuroprotector. S'ha observat que la inflamació indueix tant l'expressió de  $\beta$ -amiloide com la fosforilació de Tau en models animals (Zilka *et al.*, 2012). Concretament, Li *et al.* (2003) van demostrar que la secreció de la

citocina proinflamàtoria IL-1 $\beta$  incrementa la fosforilació de Tau a través de l'activació de la MAPK. A més, l'expressió perllongada de TNF- $\alpha$  també afavoreix la formació de cabdells neurofibril·lars (Janelins *et al.*, 2008). Així, l'efecte de l'SDP sobre la proteïna Tau podria ser conseqüència del paper antiinflamatori del suplement. A més, la disminució de la fosforilació de Tau influeix en el manteniment de les funcions cognitives, ja que s'ha vist que els cabdells neurofibril·lars formats per la hiperfosforilació de Tau estan estretament correlacionats amb la pèrdua de memòria en la malaltia d'Alzheimer (Imahori i Uchida, 1997). Així doncs, la inhibició de la hiperfosforilació de tau podria ser una diana terapèutica per la prevenció de la malaltia d'Alzheimer.

En resum, durant l'envelliment hi ha una inflamació crònica de baixa intensitat coneguda com *inflammaging*, que comporta una activació immunitària inespecífica que redueix la capacitat de resposta front microorganismes i que pot generar trastorns cognitius. En els ratolins senescents, la suplementació dietètica amb SDP atenua l'activació basal inespecífica del GALT, que es tradueix, mitjançant la connexió entre l'intestí i el cervell, en una reducció de les alteracions cognitives associades a l'envelliment. A més, els animals senescents que han rebut la suplementació amb SDP presenten una menor neuroinflamació i preserven la funcionalitat de la barrera hematoencefàlica i una major capacitat de memòria. Per tant, podríem dir que la suplementació amb SDP té propietats neuroprotectores. En conseqüència, la suplementació dietètica SDP pot ser una nova estratègia dietètica en la prevenció de les alteracions cognitives associades a l'envelliment, tot i que caldria aprofundir més en els possibles mecanismes d'acció implicats.

## **VI. CONCLUSIONS**

---

---



De l'estudi sobre els efectes de l'envelliment i de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques d'origen porcí (SDP) sobre el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) es pot concloure que:

- ✓ Els ratolins SAMR1 i SAMP8 de 2 mesos d'edat presenten un grau d'activació inespecífica del GALT similar; mentre que els ratolins SAMP8 de 6 mesos d'edat l'activació inespecífica està augmentada respecte els ratolins SAMR1. Això indicaria que els ratolins SAMP8 de 6 mesos mostren l'*inflammaging* propi d'edats avançades.
- ✓ La suplementació dietètica amb SDP durant 4 mesos dels ratolins senescents redueix la inflamació associada a l'envelliment o *inflammaging* sobre el GALT.
- ✓ Els ratolins envellits no són capaços de generar una resposta immunitària intestinal específica davant de l'administració de l'enterotoxina B d'*S. aureus*. La suplementació dietètica amb SDP preserva la resposta immunitària específica intestinal en els animals senescents.

De l'anàlisi dels efectes de l'envelliment i de la suplementació dietètica amb SDP sobre les alteracions estructurals i funcionals del sistema nerviós central es pot concloure que:

- ✓ En els ratolins SAMP8, l'envelliment es caracteritza per una pèrdua de la capacitat cognitiva. La suplementació dietètica amb SDP atenua la pèrdua de memòria a curt i llarg termini associada a l'envelliment, però no millora la capacitat d'aprenentatge.
- ✓ Els ratolins SAMP8 de 6 mesos d'edat presenten una major expressió de mediadors proinflamatoris tant al còrtex com a l'hipocamp (neuroinflamació). La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques redueix la neuroinflamació associada a l'envelliment a través de l'increment de la concentració de la citocina antiinflamatòria IL-10 al teixit cerebral.
- ✓ Als ratolins SAMP8, l'envelliment va acompanyat d'un increment de l'estat oxidatiu cerebral. La suplementació amb SDP limita la formació d'agents oxidants sense modificar l'expressió d'enzims antioxidants, fet que podria ser conseqüència d'un menor grau d'inflamació basal.

- ✓ Durant l'envelliment augmenta la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, fet que afavoreix l'exposició del teixit cerebral a substàncies potencialment nocives. La suplementació dietètica amb SDP manté l'expressió de les proteïnes dels complexos d'unió de l'endoteli capil·lar i la funcionalitat de la barrera hematoencefàlica. D'aquesta forma promou la integritat del teixit cerebral.
- ✓ En els ratolins SAMP8 envellits, s'observa un augment de l'abundància de la proteïna Tau fosforilada, fenomen que està relacionat amb l'aparició de trastorns cognitius. La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques redueix la fosforilació de la proteïna Tau durant l'envelliment; aquesta observació suggereix que el suplement emprat en aquest estudi podria tenir propietats neuroprotectores.
- ✓ La concentració plasmàtica de citocines, tant proinflamatòries com antiinflamatòries, augmenta durant l'envelliment, observació compatible amb l'activació immunitària basal i inespecífica característica d'aquesta etapa. La suplementació amb SDP prevé l'efecte de l'envelliment sobre aquestes variables, compatible amb els efectes antiinflamatoris descrits per aquest tipus de suplementos.

**En resum, l'envelliment s'acompanya d'una activació immunitària basal inespecífica, que comporta una menor capacitat de resposta immunitària efectiva contra microorganismes. Aquesta activació immunitària es manifesta amb un augment de l'expressió de mediadors inflamatoris i a una possible predisposició a patir trastorns cognitius.**

**Aquest treball ha demostrat que la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques és capaç de reduir la inflamació de baixa intensitat pròpia de l'envelliment i prevé, en part, el deteriorament cognitiu dels animals senescents.**

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

---

---





**A**

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Anticuerpos y antígenos. A: Inmunología Celular y Molecular. 6ª edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 2008, pp: 75-98.

Abutbul S, Shapiro J, Szaingurten-Solodkin I, Levy N, Carmy Y, Baron R, Jung S, Monsonego A. TGF-beta signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. *Glia*. 60: 1160-1171, 2012.

Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 18: 387-404, 2004.

Aggleton JP, Albasser MM, Aggleton DJ, Poirier GL, Pearce JM. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neurosci*. 124: 55-68, 2010.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 7915-7922, 1993.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 42: 631-639, 1992.

Azcoitia I, Perez-Martin M, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Garcia-Segura L, Tresguerres J. Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 26: 697-703, 2005.

**B**

Bacalini MG, Friso S, Olivieri F, Pirazzini C, Giuliani C, Capri M, Santoro A, Franceschi C, Garagnani P. Present and future of anti-ageing epigenetic diets. *Mech Ageing Dev*. 136-137: 101-115, 2014.

Baddeley A. Working Memory. *Science*. 255: 556-559, 1992.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 16: 1-13, 2004.

Barrientos R, Frank M, Watkins L, Maier S. Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: Implications for hippocampal-dependent cognition. *Horm Behav*. 62: 219-227, 2012.

Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*. 61: 1315-1322, 2012.

Beracochea D, Krazem A, Henkouss N, Haccard G, Roller M, Fromentin E. Intake of wild blueberry powder improves episodic-like and working memory during normal aging in mice. *Planta Med*. 82: 1163-1168, 2016.

Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, Alperovitch A. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillessement Artériel. *J Am Geriatr Soc*. 48: 1285-1291, 2000.

Bhandari SK, Xu B, Nyachoti CM, Giesting DW, Krause DO. Evaluation of alternatives to antibiotics using an Escherichia coli K88+ model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J Anim Sci*. 86: 836-847, 2008.

Bischoff SC. Microbiota and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 19: 26-30, 2016.

Bishop N, Lu T, Yankner B. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464: 529-535, 2010.

Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 3: 640-649, 2007.

Blaylock R, Maroon J. Natural plant products and extracts that reduce immunoexcitotoxicity-associated neurodegeneration and promote repair within the central nervous system. *Surg Neurol Int*. 3: 19, 2012.

Blennow K, Wallin A, Fredman P, Karlsson I, Gottfries CG, Svennerholm L. Blood-brain barrier disturbance in patients with Alzheimer's disease is related to vascular factors. *Acta neurol Scand*. 81: 323-326, 1990.

Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6: 298-305, 2005.

Borg BS, Campbell JM, Russel LE, Rodríguez C, Ródenas J. Evaluation of the chemical and biological characteristics of spray-dried plasma protein collected from various locations around the world. *Am Assoc Swine Vet*. 97-100, 2002.

Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Trevisi P, Nobili F, Mengheri E. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci.* 82: 1764-1772, 2004.

Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* 34: 129-136, 2013.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.

Brandzaeg P, Pabst R. Let's go mucosa; communication on slippery ground. *Trends Immunol.* 25: 570-577, 2004.

Brandzaeg P. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci.* 964: 13-45, 2002.

Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg JB, Pedersen BK, Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med.* 115: 278-283, 2003.

Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci.* 24: 9811-9825, 2004.

Burke S, Barnes C. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 7: 30-40, 2006.

Butterfield D, Abdul H, Newman S, Reed T. Redox Proteomics in Some Age-Related Neurodegenerative Disorders or Models Thereof. *NeuroRx.* 3: 344-357, 2006.

## C

Calder PC. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson Lecture: fatty acids and inflammation from the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. *Clin Nutr.* 29: 5-12, 2010.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1851: 469-484, 2015.

Campbell JM, Quigley JD 3<sup>rd</sup>, Russell LE, Koehn LD. Efficacy of spray-dried bovine serum on health and performance of turkeys challenged with *Pasteurella multocida*. *J Appl Poult Res*. 13: 388-393, 2004.

Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*. 33: 703-709, 1997.

Candore GG, Di Lorenzo G, Caruso C, Modica MA, Colucci AT, Crescimanno G, Ingrassia A, Sangiorgi GB, Salerno A. The effect of age on mitogen responsive T cell precursors in human beings is completely restored by interleukin-2. *Mech Ageing Dev*. 63: 297-307, 1992.

Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflammaging and immunosenescence. *J Proteomics*. 74: 2313-2323, 2011.

Cao L, Tian Y, Jiang Y, Zhang GJ, Lei H, Di ZL. Down-regulation of Homer1b/c protects against chemically induced seizures through inhibition of mTOR signaling. *Cell Physiol Biochem*. 35: 1633-1642, 2015.

Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L. Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech Ageing Dev*. 136-137: 59-69, 2014.

Carey JR, Zou S. Theories of life span and aging. A: physiological basis of aging and geriatrics. Timiras PS, Ed. Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 55-58.

Carroll JA, Touchette KJ, Matteri RL, Dyer CJ, Allee GL. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of weaned pigs. *J Anim Sci*. 80: 502-509, 2002.

Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis*. 31: 578-585, 2000.

Cawthon PM, Peters KW, Shardell MD, McLean RR, Dam T-TL, Kenny AM, Fragala MS, Harris TB, Kiel DP, Guralnik JM, Ferrucci L, Kritchevsky SB, Vassileva MT, Studenski SA, Alley DE. Cutpoints for low appendicular lean mass that identify older adults with clinically significant weakness. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 69: 567-575, 2014.

Che H, Sun LH, Guo F, Niu HF, Su XL, Bao YN, Fu ZD, Liu HL, Hou X, Yang BF, Ai J. Expression of amyloid-associated miRNAs in both the forebrain cortex and hippocampus of middle-aged rat. *Cell Physiol Biochem*. 33: 11-22, 2014.

Chen G, Lustig A, Weng NP. T cell aging: a review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Front Immunol.* 4: 121, 2013.

Chen JW, Chen YH, Lin FY, Chen YL, Lin SJ. Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 1559-1566, 2003.

Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (review). *Mol Med Rep.* 13: 3391-3396, 2016.

Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging. *Ann N Y Acad. Sci.* 928: 327-335, 2001.

Coffey RD, Cromwell GL. The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. *J Anim Sci.* 73: 2532-2539, 1995.

Coffey RD, Cromwell GL. Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. *Pig News Info.* 22: 39-48, 2001.

Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 5: 35-57, 2014.

Conboy IM, Rando TA. Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle.* 11: 2260-2267, 2012.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-867, 2002.

Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.* 25: 210-217, 2004.

Curran-Everett D, Benos DJ. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287: 247-249, 2004.

**D**

Dal-Pan A, Dudonné S, Bourassa P, Bourdoulous M, Tremblay C, Desjardins Y, Calon F. Cognitive- Enhancing effects of a polyphenols-rich extract from fruits without changes in neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 55: 115-135, 2016.

De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal.* 7: 1356-1366, 2005.

De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflammaging. *Curr Pharm Des.* 15: 3003-3026, 2009.

Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med.* 62: 141-155, 2011.

Del Valle J, Bayod S, Camins A, Beas-Zárate C, Velázquez-Zamora DA, González-Burgos I, Pallàs M. Dendritic spine abnormalities in hippocampal CA1 pyramidal neurons underlying memory deficits in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 32: 233-240, 2012.

DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology.* 7: 471-481, 2006.

Deleidi M, Jaggle M, Rubino G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front Neurosci.* 9: 172, 2015.

Derhovanessian E, Solana R, Larbi A, Pawelec G. Immunity, ageing and cancer. *Immun Ageing.* 24: 5-11, 2008.

Dhandapani KM, Brann DW. Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys.* 39: 13-22, 2003.

Di Benedetto S, Müller L, Wenger E, Düzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev.* 75: 114-128, 2017.

Diack AB, Alibhai JD, Barron R, Bradford B, Piccardo P, Manson JC. Insights into mechanisms of chronic neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 17: 82, 2016.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocket M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 9363-9367, 1995.

DiSabato D, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2: 136-153, 2016.

Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, Ramirez MJ. Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology.* 64: 137-144, 2013.

Driscoll I, Sutherland R. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Rev Neurosci.* 16: 87-121, 2005.

## E

Eilat-Adar S, Goldbourt U. Nutritional recommendations for preventing coronary heart disease in women: Evidence concerning whole foods and supplements. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20: 459-466, 2010.

Elahy M, Jackaman C, Mamo JC, Lam V, Dhaliwal SS, Giles C, Nelson D, Takechi R. Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immun Ageing.* 12: 2, 2015.

Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation.* 12: 255-269, 2005.

Ellwardt E, Walsh JT, Kipnis J, Zipp F. Understanding the role of T cells in CNS homeostasis. *Trends Immunol.* 37: 154-165, 2016.



Enciu AM, Gherghiceanu M, Popescu BO. Triggers and effectors of oxidative stress at blood–brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 297512, 2013.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31: 47-59, 1988.

Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*. 215: 244-254, 2010.

Epstein FH, Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340: 115-126, 1999.

Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 51: 245-270, 2000.

## **F**

Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol*. 28: 243-273, 2010.

Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, Abellan van Kan G, Andrieu S, Bauer J, Breuille D, Cederholm T, Chandler J, De Meynard C, Donini L, Harris T, Kannt A, Keime Guibert F, Onder G, Papanicolaou D, Rolland Y, Rooks D, Sieber C, Souhami E, Verlaan S, Zamboni M.; International Working Group on Sarcopenia. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. *J Am Med Dir Assoc*. 12: 249-256, 2011.

Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 448: 767-774, 2007.

Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*. 2015: 610813, 2015.

Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*. 584: 3826-3830, 2010.

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span-from yeast to humans. *Science*. 328: 321-326, 2010.

Ford CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A, McArdle A, Jackson MJ. Identification of (poly)phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. *Br J Nutr*. 115: 1699-1710, 2016.

Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafe M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol*. 34: 911-921, 1999.

Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 128: 92-105, 2007.

Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev*. 65: 173-176, 2007.

Freeman L, Keller J. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim Biophys Acta*. 1822: 822-829, 2012.

Frost RA, Lang CH. Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *J Appl Physiol*. 103: 378-387, 2007.

Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol*. 30: 334-343, 2009.

## G

Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab*. 55: 123-139, 2009.

Gatnau R, Paul PS, Zimmerman DR. Spray-dried porcine plasma as a source of immunoglobulins for newborn piglets. *J Anim Sci*. 64: 244, 1989.

Gemechu JM, Bentivoglio M. T cell recruitment in the brain during normal aging. *Front Cell Neurosci*. 6: 38, 2012.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol*. 21: 264-271, 2001a.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr*. 74: 833-839, 2001b.

Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*. 21: 515-521, 2000.

Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist*. 8: 541-552, 2003.

Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J*. 19: 1329-1331, 2005.

Gomez-Pinilla F, Huie JR, Ying Z, Ferguson AR, Crown ED, Baumbauer KM, Edgerton VR, Grau JW. BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression. *Neuroscience*. 148: 893-906, 2007.

Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. 333: 1109-1112, 2011.

Greer EL, Brunet A. Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*. 8: 113-127, 2009.

Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> indicator dilution technique. *J Appl Physiol*. 58: 1929-1941, 1985.

Gruber AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol*. 211: 144-156, 2007.

Guigoz Y, Doré J, Schiffrin J. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Op Clin Nutr Metab Care*. 11: 13-20, 2008.

Guillen J. FELASA Guidelines for ethical care and use of animals. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 51: 311-321, 2012.

Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol*. 37: 1034-1042, 2005.

## H

Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Madiha S. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*. 36: 9653, 2014.

Halliwel B. Oxidants and the cerebral nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand Suppl*. 126: 23-33, 1989.

Halliwel B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> edition. Clarendon Press, Oxford, 2006.

Hamilton-Miller JMT. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgrad Med J*. 80: 447-451, 2004.

Han SN, Lichtenstein AH, Ausman LM, Meydani SN. Novel soybean oils differing in fatty acid composition alter immune functions of moderately hypercholesterolemic older adults. *J Nutr*. 142: 2182-2187, 2012.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature*. 345: 458-460, 1990.

Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11: 298-300, 1956.

Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 475: 324-332, 2011.

Hayflick M, Moorhead PS. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 37: 614-636, 1980.

Hedden T, Gabrieli J. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 5: 87-96, 2004.

Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21: 569-576, 2011.

Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today.* 21: 123-128, 2000.

Herskovits AZ, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res.* 23: 746-758, 2013.

Herskovits AZ, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron.* 81: 471-483, 2014.

Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. Aging and immunity. *Acta Pathol Jpn.* 42: 537-548, 1992.

Hirose K, Tomiyama H, Okazaki R, Arai T, Koji Y, Zaydun G, Hori S, Yamashina A. Increased pulse wave velocity associated with reduced calcaneal quantitative osteosono index: possible relationship between atherosclerosis and osteopenia. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 2573-2578, 2003.

Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Differential effect of atorvastatin and fenofibrate on plasma oxidized low density lipoprotein, inflammation markers, and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 57: 380-386, 2008.

Houtkooper R, Williams R, Auwerx J. Metabolic Networks of Longevity. *Cell.* 142: 9-14, 2010.

Howell NK, Lawrie RA. Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. *J Food Technol.* 18: 747-762, 1983.

Hsieh HL, Yang Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases CM. *Biomed Res Int.* 2013: 484613, 2013.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3: 276-285, 2003.

**I**

Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 10: 1369-1376, 2007.

Imahori K, Uchida T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem*. 121: 179-188, 1997.

**J**

Janelins MC, Mastrangelo MA, Park KM, Sudol KL, Narrow WC, Oddo S, LaFerla FM, Callahan LM, Federoff HJ, Bowers WJ. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- $\alpha$  expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol*. 173: 1768-1782, 2008.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T. A: Inmunobiología: El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Masson, S.A., Barcelona, 2000, pp: 115-162.

Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 443: 421-426, 2006.

Jeffery IB, O'Toole PW. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients*. 5: 234-252, 2013.

Jiang M, Wang J, Fu J, Du L, Jeong H, West T, Xiang L, Peng Q, Hou Z, Cai H, Seredenina T, Arbez N, Zhu S, Sommers K, Qian J, Zhang J, Mori S, Yang XW, Tamashiro KL, Aja S, Moran TH, Luthi-Carter R, Martin B, Maudsley S, Mattson MP, Cichewicz RH, Ross CA, Holtzman DM, Krainc D, Duan W. Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med*. 18: 153-158, 2012.

Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. Molecular biology of aging. *Cell*. 96: 291-302, 1999.

Jones S, Nyberg L, Sandblom J, Stigsdotter Neely A, Ingvar M, Magnus Petersson K, Backman L. Cognitive and neural plasticity in aging: general and task-specific limitations. *Neurosci Biobehav Rev.* 30: 864-871, 2006.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 33: 1205-1214, 2003.

## **K**

Kanungo MS. A model for ageing. *J Theor Biol.* 53: 253-261, 1975.

Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science.* 244: 811-813, 1989.

Katayama S, Imai R, Sugiyama H, Nakamura S. Oral administration of soy peptides suppresses cognitive decline by induction of neurotrophic factors in SAMP8 mice. *J Agric Food Chem.* 62: 3563-3569, 2014.

Katayama S, Sugiyama H, Kushimoto S, Uchiyama Y, Hirano M, Nakamura S. effects of sesaminol feeding on brain A $\beta$  accumulation in a Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8. *J Agric Food Chem.* 64: 4908-4913, 2016.

Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 282: 4067-4079, 2015.

Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of murine Peyer's patch. *J Exp Med.* 183: 237-247, 1996.

Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev.* 35: 295-303, 2001.

Khan MZ, Atlas N, Nawaz W. Neuroprotective effects of *Caralluma tuberculata* on ameliorating cognitive impairment in D-galactose-induced mouse model. *Biomed Pharmacother.* 84: 387-394, 2016.

Kim HJ, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Bar-Or A. Inflammatory potential and migratory capacities across human brain endothelial cells of distinct glatiramer acetate-reactive T cells generated in treated multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 111: 38-46, 2004.

Kim J, Baxter M. Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci.* 24: 324-330, 2001.

Kiyono H, Fukuyama S. NALT - versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol.* 4: 699-710, 2004.

Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 10: 205-215, 2011.

Koyama A, O'Brien J, Weuve J, Blacker D, Metti AL, Yaffe K. The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 68: 433-440, 2013.

Krakauer T, Buckley M, Issaq HJ, Fox SD. Rapamycin protects mice from Staphylococcal enterotoxin B-induced toxic shock and blocks cytokine release in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 1125-1131, 2010.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24: 2463-2479, 2010.

Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry.* 72: 595-607, 2007.

Kwon SE, Chapman ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron.* 70: 847-854, 2011.

## L

Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, Belkaid Y, Chougnet C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol.* 181: 1835-1848, 2008.

Langille MG, Meehan CJ, Koenig JE, Dhanani AS, Rose RA, Howlett SE, Beiko RG. Microbial shifts in the aging mouse gut. *Microbiome.* 2: 1-12, 2014.



Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149: 274-293, 2012.

Larbi A, Dupuis G, Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fülöp T. Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging. *Cell Signal*. 18: 1017-1030, 2006.

Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology*. 23: 64-74, 2008.

Larbi A, Pawelec G, Wong SC, Goldeck D, Tai JJY, Fulop T. Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? *Ageing Res Rev*. 10: 370-378, 2011.

Larson K, Yan SJ, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, Guo D, Eickbush TH, Li WX. Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet*. 8: e1002473, 2012.

Lee Y, Oh S. Administration of red ginseng ameliorates memory decline in aged mice. *J Ginseng Res*. 39: 250-256, 2015.

Lesourd, B. Nutritional factors and immunological ageing. *Proc Nutr Soc*. 65: 319-325, 2006.

Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, Li Y. Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing a beta(1-42) oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience*. 163: 741-749, 2009.

Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci*. 23: 1605-1611, 2003.

Li Z, Liu F, Ma H, White PF, Yumul R, Jiang Y, Wang N, Cao X. Age exacerbates surgery-induced cognitive impairment and neuroinflammation in Sprague-Dawley rats: the role of IL-4. *Brain Res*. 1665: 65-73, 2017.

Linton PJ and Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 5: 133-139, 2004.

Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci*. 11: 334-343, 2008.

Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 15: 6-15, 2014.

Liu Z, Wang C, Wang X, Xu S. Therapeutic Effects of Transplantation of As-MiR-937-Expressing Mesenchymal Stem Cells in Murine Model of Alzheimer's Disease. *Cell Physiol Biochem*. 37: 321-330, 2015.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*. 25: 402-408, 2001.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 153: 1194-1217, 2013.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 481: 287-294, 2012.

## M

MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM, Luther SA, Orbea HA. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev*. 156: 53-66, 1997.

Maijón M, Miró L, Polo J, Campbell J, Russell L, Crenshaw J, Weaver E, Moretó M, Pérez-Bosque A. Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury. *Br J Nutr*. 107: 867-875, 2012a.

Maijón M, Miró L, Polo J, Campbell J, Russell L, Crenshaw J, Weaver E, Moretó M, Pérez-Bosque A. Dietary plasma proteins modulate the adaptive immune response in mice with acute lung inflammation. *J Nutr*. 142: 264-270, 2012b.

Maijón M, Clements SJ, Ivory K, Nicoletti C, Carding SR. Nutrition, diet and immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 136-137: 116-128, 2014.

Makinodan T, Kay MMB. Age influence on the immune system. *Adv Immunol.* 29: 287-330, 1980.

Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet.* 371: 771-783, 2008.

Mariani E, Polidori M, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827: 65-75, 2005.

Markowska-Daniel I, Szcotka A, Bednarek D, Pejsak Z. Preliminary study of the influence of plasma proteins on immunological and production parameters in pigs. *Poj J Vet Sci.* 6: 275-277, 2003.

Martin-Orúe SM, Pérez-Bosque A, Gómez de Segura A, et al. Feed added sprayed dried porcine plasma (SDPP) modifies cecal microbiota in rats. *Gut Microbiome Meeting.* Clermont-Ferrand, France, 2008.

Martinet KZ, Bloquet S, Bourgeois C. Ageing combines CD4 T cell lymphopenia in secondary lymphoid organs and T cell accumulation in gut associated lymphoid tissue. *Immun Aging.* 11: 8, 2014.

Mawhinney L, De Rivero Vaccari J, Dale G, Keane R, Bramlett H. Heightened inflammasome activation is linked to age- related cognitive impairment in Fischer 344 rats. *BMC Neurosci.* 12: 123, 2011.

McKay DM, Benjamin MA, Lu J. CD4+ T cells mediate superantigen-induced abnormalities in murine jejunal ion transport. *Am J Physiol.* 275: 29-38, 1998.

McLean RR, Shardell MD, Alley DE, Cawthon PM, Fragala MS, Harris TB, Kenny AM, Peters KW, Ferrucci L, Guralnik JM, Kritchevsky SB, Kiel DP, Vassileva MT, Xue QL, Perera S, Studenski SA, Dam TT. Criteria for clinically relevant weakness and low lean mass and their longitudinal association with incident mobility impairment and mortality: the foundation for the National Institutes of Health (FNIH) sarcopenia project. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69: 576-83, 2014.

McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD. A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+

lymphocytes: differences between young and elderly subjects. *Exp Gerontol.* 37: 227-234, 2002.

Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev.* 65: 375-398, 1990.

Mestecky J, Blumberg R, Kiyono H, McGhee JR. The mucosal immune system. A: *Fundamental Immunology*. 5<sup>th</sup> edition, Paul WE, Academic, San Diego, 2003, pp: 965-1020.

Miller M, Shukitt-Hale B. Berry fruit enhances beneficial signaling in the brain. *J Agric Food Chem.* 60: 5709-5715; 2012.

Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 273: 70-74, 1996.

Milner JA. Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr.* 134: 2492-2498, 2004.

Miquel J. Teorías del envejecimiento: selección e integración. A: *Biogerontología Médica*. Sastre J, Pamplona R, Ramón JR. Ergon, Madrid, 2009, pp.1-12.

Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 60: 121-142, 1998.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. *Nature.* 451: 1069-1075, 2008.

Möller P, Lohr M, Folkmann J, Mikkelsen L, Loft S. Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. *Free Radic Biol Med.* 48: 1275-1285, 2010.

Monk JM, Liddle DM, Cohen DJ, Tsang DH, Hillyer LM, Abdelmagid SA, Nakamura MT, Power KA, Ma DW, Robinson LE. The delta 6 desaturase knock out mouse reveals that immunomodulatory effects of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids are both independent of and dependent upon conversion. *J Nutr Biochem.* 32: 29-38, 2016.

Moor AC, de Vries HE, de Boer AG, Breimer DD. The blood-brain barrier and multiple sclerosis. *Biochem Pharmacol.* 47: 1717-1724, 1994.

Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem.* 201: 523-546, 1991.

Moretó M, Miró L, Garcia-Just A, Amat C, Pérez-Bosque A. La suplementación dietética con proteínas de plasma porcino modifica la composición de la microbiota fecal de ratones. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. València, Espanya 2015.

Morrill JL, Morrill JM, Feverherm AM, Laster JF. Plasma proteins and a probiotic as ingredients in milk replacer. *J Dairy Sci.* 78: 902-907, 1995.

Morris MC. Nutritional determinants of cognitive aging and dementia. *Proc Nutr Soc.* 71: 1-13, 2012.

Morris R, Garrud P, Rawlins J, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 297: 681-683, 1982.

Morrison A, Chein J. Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychon Bull Rev.* 18: 46-60, 2011.

Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 12: 661-684, 2012.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 3: 331-341, 2003.

Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol.* 6: 379-386, 2006.

## N

Nacionales DC, Gentile LF, Vanzant E, Lopez MC, Cuenca A, Cuenca AG, Ungaro R, Li Y, Baslanti TO, Bihorac A, Moore FA, Baker HV, Leeuwenburgh C, Moldawer LL, Efron PA. Aged mice are unable to mount an effective myeloid response to sepsis. *J Immunol.* 192: 612-622, 2014.

Nacionales DC, Szpila B, Ungaro R, Lopez MC, Zhang J, Gentile LF, Cuenca AL, Vanzant E, Mathias B, Jyot J, Westerveld D, Bihorac A, Joseph A, Mohr A, Duckworth LV, Moore

FA, Baker HV, Leeuwenburgh C, Moldawer LL, Brakenridge S, Efron PA. A detailed characterization of the dysfunctional immunity and abnormal myelopoiesis induced by severe shock and trauma in the aged. *J Immunol.* 195: 2396-2407, 2015.

Nakai M, Iizuka M, Matsui N, Hosogi K, Imai A, Abe N, Shiraishi H, Hirata A, Yagi Y, Jobu K, Yokota J, Kato E, Hosoda S, Yoshioka S, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y, Miyamura M. Bangle (*Zingiber purpureum*) Improves Spatial Learning, Reduces Deficits in Memory, and Promotes Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Senescence-Accelerated Mouse P8. *J Med Food.* 19: 435-441, 2016.

Nakajima K, Matsushita Y, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T. Differential suppression of endotoxin-inducible inflammatory cytokines by nuclear factor kappa B (NFkappaB) inhibitor in rat microglia. *Neurosci Lett.* 401: 199-202, 2006.

National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th rev. Ed. National Academy Press, Washington, D.C., 1995.

Naudi A, Jove M, Llieva E, Cacabelos D, Gonzalo H, Serrano J, Boada J, Ayala MV, Portero-Otin M, Pamplona R. Oxidación de macromoléculas, envejecimiento y longevidad. *Biogerontologia medica*, 2009; p43-69.

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 136: 65-80, 2009.

Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 112: 251-254, 2010.

Nollet H, Deprez P, van Driessche E, Muylle E. Protection of just weaned pigs against infection with F18+ *Escherichia coli* by non-immune plasma powder. *Vet Microbiol.* 65: 37-45, 1999.

Nova E, Warnberg J, Gomez-Martinez S, Diaz LE, Romeo J, Marcos A. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br J Nutr.* 98: 90-95, 2007.

**O**

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358, 1979.

Osorio F, Bárcena C, Soria-Valles C, Ramsay A, de Carlos F, Cobo J, López-Otín C. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- $\kappa$ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.* 26: 2311-2324, 2012.

Ouwehand AC, Tiihonen K, Saarinen M, Putaala H, Rautonen N. Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters. *Br J Nutr.* 101: 367-375, 2009.

**P**

Pae M, Meydani SN, Wu D. The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis.* 3: 91-129, 2012.

Pakkenberg B, Gundersen H. Neocortical neuron number in humans: Effect of sex and age. *J Comp Neurol.* 384: 312-320, 1997.

Pallàs M. Senescence-Accelerated Mice P8: a tool to study brain aging and alzheimer's disease in a mouse model. *ISRN Cell Biology.* Article ID 917167, 2012.

Palma G, D'Aiuto M, Petrillo A, Dallemagne P, Sinicropi MS, Rodriquez M, Longo P, Mariconda AL, Arra C, De Martino F, Capasso A, Saturnino C. Targeting STAT3 in cancer inhibition. *Pharmacologyonline.* 1: 50-66, 2015.

Palomera-Avalos V, Griñán-Ferré C, Puigoriol-Illamola D, Camins A, Sanfeliu C, Canudas AM, Pallàs M. resveratrol protects samp8 brain under metabolic stress: focus on mitochondrial function and wnt pathway. *Mol Neurobiol.* 54: 1661-1676, 2016.

Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 3: 2-12, 2010.

Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today.* 16: 420-422, 1995.

Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci.* 7: 1056-1183, 2002.

Pawelec G, Larbi A. Immunity and ageing in man: annual review 2006/2007. *Exp Gerontol.* 43: 34-38, 2008.

Perez SD, Du K, Rendeiro C, Wang L, Wu Q, Rubakhin SS, Vazhappilly R, Baxter JH, Sweedler JV, Rhodes JS. A unique combination of micronutrients rejuvenates cognitive performance in aged mice. *Behav Brain Res.* 320: 97-112, 2017.

Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Vicario M, Castell M, Russell L, Campbell JM, Quigley JD, Polo J, Moretó M. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *Staphylococcus aureus* superantigen B. *J Nutr.* 134: 2667-2672, 2004.

Pérez-Bosque A, Amat C, Vicario M, Polo J, Campbell JM, Crenshaw J, Russell L, Moretó M. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* superantigen B on intestinal barrier function in weaned rats. *J Nutr.* 136: 2838-2843, 2006.

Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, Crenshaw J, Moretó M. Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *J Nutr.* 138: 533-537, 2008.

Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, Crenshaw J, Moretó M. Dietary plasma protein supplements prevent the release of mucosal proinflammatory mediators in intestinal inflammation in rats. *J Nutr.* 140: 25-30, 2010.

Pérez-Bosque A, Moretó M. A rat model of mild intestinal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Proc Nutr Soc.* 69: 447-453, 2010.

Pérez-Bosque A, Miró L, Maijó M, Polo J, Campbell J, Russell L, Crenshaw J, Weaver E, Moretó M. Dietary intervention with serum-derived bovine immunoglobulins protects barrier function in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 308: 1012-1018, 2015.



Pérez-Bosque A, Miró L, Amat C, Polo J, Moretó M. The Anti-Inflammatory Effect of Spray-Dried Plasma Is Mediated by a Reduction in Mucosal Lymphocyte Activation and Infiltration in a Mouse Model of Intestinal Inflammation. *Nutrients*. 8, 2016a.

Pérez-Bosque A, Miró L, Maijó M, Polo J, Campbell JM, Russell L, Crenshaw JD, Weaver E, Moretó M. Oral serum-derived bovine immunoglobulin/protein isolate has immunomodulatory effects on the colon of mice that spontaneously develop colitis. *PLoS One*. 11: e0154823, 2016b.

Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: A review. *J Neurocytol*. 31: 581-593, 2002.

Petschow BW, Burnett B, Shaw AL, Weaver EM, Klein GL. Serum-derived bovine immunoglobulin/protein isolate: postulated mechanism of action for management of enteropathy. *Clin Exp Gastroenterol*. 7: 181-190, 2015.

Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 27: 813-823, 2004.

Pilato F, Profice P, Ranieri F, Capone F, Di Iorio R, Florio L, Di Lazzaro V. Synaptic plasticity in neurodegenerative diseases evaluated and modulated by *in vivo* neurophysiological techniques. *Mol Neurobiol*. 46: 563-571, 2012.

Poldrack R, Packard M. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*. 41: 245-251, 2003.

Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal*. 14: 1551-1585, 2011.

Porquet D, Casadesus G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegri C, Sanfeliu C, Camins A, Pallas M, del Valle J. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age*. 35: 1851-1865, 2013.

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*. 78: 959-991, 2009.

**Q**

Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT, Puigserver P, Sadoshima J, Deng H, Pedrini S, Gandy S, Sauve AA, Pasinetti GM. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*. 281: 21745–21754, 2006.

Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*. 21: 727-735, 2007.

Quigley JD 3<sup>rd</sup>, Drew MD. Effects of oral antibiotics or bovine plasma on survival, health and growth in dairy calves challenged with *Escherichia coli*. *Food Agric Immunol*. 12: 311-318, 2000.

Quigley JD 3<sup>rd</sup>, Wolfe TM. Effects of spray-dried animal plasma in calf milk replacer on health and growth of dairy calves. *J Dairy Sci*. 86: 586-592, 2003.

**R**

Rai T, Troen BR. Principles and practice of geriatric surgery. A: Cell and molecular aging. 2nd edition. Rosenthal RA, Zenilman ME, Katlic MR. New York, Springer New York, 2011, pp: 5-38.

Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol*. 4: 261-270, 2011.

Reiter, RJ. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog Neurobiol*. 56: 359-384, 1998.

Rescigno T, Micolucci L, Tecce MF, Capasso A. Bioactive nutrients and nutrigenomics in age-related diseases. *Molecules*. 22: 105, 2017.

Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta*. 1362: 116-127, 1997.

Rizzo V, Richman J, Puthanveettil S. Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons. *Front Aging Neurosci*. 6: 337, 2015.

Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 192: 547-556, 2011.

Rosenberg GA. Blood-Brain Barrier Permeability in Aging and Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 1: 138-139, 2014.

Russell LE, Weaver EM. Strategic application of blood proteins in feeding strategies for early weaned pigs and calves. *Amer Assoc Swine Vet.* 37-45, 1996.

## **S**

Salminen A, Kaarniranta K. Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF- $\kappa$ B driven entropic aging process. *Ageing Res Rev.* 9: 298-314, 2010.

Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. SIRT1 longevity factor suppresses NF- $\kappa$ B-driven immune responses: Regulation of aging via NF- $\kappa$ B acetylation? *BioEssays.* 30: 939-942, 2008a.

Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta, K. Interaction of aging-associated signaling cascades: Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci.* 65: 1049-1058, 2008b.

Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.* 236: 13-23, 2006.

Saykally JN, Rachmany L, Hatic H, Shaer A, Rubovitch V, Pick CG, Citron BA. The nuclear factor erythroid 2-like 2 activator, tert-butylhydroquinone, improves cognitive performance in mice after mild traumatic brain injury. *Neuroscience.* 223: 305-314, 2012.

Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Visser M. Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *Am J Med.* 119: 526, 2006.

Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tylavsky FA, Visser M; Health ABC Study. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 64: 1183-1189, 2009.

Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 970-982, 2007.

Seo JE, Hasan M, Han JS, Kang MJ, Jung BH, Kwok SK, Kim HY, Kwon OS. Experimental autoimmune encephalomyelitis and age-related correlations of NADPH oxidase, MMP-9, and cell adhesion molecules: The increased disease severity and blood–brain barrier permeability in middle-aged mice. *J Neuroimmunol*. 287: 43-53, 2015.

Shanahan F. The intestinal immune system. A: Physiology of the gastrointestinal tract. Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH. Raven Press, New York, 1994, pp: 643-684.

Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 22: 507-513, 2010.

Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 21: 598-605, 2010.

Shimada A, Hasegawa-Ishii S. Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence. *Aging Dis*. 2: 414-435, 2011.

Shipstead Z, Redick T, Engle R. Does working memory training generalize? *Psychol Sci*. 17: 245-276, 2010.

Shlisky J, Bloom DE, Beaudreault AR, Tucker KL, Keller HH, Freund-Levi Y, Fielding RA, Cheng FW, Jensen GL, Wu D, Meydani SN. Nutritional considerations for healthy aging and reduction in age-related chronic disease. *Adv Nutr*. 8: 17-26, 2017.

Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph J. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci*. 12: 135-140, 2009.

Simi A, Lerouet D, Pinteaux E, Brough D. Mechanisms of regulation for interleukin-1 $\beta$  in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 52: 1563-1569, 2007.

Singh CK, Liu X, Ahmad N. Resveratrol, in its natural combination in whole grape, for health promotion and disease management. *Ann N Y Acad Sci*. 1348: 150-60, 2015.

Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of proinflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*. 87: 10-20, 2012.

Sochocka M, Breno BS, Leszek J. Inflammatory response in the CNS: friend or foe? *Mol Neurobiol.* 2016.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273: 59-63, 1996.

Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity.* 24: 491-494, 2006.

Song M, Liu Y, Lee JJ, Che TM, Soares-Almeida JA, Chun JL, Campbell JM, Polo J, Crenshaw JD, Seo SW, Pettigrew JE. Spray-dried plasma attenuates inflammation and improves pregnancy rate of mated female mice. *J Anim Sci.* 93: 298-305, 2015.

Spencer J, Vafeiadou K, Williams R, Vauzour D, Spencer J, Vafeiadou K, Vauzour D. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med.* 33: 83-97, 2012.

Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Schölmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev.* 122: 1591-1611, 2001.

Stuart MJ, Baune BT. Depression and type 2 diabetes: inflammatory mechanisms of a psychoneuroendocrine co-morbidity. *Neurosci Biobehav Rev.* 36: 658-676, 2012.

Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol.* 30: 247-253, 2010.

Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv Immunol.* 107: 153-185, 2010.

Sweatt JD. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology.* 174: 99, 2003.

## T

Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ferrer I, Caballero B, Smith MA, Casadesus G, Camins A, Pallás M. Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67: 612-623, 2008.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. A new murine model accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 17: 183-194, 1981.

Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol.* 32: 117-127, 1997.

Takeda T, Kogishi K, Matsushita T. Short-lived animal models for aging research and the position of the SAM model. A: The senescence-accelerated mouse (SAM). Achievements and future directions. Takeda T, Ed. Elsevier, pp: 25-35, 2013.

Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 11: 694-703, 2012.

Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *J Nutr.* 131: 1918-1927, 2001a.

Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged <55 years. *Am J Clin Nutr.* 73: 539-548, 2001b.

Thoman ML, Weigle WO. The cellular and sub-cellular bases of immunosenescence. *Adv Immunol.* 46: 221-261, 1989.

Tichauer JE, Flores B, Soler B, Eugenin-von Bernhardt L, Ramírez G, von Bernhardt R. Age-dependent changes on TGFbeta1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation. *Brain Behav Immun.* 37: 187-196, 2014.

Tilstra J, Robinson A, Wang J, Gregg S, Clauson C, Reay D, Robbins P. NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.* 122: 2601-2612, 2012.

Torrallardona D, Conde MR, Badiola I, Polo J, Brufau J. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J Anim Sci*. 81: 1120-1126, 2003.

Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 13<sup>ª</sup> edición. *Editorial Médica Panamericana S.A.*, 2012.

Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, Stella I, Antonaci S. Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins. *Ageing Res Rev*. 6: 81-93, 2007.

Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 109: 179-187, 2005.

Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matteri RL, Dyer CJ, Beausang LA, Zannelli ME. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J anim Sci*. 80: 494-501, 2002.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 76: 4350-4354, 1979.

Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 6: 118-136, 1993.

## V

Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev*. 35: 36-45, 2017.

Van Dijk AJ, Everts H, Nabuurs MJA, Margry RJCF, Beynen AC. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: A review. *Livest Prod Sci*. 68: 263-274, 2001.

Van Eldik L, Thompson W, Ranaivo H, Behanna H, Martin Watterson D. Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative

diseases: function-based and target-based discovery approaches. *Int Rev Neurobiol.* 82: 277-296, 2007.

Vedin I, Cederholm T, Freund-Levi Y, Basun H, Garlind A, Faxen-Irving G, Johnagen ME, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J. Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: The OmegAD study. *Am J Clin Nutr.* 87: 1616-1622, 2008.

Venkataraman K, Khurana S, Tai TC. Oxidative Stress in Aging-Matters of the Heart and Mind. *Int J Mol Sci.* 14: 17897-17925, 2013.

Vicens P, Redolat R, Carrasco C. Aprendizaje especial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema.* 15: 539-544, 2003.

Vida C, González EM, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des.* 20: 4656-4678, 2014.

Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life.* 59: 249-254, 2007.

## W

Walford RL, Jawaid SQ, Naeim F. Evidence for in vitro senescence of T-lymphocytes cultured from normal human peripheral blood. *Age.* 4: 67-70, 1981.

Walford RL. The immunological theory of aging. Musksgaard, Copenhage. pp. 1-248, 1969.

Walford RL. Immunologic theory of aging: current status. *Fed Proc.* 33: 2020-2027, 1974.

Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev.* 21: 274-301, 2001.

Weng NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity.* 24: 495-499, 2006.



Werry EL, Enjeti S, Halliday GM, Sachdev PS, Double KL. Effect of age on proliferation-regulating factors in human adult neurogenic regions. *J Neurochem*. 115: 956-964, 2010.

Williams C, El Mohsen M, Vauzour D, Rendeiro C, Butler L, Ellis J, Spencer J. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB 226 phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med*. 45: 295-305, 2008.

Wilson I, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends Neurosci*. 29: 662-670, 2006.

Wilson R, Barnes L, Mendes De Leon C, Aggarwal N, Schneider J, Bennett D. Depressive symptoms, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology*. 59: 364-370, 2002.

Wonodi I, Schwarcz R. Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 36: 211-218, 2010.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *Eur J Neurosci*. 23: 2573-2580, 2006.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*. 155: 751-759, 2008.

## **Y**

Yanai S, Toyohara J, Ishiwata K, Ito H, Endo S. Long-term cilostazol administration ameliorates memory decline in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) through a dual effect on cAMP and blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 116: 247-259, 2016.

Yancik R, Ries LG. Cancer in the aged. An epidemiologic perspective on treatment issues. *Cancer*. 68: 2502-2510, 1991.

Yang X, Xu S, Qian Y, Xiao Q. Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 $\alpha$  in conditions of neuroinflammatory injury. *Brain Behav Immun*. pii: S0889-1591, 2017.

Yankner B, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol.* 3: 41-66, 2008.

Yokozawa T, Lee YA, Zhao Q, Matsumoto K, Cho EJ. Persimmon oligomeric proanthocyanidins extend life span of senescence-accelerated mice. *J Med Food.* 12: 1199-1205, 2009.

Yuan H, Zheng JC, Ping Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process. *Neurosci Bull.* 23: 125-130, 2007.

Yuan J, Lu L, Zhang Z, Zhang S. Dietary intake of resveratrol enhances the adaptive immunity of aged rats. *Rejuvenation Res.* 15: 507-515, 2012.

Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol.* 13: 293-310, 2003.

## Z

Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature.* 497: 211-216, 2013.

Zhang ZX, Zhao RP, Wang DS, Li YB. Fuzhisan ameliorates the memory deficits in aged SAMP8 mice via decreasing A $\beta$  production and tau hyperphosphorylation of the hippocampus. *Neurochem Res.* 41: 3074-3082, 2016.

Zhao HF, Li Q, Zhang ZF, Pei XR, Wang JB, Li Y. Long-term ginsenoside consumption prevents memory loss in aged SAMP8 mice by decreasing oxidative stress and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus. *Brain Res.* 1256: 111-122, 2009.

Zhao L, Sun L, Wang H, Ma H, Liu G, Zhao Y. Changes of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *J Leukoc Biol.* 81: 1386-1394, 2007.

Zheng C, Zhou XW, Wang JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Transl Neurodegener.* 5: 7, 2016.

## BIBLIOGRAFIA

---

Zilka N, Kazmerova Z, Jadhav S, Neradil P, Madari A, Obetkova D, Bugos O, Novak M. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J Neuroinflammation*. 9: 47, 2012.

Zindler E, Zipp F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 24: 551-562, 2010.

## VIII. ANNEX

---

---



## DIETARY PLASMA PROTEIN SUPPLEMENTATION PREVENTS INTESTINAL AGE-RELATED AND SEB-INDUCED INFLAMMATION

Garcia-Just A<sup>†1</sup>, Miró L<sup>†1,2</sup>, Amat C<sup>1</sup>, Moretó M<sup>1</sup>, Pérez-Bosque A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació and Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona (UB), 08028, Spain;

<sup>2</sup>APC-Europe S.L.U., Granollers 08403, Spain;

Corresponding author: Dr. Miquel Moretó; Departament Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Av. de Joan XXIII 27-31, E-08028 Barcelona, Spain; Email: mmoreto@ub.edu; Tel.: +34 934024505

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Running title:** SDP prevents intestinal inflammation

**Abstract:** The increased life expectancy during recent years has promoted the research on healthy aging. Aging is accompanied by increased nonspecific immune activation (inflammaging) which favours the appearance of several disorders. We have studied if a plasma protein dietary supplement, which has been shown to prevent the activation of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) in rodents challenged with *S. aureus* enterotoxin B (SEB), can also prevent age-dependent effects on immune system homeostasis. We first characterized GALT in a mice model of senescence (SAMP8) at different ages (compared to mice from a senescence accelerated resistant strain; SAMR1) and secondly we analysed the GALT response of senescent animals in response to a SEB challenge. Aging increased the cell number and the percentage of activated Th lymphocytes in mesenteric lymph nodes (MLN) and Peyer's patches (PP) in both mice strains (all,  $p < 0.05$ ). Senescent mice showed higher expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in intestinal mucosa with increasing age (both,  $p < 0.05$ ). In young mice, the immune response to SEB consisted of increased the expression of intestinal IL-6 and TNF- $\alpha$ , as well as cell recruitment and activation (all,  $p < 0.05$ ), as expected. However, senescent mice showed a low immune response to the SEB challenge, since SEB did not change the cell recruitment or the percentage of activated Th lymphocytes. Mice supplemented with SDP gave response to the SEB that was similar to that observed in young mice. These results indicate that senescent mice have an impaired mucosal immune response characterized by unspecific GALT activation and a weak specific immune response. SDP supplementation reduces nonspecific basal immune activation allowing generation of specific responses.

**Keywords:** intestinal inflammation; *S. aureus* enterotoxin B; Aging; Spray-dried animal plasma; Functional proteins; Diet.

## INTRODUCTION

Aging is an intrinsic process that impairs the function of cells, tissue organs and individuals. It is characterized by raised inflammatory state and by physiological changes that involve a reduction in the response to environmental stimuli that, in turn, increase the predisposition to illness and death.

Francheschi *et al.*, (2000) introduced the concept of *inflammaging* which defines a chronic low-grade inflammation that is shared by a broad spectrum of age-related pathologies. It is caused by the cumulative exposure to antigenic loads, triggered by both clinical and subclinical infections, as well as exposure to non-infective antigens (Francheschi *et al.*, (2007). The resulting inflammatory condition involves increased production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines, affecting both innate (Cannizzo *et al.*, 2011) and acquired immune system (Ponnappan and Ponnappan, 2011). These results in a vicious circle, which drives immune system remodelling that, will eventually favour a chronic pro-inflammatory state (CITA). Hence, high plasma IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , and C-reactive protein concentrations are associated with a higher risk of morbidity and mortality in elderly people (Brüüngaard & Pedersen, 2003).

The inflammaging profile is paralleled by changes in the immune system associated with aging that are known as immunosenescence. This condition is characterized by a decline in immune competence associated with a

reduction in the secretion of specific IgA to the intestinal lumen, and a reduced capacity to generate tolerance to innocuous antigens (Mabbot *et al.*, 2013). This means that, in aged individuals, the protective function of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) is compromised.

In addition to the age-related GALT progressive deterioration, the intestine is permanently exposed to food and environmental antigens which are also responsible for the low-grade permanent inflammation that characterizes the gut mucosa (Cevenini *et al.*, 2013). This condition can be reproduced in the laboratory by systemic administration of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) because it induces a polyclonal activation of T cells, especially in the small intestine (Baker & Acharya, 2004), that results in mild stimulation of pro-inflammatory cytokines secretion (Pérez-Bosque *et al.*, 2004; 2008; 2016).

Dietary intervention can modulate GALT activation. Dietary supplementation with functional proteins from porcine plasma (spray-dried plasma, SDP) have been shown to prevent deterioration of the intestinal barrier and defence mechanisms, reducing GALT activation in animals challenged with SEB (Pérez-Bosque *et al.*, 2006, 2010). The mechanism of action of SDP involves a reduction in the number of activated Th lymphocytes and stimulation the Treg population which restores the pro-/anti-inflammatory cytokine profile. These pattern has been extensively observed in the small intestine in both rats (Pérez-Bosque *et al.*,

2008) and mice (Pérez-Bosque *et al.*, 2016), in the colon of mice spontaneously developing colitis (Pérez-Bosque *et al.*, 2015) and in the lung mucosa of mice challenged by LPS inhalation (Maijó *et al.*, 2012). Furthermore, SDP can prevent stress-induced uterine inflammation in rats, and improve the low pregnancy rates in this model (Song *et al.*, 2015).

The aim of the present study was to analyse if SDP supplementation is effective in preventing inflammaging in senescent mice prone (senescence accelerated prone mice, SAMP8 strain) that were further challenged with SEB.

## Materials and Methods

**Animals and diets.** Male mice of the prone to senescence (SAMP8) strain and its control senescence-resistant (SAMR1) counterpart, were kept at the animal facility of the Faculty of Pharmacy and Food Science under stable temperature and humidity conditions, with a 12 h:12 h light/dark cycle. All protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the University of Barcelona, in accordance with the Generalitat de Catalunya guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (registration numbers 565/13 and 7397, respectively).

**Experiment 1. Characterization of GALT of the animal model at three stages of development.** The evolution of the leukocyte populations present in mesenteric lymph nodes (MLN) and Peyer's patches (PP) in SAMR1 and SAMP8 mice, as well as the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in

jejunum mucosa were studied at different stages of development. Animals were euthanized when were 2, 6 or 9 months-old.

## Experiment 2. Acute intestinal inflammation.

Young (2 months-old) and senescent (6 months-old) mice were used in this study. Mice were maintained isolated in conventional housing from 2 to 6 months-old. During this period (4 months) mice were fed with experimental diets (Table 1). Intestinal inflammation was induced by intraperitoneal administration of 25  $\mu$ g of SEB, given 24 h before sacrifice; non-challenged mice received the vehicle (PBS). All animals were euthanized by anaesthetic overdose.

**Mesenteric lymph node cell isolation.** MLN were obtained, finely minced and incubated in a digestion solution composed by RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 5% inactivated foetal bovine serum, 100,000 U/L penicillin, 100 mg/L streptomycin, 10 mM-HEPES, 2 nM-L-glutamine and 150 U/ml collagenase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a shaker (Thermomixer Comfort Eppendorf®, Heuppauge, NY, USA). MLN were mechanically disaggregated and passed through stainless steel mesh. The cell suspension was centrifuged at 500g for 10 min at 4°C. The pelleted cells were resuspended in PBS-FBS. Cell number and viability were determined using acridine orange and ethidium bromide.

**Peyer's Patch cell isolation.** The jejunum and ileum were first washed with PBS. PP were excised and immediately incubated in the same solution as previously described for MLN. PP were then mechanically disaggregated and passed through a stainless steel mesh. The



resulting cell suspensions were centrifuged at 500g for 10 min at 4°C. The pelleted cells were resuspended in 40% Percoll™ in complete RPMI. This cell suspension was carefully layered over 80% Percoll™ in complete RPMI medium and centrifuged at 700g for 20 min at 20°C. The ring of cells was carefully collected, transferred to a clean tube and centrifuged at 500g for 10 min at 4°C. The pelleted cells were resuspended in PBS-FBS. Cell number and viability were determined using acridine orange and ethidium bromide markers.

**CELL STAINING.** The procedure was similar to that described previously by Pérez-Bosque *et al.* (2004). Briefly, staining was carried out in samples containing  $3 \cdot 10^5$  cells. To stain the surface markers, cells were incubated with primary antibodies conjugated to fluorochromes (anti-CD4 (GK1.5) and anti-CD25 (PC61.5)), purchased as fluorescent conjugates from eBioscience (San Diego, CA). To stain the intracellular marker (FoxP3), cells were fixed with paraformaldehyde for 20 min at 4°C, and permeabilized with Triton-X® for 20 min at 4°C. Then, cells were washed and incubated with the primary antibodies to stain the intracellular marker. Finally, cells were washed and stored in 4% paraformaldehyde until further analysis in a Gallios Flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL), located in the Cytometry Unit of the Scientific-Technical Services of the Barcelona Science Park (BSP). Results were analysed using the Flowjo Software (Treestar Inc., Ashland, OR).

**REAL-TIME PCR.** RNA extraction and reverse transcription were carried out as described previously by Pérez-Bosque *et al.*, (2015). The

primers used are described in **Table 2**. Product fidelity was confirmed by melt-curve analysis.

**STATISTICAL ANALYSIS.** The results of the experiments are presented as the mean  $\pm$  SEM. The data were analyzed by two-way ANOVA followed by the Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc test, using GraphPad Prism® software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). On the first experiment, the factors considered were the strain of mice and age. On the second experiment, the factors considered were the effects of age and dietary supplementation (considered together as a variable with different groups: 2M, 6M, 6M-SDP), and SEB-induced inflammation. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Characterization of GALT in SAM strains

**MLN populations in SAM strains.** The number of leukocytes of the MLN was not the same between the strains. At all ages, the number of leukocytes in SAMP8 mice was lower than in SAMR1 animals ( $p = 0.001$ , **Figure 1A**). The evolution of activated Th lymphocytes in MLN differ between strain ( $p < 0.001$ , **Figure 1B**) and a significant interaction was found between strains and age ( $p < 0.0051$ ). This effect enhanced in the older (9 month-old) SAMP8 mice. The percentage of regulatory Th lymphocytes increased at 6 months and was kept high until the 9th month. SAMR1 mice showed a higher percentage of this population than SAMP8 mice ( $p = 0.043$ , **Figure 1C**). The

ratio of activated to regulatory Th lymphocytes in MLN was significantly increased in SAMP8 in comparison with SAMR1 mice ( $p < 0.001$ , **Figure 1D**) and this effects was more evident at 9 months-old. A significant interaction was found between strains and age ( $p = 0.005$ ).

**PP populations in SAM strains.** PP count showed a similar pattern as in MLN. Cell count increased with age in both strains ( $p = 0.047$ , **Figure 2A**), although it was higher in SAMR1 mice (strain effect  $p = 0.003$ ). The population of activated Th lymphocytes increased with age ( $p < 0.001$ , **Figure 2B**). At 2 months-old both strains presented similar values but SAMP8 mice had higher percentage of this population at 6 and 9 months-old. Activated Th lymphocytes in PP differ between strain ( $p < 0.001$ ) and interaction between strain and age was found ( $p = 0.001$ ). The percentage of regulatory Th lymphocytes increased at 6 months-old and was decreased at 9 months-old (**Figure 2C**). The ratio of activated to regulatory Th lymphocytes increased with age ( $p < 0.001$ , **Figure 2D**). This ratio was higher in SAMP8 mice than SAMR1 and showed superior levels at 9 months-old

**Pro-inflammatory cytokines in SAM strains.** IL-6 and TNF- $\alpha$  in jejunum mucosa increased with age in both strains ( $p = 0.001$  and  $p < 0.001$  respectively, **Figure 3A** and **3B**). At 2 months-old, the expression of these two cytokines was similar between strains. However, at 6 and 9 months-old, SAMP8 mice doubled the expression of IL-6 compared to SAMR1 mice (strain effect  $p < 0.003$ ). The expression of TNF- $\alpha$  presented a strain effect ( $p < 0.001$ ) and interaction between strain and age ( $p = 0.007$ ).

#### Effect of SDP in response of SEB inflammation in senescent mice

**Effect of SDP in MLN population in senescence mice.** Senescent mice showed increased cell recruitment into MLNs in basal conditions ( $p < 0.001$ ). Moreover, SEB administration increased leukocyte recruitment into MLNs ( $p = 0.031$ , **Figure 4A**), although senescent mice fed with control diet showed less response to SEB administration than young mice or senescent mice supplemented with SDP. This resulted in Age and SEB interaction ( $p = 0.019$ ). Aged mice (6M) had a lower percentage of activated Th lymphocytes than young SAMP8 in response to SEB administration ( $p < 0.001$  **Figure 4B**) and there was no effect of SDP supplementation in old mice. An interaction between age and SEB administration ( $p < 0.001$ ). Neither senescence nor dietary supplementation with SDP modified the percentage of regulatory Th lymphocytes compared to young SAMP8 mice (**Figure 4C**). On the other hand, SEB administration increased the percentage of regulatory Th lymphocytes in all groups ( $p = 0.002$ ; **Figure 4C**). The ratio of activated to regulatory Th lymphocytes was reduced in aged mice, suggesting a reduced immune response to SEB ( $p = 0.012$ , **Figure 4D**). SDP supplementation did not modify the ratio of activated to regulatory Th lymphocytes observed in 6-months-old mice. Moreover, there was an interaction between age and SEB immune response ( $p = 0.001$ ), since SEB increased this ratio in young mice while in senescent mice there was a reduction in the ratio between activated and regulatory Th lymphocytes.

**Effect of SDP in PP population in senescence mice.** SEB administration increased leukocyte recruitment into PP in all experimental groups ( $p<0.001$ ; **Figure 5A**). The percentage of activated Th lymphocytes in PP was higher in senescent animals than in young animals ( $p=0.015$ ; **Figures 5B**). SDP supplementation did not affect this variable. Though no clear effects of SEB were observed, there was an interaction between SEB administration and SDP supplementation ( $p=0.001$ ). Senescence was characterized by an increase in the percentage of regulatory Th lymphocytes in PP ( $p<0.001$ ; **Figures 5C**). SDP supplementation did not attenuate the effects of senescence on the percentage of regulatory Th lymphocytes in PP and SEB administration did not modify this population. The administration of the enterotoxin generates a different response in the ratio between activated Th cells and regulatory Th cells in all groups in the PP (SEB effect  $p=0.008$ , **Figure 5D**). SEB administration increased this ratio in young (2M) and aged mice fed with control diet. Moreover, the enterotoxin reduced the activated to regulatory lymphocytes ratio in the group that received the SDP supplementation. There was an interaction between SEB administration and SDP supplementation ( $p<0.001$ ).

**Effect of SDP in cytokine expression in senescence mice.** During senescence there was an increase in the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the mucosa of the jejunum ( $p=0.002$  and  $p=0.019$ , respectively, **Figure 6A** and **6B**) that was prevented by SDP supplementation ( $p=0.040$  for IL-6 and  $p=0.020$  TNF- $\alpha$ ). Moreover,

SEB administration increased the expression of both cytokines ( $p=0.020$  for IL-6 and  $p<0.001$  for TNF- $\alpha$ ). Toxin administration increased the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the jejunum mucosa ( $p<0.001$ ; **Figures 6C**). However, senescence impaired the mucosal expression of this cytokine during the acute inflammation induced by SEB challenge ( $p=0.021$ ).

## DISCUSSION

Aging is a physiological process that affects the immune, nervous and endocrine systems, resulting in increased morbidity and mortality. The changes that affect the immune system (immunosenescence) involve both innate and acquired immunity (Weiskopf *et al.*, 2009), and result in increased susceptibility and severity of infectious, autoimmune and carcinogenic processes (Pawelec *et al.*, 1995). In aged individuals, the gastrointestinal tract is particularly susceptible to infectious diseases, and this is associated with lower response capacity of the mucosal immune system (McDonald *et al.*, 2011).

We have used the SAMP8 mice. This strain is widely used in aging studies because it exhibits morphological and functional alterations associated aging, already at early stages of development (Takeda *et al.*, 1991). SAMP8 mice are currently used in studies on the origins and causes of aging and associated disorders in organs such as the heart and liver (Forman *et al.*, 2010, Cuesta *et al.*, 2010), neurological disorders (Butterfield and Poon, 2005, Chiba *et al.*, 2009) and the inflammatory processes

associated to oxidative stress (Cuesta *et al.*, 2011). Takeda *et al.*, (1991) described that SAMP mice show normal growth and development within the first 2 months of life, after which they show changes in the immune system associated with aging. Among these changes, there is deterioration in the activity of Th lymphocytes (Yoshioka *et al.*, 1989). Our results show that inflammatory markers in young SAMR1 and SAMP8 mice are similar though SAMP8 mice show reduced lymphocyte counts in both GLM and PP compared to SAMR1 mice. Differences become larger with aging.

Senescent mice show thymic involution, an increase in the effector and memory T subpopulations and a concomitant reduction in naïve T cells (Pawelec and Larbi, 2008; Weng, 2006). Cell membrane composition is altered (Larbi *et al.*, 2006) and this may affect the responsiveness of T cells (Larbi *et al.*, 2011). Changes may involve the expression of costimulatory molecules and cytokine receptors and molecular and transcriptional alterations (Chen *et al.*, 2013). In addition, impairment of the immune system's functionality associated with age is characterized by chronic low-grade inflammation known as inflammaging (Franceschi, 2007; Larbi *et al.*, 2008). McNerlan *et al.*, (2002) observed that, during aging, deregulation in the interactions of cytokines occurs, which plays a central role in the remodelling of the immune system. The increased expression of pro-inflammatory cytokines is in the background of degenerative diseases that often accompany advanced age (Ponnappan and Ponnappan, 2011); for example pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-18 or TNF-

$\alpha$ , which are responsible for chronic inflammation, are often increased in the elderly (Brüünsgaard & Pedersen, 2003). At the same time, increased pro-inflammatory cytokine concentration in the intestinal mucosa will compromise the integrity and permeability of the epithelium (Cuesta *et al.*, 2010). We have observed that aged mice have increased pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion in the jejunum mucosa and that this effect is more pronounced in SAMP8 mice than in the SAMR1 mice. On the other hand, we have seen that, with age, there is an increase in the degree of activation of the gut associated immune system (GALT) that is already visible in 6 months-old animals.

Elderly people have decreased capacity to generate adequate adaptive responses, making them more susceptible to malnutrition, systemic infections and medication side effects (Tiihonen *et al.*, 2010). For this reason, the use of prebiotics, probiotics and certain dietary supplements may alleviate some age-related problems by modulating microbial activity and the degree of GALT activation.

One of the most remarkable alterations in aging is a decline in the performance of adaptive immunity mechanisms and the establishment of a mild chronic inflammatory state. These processes impact on the internal environment and change their composition over time (Forsey *et al.*, 2003). With this in perspective, chronic antigenic load and inflammaging are the major causes of aging and the pathogenesis of diseases related to (De Martini *et al.*, 2005).

Our results show that our 6 months-old SAMP8 mice already present an immunosenescence profile as well as the inflammaging characteristics of old animals, and that these processes develop at already 2 months of age. Based on these determinations, SAMP8 intestinal immune response to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) has been evaluated and the effect of dietary supplementation with SDP has been studied.

We propose the study of the effects of spray-dried plasma (SDP) supplementation as modulators of inflammation and intestinal immune system in senescent animals. SDP is a protein-based supplement of spray-dried whole plasma of porcine origin. It is an ingredient that has been used for many years as a dietary supplement of farm animals and is mainly administered in the stage following weaning as an alternative to the use of antibiotics (Torrallardona *et al.*, 2007).

Along with the loss of responsiveness of T cells (Larbi *et al.*, 2011), it has been found that the function of Treg lymphocytes is altered at advanced ages and are less efficient inhibiting the pro-inflammatory activities of other cell types (Zhao *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2012). Thus, Treg lymphocytes from aged individuals are less efficient preventing inflammaging, although their numbers increase with age in lymphoid tissues. Several studies in mice have demonstrated a greater presence of Treg lymphocytes in the lymphoid organs of old animals as compared to young animals, while the number in circulating blood remains unchanged (Zhao *et al.*, 2007; Lages *et al.*, 2008). Our results demonstrate that this

phenomenon also happens on the MLN of SAMP8 and SAMR1 mice. In contrast, in Peyer's patches, although the Treg population increases with age, it decreases again after 6 months of age.

In basal conditions, we observed that dietary supplementation with SDP prevents the increase in the inflammatory state of the intestine by reducing the cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . This decrease in chronic inflammation in mice appears to be important in generating an effective immune response to SEB administration. This activation of the immune system by the superantigens leads to a large production of cytokines that is often carried out by TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 (Onai and Kudo, 2001). On the other hand, our results show that administration of SEB does not increase IL-6 or IFN- $\gamma$  cytokine expression in 6-month-old mice. In contrast, 2 months-old mice and those who received dietary SDP supplementation show an increase in pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  generated in the jejunum mucosa after administration of SEB, as well as an increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Our results indicate that aged SAMP8 have a lower immune response to SEB, since the number of lymphocytes in GALT remains unchanged after administration of enterotoxin and the activated Th lymphocytes subpopulation is not increased. In young SAMP8 mice, however, there was an increase in the number and activation of T-lymphocytes, both MLN and PP. This indicates that the immune system responds to the toxin. SDP feeding increased the percentage of lymphocytes against SEB in both MLN and PP as well as the

number of activated Th cells in MLN in response to enterotoxin.

Therefore, although inflammaging promotes numerous alterations in advanced ages, such as cardiovascular disease or chronic obstructive pulmonary disease (Olivieri & Chetta, 2013, Franceschi *et al.*, 2000 and 2007), and contributes to an insufficient response to infections, it does not result in an increased inflammatory response as it would be expected (Nacionales *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). Rather, data suggest a failure to generate an immune response, as well as a subsequent inability to resolve the inflammation. Our results indicate that dietary supplementation with SDP avoids the drastic fall in the responsiveness capacity that occurs in the intestine of senescent mice against an infection, since it decreases inflammaging and allows a response against inflammatory stimulus.

The effects of dietary supplementation with SDP on GALT have been previously studied in young animals, but there were no studies on its effects on old animals. Pérez-Bosque *et al.* (2016) found that SDP has a great anti-inflammatory effect after a challenge with SEB in young mice. SDP decreases the immune response of young mice, thus avoiding an exaggerated reaction of the immune system against the toxin. Other studies on rats (Pérez-Bosque *et al.*, 2004; 2008) have also demonstrated the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of SDP which maintains the intestinal mucosal barrier function and modulates the degree of activation of gut-associated lymphoid tissue in different challenged animals. Several studies on the

mechanism by which SDP indicates that it decreases mucosal pro-inflammatory cytokine expression, reduces activation of Th lymphocytes and promotes the abundance of regulatory Th lymphocyte population. In addition, it also increases the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 or TGF- $\beta$ , which counteract the effects of TNF- $\alpha$  and other mediators of inflammation. These changes in the cytokine profile may explain the reduced effects of SEB administration in young mice (Pérez-Bosque *et al.*, 2016). In this study, it has also been observed that 6-month-old SAMP8 mice that have received dietary supplementation present changes in the cytokine profile. The pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are diminished compared to the aged group, which would explain the prevention of inflammaging. In addition, the SDP decreases the subpopulation of activated Th lymphocytes in MLN. This decrease in basal inflammation in aged mice is key to generate a response of the immune system to other stimuli, such as SEB administration. In this way the mice that have received the SDP feed can respond in a similar way to the young mice. In addition, administration of SEB from SDP increases the Treg lymphocyte population in intestinal-associated lymphoid tissue in old mice, with a corresponding increase in IL-10 expression. Therefore, SDP exerts a modulatory effect on the intestinal immune system since, on the one hand, it decreases the inflammation associated with age but, on the other hand, it allows an effective immune response to the administration of SEB.

## DISCLOSURES

Pérez-Bosque, A. Garcia-Just, C. Amat and M. Moretó declare that they have no conflict of interest; L. Miró is employed by APC Europe S.L.U (Granollers, Spain).

## ACKNOWLEDGMENTS:

APC Europe S.L.U (Granollers, Spain) provided the experimental diets.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS:

A.P.-B., C.A., and M.M. conceived and designed the experiments;  
A.P.-B., L.M. and A.G.-J. performed the experiments;  
A.P.-B., L.M. and M.M. analyzed the data;  
A.P.-B., L.M. and M.M. wrote the paper.  
All the authors approved the final version of the paper.

## REFERENCES

1. Baker MD, Acharya KR (2004). Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol*, 293: 529-537.
2. Brüüngaard H, Pedersen BK (2003). Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*, 23: 15-39.
3. Butterfield DA y Poon HF (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 40: 774-783.
4. Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L (2011). Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics*, 2: 2313-2323.
5. Cevenini E, Monti D, Franceschi C (2013). Inflamm-aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16: 14-20.
6. Chiba Y, Shimada A, Kumagai N, Yoshikawa K, Ishii S, Furukawa A, *et al.*, (2009). The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochem Res*, 34: 679-687.
7. Chen G, Lustig A, Weng NP (2013). T cell aging: a review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Front Immunol*, 4: 121.
8. Chen MM, Palmer JL, Plackett TP, Deburghraeve CR, Kovacs EJ (2014). Age-related differences in the neutrophil response to pulmonary pseudomonas infection. *Exp Gerontol*, 54: 42-46.
9. Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, *et al.*, (2011). Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev*, 132: 573-582.
10. Cuesta S, Kireev R, Forman K, García C, Escames G, Ariznavarreta C, *et al.*, (2010). Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Exp Gerontol*, 45: 950-956.
11. Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña-Castroviejo D, *et al.*, (2010). Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res*, 49: 312-320.
12. Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, *et al.*, (2003). Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev*, 124: 487-493.

13. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, *et al.* (2000). Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908: 244-254.
14. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, *et al.*, (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, 128: 92-105.
15. Larbi A, Dupuis G, Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fülöp T (2006). Differential role of lipid rafts in the functions of CD4+ and CD8+ human T lymphocytes with aging. *Cell Signal*, 18: 1017-1030.
16. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G (2008). Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology*, 23: 64-74.
17. Larbi A, Pawelec G, Wong SC, Goldeck D, Tai JJY, Fulop T (2011). Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? *Ageing Res Rev*, 10: 370-378.
18. Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, *et al.*, (2008). Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic in factious disease reactivation. *J Immunol*, 181: 1835-1348.
19. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*, 6: 666-677.
20. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L (2005). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett*, 579: 2035-2039.
21. McDonald KG, Leach MR, Huang C, Wang C, Newberry RD (2011). Aging impacts isolated lymphoid follicle development and function. *Immun Ageing*, 8:1.
22. McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD (2002). A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects. *Exp Gerontol*, 37: 227-234.
23. Maijò M, Miró L, Polo J, Campbell J, Russell L, Crenshaw J, *et al.*, (2012). Dietary plasma proteins modulate the adaptive immune response in mice with acute lung inflammation. *J Nutr*, 142: 264-270.
24. Nacionales DC, Gentile LF, Vanzant E, Lopez MC, Cuenca A, Cuenca AG, *et al.*, (2014). Aged mice are unable to mount an effective myeloid response to sepsis. *J Immunol*, 192: 612-622.
25. Nacionales DC, Szpila B, Ungaro R, Lopez MC, Zhang J, Gentile LF, *et al.*, (2015). A detailed characterization of the dysfunctional immunity and abnormal myelopoiesis induced by severe shock and trauma in the aged. *J Immunol*, 195: 2396-2407.
26. Olivieri D, Chetta A (2013). Therapeutic perspectives in vascular remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Chem Immunol Allergy*, 99: 216-225.
27. Onai H & Kudo S (2001). Suppression of superantigen-induced lung injury and vasculitis by preadministration of human urinary trypsin inhibitor. *Eur J Clin Invest*, 31: 272-280.
28. Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K (1995). Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today*, 16: 420-422.
29. Pawelec G, Larbi A (2008). Immunity and ageing in man: annual review 2006/2007. *Exp Gerontol*, 43: 34-38.



30. Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Vicario M, Castell M, Russell L, Campbell JM, *et al.*, (2004). Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. aureus* Superantigen B J Nutr, 134: 2667-2672.
31. Pérez-Bosque A, Amat C, Polo J, Campbell JM, Crenshaw J, Russell L, *et al.*, (2006). Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. J Nutr, 136: 2838-2843.
32. Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, *et al.*, (2008). Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B J Nutr, 138(3): 533-537.
33. Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, *et al.*, (2010). Dietary plasma protein supplements prevent the release of mucosal proinflammatory mediators in intestinal inflammation in rats. J Nutr, 140: 25-30.
34. Pérez-Bosque A, Miró L, Maijó M, Polo J, Campbell J, Russell L, *et al.*, (2015). Dietary intervention with serum-derived bovine immunoglobulins protects barrier function in a mouse model of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 308: G1012-G1018.
35. Pérez-Bosque A, Miró L, Amat C, Polo J, Moretó M (2016). The Anti-Inflammatory Effect of Spray-Dried Plasma Is Mediated by a Reduction in Mucosal Lymphocyte Activation and Infiltration in a Mouse Model of Intestinal Inflammation. Nutrients, 8(10). pii: E657
36. Ponnappan S, Ponnappan U (2011). Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. Antioxid Redox Signal, 14: 1551-1585.
37. Sun L, Hurez VJ, Thibodeaux SR, Kious MJ, Liu A, Lin P, *et al.*, (2012). Aged regulatory T cells protect from autoimmune inflammation despite reduced STAT3 activation and decreased constraint of IL-17 producing T cells. Aging Cell, 11: 509-519.
38. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1991). Senescence-accelerated mouse (SAM): a murine model of accelerated senescence. J Am Geriatr Soc, 39: 911-91.
39. Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. Ageing Res Rev, 9:107-116.
40. Torrallardona D, Conde R, Badiola I, Polo J (2007). Evaluation of spray dried animal plasma and calcium formate as alternatives to colistin in piglets experimentally infected with *Escherichia coli* K99. Livest Sci, 108:303-306.
41. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. (2009). The aging of the immune system. Transpl Int, 22:1041-1050.
42. Weng NP (2006). Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? Immunity. 24:495-499.
43. Yoshioka H, Yoshida H, Doi T, Muso E, Ohshio G, Higuchi K, *et al.*, (1989). Autoimmune abnormalities in a murine model of accelerated senescence. Clin Exp Immunol. 75:129-135.
44. Zhao L, Sun L, Wang H, Ma H, Liu G, Zhao Y (2007). Changes of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. J Leukoc Biol. 81:1386-1394.

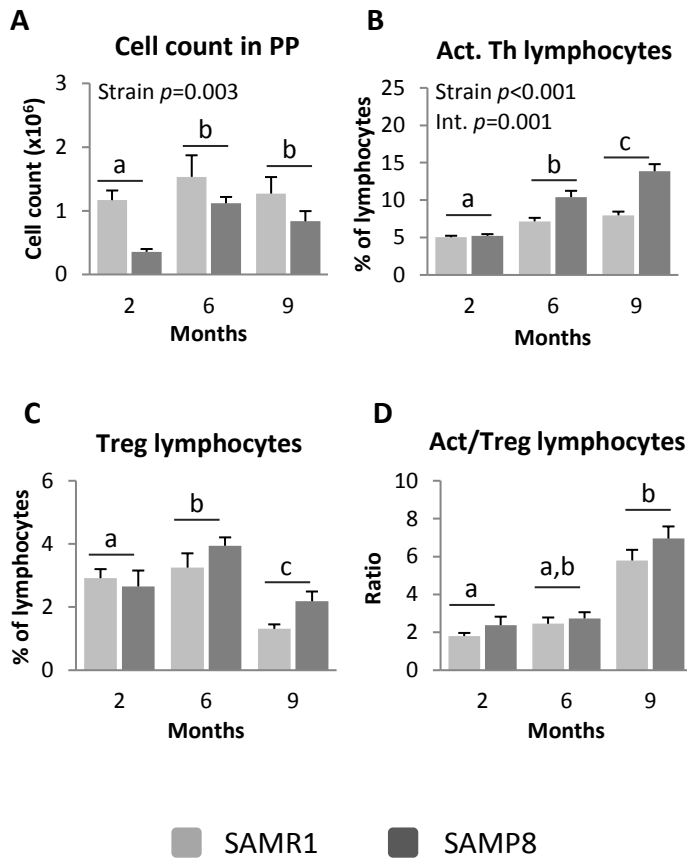
**Table 1.** Composition of experimental diets.

Ingredient	Control	SDP
SDP	---	80
Corn starch	199.3	308.8
Skim milk	530.7	340.5
Sucrose	94.5	94.5
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	50
AIN-93-G-MX (94046)*	35	35
AIN-93 VX (94047)*	15	15
DL-Methionine	2.5	3.2
Choline bitartrate	3	3

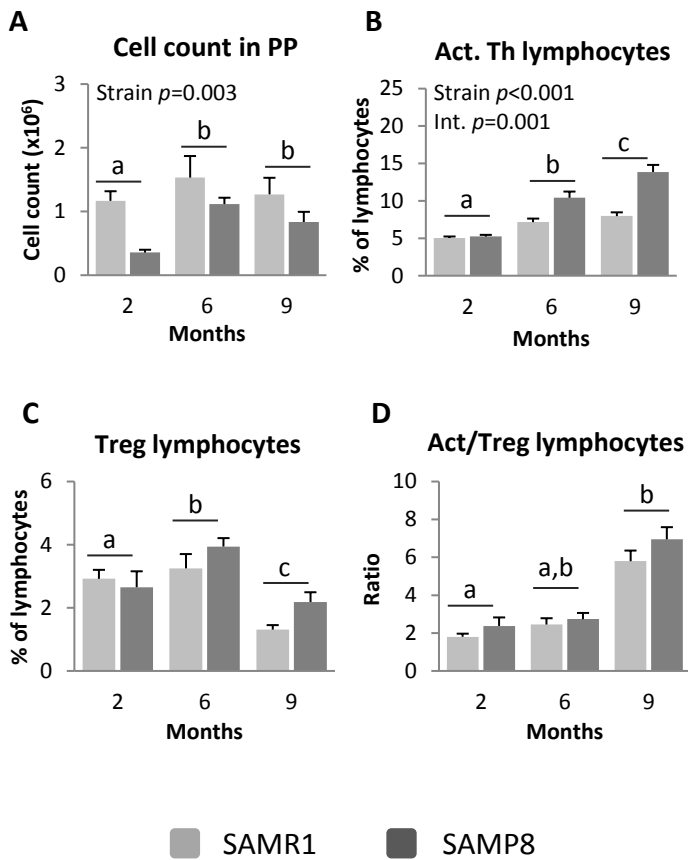
Diets were produced by APC-Europe, S.A. \*Provided by Envigo (Italy).

**Table 2.** Primers used for analysis of cytokine expression.

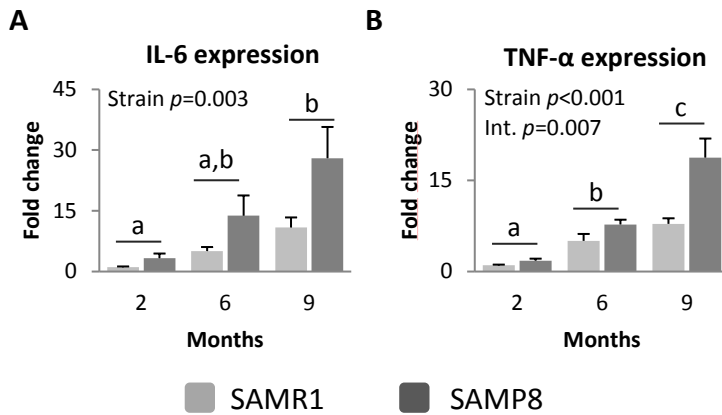
Target	Forward	Reverse	Size
Gusb	5'-CCG ATT ATC CAG AGC GAG TAT G-3'	5'-CTC AGC GGT GAC TGG TTC G-3'	97 bp
IL-6	5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'	109 bp
IL-10	5'-GGC GCT GTC ATC GAT TTC TCC CC-3'	5'-TGG CCT TGT AGA CAC CTT GGT CTT-3'	102 bp
TNF- $\alpha$	5'- CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC-3'	5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT-3'	103 bp



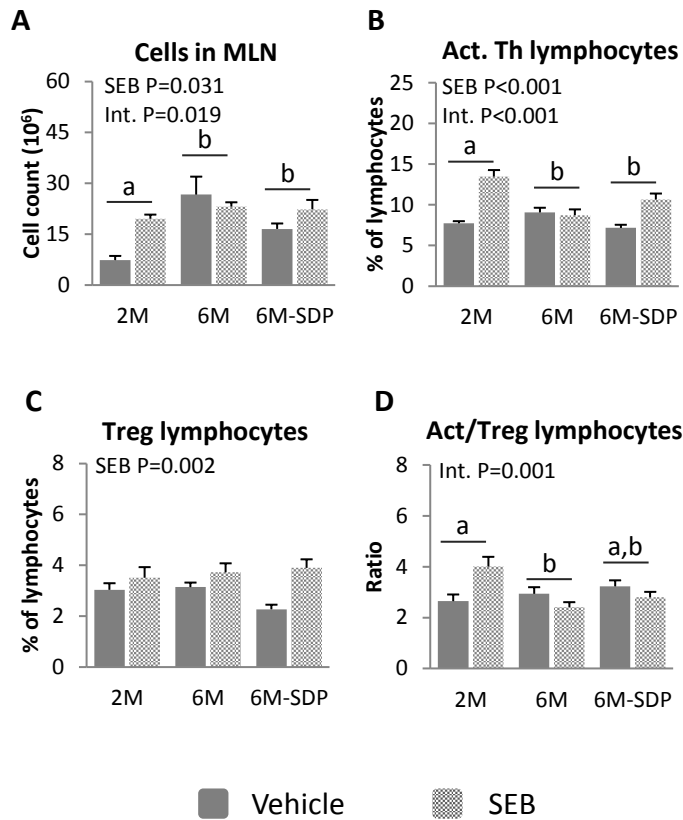
**Figure 1.** Cell recruitment (A); percentage of activated (Act.) Th lymphocytes (B); percentage of regulatory (Treg) Th lymphocytes (C) and ratio of activated and regulatory Th lymphocytes (D) in mesenteric lymph nodes from SAMR1 and SAMP8 mice at 2, 6 and 9 months-old. The light grey bars represent SAMR1 mice and dark grey bars represent SAMP8 mice. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-11$  animals). Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .



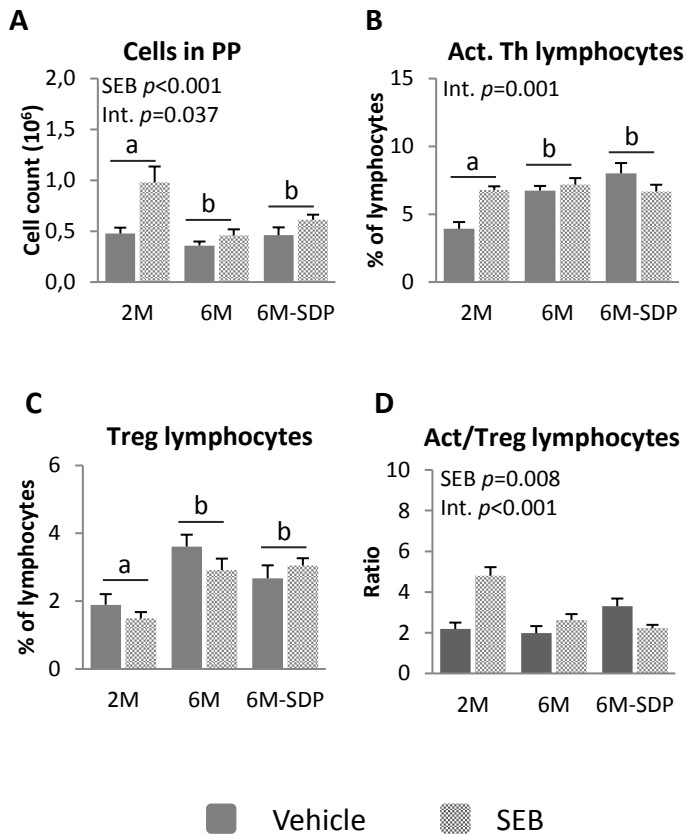
**Figure 2.** Cell recruitment (A); percentage of activated (Act.) Th lymphocytes (B); percentage of regulatory (Treg) Th lymphocytes (C) and ratio of activated and regulatory Th lymphocytes (D) in Peyer's patches from SAMR1 and SAMP8 mice at 2, 6 and 9 months-old. The light grey bars represent SAMR1 mice and dark grey bars represent SAMP8 mice. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$  animals). Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .



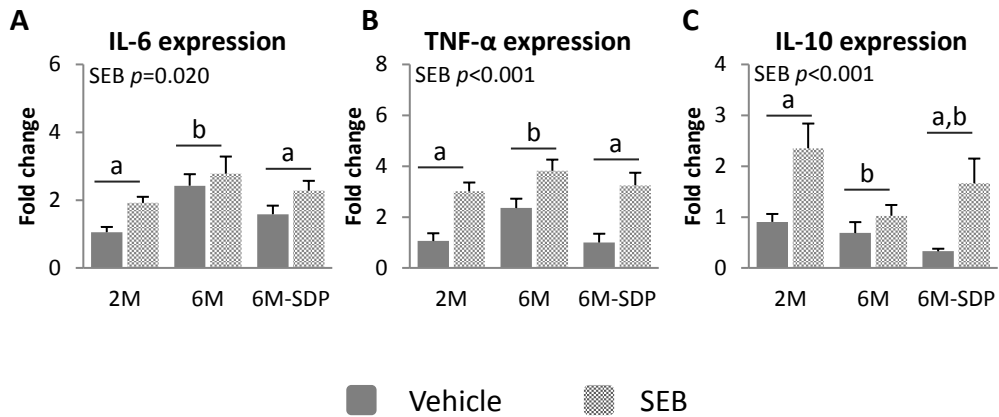
**Figure 3.** mRNA expression of IL-6 (A) and TNF- $\alpha$  (B), in jejunum mucosa from SAMR1 and SAMP8 mice at 2, 6 and 9 months-old. The light grey bars represent SAMR1 mice and dark grey bars represent SAMP8 mice. All target genes were normalized to beta glucuronidase (GUSB) expression. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6-7 animals). Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** Cell recruitment (A); percentage of activated (Act.) Th lymphocytes (B); percentage of regulatory (Treg) Th lymphocytes (C) and ratio of activated and regulatory Th lymphocytes (D) in mesenteric lymph nodes from SAMP8 mice of the 2M, 6M-CTL and 6M-SDP groups. The dense bars represent groups that received the vehicle and the grated bars represent inflamed mice with SEB. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5-8 animals). Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** Cell recruitment (A); percentage of activated (Act.) Th lymphocytes (B); percentage of regulatory (Treg) Th lymphocytes (C) and ratio of activated and regulatory Th lymphocytes (D) in Peyer's patches from SAMP8 mice of the 2M, 6M-CTL and 6M-SDP groups. The dense bars represent groups that received the vehicle and the grated bars represent inflamed mice with SEB. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6-8$  animals). Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .



**Figure 6.** mRNA expression of IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) and IL-10 (C) in jejunum mucosa from SAMP8 mice of the 2M, 6M-CTL and 6M-SDP groups. The dense bars represent groups that received the vehicle and the grated bars represent inflamed mice with SEB. All target genes were normalized to beta glucuronidase (GUSB) expression. All of the results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 5-6 animals). Means without a common letter differ,  $p<0.05$ .