



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Efecte de la suplementació dietètica
amb proteïnes plasmàtiques en la progressió de la
malaltia de l'Alzheimer. Paper de la microbiota
i l'eix intestí-cervell en aquest efecte**

Cristina Rosell Cardona



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Secció de Fisiologia
Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals**

**EFFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB PROTEÏNES
PLASMÀTIQUES SOBRE LA PROGRESSIÓ DE LA MALALTIA DE
L'ALZHEIMER. PAPER DE LA MICROBIOTA I L'EIX INTESTÍ-
CERVELL**

**Cristina Rosell Cardona
2022**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Secció de Fisiologia
Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals

EFFECTE DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES SOBRE LA PROGRESSIÓ DE LA MALALTIA DE L'ALZHEIMER. PAPER DE LA MICROBIOTA I L'EIX INTESTÍ- CERVELL.

Programa de Doctorat: **Biotecnologia**

Memòria presentada per **Cristina Rosell Cardona** per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Dra. Lluïsa Miró Martí
(Directora)

Dra. Anna Pérez Bosque
(Directora)

Dra. Concepció Amat Miralles
(Tutora)

Cristina Rosell Cardona
(Doctoranda)

Cristina Rosell Cardona
2022

Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes "*Effects of SDP on functional markers of the central nervous system*" i "*Effects of animal plasma derivatives in the prevention of neuroinflammation and oxidative stress associated with aging*" ambdós gestionats per la Fundació Bosch i Gimpera de la Universitat de Barcelona, ref. FBG-309652 (Període 2018-2020) i FBG-310633 (Període 2020-2021), respectivament. Empresa finançadora: APC Europe S.A., Granollers (Barcelona). El grup forma part del grup consolidat Fisiologia i Nutrició Experimental (2017SGR945; Generalitat de Catalunya). Durant la seva realització, l'autora ha estat contractada per la Fundació Bosch i Gimpera a càrrec del projecte FBG-309202. 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 i l'Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona.



ÍNDEX



ÍNDIX.....	III
ÍNDIX DE FIGURES.....	IV
ABREVIATURES.....	VI
RESUM DE LA TESI.....	XI
I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. MALALTIA D'ALZHEIMER	3
1.1. PÈRDUA DE MEMÒRIA I PLASTICITAT SINÀPTICA	3
1.2. PROCESSAMENT DE LA PROTEÏNA PRECURSORA AMILOIDE	4
1.2.1. Via no amiloidogènica.....	5
1.2.2. Via amiloidogènica.....	5
1.2.3. Eliminació dels pèptids A β	6
1.3. HIPERFOSFORILACIÓ PROTEÏNA TAU	7
1.3.1. Quinasa dependent de ciclina 5 (CDK5).....	8
1.3.2. Glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK3 β).....	8
1.3.3. Cabdells neurofibril·lars	8
1.4. NEUROINFLAMACIÓ.....	10
1.4.1. Citocines pro-inflamatòries	10
1.4.2. Quimocines	10
1.4.3. Caspases	11
1.4.4. Sistema del complement	11
1.4.5. Estrès oxidatiu	11
1.5. ACTIVACIÓ DE LA MICRÒGLIA O MICROGLIOSI	11
1.5.1. Micròglia M1.....	12
1.5.2. Micròglia M2.....	13
1.6. ACTIVACIÓ DELS ASTRÒCITS O ASTROGLIOSI	13
1.7. TIPUS D'ALZHEIMER	14
1.7.1. Alzheimer tipus precoç	14
1.7.2. Alzheimer tipus tardà	14
1.8. FACTORS DE RISC DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER.....	15
1.8.1. Envel·liment	15
1.8.2. Factors genètics	15
1.8.3. Malalties cerebrovascular.....	15
1.8.4. Hipertensió i dislipèmia	16

1.8.5.	Obesitat.....	16
1.8.6.	Sedentarisme	16
1.9.	MODELS MURINS D'ESTUDI DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER.....	17
2.	MICROBIOTA INTESTINAL	17
2.1.	MICROBIOTA INTESTINAL EN LES DIFERENTS ETAPES DE LA VIDA	18
2.2.	EIX INTESTÍ-CERVELL.....	20
2.2.1.	Via neural	20
2.2.2.	Via immunològica	21
2.2.3.	Via endocrina	21
2.2.4.	Via metabòlica	22
2.3.	MICROBIOTA, PLASTICITAT SINÀPTICA I MEMÒRIA.....	24
3.	DISBACTERIOSI I MALALTIA D'ALZHEIMER	24
3.1.	MICROBIOTA, VIA AMILOIDOGÈNICA I HIPERFOSFORILACIÓ DE LA PROTEÏNA TAU.....	25
3.2.	MICROBIOTA, NEUROINFLAMACIÓ I ACTIVACIÓ MICRÒGLIA.....	26
4.	DIETA, MALALTIA D'ALZHEIMER I EIX INTESTÍ-CERVELL	27
4.1.	PROBIÒTICS I PREBIÒTICS	28
4.2.	SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES	29
4.2.1.	Efectes anti-inflamatoris del plasma porcí assecat per atomització.....	30
4.2.2.	Efectes prebiòtics del plasma porcí assecat per atomització	32
II.	PLANTEJAMENT I OBJECTIUS.....	35
III.	RESULTATS.....	39
	<i>Article 1: Dietary spray-dried porcine plasma reduces neuropathological Alzheimer's disease hallmarks in SAMP8 mice.....</i>	41
	<i>Article 2: The neuroprotective effects of spray-dried porcine plasma supplementation involve the microbiota-gut-brain axis.....</i>	59
IV.	DISCUSSIÓ.....	85
V.	CONCLUSIONS.....	101
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	105
VII.	ANNEX.....	137

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Via no amiloidogènica del processament de la proteïna precursora amiloide (APP).....	5
Figura 2. Via amiloidogènica del processament de la proteïna precursora amiloide (APP).....	6
Figura 3. Hiperfosforilació de la proteïna tau.....	9
Figura 4. Densitat de poblacions microbianes al llarg del tracte gastrointestinal.....	18
Figura 5. Eix microbiota-intestí-cervell	23
Figura 6. Àrees on la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) ha mostrat efectes antiinflamatoris.....	31
Figura 7. Efectes de la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) sobre els marcadors neuropatològics de l'AD.....	93
Figura 8. Efectes de la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) sobre l'eix microbiota-intestí-cervell.....	98

ÍNDIX D'ABREVIATURES

A β	Beta amiloide, <i>Amyloid beta</i>
AD	Malaltia de l'Alzheimer, <i>Alzheimer's disease</i>
ADAM10	Proteïna 10 que conté dominis de desintegrina i metaloproteïna, <i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
AICD	Domini intracel·lular de la proteïna precursora amiloide, <i>Amyloid precursor protein intracellular domain</i>
ANS	Sistema nerviós autònom, <i>Autonomic nervous system</i>
APOE	Apolipoproteïna E, <i>Apolipoprotein E</i>
APP	Proteïna precursora amiloide, <i>Amyloid precursor protein</i>
Arg1	Arginasa 1, <i>Arginase 1</i>
BACE1	Beta-secretasa 1, <i>Beta-secretase 1</i>
BBB	Barrera hematoencefàlica, <i>Blood-brain barrier</i>
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMAA	Beta-N-metilamino-L-alanina, <i>Beta-N-methylamino-L-alanine</i>
CD	Clúster de diferenciació, <i>Cluster of differentiation</i>
CDK5	Quinasa dependent de ciclina 5, <i>Cyclin dependent kinase 5</i>
CNS	Sistema nerviós central, <i>Central nervous system</i>
ENS	Sistema nerviós enteric, <i>Enteric nervous system</i>
GABA	Àcid gamma-aminobutíric, <i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí, <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GF	Lliures de microorganismes, <i>Germ-free</i>
GIT	Tracte gastrointestinal, <i>Gastrointestinal tract</i>
GSK3 β	Glicogen sintasa quinasa 3 beta, <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HPA	Hipotalàmic-hipofisiari-suprarenal, <i>Hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
IBD	Malaltia inflamatòria intestinal, <i>Inflammatory bowel disease</i>
IDE	Enzim degradant d'insulina, <i>Insulin-degrading enzyme</i>

Ig	Immunoglobulina, <i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleucines, <i>Interleukin</i>
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
KO	Bloqueig de gens, <i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolisacàrid, <i>Lypopolysaccharide</i>
LTD	Depressió a llarg termini, <i>Long-term depression</i>
LTP	Potenciació a llarg termini, <i>Long-term potentiation</i>
NEP	Neprilisina, <i>Neprylisin</i>
NFT	Cabdells neurofibrilars, <i>Neurofibrillary tangles</i>
NF-κB	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades, <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Assassins naturals, <i>Natural killers</i>
NMDAR	Receptor N-metil-d-aspartat, <i>N-methyl-d-aspartate receptor</i>
NO	Òxid nítric, <i>Nitric oxide</i>
PSEN	Presenilina, <i>Presenilin</i>
p-tau	Tau hiperfosforilada, <i>Hyperphosphorylated tau</i>
RNS	Espècies reactives de nitrogen, <i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	Espècies reactives d'oxigen, <i>Reactive oxygen species</i>
SAMP8	Propensos a la senescència accelerada 8, <i>Senescence-prone accelerated</i>
sAPP	Proteïna precursora amiloide soluble, <i>Soluble amyloid precursor protein</i>
SCFA	Àcids grassos de cadena curta, <i>Short-chain fatty acids</i>
SDP	Plasma porcí assecat per atomització, <i>Spray-dried porcine plasma</i>
SEB	Enterotoxina d' <i>Staphylococcus aureus</i> B, <i>Staphylococcus aureus enterotoxin B</i>
TGF-β	Factor de creixement transformant-beta, <i>Transforming growth factor-beta</i>
Th	T col·laboradors, <i>T helper</i>

ABREVIATURES

TLR	Receptors de tipus Toll, <i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	Factor de necrosi tumoral alfa, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TREM2	Receptor desencadenant expressat a les cèl·lules mieloides 2, <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
YM1	Proteïna similar a la quitinasa 3 (Chil3), <i>Chitinase-like protein 3 (Chil3)</i>



RESUM



La malaltia d'Alzheimer (AD) és el tipus de demència més comú durant l'envelliment i una de les malalties neurodegeneratives més severes. L'AD es caracteritza per una pèrdua de memòria, la deposició de pèptids beta-amiloïdes (A β) i l'agregació de la proteïna Tau hiperfosforilada (p-tau), que promouen la formació de les plaques amiloïdes i els cabdells neurofibrilars, respectivament; així com la neuroinflamació i l'activació de la micròglia. D'altra banda, durant l'envelliment, hi ha disbacteriosi, i s'indueix un increment dels bacteris patogènics, la permeabilitat intestinal i l'estat pro-inflamatori. Conseqüentment, la disbacteriosi pot contribuir al desenvolupament de l'AD a través de diferents elements de l'eix intestí-cervell. La suplementació dietètica amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) redueix el deteriorament cognitiu dels ratolins SAMP8 envellits, té efectes anti-inflamatoris a la mucosa intestinal en diferents models murins d'inflamació; i efectes prebiòtics en animals joves. Atesos aquests antecedents, la hipòtesi que es planteja en aquesta tesi és que els efectes prebiòtics del plasma assecat poden estar implicats en els seus efectes neuroprotectors. Es van utilitzar ratolins SAMP8 de 2 mesos d'edat (grup de referència) i de 6 mesos d'edat, que es van dividir en dos grups segons el pinso experimental que van rebre durant 4 mesos, pinso control o pinso suplementat amb l'SDP al 8%. Els ratolins envellits presentaven un empitjorament de la funció cognitiva amb una reducció de la memòria a curt i llarg termini, a més d'una menor abundància cortical d'una neurotrofina relacionada amb la plasticitat sinàptica, com és el BDNF. La suplementació amb l'SDP va prevenir aquests efectes. La senescència va promoure l'augment del fragment beta soluble de la proteïna precursora amiloide (sAPP- β) i la generació de pèptids neurotòxics A β . La suplementació amb l'SDP va disminuir l'abundància d'aquests marcadors, així com també va reduir l'expressió de la β -secretasa 1 (*Bace1*), essencial en aquesta via amiloidogènica. L'envelliment va incrementar l'abundància de la proteïna p-tau i de les proteïnes quinases encarregades de la seva hiperfosforilació, la qual cosa es va prevenir amb la suplementació amb l'SDP. La micròglia, les cèl·lules immunitàries específiques del sistema nerviós central, estava més activada al còrtex dels ratolins senescents, i aquest procés va anar acompanyat d'una major neuroinflamació. La suplementació amb l'SDP va atenuar la neuroinflamació i l'activació de la micròglia posant de manifest els seus efectes anti-inflamatoris. Així doncs, la suplementació amb l'SDP redueix els marcadors neuropatològics de l'AD. Paral·lelament, es va demostrar que els ratolins SAMP8 envellits mostraven un major grau d'inflamació sistèmica i a la mucosa de còlon. Aquest procés inflamatori anava acompanyat d'una disminució de l'expressió de les proteïnes relacionades amb la producció de moc (*Muc2*, *Tff3*) i del complex d'unió (Ocludina). La suplementació amb l'SDP va atenuar la inflamació

sistèmica i del còlon, i va millorar l'estructura de la barrera. Aquests efectes de l'envelliment es van relacionar amb la reducció de l'abundància de bacteris promotors de la salut, com per exemple, els gèneres *Lactobacillus* i *Pediococcus*, i en va incrementar d'altres associats amb la inflamació, com els gèneres *Johnsonella* i *Erysipelothrix*. En canvi, la suplementació amb l'SDP va exercir efectes prebiòtics, i va induir el creixement dels bacteris probiòtics i en va disminuir els patogènics. En conclusió, els efectes anti-inflamatoris de la suplementació amb l'SDP redueixen la inflamació sistèmica, a la mucosa de còlon, a més presenta propietats neuroprotectores en els ratolins envellits; aquests efectes es correlacionen amb la promoció d'espècies probiòtiques, la qual cosa suggereixen que l'eix intestí cervell pot estar involucrat en l'efecte de l'SDP sobre la progressió de l'AD.

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia during aging and one of the most severe neurodegenerative diseases. AD is characterized by memory loss, amyloid-beta (A β) deposition, aggregation of hyperphosphorylated Tau protein (p-tau), leading to neuroinflammation and activation of microglia. Aging is also accompanied by dysbiosis, which is an alteration of the microbiota, where increases pathogenic bacteria; as well as increased intestinal permeability and inflammation. Consequently, dysbiosis may contribute to the development of AD via the gut-brain axis. Supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) attenuates cognitive decline in aged SAMP8 mice, reduces inflammatory response of the intestinal mucosa in different murine models and shows prebiotic effects in weaned animals. Therefore, the hypothesis proposed is that the prebiotic effects of SDP may be involved in its neuroprotective effects. Experiments were performed in 2-month-old SAMP8 mice fed a standard diet and in 6-month-old SAMP8 mice fed a control or an 8% SDP supplemented diet for 4 months. Aging impaired short- and long-term memory, reduced cortical BDNF abundance, and increased soluble beta amyloid precursor protein (sAPP- β) and A β peptides. SDP supplementation prevented all these aging effects, and reduced the expression of β -secretase1 (*Bace1*), which is essential in the amyloidogenic pathway. Aging increased the abundance of p-tau and the kinases responsible for its hyperphosphorylation, which was also prevented by SDP supplementation. Senescence activated microglia, the immune cells specific to the central nervous system, increasing neuroinflammation. These effects were attenuated by SDP supplementation. Thus, SDP supplementation reduces neuropathological markers of AD. In parallel, aged SAMP8 mice showed increased systemic and colonic inflammation, as well as, reduced *Muc2*, *Tff3* and Occludin expression. SDP supplementation attenuated systemic and colonic inflammation, and improved barrier structure. Aging reduced the abundance of health-promoting bacteria, such as *Lactobacillus* and *Pediococcus*, and increased inflammation-associated bacteria, such as *Johnsonella* and *Erysipelothrix*. In contrast, SDP supplementation induced the growth of probiotic bacteria and decreased the pathogenic ones. In conclusion, SDP supplementation has anti-inflammatory and neuroprotective effects, as well as prebiotic properties in aged mice, suggesting that the gut-brain axis may be involved in the effect of SDP on AD progression.



INTRODUCCIÓ



1. MALALTIA D'ALZHEIMER

La malaltia de l'Alzheimer (AD, *Alzheimer's disease*) és una malaltia neurodegenerativa que afecta sobretot a les àrees cerebrals del còrtex i de l'hipocamp. És el tipus més comú de demència en les persones d'edat avançada. Actualment, hi ha una prevalença mundial d'uns 50 milions de persones amb demència, la qual augmenta cada any, juntament amb l'increment de l'esperança de vida (Soria Lopez et al., 2019). L'augment de la prevalença té un gran impacte sobre la família i l'entorn de la persona afectada, així com un elevat cost econòmic per la societat. Es calcula que a l'any 2050, la prevalença de la demència s'haurà triplicat i que la despesa anual a Estats Units podria excedir els 600 bilions de dòlars (d'Estats Units) (Lane et al., 2018). En l'actualitat, no hi ha cap tractament farmacològic que pugui curar l'AD. Per aquest motiu, hi ha un interès creixent en la prevenció per aconseguir enrederir el desenvolupament i la incidència de la malaltia (Soria Lopez et al., 2019).

Clínicament, l'AD es caracteritza per una pèrdua progressiva de la memòria episòdica i de la funció cognitiva, com per exemple l'aprenentatge i l'ús del llenguatge. Les persones amb AD acostumen a tenir alteracions del comportament com l'apatia, l'agressivitat i/o la depressió. Molecularment, els signes distintius de l'AD són la deposició de pèptids β -amiloides ($A\beta$, *amyloid beta*), l'agregació de la proteïna tau hiperfosforilada (*p-tau*, *hyperphosphorylated tau*), que promouen la formació de les plaques amiloides i dels cabdells neurofibril·lars (NFT, *neurofibrillary tangles*), respectivament, així com neuroinflamació, microgliosi i astrogliosi (Masters et al., 2015).

1.1. PÈRDUA DE MEMÒRIA I PLASTICITAT SINÀPTICA

Una de les característiques principals de l'AD és la pèrdua de la funcionalitat cognitiva, la memòria, l'aprenentatge. La neurotoxicitat causada pels depòsits d' $A\beta$, els NFT i la neuroinflamació subjacent a l'AD produeixen una alteració de l'estructura neuronal, de la plasticitat sinàptica i la mort neuronal, la qual cosa implica la pèrdua progressiva de la memòria (Ferreira i Klein, 2011; Peineau et al., 2018; Tracy i Gan, 2017).

La plasticitat sinàptica és el procés neuronal necessari pel desenvolupament i la consolidació de la memòria i l'aprenentatge i l'homeòstasi dels circuits neurals. La plasticitat sinàptica consisteix en la modificació estructural de les connexions sinàptiques modulant-ne la seva eficàcia i activitat (Amtul i Atta-Ur-Rahman, 2015). Aquestes modificacions funcionals es poden potenciar o afeblir gràcies als processos de potenciació

a llarg termini (LTP, *long-term potentiation*) i depressió a llarg termini (LTD, *long-term depression*), respectivament (Peineau et al., 2018). En el procés de LTP hi ha un engrandiment de les espines dendrítiques, un augment de neurotransmissors presinàptics i de la força i densitat postsinàptica, la qual cosa, fa augmentar l'activitat neuronal. En aquest procés tenen gran rellevància l'activitat de neurotrofines com el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), així com dels receptors de N-metil-d-aspartat (NMDAR, *N-methyl-d-aspartate receptor*) i α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionat (AMPA, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*) (Lu et al., 2014; Wang i Reddy, 2017).

El BDNF és la neurotrofina més abundant del cervell, indueix la LTP, afavoreix l'increment de la densitat de les espines dendrítiques i, per tant, té una gran importància sobre la plasticitat sinàptica, la diferenciació neuronal i el manteniment de les neurones (Lu et al., 2014). L'abundància de BDNF està disminuïda en pacients de l'AD, i de fet, els pèptids A β poden inhibir directament la seva maduració (Tanila, 2017).

El NMDAR sinàptic és un receptor de glutamat que quan s'activa indueix la LTP, a través de l'activació de la Ca²⁺/calmodulina proteïna quinasa II i la LTD, per l'activació d'enzims fosfatases, la qual cosa inicia la plasticitat sinàptica. A més, suprimeix les senyals proapoptòtiques i de les caspases, entre d'altres, i per tant, estimula la supervivència neuronal. D'altra banda, durant l'AD, els pèptids A β indueixen l'estimulació de NMDAR extrasinàptic, el qual promou la mort cel·lular (Wang i Reddy, 2017).

1.2. PROCESSAMENT DE LA PROTEÏNA PRECURSORA AMILOIDE

La proteïna precursora amiloide (APP, *amyloid precursor protein*) és una glicoproteïna que participa en diferents activitats biològiques implicades en l'homeòstasi, i el desenvolupament neuronal. L'APP forma part de la família que també conté la proteïna similar a APP (APLP, *APP-like protein*) 1 i APLPL2. Totes són proteïnes transmembrana tipus I i són processades de forma semblant. L'APP és la única que conté el domini A β i és processada per unes proteases que fan dues escissions seqüencials. Aquest processament pot ser seguint la via no amiloidogènica o la via amiloidogènica. Quan se segueix la via amiloidogènica s'alliberen els pèptids A β que es poden depositar per formar les plaques amiloides (Zhang Y et al., 2011).

1.2.1. Via no amiloidogènica

La via no amiloidogènica del processament de l'APP es representa a la **Figura 1** i consisteix, primerament, en una escissió de la proteïna per un enzim α -secretasa, la proteïna 10 que conté dominis de desintegrina i metaloproteïnasa (ADAM10, *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*). ADAM10 talla l'APP per l'interior del domini A β , i allibera un fragment soluble de l'APP (sAPP α , *soluble amyloid precursor protein*) i un fragment C-terminal de 83 aminoàcids (C83). Posteriorment, es produeix l'escissió de C83 per un enzim γ -secretasa, amb la qual s'allibera el domini intracel·lular de l'APP (AICD, *amyloid precursor protein intracellular domain*) i el pèptid p3 (Yuan et al., 2017).

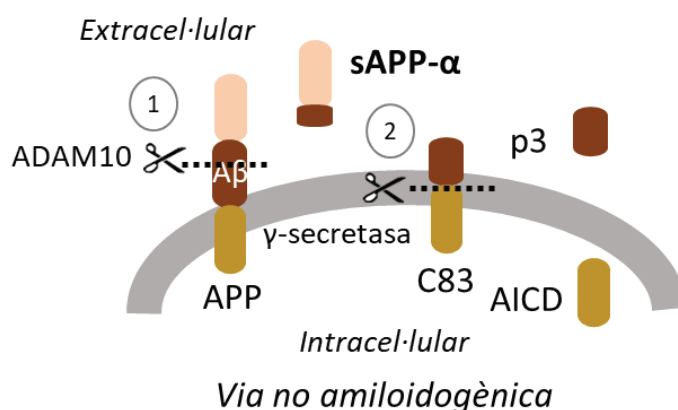


Figura 1. Via no amiloidogènica del processament de la proteïna precursora amiloide (APP). La via no amiloidogènica consisteix en les escissions consecutives realitzades per l' α -secretasa (ADAM10) i la γ -secretasa, on s'allibera sAPP- α i el fragment p3, respectivament. AICD: domini intracel·lular de l'APP, *amyloid precursor protein intracellular domain*; C83 fragment C-terminal de 83 aminoàcids.

1.2.2. Via amiloidogènica

El processament aberrant de l'APP o via amiloidogènica consisteix en les accions seqüencials de les secretases β i γ , tal i com es representa a la **Figura 2**. Primerament, beta-secretasa 1 (BACE1, *beta-secretase 1*) talla l'APP i es forma la proteïna soluble sAPP- β i el fragment C99 (Zhang Y et al., 2011). Hi ha estudis que mostren que sAPP- β pot participar en l'apoptosi neuronal i la degeneració de l'axó a través de la seva unió al receptor DR6 (*death receptor 6*) (Nikolaev et al., 2009). A més, l'acumulació de C99 pot induir alteracions en la plasticitat sinàptica, independentment de la deposició d'A β (Bourgeois et al., 2018).

Així doncs, BACE1 té un paper essencial en la via amiloidogènica i és el pas determinant per a la generació d'A β i dels altres fragments neurotòxics. Per això, actualment, s'està estudiant la inhibició d'aquesta proteasa com a possible tractament de l'AD. De fet, la

inhibició de BACE1 prevé la formació d'A β , i millora la funció cognitiva tant en pacients que pateixen l'AD, com models d'AD en ratolins transgènics (Moussa-Pacha et al., 2020). La inhibició de BACE1 redueix la producció d'aquests pèptids i, tal com s'ha descrit anteriorment, augmenta l'activitat neuronal i la memòria en un model d'AD familiar en ratolins (Das i Yan, 2017).

A continuació del tall de BACE1, hi ha una escissió per part de la γ -secretasa que allibera els pèptids A β i l'AICD. L'A β pot formar agregats insolubles que constitueixen les plaques amiloides o plaques senils (Zhang Y et al., 2011). Hi ha dos tipus d'A β , l'A β_{40} i l'A β_{42} . L'A β_{40} és la més abundant en la forma soluble, l'A β_{42} és la més neurotòxica, la qual es troba de forma majoritària a les plaques senils (Reiss et al., 2018).

L'agregació d'A β és neurotòxica i produeix radicals lliures com per exemple espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactives oxygen species*) que oxiden les proteïnes i lípids, les quals deterioren la integritat de la membrana, modifiquen enzims com la glicogen sintasa (GS, *glycogen synthase*) i alteren l'activitat cel·lular, fins a produir l'apoptosi neuronal (Chen GF et al., 2017; Reiss et al., 2018). A més, l'increment de l'abundància d'A β estimula el sistema immunitari innat i activa diferents receptors similars a *toll* (TLR, *toll-like receptor*), la micròglia, i, finalment, indueix una resposta inflamatòria (Heneka et al., 2015a).

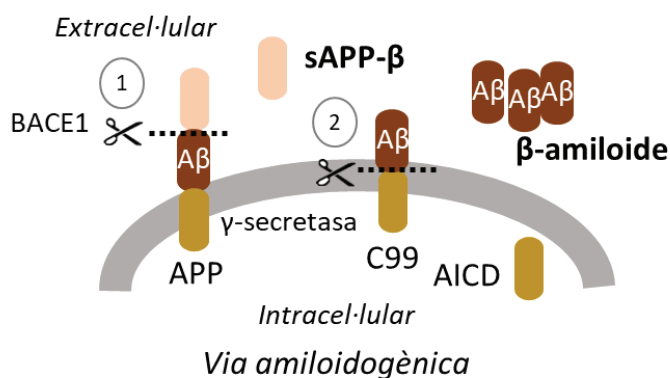


Figura 2. Via amiloidogènica del processament de la proteïna precursora amiloide (APP). La via amiloidogènica consisteix en l'escissió d'APP per part de la β -secretasa (BACE1) i la γ -secretasa, on s'allibera sAPP- β i A β , respectivament. AICD: domini intracel·lular de l'APP, *amyloid precursor protein intracellular domain*; C99 fragment C-terminal de 99 aminoàcids.

1.2.3. Eliminació dels pèptids A β

Els nivells d'A β varien en funció de la seva síntesi i eliminació. La sobreproducció d'A β és característica de l'AD precoç, en canvi la disminució de la seva degradació és més típica de l'AD tardana (Mawuenyega et al., 2010).

Els pèptids A β es poden eliminar a través de la barrera hematoencefàlica (BBB, *blood-brain barrier*) cap al líquid cefalorraquidi o al líquid intersticial, on els astròcits i la micròglia participaran en la seva eliminació, o bé, poden ser degradats per hidròlisi de manera enzimàtica (Tarasoff-Conway et al., 2015). La hidròlisi d'A β és realitzada principalment per dues proteases: la neprilisina (NEP, *neprylisin*) i l'enzim degradant d'insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*). NEP és una glicoproteïna de la família de les metaloendopeptidases, la qual s'expressa a les membranes pre- i post-sinàptiques i es pot trobar també al líquid cefalorraquidi. La NEP participa en la regulació de neuropèptids, tot i que la seva funció principal és la degradació d'A β (Miners et al., 2008). D'altra banda, l'IDE es troba majoritàriament al citosol, tot i que també es pot trobar als mitocondris i als peroxisomes. Tot i que la seva funció principal és en el metabolisme de la insulina, també pot actuar sobre altres substrats, com són els A β , promovent la seva eliminació (Nalivaeva i Turner, 2019). Tant, NEP com IDE tenen una regulació de realimentació positiva, en la qual l'expressió dels dos enzims augmenta a mesura que augmenta l'abundància d'AICD (Lauer et al., 2020).

1.3. HIPERFOSFORILACIÓ PROTEÏNA TAU

Un altre signe distintiu de l'AD és la hiperfosforilació de la proteïna tau. Tau és una fosfoproteïna que és abundant al soma i a l'axó de les neurones del sistema nerviós central (CNS, *central nervous system*), tot i que també es pot localitzar en altres compartiments i altres tipus cel·lulars, com són oligodendròcits i astròcits. La proteïna tau conté molts residus serina/treonina que poden ser fosforilats (Higuchi et al., 2002). La proteïna tau promou l'estabilització dels microtúbuls, els quals són estructures formades per dues proteïnes globulars, la tubulina alfa i la beta, que s'encarreguen del transport intracel·lular d'òrgans, com per exemple, mitocondris, vesícules o lisosomes, entre d'altres. La proteïna tau, a més, participa en el manteniment de l'estructura cel·lular, el correcte funcionament de l'axó i de l'activitat sinàptica (Chong et al., 2018). L'activitat de la proteïna tau es regula per fosforilació, la qual cosa produeix un canvi conformacional de la proteïna que redueix l'afinitat cap als microtúbuls i dificulta la seva estabilització, tal com mostra la **Figura 3**. Les quinases principals que regulen i fosforilen la tau són la quinasa dependent de ciclina 5 (CDK5, *cyclin dependent kinase 5*) i la quinasa glicogen sintasa 3 β (GSK3 β , *glycogen synthase kinase 3 β*) (Lee S et al., 2011).

1.3.1. Quinasa dependent de ciclina 5 (CDK5)

La CDK5 és una quinasa que fosforila els residus serina-treonina de la proteïna tau i d'altres proteïnes relacionades amb el desenvolupament del CNS. La CDK5 es troba inactivada i l'activa els activadors localitzats a la membrana p35 i p39 (o per les seves formes truncades p25 i p29). Quan hi ha un increment de la concentració intracel·lular de calci, la calpaina escindeix p35 i p39 per formar p25 i p29 que són les que activen CDK5. L'associació CDK5/p25 és la més estable, però hiperactiva la quinasa, formant un complex neurotòxic. CDK5/p25 promou la hiperfosforilació incontrolada dels substrats de la quinasa, com per exemple la proteïna tau. Aquesta hiperfosforilació de tau altera la funció sinàptica, produeix l'apoptosi neuronal, l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial i accelera la neurodegeneració de l'AD (Liu SL et al., 2016). A més, CDK5 pot fosforilar també l'APP, la qual cosa indueix la via amiloidogènica del processament de la proteïna i augmenta l'alliberació de pèptids A β (Liu F et al., 2003).

1.3.2. Glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK3 β)

La GSK3 β és una altra quinasa que fosforila específicament residus serina-treonina que s'associa a la resistència a la insulina, a la inflamació sistèmica i a l'AD. La GSK3 β es troba de forma abundant al cervell i s'ha associat amb la neuroinflamació, ja que activa la via del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF- κ B, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*); a més dels receptors TLR i, per tant, indueix la producció de citocines pro-inflamatòries. A més, també contribueix a l'apoptosi neuronal i al dèficit de memòria i de l'aprenentatge (Souder i Anderson, 2019). La GSK3 β es regula per fosforilació, ja que depenent de la posició on es produeixi la fosforilació, la quinasa s'activarà o s'inactivarà. Per exemple, GSK3 β s'inactiva quan és fosforilada a la posició serina 9, però en canvi s'activa quan es fosforila la tirosina-216 (Beurel et al., 2015). A més, GSK3 β contribueix a la fosforilació anormal de la proteïna tau i, per tant, participa en la formació d'aquestes estructures neuropatològiques (Lee S et al., 2011).

1.3.3. Cabdells neurofibril·lars

La hiperfosforilació de la proteïna tau (p-tau) provoca un canvi conformacional, el qual produeix la formació d'oligòmers que finalment s'agregaran i formaran uns filaments helicoidals, els NFT. Els NFT són una de les característiques principals que es poden observar en pacients amb l'AD (Chong et al., 2018).

El canvi conformacional de la proteïna tau i la formació d'oligòmers són senyals prematurs de la degeneració neuronal, prèvies a la formació dels NFT. Aquestes formacions promouen sinaptotoxicitat i deteriorament sinàptic, la qual cosa es tradueix en neurodegeneració (Tai HC et al., 2014).

El despreniment de la proteïna tau dels microtúbuls produeix els NFT, la qual cosa causa una disrupció del transport axonal dels mitocondris. A més, l'abundància de la sinaptofisina, una proteïna que participa en la transmissió sinàptica, es redueix quan hi ha aquestes formacions, desregulant les sinapsis de forma independent a la formació d'A β (Callahan et al., 2002).

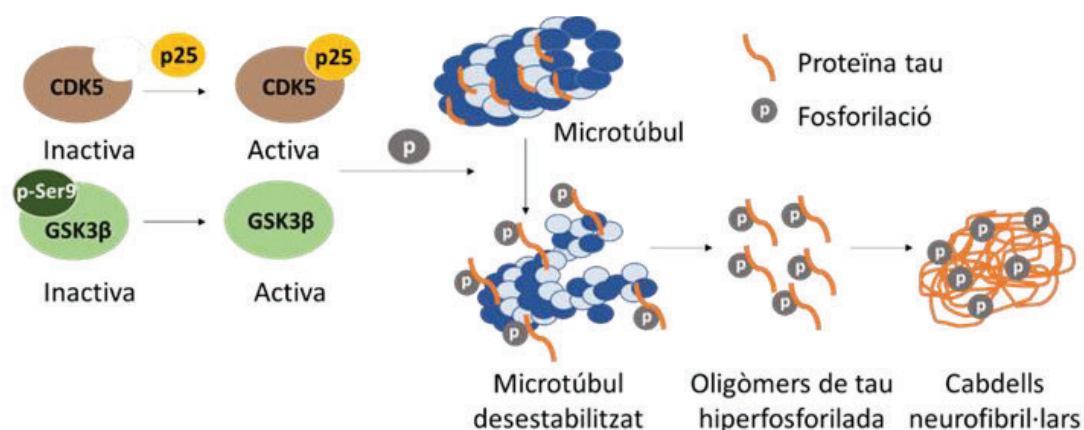


Figura 3. Hiperfosforilació de la proteïna tau. La quinasa CDK5 s'activa principalment per p25, mentre que la quinasa GSK3- β està inactivada quan està fosforilada en la posició Ser9 i, per tant, s'activa quan perd aquesta fosforilació. Una vegada activades, ambdues quinases activades seran les principals responsables de fosforilar la proteïna tau. Quan la proteïna tau és fosforilada, perd la seva funció i la seva afinitat cap als microtúbuls i aquests es desestabilitzen. Seguidament, la proteïna tau hiperfosforilada pateix un canvi conformacional que indueix la formació d'oligòmers i la posterior agregació en filaments helicoidals anomenats cabdells neurofibril·lars. CDK5: Quinasa dependent de ciclina 5 (*Cyclin dependent kinase 5*); GSK3 β : Quinasa glicogen sintasa 3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*).

1.4. NEUROINFLAMACIÓ

La neuroinflamació es produeix per la secreció de mediadors inflamatoris com citocines pro-inflamatòries, quimocines, components del sistema del complement, i radicals lliures que afecten al funcionament del cervell i, conseqüentment, tenen un paper essencial en el progrés de l'AD (Dansokho i Heneka, 2018). De fet, aquests mediadors inflamatoris estan augmentats en les primeres etapes del desenvolupament de l'AD i s'han proposat com a biomarcadors per al diagnòstic de la malaltia (Shen et al., 2019).

1.4.1. Citocines pro-inflamatòries

L'augment de citocines pro-inflamatòries s'han relacionat amb un increment de la deposició d'A β en ratolins senescents i en models transgènics de l'AD (Patel et al., 2005) i també en pacients que pateixen aquesta malaltia (Park et al., 2020). L'agregació de la proteïna tau també indueix una resposta inflamatòria via NF- κ B que causa la secreció de citocines inflamatòries al cervell (Srinivasan et al., 2015). Aquest procés present en les NFT participa en el deteriorament sinàptica, la inflamació crònica present a l'AD, i, finalment la neurodegeneració (Chong et al., 2018).

Les citocines pro-inflamatòries com les interleucines (IL, *interleukin*) IL-1 β , IL-6, IL-18, o el factor de necrosi tumoral-alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor-alpha*) poden deteriorar la funció neuronal i suprimir la transmissió sinàptica. A més, en resposta dels dipòsits de A β , la micròglia i els astròcits s'activa i produeix un increment de la neuroinflamació (Heneka et al., 2015b; Sugama et al., 2004). A més, la citocina pro-inflamatòria IL-17 promou el reclutament de les cèl·lules immunitàries, com per exemple de la micròglia activada (Chen J et al., 2020).

1.4.2. Quimocines

Les quimocines són pèptids de la família de les citocines que atrauen les cèl·lules immunitàries cap a la zona danyada i, per tant, induir, la quimiotaxi. A l'AD, les quimocines participen en la migració de la micròglia cap a les àrees de neuroinflamació, com les plaques senils, i en la seva activació. També modulen la funció dels astròcits, incrementant l'expressió de mediadors d'inflamació (Savarin-Vuillat i Ransohoff, 2007). Així mateix, s'han relacionat amb l'augment de la deposició neurotòxica d'A β , i l'alteració de la funció cognitiva i la memòria (Sungho Lee et al., 2010; Lee YK et al., 2009).

1.4.3. Caspases

Les caspases són una família de proteases específiques de cisteïnil-aspartat que indueixen l'apoptosi cel·lular. S'ha descrit que les caspases poden modular el sistema immunitari i activar la secreció de citocines proinflamatòries com la IL1- β o la IL-18 (Keller et al., 2008). L'activació de les caspases està incrementada al cervell de pacients que pateixen l'AD i co-localitzen amb els depòsits d'A β i els NFT (Rohn et al., 2001; Su et al., 2001).

1.4.4. Sistema del complement

El sistema del complement forma part del sistema immunitari innat i participa en la defensa contra patògens. A l'AD, la formació de depòsits d'A β s'associa a l'activació d'aquest sistema (Veerhuis et al., 2011). A més, el sistema del complement podria potenciar la pèrdua de sinapsis, la qual cosa acceleraria la progressió de la malaltia (Stephan et al., 2012).

1.4.5. Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu es caracteritza per l'alliberació de radicals lliures que es relacionen amb un dany al DNA mitocondrial, l'oxidació de proteïnes i lípids i una major permeabilització de les membranes cel·lulars, factors que contribueixen a la neurodegeneració (Simpson i Oliver, 2020). La neuroinflamació crònica present a l'AD pot alterar el funcionament dels mitocondris i incrementar els nivells de radicals lliures, com per exemple, les ROS i les espècies reactives de nitrogen (RNS, *reactive nitrogen species*) (White et al., 2017). També s'ha descrit que les citocines pro-inflamatòries IL-1 β i TNF- α produeixen un increment de l'expressió de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), enzim que produeix RNS (Akama i Van Eldik, 2000).

1.5. ACTIVACIÓ DE LA MICRÒGLIA O MICROGLIOSI

La micròglia són cèl·lules glials mieloides que formen part del sistema immunitari innat del CNS. Les seves funcions són: la detecció de canvis en l'ambient; la defensa contra estímuls nocius, inclosos patrons moleculars associats a patògens (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) i patrons moleculars associats a danys (DAMP, *damage-associated molecular patterns*); i la reparació de sinapsis i el manteniment de l'homeòstasi de la mielina. La micròglia detecta els estímuls a través de diferents sensors i receptors, com per exemple els TLR i els receptors similars als dominis d'oligomerització d'unió als

nucleòtids (NLR, *nucleotide-binding oligomerization domains-like receptors*) (Kwon i Koh, 2020). A més, la micròglia pot alliberar BDNF, neurotrofina que promou la formació de sinapsi i, per tant, millora les funcions cognitives de memòria i aprenentatge (Parkhurst et al., 2013).

La micròglia al cervell madur es troba majoritàriament inactiva. En resposta a certs estímuls immunològics o danys cerebrals, la micròglia s'activa, canviant la seva estructura cel·lular, i presentant una sèrie de marcadors de membrana. Quan s'activa, la micròglia participa en el manteniment homeostàtic, en la regulació del desenvolupament cerebral i en la immunitat innata. A més, pot tenir un paper anti-inflamatori secretant citocines com IL-10 o factor de creixement transformant-beta (TGF- β , *transforming growth factor-beta*) a la zona afectada (Block et al., 2007).

Quan hi ha una exposició prolongada a l'estímul, la micròglia s'hiperactiva i produeix neurotoxicitat, amb la secreció en excés de citocines pro-inflamatòries, òxid nítric (NO, *nitric oxide*) i ROS, entre d'altres. Seguidament, augmenta la seva proliferació, la qual cosa, incrementa encara més la resposta inflamatòria, que finalment produeix neurodegeneració (Sarlus i Heneka, 2017). La micròglia hiperactivada o microgliosi també pot produir la mort neuronal i la fagocitosi descontrolada d'espines dendrítiques i axons terminals que malmeten les sinapsis (Bisht et al., 2016).

La micròglia s'activa en presència de depòsits d'A β i agregats de la proteïna tau. En un primer pas, la micròglia elimina aquests components, però a mida que progressa la malaltia, s'altera la resposta immunitària microglial i pot contribuir a la neurotoxicitat (Vogels et al., 2019). De fet, al voltant de les plaques senils i dels NFT en pacients que pateixen l'AD i models d'AD de ratolins transgènics es troba micròglia activada (Akama i Van Eldik, 2000; Nilson et al., 2017).

D'altra banda, segons la seva funcionalitat es pot classificar en micròglia de tipus M1 o pro-inflamatòria i M2 o anti-inflamatòria. Tot i que actualment existeix controvèrsia, ja que s'ha observat que en una situació de neurodegeneració la micròglia expressa tant els marcadors neurotòxics com els neuroprotectors (Ransohoff, 2016).

1.5.1. Micròglia M1

La micròglia tipus M1 o activació clàssica actua com a primera línia de defensa, induint una resposta pro-inflamatòria via NF- κ B i iNOS. A més, aquest tipus de micròglia està associada amb la producció de citocines pro-inflamatòries i quimocines, com per exemple, la IL-1 β , la IL-6, la IL-12, el TNF- α i la proteïna quimiotàctica de monòcits 1 (MCP-1, *monocyte*

chemoattractant protein-1). A més, genera estrès oxidatiu, ja que secreta superòxid, NO i ROS. Aquests mediadors poden ser neurotòxics si se secreten de forma crònica. El fenotip de la micròglia M1 es caracteritza per marcadors cel·lulars com el clúster de diferenciació (CD, *cluster of differentiation*) 86 (CD86), el complex d'histocompatibilitat principal II (MHCII, *major histocompatibility complex II*) i l'expressió d'iNOS i de les diferents citocines pro-inflamatòries (Tang i Le, 2016).

1.5.2. Micròglia M2

La micròglia tipus M2 o activació alternativa té un paper neuroprotector, ja que participa en la restauració de processos, així com la fagocitosi de restes cel·lulars, la neurogènesi o la remielinització, entre d'altres. Aquest tipus de micròglia es caracteritza per la inducció d'una resposta anti-inflamatòria amb la secreció d'IL-4 i IL-13, IL-10 i TGF- β , així com factors de creixement i factors neurotròfics que participen a la reparació del teixit i la reconstrucció de la matriu extracel·lular (Hu et al., 2015).

Arginasa 1 (ARG1, *arginase 1*) i la proteïna similar a la quitinasa 3 (YM1, *chitinase-like protein 3* (*Chil3*)) són alguns dels marcadors característics de la micròglia M2 i que s'associen amb la producció de citocines anti-inflamatòries. ARG1 suprimeix la producció de NO, ja que competeix amb iNOS pel mateix substrat, l'arginina. D'altra banda, els antagonistes de YM1, proteïna que protegeix la matriu extracel·lular, són l'endotoxina lipopolisacàrid (LPS, *lypopolysaccharide*) i l'interferó-gamma (IFN- γ , *interferon gamma*) (Cherry et al., 2014).

El receptor desencadenant expressat a les cèl·lules mieloides 2 (TREM2, *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) és un marcador d'activació de la micròglia que té un efecte neuroprotector, ja que redueix la pèrdua neuronal i promou la supervivència de la micròglia. Aquest receptor està relacionat amb les respostes inflammatòries induïdes per TLR i la participació de la fagocitosi d'A β (Ruganzu et al., 2021). Tot i així, mutacions en aquesta proteïna s'han relacionat amb un elevat risc de patir AD i s'ha descrit un augment de l'abundància d'aquest receptor en còrtex de pacients que pateixen l'AD (Lue et al., 2015).

1.6. ACTIVACIÓ DELS ASTRÒCITS O ASTROGLIOSI

Els astròcits són el tipus de cèl·lula glial més abundant del CNS. Fisiològicament els astròcits tenen una funció neuroprotectora, ja que participen en l'organització i

manteniment estructural i funcional del cervell, el processament de la informació i la transmissió sinàptica i el transport tròfic cap a les neurones (Sofroniew i Vinters, 2010).

Els astròcits es caracteritzen per l'expressió de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP, *glial fibrillary acid protein*). Durant l'AD hi ha una alteració de la funció dels astròcits, els quals s'activen. Aquest procés s'anomena astrogliosi i pot participar a la neurodegeneració. Els astròcits poden ser activats pels depòsits d'A β , la qual cosa resulta en una activació de la via NF- κ B i de mediadors pro-inflamatoris com TNF- α , IL-1 β i la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Carrero et al., 2012).

1.7. TIPUS D'ALZHEIMER

Tot i que les manifestacions clíniques són similars, l'AD es pot dividir segons l'edat on apareix la simptomatologia. Així doncs, existeixen dos tipus d'AD segons aquesta classificació: Alzheimer d'inici precoç o Alzheimer d'inici tardà.

1.7.1. Alzheimer tipus precoç

L'AD de tipus precoç es defineix quan l'inici dels símptomes comença abans dels 65 anys. Aquest tipus de malaltia afecta d'un 1 a un 5 % dels pacients que pateixen l'AD. Aquest tipus d'AD precoç s'associa amb una progressió més ràpida de la malaltia i, en l'AD autosòmic dominant o familiar, a un patró hereditari on l'AD es transmet d'una generació a la següent (Lane et al., 2018). Aquesta malaltia apareix quan hi ha una mutació almenys a un dels tres gens: *presenilina (Psen, presenilin) 1 (Psen1)*, *2 (Psen2)* o *App*. La mutació d'aquests gens promou el processament aberrant de l'APP i les seves mutacions resulten en un augment dels depòsits d'A β , així com una major agregació de tau fosforilada (Karch et al., 2014).

1.7.2. Alzheimer tipus tardà

L'AD de tipus tardà es defineix quan l'aparició de la simptomatologia és després dels 65 anys. És el tipus més comú i afecta a un 95 % dels casos de l'AD. L'etiologia de la malaltia segueix sense estar clara, i de fet, actualment, l'AD es considera una malaltia multifactorial, ja que hi ha diferents factors que poden influir en la seva aparició i progressió. L'envelliment és el factor de risc principal, tot i que hi ha d'altres que també hi influeixen, com factors genètics, comorbiditats, factors ambientals i d'estil de vida (Hou et al., 2019).

1.8. FACTORS DE RISC DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER

1.8.1. Envel·liment

L'envel·liment és el factor de risc principal de l'AD. Durant l'envel·liment hi ha una alteració gradual del sistema immunitari anomenat immunosenescència (Aiello et al., 2019), i una inflamació crònica de baix grau que s'anomena *inflammaging*, la qual activa de forma crònica el sistema immunitari innat, i més concretament a nivell cerebral, de la micròglia (Franceschi et al., 2018). Diferents alteracions relacionades amb l'envel·liment s'hi troben implicades, com són la senescència cel·lular, la disfunció mitocondrial, l'alteració de l'autofàgia, l'activació dels inflamasomes, la desregulació del sistema d'ubiquitinació, el dany del material genètic i l'alteració de la composició microbiana, les quals produeixen també un augment de l'estrès oxidatiu (Vitale et al., 2013). Tots aquests processos acceleren la progressió de l'AD i augmenten els signes distintius neuropatològics de la malaltia (Hou et al., 2019).

1.8.2. Factors genètics

A l'AD de tipus tardà també existeixen factors genètics que poden augmentar el risc de desenvolupar la malaltia. El gen que porta associat un major risc a patir la malaltia és el transportador de lípids *apolipoproteïna E (APOE, apolipoprotein)*, més concretament l'al·lel $\epsilon 4$. L'*APOE* $\epsilon 4$ s'associa a un increment de l'agregació d'A β i a una reducció de la seva degradació; a més, augmenta la p-tau, redueix el metabolisme glicosídic i la funció mitocondrial (Tai LM et al., 2015). L'al·lel $\epsilon 4$ té una menor capacitat de transportar àcids grassos poliinsaturats, que es requereixen pel manteniment de l'estructura, funció i integritat vascular del cervell (Bazinet i Layé, 2014; Tai LM et al., 2015). Tot i així, estudis d'associació genòmica (GWAS, *genome-wide association studies*) han relacionat l'AD amb més de 20 gens diferents, entre ells variacions en el marcador de micròglia *TREM2* (Gratuze et al., 2018).

1.8.3. Malalties cerebrovascular

Les malalties cerebrovasculars com l'íctus, vasculopaties, hemorràgies cerebrals, entre d'altres estan associades a un augment del risc a patir demència. Aquestes malalties afecten a la integritat de la BBB, la qual cosa produeix un increment del processament aberrant d'APP i un augment dels nivells d'A β , a més d'una disminució de la seva

degradació. També s'ha descrit que hi ha un augment de la disfunció neuronal, i una acceleració de la neurodegeneració (Zlokovic, 2011).

1.8.4. Hipertensió i dislipèmia

De la mateixa manera que les malalties cerebrovasculars, la hipertensió pot deteriorar la BBB. De fet la hipertensió és una de les possibles causes que apareguin les malalties cerebrovasculars. Diferents estudis revelen que pacients que pateixen l'AD tenen una pressió arterial elevada. A més la hipertensió s'associa a un increment dels NFT (Skoog i Gustafson, 2006).

Una elevada concentració de colesterol en sang pot augmentar el risc de patir l'AD, ja que també poden afectar la integritat de la BBB. De fet, estudis experimentals realitzats en ratolins han demostrat que la hipercolesterolèmia està associada a un increment de l'acumulació dels nivells dels pèptids A β , de la formació de NFT, del deteriorament cognitiu i la neuroinflamació (Ricciarelli et al., 2012; Ullrich et al., 2010).

1.8.5. Obesitat

L'obesitat és un altre factor de risc a patir l'AD i, de fet, en les dues malalties s'estableix una inflamació crònica de baixa intensitat sistèmica. Anstey et al., (2011) conclou de diferents estudis realitzats en persones de mitjana edat que hi ha una associació entre l'índex de massa corporal i l'AD. A més, en persones obeses s'han trobat una concentració més elevada de proteïnes amiloides a plasma (Jahangiri et al., 2013) i una permeabilitat major de la BBB en persones adultes obeses o amb sobrepès (Gustafson et al., 2007). D'altra banda, l'obesitat es relaciona amb altres comorbiditats com aterosclerosi, hipertensió, dislipèmia i T2DM, les quals són al mateix temps factors de risc de l'AD (De la Torre, 2013).

1.8.6. Sedentarisme

La manca d'activitat física o sedentarisme és un altre dels factors de risc a patir l'AD. La realització d'activitat física es relaciona amb la reducció de la pressió, l'obesitat, amb la modificació del perfil lipídic i conseqüentment, dels mecanismes promotors de la inflamació que hi ha subjacents a aquestes situacions. A més, l'activitat física millora la funció cognitiva, i augmenta el factor neurotròfic de plasticitat sinàptica BDNF, el qual participa a la neurogènesi (Paillard et al., 2015).

1.9. MODELS MURINS D'ESTUDI DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Un model d'AD en condicions òptimes ha de complir les següents premisses: en primer lloc, reproduir els canvis bioquímics i cognitius que succeeixen durant el desenvolupament de la malaltia; i en segon lloc, manifestar la malaltia en un període adequat per poder dur a terme una intervenció o tractament (Götz et al., 2018).

Per una banda, hi ha models de rossegadors transgènics que es basen en l'expressió de mutacions que es troben a l'AD de tipus precoç familiar (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*). Es tracta d'afegir el gen amb la mutació d'interès combinat amb un promotor específic. Altres models es basen en la recombinació homòloga directa, en els quals se'ls hi elimina (*KO*, *knock-out*) o insereix (*knock-in*) un gen concret. Alguns exemples més comuns són amb l'eliminació d'*App*, *Bace1*, *Psen1*, *Psen2* o la inserció de *P301L tau* per reproduir la patologia de la proteïna tau (Götz et al., 2018).

D'altra banda, hi ha els ratolins propensos a la senescència accelerada 8 (*SAMP8*, *senescence-prone accelerated mice 8*), un model de ratolins àmpliament utilitzat per l'estudi de l'AD. Els *SAMP8* provenen dels animals consanguinis *SAM* originats a partir dels ratolins *AKR/J* (Takeda et al., 1994), que després de varies generacions es va observar que tenien signes distintius d'envelliment accelerat, com pèrdua de l'activitat, menys esperança de vida, lordocifosi o pèrdua de pèl (Pallàs, 2012). Els *SAMP8* presenten un increment de la formació d'A β des dels 4 fins als 12 mesos (Del Valle et al., 2010), així com l'acumulació de p-tau, un increment de l'estrès oxidatiu i neuroinflamació (Garcia-Just et al., 2020). A més, tenen un deteriorament cognitiu associat a l'envelliment, com per exemple, dificultats en l'aprenentatge, la memòria i alteracions del comportament (Götz et al., 2018).

2. MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota és el conjunt de microorganismes (bacteris, arqueus, fongs, virus i microeucariotes) que resideixen a diferents mucoses de l'organisme, com per exemple la mucosa pulmonar, la genitourinària, la pell, la cavitat bucal i al llarg del tracte gastrointestinal (*GIT*, *gastrointestinal tract*) (Thursby i Juge, 2017). Respecte la microbiota gastrointestinal, aquesta presenta un gradient de concentració al llarg del *GIT*, així com diferent composició en funció de la zona (Biedermann i Rogler, 2015), tal i com es representa a la **Figura 4**. A les zones on hi ha elevats nivells d'àcids, d'oxigen o d'agents antimicrobians, la densitat disminueix, ja que dificulta el seu creixement i adhesió a

l'epiteli. En canvi, la densitat augmenta notablement a colon on les condicions són òptimes pel seu desenvolupament i tenen una gran disponibilitat de carbohidrats no digeribles que poden fer servir de substrat energètic (Thursby i Juge, 2017).

La microbiota intestinal comprèn uns 10^{14} microorganismes que generen una massa total de 1,5 kg. De fet, hi ha 10 cops més cèl·lules microbianes que cèl·lules humanes, les quals tenen funcions vitals pel nostre organisme (Adak i Mojibur, 2019). Fisiològicament, la microbiota ajuda al manteniment de la integritat de la barrera intestinal i de la producció de moc, dificulta l'adhesió de patògens, de la síntesi de vitamines, d'activitats metabòliques i de la regulació i maduració del teixit limfàtic i del sistema immunitari adaptatiu. A més, la microbiota promou la producció de immunoglobulina (Ig, *immunoglobulin*) A (IgA), que és secretada a la lumen i s'associa a la funció mucosal de l'intestí. També produeix àcids grassos de cadena curta (SCFA, *short-chain fatty acids*) (Thursby i Juge, 2017).

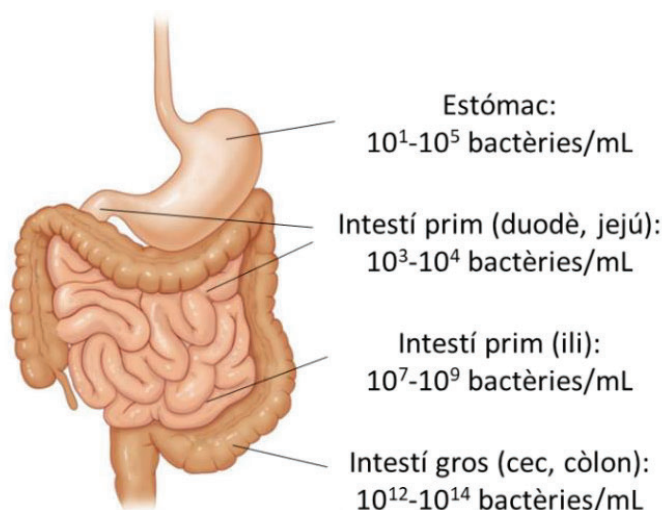


Figura 4. Densitat de poblacions microbianes al llarg del tracte gastrointestinal. La concentració de bacteris augmenta a mesura que s'avança pel tracte gastrointestinal, ja que hi ha condicions més òptimes per al desenvolupament de la microbiota.

2.1. MICROBIOTA INTESTINAL EN LES DIFERENTS ETAPES DE LA VIDA

La colonització de la microbiota es creu que comença al moment del naixement, tot i que hi ha estudis que afirmen que la microbiota és present a la placenta, al líquid amniòtic o al meconi (DiGiulio et al., 2010). El tipus de part modifica la composició de la microbiota al néixer. En els parts naturals, la microbiota dels infants s'assembla a la microbiota vaginal i fecal de la mare i conté un elevat percentatge de *Lactobacillus*. En canvi, en els parts per

cesària la microbiota del infant s'assimila més a la microbiota de la pell de la mare i hi abunda el gènere *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium spp.* i les espècies facultatives anaeròbiques *Clostridium spp.* (Dominguez-Bello et al., 2010). Tot i així, en aquesta primera etapa de desenvolupament, la diversitat de la microbiota és baixa i predominen els fílums *Actinobacteria* i *Proteobacteria*.

Durant el primer any la diversitat augmenta i entre els 2-5 anys ja es té una microbiota molt similar a la d'adult (Rodríguez et al., 2015). Així doncs, aquests 3 primers anys de vida són essencials per la formació de la microbiota i el desenvolupament sa de l'infant, sobretot pel que fa el seu neurodesenvolupament (Borre et al., 2014).

Durant l'etapa adulta la composició de la microbiota es manté força estable, tot i així, diferents factors com la localització geogràfica, viure a una zona urbana o rural, l'ús d'antibiòtics de forma recurrent, l'estil de vida i la dieta la poden influenciar (Thursby i Juge, 2017). La microbiota intestinal es compon principalment dels fílums *Firmicutes* (60-80%, que són bacteris gram positius) i *Bacteroidetes* (20-30%, que són bacteris gram negatius). En menor proporció, es troben el fílum *Actinobacteria* (<10%, que són gram negatius), *Proteobacteria* (<1%, que són gram negatius) i *Verrucomicrobia* (Szablewski, 2018).

L'envelliment modifica la composició de la microbiota, i altera la seva funcionalitat, la qual cosa pot produir diferents malalties. La immunosenescència, canvis en l'estil de vida, menys mobilitat, infeccions recurrents, funcionalitat intestinal disminuïda són situacions que es produeixen a l'envelliment, que poden alterar la composició microbiana i que es poden associar amb un increment de l'estat inflamatori o *l'inflammaging* (Nagpal et al., 2018). Generalment, l'envelliment redueix la diversitat de la microbiota, de la seva capacitat metabòlica i de l'abundància de gèneres beneficiosos com *Prevotella*, *Bifidobacterium*, i *Lactobacillus*, juntament amb un augment de bacteris oportunistes com *Enterobacteries*, *Clostridium perfringens* o *Clostridium difficile* (O'Toole i Jeffery, 2015). D'altra banda, en les persones centenàries s'ha descrit que hi ha un increment d'alguns dels bacteris productors d'SCFA, com espècies del gènere *Eubacterium*. A més, s'incrementa l'abundància dels bacteris anaeròbics facultatius, com *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcaceae*, i d'altres dins del fílum *Proteobacteria*, o del gènere *Akkermansia*, la qual cosa s'associa amb la longevitat (Biagi et al., 2010). La microbiota intestinal alterada a més de repercutir el sistema immunitari intestinal, també poden afectar a diferents òrgans extra-intestinals, com per exemple, al fetge, al pulmó i al cervell (Zheng et al., 2020).

2.2. EIX INTESTÍ-CERVELL

L'eix intestí-cervell és una xarxa de comunicacions bidireccional que permet que la microbiota intestinal i els seus metabòlits tinguin una ruta de comunicació al cervell. La microbiota i l'intestí es poden comunicar amb el cervell per diferents vies: vies neurals, immunològiques, endocrines i metabòliques (Collins et al., 2012), tal i com es mostra a la **Figura 5**. Actualment, arrel del gran paper que té la microbiota en la comunicació entre l'intestí i el cervell s'ha establert un concepte més específic anomenat eix microbiota-intestí-cervell.

2.2.1. Via neural

El sistema nerviós autònom (ANS, *autonomic nervous system*) és una xarxa neural localitzada al sistema central i perifèric que controla les funcions autònomes, que es produeixen sense acte de consciència, com per exemple, respirar, el batec cardíac o la digestió. L'ANS es compon del sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic i regulen la motilitat de l'intestí, la permeabilitat de la barrera, el manteniment del fluid epitelial, l'osmolaritat del lumen, la secreció de bilis, el nivell de carbohidrats, la producció de moc i bicarbonat i la resposta immunitària mucosal, entre d'altres (Gibbons, 2019).

El nervi vague forma part de l'ANS, més concretament del sistema nerviós parasimpàtic. El nervi vague intervé en el manteniment de l'homeòstasi intestinal i del cervell i és el responsable de l'alliberament de neurotransmissors i la regulació de la immunitat local i la permeabilitat intestinal (Ma et al., 2019). La pròpia microbiota també pot sintetitzar neurotransmissors, com per exemple, noradrenalina, l'àcid γ -aminobutíric (GABA, *gamma-aminobutyric acid*), la histamina i la serotonina que poden participar en la interacció entre l'intestí i el cervell (Morais et al., 2021).

L'intestí té un sistema nerviós propi anomenat sistema nerviós entèric (ENS, *enteric nervous system*). L'ENS és una xarxa de neurones sensorials, motores i interneurons que són capaces de regular les funcions bàsiques del GIT, com són la motilitat, la secreció de moc, la funció endocrina o el flux sanguini. L'ENS es comunica amb l'ANS a través de neurones aferents i eferents que innerven l'intestí i de neurotransmissors, com per exemple, l'adrenalina, la noradrenalina i l'acetilcolina (Borre et al., 2014). També pot interaccionar amb les cèl·lules de la barrera intestinal, com per exemple, les cèl·lules neuroendocrines i les cèl·lules immunitàries presents a la mucosa. Les neurones entèriques expressen receptors de reconeixement de patrons, com són els TLR, que

reconeixen components microbians i participen en la funció i desenvolupament de l'ENS (Hyland i Cryan, 2016).

2.2.2. Via immunològica

L'intestí té un sistema immunitari propi anomenat teixit limfoide associat a l'intestí (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) que representa una barrera defensiva enfront de patògens i es generen mecanismes de tolerància cap a antígens innocus (Cieza et al., 2012). El GALT conté diferents tipus cel·lulars, com per exemple limfòcits T i cèl·lules dendrítiques. La comunicació immunològica entre l'intestí i el cervell es pot donar a terme per tres vies. En primer lloc, les cèl·lules immunitàries poden alliberar citocines pro-inflamatòries, com són el IFN- γ i el TNF- α o anti-inflamatòries, com el TGF- β i l'IL-10, entre d'altres que poden actuar sobre nervis entèrics o fibres sensorials, o bé, ser transportades en sang i arribar fins al CNS. En segon lloc, les cèl·lules immunitàries per si mateixes activin fibres sensorials aferents o nervis entèrics. Finalment, les cèl·lules immunitàries intestinals, principalment limfòcits T, també poden migrar a altres àrees limfàtiques i, fins i tot, al CNS, on poden promoure la neuroinflamació (Powell et al., 2017).

Els enteròcits són cèl·lules epitelials que tenen funció d'absorció i són un dels components de la barrera intestinal. Quan hi ha una disrupció de la barrera intestinal, s'alliberen citocines inflamatòries produïdes pels enteròcits o les cèl·lules immunitàries. Tanmateix, aquest procés també s'esdevé en sentit invers, ja que en una desregulació del sistema immunitari, com per exemple a la immunosenescència, se secreten citocines i es pot provocar un augment de la permeabilitat intestinal (Turner, 2019).

La microbiota o els seus metabòlits poden actuar directament amb les cèl·lules immunitàries del GALT, com amb els enteròcits l'epiteli intestinal, ja que ambdós expressen els receptors immunitaris innats TLR que reconeixen bacteris o antígens bacterians. L'activació dels TLR dels enteròcits promou l'alliberació de mediadors inflamatoris, com citocines o quimocines. La microbiota també pot translocar-se a altres teixits a través de la circulació sistèmica i modular la resposta immunitària (Zheng et al., 2020).

2.2.3. Via endocrina

Les cèl·lules enteroendocrines són cèl·lules epitelials que es troben distribuïdes per les vellositats i les criptes del GIT. Aquestes cèl·lules són de gran importància pel manteniment de l'homeòstasi intestinal, ja que modulen canvis metabòlics i, a més, poden secretar

pèptids que activen els receptors de neurones entèriques, aferents vagals i del CNS (Latorre et al., 2016). També poden produir serotonina, un neurotransmissor que activa fibres nervioses aferents del GIT i regula les funcions peristàltiques intestinals, la secreció d'electròlits, la percepció del dolor i respostes inflamatòries (Mawe i Hoffman, 2013).

D'altra banda, l'eix hipotalàmic-hipofisari-suprarenal (HPA, *hypothalamic-pituitary-adrenal*) és un sistema neuroendocrí i una de les vies de comunicació de l'eix intestí-cervell. Quan s'activa l'eix HPA, les neurones neuroendocrines de l'hipotàlem alliberen hormones o neuropèptids que promouen la producció hormonal a la glàndula pituitària que, seguidament, estimula la secreció de glucocorticoides al còrtex adrenal. L'eix HPA participa en la resposta a l'estrès, la consolidació de la memòria i l'aprenentatge, també afecta la integritat de la barrera intestinal (Latorre et al., 2016). En la disbacteriosi hi ha un estat inflamatori crònic que pot activar l'eix HPA. De fet, existeixen desordres gastrointestinals que s'associen amb trastorns neurològics com l'ansietat i depressió, com és el síndrome de l'intestí irritable, i que evidencien la comunicació entre la microbiota i l'eix HPA (Farzi et al., 2018).

2.2.4. Via metabòlica

La microbiota produeix una sèrie de metabòlits, pèptids i proteïnes a partir de la dieta, com són els SCFA, o conjugats lipídics, entre d'altres, que poden interactuar indirectament a través de l'eix intestí-cervell (Nicholson et al., 2012).

Els SCFA predominants són tres: l'acetat, el propinat i el butirat i es produeixen a través d'un procés metabòlic fermentatiu de les fibres indigeribles o d'aminoàcids. Els SCFA poden participar en la regulació de diferents processos cel·lulars com per exemple l'expressió de gens, la quimiotaxi, l'apoptosi o la proliferació i diferenciació cel·lular. Els SCFA, principalment el butirat, són una font d'energia important per les cèl·lules epitelials, modulen l'activitat de les cèl·lules del sistema immunitari innat i adaptatiu, així com l'expressió de citocines i quimocines (Oliveira Corrêa et al., 2016). Aquests SCFA poden activar receptors que es troben a la membrana de cèl·lules epitelials, immunitàries i enteroendocrines; i inhibir deacetilases d'histones (HDACs, *histone deacetylases*) o bé, estimular l'activitat de les acetiltransferases d'histones, entre d'altres. A més, poden induir la senyalització enteroendocrina, modular el sistema immunitari, estimular el nervi vague i/o arribar a través del torrent sanguini al CNS i actuar-hi activant diferents vies de senyalització (Cryan et al., 2019).

La microbiota pot produir diferents conjugats lipídics, com per exemple l'LPS, que es troba a la superfície dels bacteris gram negatius, i els peptidoglicans, que constitueixen la paret cel·lular dels bacteris. L'LPS és reconegut per receptors específics, els TLR4, i promouen l'expressió de citocines pro-inflamatòries i la inflamació sistèmica crònica (Walrath et al., 2021). Els peptidoglicans són reconeguts pel receptor de reconeixement de patrons d'unió a nucleòtids 1 (Nod1, *pattern recognition receptor nucleotide-binding*) i indueixen una resposta immunitària innata, mort cel·lular, estrès oxidatiu i inflamació (Clarke et al., 2010).

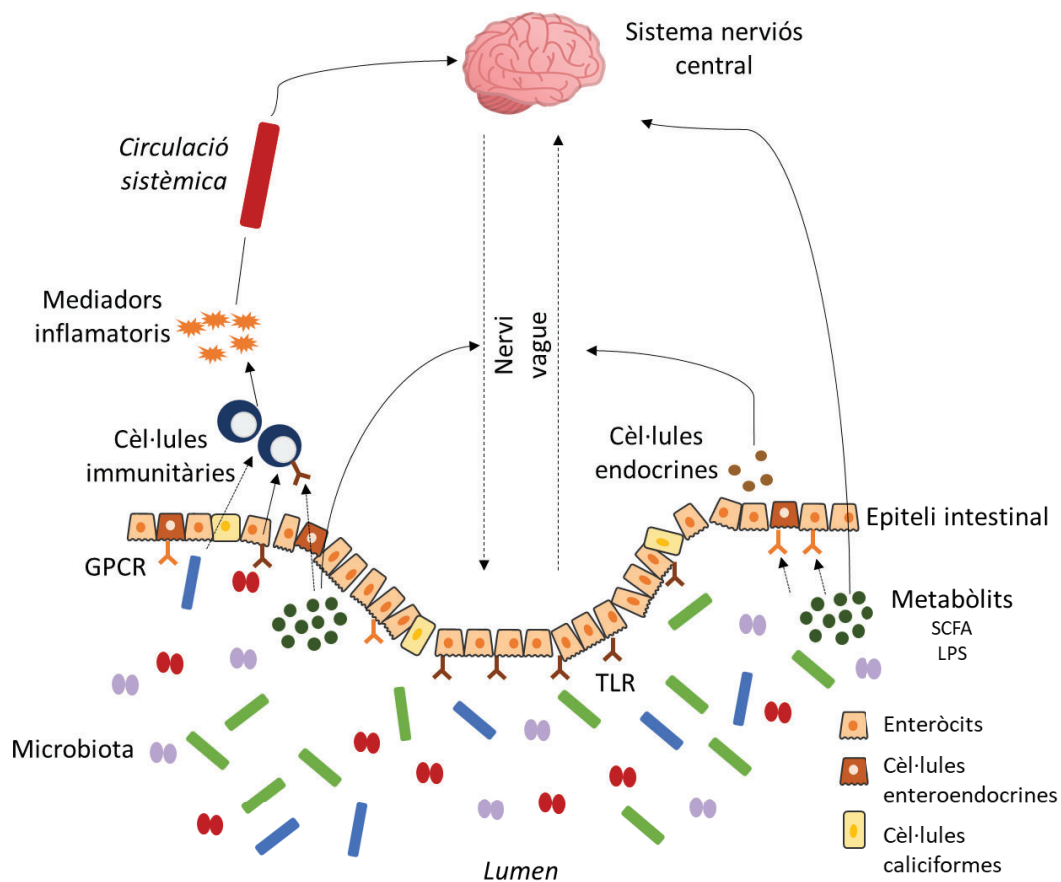


Figura 5. Eix microbiota-intestí-cervell. La microbiota intestinal es comunica amb el sistema nerviós central a través de l'eix intestí-cervell a través de vies neurals, immunològiques, endocrines i metabòliques. La microbiota i els seus metabòlits poden interactuar amb les cèl·lules endocrines, activar el sistema nerviós entèric, el nervi vague i les cèl·lules immunitàries a través dels TLR o actuar directament amb el cervell. Les cèl·lules immunitàries alliberaran un seguit de mediadors inflamatoris que poden travessar la barrera hematoencefàlica i induir una resposta immunitària.

2.3. MICROBIOTA, PLASTICITAT SINÀPTICA I MEMÒRIA

Al llarg dels últims anys diversos estudis han relacionat la composició de la microbiota amb la funció cognitiva. De fet, bacteris gram positius com *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* produeixen GABA, el qual és el major neurotransmissor inhibitori del CNS. Les sinapsis inhibitories gabaèrgiques són imprescindibles per una bona sincronització de les neurones i la consolidació de la memòria (Nava-Mesa et al., 2014). A més, una menor producció de GABA està associada a una davallada cognitiva en humans, i és el que s'observa en pacient d'AD (Rissman et al., 2007). D'altra banda, la concentració de GABA al CNS és directament proporcional a la seva concentració al GIT i a l'abundància de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* a la microbiota intestinal (Jiang C et al., 2017).

L'efecte positiu sobre la funcionalitat sinàptica també s'ha associat a la producció microbiana d'SCFA. S'ha observat que els SCFA produeixen un increment de la fosforilació de la proteïna CREB (Shah et al., 2006), via relacionada amb un augment de la neurogènesi (Hattiangady et al., 2005), i amb la millora de la funcionalitat cognitiva en models d'animals amb neurodegeneració (Leung i Thuret, 2015). Així, l'administració de butirat sòdic millora la plasticitat sinàptica, a través de la inhibició de la histona desacetilasa, la qual cosa promou l'expressió d'*IL-10* a cervell i, redueix la neuroinflamació (Jiang Y et al., 2021).

La microbiota també pot contribuir a reduir la funcionalitat sinàptica ja que determinats bacteris del fílum *Cyanobacteria* produeixen l'aminoàcid BMAA (BMAA, *beta-N-methylamino-L-alanine*), una neurotoxina que interacciona amb NMDAR i deteriora la funcionalitat de la plasticitat sinàptica i, en conseqüència, a la consolidació de la memòria (Pablo et al., 2009). A més, l'expressió de NMDAR està reduïda a l'hipocamp de ratolins lliures de microorganismes (GF, *germ-free*) (Szablewski, 2018).

3. DISBACTERIOSI I MALALTIA D'ALZHEIMER

La disbacteriosi és una alteració de la composició de la microbiota intestinal que es pot produir per diferents causes, entre elles l'envelliment, modificacions de la dieta i/o l'estil de vida, tractaments perllongats amb medicaments o amb antibiòtics (Weiss i Hennet, 2017). A la disbacteriosi hi ha un augment de la secreció d'LPS i una reducció de metabòlits bacterians beneficiosos, com els SCFA o vitamines essencials, que comporta un estat pro-inflamatori i un increment de la permeabilitat intestinal (Walrath et al., 2021). Conseqüentment, la disbacteriosi contribueix al desenvolupament i progressió de diverses malalties, com per exemple, malalties cardiovasculars, l'obesitat, o la malaltia inflamatòria

intestinal (IBD, *inflammatory bowel disease*), entre d'altres. A més, hi ha una gran evidència que la disbacteriosi està implicada en trastorns neurològics i malalties neurodegeneratives, com la malaltia de Parkinson o l'AD, a través de l'eix intestí-cervell (Biedermann i Rogler, 2015).

A la disbacteriosi hi ha un augment dels bacteris patogènics i oportunistes, la qual cosa activa el sistema immunitari i altera la barrera intestinal. Aquesta consta d'una monocapa de cèl·lules epitelials unides entre elles per proteïnes del complex d'unió, a més d'una capa de moc, que consisteix en una xarxa de mucines i que conté agents antibacterians, com defensines, pèptids antimicrobioans i IgA (Biedermann i Rogler, 2015). A l'AD, hi ha una alteració de la producció de moc, una reducció i/o deslocalització de les proteïnes del complex d'unió que condueix a un increment de la permeabilitat intestinal (Sochocka et al., 2019). Conseqüentment, els metabòlits secretats per la microbiota poden travessar fàcilment aquesta barrera més permeable i estimular el nervi vague, o bé arribar fins al cervell a través de la circulació sistèmica. La microbiota intestinal pot produir diferents compostos i metabòlits perjudicials per exemple, LPS, proteïnes amiloides bacterianes o BMAA, entre d'altres, els quals promouen el desenvolupament i la progressió de diferents característiques distintives de l'AD, com la producció d'A β , l'activació de la micròglia i la neuroinflamació (Marizzoni et al., 2020; Zhao Y et al., 2015). Paral·lelament, l'augment de la permeabilitat intestinal promou una major inflamació local, però també sistèmica, que acaba comportant una disfunció d'àrees específiques del cervell (Pistollato et al., 2016b).

3.1. MICROBIOTA, VIA AMILOIDOGÈNICA I HIPERFOSFORILACIÓ DE LA PROTEÏNA TAU

Tal com he comentat anteriorment, la microbiota està implicada en el desenvolupament i la progressió de l'amiloidogènesi i de la formació dels NFT. Recentment, s'ha observat que ratolins transgènics amb AD presenten disbacteriosi i l'eliminació de la microbiota disminueix l'acumulació d'A β en aquests ratolins. El trasplantament fecal de la microbiota a animals GF transgènics per l'APP produeix un augment de l'abundància d'A β major si la microbiota prové d'animals que pateixen l'AD que no si prové d'animals sans (Harach et al., 2017).

L'administració crònica de LPS en rates indueix el processament de l'APP per via amiloidogènica, ja que incrementa l'expressió de BACE1 (Deng et al., 2014). A més, tant en aquests animals com en pacients amb AD, l'LPS co-localitza amb els pèptids A β de les plaques senils i al voltant dels vasos sanguinis cerebrals (Deng et al., 2014; Zhan et al.,

2016). L'LPS interacciona amb el TLR4 i el complex proteic CD14 per dur a terme aquesta activació de la via amiloidogènica, de fet animals transgènics que pateixen l'AD tenen incrementada l'expressió de TLR4 (Walter et al., 2007). En canvi, la inhibició de TLR4 redueix la deposició d'A β (Kumar, 2019).

A més de l'LPS, els enterobacteris gram negatius secreten proteïnes amiloides que, tot i que normalment són solubles, poden formar agregats. Si hi ha un augment de la permeabilitat de la barrera intestinal i de la BBB, aquestes proteïnes poden arribar al cervell, acumular-se i induir una resposta inflamatòria. Aquesta neuroinflamació inhibeix la fagocitosi dels pèptids A β cerebrals i, per tant, en promou la seva acumulació (Pistollato et al., 2016a).

3.2. MICROBIOTA, NEUROINFLAMACIÓ I ACTIVACIÓ MICRÒGLIA

La microbiota i els seus metabòlits poden induir la neuroinflamació i l'activació de la micròglia. De fet, una disminució dels bacteris productors de SCFA s'ha relacionat amb un augment de la inflamació i de la via NF- κ B i de l'activació de la micròglia (Jiang C et al., 2017). A més, l'administració oral d'SCFA pot revertir l'efecte de la manca de microbiota sobre la maduració de la micròglia en ratolins GF (Erny et al., 2015). Aquests SCFA també incrementen l'abundància de proteïnes del complex d'unió dels vasos sanguinis cerebrals, reforçant la integritat de la BBB, el que produeix una menor neuroinflamació (Braniste et al., 2014).

L'administració d'LPS produeix una disfunció cognitiva a ratolins, associada a una activació de la micròglia i neuroinflamació (Zhao J et al., 2019). Així doncs, indueix la resposta immunitària innata, amb un augment de la producció de citocines, la inflamació i la fagocitosi. Ratolins transgènics amb dèficit de TLR4 també tenen una menor activació de la micròglia (Kumar, 2019).

L'acumulació de proteïnes amiloides genera una cascada pro-inflamatòria a través de la via NF- κ B i l'activació de la micròglia a través del complex TLR2/1 (Zhao Y et al., 2015). Això produeix la síntesi de citocines pro-inflamatòries, com per exemple, IL-17, la qual activa al mateix temps la via NF- κ B i IL-22, associada amb la neuroinflamació crònica de l'AD, a més de quimocines, ROS, RNS, etc (Kumar, 2019).

4. DIETA, MALALTIA D'ALZHEIMER I EIX INTESTÍ-CERVELL

Actualment, hi ha una evidència creixent de que modificant elements de la dieta es pot incidir sobre l'AD a través de l'eix intestí-cervell. De fet, la dieta és un factor essencial per la modificació de la microbiota (Kincaid et al., 2021).

La dieta i els complements alimentaris poden modular el sistema immunitari i influir a les respostes neuroinflamatòries (Calder et al., 2017). Diferents estudis confirmen que mantenir una alimentació sana i equilibrada pot enrederir el progrés de l'AD, reduir la neuroinflamació i millorar el deteriorament cognitiu, mentre que una dieta alta amb greixos saturats i sucres refinats pot tenir l'efecte contrari (Minihane et al., 2015; Pistollato et al., 2018). A més, el manteniment d'aquest tipus de dieta durant un llarg període s'associa a un increment de *Bacteroidetes*, específicament *Alistipes spp.* i *Bacteroides spp.* i una reducció de l'abundància de *Firmicutes* (Turnbaugh et al., 2009). Aquest tipus de dieta s'ha relacionat amb un increment de la concentració circulant de LPS, una major inflamació i estrès oxidatiu al cervell i permeabilitat de la BBB, que finalment indueixen una acumulació d'A β i NFT al cervell (Zhang M et al., 2020). D'altra banda, les persones que segueixen una dieta rica en aliments vegetals tenen una major diversitat de la microbiota i un increment dels bacteris productors de SCFA (Wu et al., 2011).

S'ha descrit que la dieta mediterrània rica en polifenols, greixos insaturats i vitamines té efectes anti-inflamatoris, inhibint la producció de radicals lliures i citocines per part de la micròglia i reduint l'apoptosi neuronal (McGrattan et al., 2019). L'oli d'oliva verge extra, component clau de la dieta, redueix la neuroinflamació, la agregació d'A β i l'acumulació de proteïna p-tau, fet que millora de la integritat sinàptica (Lauretti et al., 2017). A més, l'adherència a la dieta mediterrània promou l'abundància de *Prevotella* i disminueix *Lachnospiraceae* (Filippis et al., 2016), a més d'incrementar la concentració de butirats i d'espècies productores d'SCFA (Gutiérrez-Díaz et al., 2016).

El consum d'una dieta rica en peix blau, ric en l'àcid gras omega-3, s'ha relacionat amb un menor risc de patir AD. De fet, la suplementació amb omega-3 promou la fagocitosis d'A β , reduint la neuroinflamació i l'estrès oxidatiu i estimulants la neurogènesi (Bazinet i Layé, 2014; Fiala et al., 2017). A més, el consum de peix blau es correlaciona amb un augment de la concentració a sang d'àcid docosahexaenoic (DHA, *docosahexaenoic acid*), un tipus d'àcid omega-3, que s'associa a l'increment de famílies productores d'SCFA, com *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* (Gubert et al., 2020).

Els flavonoides també tenen efectes neuroprotectors i poden disminuir el risc de desenvolupar l'AD. Els flavonoides redueixen l'expressió de BACE1 i la deposició d'A β i la p-tau, portant a una reducció de l'apoptosi neuronal i una major neurogènesi (Ayaz et al., 2019). Més concretament, s'ha descrit que les isoflavones de la soja redueixen l'expressió de TLR-4 i NF- κ B, reduint la neuroinflamació i millorant la memòria i l'aprenentatge en rates a les que se'ls hi ha injectat A β ₄₂ a cervell (Ding et al., 2011). Diferents estudis han relacionat els flavonoides amb una modulació de la composició de la microbiota. Per exemple, *in vitro* extractes de llavors de raïm, rics en flavonoides, augmenten els nivells de *Lactobacillus* i *Enterococcus* i redueixen l'espècie *Clostridium histolyticum* (Cueva et al., 2013).

4.1. PROBIÒTICS I PREBIÒTICS

Els probiòtics són bacteris vius que en quantitats adequades produeixen efectes beneficiosos per l'organisme (Gareau et al., 2010). Els gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* són els microorganismes més utilitzats com a probiòtics i els més estudiats, tot i que n' existeixen d'altres.

L'administració de probiòtics promou una resposta anti-inflamatòria tant sistèmica com a nivell central (Bonfili et al., 2017; Distrutti et al., 2014), millorant l'activitat sinàptica i el reduint el deteriorament cognitiu en rates diabètiques (Davari et al., 2013) i en ratolins amb AD (Bonfili et al., 2017).

Els probiòtics són una estratègia terapèutica per millorar la funció del GIT i prevenir els trastorns del CNS en humans i rosegadors. Diferents estudis evidencien que els probiòtics poden reduir el comportament similar a l'ansietat i la depressió i millorar la consolidació de la memòria. Aquests efectes es relacionen amb una menor activació de la micròglia i menys depòsits de pèptids A β , una reducció de l'estrès oxidatiu i la inflamació cerebral, així com una menor inflamació sistèmica (Bonfili et al., 2017; Chunchai et al., 2018; Dhaliwal et al., 2018). A més, l'administració de probiòtics reverteix el comportament similar a l'ansietat i a la depressió que es produeix en models GF (Liu WH et al., 2016), o davant d'una infecció que provoca una disfunció de la memòria associada a l'estrès (Gareau et al., 2011).

Pel que fa als prebiòtics, aquests són ingredients no digeribles que estimulen l'activitat de la microbiota GIT i el seu creixement, promovent l'abundància de bacteris beneficiosos per la salut (Saulnier et al., 2013). Els prebiòtics més utilitzats són la inulina, el midó resistent a la digestió, els fructooligosacàrids o els galactooligosacàrids, entre d'altres.

L'administració de prebiòtics incrementa l'abundància de *Bifidobacterium* en persones ancianes (Toward et al., 2012; Vulevic et al., 2008), així com la concentració d'SCFA, els quals tenen un paper essencial en la modulació de la funció cerebral a través de l'eix intestí-cervell (Dalile et al., 2019). Els prebiòtics també redueixen les ROS i, per tant, l'estrès oxidatiu i la inflamació intestinal (Franco-Robles i López, 2015), reduint la permeabilitat intestinal i la concentració de LPS en sang (Szablewski, 2018), i per tant, disminuint la inflamació sistèmica.

Aquest efecte dels prebiòtics sobre la inflamació sistèmica es tradueix en una modulació de les respostes neuroimmunològiques, com per exemple incrementar la fagocitosi, l'activitat de les cèl·lules assassines naturals (NK, *natural killer*), la producció de citocines anti-inflamatòries i reduir les pro-inflamatòries (Vulevic et al., 2008). Aquesta menor neuroinflamació té un impacte sobre diferents elements cerebrals, com un augment factors de creixement neurals com el BDNF, la sinaptofisina i el NMDAR (Savignac et al., 2013; Williams et al., 2016) que promouen l'eficiència sinàptica (Savignac et al., 2013), i la neurogènesi (de Cossío et al., 2017).

4.2. SUPLEMENTACIÓ AMB PROTEÏNES PLASMÀTIQUES

Les proteïnes plasmàtiques d'origen boví i porcí han estat àmpliament utilitzades com a ingredients alimentaris en als animals de granja i s'utilitzen com a alternativa a l'ús dels antibiòtics (Torrallardona, 2010), ja que promouen el creixement i redueixen la incidència d'infeccions després del deslletament, així com la seva durada i gravetat (Bosi et al., 2004). N'és un exemple la suplementació dietètica amb plasma porcí assecat per atomització (SDP, *spray-dried porcine plasma*). L'SDP s'obté del fraccionament de la sang de porcs sans destinats al consum humà. La sang es recull amb un anticoagulant, normalment s'utilitza el citrat sòdic, se centrifuga per separar el plasma de la resta d'elements cel·lulars. Per convertir-lo en pols, el plasma s'asseca per atomització a alta pressió i temperatura durant un període de temps curt (Pérez-Bosque et al., 2016a), el que permet que les proteïnes no es desnaturalitzin i preservin la major part de la seva activitat biològica (Borg et al., 2002). De fet, l'SDP és un producte amb un elevat contingut de proteïnes, on predominen l'albumina, globulines, immunoglobulines, de les que destaca la IgG, fibrina i, en una menor proporció, transferrina, factors de creixement, entre d'altres (Howell i Lawrie, 1983).

Actualment, la suplementació amb SDP s'utilitza com a ingredient funcional per als animals de granja en el període de deslletament, ja que en promou el creixement (Bosi et al., 2004;

Van Dijk et al., 2002) i millora de la digestibilitat dels aliments (Bosi et al., 2001), factors claus per prevenir les complicacions conseqüents d'aquest període. Aquests efectes sobre el creixement, digestibilitat dels aliments i modulació de la funció immunitària s'han observat en altres models d'animals com en peixos, aus de corral i gossos (Campbell et al., 2019; Gisbert et al., 2015; Quigley III et al., 2004).

4.2.1. Efectes anti-inflamatoris del plasma porcí assecat per atomització

L'SDP té propietats anti-inflamatòries, com ho demostren diferents estudis realitzats tant en animals de laboratori com de granja. La major part d'aquests estudis s'han centrat a nivell intestinal i en un etapa molt concreta, el període posterior al deslletament. Aquesta etapa és un moment molt estressant en la vida dels animals, ja que pateixen canvis socials, ambientals i nutricionals complexos, que acostumen a anar acompanyats d'un increment en la prevalença de les infeccions i alteracions gastrointestinals, sobretot en animals de granja (Lallès et al., 2009). En aquest context, en porquets acabats de deslletar, la suplementació amb SDP redueix la permeabilitat de la barrera intestinal i en millora la seva funció, augmentant l'expressió de proteïnes del complex d'unió (Peace et al., 2011). A nivell d'animals de laboratori, l'SDP prevé l'alteració de la permeabilitat intestinal bé associada a una inflamació aguda, com la induïda per l'administració de l'enterotoxina B d'*S. aureus* (SEB, *S. aureus enterotoxin B*); bé associada a la inflamació crònica que desenvolupen ratolins transgènics que mimetitzen l'IBD. En ambós casos, l'SDP promou l'expressió de *Muc2* (principal mucina de la capa de moc que protegeix la mucosa intestinal) i incrementa l'abundància d'E-cadherina (Pérez-Bosque et al., 2006; Miró et al., 2020a). Ambdós elements promouen una major barrera intestinal que preserva la integritat de la mucosa intestinal. A més, en ratolins femella prenyades i en condicions d'estrès, la suplementació amb SDP també millora la integritat intestinal i la funció de barrera (Liu Y et al., 2018).

D'altra banda, la suplementació amb SDP també modula la resposta immunitària intestinal, modificant tant el tipus de poblacions implicades com el perfil de citocines que s'expressen durant un procés inflamatori agut. En línies generals, l'SDP redueix la resposta pro-inflamatòria, ja que disminueix el percentatge de limfòcits T, monòcits i neutròfils activats en diferents compartiments intestinals, així com l'expressió de citocines pro-inflamatòries com el *Tnf- α* o la *Il-1 β* (Pérez-Bosque et al., 2004; Pérez-Bosque et al., 2008; Pérez-Bosque et al., 2010). L'SDP, no només redueix la resposta pro-inflamatòria, sinó que també incrementa el percentatge de limfòcits T-reguladors (Treg, *T regulatory*), així com

l'expressió de citocines associades a una resposta anti-inflamatòria, com són la *Il-10* o el *Tgf-β* (Pérez-Bosque et al., 2016b).

Aquest efecte de l'SDP sobre la secreció de citocines pro-inflamatòries i anti-inflamatòries també s'observa al colon de porcs acabats de deslletar (Peace et al., 2011), en ratolins sensencients (Miró et al., 2017), i davant una inflamació intestinal crònica (Miró et al., 2020a). A més, la suplementació amb l'SDP redueix la fosforilació de NF-κB i l'expressió de cèl·lules d'adhesió, les quals es veuen incrementades durant un procés inflamatori, afavorint el reclutament de més leucòcits activats (Pérez-Bosque et al., 2016b).

A més dels efectes a nivell intestinal, l'SDP també té efectes beneficiosos sobre altres mucoses de l'organisme, fet que indica que el sistema immunitari mucosal comú està implicat. Aquest està format pel GALT, però també hi participa el teixit limfoide associat al bronqui (BALT, *Bronchus-associated lymphoid tissue*), el teixit limfoide associat genito-urinari (GUALT, *genito-urinary associated lymphoid tissue*). A més, s'ha pogut observar que la suplementació amb SDP té un efecte neuroprotector sobre el CNS, tal i com es resumeix a la **Figura 6**.

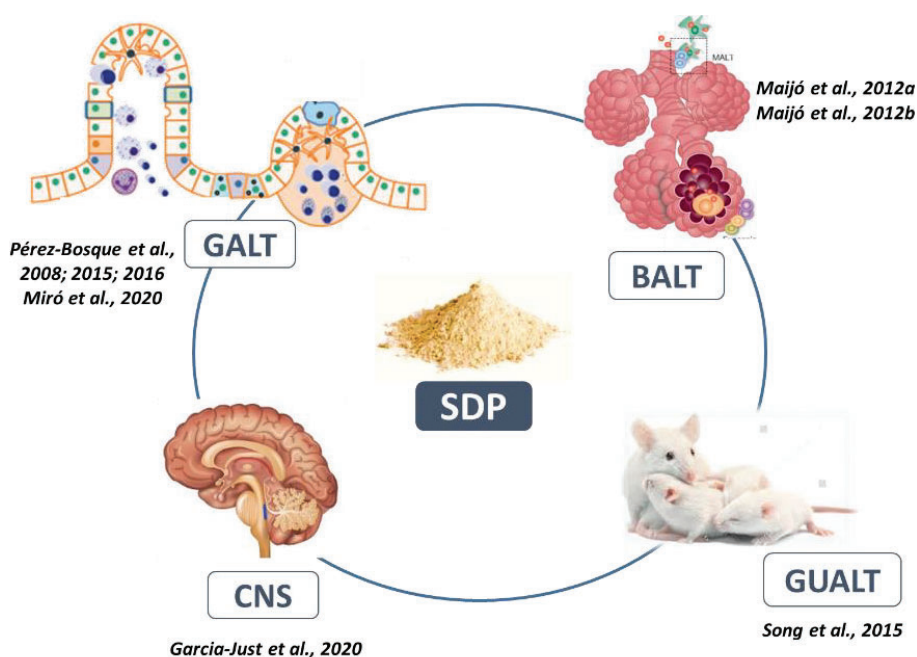


Figura 6. Àrees on la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) ha mostrat efectes antiinflamatoris. La suplementació amb SDP modula l'activitat del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT, *Gut-associated lymphoid tissue*), del teixit limfoide associat al bronqui (BALT, *Bronchus-associated lymphoid tissue*) i edl teixit limfoide associat genito-urinari (GUALT, *genito-urinary associated lymphoid tissue*). A més, la suplementació amb SDP té un efecte neuroprotector sobre el sistema nerviós central (CNS, *Central nervous system*).

Pel que fa al GUALT, la suplementació amb SDP atenua la inflamació uterina, fet que millora de la taxa d'èxit en ratolins femella prenyades i en situació d'estrès (Song et al., 2015). D'altra banda, la suplementació amb l'SDP redueix la resposta inflamatòria del BALT durant una inflamació pulmonar aguda. El patró observat és similar al de la mucosa intestinal, una reducció del percentatge de poblacions leucocitàries activades amb la conseqüent menor expressió de citocines pro-inflamatòries (Maijó et al., 2012a). Aquest efecte és acompanyat d'un augment de limfòcits Treg i secreció d'IL-10 (Maijó et al., 2012b). A més, en porquets acabats de deslletar, la suplementació amb SDP redueix l'expressió gènica de citocines pro-inflamatòries en diferents teixits com la melsa, l'hipotàlem, la glàndula adrenal, la glàndula pituïtària i el fetge i, a més, atenua la resposta inflamatòria sistèmica després de l'administració intraperitoneal de LPS (Touchette et al., 2002).

A nivell central, la suplementació amb l'SDP a animals senescents redueix la permeabilitat de la BBB i participa en el manteniment de la integritat de l'endoteli vascular cortical, ja que redueix les molècules d'adhesió cel·lular que s'incrementen amb la inflamació, facilitant el reclutament de cèl·lules immunitàries activades. De fet, la suplementació amb SDP també prevé la neuroinflamació, ja que disminueix l'expressió de citocines pro-inflamatòries i l'activació de la via NF- κ B, mentre que augmenta les anti-inflamatòries. L'estrès oxidatiu, característic de la senescència, també es veu atenuat per la suplementació amb l'SDP. A més, prevé dels efectes de l'envelliment sobre la sinaptofisina i així millora en l'eficiència sinàptica i la seva plasticitat. De fet, la suplementació amb l'SDP millora la memòria a curt i llarg termini dels ratolins senescents (Garcia-Just et al., 2020).

4.2.2. Efectes prebiòtics del plasma porcí assecat per atomització

La suplementació amb l'SDP durant 14 dies té un efecte prebiòtic en ratolins i porcs acabats de deslletar. La suplementació amb l'SDP estimula especialment l'abundància del fílum *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, ambdós productors de SCFA. A més, redueix el fílum *Proteobacteria* en porquets acabats de deslletar, el qual es relaciona amb la promoció de la inflamació intestinal (Che et al., 2019; Moretó et al., 2020).

A nivell de gènere, la suplementació amb SDP incrementa l'abundància de *Lactobacillus*, el qual s'associa a una menor inflamació intestinal i una millora integritat de la mucosa, tant en ratolins com a porquets acabats de deslletar (Moretó et al., 2020; Che et al., 2019). Aquest efecte també s'observa en porquets acabats de deslletar als que se'ls hi administra l'espècie patògena *Escherichia coli* K99 (Torrallardona et al., 2003). S'ha descrit que la

suplementació amb l'SDP redueix els gèneres *Escherichia* i *Shigella* en porcs, gèneres que es relacionen amb patologies intestinals per aquests animals (Che et al., 2019) i estimula l'abundància del gènere *Blautia* que participa en la millora de la permeabilitat intestinal i la reducció de la inflamació. Més específicament, espècies anti-inflamatòries com *Parabacteroides goldsteinii* i espècies de la família *Porphyromonadaceae* també s'incrementen amb la suplementació amb SDP en ratolins acabats de deslletar (Moretó et al., 2020).



PLANTEJAMENT I OBJECTIUS



L'envelliment és un dels factors de risc principals de la malaltia d'Alzheimer (AD). L'increment de l'esperança de vida, juntament amb altres comorbilitats, augmenten la incidència de la malaltia, la qual està creixent de forma alarmant. Actualment, no hi ha cap tractament farmacològic que retardi el deteriorament cognitiu associat a l'AD (Soria-Lopez et al., 2019). Per aquest motiu, hi ha un interès creixent en l'estudi de mesures preventives per endarrerir la progressió de la malaltia. Diferents suplementes dietètics amb característiques anti-inflamatòries i anti-oxidants podrien reduir la progressió de l'AD (Griñan-Ferré et al., 2021). El plasma porcí assecat per atomització (SDP) té propietats anti-inflamatòries a diferents mucoses de l'organisme com la intestinal (Pérez-Bosque et al., 2016), la pulmonar (Maijó et al., 2012) i la genito-urinària (Song et al., 2015). A més, atès que estudis previs han demostrat que la suplementació amb l'SDP redueix la neuroinflamació i l'estrès oxidatiu al cervell i la pèrdua de memòria de ratolins envellits (Garcia-Just et al., 2020), el primer objectiu que s'ha plantejat és:

- **Determinar si l'efecte neuroprotector de la suplementació dietètica amb l'SDP pot atenuar les característiques neuropatològiques de la malaltia d'Alzheimer en ratolins SAMP8 envellits.**

L'alteració de la microbiota o disbacteriosi està present durant l'envelliment i està associada a un increment de l'estat inflamatori que pot promoure la neuroinflamació i, finalment la neurodegeneració (Lin et al., 2019). La suplementació amb l'SDP modula la composició de la microbiota i promou l'abundància de bacteris beneficiosos per la salut en animals acabats de deslletar com porcs i ratolins (Moretó et al., 2020; Che et al., 2019). Davant d'aquestes propietats prebiòtiques de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques s'ha proposat el següent objectiu:

- **Analitzar si la suplementació dietètica amb l'SDP modifica la composició de la microbiota en ratolins senescents.**

Hi ha una evidència creixent que l'eix microbiota-intestí-cervell és la via per la qual la dieta i els suplementes alimentaris poden tenir un efecte sobre la progressió de l'AD (Kincaid et al., 2021). La microbiota i els seus subproductes poden comunicar-se amb el cervell a través d'aquest eix i la regulació i activació de les vies immunitàries, neurals i/o endocrines. Atès que l'SDP presenta propietats anti-inflamatòries i el paper que juga el sistema immunitari en l'eix microbiota-intestí-cervell, s'ha proposat:

- **Estudiar si l'eix microbiota-intestí-cervell implica canvis en l'activació de la via immunitària que poden estar participant en els efectes neuroprotectors de la suplementació dietètica amb l'SDP en ratolins envellits.**



RESULTATS



**DIETARY SPRAY-DRIED PORCINE PLASMA REDUCES
NEUROPATHOLOGICAL ALZHEIMER'S DISEASE HALLMARKS IN
SAMP8 MICE**

Rosell-Cardona C*, Griñán-Ferré C*, Pérez-Bosque A, Polo J, Pallàs M, Amat C,
Moretó M, Miró L.

**Coautoria*

Publicat, doi: 10.3390/nu13072369.

Nutrients. 2021;13(7):2369.

Dietary spray-dried porcine plasma reduces neuropathological Alzheimer's disease hallmarks in SAMP8 mice

Nutrients. 2021;13(7):2369. doi: 10.3390/nu13072369.

Resum de l'Article 1

Introducció. La malaltia d'Alzheimer (AD, *Alzheimer's disease*) és una malaltia neurodegenerativa caracteritzada pel processament aberrant de la proteïna precursora amiloide (APP), que provoca les plaques amiloides; i l'agregació de la proteïna tau hiperfosforilada, que forma els cabdells neurofibril·lars. Aquests fenòmens s'acompanyen de neuroinflamació crònica de baixa intensitat i activació de la micròglia. S'ha descrit que la suplementació dietètica amb plasma porcí assecat per atomització (SDP, *spray-dried porcine plasma*) produeix efectes anti-inflamatoris en diferents models d'inflamació intestinal. A més, la suplementació amb SDP millora la memòria a curt i llarg termini i incrementa la integritat sinàptica en ratolins senescents.

Objectius. Determinar si la suplementació amb SDP redueix els signes neuropatològics característics de l'AD en ratolins senescents SAMP8.







Material i mètodes. Els experiments s'han realitzat amb ratolins SAMP8 de 2 mesos d'edat (grup de referència jove) i de 6 mesos d'edat, que s'han dividit en dos grups segons el pinso experimental que han rebut durant 4 mesos, pinso control o pinso suplementat amb SDP al 8%. S'han determinat diferents marcadors moleculars cerebrals característics de l'AD. Entre aquests, s'han determinat els marcadors relacionats amb la patologia amiloide per Western Blot, kit ELISA o PCR en temps real; marcadors associats als cabdells neurofibril·lars, que s'han analitzat per Western Blot; i marcadors relacionats amb la neuroinflamació i l'activació de la micròglia que s'han determinat per PCR en temps real.

Resultats. Els animals senescents alimentats amb pinso control van presentar una major presència de diferents marcadors característics de l'AD, com l'abundància de p-CDK5, p-tau (Ser396), sAPP- β i A β_{40} i va reduir l'abundància de la forma inactiva de GSK3- β , p-GSK3 β (Ser9) (tot, $p < 0,05$). La suplementació amb l'SDP va prevenir d'aquests efectes i, a més, va disminuir l'expressió de *Bace1* (tot, $p < 0,05$). L'envelliment va augmentar l'expressió dels enzims que participen en el processament aberrant de l'APP (*Mme1* i *Ide1*) i de citocines pro-inflamatòries, com *Il-17* i *Il-18* (tot, $p < 0,05$). La suplementació amb SDP va atenuar d'aquests efectes (tot, $p < 0,05$) i, a més, va incrementar l'expressió de la citocina anti-inflamatòria *Tgf- β* ($p < 0,05$). La senescència va incrementar l'expressió dels marcadors d'activació microglial com *Trem2*, *Arg1* i *Ym1* (tot, $p < 0,05$). La suplementació amb l'SDP va prevenir d'aquests efectes i va atenuar l'expressió d'*Inos* ($p < 0,05$).

Conclusions. La suplementació amb SDP redueix els signes distintius neuropatològics de l'AD en ratolins senescents, que explicaria la seva millora cognitiva.

Article

Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer's Disease Hallmarks in SAMP8 Mice

Cristina Rosell-Cardona ^{1,†}, Christian Griñan-Ferré ^{2,†} , Anna Pérez-Bosque ¹ , Javier Polo ³ , Mercè Pallàs ² , Concepció Amat ¹ , Miquel Moretó ¹ and Lluïsa Miró ^{1,3,*} 

- ¹ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute for Nutrition and Food Safety, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; cristina.rosell@ub.edu (C.R.-C.); anna.perez@ub.edu (A.P.-B.); camat@ub.edu (C.A.); mmoret@ub.edu (M.M.)
- ² Department of Pharmacology, Toxicology, and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Neurosciences, CIBERNED, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; christian.grinan@ub.edu (C.G.-F.); pallas@ub.edu (M.P.)
- ³ APC Europe S.L.U., 08403 Granollers, Spain; javier.polo@apc-europe.com
- * Correspondence: lluisa.miro@ub.edu; Tel.: +34-93-4024505
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is characterized by the aberrant processing of amyloid precursor protein (APP) and the accumulation of hyperphosphorylated tau, both of which are accompanied by neuroinflammation. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) has anti-inflammatory effects in inflammation models. We investigated whether dietary supplementation with SDP prevents the neuropathological features of AD. The experiments were performed in 2- and 6-month-old SAMP8 mice fed a control diet, or a diet supplemented with 8% SDP, for 4 months. AD brain molecular markers were determined by Western blot and real-time PCR. Senescent mice showed reduced levels of p-GSK3 β (Ser9) and an increase in p-CDK5, p-tau (Ser396), sAPP β , and the concentration of A β ₄₀, (all $p < 0.05$). SDP prevented these effects of aging and reduced *Bace1* levels (all $p < 0.05$). Senescence increased the expression of *Mme1* and *Ide1* and pro-inflammatory cytokines (*Il-17* and *Il-18*; all $p < 0.05$); these changes were prevented by SDP supplementation. Moreover, SDP increased *Tgf- β* expression ($p < 0.05$). Furthermore, in aged mice, the gene expression levels of the microglial activation markers *Trem2*, *Ym1*, and *Arg1* were increased, and SDP prevented these increases (all $p < 0.05$). Thus, dietary SDP might delay AD onset by reducing its hallmarks in senescent mice.

Keywords: neuroinflammation; dietary supplementation; aging; plasma proteins; Alzheimer's disease; SAMP8



Citation: Rosell-Cardona, C.; Griñan-Ferré, C.; Pérez-Bosque, A.; Polo, J.; Pallàs, M.; Amat, C.; Moretó, M.; Miró, L. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer's Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* **2021**, *13*, 2369. <https://doi.org/10.3390/nu13072369>

Academic Editor: Panteleimon Giannakopoulos

Received: 23 May 2021
Accepted: 8 July 2021
Published: 10 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The prevalence of Alzheimer's disease (AD), already the most common type of dementia, is increasing at an alarming rate due to the life expectancy improvements of recent decades [1]. This neurodegenerative disorder, which leads to cognitive decline, is characterized by aberrant amyloid precursor protein (APP) processing, the deposition of β -amyloid (A β) peptides such as A β ₄₀ and A β ₄₂, and the aggregation of hyperphosphorylated tau (p-tau) protein, all processes that are accompanied by neuronal loss [2]. A β peptides tend to self-aggregate as oligomers in β -amyloid or senile plaques, with extracellular A β accumulation caused by cleavage of APP by the β -secretase BACE1 [3].

Tau proteins are microtubule-associated proteins that stabilize microtubules in neuronal axons. Hyperphosphorylation of tau (i.e., p-tau) leads to the accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs) and toxic species of soluble tau, which disrupt normal synaptic and neuronal function [4]. The kinases responsible for tau phosphorylation are glycogen

synthase kinase 3 β (GSK3 β) and cyclin-dependent kinase 5 (CDK5). GSK3 β , in addition to its role in the pathogenesis of NFTs, also promotes pro-inflammatory pathways through nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation. Indeed, it is inhibited when phosphorylated at Ser9, which stimulates its glucose synthesis-related physiological effects [5]. Under pathological conditions, CDK5 becomes hyperactive and causes aberrant hyperphosphorylation of tau proteins in NFTs [6] and interferes with the proteolytic processing of APP, modulating A β by affecting the secretases, which are critical for the hydrolysis of APP [7]. Therefore, these enzymes play major roles in AD by affecting amyloid processing and NFTs formation.

Another of the main features of AD pathogenesis is inflammation. During senescence, there is an increase in the low-intensity inflammatory state known as inflammaging [8]. The role of neuroinflammation in AD has been determined using genome-wide association studies that identified more than 20 gene variants as risk factors for developing AD [9]. For instance, p-tau can activate the MAPK pathway and the NF- κ B transcription factor pathway, which in turn increase IL-6 levels [10]. Similarly, A β can activate microglia, increasing the expression of cytokines [11]. Microglial cells are the immune system of the central nervous system: they can act as phagocytes, removing A β , and they play an important role in neuronal homeostasis and synaptic plasticity [12]. Indeed, activated microglia represent a noteworthy feature in AD [13].

Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) is widely used in farming as an alternative to antibiotics [14]. SDP promotes growth performance, feed efficiency, and animal survival [15,16]. Furthermore, SDP exerts anti-inflammatory effects in different models of inflammation, such as in the intestinal [17–20], pulmonary [21], and genitourinary mucosae in a mouse model, inducing low pregnancy rates by stress [22]. It also stimulates the growth of probiotic species in the gut microbiota and the expression of mucosal regulators of anti-inflammatory pathways [23]. Moreover, SDP supplementation prevents cognitive decline in senescent mice [24].

This study aimed to determine whether SDP supplementation could exert a neuroprotective effect against AD hallmarks in SAMP8 mice, a model of age-related cognitive decline and AD. These mice present several neuropathological features of AD, such as aberrant APP processing [25], oxidative stress damage [26], and neuroinflammation [27–29]. Thus, we used this rodent model to study some of the most important molecular mechanisms associated with AD.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Experimental Design and Diets

Experiments were conducted using mice prone to senescence (SAMP8 strain) obtained from Envigo (Bresso, Italy). The colony generated was kept at the animal facility of the Faculty of Pharmacy and Food Sciences of the Universitat de Barcelona under stable temperature and humidity conditions, with a 12 h:12 h light/dark cycle. All animal experiments were performed following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona and the Catalan government (ref. 484/16 and 9272, respectively). Animals were housed individually and fed experimental diets (Control or SDP) for 4 months.

SDP is a protein-rich ingredient obtained from industrial fractionation of blood from healthy pigs. Once the cellular fraction is separated, plasma is then concentrated and spray-dried, thus obtaining the so-called “spray-dried plasma” (SDP). During this process, plasma proteins are exposed to high temperatures for a very short period, and this has the advantage over conventional drying in that the proteins are not denaturalised and preserve their biological activity [30]. The SDP is considered a safe product, and its manufacturing process includes several biosafety steps [31]. Diets were balanced for energy and total N, and lysine and methionine were formulated to meet the National Research Council

requirements [32] for laboratory animals. The composition of the experimental diets has been published previously [24] and is detailed in Table 1.

The experimental design of this study included 3 groups of 6–8 animals/group: 2M, 2-month-old mice fed commercial standard feed; 6M-CTL, 6-month-old mice fed with control diet for 4 months; and 6M-SDP, 6-month-old mice fed with SDP diet for 4 months.

Table 1. The composition of experimental diets.

Ingredients	Control Diet	SDP ¹ Diet
	g/kg	
SDP	-	80
Dried skim milk	530.7	340.5
Corn starch	199.3	308.8
Sucrose	94.5	94.5
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	50
AIN-93-G-MX (94046) ²	35	35
AIN-93 VX (94047) ²	15	15
Choline bitartrate	3	3
Methionine	2.5	3.2

¹ SDP (spray-dried plasma) was provided by APC-Europe (Granollers, Spain). ² AIN-93 MX, mineral mix AIN-93 VX, vitamin mix; both were provided by Envigo (Breso, Italy).

2.2. Sample Collection

At the end of the experimental period, mice were anaesthetized with ketamine: xylazine (100 mg/kg:10mg/kg); blood was obtained by cardiac puncture and the animal was euthanized during the experimental intervention. The brain was collected, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

2.3. Sample Homogenization

Samples of brain tissue were homogenized using a Polytron (PRO Scientific Inc, Oxford, CT, USA) at 20,000 rpm in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, and 2% (*v/v*) inhibitor protease cocktail. The homogenate was centrifuged at 4°C at $955 \times g$ for 20 min. All reagents were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA).

2.4. Western Blot

Western blot procedure was performed, as described previously by Moretó et al. [23]. Briefly, samples of homogenized brain tissue were quantified for protein concentration using the Bradford method (Bio-Rad, Munich, Germany). Equal amounts of protein (50 μg) were separated on 5–18% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Munich, Germany). Membranes were blocked by incubation for 90 min at room temperature in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST) and 5% dry milk. Afterwards, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: β -amyloid (1/500, Abcam, Cambridge, UK); tau (1/1000, Millipore, Billerica, MA, USA); p-tau (Ser396, 1/1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); CDK5 (1/1000, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA); p-CDK5 (1/1000, Abcam, Cambridge, UK); GSK3 (1/1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA); p-GSK3 (Ser9, Abcam, Cambridge, UK); sAPP α (1/1000, Covance, Princeton, NJ, USA); sAPP β (1/1000, Covance, Princeton, NJ, USA); β -actin (1/30000, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). Membranes were washed and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) for 2 h at room temperature. Protein bands were visualized using a chemiluminescence detection kit Clarity and ChemiDoc XRS+ instrument (both from Bio-Rad, Munich, Germany). After their detection, hybridization bands were quantified using the plug-in Gel Lanes fit from ImageJ software.

2.5. ELISA Assay

Cortical tissues were homogenized in cold 5 M guanidine-HCl/50 mM Tris buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). The quantification of amyloid- β_{40} and amyloid- β_{42} was performed with the mouse A β_{40} and A β_{42} ELISA Kits (both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer's instructions.

2.6. Real-Time PCR

RNA extraction of the cortex and reverse transcription were carried out as described previously [24]. The primers used are shown in Table 2. Product fidelity was confirmed by melt curve analysis. TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for the following genes: *Disintegrin and metalloproteinase 10* (*Adam10*, Mm00545742_m1), β -secretase (*Bace1*, Mm00478664_m1), *Insulin-degrading enzyme* (*Ide*, Mm00473077_m1), and *Neprilysin* (also known as *Membrane metallo-endopeptidase* *Mme*, Mm00485028_m1), following the manufacturer's instruction. Each PCR run included duplicates of reverse transcription for each sample and negative controls (reverse transcription-free samples, RNA-free sample). Quantification of the target gene transcripts was performed using *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (*Hprt1*, Mm00446968_m1) gene expression as reference, and was carried out with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [33].

Table 2. Primers used for real-time PCR.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size (bp)
<i>Arg1</i>	GACAGGGCTCCTTTTCAGGAC	GCCAAGGTAAAGCCACTGC	108
<i>Il-17</i>	AGCAGCGATCATCCCTCAA	TTGCGCCAAGGGAGTTAAA	104
<i>Il-18</i>	GTTTACAAGCATCCAGGCACAG	GAAGGTTTGAGGCGGCTTTC	151
<i>Inos</i>	CCCAACAATACAAGATGACCCT	AGGGATTCTGGAACATTCTGTG	87
<i>Tgf-b</i>	CAGGGTGAAGGGGAAAACCTC	AGTTCGGTCATTAGTCTCCG	204
<i>Trem2</i>	CCTGAAGAAGCGGAATGGGA	CTTGATTCTGGAGGTGCTGT	269
<i>Ym1</i>	GTGGAGAAAGACATTCCAAGGC	CAGTTCAGGGATCTTGATCCCA	90

Arg1: arginase1; *Il*: interleukin; *Inos*: inducible nitric oxide synthase; *Tgf-b*: transforming growth factor beta; *Trem-2*: triggering receptor expressed on myeloid cells 2; *Ym1*: chitinase-like protein 3 (Chil3).

2.7. Statistical Analysis

Results are presented as means \pm SEM. A test was performed to detect outliers (Grubb test) and check the homogeneity of variance (Levene's test) and data normality (Shapiro-Wilk test) for all groups. To compare the different groups, one-way ANOVA followed by the Fisher's post hoc test was used when data were normally distributed; otherwise, the non-parametric Kruskal-Wallis test was carried out. When normally distributed data showed no sphericity, we applied an ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction. All data were analyzed using GraphPad Prism[®] software Version 8 (GraphPad Software Inc.). Differences in tests were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Amyloid Pathology

Neither aging nor SDP supplementation modified sAPP α abundance (Figure 1A). Aging increased the abundance of sAPP β in the brain tissue compared to young mice ($p = 0.030$; Figure 1B). SDP supplementation reduced the abundance of this protein ($p = 0.003$). Levels of A β_{40} and A β_{42} were augmented in the cortex of 6-month-old mice (both, $p < 0.001$, Figure 1C,D, respectively), and SDP supplementation prevented A β_{40} increase ($p = 0.032$). Relative abundance of β -amyloid (A β) was not altered by senescence nor by SDP supplementation (Figure 1E).

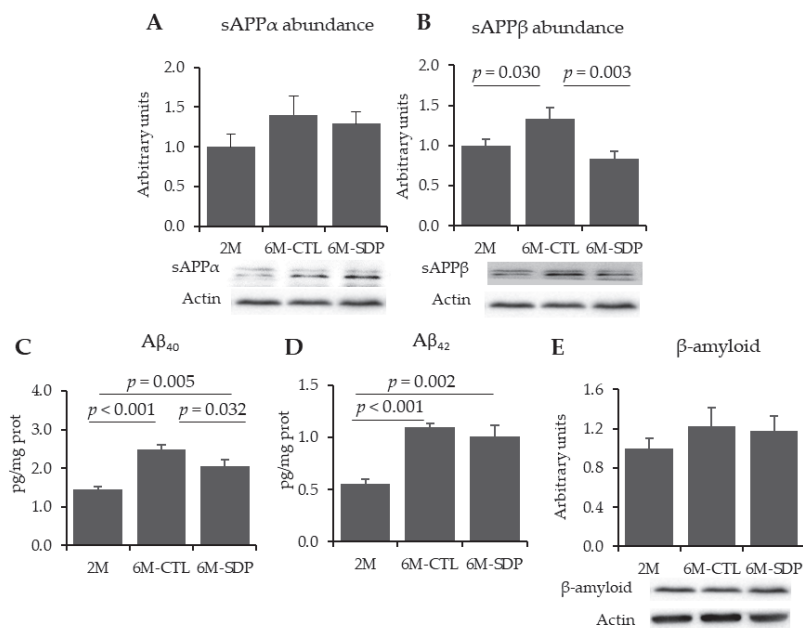


Figure 1. Effects of SDP supplementation on amyloid pathology markers. Panels (A–E) show the abundance of sAPP α , sAPP β , A β ₄₀, A β ₄₂, and β -amyloid in brain tissue. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ – 6 mice). Statistics: ANOVA (Fisher’s multiple comparison test). A β : β -amyloid; APP: amyloid protein precursor.

Aging did not modify *Adam10* and *Bace1* gene expression (Figure 2A,B, respectively). Both genes were decreased in mice that were fed the SDP-supplemented diet ($p = 0.003$ for both enzymes). Gene expression of the A β degrading enzymes, *Ide1* and *Mme1*, was higher in the cortex of 6-month-old SAMP8 mice than in young mice (both $p = 0.005$, Figure 2C,D), and these effects were prevented by SDP supplementation ($p = 0.030$ and $p = 0.024$, respectively).

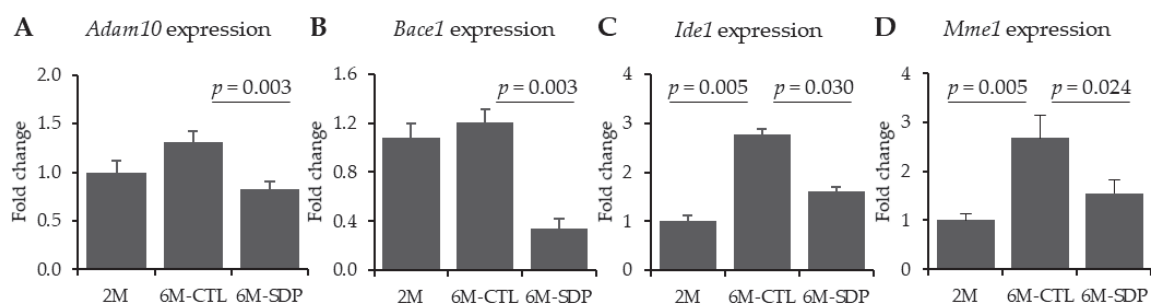


Figure 2. Effects of SDP supplementation on gene expression of enzymes related to aberrant APP processing. Panels (A–D) show the expression of *Adam10*, *Bace1*, *Ide1*, and *Mme1*, respectively, in cortex tissue. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ – 6 mice). Statistics: ANOVA (Fisher’s multiple comparison test). *Adam10*: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; *Bace1*: beta-secretase 1; *Ide1*: insulin-degrading enzyme; *Mme1*: neprilysin.

3.2. Neurofibrillary Tangles

The total abundance of GSK3 β and CDK5 proteins was not altered by aging nor by SDP supplementation. Nevertheless, the abundance of phosphorylated GSK3 β was reduced in aged mice compared with the younger mice ($p = 0.017$, Figure 3A), and dietary supplementation with SDP prevented this change ($p = 0.041$). Moreover, aging augmented the abundance of phosphorylated CDK5 (p-CDK5; $p = 0.008$, Figure 3B), and this increase was completely prevented by SDP supplementation ($p = 0.035$). Relative abundance of total tau was not changed, neither by aging nor by SDP supplementation. However, 6M-

CTL mice showed increased abundance of phosphorylated tau on Ser196 (p-tau (Ser396); $p = 0.009$; Figure 3C), and SDP supplementation prevented this increase ($p = 0.032$).

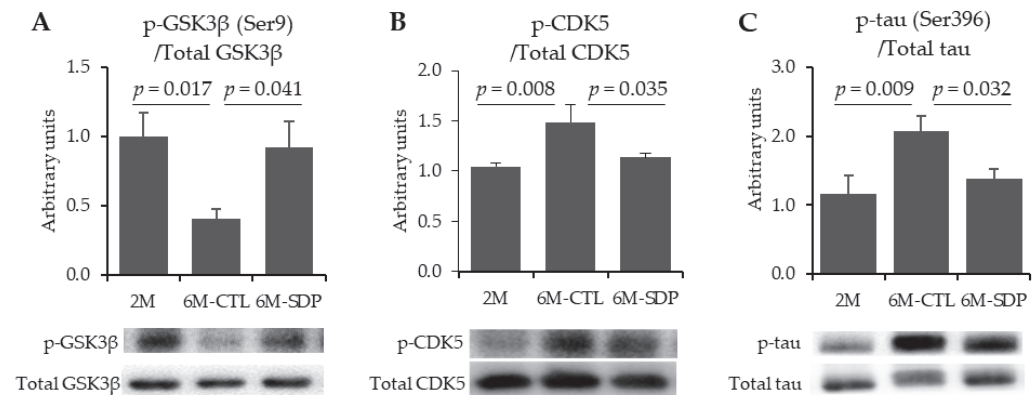


Figure 3. Effect of SDP supplementation on neurofibrillary tangles. Panels (A–C) show the abundance of p-GSK3β (Ser9), p-CDK5, and p-tau (Ser396) in the brain tissue, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5–6$ mice). Statistics: one-way ANOVA followed by Fisher’s multiple comparison test. GSK3β: glycogen synthase kinase 3β; CDK5: cyclin dependent kinase 5.

3.3. Neuroinflammatory Markers

The gene expression of the pro-inflammatory cytokines *Il-17* and *Il-18* was increased in 6M-CTL mice compared to 2M mice ($p = 0.012$ and $p = 0.033$, respectively, Figure 4A,B), whereas the SDP supplementation prevented it ($p = 0.005$ and $p = 0.004$, respectively). Furthermore, 6M-CTL mice showed a similar gene expression of the anti-inflammatory cytokines *Tgf-β* in the cortex compared to the 2M group, while SDP supplementation increased the gene expression of this anti-inflammatory cytokine in respect to 6M-CTL mice ($p = 0.029$) and young mice ($p = 0.008$, Figure 4C). SDP supplementation reduced the ratio *Il-17/Tgf-β* compared to 6M-CTL mice ($p = 0.008$, Figure 4D) and the ratio of *Il-18/Tgf-β* in respect to senescent control mice ($p = 0.004$, Figure 4E) and young mice ($p = 0.014$).

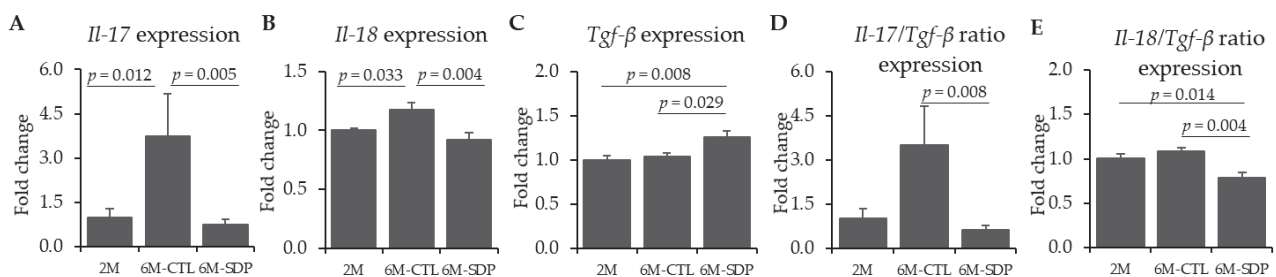


Figure 4. Effect of SDP supplementation on cytokine gene expression. Panels (A–C) show the gene expression of *Il-17*, *Il-18*, and *Tgf-β* in cortex tissue, respectively. Panels (D,E) show the gene expression ratio *Il-17/Tgf-β* and *Il-18/Tgf-β* in cortex tissue, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5–6$ mice). Statistics: one-way ANOVA followed by Fisher’s multiple comparison test. *Il*: interleukin; *Tgf-β*: transforming growth factor beta.

3.4. Microglia Markers

Gene expression of *Inos* was not altered by aging (Figure 5A), but SDP supplementation diminished it ($p = 0.009$). Gene expression of *Trem2* in cortex of 6M-CTL mice was higher than in young mice ($p = 0.004$ Figure 5B), and SDP supplementation prevented it ($p = 0.040$). Moreover, the gene expression of *Arg1* and *Ym1* was also increased in aged mice ($p = 0.016$ and $p = 0.049$, Figure 5C,D, respectively), and SDP supplementation reduced these effects ($p = 0.030$ and $p = 0.025$, respectively).

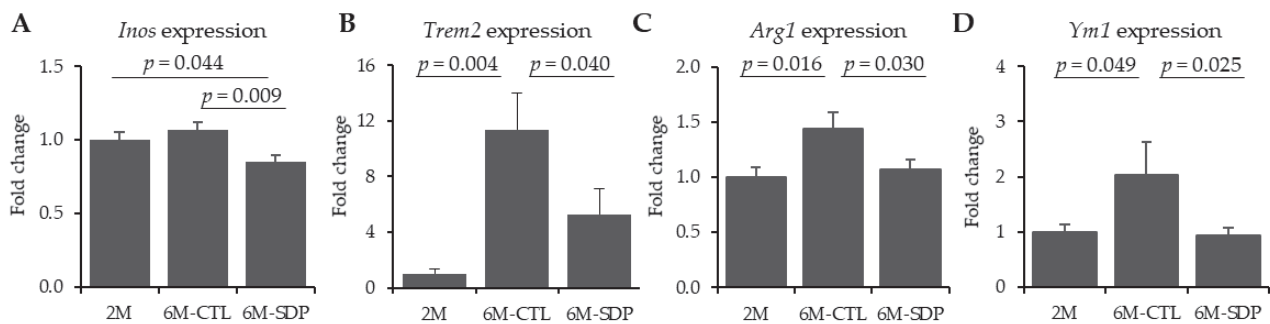


Figure 5. Effect of SDP supplementation on markers of microglia. Panels (A–D) show the gene expression of *Inos*, *Trem2*, *Arg1*, and *Ym1* in cortex tissue, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5–6$ mice). Statistics: one-way ANOVA followed by Fisher’s multiple comparison test. *Inos*: inducible nitric oxide synthase; *Trem2*: triggering receptor expressed on myeloid cells 2; *Arg1*: arginase 1; *Ym1*: chitinase-like protein 3 (Chil3).

4. Discussion

The recent approval of aducanumab, albeit with weak scientific evidence, has created a new drug for AD, as well as an anti-amyloid therapy [34]. However, no pharmacological therapy can effectively halt the decline in cognitive function associated with AD [1]. Therefore, there is growing interest in the study of protective measures to reduce disease incidence. Recent work shows that antioxidants and anti-inflammatory supplements may help decrease AD risk [35,36]. Accordingly, in this study, we examined the effects of dietary supplementation with SDP, a supplement with well-known anti-inflammatory properties. Previous studies have shown that SDP supplementation improves short- and long-term memory and increases synaptic integrity. These effects have been associated with reduced pro-inflammatory cytokine expression and increased IL-10 abundance in brain tissue [24]. Our current results show that SDP can reduce the main hallmarks of AD, such as aberrant APP processing and NFTs formation, which are substantial contributors to the disease [37].

As shown here, 6-month-old SAMP8 mice exhibited an increased amyloid and tau pathologies, as evaluated by several markers such as sAPP β , A β ₄₀, A β ₄₂, and *p*-tau, indicating that they already had early molecular and clinical features of AD. These early events are consistent with cognitive impairment because 6-month-old SAMP8 mice already have both short- and long-term memory loss, as indicated by previous work conducted in our laboratory [24]. Activation of the amyloidogenic pathway of APP processing results in the production of sAPP β and the generation of neurotoxic A β . Activation of this pathway involves the sequential cleavage of APP by β -secretase (BACE1) and γ -secretase, which results in the production of sAPP β and the generation of neurotoxic A β peptides [38]. Furthermore, cleavage of APP by BACE1 is an essential first step in the production of A β that has been well recognized as an initial causal event of the disease [39]. Our results suggest that SDP supplementation reduces the levels of sAPP β , as well as A β ₄₀ abundance, by decreasing the level of the amyloidogenic secretase BACE1, suggesting a reduction in the amyloidogenic pathway. These effects might explain the improved memory retention, in both the short- and the long-term, previously observed in 6-month-old SAMP8 mice supplemented with SDP [24]. Moreover, this effect of SDP is comparable to that of other nutritional interventions, which include supplementation with vitamin D, resveratrol, and lycopene, compounds, that also reduce the levels of A β -related biomarkers, such as APP, sAPP β , and BACE1, in both mice and patients with AD [40–42].

Hyperphosphorylated tau is a neuropathological hallmark of AD that disrupts axonal transport and leads to NFTs accumulation [4]. In addition, tau phosphorylation is modulated by several protein kinases and phosphatases, such as GSK3 β and CDK5 [43]. Of these kinases, CDK5 is particularly interesting because it may play a crucial role in the pathogenesis of the disease by potentially regulating the activity of other critical kinases, including GSK3 β [6]. In addition, CDK5 and its potent activator p25 have been linked to the reduced synaptic density observed in early stages of AD [44]. In our hands, SDP

reduced the abundance of *p*-tau and *p*-CDK5 while increasing that of *p*-GSK3 β . Unlike CDK5, GSK3 β is inactivated when phosphorylated in Ser9 [5]. Thus, GSK3 β phosphorylation in Ser9 improves cell function and reduces NFTs levels [45]. Moreover, the effect of SDP associated with reduced abundance of activated CDK5 and *p*-tau is consistent with previous results showing that 6-month-old SAMP8 mice supplemented with SDP show a higher abundance of synaptophysin [24], which is indicative of higher synaptic density [46].

Although the two cardinal pathological features of AD and neuroinflammation were traditionally considered independent pathways, recent studies show an interaction between these processes, indicating that neuroinflammation might significantly affect the onset of AD [47]. Several studies indicate increased levels of pro-inflammatory cytokines in AD [48,49]. Moreover, pro-inflammatory cytokines and NF- κ B signaling upregulate the BACE1 pathway, resulting in elevated A β production [50], and this correlates with the NF- κ B increase found in aged SAMP8 mice [24]. For instance, IL-17 can activate glial cells [51], and IL-18 upregulates components of the γ -secretase complex, accelerating A β production, as well as GSK3 β and CDK5 kinases, which promote the hyperphosphorylation of tau [52]. Moreover, reductions in microglial activation and neuronal loss are seen in IL-18 knockout mice [53]. In this study, we observed an increase in the gene expression of pro-inflammatory cytokines such as *Il-17* (and to a lesser degree *Il-18*) with age, and SDP supplementation not only prevented this effect but also increased the expression of the anti-inflammatory factor *Tgf- β* . Consequently, SDP supplementation promoted the anti-inflammatory pathway, as shown by the reduction in the *Il-17/Tgf- β* and *Il-18/Tgf- β* ratios. This might be associated with the neuroprotective effects of SDP found in the aberrant amyloid processing pathway and in NFTs. These anti-inflammatory effects of SDP correlate well with previous results showing that the SDP diet reduced the levels of NF- κ B and pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1 β and TNF- α , and increased IL-10 in 6-month-old SAMP8 mice [24]. Similarly, recent studies have reported that anti-inflammatory drugs play a significant role in the AD reduction strategy [54,55].

Activated microglial cells surrounding amyloid plaques and the presence of T-cells promote neuroinflammation in AD. Indeed, there is growing interest in analyzing the role of microglia in AD because activated microglia are another key hallmark of the pathology [9]. Activated microglia are localized around senile plaques [56] and NFTs in the brain tissue of AD patients and transgenic mouse models [57]. In our hands, 6-month-old SAMP8 mice have increased hallmarks of AD and neuroinflammation, which might elevate the levels of activated M2-type microglia. Indeed, recent studies confirm that, in early stage AD, M2 phenotype microglia are activated to prevent the overproduction of A β and further pathological damage [58,59]. Specifically, TREM2, which is dominantly expressed by microglia in the central nervous system, is also increased in 7-month-old SAMP8 mice from [60]. Moreover, Arg1⁺ microglia have been observed to increase during IL-1 β neuroinflammation in a negative feedback mechanism [61], and this cytokine is increased in 6M-SAMP8 mice, as shown in previous work [24]. These facts correlate well with our findings of increased expression of the M2 microglial markers *Trem2*, *Arg1*, and *Ym1* in aged mice. In a similar manner to our results, previous studies have shown that SDP supplementation reduces *Inos* gene expression in a mouse model of acute lung injury [21], and other natural products such as curcumin can inhibit this gene expression in microglia [62]. This relationship between neuroinflammation and activated microglia might explain the reduction in microglia markers by SDP supplementation, as SDP supplementation reduces both neuronal and systemic inflammation [19,20].

SDP is a complex mixture of functional proteins (albumin, transferrin, immunoglobulins, and other globulins), growth factors, bioactive peptides, and other biological components. Its mechanism of action may involve several of its functional components, rather than just one, which may act directly on the intestinal immune response [18], or it may promote the growth of a microbiota with anti-inflammatory effects, as demonstrated by Moretó et al. [23]. Recently, plasma protein-derived supplements have been observed to

inhibit TNF secretion in rat T lymphocytes and monocytes in vitro, and to regulate the immune response of intestinal enterocytes through MyD88 and NF κ B [63]. Stimulation of MyD88 and NF- κ B-related receptors on enterocytes involves the activation of immunomodulatory complexes, including not only cytokine/chemokine secretion [64] but also the secretion of antibacterial peptides [65]. Conversely, there is growing evidence regarding the relationship between the gut microbiota, the digestive system, and the brain, as well as their association with inflammation [66–68]. Changes in the composition of the gut microbiota coextensive with aging likely contribute to immunosenescence and to the development of a pro-inflammatory phenotype [69]. In fact, SAMP8 mice at 6 months of age, showed a reduction in probiotic species, while the proinflammatory species of the intestinal microbiota increased [70]; these are able to secrete bacterial amyloids and lipopolysaccharides that are considered neurotoxic [71]. Moreover, SDP increases the presence of bacterial families that enhance the intestinal barrier function, as well as the growth of species that are well-known mediators of anti-inflammatory and tolerogenic responses [23,72]. These results suggest that some components in SDP may be effective in changing the profile of the microbiota, with potential implications for reducing intestinal and peripheral inflammation [19], and eventually communicating with to distant areas such as the brain [73].

5. Conclusions

In conclusion, SDP supplementation increases brain resilience against the key features of AD in SAMP8 mice, reducing the neuroinflammation and attenuating the microglial activation (Figure 6).

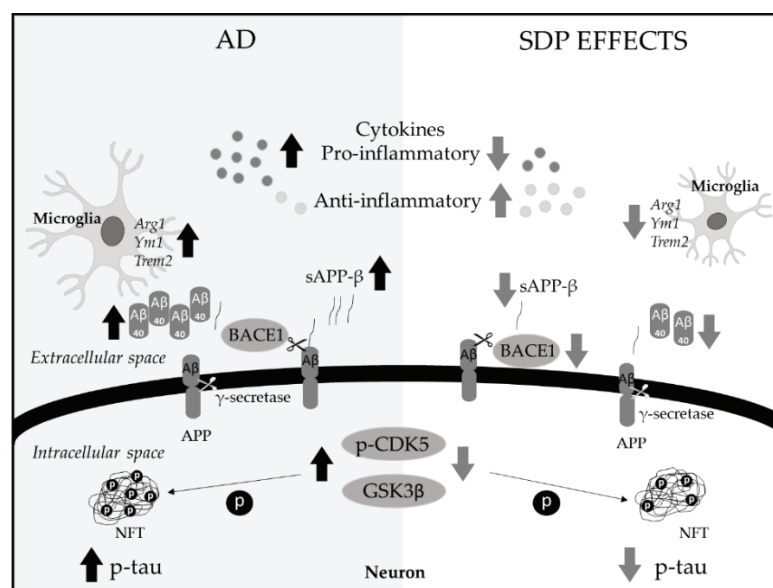


Figure 6. Representative scheme of the effects of SDP on AD hallmarks. SDP supplementation decreases the aberrant APP processing pathway and the hyperphosphorylation of tau. These preventive effects are accompanied by a reduction in the neuroinflammation and an attenuation in the activated microglia. APP: amyloid precursor protein, Arg1: arginase1, A β_{40} : β -Amyloid 1-40, BACE1: β -secretase, CDK5: cyclin-dependent kinase 5, GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β , NFT: neurofibrillary tangles, P: phosphorylation, Trem2: triggering receptor expressed on myeloid cells 2, Ym1: chitinase-like protein 3 (Chil3).

Author Contributions: Conceptualization and design of the experiments, C.G.-F., A.P.-B., J.P., M.P., C.A., M.M., and L.M.; methodology and data analysis, C.R.-C., L.M., A.P.-B.; contribution with essential reagents and materials, C.G.-F., J.P., M.P.; writing—original draft preparation, L.M. and C.R.-C., writing—review and editing, C.G.-F., A.P.-B., M.P., C.A., and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by APC-Europe SLU (Granollers, Spain) by research contracts with the Bosch i Gimpera Foundation of the University of Barcelona. The research groups were also supported by grants 2017SGR945 and 2017SGR106 for Consolidated Research Groups, Generalitat de Catalunya, Spain. We also thank Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER funds (PID2019-106285RB) for financial support. CR-C was supported by a grant from the Bosch i Gimpera Foundation (Universitat de Barcelona).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona and the Catalan government (ref. 484/16 and 9272, respectively).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: C.R.-C., C.G.-F., A.P.-B., M.P., C.A., M.M. and have no conflicts of interests. J.P. and L.M. are employed by A PC-Europe SLU. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Soria-Lopez, J.A.; González, H.M.; Léger, G.C. Alzheimer's disease. In *Handbook of Clinical Neurology*, 3rd ed.; DeKosky, S.T., Asthana, S., Eds.; Elsevier: Boston, MA, USA, 2019; Volume 167, pp. 231–255. [[CrossRef](#)]
2. Ozben, T.; Ozben, S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clin. Biochem.* **2019**, *72*, 87–89. [[CrossRef](#)]
3. Vassar, R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2014**, *6*, 89. [[CrossRef](#)]
4. Chong, F.P.; Ng, K.Y.; Koh, R.Y.; Chye, S.M. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 965–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Souder, D.C.; Anderson, R.M. An expanding GSK3 network: Implications for aging research. *Geroscience* **2019**, *41*, 369–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Liu, S.L.; Wang, C.; Jiang, T.; Tan, L.; Xing, A.; Yu, J.T. The role of Cdk5 in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 4328–4342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lu, T.T.; Wan, C.; Yang, W.; Cai, Z. Role of Cdk5 in amyloid-beta pathology of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2019**, *16*, 1206–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ader, R.; Godbout, J.P.; Johnson, R.W. Aging, neuroinflammation and behavior. In *Psychoneuroimmunology*, 4th ed.; Ader, R., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2009; pp. 322–345.
9. Dansokho, C.; Heneka, M.T. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2018**, *125*, 771–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Medeiros, R.; LaFerla, F.M. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp. Neurol.* **2013**, *239*, 133–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Rogers, J.; Strohmeyer, R.; Kovelowski, C.J.; Li, R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* **2002**, *40*, 260–269. [[CrossRef](#)]
12. Stephan, A.H.; Barres, B.A.; Stevens, B. The complement system: An unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **2012**, *35*, 369–389. [[CrossRef](#)]
13. Sarlus, H.; Heneka, M.T. Microglia in Alzheimer's disease. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 3240–3249. [[CrossRef](#)]
14. Torrallardona, D. Spray dried animal plasma as an alternative to antibiotics in weanling pigs—A review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2010**, *23*, 131–148. [[CrossRef](#)]
15. Van Dijk, A.J.; Margry, R.J.C.F.; Van der Lee, A.G.; Hemke, G.; Beynen, A.C. Growth performance and health status in weanling piglets fed spray-dried porcine plasma under typical Northern European conditions. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2002**, *86*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; González-Esquerra, R.; Polo, J. Impact of spray-dried plasma on intestinal health and broiler performance. *Microorganisms* **2019**, *7*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. 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.* **2010**, *140*, 25–30. [[CrossRef](#)]
18. 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* **2016**, *8*, 657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Miró, L.; Garcia-Just, A.; Amat, C.; Polo, J.; Moretó, M.; Pérez-Bosque, A. Dietary animal plasma proteins improve the intestinal immune response in senescent mice. *Nutrients* **2017**, *9*, 1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Miró, L.; Amat, C.; Rosell-Cardona, C.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Pérez-Bosque, A.; Moretó, M. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma attenuates colon inflammation in a genetic mouse model of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6760. [[CrossRef](#)]
21. Maijón, M.; Miro, L.; Polo, J.; Campbell, J.; Russell, L.; Crenshaw, L.; Weaver, E.; Moreto, M.; Pérez-Bosque, A. Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 867–875. [[CrossRef](#)]
22. Song, M.; Liu, Y.; Lee, J.J.; Che, T.M.; Soares-Almeida, J.A.; Chun, J.L.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Crenshaw, J.D.; Seo, S.W.; et al. Spray-dried plasma attenuates inflammation and improves pregnancy rate of mated female mice. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 298–305. [[CrossRef](#)]
23. Moretó, M.; Miró, L.; Amat, C.; Polo, J.; Manichanh, C.; Pérez-Bosque, A. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma has prebiotic effects on gut microbiota in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2926. [[CrossRef](#)]
24. Garcia-Just, A.; Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Amat, C.; Polo, J.; Pallàs, M.; Griñán-Ferré, C.; Moretó, M. Dietary spray-dried porcine plasma prevents cognitive decline in senescent mice and reduces neuroinflammation and oxidative stress. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 303–311. [[CrossRef](#)]
25. Morley, J.E.; Vijaya, S.A.; Kumar, B.; Armbrecht, H.J. The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1123–1130. [[CrossRef](#)]
26. Griñán-Ferré, C.; Palomera-Ávalos, V.; Puigoriol-Illamola, D.; Camins, A.; Porquet, D.; Plá, V.; Aguado, F.; Pallàs, M. Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp. Gerontol.* **2016**, *80*, 57–69. [[CrossRef](#)]
27. Pallàs, M. Senescence-accelerated mice P8: A tool to study brain aging and Alzheimer's disease in a mouse model. *ISRN Cell Biol.* **2012**, 1–12. [[CrossRef](#)]
28. Miyamoto, M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 139–148. [[CrossRef](#)]
29. Takeda, T.; Hosokawa, M.; Higuchi, K.; Hosono, M.; Akiguchi, I.; Katoh, H. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch. Gerontol. Geriatr.* **1994**, *19*, 185–192. [[CrossRef](#)]
30. Borg, B.S.; Campbell, J.M.; Russel, L.E.; 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.* **2002**, *33*, 97–100.
31. Blázquez, E.; Rodríguez, C.; Ródenas, J.; Segalés, J.; Pujols, J.; Polo, J. Biosafety steps in the manufacturing process of spray-dried plasma: A review with emphasis on the use of ultraviolet irradiation as a redundant biosafety procedure. *Porc. Health Manag.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)]
32. National Research Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th ed.; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1995.
33. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
34. Filling the void for new Alzheimer's disease therapy. *Nat. Aging* **2021**. [[CrossRef](#)]
35. Griñán-Ferré, C.; Bellver-Sanchis, A.; Izquierdo, V.; Corpas, R.; Roig-Soriano, J.; Chillón, M.; Andres-Lacueva, C.; Somogyvári, M.; Solti, C.; Sanfeliu, C.; et al. The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *67*, 101271. [[CrossRef](#)]
36. Canhada, S.; Castro, K.; Perry, I.S.; Luft, V.C. Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutr. Neurosci.* **2018**, *21*, 529–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Masters, C.L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C.C.; Sperling, R.A.; Cummings, J.L. Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fisher, C.L.; Resnick, R.J.; De, S.; Acevedo, L.A.; Lu, K.P.; Schroeder, F.C.; Nicholson, L.K. Cyclic cis-locked phospho-dipeptides reduce entry of A β PP into amyloidogenic processing pathway. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *55*, 391–410. [[CrossRef](#)]
39. Cai, Z.; Liu, Z.; Xiao, M.; Wang, C.; Tian, F. Chronic cerebral hypoperfusion promotes amyloid-beta pathogenesis via activating β/γ -secretases. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 3446–3455. [[CrossRef](#)]
40. Wang, J.; Li, J.; Wang, Z.; Cui, Y.; Tan, X.; Yuan, T.; Liu, Q.; Liu, Z.; Liu, Z. Supplementation of lycopene attenuates lipopolysaccharide-induced amyloidogenesis and cognitive impairments via mediating neuroinflammation and oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *56*, 16–25. [[CrossRef](#)]
41. Corpas, R.; Griñán-Ferré, C.; Rodríguez-Farré, E.; Pallàs, M.; Sanfeliu, C. Resveratrol Induces Brain Resilience against Alzheimer Neurodegeneration through Proteostasis Enhancement. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 1502–1516. [[CrossRef](#)]
42. Jia, J.; Hu, J.; Huo, X.; Miao, R.; Zhang, Y.; Ma, F. Effects of vitamin D supplementation on cognitive function and blood A β -related biomarkers in older adults with Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2019**, *90*, 1347–1352. [[CrossRef](#)]
43. Lee, S.; Hall, G.F.; Shea, T.B. Potentiation of tau aggregation by cdk5 and GSK3 β . *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *26*, 355–364. [[CrossRef](#)]
44. Sheng, Y.; Zhang, L.; Su, S.C.; Tsai, L.H.; Zhu, J.J. Cdk5 is a new rapid synaptic homeostasis regulator capable of initiating the early Alzheimer-like pathology. *Cereb. Cortex* **2016**, *26*, 2937–2951. [[CrossRef](#)]

45. Hermida, M.A.; Kumar, J.D.; Leslie, N.R. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv. Biol. Regul.* **2017**, *65*, 5–15. [[CrossRef](#)]
46. Del Valle, J.; Bayod, S.; Camins, A.; Beas-Zárate, C.; Velázquez-Zamora, D.A.; 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. Alzheimer's Dis.* **2012**, *32*, 233–240. [[CrossRef](#)]
47. Korzhevskii, D.E.; Kirik, O.V. Brain Microglia and microglial markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2016**, *46*, 284–290. [[CrossRef](#)]
48. Park, J.C.; Han, S.H.; Mook-Jung, I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: A brief review. *BMB Rep.* **2020**, *53*, 10–19. [[CrossRef](#)]
49. Shen, X.N.; Niu, L.D.; Wang, Y.J.; Cao, X.P.; Liu, Q.; Tan, L.; Zhang, C.; Yu, J.T. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2019**, *90*, 590–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Sastre, M.; Dewachter, I.; Landreth, G.E.; Willson, T.M.; Klockgether, T.; van Leuven, F.; Heneka, M.T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9796–9804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Chen, J.; Liu, X.; Zhong, Y. Interleukin-17A: The key cytokine in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 566922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. White, C.S.; Lawrence, C.B.; Brough, D.; Rivers-Auty, J. Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **2017**, *27*, 223–234. [[CrossRef](#)]
53. Sugama, S.; Wirz, S.A.; Barr, A.M.; Conti, B.; Bartfai, T.; Shibasaki, T. Interleukin-18 null mice show diminished microglial activation and reduced dopaminergic neuron loss following acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment. *Neuroscience* **2004**, *128*, 451–458. [[CrossRef](#)]
54. Griñán-Ferré, C.; Codony, S.; Pujol, E.; Yang, J.; Leiva, R.; Escolano, C.; Puigoriol-Illamola, D.; Companys-Aleman, J.; Corpas, R.; Sanfeliu, C.; et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase as a new therapy for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2020**, *17*, 1825–1835. [[CrossRef](#)]
55. Wang, J.; Tan, L.; Wang, H.F.; Tan, C.C.; Meng, X.F.; Wang, C.; Tang, S.W.; Yu, J.T. Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: An updated systematic review and meta-analysis. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *44*, 385–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zotova, E.; Bharambe, V.; Cheaveau, M.; Morgan, W.; Holmes, C.; Harris, S.; Neal, J.W.; Love, S.; Nicoll, J.A.; Boche, D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain* **2013**, *136*, 2677–2696. [[CrossRef](#)]
57. Nilson, A.N.; English, K.C.; Gerson, J.E.; Whittle, T.B.; Crain, C.N.; Xue, J.; Sengupta, U.; Castillo-Carranza, D.L.; Zhang, W.; Gupta, P.; et al. Tau oligomers associate with inflammation in the brain and retina of tauopathy mice and in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *55*, 1083–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Li, L.; Li, L.; Zhang, J.; Huang, S.; Liu, W.; Wang, Z.; Liang, S.; Tao, J.; Chen, L. Disease stage-associated alterations in learning and memory through the electroacupuncture modulation of the cortical microglial M1/M2 polarization in mice with Alzheimer's disease. *Neural Plast.* **2020**, 8836173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zheng, H.; Cheng, B.; Li, Y.; Li, X.; Chen, X.; Zhang, Y.W. TREM2 in Alzheimer's disease: Microglial survival and energy metabolism. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Jiang, T.; Yu, J.T.; Zhu, X.C.; Tan, M.S.; Gu, L.Z.; Zhang, Y.D.; Tan, L. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 knockdown exacerbates aging-related neuroinflammation and cognitive deficiency in senescence-accelerated mouse prone 8 mice. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1243–1251. [[CrossRef](#)]
61. Cherry, J.D.; Olschowka, J.A.; O'Banion, M.K. Arginase 1⁺ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ghasemi, F.; Bagheri, H.; Barreto, G.E.; Read, M.I.; Sahebkar, A. Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotox. Res.* **2019**, *36*, 12–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hernández-Chirlaque, C.; Aranda, C.J.; Ocón, B.; Polo, J.; Martínez-Augustin, O.; Sánchez de Medina, F. Immunoregulatory Effects of Porcine Plasma Protein Concentrates on Rat Intestinal Epithelial Cells and Splenocytes. *Animals* **2021**, *11*, 807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Günther, C.; Buchen, B.; Neurath, M.F.; Becker, C. Regulation and pathophysiological role of epithelial turnover in the gut. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *35*, 40–50. [[CrossRef](#)]
65. Menendez, A.; Willing, B.P.; Montero, M.; Wlodarska, M.; So, C.C.; Bhinder, G.; Vallance, B.A.; Finlay, B.B. Bacterial stimulation of the TLR-MyD88 pathway modulates the homeostatic expression of ileal Paneth cell alpha-defensins. *J. Innate Immun.* **2013**, *5*, 39–49. [[CrossRef](#)]
66. Cattaneo, A.; Cattane, N.; Galluzzi, S.; Provasi, S.; Lopizzo, N.; Festari, C.; Ferrari, C.; Guerra, U.P.; Paghera, B.; Muscio, C.; et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging* **2017**, *49*, 60–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lin, C.; Zhao, S.; Zhu, Y.; Fan, Z.; Wang, J.; Zhang, B.; Chen, Y. Microbiota-gut-brain axis and toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1309–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Liu, X.; Cao, S.; Zhang, X. Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7885–7895. [[CrossRef](#)]

69. Vaiserman, A.M.; Koliada, A.K.; Marotta, F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *35*, 36–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Miró, L.; Moretó, M.; Amat, C.; Polo, J.; Pérez-Bosque, A. Aging effects on gut microbiota in SAMP8 mice. *Proceedings* **2020**, *61*, 25. [[CrossRef](#)]
71. Askarova, S.; Umbayev, B.; Masoud, A.R.; Kaiyrlykyzy, A.; Safarova, Y.; Tsoy, A.; Olzhayev, F.; Kushugulova, A. The links between the gut microbiome, aging, modern lifestyle and Alzheimer's disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 104. [[CrossRef](#)]
72. Torrallardona, D.; Conde, M.R.; 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.* **2003**, *81*, 1220–1226. [[CrossRef](#)]
73. Caracciolo, B.; Xu, W.; Collins, S.; Fratiglioni, L. Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech. Ageing Dev.* **2014**, *136–137*, 59–69. [[CrossRef](#)]

***THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SPRAY-DRIED PORCINE
PLASMA SUPPLEMENTATION INVOLVE
THE MICROBIOTA–GUT–BRAIN AXIS***

Rosell-Cardona C, Amat C, Griñán-Ferré C, Polo J, Pallàs M, Pérez-Bosque A,
Moretó M, Miró L.

Publicat, doi:10.3390/nu14112211

Nutrients. 2022;14(11):2211

The neuroprotective effects of spray-dried porcine plasma supplementation involve the microbiota–gut–brain axis

Nutrients 2022.

Resum de l'Article 2

Introducció. La malaltia d'Alzheimer (AD) és el tipus de demència més comú durant l'envelliment i es caracteritza per pèrdua de memòria, neuroinflamació, una acumulació de pèptids A β i la hiperfosforilació de la proteïna tau. Durant l'envelliment hi ha disbacteriosi, que és acompanyada per un augment de la permeabilitat intestinal i un estat pro-inflamatori. La suplementació dietètica amb plasma porcí assecat per atomització (SDP, *spray-dried porcine plasma*) pot prevenir la neuroinflamació i l'estrès oxidatiu, així com reduir els marcadors neuropatològics de l'AD en ratolins SAMP8 envellits. A més, l'SDP té efectes prebiòtics en ratolins joves.

Objectius. Determinar si els efectes neuroprotectors de l'SDP implica canvis en la composició de la microbiota de ratolins envellits SAMP8.

Material i mètodes. Els experiments s'han realitzat amb ratolins SAMP8 de 2 mesos d'edat (grup de referència jove) i de 6 mesos d'edat, que s'han dividit en dos grups segons el pinso experimental que han rebut durant 4 mesos, pinso control o pinso suplementat amb SDP al 8%. S'han determinat els efectes de l'SDP al sistema nerviós central, a sèrum i a còlon. Per dur-ho a terme, s'han realitzat tests de comportaments i cognitius; s'han determinat marcadors de neuroinflamació per real-time PCR i Western Blot; s'han quantificat marcadors d'inflamació sistèmica per kits comercials; s'ha analitzat la composició de la microbiota per la plataforma *Illumina MiSeq*; i s'han determinat els marcadors d'inflamació de còlon i de l'estructura de la barrera epitelial per real-time PCR.

Resultats. L'envelliment va reduir la memòria a curt i llarg termini, a més de l'abundància de BDNF madur a còrtex de ratolí (tot, $p < 0,05$). La suplementació dietètica amb l'SDP va prevenir els efectes de l'edat tant sobre la memòria com sobre la neurotrofina (tot, $p < 0,05$). L'envelliment va incrementar l'expressió d'*Il-1b*, *Il-6*, i *Tlr2* i l'abundància de p65-NF κ B (tot, $p < 0,05$). A més, durant la senescència es va reduir l'expressió de la citocina anti-inflamatòria *Tgf-b* i la concentració d'IL-10 a còrtex (ambdós, $p < 0,05$). La suplementació amb l'SDP va atenuar tots aquests efectes neuroinflamatoris i va incrementar les citocines anti-inflamatòries (tot, $p < 0,05$). D'altra banda, l'envelliment va incrementar la concentració de LPS i de citocines pro-inflamatòries (IL-1 β i TNF- α) a sèrum (tot, $p < 0,05$). La suplementació amb SDP va prevenir l'increment de la concentració de citocines circulants pro-inflamatòries (ambdós, $p < 0,05$), tot i que no va modificar la concentració sèrica d'LPS. A còlon, l'envelliment va augmentar l'expressió de citocines pro-inflamatòries (*Il-1b*, *Il-6*, *Tnf- α*), de marcadors de cèl·lules immunitàries (*Cd25*, *F4/80*, *Itgae*), així com

dels receptors *Tlr2* i *Tlr4* (tot, $p < 0.05$). A més, en els animals envellits hi havia una reducció de l'expressió de *Muc2*, *Tff3* i de *Ocludina* (tot, $p < 0.05$). La suplementació amb SDP va atenuar aquests efectes (tot, $p < 0.05$). Per últim, l'envelliment va reduir l'abundància de bacteris probiòtics com *Lactobacillus*, *Pediococcus*, entre d'altres, i en va incrementar la d'altres relacionats amb la inflamació com l'*Erysipelhotrix* (tot, $p < 0.05$). La suplementació amb l'SDP va induir creixement la proliferació dels bacteris promotors de la salut, com per exemple *Lactobacillus*, *Pediococcus*, i *Odoribacter*, mentre que va disminuir l'abundància de bacteris relacionats amb la inflamació com *Johnsonella* i *Erysipelhotrix* (tot, $q < 0.1$).

Conclusions. Els efectes neuroprotectors de l'SDP podrien ser mediats per canvis a la composició de la microbiota.

Article

The Neuroprotective Effects of Spray-Dried Porcine Plasma Supplementation Involve the Microbiota—Gut—Brain Axis

Cristina Rosell-Cardona ¹, Concepció Amat ¹, Christian Griñán-Ferré ², Javier Polo ³, Mercè Pallàs ², Anna Pérez-Bosque ¹, Miquel Moretó ¹ and Lluïsa Miró ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute for Nutrition and Food Safety, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; cristina.rosell@ub.edu (C.R.-C.); camat@ub.edu (C.A.); anna.perez@ub.edu (A.P.-B.); mmoreto@ub.edu (M.M.)

² Department of Pharmacology, Toxicology, and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Neurosciences, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; christian.grinan@ub.edu (C.G.-F.); pallas@ub.edu (M.P.)

³ APC-Europe S.L.U., 08403 Granollers, Spain; javier.polo@apc-europe.com

* Correspondence: lluisa.miro@ub.edu; Tel.: +34-93-4024505

Abstract: Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) reduces the Alzheimer's disease (AD) hallmarks in SAMP8 mice. Since gut microbiota can play a critical role in the AD progression, we have studied if the neuroprotective effects of SDP involve the microbiota—gut—brain axis. Experiments were performed on two-month-old SAMP8 mice fed a standard diet and on six-month-old SAMP8 mice fed a control diet or an 8% SDP supplemented diet for four months. Senescence impaired short- and long-term memory, reduced cortical brain-derived neurotrophic factor (BDNF) abundance, increased interleukin (*Il*)-1 β , *Il*-6, and Toll-like receptor 2 (*Tlr*2) expression, and reduced transforming growth factor β (*Tgf*- β) expression and IL-10 concentration (all $p < 0.05$) and these effects were mitigated by SDP (all $p < 0.05$). Aging also increased pro-inflammatory cytokines in serum and colon (all $p < 0.05$). SDP attenuated both colonic and systemic inflammation in aged mice (all $p < 0.05$). SDP induced the proliferation of health-promoting bacteria, such as *Lactobacillus* and *Pediococcus*, while reducing the abundance of inflammation-associated bacteria, such as *Johnsonella* and *Erysipelothrix* (both $q < 0.1$). In conclusion, SDP has mucosal and systemic anti-inflammatory effects as well as neuroprotective properties in senescent mice; these effects are well correlated with SDP promotion of the abundance of probiotic species, which indicates that the gut—brain axis could be involved in the peripheral effects of SDP supplementation.

Keywords: microbiota; Alzheimer's disease; aging; dietary supplementation; spray-dried porcine plasma



Citation: Rosell-Cardona, C.; Amat, C.; Griñán-Ferré, C.; Polo, J.; Pallàs, M.; Pérez-Bosque, A.; Moretó, M.; Miró, L. The Neuroprotective Effects of Spray-Dried Porcine Plasma Supplementation Involve the Microbiota—Gut—Brain Axis. *Nutrients* **2022**, *14*, 2211. <https://doi.org/10.3390/nu14112211>

Academic Editor: Serguei O. Fetissov

Received: 7 March 2022

Accepted: 24 May 2022

Published: 26 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia in elderly people. It is characterized by memory loss, the extracellular deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptides and the aggregation of hyperphosphorylated tau (p-tau) protein, which is the main component of neurofibrillary tangles [1]. Neuroinflammation plays a critical role in AD because it can promote the accumulation of $A\beta$ and p-tau [2]. There is currently no cure for this disease and the etiology underlying its progression remains unclear [3]. Although aging is the major risk factor for AD [4], many factors can influence its development, such as family history, susceptibility genes, and diet [5].

The gut microbiota, which comprises bacteria, archaea, fungi, and viruses that reside in the gastrointestinal tract, plays a key role in health and disease. In a healthy state, the microbiota is involved in the maintenance of the intestinal barrier, inhibition of pathogen adhesion to the epithelial surface, production of short-chain fatty acids (SCFAs), and regulation and maturation of the mucosal immune system [6]. During aging, the microbiota composition is altered, resulting in an increase in the abundance of pathogenic bacteria

and a more pro-inflammatory microbiota profile. This type of microbial alteration, which is called dysbiosis, is associated with many intestinal diseases, such as inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome, but is also linked to extraintestinal inflammatory diseases such as asthma and obesity [7], as well as neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and AD [8]. Furthermore, an altered microbiota composition and increase in pathogenic bacteria are associated with a disruption of the intestinal barrier [9]. Consequently, microbiota and their by-products can cross the intestinal barrier and activate toll-like receptors (TLR) and the immune system. This induces the release of pro-inflammatory cytokines and leads to an inflammatory state, which can promote neuroinflammatory responses and neurodegeneration in the central nervous system through the gut–brain axis [10].

The gut–brain axis is a network of connections involving neural, immune, endocrine, and metabolic pathways that enables communication between the gut and the brain. The concept of the microbiota–gut–brain axis has emerged because there is growing evidence of the role played by the microbiota in many neurological diseases [11]. Specifically, age-associated changes in the gut microbiota may play an important role in AD progression [12]. This interplay between the microbiota and the brain and their effects on AD are based on studies on germ-free animals or animals treated with antibiotics. Both models exhibit a reduction in working memory, cognitive function, synaptic plasticity, and an immaturity of microglia. Interestingly, behavioral and molecular changes in the brain and alterations in the gut microbiota have been reported in several AD mice models at different ages [13]. Notably, the use of probiotics, prebiotics, and fecal microbiota transplant alleviate neuroinflammation and improve memory [8]. Diet and dietary supplements are essential factors that can modulate the gut microbiota by increasing or decreasing the levels of some bacterial species and thereby modify the abundance of certain metabolites of microbial origin. In addition, they can play a vital role in protecting against AD via the gut–brain axis [14].

Spray-dried porcine plasma (SDP) is a functional protein source that contains many functional components such as albumin, immunoglobulins, transferrin, fibrinogen, growth factors and many other peptides that not only promote intestinal function but also have systemic effects beyond the intestine, such as on the respiratory and reproductive systems [15–18]. Using aged senescence-accelerated prone (SAMP8) mice, we have previously shown that dietary supplementation with SDP prevents cognitive decline and reduces neuroinflammation and oxidative stress in the central nervous system [19] and decreases the neuropathological hallmarks of AD [20]. Moreover, SDP has been widely studied for its anti-inflammatory properties in gut-associated lymphoid tissue and in several experimental models of chronic and acute inflammation [21,22]. SDP also exerts prebiotic effects by enhancing the levels of beneficial species that induce anti-inflammatory pathways in weaned mice [23]. Therefore, the present study aimed to elucidate if the microbiota–gut–brain axis is involved in the neuroprotective effects of SDP in aged SAMP8 mice, which is a well-established model of AD [24].

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Experimental Design, and Diets

Male SAMP8 mice were obtained from Envigo (Bresso, Italy) and were kept at the animal facility of the Faculty of Pharmacy and Food Sciences of the Universitat de Barcelona under stable temperature and humidity conditions and a 12 h:12 h light/dark cycle. All animal experiments were performed following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona and the Catalan government (ref. 337/19 and 11,128, respectively). Animals were housed individually and fed experimental diets (control (CTL) or SDP) for 4 months. SDP is a functional protein source obtained from the blood of healthy pigs intended for human consumption [25]. The diets were balanced for energy, lysine, methionine, and total nitrogen and were formulated to meet

National Research Council requirements [26] for laboratory animals. The composition of the experimental diets is detailed in Rosell-Cardona et al. [20]. Mice were divided into three groups: 2M, 2-month-old mice fed standard commercial feed; 6M-CTL, 6-month-old mice fed Control diet for 4 months; and 6M-SDP, 6-month-old mice fed with SDP diet for 4 months.

2.2. Sample Collection

The day before animals were euthanized, their feces were collected under clean conditions and immediately frozen in liquid nitrogen. At the end of the experimental period, the mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine:xylazine (100:10 mg/kg). Blood was obtained directly from cardiac puncture and tissue samples were taken from the brain cortex and colonic mucosa. All samples were quickly frozen at -80°C until their use.

2.3. Open Field Test

The open field test (OFT) evaluates the locomotor activity and anxiety-like behavior of mice, based on their aversion to luminous and open spaces. It was performed as described by Puigoriol-Illamola et al. [27]. Briefly, mice were placed in the center of a white wooden box ($50 \times 50 \times 25$ cm) divided into central and peripheral zones (15 cm between the central zone and the wall). Mice explored the box for 5 min and each trial was recorded using a camera placed on the top of the box. The locomotor activity of the mice calculated as the sum of total distance travelled, the number of rearings, and the border stay duration were analyzed with SMART®v3.0 software (Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA). Between each trial, the box was carefully cleaned with 70% ethanol.

2.4. Novel Object Recognition Test

The novel object recognition test (NORT) allows the evaluation of short- and long-term memory. It was carried out as described by Garcia-Just et al. [19]. Briefly, mice were placed in a 90-degree two-arm (25-cm long, 20-cm high, 5-cm wide) black maze. Mice were habituated to the maze for 10 min on three consecutive days. On the fourth day, the animals underwent a 10 min acquisition trial, in which they were placed in the maze in the presence of two identical objects situated at the end of each arm. During this trial, side preference and explorative index were measured. The first retention trial was performed two hours later to evaluate short-term memory. During this trial, one of the objects was replaced by a new one and the behavior of the mice was recorded for 10 min. The second retention trial, which measures long-term memory, was conducted 24 h after the acquisition trial. Another new object replaced the other new object in the previous trial. The mice were recorded for 10 min. The time that mice spent exploring the new object (NO) and the time that mice spent exploring the old object (OO) were measured from video recordings of each trial. To evaluate the cognitive performance, the discrimination index (DI) was calculated, which is defined as $(\text{NO} - \text{OO}) / (\text{NO} + \text{OO})$. A lower DI indicates less memory capacity.

2.5. Western Blot

Western blot was performed as described by Miró et al. [21]. Briefly, brain cortex samples were homogenized using a Polytron homogenizer (PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA) at 20,000 rpm in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT) and 2% (*v/v*) protease inhibitor cocktail (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Equal amounts of protein (50 μg) were separated on 10%–15% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were then blocked and incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies against nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κB) p65 (ser536), total NF- κB (both obtained from rabbit and used at 1/1000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), brain-derived neurotrophic

factor (BDNF, from rabbit and used at 1/500, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) and actin (from mouse and used at 1/10,000, Sigma-Aldrich). Next, the membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich). Protein bands were visualized using the Clarity chemiluminescence detection kit and ChemiDoc XRS+ instrument (both from Bio-Rad) and quantified using the gel analyzer plug-in Gel Lanes Fit from ImageJ software [28].

2.6. Real-Time PCR

RNA was extracted from the brain cortex and colonic mucosa as described previously [20]. Total RNA was reverse-transcribed using the High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time PCR was performed on a MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad). The primers used are shown in Supplementary Table S1. TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for *Occludin* (Mm0128968_m1) according to the manufacturer's instructions. Product fidelity was confirmed by melting-curve analysis. Each PCR run included duplicates of reverse transcription for each sample and negative controls (reverse transcription-free samples, RNAfree sample). Target gene transcripts were quantified using *Hprt1* gene expression as reference and with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [29].

2.7. Quantification of Cytokines

Cytokine concentrations in serum and cortex samples were quantified using Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assay kit (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions.

2.8. Lipopolysaccharide Determination

Serum and cortical lipopolysaccharide (LPS) levels were determined using the Competition ELISA kit for LPS (Antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.9. Extraction and Purification of Total Genomic DNA

DNA was extracted as described previously by Moretó et al. [23]. Briefly, fecal samples were suspended in 4 M guanidine thiocyanate, 10% N-lauroyl sarcosine and 5% N-lauroyl sarcosine (all from Sigma-Aldrich). DNA was extracted by mechanical disruption of the microbial cell wall using Zirconia/silica beads (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). The disruption was performed by shaking the mixture using the FastPrep®–24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Then, polyvinylpyrrolidone was added (Sigma-Aldrich) and tubes were vortexed and centrifuged for 3 min at $12,000 \times g$. The pellet was washed with TENP (50 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA (pH 8), 1% polyvinylpyrrolidone, 100 mM NaCl). DNA was precipitated by isopropanol and incubated with RNase (Qiagen, Venlo, The Netherlands). To precipitate nucleic acids, 3 M sodium acetate (Sigma-Aldrich) and absolute ethanol (JT Baker, Deventer, The Netherlands) were added. DNA was quantified using a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

2.10. 16S rDNA Gene Analysis

Extracted genomic DNA was processed and the variable V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified. The primers to detect 16S rRNA were: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' (forward) and reverse 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (reverse). High-throughput sequencing was performed using the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at the Genomics and Bioinformatics Service, Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Spain).

2.11. Statistical Analysis

Results are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). All results were analyzed using GraphPad Prism® software v8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). First, Grubb's test was performed to detect outliers, in addition to Levene's test to check the homogeneity of variance and the Shapiro–Wilk test to verify data normality for all groups. To compare groups, one-way ANOVA followed by the Fisher posthoc test was used for normally distributed data. In contrast, the Kruskal–Wallis test was used for non-normally distributed data. To analyze the evolution of body weight and feed consumption of the aged animals, the area under the curve was calculated for each animal and these values were compared using the t-student test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Microbial data were analyzed with ANOVA test, followed by the Benjamini and Hochberg method that corrected p values (or q values) for the false discovery rate (FDR) for normally distributed data. In contrast, the Kruskal–Wallis test was used for non-normally distributed data. Differences were considered statistically significant when $q < 0.1$ [30].

3. Results

3.1. Body Weight and Food Intake

Aged animals fed the SDP feed showed a higher rate of body weight gain than control (CTL) mice ($p < 0.001$; Figure 1A). At the end of the experimental period, body weight gain was greater in SDP mice than in CTL mice ($p = 0.008$; Figure 1B). Both groups of animals had similar food intake (Figure 1C).

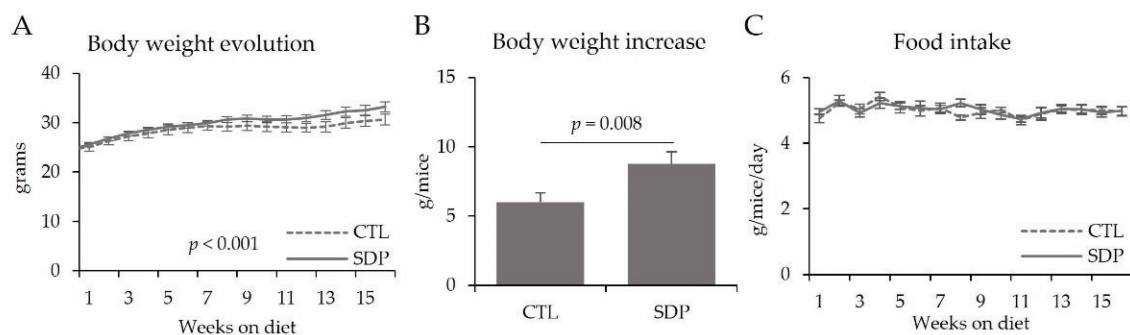


Figure 1. Body weight evolution (A), body weight increase (B) and food intake evolution (C) of SAMP8 mice during the experimental period. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 11$ – 12 mice/group). Statistics: t-Student test.

3.2. Behavioral and Cognitive Tests

AD is associated with behavioral and cognitive abnormalities, so we evaluated whether SDP could mitigate these alterations in aged SAMP8 mice. Representative tracking maps of the OFT of all groups are shown in Figure 1A. Aging reduced the locomotor activity of the mice (6M-CTL vs. 2M; $p < 0.001$; Figure 2B) and SDP attenuated this reduction (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.027$). Furthermore, we showed reduced exploratory activity (6M-CTL and 6M-SDP, $p < 0.001$ and $p = 0.008$; Figure 2C), and increased anxiety-like behavior (6M-CTL and 6M-SDP, $p = 0.019$ and $p < 0.001$; Figure 2D) in both groups of aged mice, without differences due to SDP supplementation.

To assess the working memory of mice, they were evaluated using the NORT. During the familiarization phase, all groups had a similar explorative index and object preference (Figure 3A,B, respectively). Regarding short-term memory, aged mice had lower values of DI than younger mice (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.008$; Figure 3C). SDP supplementation prevented this reduction (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.039$), showing similar DI values to those of young mice. Regarding long-term memory, aged mice had a lower DI than the young group (6M-CTL vs. 2M; $p < 0.001$; Figure 3D). SDP supplementation prevented this

reduction, as these mice showed higher DI values than aged mice (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.040$).

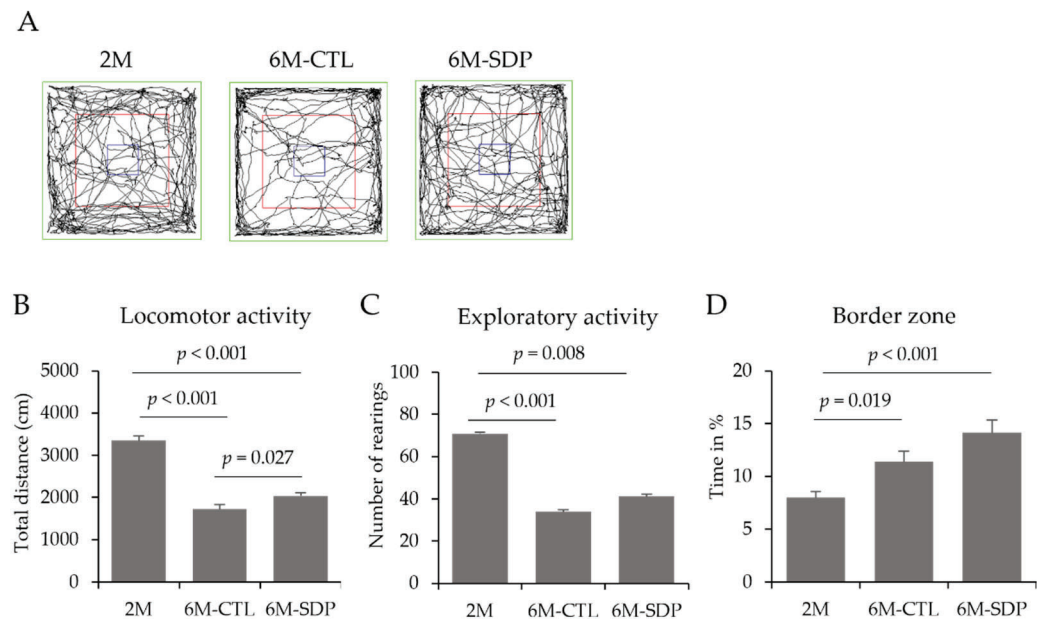


Figure 2. Open field test (OFT). Representative tracking maps of 2M, 6M-CTL, and 6M-SDP groups (A), locomotor activity (B), exploratory activity (C) and percentage of time in the border zone (D). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 11$ – 12 mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test), and Kruskal–Wallis test.

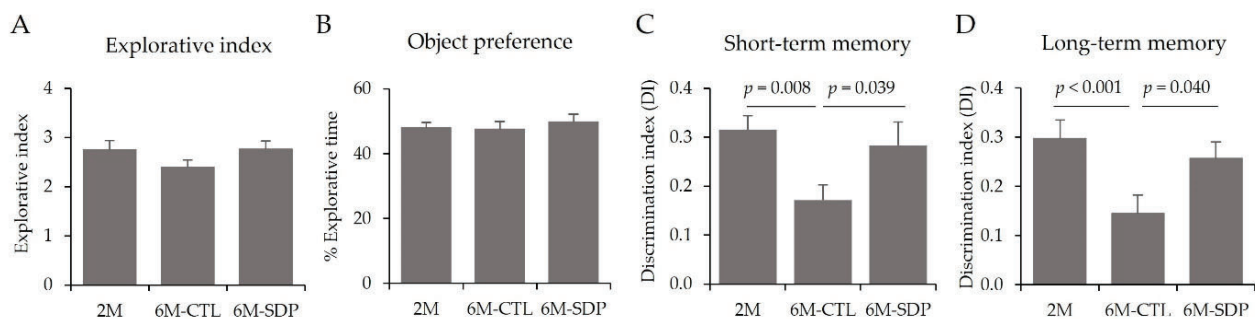


Figure 3. Novel object recognition test (NORT). Explorative index (A), object preference (B), short-term memory (C), long-term memory (D). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 11$ – 12 mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test).

3.3. Effects on the CNS

Molecularly, it has been well-established that SAMP8 presents changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pathway. Neither aging nor SDP supplementation changed the relative abundance of the precursor form of BDNF (pro-BDNF; Figure 4A) in the cortex. However, senescence reduced the abundance of mature form of BDNF (m-BDNF; 6M-CTL vs. 2M; $p = 0.049$; Figure 4B), which was prevented by SDP supplementation (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.030$).

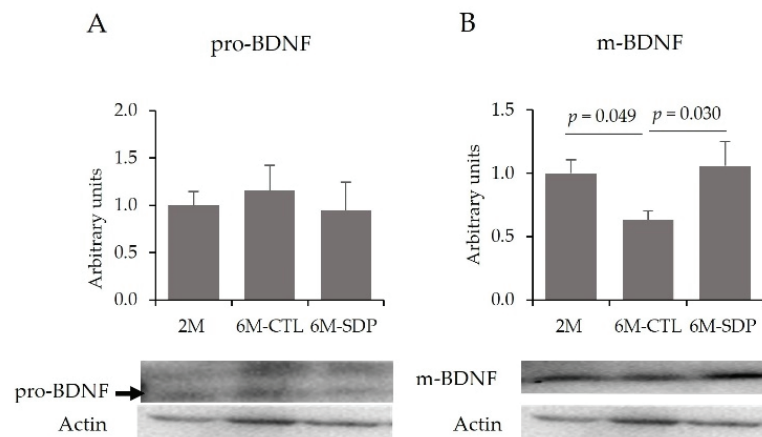


Figure 4. Abundance of BDNF precursor (pro-BDNF) (A) and mature BDNF (m-BDNF) (B). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5–6$ mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test), and chi-square test.

Gene expression of the pro-inflammatory cytokines $Il-1\beta$ and $Il-6$ was increased in the cortex of aged mice (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.002$ and $p < 0.001$, respectively; Figure 5A,B), as was the abundance of p65-NF- κ B (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.023$; Figure 5C). Supplementation with SDP reduced the gene expression of the pro-inflammatory cytokines (both $p = 0.014$) and attenuated the effect of aging on the abundance of p65-NF- κ B (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.043$). In addition, aged mice showed decreased gene expression of the anti-inflammatory cytokine Tgf- β compared with young mice (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.037$; Figure 5D). SDP supplementation prevented this decrease (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.041$) and also increased the concentration of IL-10 in the cortex of senescent mice (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.022$; Figure 5E).

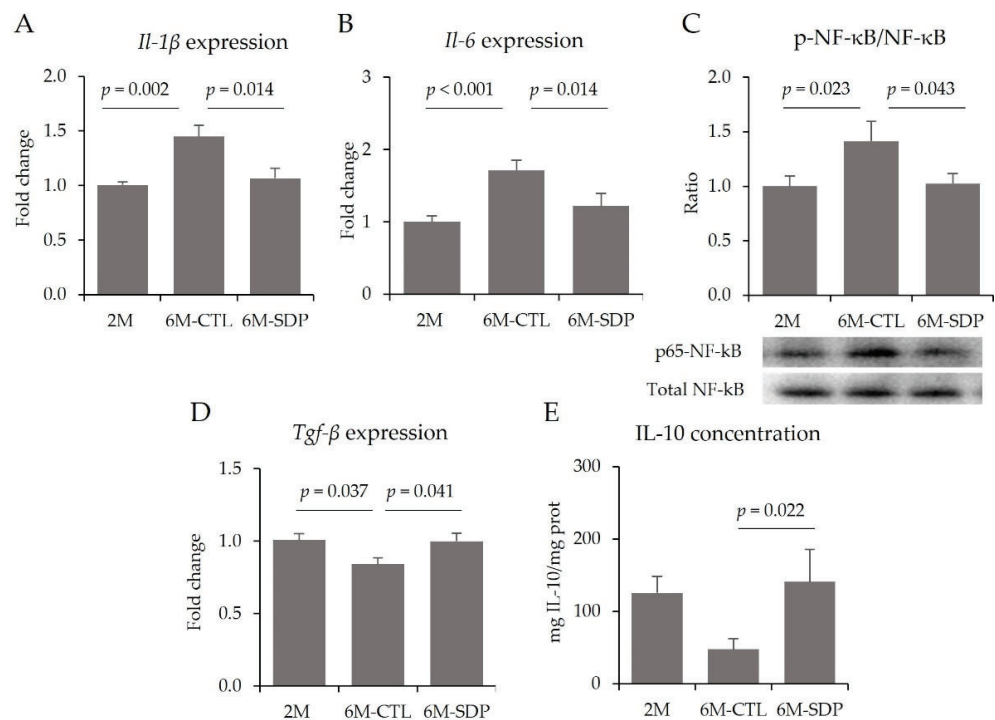


Figure 5. Neuroinflammation in cortical tissue. Gene expression of $Il-1\beta$ (A) and $Il-6$ (B), protein abundance of p65-NF- κ B respect to total NF- κ B (C), gene expression of Tgf- β (D), and concentration of IL-10 (E). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 8–9$ mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test). IL, interleukin; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; Tgf- β , transforming growth factor-beta.

Moreover, the gene expression of toll-like receptor 2 (*Tlr2*) was higher in senescent mice (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.012$; Figure 6A), and SDP supplementation prevented this age-associated increase (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.030$). On the other hand, no effects of aging or diet were observed for *Tlr4*, *Cd14*, and *Myd88* gene expression (Figure 6B–D, respectively). The gene expression of TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (*Trif*) was increased in the cortex by senescence (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.018$; Figure 6E). Conversely, the concentration of LPS in the cortex was not modified by aging or diet (Figure 6F).

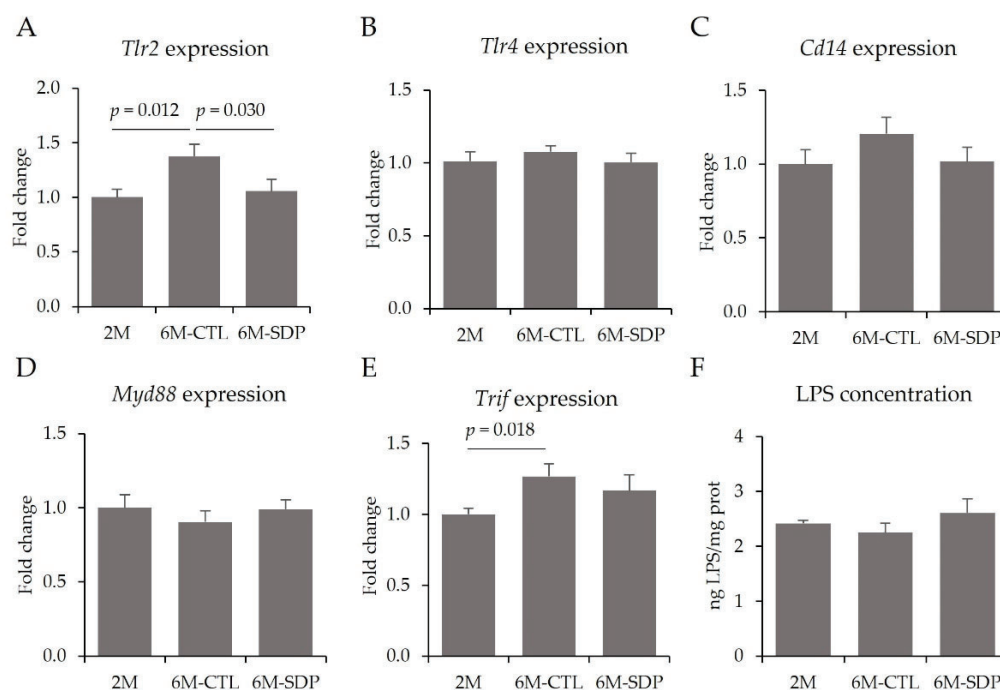


Figure 6. TLR signaling pathway in cortical tissue. Gene expression of *Tlr2* (A), *Tlr4* (B), *Cd14* (C), *Myd88* (D), *Trif* (E), and concentration of LPS (F). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6-9$ mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test). Cd14, cluster of differentiation 14; LPS, lipopolysaccharide; Myd88, myeloid differentiation factor 88; Tlr, toll-like receptor; Trif, toll-like receptor adaptor molecule 1.

3.4. Systemic Effects

Aging has been previously described to increase systemic inflammation in SAMP8 mice [29]. Of note, senescence increased systemic inflammation by augmenting the concentration of LPS (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.032$; Figure 7A), and of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in the serum of aged mice (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.021$ and $p < 0.001$; Figure 7B,C, respectively), and SDP supplementation reduced the concentration of both cytokines in senescent mice (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.004$ and $p = 0.011$, respectively). Furthermore, SDP supplementation tended to increase the serum concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.066$; Figure 7D).

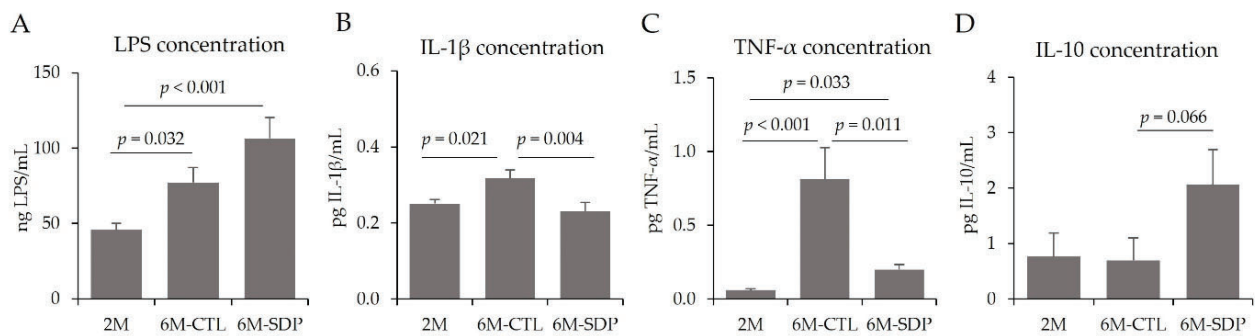


Figure 7. Systemic inflammation. Concentrations of LPS (A), IL-1β (B), TNF-α (C), and IL-10 (D). Results are expressed as mean ± SEM ($n = 8-9$ mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test). IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha.

3.5. Gut Microbiota

The Shannon’s index, used as a reflection of the diversity of species in a community, was similar in the different groups (Figure 8A). The number of species in feces (species richness) was not modified by age or SDP supplementation (Figure 8B). The gut microbiota of these mice predominantly comprised *Bacteroidetes* (42.4%–44.3%; Figure 8D–F) and *Firmicutes* (30.7%–38.0%), which constituted the dominant phyla, and their ratio (F/B) was not modified by age or SDP supplementation (Figure 7C). They were followed by *Proteobacteria* (14.2%–15.5%), *Verrucomicrobia* (0.5%–6.7%), *Actinobacteria* (0.4%–0.8%), *Tenericutes* (0.6%–1.0%), *Deferribacteres* (0.2%–0.5%), and others. No significant differences could be attributed to age or SDP supplementation.

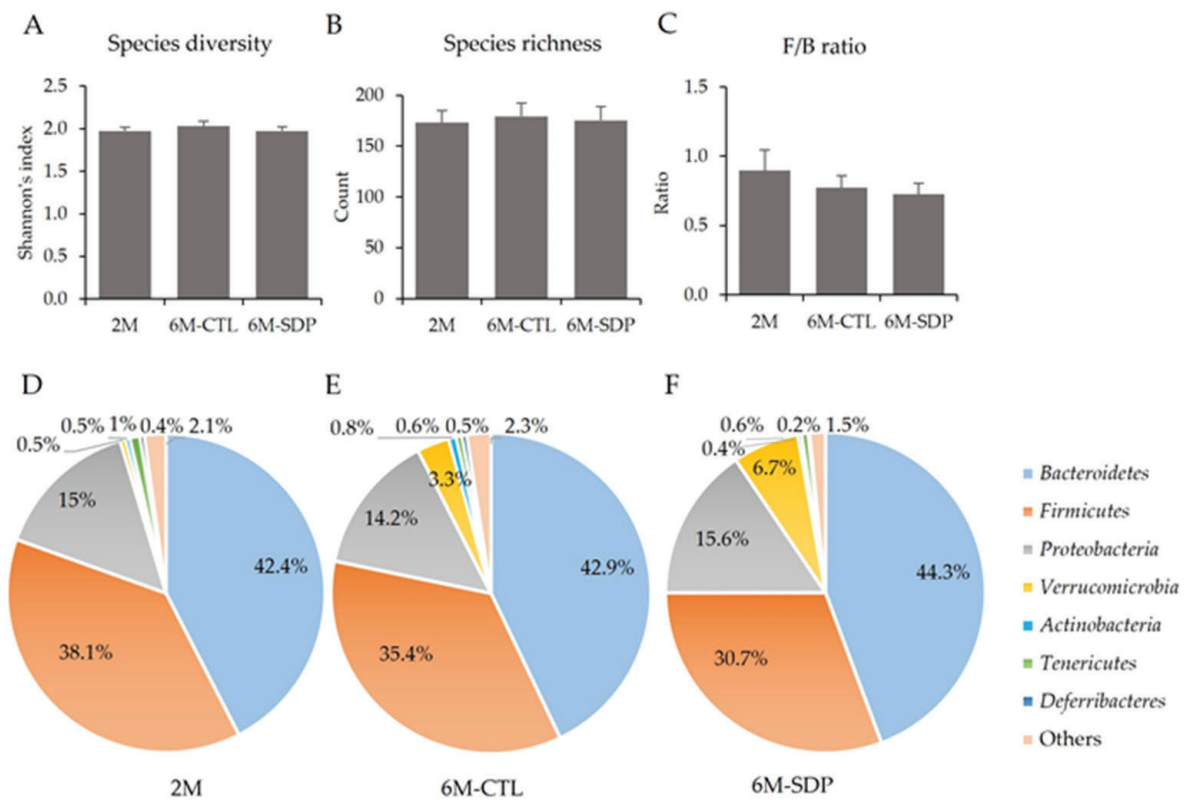


Figure 8. Microbial Shannon’s index (A), species richness (B), ratio between *Firmicutes*/*Bacteroidetes* (F/B) (C), and bacterial composition at the phylum level in the 2M group (D), 6M-CTL group (E), and 6M-SDP group (F). Results are expressed as mean ± SEM and as percentages ($n = 10-11$ mice/group). Statistics: ANOVA (Benjamini and Hochberg multiple comparison test).

The effects of age and SDP supplementation at the family level are shown in Table 1. Senescence reduced the abundance of the families *Lactobacillaceae* and *Clostridiaceae*, from the Firmicutes phylum; *Sphingobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, and *Prevotellaceae*, from Bacteroidetes phylum; and *Helicobacteraceae*, from the Proteobacteria phylum (6M-CTL vs. 2M; all $q < 0.05$); whereas increased *Erysipelotrichaceae*, from the Firmicutes phylum (6M-CTL vs. 2M; $q < 0.05$); and *Bacteroidaceae* and *Porphyromonadaceae*, from the Bacteroidetes phylum (6M-CTL vs. 2M; both, $q < 0.1$). On the other hand, SDP supplementation prevented the effect of aging on the *Lactobacillaceae* family and increased the relative abundance of the *Eubacteriaceae* family (6M-SDP vs. 6M-CTL; both $q < 0.05$).

At the genus level and within the Firmicutes phylum, senescence reduced the relative abundance of the anti-inflammatory genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* (6M-CTL vs. 2M; $q = 0.009$ and $q < 0.001$, respectively; Figure 9A,B) and SDP supplementation prevented these reductions (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.040$ and $q = 0.006$, respectively). Furthermore, SDP supplementation increased the abundance of the acetyl-CoA producer *Acetobacterium* (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.063$; Figure 9C). The abundance of the pathogenic bacteria *Erysipelothrix* was increased in aged mice compared with young mice (6M-CTL vs. 2M; $q = 0.038$; Figure 9D). SDP supplementation reduced it (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.084$) and also reduced the relative abundance of the pathogenic bacteria *Johnsonella* (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.039$, Figure 9E). Besides, aging reduced *Clostridium* abundance (6M-CTL vs. 2M; $q = 0.007$, Figure 9F), but SDP had no effects on its abundance.

Table 1. Bacterial composition at family level.

Phylum	Family	2M	6M-CTL	6M-SDP	q		
					2M 6M-CTL	2M 6M-SDP	6M-CTL 6M-SDP
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	10.1 ± 2.2	1.3 ± 0.3	6.6 ± 2.0	0.003	NS	0.019
	<i>Eubacteriaceae</i>	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.1	2.0 ± 0.6	NS	NS	0.033
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.1 ± 0.01	3.9 ± 1.9	0.5 ± 0.2	0.029	NS	NS
	<i>Lachnospiraceae</i>	20.1 ± 2.2	23.2 ± 2.2	17.6 ± 1.7	NS	NS	NS
	<i>Clostridiaceae</i>	6.7 ± 0.6	4.0 ± 0.4	4.7 ± 0.7	0.008	0.030	NS
	<i>Ruminococcaceae</i>	4.6 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.8 ± 0.6	NS	NS	NS
Bacteroidetes	<i>Bacteroidaceae</i>	10.2 ± 1.9	21.2 ± 1.9	21.8 ± 2.0	<0.001	<0.001	NS
	<i>Porphyromonadaceae</i>	8.0 ± 1.3	11.3 ± 1.0	12.1 ± 1.2	0.082	0.060	NS
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	5.5 ± 0.6	3.8 ± 0.3	4.3 ± 0.3	0.036	NS	NS
	<i>Flexibacteraceae</i>	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	NS	NS	NS
	<i>Flavobacteriaceae</i>	4.2 ± 0.6	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.4	0.005	0.005	NS
	<i>Odoribacteriaceae</i>	3.2 ± 0.7	1.9 ± 0.3	2.4 ± 0.5	NS	NS	NS
	<i>Prevotellaceae</i>	9.2 ± 2.2	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.018	0.017	NS
Proteobacteria	<i>Desulfovibrionaceae</i>	1.9 ± 0.4	2.6 ± 0.4	3.1 ± 0.4	NS	NS	NS
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	NS	NS	NS
	<i>Helicobacteriaceae</i>	3.6 ± 0.7	1.4 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.004	<0.001	NS
Verrucomicrobia	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.03 ± 0.01	3.2 ± 1.6	8.1 ± 1.9	NS	0.016	NS
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.05 ± 0.01	0.5 ± 0.3	0.05 ± 0.01	NS	NS	0.069

Results are expressed as percent of the total population at family level (mean ± SEM; $n = 10$ – 11 mice). Statistics: ANOVA (False discovery rate, Benjamini and Hochberg multiple comparison test). NS: non-significant.

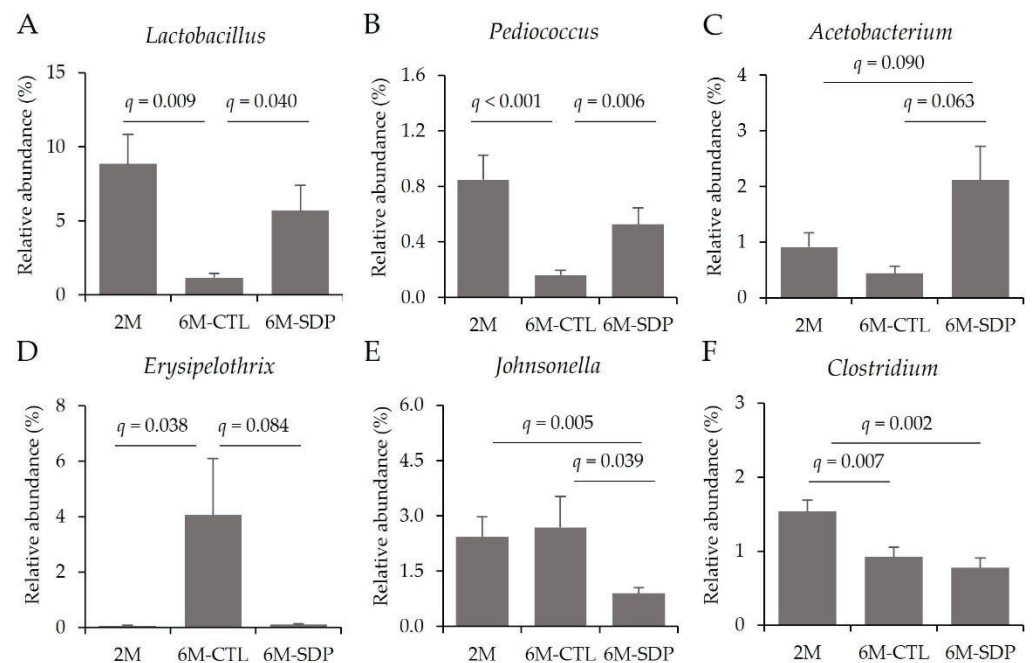


Figure 9. Fecal microbial composition at the genus level of the Firmicutes phylum. Relative abundance of *Lactobacillus* (A), *Pediococcus* (B), *Acetobacterium* (C), *Erysipelothrix* (D), *Johnsonella* (E), and *Clostridium* (F). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 10$ – 11 mice/group). Statistics: ANOVA (False discovery rate, Benjamini and Hochberg multiple comparison test).

At the genus level and considering the Bacteroidetes phylum, senescence increased *Bacteroides* abundance (6M-CTL vs. 2M; $q < 0.001$; Figure 10A), although no effect of SDP supplementation was observed. Aging reduced the relative abundance of *Prevotella* and SDP supplementation has no effect (6M-CTL vs. 2M; $q = 0.013$; Figure 10B). Senescence reduced levels of *Odoribacter* (6M-CTL vs. 2M; $q < 0.001$; Figure 10C) and SDP supplementation attenuated this effect (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.071$). The *Parabacteroides* genus was increased in aged mice (6M-CTL vs. 2M; $q = 0.022$, Figure 10D) and there was no effect of SDP supplementation.

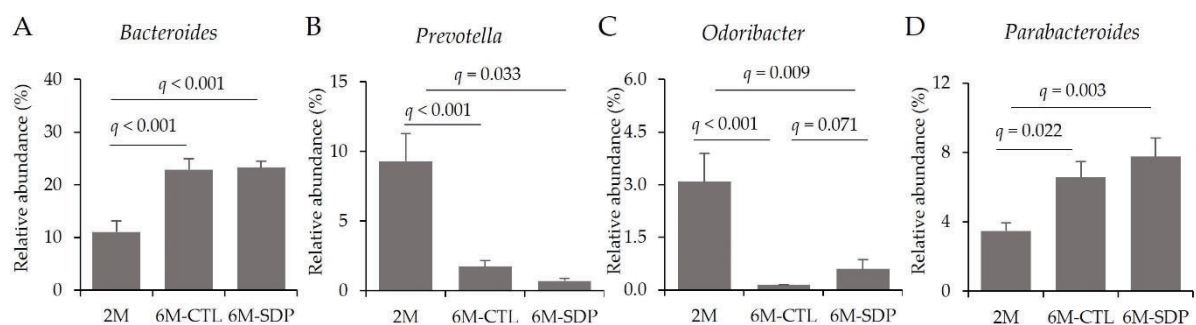


Figure 10. Fecal microbial composition at the genus level of the Bacteroidetes phylum. Relative abundance of *Bacteroides* (A), *Prevotella* (B), *Odoribacter* (C), and *Parabacteroides* (D). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 10$ – 11 mice/group). Statistics: ANOVA (False discovery rate, Benjamini and Hochberg multiple comparison test).

At the species level, aging reduced the abundance of several species of the *Lactobacillus* genus such as *L. taiwanensis*, *L. siliginis*, *L. antri* and *L. intermedius* as well as *Pediococcus argentanicus* (6M-CTL vs. 2M; all $q < 0.05$; Table 2), and SDP supplementation prevented this effect on *L. siliginis* levels (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q = 0.047$). Aged mice showed an increase in some species of *Bacteroides* spp., along with *Erysipelothrix muris* and *Parabacteroides gordonii* (6M-CTL vs. 2M; all $q < 0.05$), and a reduction in *Helicobacter mastomyrinus*

and *Prevotella dentasini* (6M-CTL vs. 2M; both $q < 0.05$). SDP supplementation reduced the abundance of *Erysipelohotrix muris*, *Helicobacter mastomyrinus*, *Bacteroides denticanum*, and *Bifidobacterium choerinum* (6M-SDP vs. 6M-CTL; all $q < 0.05$) as well as *Parabacteroides gordonii* (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q < 0.1$) and increased *Parabacteroides goldsteinii* (6M-SDP vs. 6M-CTL; $q < 0.05$).

Table 2. Effects of age and SDP on bacterial composition at species level.

Family	Species	2M	6M-CTL	6M-SDP	q		
					2M 6M-CTL	2M 6M-SDP	6M-CTL 6M-SDP
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	5.1 ± 1.7	0.9 ± 0.2	2.0 ± 0.6	NS	NS	NS
	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	1.9 ± 0.7	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.003	0.070	NS
	<i>Lactobacillus siliginis</i>	1.8 ± 0.5	0.3 ± 0.06	0.8 ± 0.2	0.035	0.075	0.047
	<i>Lactobacillus antri</i>	1.1 ± 0.3	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.2	0.018	0.016	NS
	<i>Lactobacillus intermedius</i>	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.1	NS	NS	NS
	<i>Pediococcus argentinus</i>	0.5 ± 0.1	0.08 ± 0.04	0.2 ± 0.05	0.009	NS	NS
Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelhotrix muris</i>	0.1 ± 0.02	8.9 ± 3.8	0.2 ± 0.1	0.020	NS	0.046
Prevotellaceae	<i>Prevotella dentasini</i>	16.0 ± 3.7	1.6 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.005	0.005	0.044
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	2.9 ± 0.4	6.6 ± 1.2	8.7 ± 1.3	0.031	0.002	NS
	<i>Bacteroides rodentium</i>	2.7 ± 0.6	3.2 ± 0.9	5.6 ± 1.3	NS	NS	NS
	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	0.5 ± 0.1	4.1 ± 0.7	4.6 ± 0.9	0.001	0.001	NS
	<i>Bacteroides sartorii</i>	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.011	0.002	NS
	<i>Bacteroides denticanum</i>	0.9 ± 0.1	6.5 ± 1.1	3.1 ± 0.6	0.001	0.009	0.015
Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	4.9 ± 0.6	6.0 ± 0.7	10.6 ± 1.3	NS	0.005	0.013
	<i>Parabacteroides gordonii</i>	0.0 ± 0.0	3.6 ± 0.8	1.7 ± 0.7	<0.001	0.014	0.070

Results are expressed as percent of the total population at species level (mean ± SEM; $n = 10$ – 11 mice). Statistics: ANOVA (False discovery rate, Benjamini and Hochberg multiple comparison test). NS: non-significant.

3.6. Effects on Colon Tissue

Gene expression analysis revealed that senescence increased the colonic expression of Tlr2 and Tlr4 (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.005$ and $p = 0.029$; Figure 11A,B, respectively) and SDP supplementation prevented both increases (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.025$, and $p = 0.018$, respectively). In addition, aging augmented the gene expression of *Cd14* in the colonic mucosa (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.015$; Figure 11C), whereas SDP supplementation attenuated this increase (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.019$). Likewise, *Myd88* gene expression was also increased in the colonic mucosa of aged mice compared with the young group (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.007$; Figure 11D). No effect was observed of aging or SDP supplementation on *Trif* gene expression (Figure 11E).

Gene expression of *Ffar2* (which encodes GPR43) and *Ffar3* (which encodes GPR41) was reduced in the colon tissue of aged mice (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.023$ and $p = 0.001$; Figure 11F,G, respectively), whereas SDP supplementation increased the expression of both genes (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.033$ and $p = 0.032$, respectively).

In aged mice, the gene expression of pro-inflammatory cytokines (*Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α*) was augmented in the colonic mucosa (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.001$, $p = 0.005$ and $p = 0.002$; Figure 12A–C, respectively), and SDP supplementation prevented the effects of aging on *Il-6*, and *Tnf- α* (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.045$ and $p = 0.015$, respectively). Aging increased the gene expression of *Cd25* and *F4/80* (6M-CTL vs. 2M; both $p = 0.005$; Figure 12D,E, respectively), whereas SDP supplementation prevented these increases (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.031$ and $p = 0.008$, respectively). *Itgae* was increased in control and SDP-treated senescent mice ($p = 0.038$ and $p = 0.023$, respectively; Figure 12F).

Senescence also impaired the intestinal barrier by reducing the gene expression of *Tff3*, *Muc2*, and *Occludin* (6M-CTL vs. 2M; $p = 0.011$, $p = 0.016$, and $p = 0.039$; Figure 13A–C, respectively). SDP supplementation prevented all of these aging-associated changes (6M-SDP vs. 6M-CTL; $p = 0.014$, $p = 0.022$, and $p = 0.045$, respectively).

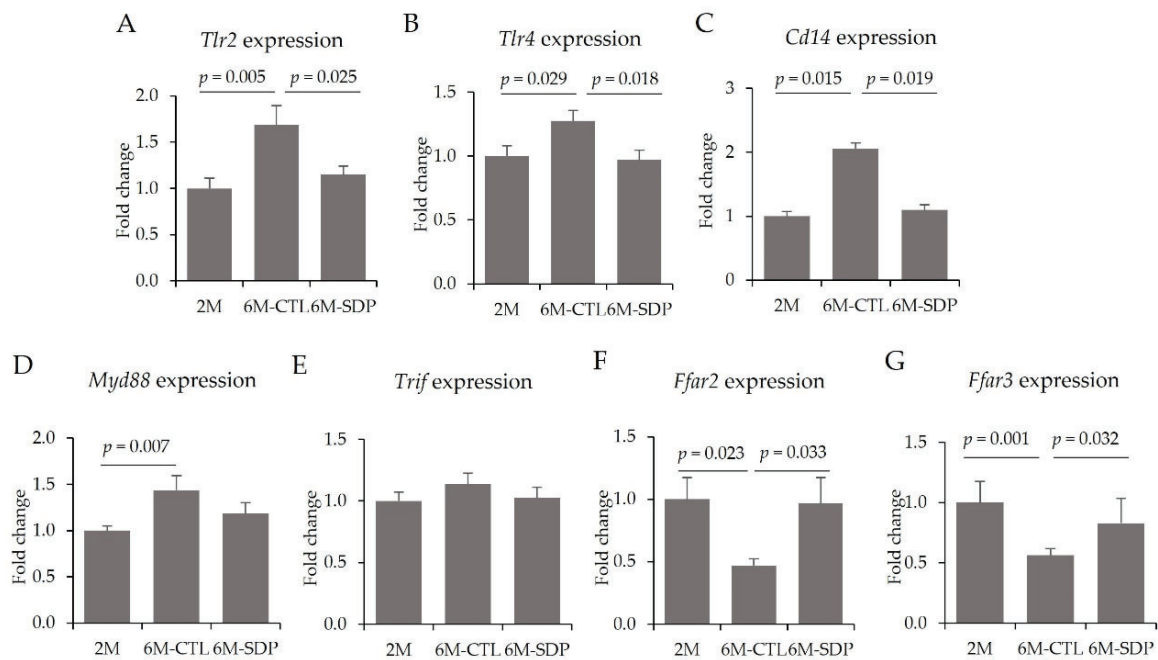


Figure 11. Gene expression of the TLR signaling pathway and SCFA receptors in colon mucosa. *Tlr2* (A), *Tlr4* (B), *Cd14* (C), *Myd88* (D), *Trif* (E), *Ffar2* (F), and *Ffar3* (G). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 9$ – 11 mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test). *Cd14*, cluster of differentiation 14; *Ffar2*, free fatty acid receptor 2 (GPR43); *Ffar3*, free fatty acid receptor 3 (GPR41); *Myd88*, myeloid differentiation factor 88; *Tlr*, toll-like receptor; *Trif*, toll-like receptor adaptor molecule 1.

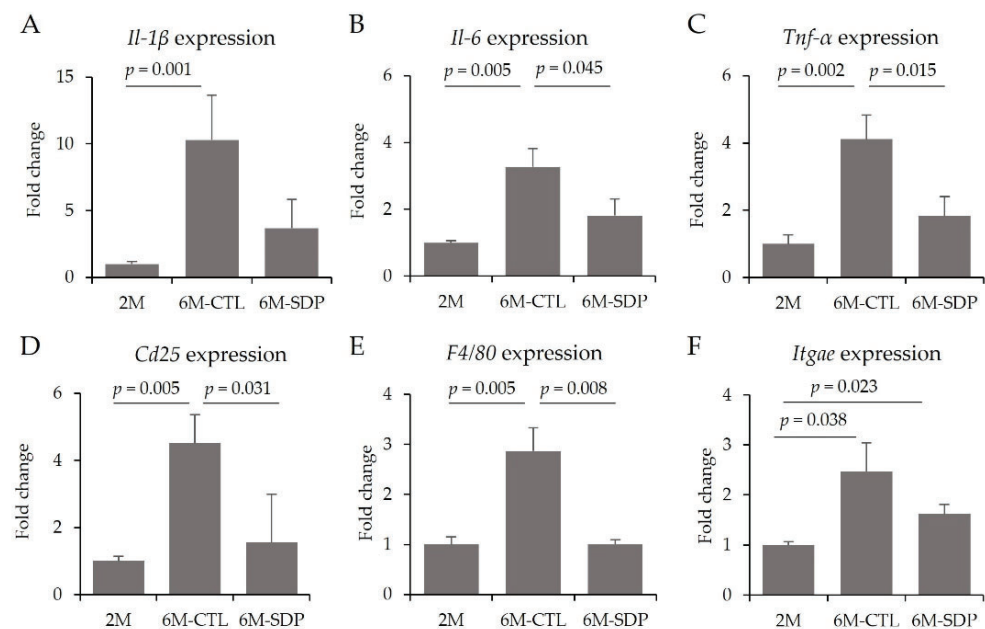


Figure 12. Inflammation in colon tissue. Gene expression of *Il-1 β* (A), *Il-6* (B), *Tnf- α* (C), *Cd25* (D), *F4/80* (E), and *Itgae* (F). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 9$ – 11 mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test) and Kruskal–Wallis test. *Cd25*, cluster of differentiation 25; *Itgae*, integrin alpha e; *Il*, interleukin; *Tnf- α* , tumor necrosis factor alpha.

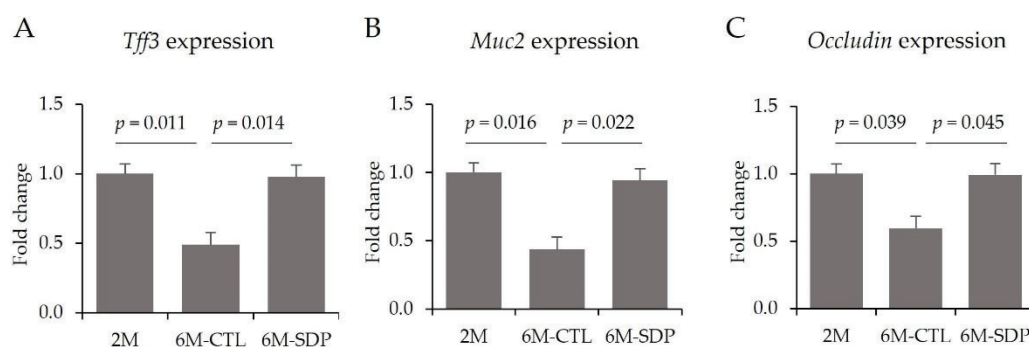


Figure 13. Intestinal barrier. Gene expression of *Tff3* (A), *Muc2* (B), and *Occludin* (C). Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 9–11$ mice/group). Statistics: ANOVA (Fisher multiple comparison test). *Muc2*, mucin 2; *Tff3*, trefoil factor 3.

4. Discussion

There is consistent evidence supporting the ability of diet and dietary supplements to influence the progression of Alzheimer’s disease (AD) through the microbiota–gut–brain axis [14]. Mechanisms of communication between the gut microbiota and brain primarily involve the regulation of the immune system and the activation of neural and endocrine pathways by the gut microbiota or its by-products [31]. Dietary supplementation with SDP improves brain resilience against the neuropathological hallmarks of AD [15] and prevents the cognitive decline in SAMP8 mice [19]. Previous studies have shown that SDP supplementation has anti-inflammatory properties because it can modulate the mucosal immune response. Indeed, it can mitigate the harmful effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge in rodents [22] or *E. coli* infection in pigs [32]. Furthermore, SDP supplementation has prebiotic effects, raising the abundance of health-promoting bacteria in weaned mice [23], and weaned pigs [33]. Accordingly, in this study, we hypothesized that SDP promotes changes in the microbiota profile that could be involved in the neuroprotective effects of SDP.

As aforementioned, memory loss is one of the earliest reported symptoms in AD [1]. In our study, we observed age-associated short- and long-term memory deterioration, which is widely seen in SAMP8 mice [34]. We also found that SDP supplementation was protective against age-related cognitive decline [19]. The beneficial effect of SDP on cognition is related to a lower loss of synaptophysin in the brain [19], consistent with the fact that cognitive impairment can be due to synaptic dysfunction rather than neuronal loss [35]. Cognitive decline is also associated with reduced locomotor activity [36]. This age-related motor dysfunction is typically observed in SAMP8 mice [37], as we corroborated in aged SAMP8. For the first time, we have shown that SDP attenuated motor dysfunction in aged SAMP8 mice, similar to the increase in locomotor activity found in LPS-challenged C57BL/6 mice [38].

BDNF plays an essential role in synaptic plasticity, brain neuroprotection, and memory [39]. Of note, BDNF levels decreased in AD patients because $A\beta$ peptides inhibit its maturation [40], leading to neurodegeneration and synaptic loss [41]. In our study, aged mice showed a lower abundance of mature form of BDNF, which correlates well with memory loss. SDP supplementation increased m-BDNF levels that could be responsible for the beneficial effect observed on memory retention. In addition, SDP supplementation reduced sAPP β accumulation and $A\beta_{40}$ concentration in the brain. In fact, SDP supplementation also reduced the expression of Bace-1, an essential enzyme in the amyloidogenic pathway [20], correlating the reduced activation of the amyloidogenic pathway with an increased abundance of the mature form of this neurotrophin. These results also agree with studies showing that dietary supplements and prebiotics can increase BDNF abundance in the brain and improve memory retention in adult rats [42].

Neuroinflammation and oxidative stress can worsen neurodegeneration and is considered a pathological hallmark of AD [2]. We have shown that SDP supplementation

prevented neuroinflammation by diminishing the gene expression of the pro-inflammatory cytokines $Tnf-\alpha$ and IL-6 and increasing the levels of the anti-inflammatory cytokines Tgf- β and IL-10 in the cortex of aged mice. Moreover, in previous work, SDP supplementation also decreased the concentration of hydrogen peroxide in the cortex, reducing oxidative stress [19]. In addition, in this study, SDP supplementation also reduced gene expression of *Tlr2* as well as NF- κ B activation. The expression of *Tlr2* is upregulated in brains of AD patients and in a mouse model of neurodegeneration [43]. Activation of TLR is not only essential for generating neuroinflammation, but this pathway also plays an essential role in promoting the amyloidogenic processing of A β [44]. Specifically, TLR2 and TLR4 are binding sites for A β , and the signaling of both receptors can activate microglia and induce the release of proinflammatory mediators [45]. The pathway activated through TLRs can be either Myd88-dependent or -independent pathways, both of which induce inflammatory cascades via activation of the transcription factor NF- κ B [46]. Here, we observed that TLRs were activated in a Myd88-independent pathway because the *Trif* adaptor was increased in aged mice, while *Myd88* was not modified. Activation of NF- κ B is associated with inflammatory responses and neurodegenerative diseases, such as in AD patients, where it induces the amyloidogenic pathway and tau phosphorylation [47]. The reduction in this signaling pathway observed in SDP-supplemented mice could be associated with the ability of SDP to decrease the amyloidogenic pathway and tau phosphorylation, as well as microglial activation [20].

Increasing evidence confirms the relationship between the microbiota and AD. The microbiota can modulate microglia maturation, regulate blood–brain barrier permeability and synaptic plasticity, or induce the formation of A β and neurofibrillary tangles [48]. Moreover, during aging, there is an alteration of the microbiota composition that contributes to the increase in the low-intensity inflammatory state present during senescence known as inflammaging. Dysbiosis also promotes LPS release and reduces the amount of beneficial bacterial metabolites such as SCFA [49]. In this study, the senescent mice exhibited a reduced abundance of beneficial species and an increase in pro-inflammatory bacteria. For instance, aging increased the abundance of the *Erysipelotrichaceae* family, and of the *Johnsonella* and *Erysipelothrix* genera, which are involved in inflammatory processes [50]. These pathogenic bacteria are more abundant in an AD mouse model [51] and may contribute to the cognitive decline in AD [52].

The SDP supplement mainly comprises peptides and proteins, which differentiates it from other conventional prebiotics [23]. Some of its compounds can resist digestion in the small intestine and reach the colonic lumen [53], where they can modify the colonic microbiota. SDP supplementation enhanced the abundance of probiotic genera with well-known anti-inflammatory properties at mucosal interfaces and reduced the abundance of pathogenic bacteria, such as the *Johnsonella* and *Erysipelothrix* genera. More specifically, at the species level, SDP prevented the effects of aging on the abundance of *Erysipelothrix muris* and *Prevotella dentasini*. Furthermore, an SDP diet also enhanced the abundance of *Eubacteriaceae* family, which has health-promoting effects for the host, and is negatively correlated with dementia [54].

SDP supplementation promotes the abundance of the *Lactobacillaceae* family, as well as different health-promoting genera within it, such as *Lactobacillus* and *Pediococcus*. These effects of SDP on *Lactobacillus* have been also observed in other mice strains [23] and in pigs [33]. Furthermore, oral administration of *Lactobacillus* bacteria prevents cognitive decline in both humans and rats [55] and improves memory retention in aged SAMP8 mice [56], in addition to increasing BDNF levels in the rodent brain [57]. These observations are consistent with our findings regarding augmented BDNF abundance and prevention of cognitive decline. Furthermore, *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by increasing plasma IL-10 levels [57], which is also increased in SDP-supplemented senescent mice.

SDP supplementation also augmented the abundance of other bacterial genera of the Firmicutes phylum, such as *Acetobacterium*, which is an acetyl-CoA producer [58]. Increased acetyl-CoA levels improve cognitive function during aging [59] and acetyl-CoA is the main

precursor of butyrate [60]. SCFAs, especially butyric acid, can inhibit the expression of the cytokines *Il-6*, *Il-1 β* , and *Tnf- α* , thereby exerting anti-inflammatory effects [61]. SCFAs can mediate cellular functions by activating cell surface G protein-coupled receptors (GPCR), such as *Ffar2* and *Ffar3*, which are expressed on epithelial and immune cells [31]. Here, SDP supplementation increased the gene expression of *Ffar2* and *Ffar3*, which would suggest that some of the anti-inflammatory and neuroprotective effects of SDP may be mediated through SCFA. These byproducts produced by the microbiota may circulate to the brain, modulating the degree of immune system activation and regulating microglia maturation [31], and could therefore be a link between the gut microbiota and the reduction in neuroinflammation.

Aging-related dysbiosis promotes the production of LPS and the increase of the intestinal barrier permeability, which allows the translocation of bacteria and their by-products into the bloodstream [62]. Recent studies have revealed that increased intestinal permeability induces systemic inflammation, impairing the blood–brain barrier function, triggering neuroinflammation and cognitive dysfunction [8,63]. In the present study, it was observed that aged mice showed a lower expression of genes related to the production and maintenance of the mucus layer (*Tff3* and *Muc2*) and to the epithelial barrier tightness (*Occludin*) and, as consequence of the impaired intestinal barrier, the serum LPS concentration was elevated in aged mice. Indeed, AD patients show higher plasma LPS concentration, which may promote the development of the amyloid pathology [64]. In contrast, dietary supplementation with SDP prevented the age-associated changes in the gene expression of *Occludin*, *Muc2* and *Tff3*. These effects of SDP may be related to the effects observed on the microbiota, since *Lactobacillus* bacteria enhance the intestinal barrier, and reduce colon permeability [65], promoting mucus secretion, providing antimicrobial protection and preventing the translocation of pathogenic bacteria [66]. Indeed, this ability of SDP to improve intestinal barrier tightness has been observed in different experimental models of intestinal inflammation, both acute [67] and chronic [21] inflammation.

These effects of aging on intestinal barrier function are accompanied by colonic mucosal inflammation, and a recruitment of activated T cells (*Cd25*) and macrophages (*F4/80*). Bacteria can activate immune cells through TLR receptors. This is consistent with increased expression of *Tlr2* and *Tlr4* in the colonic mucosa. Activation of the immune response results in systemic inflammation which is also common along aging [68]. In this work, the systemic concentration of pro-inflammatory cytokines (e.g., *IL-1 β* and *TNF- α*), increased with aging. Patients with AD show elevated concentrations of circulating *IL-1 β* and *TNF- α* [69], which are considered as peripheral biomarkers for AD [70]. Indeed, chronic systemic inflammation induces AD-like neuropathology in mice [63]. Various factors of the inflammatory cascade can circulate to the brain, cross the altered blood–brain barrier [10], and activate microglia, thereby altering cognitive function [48]. Dietary supplementation with SDP showed immunomodulatory effects by reducing the intensity of the immune response in the colon. The SDP diet decreased the gene expression of the innate receptors *Tlr2* and *Tlr4* and the recruitment of activated T cells and macrophages, as well as the expression of the pro-inflammatory cytokine *Tnf- α* and *Il-6*. This effect of SDP is relevant because immune activation and the release of pro-inflammatory cytokines can disassemble tight-junction proteins increasing epithelial permeability [71] and promoting and perpetuating intestinal inflammation [72]. SDP supplementation not only attenuated the immune response in the colon, but also systemically, by reducing the concentration of pro-inflammatory cytokines (*TNF- α* and *IL-1 β*) in the serum as well as by increasing the concentration of the anti-inflammatory cytokine *IL-10*. The SDP induced reduction in systemic inflammation is consistent with previous results in aged mice [73].

5. Conclusions

In conclusion, dietary supplementation with SDP increases the abundance of probiotic species in the gut and reduces the local and systemic inflammatory responses. This attenuation of the immune response results in reduced neuroinflammation, improving cognitive performance in senescent animals (Figure 14). Taken together, this study shows that SDP supplementation has prebiotic effects and suggests that the microbiota–gut–brain axis could play a role in the neuroprotective effects of SDP.

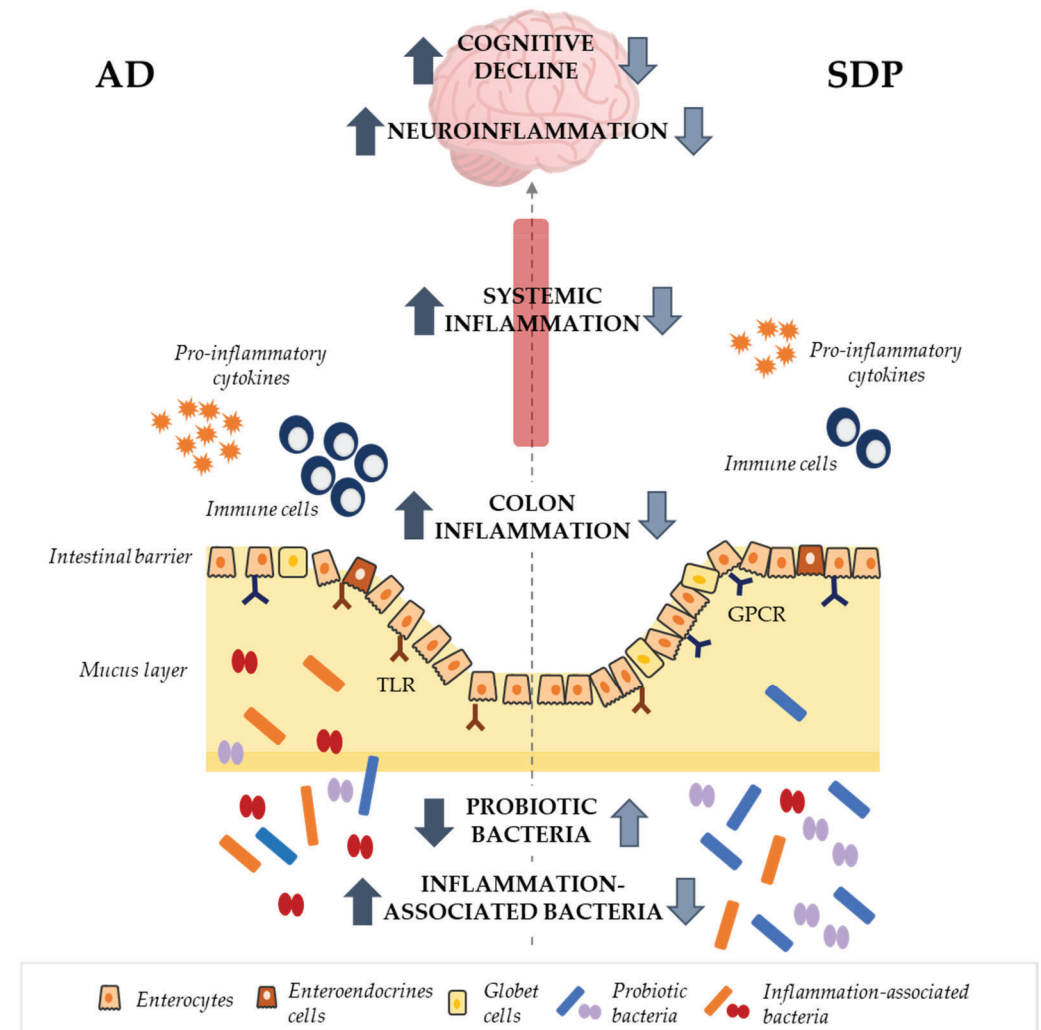


Figure 14. Schematic integrative representation of the effects of SDP supplementation on the gut–brain axis in an AD mouse model. Dietary supplementation with SDP promotes the growth of probiotic genera and reduces the levels of pathogenic genera. This is accompanied by a reduction in the intestinal permeability and local and systemic immune and inflammatory responses. These effects culminate in a reduction in neuroinflammation and an amelioration of the cognitive decline. AD, Alzheimer’s disease; GPCR, G protein-coupled receptors; SDP, spray-dried porcine plasma; TLR, toll-like receptor.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14112211/s1>, Table S1: Primers used for Real-Time PCR.

Author Contributions: Conceptualization, C.A., J.P., A.P.-B., M.M., L.M.; methodology, formal analysis, and investigation, C.R.-C., C.G.-F., A.P.-B., L.M.; resources, J.P., M.P.; writing-original draft preparation, C.R.-C., A.P.-B., L.M.; writing-review and editing, C.A., J.P., M.P., M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by APC-Europe SLU (Granollers, Spain) by research contracts with the Bosch i Gimpera Foundation of the University of Barcelona by a grant from the European Regional Development Fund (ERDF) and the Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) project IDI-20180885. The research groups were also supported by grant 2017SGR945 for Consolidated Research Groups, Generalitat de Catalunya, Spain. C.R.-C. received a research grant from the Bosch i Gimpera Foundation (Universitat de Barcelona).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona and the Catalan government (ref. r337/19 aproved on 24 September 2020; and 11128 24 May 2021, respectively).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: C.R.-C., C.A., C.G.-F., M.P., A.P.-B., M.M. and L.M. have no conflict of interests. J.P. is employed by APC-Europe S.L.U. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Lane, C.A.; Hardy, J.; Schott, J.M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Calsolaro, V.; Edison, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement.* **2016**, *12*, 719–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Soria-Lopez, J.A.; González, H.M.; Léger, G.C. Alzheimer's disease. In *Handbook of Clinical Neurology*, 3rd ed.; DeKosky, S.T., Asthana, S., Eds.; Elsevier: Boston, MA, USA, 2019; Volume 167, pp. 231–255. [[CrossRef](#)]
4. Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S.G.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 565–581. [[CrossRef](#)]
5. Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 5789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Biedermann, L.; Rogler, G. The intestinal microbiota: Its role in health and disease. *Eur. J. Pediatr.* **2015**, *174*, 151–167. [[CrossRef](#)]
7. Maynard, C.L.; Elson, C.O.; Hatton, R.D.; Weaver, C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **2012**, *489*, 231–241. [[CrossRef](#)]
8. Cryan, J.F.; O'Riordan, K.J.; Cowan, C.S.M.; Sandhu, K.V.; Bastiaanssen, T.F.S.; Boehme, M.; Codagnone, M.G.; Cusotto, S.; Fulling, C.; Golubeva, A.V.; et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1877–2013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zhao, J.; Bi, W.; Xiao, S.; Lan, X.; Cheng, X.; Zhang, J.; Lu, D.; Wei, W.; Wang, Y.; Li, H.; et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5790. [[CrossRef](#)]
10. Lin, C.; Zhao, S.; Zhu, Y.; Fan, Z.; Wang, J.; Zhang, B.; Chen, Y. Microbiota-gut-brain axis and toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1309–1317. [[CrossRef](#)]
11. Collins, S.M.; Surette, M.; Bercik, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 735–742. [[CrossRef](#)]
12. Vogt, N.M.; Kerby, R.L.; Dill-McFarland, K.A.; Harding, S.J.; Merluzzi, A.P.; Johnson, S.C.; Carlsson, C.M.; Asthana, S.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13537. [[CrossRef](#)]
13. Zhan, G.; Yang, N.; Li, S.; Huang, N.; Fang, X.; Zhang, J.; Zhu, B.; Yang, L.; Yang, C.; Luo, A. Abnormal gut microbiota composition contributes to cognitive dysfunction in SAMP8 mice. *Ageing* **2018**, *10*, 1257–1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kincaid, H.J.; Nagpal, R.; Yadav, H. Diet-Microbiota-Brain Axis in Alzheimer's Disease. *Ann. Nutr. Metab.* **2021**, *77* (Suppl. S2), 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rosell-Cardona, C.; Griñan-Ferré, C.; Pérez-Bosque, A.; Polo, J.; Pallàs, M.; Amat, C.; Moretó, M.; Miró, L. Reply to Nifli, A.-P. Comment on "Rosell-Cardona et al. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer's Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* **2021**, *13*, 4065. [[CrossRef](#)]
16. Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; González-Esquerro, R.; Polo, J. Impact of Spray-Dried Plasma on Intestinal Health and Broiler Performance. *Microorganisms* **2019**, *7*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maijó, 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.* **2012**, *142*, 264–270. [[CrossRef](#)]
18. Song, M.; Liu, Y.; Lee, J.J.; Che, T.M.; Soares-Almeida, J.A.; Chun, J.L.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Crenshaw, J.D.; Seo, S.W.; et al. Spray-dried plasma attenuates inflammation and improves pregnancy rate of mated female mice. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 298–305. [[CrossRef](#)]

19. Garcia-Just, A.; Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Amat, C.; Polo, J.; Pallàs, M.; Griñán-Ferré, C.; Moretó, M. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Prevents Cognitive Decline in Senescent Mice and Reduces Neuroinflammation and Oxidative Stress. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 303–311. [[CrossRef](#)]
20. Rosell-Cardona, C.; Griñán-Ferré, C.; Pérez-Bosque, A.; Polo, J.; Pallàs, M.; Amat, C.; Moretó, M.; Miró, L. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer's Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* **2021**, *13*, 2369. [[CrossRef](#)]
21. Miró, L.; Amat, C.; Rosell-Cardona, C.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Pérez-Bosque, A.; Moretó, M. Dietary Supplementation with Spray-Dried Porcine Plasma Attenuates Colon Inflammation in A Genetic Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6760. [[CrossRef](#)]
22. 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* **2016**, *8*, 657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Moretó, M.; Miró, L.; Amat, C.; Polo, J.; Manichanh, C.; Pérez-Bosque, A.; Moretó, M.; Miró, L.; Amat, C.; Polo, J.; et al. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma has prebiotic effects on gut microbiota in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Götz, J.; Bodea, L.-G.; Goedert, M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 583–598. [[CrossRef](#)]
25. Blázquez, E.; Rodríguez, C.; Ródenas, J.; Segalés, J.; Pujols, J.; Polo, J. Biosafety steps in the manufacturing process of spray-dried plasma: A review with emphasis on the use of ultraviolet irradiation as a redundant biosafety procedure. *Porc. Health Manag.* **2020**, *6*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. NRC. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th ed.; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1995.
27. Puigoriol-Illamola, D.; Griñán-Ferré, C.; Vasilopoulou, F.; Leiva, R.; Vázquez, S.; Pallàs, M. 11 β -HSD1 Inhibition by RL-118 Promotes Autophagy and Correlates with Reduced Oxidative Stress and Inflammation, Enhancing Cognitive Performance in SAMP8 Mouse Model. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 8904–8915. [[CrossRef](#)]
28. Schneider, C.; Rasband, W.; Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
30. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
31. Dalile, B.; Van Oudenhove, L.; Vervliet, B.; Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 461–478. [[CrossRef](#)]
32. Bosi, P.; Casini, L.; Finamore, A.; Cremokolini, C.; Merialdi, G.; 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.* **2004**, *82*, 1764–1772. [[CrossRef](#)]
33. Che, L.; Hu, L.; Zhou, Q.; Peng, X.; Liu, Y.; Luo, Y.; Fang, Z.; Lin, Y.; Xu, S.; Feng, B.; et al. Microbial insight into dietary protein source affects intestinal function of pigs with intrauterine growth retardation. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 327–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Griñán-Ferré, C.; Marsal-García, L.; Bellver-Sanchis, A.; Kondengaden, S.M.; Turga, R.C.; Vázquez, S.; Pallàs, M. Pharmacological inhibition of G9a/GLP restores cognition and reduces oxidative stress, neuroinflammation and β -Amyloid plaques in an early-onset Alzheimer's disease mouse model. *Aging* **2019**, *11*, 11591–11608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yang, Y.; Lu, J.; Zuo, Y. Changes of Synaptic Structures Associated with Learning, Memory and Diseases. *Brain Sci. Adv.* **2018**, *4*, 99–117. [[CrossRef](#)]
36. Singhal, G.; Morgan, J.; Jawahar, M.C.; Corrigan, F.; Jaehne, E.J.; Toben, C.; Breen, J.; Pederson, S.M.; Manavis, J.; Hannan, A.J.; et al. Effects of aging on the motor, cognitive and affective behaviors, neuroimmune responses and hippocampal gene expression. *Behav. Brain Res.* **2020**, *383*, 112501. [[CrossRef](#)]
37. Tsumagari, R.; Maruo, K.; Nakao, T.; Ueda, S.; Yamanoue, M.; Shirai, Y. Motor Dyscoordination and Alteration of Functional Correlation Between DGK γ and PKC γ in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8). *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 573966. [[CrossRef](#)]
38. Liu, Y.; Choe, J.; Lee, J.J.; Kim, J.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Crenshaw, J.D.; Pettigrew, J.E.; Song, M. Spray-dried plasma attenuates inflammation and lethargic behaviors of pregnant mice caused by lipopolysaccharide. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203427. [[CrossRef](#)]
39. Arancio, O.; Chao, M.V. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 325–330. [[CrossRef](#)]
40. Tanila, H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *97 Pt B*, 114–118. [[CrossRef](#)]
41. Amidfar, M.; de Oliveira, J.; Kucharska, E.; Budni, J.; Kim, Y.-K. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* **2020**, *257*, 118020. [[CrossRef](#)]
42. Savignac, H.M.; Corona, G.; Mills, H.; Chen, L.; Spencer, J.P.; Tzortzis, G.; Burnet, P.W. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. *Neurochem. Int.* **2013**, *63*, 756–764. [[CrossRef](#)]
43. Letiembre, M.; Liu, Y.; Walter, S.; Hao, W.; Pfander, T.; Wrede, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Fassbender, K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. *Neurobiol. Aging* **2009**, *30*, 759–768. [[CrossRef](#)]
44. Leng, F.; Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* **2021**, *17*, 157–172. [[CrossRef](#)]

45. Dansokho, C.; Heneka, M.T. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2018**, *125*, 771–779. [[CrossRef](#)]
46. Kumar, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **2019**, *332*, 16–30. [[CrossRef](#)]
47. Srinivasan, M.; Lahiri, D.K. Significance of NF- κ B as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 471–487. [[CrossRef](#)]
48. Mancuso, C.; Santangelo, R. Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: The long way between preclinical studies and clinical evidence. *Pharmacol. Res.* **2018**, *129*, 329–336. [[CrossRef](#)]
49. Walrath, T.; Dyamenahalli, K.U.; Hulsebus, H.J.; McCullough, R.L.; Idrovo, J.; Boe, D.M.; McMahan, R.H.; Kovacs, E.J. Age-related changes in intestinal immunity and the microbiome. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *109*, 1045–1061. [[CrossRef](#)]
50. Schaubeck, M.; Clavel, T.; Calasan, J.; Lagkouvardos, I.; Haange, S.B.; Jehmlich, N.; Basic, M.; Dupont, A.; Hornef, M.; von Bergen, M.; et al. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* **2016**, *65*, 225–237. [[CrossRef](#)]
51. Bäuerl, C.; Collado, M.C.; Diaz Cuevas, A.; Viña, J.; Pérez Martínez, G. Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Letts. Appl. Microbiol.* **2018**, *66*, 464–471. [[CrossRef](#)]
52. Shen, L.; Liu, L.; Ji, H.-F. Alzheimer's Disease Histological and Behavioral Manifestations in Transgenic Mice Correlate with Specific Gut Microbiome State. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *56*, 385–390. [[CrossRef](#)]
53. Rodriguez, C.; Blanch, E.; Romano, V.; Saborido, N.; Rodenas, J.; Polo, J. Porcine immunoglobulins survival in the intestinal tract of adult dogs and cats fed dry food kibbles containing spray-dried porcine plasma (SDPP) or porcine immunoglobulin concentrate (PIC). *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *139*, 201–211. [[CrossRef](#)]
54. Zhou, Y.; Wang, Y.; Quan, M.; Zhao, H.; Jia, J. Gut Microbiota Changes and Their Correlation with Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2021**, *81*, 583–595. [[CrossRef](#)]
55. Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Violle, N.; Javelot, H.; Desor, D.; Nejd, A.; Bisson, J.F.; Rougeot, C.; Pichelin, M.; Cazaubiel, M.; et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 755–764. [[CrossRef](#)]
56. Yang, X.; Yu, D.; Xue, L.; Li, H.; Du, J. Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 475–487. [[CrossRef](#)]
57. Liang, S.; Wang, T.; Hu, X.; Luo, J.; Li, W.; Wu, X.; Duan, Y.; Jin, F. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* **2015**, *310*, 561–577. [[CrossRef](#)]
58. Ross, D.E.; Marshall, C.W.; Gulliver, D.; May, H.D.; Norman, R.S. Defining Genomic and Predicted Metabolic Features of the *Acetobacterium* Genus. *mSystems* **2020**, *5*, e00277-20. [[CrossRef](#)]
59. Currais, A.; Huang, L.; Goldberg, J.; Petrascheck, M.; Ates, G.; Pinto-Duarte, A.; Shokhirev, M.N.; Schubert, D.; Maher, P. Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. *eLife* **2019**, *8*, e47866. [[CrossRef](#)]
60. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)]
61. Nakajima, A.; Nakatani, A.; Hasegawa, S.; Irie, J.; Ozawa, K.; Tsujimoto, G.; Suganami, T.; Itoh, H.; Kimura, I. The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179696. [[CrossRef](#)]
62. Kowalski, K.; Mulak, A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2019**, *25*, 48–60. [[CrossRef](#)]
63. Krstic, D.; Madhusudan, A.; Doehner, J.; Vogel, P.; Nötter, T.; Imhof, C.; Manalastas, A.; Hilfiker, M.; Pfister, S.; Schwerdel, C.; et al. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J. Neuroinflamm.* **2012**, *9*, 151. [[CrossRef](#)]
64. Marizzoni, M.; Cattaneo, A.; Mirabelli, P.; Festari, C.; Lopizzo, N.; Nicolosi, V.; Mombelli, E.; Mazzelli, M.; Luongo, D.; Naviglio, D.; et al. Short-Chain Fatty Acids and Lipopolysaccharide as Mediators Between Gut Dysbiosis and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *78*, 683–697. [[CrossRef](#)]
65. Khailova, L.; Baird, C.H.; Rush, A.A.; Barnes, C.; Wischmeyer, P.E. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin. Nutr.* **2017**, *36*, 1549–1557. [[CrossRef](#)]
66. Cazorla, S.I.; Maldonado-Galdeano, C.; Weill, R.; De Paula, J.; Perdígón, G.D.V.; Cazorla, S.I.; Maldonado-Galdeano, C.; Weill, R.; De Paula, J.; Perdígón, G.D.V. Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 736. [[CrossRef](#)]
67. Pérez-Bosque, A.; Amat, C.; Polo, J.; Campbell, J.M.; Crenshaw, J.; Russell, L.; Moretó, M. Spray-Dried Animal Plasma Prevents the Effects of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B on Intestinal Barrier Function in Weaned Rats. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2838–2843. [[CrossRef](#)]
68. Franceschi, C.; Garagnani, P.; Parini, P.; Giuliani, C.; Santoro, A. Inflammaging: A new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*, 576–590. [[CrossRef](#)]
69. Swardfager, W.; Lanctôt, K.; Rothenburg, L.; Wong, A.; Cappell, J.; Herrmann, N. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **2010**, *68*, 930–941. [[CrossRef](#)]
70. Park, J.-C.; Han, S.-H.; Mook-Jung, I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: A brief review. *BMB Rep.* **2020**, *53*, 10–19. [[CrossRef](#)]

71. Wang, F.; Graham, W.V.; Wang, Y.; Witkowski, E.D.; Schwarz, B.T.; Turner, J.R. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 409–419. [[CrossRef](#)]
72. Laukoetter, M.G.; Nava, P.; Nusrat, A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 401–407. [[CrossRef](#)]
73. Miró, L.; Garcia-Just, A.; Amat, C.; Polo, J.; Moretó, M.; Pérez-Bosque, A. Dietary Animal Plasma Proteins Improve the Intestinal Immune Response in Senescent Mice. *Nutrients* **2017**, *9*, 1346. [[CrossRef](#)]



DISCUSSIÓ



Actualment, hi ha un increment de l'esperança de vida, que s'associa a un augment de la prevalença de la demència. El tipus més comú de demència és l'AD, i el seu factor de risc principal és l'envelliment (Soria Lopez et al., 2019). Durant l'envelliment, hi ha una inflamació crònica de baix grau que s'anomena *inflammaging*, que activa de forma crònica i desregula el sistema immunitari (Franceschi et al., 2018) i, consegüentment, accelera la progressió de l'AD (Hou et al., 2019). L'augment de la prevalença de la demència té un gran impacte econòmic per la societat, i és una de les principals causes d'invalidesa i dependència de la gent gran (Lane et al., 2018). Actualment, no hi ha cap tractament eficaç que pugui curar l'AD, ni disminuir l'alteració de la funció cognitiva associada a la malaltia. Per aquest motiu, hi ha un interès creixent en estudiar com prevenir o com frenar la seva progressió (Soria Lopez et al., 2019), on la nutrició hi pot exercir un paper rellevant.

La nutrició és un dels factors modificables més importants de la salut. La dieta pot modular el sistema immunitari (Calder et al., 2017), així com modificar la composició de la microbiota (Kincaid et al., 2021). Diferents estudis evidencien que el manteniment d'una alimentació sana i equilibrada poden prevenir diferents malalties com les cardiovasculars, la hipertensió, la dislipèmia, la T2DM o l'obesitat (Dominguez et al., 2021), els quals al mateix temps són factors de risc que influencien en l'AD (Vinicius et al., 2019). A més, tant la dieta com complements alimentaris poden enrederir el progrés de l'AD, reduir la neuroinflamació i millorar el deteriorament cognitiu (Minihane et al., 2015). Per tant, molts estudis s'han centrat a investigar el paper de la dieta i de complements alimentaris que ajuden a disminuir el risc de patir la malaltia, com per exemple, complements anti-inflamatoris i anti-oxidants, com són l'omega-3 i el resveratrol (Canhada et al., 2018; Griñán-Ferré et al., 2021).

L'SDP és un producte plasmàtic obtingut de sang de porcs sans destinats al consum humà. La bioseguretat de l'SDP s'avalua en diferents punts al llarg del seu processat, en el qual, les proteïnes plasmàtiques s'exposen a temperatures elevades durant un període molt curt. Això permet que les proteïnes no es desnaturalitzin i, per tant, preservin la seva activitat biològica (Gatnau et al., 1989; Borg et al., 2002). L'SDP consta de molts components funcionals com l'albumina, immunoglobulines, transferrina, fibrinogen, factors de creixement i molts altres pèptids que tenen activitats biològiques intestinals i sistèmiques (Rosell-Cardona et al., 2021; Campbell et al., 2019).

La suplementació dietètica amb l'SDP està àmpliament estudiada per les seves propietats anti-inflamatòries en diferents models experimentals d'inflamació, tant

crònics com aguts (Miró et al., 2020a; Pérez-Bosque et al., 2016b), i en diferents òrgans i teixits, principalment a la mucosa intestinal (Pérez-Bosque et al., 2010), però també en teixits allunyats del sistema digestiu, com la mucosa pulmonar (Maijó et al., 2012) o la mucosa genitourinària (Song et al., 2015). En animals vells, s'ha descrit que la suplementació amb SDP redueix la inflamació basal a l'intestí, la concentració sistèmica de citocines pro-inflamatòries (Miró et al., 2017) i prevé del deteriorament cognitiu associat a l'envelliment (Garcia-Just et al., 2020), la qual cosa es podria associar amb l'*inflammaging* (Francheschi et al., 2018).

La pèrdua de memòria és un dels primers símptomes descrits a l'AD (Lane et al., 2018). Tenint en compte aquestes premisses, es va estudiar l'efecte de l'SDP sobre els marcadors neuropatològics de l'AD. Per fer-ho, s'ha utilitzat el model de ratolins SAMP8 els quals són àmpliament utilitzats en estudis de deteriorament cognitiu associat a l'envelliment (Griñán-Ferré et al., 2019). A més, aquesta soca de ratolins presenta diferents característiques associades amb l'AD, com un processament aberrant de l'APP (Morley et al., 2012), estrès oxidatiu (Griñán-Ferré et al., 2016) i neuroinflamació (Pallàs et al., 2012). Els ratolins SAMP8 envellits emprats en la present tesi presentaven un deteriorament cognitiu associat a l'edat amb la pèrdua de memòria a curt i llarg termini. D'altra banda, la suplementació amb l'SDP millorava aquest rendiment cognitiu tant a curt com llarg termini, la qual cosa confirma els resultats descrits anteriorment (Garcia-Just et al., 2020). De la mateixa manera, estudis recents han observat que els suplementes dietètics poden millorar la memòria en ratolins SAMP8 envellits (Iwata et al., 2020).

La pèrdua de memòria pot ser deguda a una disfunció sinàptica més que a una pèrdua neuronal (Yang et al., 2018), la qual cosa es pot relacionar amb els resultats de Garcia-Just et al., (2020) en què els ratolins senescents presenten una reducció de sinaptofisina al cervell, i la suplementació amb l'SDP ho prevé. En el present estudi, es va estudiar els efectes sobre la plasticitat sinàptica a nivell molecular, i es va observar una disminució de la forma madura de BDNF en l'envelliment. El BDNF és un factor neurotròfic que juga un paper essencial en la plasticitat sinàptica, la neuroprotecció cerebral i la memòria (Arancio i Chao, 2007). L'abundància de BDNF disminueixen en pacients amb l'AD, ja que els pèptids A β poden inhibir la seva maduració (Tanila, 2017), i induir la neurodegeneració i la disfunció sinàptica (Amidfar et al., 2020). Per contra, el pinso amb l'SDP va incrementar l'abundància d'aquest factor neurotròfic, el qual podria ser responsable de l'efecte beneficiós del suplement envers el deteriorament de la memòria. Diferents suplementes i prebiòtics augmenten l'abundància de BDNF al cervell i milloren la retenció de memòria en animals (Savignac et al., 2013). A més, els NFT, la deposició d'A β

i la neuroinflamació també poden ser responsables d'aquest deteriorament de la memòria (Kesika et al., 2021).

Aquest deteriorament cognitiu també s'associa amb una activitat locomotora reduïda (Singhal et al., 2020), la qual s'observa normalment en ratolins SAMP8 (Tsumagari et al., 2021). Aquesta reducció motora també es va observar amb els ratolins senescents. Els nostres resultats suggereixen que la suplementació dietètica amb l'SDP va prevenir aquesta disminució de l'activitat locomotora. El BDNF regula l'activitat locomotora en ratolins (Kernie et al., 2000) i aquesta neurotrofina s'ha vist augmentada en els nostres ratolins SAMP8 que reben la suplementació amb l'SDP. A més, aquests resultats es correlacionen bé amb l'augment de l'activitat locomotora en ratolins C57BL/6 desafiats amb LPS alimentats amb el pinso SDP (Liu et al., 2018). S'ha descrit que els tractaments farmacològics envers el desenvolupament de l'AD, augmenten l'activitat locomotora i el rendiment cognitiu en ratolins SAMP8 (Puigoriol-Illamola et al., 2018).

En els ratolins SAMP8 es van observar patologies amiloides i tau augmentades, les quals van ser avaluades per l'activació de marcadors de la via amiloidogènica, com ara *Bace1*, sAPP β , A β 40, A β 42, i la p-tau. El processament aberrant de l'APP i la formació de NFT contribueixen substancialment a la malaltia (Masters et al., 2015) i, per tant, aquests ratolins a l'edat de 6 mesos presentaven característiques moleculars i clíniques primerenques de l'AD.

L'activació de via amiloidogènica implica la divisió seqüencial de l'APP per la BACE1 i la γ -secretasa, que produeix la sAPP β i la generació de pèptids A β neurotòxics (Fisher et al., 2017). A més, la divisió de l'APP per BACE1 és un primer pas essencial en la producció de pèptids A β que són reconeguts com un dels marcadors inicials que causen la malaltia (Cai et al., 2017). Els nostres resultats suggereixen que la suplementació amb l'SDP redueix la concentració de sAPP β , així com l'abundància d'A β 40, i l'expressió de la secretasa amiloidogènica BACE1, la qual cosa indica una reducció de la via amiloidogènica. Aquests efectes podrien explicar la millora de la retenció de memòria, tant a curt com a llarg termini, i l'increment de BDNF observat en els ratolins SAMP8 de 6 mesos suplementats amb l'SDP. A més, aquest efecte de l'SDP és comparable a altres intervencions nutricionals, que inclouen suplementes amb vitamina D, resveratrol, el consum d'oli d'oliva verge extra, entre d'altres, i que també redueixen els biomarcadors relacionats amb A β , com ara APP, sAPP β i BACE1, a tant ratolins com pacients amb l'AD (Bazinet & Layé, 2014; Corpas et al., 2019; Jia et al., 2019; Laurettil et al., 2017).

La p-tau és un altre signe distintiu neuropatològic de l'AD que altera el transport axonal i la seva agregació comporta la formació de NFTs (Chong et al., 2018). A més, la fosforilació de tau està modulada per diverses proteïnes quinases, com GSK3 β i CDK5 (Lee et al., 2011). La CDK5 juntament amb el seu potent activador p25 és particularment interessant, ja que té un paper crucial en la patogènesi de l'AD. La CDK5 accelera la neurodegeneració de l'AD, indueix estrès oxidatiu, disminueix la densitat sinàptica observada en les primeres etapes de la malaltia, regula l'activitat d'altres quinases essencials, inclosa la GSK3 β i també pot fosforilar l'APP i augmentar la via amiloidogènica del processament d'aquesta proteïna (Liu F et al., 2003; Liu SL et al., 2016; Sheng et al., 2016). D'altra banda, la GSK3 β activada, a part de fosforilar tau, s'ha relacionat amb la neuroinflamació, l'activació dels receptors TLR i de la via NF- κ B, l'apoptosi neuronal i un major dèficit de memòria i aprenentatge (Souder & Anderson, 2019). La suplementació amb l'SDP va reduir l'abundància de p-tau i p-CDK5 alhora que va augmentar la de p-GSK3 β (fosforilada en la Ser9). A diferència de CDK5, GSK3 β s'inactiva quan es fosforila en aquesta posició (Souder & Anderson, 2019). Per tant, la fosforilació GSK3 β a Ser9 millora la funció cel·lular i redueix l'abundància de NFTs (Hermida et al., 2017). A més, l'efecte de l'SDP associat amb una reducció de l'abundància de la CDK5 activada i de la p-tau és coherent amb els resultats anteriors que mostren que els ratolins SAMP8 de 6 mesos que reben la suplementació amb l'SDP tenen una major abundància de sinaptofisina (Garcia-Just et al., 2020), indicatiu d'una densitat sinàptica més elevada (Del Valle et al., 2012).

Tot i que els dipòsits d'A β i els NFT tradicionalment es consideraven vies independents a la neuroinflamació, estudis recents demostren una interacció entre aquests processos, i indiquen que la neuroinflamació i l'estrès oxidatiu poden agreujar la neurodegeneració i afectar a l'aparició de l'AD (Korzhevskii & Kirik, 2016). Diversos estudis mostren un augment de la concentració de citocines pro-inflamatòries en els pacients que pateixen l'AD (Park et al., 2020; Shen et al., 2019). S'ha descrit que l'IL-17 pot activar les cèl·lules glials (Chen et al., 2020) i l'IL-18 regula els components del complex γ -secretasa, accelerant la producció d'A β , així com les quinases GSK3 β i CDK5, que afavoreixen la p-tau (White et al., 2017). En ratolins *IL-18-KO*, s'observa una reducció de l'activació microglial i la pèrdua neuronal (Sugama et al., 2004). L'increment de dipòsits A β també s'associa amb un increment de citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , IL-6 i TNF- α , les quals poden suprimir la transmissió sinàptica, malmetre la funció neuronal i activar les cèl·lules glials (Heneka et al., 2015). Els ratolins del present estudi mostren un augment de l'expressió gènica de citocines pro-inflamatòries com *Il-17*, *Il-6*, *Il-1 β* (i en menor grau

l'IL-18), i la reducció de l'anti-inflamatòria *Tgf-β* en el còrtex de ratolins senescents. La suplementació amb l'SDP va prevenir la neuroinflamació, ja que va disminuir l'expressió gènica de les citocines pro-inflamatòries i va augmentar l'expressió de *Tgf-β* i la concentració d'IL-10 en el teixit cerebral. Garcia-Just et al., (2020) va descriure que els ratolins suplementats amb l'SDP presentaven una reducció de l'expressió pro-inflamatòria de citocines (*Il-6*, *Tnf-α*) i un augment de la concentració d'IL-10 en el teixit cerebral, a més d'una disminució de la concentració de peròxid d'hidrogen a còrtex, reduint així també l'estrès oxidatiu. Altres compostos dietètics, com els polifenols o els àcids grassos poliinsaturats, s'han descrit que també eviten la neuroinflamació associada a l'AD (Sawikr et al., 2017; Bazinet i Layé, 2014).

Els TLR estan expressats per la micròglia, els astròcits, els oligodendocits i les neurones (Kumar et al., 2019). La senyalització d'aquests receptors pot activar la micròglia i induir l'alliberament de factors pro-inflamatoris (Dansokho i Heneka, 2018). De fet, l'activació de TLR és essencial per generar neuroinflamació (Fiebich et al., 2018). A més, la via dependent de TLR té un paper essencial induint el processament amiloidogènic d'Aβ (Leng i Edison, 2021). Concretament, es descriu que TLR2 i TLR4 són llocs d'unió per a Aβ, i la senyalització d'ambdós receptors pot activar la micròglia i induir l'alliberament de factors pro-inflamatoris (Dansokho & Heneka, 2018). A més l'expressió gènica de *Tlr2* es troba augmentada en els cervells de pacients amb l'AD i en models de ratolins amb neurodegeneració (Letiembre et al., 2009). L'activació de TLR pot ser mitjançant una via dependent o independent de Myd88. Ambdues vies indueixen una cascada inflamatòria activant el factor de transcripció NF-κB (Kumar et al., 2019). En aquesta tesi es va observar un augment de l'expressió gènica de *Tlr2* al còrtex dels ratolins envellits. L'activació d'aquest TLR va promoure una via independent de Myd88, ja que es va augmentar l'expressió gènica de l'adaptador *Trif* en ratolins envellits, mentre que *Myd88* no es va modificar. Aquesta via independent de Myd88 va promoure l'augment de la forma activa del factor de transcripció NF-κB (p65-NF-κB) en ratolins senescents. L'activació de NF-κB s'associa amb respostes inflamatòries i malalties neurodegeneratives. Per exemple, la citocina IL-17, la qual s'associa amb un deteriorament cognitiu, activa NF-κB i promou l'expressió d'altres citocines pro-inflamatòries (Cipollini et al., 2019). NF-κB es troba augmentat en pacients amb l'AD i s'ha descrit que indueix la via amiloidogènica i la fosforilació de tau (Srinivasan i Lahiri, 2015; Souder & Anderson, 2019). Concretament, l'augment de citocines pro-inflamatòries i la senyalització de NF-κB regulen la via BACE1, cosa que resulta en una elevada producció d'Aβ (Sastre et al., 2003). Per tant, l'activació de la via de senyalització

de TLR-NF- κ B podria estar associada amb la inducció de la fosforilació tau i la via amiloidogènica que es va observar en aquests ratolins SAMP8 envellits. En canvi, la suplementació amb l'SDP va prevenir els canvis associats a l'edat, ja que va reduir l'expressió gènica de *Tlr2*, i l'activació de NF- κ B. Aquesta menor activació de la via de senyalització es podria associar amb els efectes preventius de l'SDP en la reducció de la via amiloidogènica, la fosforilació de tau i la reducció de la neuroinflamació.

Les cèl·lules microgials activades que envolten les plaques amiloides i la presència de cèl·lules T afavoreixen la neuroinflamació a l'AD. De fet, hi ha un interès creixent en analitzar el paper de la micròglia en el desenvolupament de l'AD i la micròglia activada s'ha descrit com un altre signe distintiu de la patologia (Dansokho & Heneka, 2018). La micròglia activada es localitza al voltant de les plaques senils (Zotova et al., 2013) i els NFT al teixit cerebral dels pacients amb l'AD i els models de ratolins transgènics per al desenvolupament de la malaltia (Nilson et al., 2017). En el present estudi, els ratolins SAMP8 de 6 mesos presentaven els signes característics de l'AD, com són la via amiloidogènica, els NFT i la neuroinflamació, la qual cosa activa la micròglia tipus M2. De fet, estudis recents confirmen que, en la fase inicial de l'AD, el fenotip de micròglia M2 s'activa per evitar la sobreproducció d'A β i més danys patològics (Li et al., 2020; Zheng et al., 2018). Concretament, el gen *Trem2*, que s'expressa dominantment per la micròglia al CNS, també s'incrementa en ratolins SAMP8 de 7 mesos (Jiang et al., 2014). A més, s'ha observat que la micròglia ARG1⁺ augmenta durant la neuroinflamació per IL-1 β en un mecanisme de retroalimentació negativa (Cherry et al., 2015), citocina que es va trobar augmentada en els ratolins envellits de 6 mesos d'edat. A més, una disrupció de la BBB també pot activar la micròglia (Kumar et al., 2019). Estudis previs realitzats en aquesta soca de ratolins trobaven un augment de la permeabilitat de la BBB en ratolins senescents (Garcia-Just et al., 2020). Tot això podria explicar l'expressió augmentada dels marcadors microgials M2, com són el *Trem2*, l'*Arg1* i el *Ym1*, en els ratolins SAMP8 envellits. La suplementació amb l'SDP va prevenir l'activació de la micròglia. De manera similar als nostres resultats, estudis previs han demostrat que la suplementació amb l'SDP redueix l'expressió gènica d'*Inos* en un model de ratolí de lesió pulmonar aguda (Maijó et al., 2012), i altres productes naturals com la curcumina poden inhibir aquesta expressió gènica en micròglia (Ghasemi et al., 2019). En conjunt, aquests resultats suggereixen potencials efectes neuroprotectors de la suplementació de l'SDP envers l'envelliment i, més concretament, en l'AD (**Figura 7**).

El mecanisme d'acció pel qual l'SDP produeix aquests efectes es desconeix. S'ha hipotetitzat que poden estar implicats diversos components funcionals que el

constitueixen en lloc d'un sol, els quals poden actuar directament sobre la resposta immunitària intestinal, i per exemple, prevenir els efectes perjudicials del SEB en ratolins (Pérez-Bosque et al., 2010; 2016b) o de la infecció amb *E. coli* en porcs (Bosi et al., 2004). D'altra banda, l'SDP pot afavorir el creixement d'una microbiota amb efectes anti-inflamatoris, com demostra Moretó et al., (2020) en ratolins, o Che et al., (2019) en porcs acabats de deslletar.

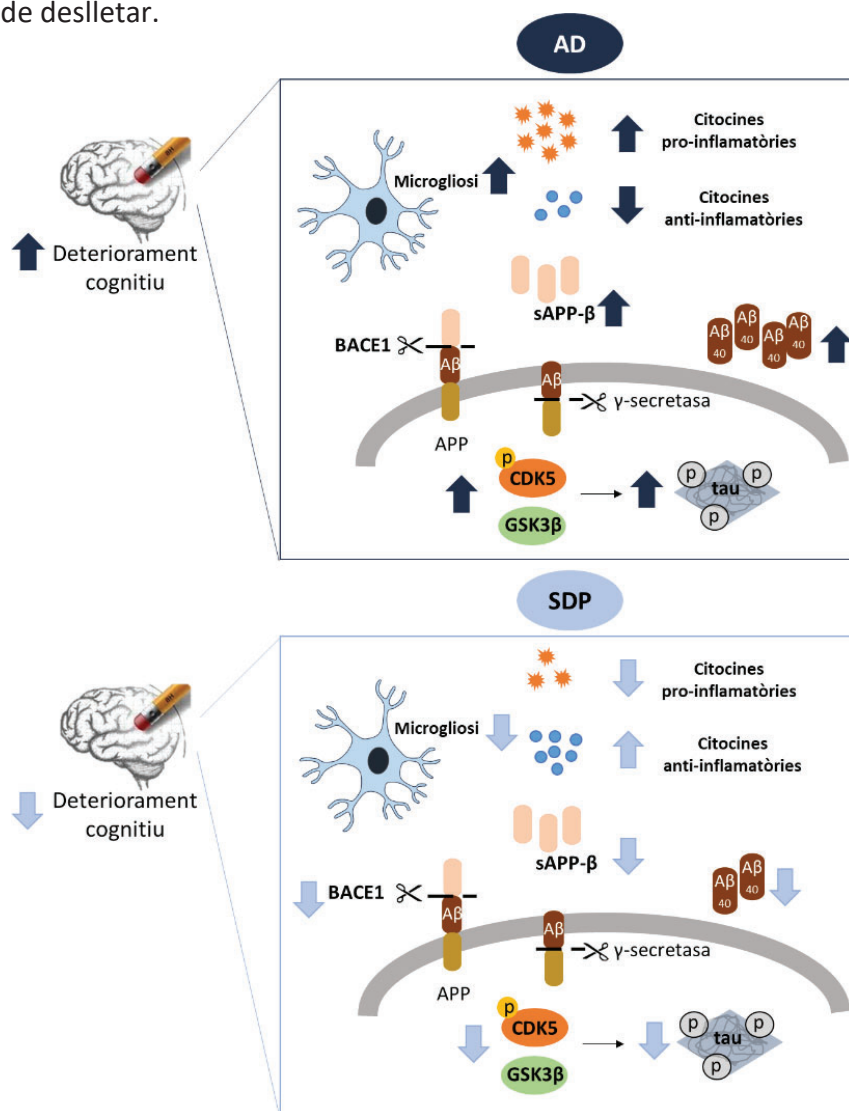


Figura 7. Efectes de la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) sobre els marcadors neuropatològics de l'AD. La suplementació dietètica amb l'SDP disminueix la via amiloidogènica i la fosforilació de tau. Aquests efectes preventius estan acompanyats per una reducció de la neuroinflamació i una atenuació de la microglia activada. APP: Proteïna precursora amiloide; Aβ₄₀: Beta-amiloide 1-40; BACE1: β-secretasa 1; CDK5: Quinasa dependent de ciclina 5 (*Cyclin dependent kinase 5*); GSK3: Glicogen sintasa quinasa 3 beta (*Glycogen synthase kinase 3β*); NFT: Cabdells neurofibrilars (Neurofibrillary tangles); P: fosforilació (*phosphorylation*).

Recentment, s'ha observat que suplementes derivats de proteïnes plasmàtiques que inhibeixen la secreció de TNF en limfòcits T i monòcits de rata *in vitro* i que regulen la

resposta immunitària dels enteròcits intestinals a través de NF- κ B (Hernández-Chirlaque et al., 2021). L'estimulació dels receptors relacionats amb NF- κ B en enteròcits implica l'activació de complexos immunomoduladors, incloent-hi no només la secreció de citocines i/o quimocines (Günther et al., 2014), sinó també la secreció de pèptids antibacterians (Menendez et al., 2013). Per contra, hi ha evidències creixents sobre la relació entre la microbiota intestinal, el sistema digestiu i el cervell, així com la seva associació amb la inflamació (Lin et al., 2019; Cattaneo et al., 2017; X. Liu et al., 2015). De fet, estudis recents suggereixen que l'efecte de la dieta o els suplementes dietètics envers la patologia de l'AD es dur a terme a través de l'eix intestí-cervell (Kincaid et al., 2021). Els possibles mecanismes d'aquesta comunicació se centren en la regulació del sistema immunitari i l'activació de les vies neuronals i endocrines per part de la microbiota intestinal o els seus subproductes (Dalile et al., 2019). Més concretament, la microbiota pot modular la maduració de la micròglia (Erny et al., 2015), així com regular la permeabilitat de la BBB i la plasticitat sinàptica, i induir la formació d'A β i NFT (Mancuso i Santangelo, 2018). Tanmateix, durant l'envelliment es produeix una alteració de la composició de la microbiota anomenada disbacteriosi. Aquesta alteració contribueix a augmentar l'*inflammaging* i la permeabilitat intestinal. La disbacteriosi també estimula la secreció de LPS i la reducció de metabòlits beneficiosos com els SCFA (Walrath et al., 2021). Els canvis en la composició de la microbiota intestinal associats amb l'envelliment probablement contribueixen a la immunosenescència i al desenvolupament d'un fenotip pro-inflamatori (Vaiserman et al., 2017). En la present tesi, la senescència va reduir l'abundància de bacteris beneficiosos i en va incrementar l'abundància de pro-inflamatoris. Per exemple, l'envelliment va augmentar la família *Erysipelotrichaceae*, que està relacionada amb inflamació, i l'abundància dels gèneres *Johnsonella* i *Erysipelhotrix*. Aquests bacteris patògens es troben més abundants en el model de ratolins l'AD (Bäuerl et al., 2018) i podrien contribuir al deteriorament cognitiu de l'AD (Shen et al., 2017). A més, l'envelliment va augmentar la família *Bacteroidaceae*, així com el gènere *Bacteroides* i les diferents espècies dins d'aquest gènere, el qual s'observa de forma més abundant en pacients amb l'AD (Vogt et al., 2017). Per contra, la senescència va reduir la família *Prevotellaceae* i el gènere *Prevotella*, bacteris comensals que es troben reduïts en models de ratolins amb l'AD (Shen et al., 2017). L'envelliment també va disminuir el gènere *Odoribacter* que s'associa negativament amb la demència (Zhou et al., 2021), així com els gèneres beneficiosos *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Aquests efectes de l'envelliment són similars als resultats anteriors analitzats al nostre laboratori (Miró et al., 2020b).

La suplementació dietètica amb l'SDP va prevenir alguns efectes de l'envelliment i va millorar el creixement de gèneres amb efectes anti-inflamatoris, que podrien atenuar la inflamació associada a l'edat. Per exemple, pel que fa a gènere, la suplementació amb l'SDP va reduir bacteris patògens com *Johnsonella* i *Erysipelhotrix*. Més concretament, en quant a espècies, la suplementació dietètica amb l'SDP va atenuar els efectes de l'envelliment i va reduir l'abundància d'*Erysipelhotrix muris* i *Prevotella dantasini*. A més, la suplementació amb l'SDP va induir l'abundància de la família *Eubacteriaceae*, que té efectes promotors de la salut per a l'hoste (Fijan et al., 2014) i es correlaciona negativament amb la demència clínica (Zhou et al., 2021).

La suplementació amb l'SDP promou la família *Lactobacillaceae*, així com diferents gèneres beneficiosos que es troben dins d'aquesta família, com ara *Lactobacillus* i *Pediococcus*. L'augment de l'abundància de *Lactobacillus* en els ratolins suplementats amb l'SDP ja s'havia descrit anteriorment amb altres models d'animals acabats de deslletar com ara ratolins (Moretó et al., 2020), porcs (Che et al., 2019) i porcs després de rebre d'una infecció per *E. coli* (Torrallardona et al., 2003). El gènere de *Lactobacillus* també participa en la prevenció de malalties neurològiques (Cheng et al. 2019). Concretament, pel que fa a l'AD, s'associa negativament amb la càrrega de pèptids amiloides en pacients amb la malaltia (Lin et al., 2019). A més, l'administració oral de *Lactobacillus* prevé el deteriorament cognitiu, tant en humans com en rates (Messaoudi et al., 2011). També millora els dèficits de memòria en ratolins SAMP8 vells (Yang et al., 2020) i en persones adultes estressades (Lew et al., 2019), així com augmenta l'expressió de *Bdnf* al cervell dels rosegadors (Liang et al., 2015). Aquestes observacions són consistents amb els nostres resultats on la suplementació amb l'SDP augmentava l'abundància de BDNF i prevenia el deteriorament cognitiu. A més, l'administració de *Lactobacillus* produeix un augment de la concentració plasmàtica d'IL-10 (Liang et al., 2015), els quals també incrementen en els nostres ratolins envellits que han rebut la suplementació amb l'SDP. Així doncs, l'increment del gènere *Lactobacillus* podria ser essencial en els efectes anti-inflamatoris i preventius envers el deteriorament cognitiu i la pèrdua de memòria en els ratolins que han rebut la suplementació amb l'SDP.

La suplementació amb l'SDP també va augmentar altres bacteris del fílum *Firmicutes*, com són els *Acetobacterium*. Aquest gènere és productor d'acetil-CoA (Ross et al., 2020). Un augment de l'acetil-CoA produeix una millora en la funció cognitiva durant l'envelliment (Currais et al., 2019) i incrementa la concentració de butirat, ja que l'acetil-Coa n'és el precursor (Louis & Flint 2017). Els SCFA exerceixen efectes anti-inflamatoris, ja que inhibeixen l'expressió de les citocines pro-inflamatòries *Il-6*, *Il-1β*, i *Tnf-α*

(Nakajima et al., 2017). Els SCFA poden mediar en les funcions cel·lulars a través de l'activació dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) de la superfície cel·lular, com són *Ffar2* i *Ffar3*, que s'expressen a les cèl·lules epitelials i immunitàries (Dalile et al., 2019). La suplementació amb l'SDP va augmentar l'expressió gènica de *Ffar2* i *Ffar3*, cosa que va suggerir que alguns dels efectes anti-inflamatoris i neuroprotectors de l'SDP podrien estar intervinguts pels SCFA. Aquests subproductes produïts per la microbiota intestinal poden circular cap al cervell, modular el grau d'activació del sistema immunitari i regular la maduració de la micròglia (Dalile et al., 2019). Per tant, podrien ser un vincle entre la microbiota intestinal i la reducció de la neuroinflamació.

La disbacteriosi afavoreix la producció de l'LPS, una endotoxina derivada de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius i altera la funció de la barrera intestinal que provoca la translocació de bacteris i dels seus subproductes al torrent sanguini, la qual cosa pot contribuir a la neurodegeneració (Kowalski i Mulak, 2019). Estudis recents revelen que l'augment de la permeabilitat intestinal indueix una inflamació sistèmica, que acaba perjudicant la funció BBB i, en conseqüència, desencadenant la neuroinflamació i la disfunció cognitiva (Cryan et al., 2019; Krstic et al., 2012). En el present estudi, es va observar una disminució de l'expressió de gens relacionats amb la producció i manteniment de la mucosa (*Tff3* i *Muc2*) i de la proteïna del complex d'unió (*Ocludina*). A conseqüència de l'alteració de la barrera epitelial, la concentració de LPS sèric es va augmentar en els ratolins envellits. A més, s'ha descrit que pacients amb l'AD tenen una concentració elevada de LPS i això pot potenciar la patologia amiloide (Marizzoni et al., 2020). D'altra banda, la suplementació dietètica amb l'SDP va millorar la funció de barrera intestinal, ja que va prevenir els canvis associats a l'edat en l'expressió gènica d'*Ocludina*, *Muc2* i *Tff3*. Aquests resultats es poden relacionar amb els efectes de l'SDP sobre la microbiota, pel fet que el gènere *Lactobacillus* pot prevenir l'alteració de la funció de la barrera intestinal i reduir la permeabilitat del còlon causada per una infecció (Khailova et al., 2017), així com augmentar la secreció de la mucosa, proporcionar una protecció antimicrobiana i prevenir la translocació de bacteris patògens (Cazorla et al., 2018). Així doncs, la suplementació amb l'SDP va millorar la funció intestinal de la mucosa, que podria estar mediada per canvis en la microbiota. Resultats similars han revelat anteriorment els efectes de la suplementació amb l'SDP sobre la funció de la mucosa (Moretó et al., 2020), la reducció de la permeabilitat intestinal durant una inflamació aguda (Pérez-Bosque et al., 2006) o crònica (Miró et al., 2020a) i sobre la prevenció de malalties infeccioses (Corl et al., 2007).

Aquests efectes sobre la funció de la barrera intestinal en ratolins de 6 mesos d'edat anaven acompanyats d'un augment de la inflamació del teixit del còlon i d'una inducció de cèl·lules T activades (*Cd25*) i macròfags (*F4/80*) en ratolins envellits. Els bacteris poden activar les cèl·lules immunitàries mitjançant una via TLR (Lin et al., 2019). De la mateixa manera, en els nostres resultats vam trobar un augment de l'expressió dels gens *Tlr2* i *Tlr4* a la mucosa del còlon. L'activació de la resposta immunitària provoca una inflamació sistèmica que també és freqüent en l'envelliment (Franceschi et al., 2018). En aquesta tesi, la concentració en sèrum de citocines pro-inflamatòries com IL-1 β i TNF- α va incrementar amb l'envelliment. Concentracions circulants elevades d'aquestes citocines es troben en pacients amb l'AD (Swardfager et al., 2010) i, de fet, es consideren biomarcadors perifèrics per la malaltia (Park et al., 2020). La inflamació sistèmica crònica indueix neuropatologia semblant a l'AD en ratolins (Krstic et al., 2012). Diferents factors de la cascada inflamatòria poden circular al cervell, inclús travessar la BBB, la qual es troba més permeable a causa de la malaltia (Lin et al., 2019), activar la micròglia i alterar la funció cognitiva (Mancuso i Santangelo, 2018). La suplementació dietètica amb l'SDP va mostrar efectes immunomoduladors, ja que va reduir la intensitat de la resposta immunitària a còlon. Els animals alimentats amb el pinso SDP van disminuir l'expressió gènica dels receptors innats *Tlr2* i *Tlr4*, el reclutament de les cèl·lules T activades i dels macròfags, així com de les citocines pro-inflamatòries *Tnf- α* i *Il-6*. Aquests resultats de l'SDP poden ser rellevants perquè l'activació del sistema immunitari i l'alliberament de citocines pro-inflamatòries poden alterar les proteïnes del complex d'unió i augmentar la permeabilitat epitelial (Wang et al., 2005) i, per tant, promoure i perpetuar la inflamació intestinal (Laukoetter et al., 2008). La suplementació amb SDP, no només atenua la resposta immunitària a còlon, sinó que la també ho fa de manera sistèmica, ja que va reduir la concentració de citocines pro-inflamatòries (TNF- α i IL-1 β), així com va augmentar la citocina anti-inflamatòria IL-10 a sèrum. La disminució de la inflamació sistèmica pot reduir la neuroinflamació (Cryan et al., 2019; Krstic et al., 2012). Efectes similars de la suplementació amb l'SDP sobre la inflamació sistèmica també s'havien observat amb anterioritat en aquest mateix model de ratolins SAMP8 (Miró et al., 2017).

En resum, la suplementació dietètica amb l'SDP indueix el creixement de bacteris probiòtics i redueix bacteris relacionats amb la inflamació. A més, millora de la funció de barrera del còlon i la reducció de la resposta inflamatòria, tant local com sistèmica. A causa de la comunicació existent entre l'intestí i el cervell (Caracciolo et al., 2014), aquests processos poden reduir l'activació de la micròglia i la neuroinflamació. A més, hi ha una disminució de la via amiloidogènica i de la p-tau. Tot això comporta una millora

en el deteriorament cognitiu i, per tant, un increment de la resiliència cerebral envers els neuromarcadors patològics de l'AD (Figura 8). Aquests resultats evidencien que la suplementació amb l'SDP té un efecte prebiòtic en ratolins envellits i suggereixen que l'eix intestí cervell pot estar involucrat en els efectes neuroprotectors del suplement.

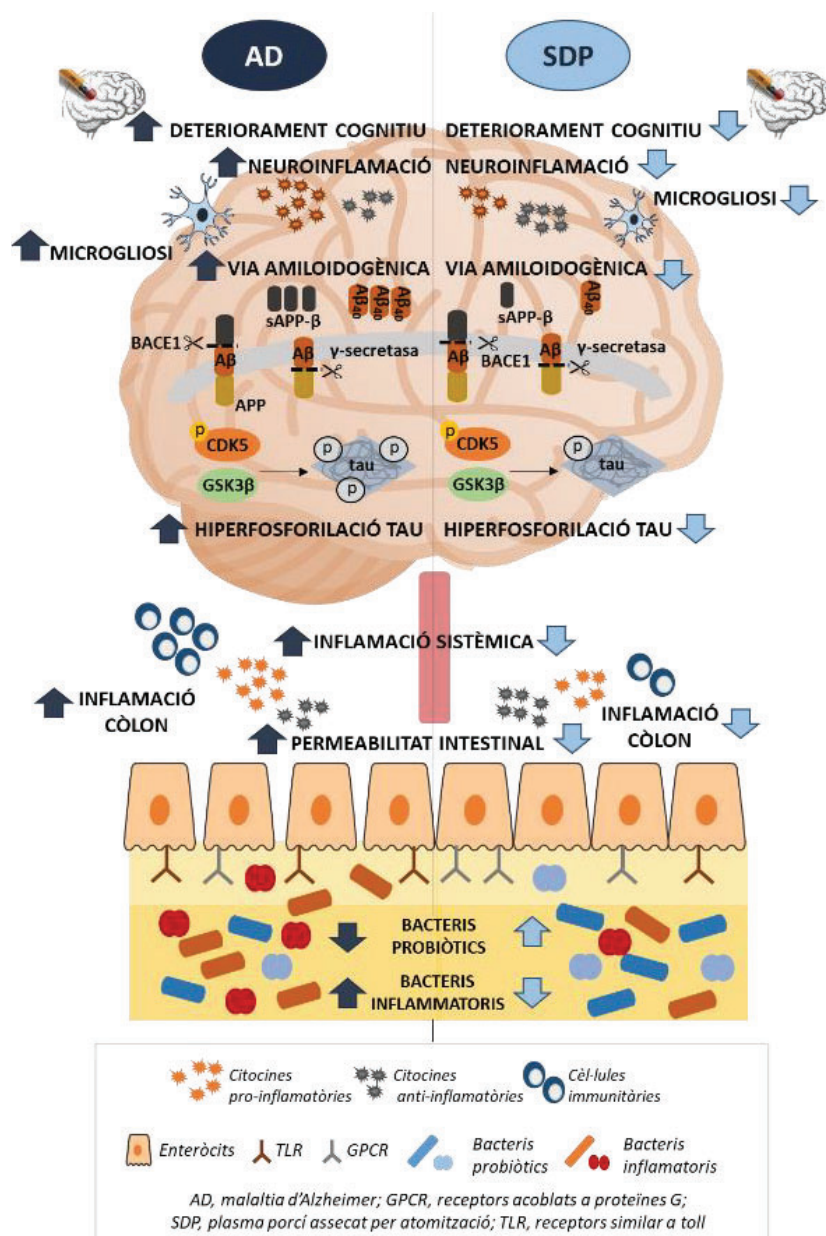


Figura 8. Efectes de la suplementació amb plasma porcí assecat per atomització (SDP) sobre l'eix microbiota-intestí-cervell. La suplementació dietètica amb l'SDP augmenta els bacteris probiòtics i disminueix els inflamatoris a colon. A més, redueix la inflamació i millora la permeabilitat de la barrera intestinal. Això va acompanyat d'una menor inflamació sistèmica i conclou en una menor neuroinflamació. A teixit cerebral, l'SDP disminueix la via amiloideogènica i la hiperfosforilació de tau, així com la microgliosi i millora el rendiment cognitiu. En conjunt, la suplementació amb l'SDP redueix el deteriorament cognitiu provocat per l'envelliment en ratolins SAMP8 a través de la microbiota i la via microbiota-intestí-cervell.

Els resultats del present estudi suggereixen un paper essencial de la microbiota en els efectes anti-inflamatoris i neuroprotectors de la suplementació amb l'SDP. Tot i això, la suplementació amb l'SDP consta de molts components funcionals, essencialment de font proteica, cosa que el diferencia dels altres prebiòtics convencionals rics en hidrats de carboni no digeribles. Aquest fet insinua que la funció de l'SDP podria ser causada per algun subproducte derivat de la digestió del suplement, o bé, que alguns dels compostos resistissin a la digestió i a l'absorció de l'intestinal prim, per absorbir-se o metabolitzar-se a còlon (Van der Wielen, 2017) o excretar-se a les femtes (Rodríguez et al., 2007), modificant així, la composició de la microbiota del còlon. Així doncs, seria interessant dilucidar, per una banda, si és algun d'aquests components o la sinergia entre tots ells el que produeix l'efecte del suplement, i la metabòlica associada als efectes prebiòtics del suplement. Per dur-ho a terme, es poden fer estudis dels diferents components per separat i veure quins efectes exerceixen en ratolins i analitzar els metabòlits resultants després de la ingesta de l'SDP.

S'ha pogut observar que la via immunològica de l'eix intestí-cervell podria ser la causant dels efectes de l'SDP en el teixit cerebral. D'altra banda, es requereixen més estudis per acabar de confirmar el mecanisme d'acció d'aquest suplement. Receptors com els TLR podrien ser essencials a l'activació d'aquesta via i a la interacció entre la microbiota i l'hoste. Ratolins KO per aquests receptors podrien evidenciar el si participen en el mecanisme de l'SDP. De la mateixa manera, l'anàlisi de la concentració d'SCFA en femtes o sanguini o bé l'ús de ratolins KO en els seus receptors podria esclarir si els SCFA són els mediadors per modular aquesta via, ja que els efectes sobre els seus receptors ho semblen indicar.

Aquests efectes de la suplementació dietètica amb l'SDP tenen gran rellevància, pel fet que actualment no hi ha cap tractament farmacològic eficaç que guareixi l'AD (Soria Lopez et al., 2019). Per tant, la suplementació dietètica amb l'SDP podria arribar a ser una bona estratègia preventiva per tal d'enrederir el desenvolupament de la malaltia. A més, els efectes prebiòtics i anti-inflamatoris de l'SDP podrien atenuar les patologies prevalents en aquestes edats avançades. S'ha comprovat la bioseguretat de la suplementació amb SDP i, en l'actualitat, s'utilitza en diferents models animals, sobretot, en animals de granja (Blázquez et al., 2020). Per aquest motiu, una futura possible aplicació podria ser l'administració d'aquest suplement en animals domèstics, per millorar i atenuar les conseqüències patològiques que pateixen per l'envelliment. Així doncs, el present estudi evidencia efectes neuroprotectors i prebiòtics de la suplementació amb l'SDP en ratolins envellits que poden ser prometedors per enrederir

els marcadors neuropatològics de l'AD i a més, obre noves vies d'investigacions per esclarir els efectes sobre el mecanisme d'acció de la suplementació amb l'SDP en la prevenció de les malalties com l'Alzheimer.



CONCLUSIONS



De l'estudi dels efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques d'origen porcí (SDP) en la progressió de la malaltia de l'Alzheimer es pot concloure que:

- Els ratolins SAMP8 presenten un deteriorament cognitiu associat a l'envelliment que és acompanyat de neuroinflamació i activació microglial amb presència de marcadors primers de la malaltia d'Alzheimer.
- La suplementació dietètica amb l'SDP durant 4 mesos atenua la neuroinflamació i incrementa la resiliència cerebral, preservant la memòria dels ratolins envellits.
- Els ratolins SAMP8 senescents presenten una activació de la via amiloidogènica amb la consegüent acumulació de sAPP β i sA β 40, i de les vies implicades en el seu desenvolupament i progressió.
- La suplementació amb SDP redueix les característiques neuropatològiques de la malaltia d'Alzheimer.

De l'estudi dels efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques d'origen porcí (SDP) i els seus efectes sobre la microbiota es pot concloure que:

- Els ratolins SAMP8 senescents presenten disbacteriosi amb una major abundància de bacteris pro-inflamatoris en detriment dels bacteris beneficiosos. Aquests canvis de les poblacions bacterianes estan associats tant a una inflamació local com sistèmica.
- La suplementació dietètica amb l'SDP modifica la composició de la microbiota en ratolins senescents, ja que promou l'abundància de bacteris amb propietats anti-inflamatòries i en redueix d'altres associats amb inflamació.
- La suplementació amb l'SDP redueix la inflamació a còlon i sistèmica en ratolins envellits, la qual cosa es podria associar amb l'efecte prebiòtic del suplement.

En resum, la suplementació amb l'SDP exerceix efectes anti-inflamatoris tant mucosals com sistèmics, així com propietats neuroprotectores. Aquests efectes es poden relacionar amb l'increment de l'abundància de bacteris probiòtics, la qual cosa suggereix una possible implicació de l'eix microbiota-intestí-cervell en els efectes perifèrics de la suplementació amb l'SDP.



BIBLIOGRAFIA



A

Adak A, Mojibur RK. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76:473–493.

Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, Ligotti ME, Zareian N, Accardi G. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? a review of potential options for therapeutic intervention. *Front Immunol.* 2019;10:2247.

Akama KT, Van Eldik LJ. β -Amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase- dependent signaling mechanism. *J Biol Chem.* 2000;275(11):7918–7924.

Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, Budni J, Kim YK. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2020;257:118020.

Amtul Z, Atta-Ur-Rahman. Neural plasticity and memory: Molecular mechanism. *Rev Neurosci.* 2015;26(3):253–268.

Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev.* 2011;12(5):426–437.

Arancio O, Chao MV. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(3):325–330.

Arnold JW, Roach J, Fabela S, Moorfield E, Ding S, Blue E, Dagher S, Magness S, Tamayo R, Bruno-Barcena JM, Azcarate-Peril MA. The pleiotropic effects of prebiotic galacto-oligosaccharides on the aging gut. *Microbiome.* 2021;9(1):31.

Ayaz M, Sadiq A, Junaid M, Ullah F, Ovais M, Ullah I, Ahmed J, Shahid M. Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic propensity in aging associated neurological disorders. *Front Aging Neurosci.* 2019;0:155.

B

- Bäuerl C, Collado MC, Diaz Cuevas A, Viña J, Pérez Martínez G. Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Lett Appl Microbiol.* 2018;66(6):464–471.
- Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(12):771–785.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015;148:114–131.
- Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, Vos W De. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLOS ONE.* 2010;5(5):e10667.
- Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur J Pediatr.* 2015;174(2):151–167.
- Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Gabriela Sánchez M, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L, Branchi I, Maggi L, Limatola C, Butovsky O, Tremblay MÈ. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia.* 2016;64(5):826–839.
- Blázquez E, Rodríguez C, Ródenas J, Segalés J, Pujols J, Polo J. Biosafety steps in the manufacturing process of spray-dried plasma: a review with emphasis on the use of ultraviolet irradiation as a redundant biosafety procedure. *Porcine Health Manag.* 2020;6:16.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(1):57–69.
- Bonfili L, Cekarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, Fiorini D, Boarelli MC, Rossi G, Eleuteri AM. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–21.

- Borg B, Campbell J, Polo J, Russell L, Rodriguez C, Ródenas J. Evaluation of the chemical and biological characteristics of spray-dried plasma protein collected from various locations around the world. *Proc Am Assoc Swine Vet.* 2002;33:97–100.
- Borre YE, Moloney RD, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:373–403.
- Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Merialdi G, Trevisi P, Nobili F, Mengheri E, Emilia R, Sperimentale IZ, Emilia R. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci.* 2004;82:1764–1772.
- Bosi P, Han IK, Jung HJ, Heo KN, Perini S, Castellazzi AM, Casini L, Creston D, Gremokolini C. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early-weaned pigs challenged with *E. coli* K88. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2001;14(8):1138–1143.
- Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3×TgAD and 2×TgAD mice. *Neurobiol of Aging.* 2018;71:21–31.
- Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, Korecka A, Bakocevic N, Guan NL, Kundu P, Gulyás B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(263).

C

- Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Capuron L, Delzenne N, Doré J, Franceschi C, Lehtinen MJ, Recker T, Salvioli S, Visioli F. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev.* 2017;40:95–119.
- Callahan LM, Vaules WA, Coleman PD. Progressive reduction of synaptophysin message in single neurons in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(5):384–395.

- Cai Z, Liu Z, Xiao M, Wang C, Tian F. Chronic cerebral hypoperfusion promotes amyloid-beta pathogenesis via activating β/γ -secretases. *Neurochem Res.* 2017;42:3446–3455.
- Campbell JM, Crenshaw JD, González-Esquerro R, Polo J. Impact of spray-dried plasma on intestinal health and broiler performance. *Microorganisms.* 2019;7(8):219.
- Canhada S, Castro K, Perry IS, Luft VC. Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutr Neurosci.* 2018;21:529–538.
- Cani PD, Daubioul CA, Reusens B, Remacle C, Catillon G, Delzenne NM. Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J Endocrinol.* 2005;185(3):457–465.
- Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L. Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech Ageing Dev.* 2014;136–137:59–69.
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. Oligomers of beta-amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol.* 2012;236(2):215–227.
- Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, Ferrari C, Guerra UP, Paghera B, Muscio C, Bianchetti A, Volta GD, Turla M, Cotelli MS, Gennuso M, Prella A, Zanetti O, Lussignoli G, Mirabile D, Bellandi D, Gentile S, Belotti G, Villani D, Harach T, Bolmont T, Padovani A, Boccardi M, Frisoni GB; INDIA-FBP Group. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging.* 2017;49:60–68.
- Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigón GDV. Oral administration of probiotics increases paneth cells and intestinal antimicrobial activity. *Front Microbiol.* 2018;9:736.
- Che L, Hu L, Zhou Q, Peng X, Liu Y, Luo Y, Fang Z, Lin Y, Xu S, Feng B, Li J, Tang J, Wu D. Microbial insight into dietary protein source affects intestinal function of pigs with intrauterine growth retardation. *Eur J Nutr.* 2019;59(1):327–344.
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(9):1205–1235.

- Chen J, Liu X, Zhong Y. Interleukin-17A: the key cytokine in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 2020;12:566922.
- Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *J Food Drug Anal.* 2019;27(3):632–648.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):1–15.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Arginase 1+ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2015;12:203.
- Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(5):965–980.
- Chunchai T, Thunapong W, Yasom S, Wanchai K, Eaimworawuthikul S, Metzler G, Lungkaphin A, Pongchaidecha A, Sirilun S, Chaiyasut C, Pratchayasakul W, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats. *J Neuroinflammation.* 2018;15:11.
- Cieza RJ, Cao AT, Cong Y, Torres AG. Immunomodulation for gastrointestinal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(3):391–400.
- Cipollini V, Anrather J, Orzi F, Iadecola C. Th17 and Cognitive Impairment: Possible Mechanisms of Action. *Front Neuroanat.* 2019;13:95.
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med.* 2010;16:228–231.
- Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(11):735–742.
- Corl BA, Harrell RJ, Moon HK, Phillips O, Weaver EM, Campbell JM, Arthington JD, Odle J. Effect of animal plasma proteins on intestinal damage and recovery of neonatal pigs infected with rotavirus. *J Nutr Biochem.* 2007;18(12):778–784.

Corpas R, Griñán-Ferré C, Rodríguez-Farré E, Pallàs M, Sanfeliu C. Resveratrol induces brain resilience against Alzheimer neurodegeneration through proteostasis enhancement. *Mol Neurobiol.* 2019;56:1502–1516.

Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1877–2013.

Cueva C, Sánchez-Patán F, Monagas M, Walton GE, Gibson GR, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. *In vitro* fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiol Ecol.* 2013;83(3):792–805.

Currais A, Huang L, Goldberg J, Petrascheck M, Ates G, Pinto-Duarte A, Shokhirev MN, Schubert D, Maher P. Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. *Elife.* 2019;8:e47866.

D

Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):461–478.

Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission.* 2018;125(5):771–779. 2018;125(5):771–779.

Das B, Yan R. Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Transl Neurodegener.* 2017;6(1):4–11.

Davari S, Talaei SA, Alaei H, Salami M. Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience.* 2013;240:287–296.

- De Cossío LF, Fourrier C, Sauvant J, Everard A, Capuron L, Cani PD, Layé S, Castanon N. Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. *Brain Behav Immun*. 2017;64:33–49.
- De la Torre JC. Vascular risk factors: a ticking time bomb to Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2013;28(6):551–559.
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(4):1303–1315.
- 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*. 2012;32:233–240.
- Deng X, Li M, Ai W, He L, Lu D, Patrylo PR, Cai H, Luo X, Li Z, Yan X. Lipolysaccharide-induced neuroinflammation is associated with Alzheimer-like amyloidogenic axonal pathology and dendritic degeneration in rats. *Adv Alzheimer Dis*. 2014;3(2):78.
- Dhaliwal J, Singh DP, Singh S, Pinnaka AK, Boparai RK, Bishnoi M, Kondepudi KK, Chopra K. *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 supplementation protects from chronic unpredictable and sleep deprivation-induced behaviour, biochemical and selected gut microbial aberrations in mice. *J Appl Microbiol*. 2018;125(1):257–269.
- DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, Gotsch F, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Sanders K, Bik EM, Chaiworapongsa T, Oyarzún E, Relman DA. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2010;64(1):38–57.
- Ding BJ, Ma WW, He LL, Zhou X, Yuan LH, Yu HL, Feng JF, Xiao R. Soybean isoflavone alleviates β -amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor- κ B activity in rats. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(5):537–542.
- Distrutti E, O'Reilly J-A, McDonald C, Cipriani S, Renga B, Lynch MA, Fiorucci S. Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL#3 resets brain gene expression and ameliorates the age-related deficit in LTP. *PLOS ONE*. 2014;9(9):e106503.

Dominguez LJ, Di Bella G, Veronese N, Barbagallo M. Impact of Mediterranean diet on chronic non-communicable diseases and longevity. *Nutrients*. 2021;13(6):2028.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS*. 2010;107(26):11971–11975.

E

Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mahlakoiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermöhlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):965–977.

F

Ferreira ST, Klein WL. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 2011;96(4):529–543.

Fiala M, Kooij G, Wagner K, Hammock B, Pellegrini M. Modulation of innate immunity of patients with Alzheimer's disease by omega-3 fatty acids. *FASEB J*. 2017;31(8):3229–3239.

Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:329.

Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(5):4745–4767.

Filippis FDe, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, Stora ALa, Laghi L, Serrazanetti DI, Cagno RD, Ferrocino I, Lazzi C, Turroni S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobbetti M, O'Toole PW, Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016;65(11):1812–1821.

Fisher CL, Resnick RJ, De S, Acevedo LA, Lu KP, Schroeder FC, Nicholson LK. Cyclic cis-locked phospho-dipeptides reduce entry of A β PP into amyloidogenic processing pathway. *J Alzheimers Dis*. 2017;55:391–410

Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(10):576–590.

Franco-Robles E, López MG. Implication of fructans in health: immunomodulatory and antioxidant mechanisms. *Scientific World Journal*. 2015;2015:289267.

G

Garcia-Just A, Miró L, Pérez-Bosque A, Amat C, Polo J, Pallàs M, Griñán-Ferré C, Moretó M. Dietary spray-dried porcine plasma prevents cognitive decline in senescent mice and reduces neuroinflammation and oxidative stress. *J Nutr*. 2020;150(2):303–311.

Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(9):503–514.

Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, MacQueen G, Sherman PM. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*. 2011;60(3):307–317.

Gatnau R, Paul PS, Zimmerman DR. Spray dried porcine plasma as a source of immunoglobulins for newborn piglets. *J Anim Sci*. 1989;67:244.

Ghasemi F, Bagheri H, Barreto GE, Read MI, Sahebkar A. Effects of curcumin on microglial cells. *Neurotox Res*. 2019;36:12–26.

Gibbons CH. Basics of autonomic nervous system function. *Handb Clin Neurol*. 2019;160:407–418.

Gisbert E, Skalli A, Campbell J, Solovyev MM, Rodríguez C, Dias J, Polo J. Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and enhances the immune status of *gilthead sea bream (Sparus aurata)* fingerlings. *J Anim Sci*. 2015;93(1):278–286.

Götz J, Bodea LG, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(10):583–598.

Gratuzo M, Leyns CEG, Holtzman DM. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2018;13:66.

- Griñán-Ferré C, Bellver-Sanchis A, Izquierdo V, Corpas R, Roig-Soriano J, Chillón M, Andres-Lacueva C, Somogyvári M, Sóti C, Sanfeliu C, Pallàs M. The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Res Rev.* 2021;67:101271.
- Griñán-Ferré C, Marsal-García L, Bellver-Sanchis A, Kondengaden SM, Turga RC, Vázquez S, Pallàs M. Pharmacological inhibition of G9a/GLP restores cognition and reduces oxidative stress, neuroinflammation and β -Amyloid plaques in an early-onset Alzheimer's disease mouse model. *Aging (Albany NY).* 2019;11(23):11591–11608.
- Griñán-Ferré C, Palomera-Ávalos V, Puigoriol-Illamola D, Camins A, Porquet D, Plá V, Aguado F, Pallàs M. Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp. Gerontol.* 2016;80:57–69.
- Gubert C, Kong G, Renoir T, Hannan AJ. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2020;134:104621.
- Günther C, Buchen B, Neurath MF, Becker C. Regulation and pathophysiological role of epithelial turnover in the gut. *Semin Cell Dev Biol.* 2014. 35;40–50.
- Gustafson DR, Karlsson C, Skoog I, Rosengren L, Lissner L, Blennow K. Mid-life adiposity factors relate to blood-brain barrier integrity in late life. *J Intern Med.* 2007;262(6):643–650.
- Gutiérrez-Díaz I, Fernández-Navarro T, Sánchez B, Margolles A, González S. Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food Funct.* 2016;7(5):2347–2356.

H

- Harach T, Marungruang N, Duthilleul N, Cheatham V, Mc Coy KD, Frisoni G, Neher JJ, Fåk F, Jucker M, Lasser T, Bolmont T. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–15.
- Hattiangady B, Rao MS, Shetty GA, Shetty AK. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp Neurol.* 2005;195(2):353–371.

- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol.* 2015a;16(3):229–236.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015b;14(4):388–405.
- Hermida MA, Kumar JD, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul.* 2017;65:5–15.
- Hernández-Chirlaque C, Aranda CJ, Ocón B, Polo J, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Immunoregulatory effects of porcine plasma protein concentrates on rat intestinal epithelial cells and splenocytes. *Animals (Basel).* 2021;11:807.
- Higuchi M, Lee VMY, Trojanowski JQ. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *NeuroMolecular Med.* 2002;2(2):131–150.
- Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(10):565–581.
- Howell NK, Lawrie RA. Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. *Int J Food Science Technology.* 1983;18:747–762.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization - New prospects for brain repair *Nat Rev Neurol.* 2015;11(1):56–64.
- Hyland NP, Cryan JF. Microbe-host interactions: influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev Biol.* 2016;417(2):182–187.
- Iwata K, Wu Q, Ferdousi F, Sasaki K, Tominaga K, Uchida H, Arai Y, Szele FG, Isoda H. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) top extract ameliorates cognitive decline in senescence model SAMP8 mice: modulation of neural development and energy metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:573487.

J

- Jahangiri A, Wilson PG, Hou T, Brown A, King VL, Tannock LR. Serum amyloid A is found on ApoB-containing lipoproteins in obese humans with diabetes. *Obesity*. 2013;21(5):993–996.
- Jia J, Hu J, Huo X, Miao R, Zhang Y, Ma F. Effects of vitamin D supplementation on cognitive function and blood A β -related biomarkers in older adults with Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90:1347–1352.
- Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The gut microbiota and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(1):1–15.
- Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Tan MS, Gu LZ, Zhang YD, Tan L. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 knockdown exacerbates aging-related neuroinflammation and cognitive deficiency in senescence-accelerated mouse prone 8 mice. *Neurobiol Aging*. 2014;35:1243–1251.
- Jiang Y, Li K, Li X, Xu L, Yang Z. Sodium butyrate ameliorates the impairment of synaptic plasticity by inhibiting the neuroinflammation in 5XFAD mice. *Chem Biol Interact*. 2021;341:109452.

K

- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*. 2014;83(1):11–26.
- Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008;132(5):818–831.
- Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*. 2000;19(6):1290–1300.
- Kesika P, Suganthi N, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C. Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2021;264:118627.

- Khailova L, Baird CH, Rush AA, Barnes C, Wischmeyer PE. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin Nutr*. 2017;36(6):1549–1557.
- Kincaid HJ, Nagpal R, Yadav H. Diet-microbiota-brain axis in Alzheimer's disease. *Ann Nutr Metab*. 2021;77(suppl 2):21–27.
- Korzhevskii DE, Kirik OV. Brain Microglia and microglial markers. *Neurosci Behav Physiol*. 2016;46:284–290.
- Kowalski K, Mulak A. Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J Neurogastroenterol Motil*. 2019;25(1):48–60.
- Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, Manalastas A, Hilfiker M, Pfister S, Schwerdel C, Riether C, Meyer U, Knuesel I. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation*. 2012;9:151.
- Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2019;332:16–30.
- Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. 2020;9(1):1–12.

L

- Lallès JP, Bosi P, Janczyk P, Koopmans SJ, Torrallardona D. Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: a review. *Animal*. 2009;3(12):1625-43.
- Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59–70.
- Latorre R, Sternini C, Giorgio RDe, Meerveld BG-V. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(5):620–630.
- Lauer AA, Mett J, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, Ritzmann F, Schrul B, Müller UC, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor

- protein intracellular domain: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2020;19(11):1–16.
- Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroentero*. 2008;14:401–407.
- Lauretti E, Iuliano L, Praticò D. Extra-virgin olive oil ameliorates cognition and neuropathology of the 3xTg mice: role of autophagy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(8):564–574.
- Lee S, Hall GF, Shea TB. Potentiation of tau aggregation by cdk5 and GSK3 β . *J Alzheimers Dis*. 2011;26(2):355–364.
- Lee S, Varvel NH, Konerth ME, Xu G, Cardona AE, Ransohoff RM, Lamb BT. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol*. 2010;177(5):2549–2562.
- Lee YK, Kwak DH, Oh KW, Nam SY, Lee BJ, Yun YW, Kim YB, Han SB, Hong JT. CCR5 deficiency induces astrocyte activation, A β deposit and impaired memory function. *Neurobiol Learn Mem*. 2009;92(3):356–363.
- Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nat Rev Neurol*. 2021;17(3):157–172.
- Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging*. 2009;30(5):759–768.
- Leung K, Thuret S. Gut microbiota: a modulator of brain plasticity and cognitive function in ageing. *Healthcare*. 2015;3(4):898–916.
- Lew LC, Hor YY, Yusoff NAA, Choi SB, Yusoff MSB, Roslan NS, Ahmad A, Mohammad JAM, Abdullah MFIL, Zakaria N, Wahid N, Sun Z, Kwok LY, Zhang H, Liong MT. Probiotic *Lactobacillus plantarum P8* alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr*. 2019;8(5):2053–2064.
- Li F, Gu M, Cai X, Song M, Li Z, Goulette T, Xiao H. Effects of dietary resveratrol on gut microbiota in mice with colitis. *FASEB J*. 2017;31(S1):972.13.

- Li L, Li L, Zhang J, Huang S, Liu W, Wang Z, Liang S, Tao J, Chen L. Disease stage-associated alterations in learning and memory through the electroacupuncture modulation of the cortical microglial M1/M2 polarization in mice with Alzheimer's disease. *Neural Plast.* 2020;8836173.
- Liang S, Wang T, Hu X, Luo J, Li W, Wu X, Duan Y, Jin F. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience.* 2015;310:561–577.
- Lin C, Zhao S, Zhu Y, Fan Z, Wang J, Zhang B, Chen Y. Microbiota-gut-brain axis and toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1309–1317.
- Liu F, Su Y, Li B, Zhou Y, Ryder J, Gonzalez-DeWhitt P, May PC, Ni B. Regulation of amyloid precursor protein (APP) phosphorylation and processing by p35/Cdk5 and p25/Cdk5. *FEBS Lett.* 2003;547(1–3):193–196.
- Liu SL, Wang C, Jiang T, Tan L, Xing A, Yu JT. The role of cdk5 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4328–4342.
- Liu X, Cao S, Zhang X. Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet. *J Agric Food Chem* 2015;63:7885–7895.
- Liu WH, Chuang HL, Huang YTe, Wu CC, Chou GT, Wang S, Tsai YC. Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice. *Behav Brain Res.* 2016;298:202–209.
- Liu Y, Choe J, Kim S, Kim B, Campbell JM, Polo J, Crenshaw JD, Pettigrew JE, Song M. Dietary spray-dried plasma improves intestinal morphology of mated female mice under stress condition. *J Anim Sci Technol.* 2018;60:10.
- Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):29–41.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;220:223–250.
- Lue L-F, Schmitz CT, Sorzano G, Sue LI, Beach TG, Walker DG. TREM2 protein expression changes correlate with Alzheimer's disease neurodegenerative pathologies in postmortem temporal cortices. *Brain Pathol.* 2015;25(4):469–480.

M

- Ma Q, Xing C, Long W, Wang HY, Liu Q, Wang RF. Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):1–14.
- 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*. 2012a;107:867–875.
- 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*. 2012b;142(2):264–270.
- Mancuso C, Santangelo R. Alzheimer’s disease and gut microbiota modifications: the long way between preclinical studies and clinical evidence. *Pharmacol Res*. 2018;129:329–336.
- Marizzoni M, Cattaneo A, Mirabelli P, Festari C, Lopizzo N, Nicolosi V, Mombelli E, Mazzelli M, Luongo D, Naviglio D, Coppola L, Salvatore M, Frisoni GB. Short-chain fatty acids and lipopolysaccharide as mediators between gut dysbiosis and amyloid pathology in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2020;78(2):683–697.
- Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer’s disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:1–18.
- Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473–486.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer’s disease. *Science*. 2010;330(6012):1774.
- McGrattan AM, McGuinness B, McKinley MC, Kee F, Passmore P, Woodside JV, McEvoy CT. Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer’s disease. *Curr Nutr Rep*. 2019;8(2):53–65.

- Menendez A, Willing BP, Montero M, Wlodarska M, So CC, Bhinder G, Vallance BA, Finlay BB. Bacterial stimulation of the TLR-MyD88 pathway modulates the homeostatic expression of ileal Paneth cell alpha-defensins. *J Innate Immun.* 2013;5:39–49.
- Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazaubiel JM. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr.* 2011;105(5):755–764.
- Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. A β -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008;18(2):240–252.
- Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, Teeling JL, Blaak EE, Fenech M, Vauzour D, McArdle HJ, Kremer BHA, Sterkman L, Vafeiadou K, Benedetti MM, Williams CM, Calder PC. Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation. *Br J Nutr.* 2015;114(7):999–1012.
- Miró L, Amat C, Rosell-Cardona C, Campbell JM, Polo J, Pérez-Bosque A, Moretó M. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma attenuates colon inflammation in a genetic mouse model of inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6760.
- Miró L, Moretó M, Amat C, Polo J, Pérez-Bosque A. Aging effects on gut microbiota in SAMP8 mice. *Proceedings.* 2020b;61(1):25.
- Miró L, Garcia-Just A, Amat C, Polo J, Moretó M, Pérez-Bosque A. Dietary animal plasma proteins improve the intestinal immune response in senescent mice. *Nutrients.* 2017;9(12):1346.
- Morais LH, Schreiber HL 4th, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(4):241–255.
- Moretó M, Miró L, Amat C, Polo J, Manichanh C, Pérez-Bosque A. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma has prebiotic effects on gut microbiota in mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):2926.
- Morley JE, Vijaya SA, Kumar B, Armbrecht HJ. The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2012;18:1123–1130.

Moussa-Pacha NM, Abdin SM, Omar HA, Alniss H, Al-Tel TH. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2020; 40(1):339–384.

N

Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, Kitzman DW, Kushugulova A, Marotta F, Yadav H. Gut microbiome and aging: physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging.* 2018;4(4):267–285.

Nakajima A, Nakatani A, Hasegawa S, Irie J, Ozawa K, Tsujimoto G, Suganami T, Itoh H, Kimura I. The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. *PLoS One.* 2017;12(7):e0179696.

Nalivaeva NN, Turner AJ. Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* 2019;176(18):3447–3463.

Nava-Mesa MO, Jiménez-Díaz L, Yajeya J, Navarro-Lopez JD. GABAergic neurotransmission and new strategies of neuromodulation to compensate synaptic dysfunction in early stages of Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:167.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 2012;108:1262–1268.

Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 2009;457(7232):981–989.

Nilson AN, English KC, Gerson JE, Barton Whittle T, Nicolas Crain C, Xue J, Sengupta U, Castillo-Carranza DL, Zhang W, Gupta P, Kaye R. Tau oligomers associate with inflammation in the brain and retina of tauopathy mice and in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(3):1083–1099.

O

O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science.* 2015;350(6265):1214–1215.

Oliveira Corrêa R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Aurélio M, Vinolo R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology.* 2016;5:73.

P

- Pablo J, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley WG, Buck A, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2009; 120(4):216–225.
- Paillard T, Rolland Y, de Barreto PS. Protective effects of physical exercise in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a narrative review. *J Clin Neurol.* 2015; 11(3):212–219.
- Pallàs M. Senescence-accelerated mice P8: a tool to study brain aging and Alzheimer's disease in a mouse model. *ISRN Cell Biology.* 2012;1–12.
- Park JC, Han SH, Mook-Jung I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: A brief review. *BMB Reports.* 2020;53(1):10–19.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell.* 2013;155(7):1596–1609.
- Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2005;2:1–10.
- Peace RM, Campbell J, Polo J, Crenshaw J, Russell L, Moeser A. Spray-dried porcine plasma influences intestinal barrier function, inflammation, and diarrhea in weaned pigs. *J Nutr.* 2011;141(7):1312–1317.
- Peineau S, Rabiant K, Pierrefiche O, Potier B. Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: Involvement in Alzheimer's disease. *Pharmacol Res.* 2018;130:385–401.
- Pérez-Bosque A, Polo J, Torrallardona D. Spray dried plasma as an alternative to antibiotics in piglet feeds, mode of action and biosafety. *Porcine Health Manag.* 2016a;2:16.
- 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.* 2016b;8(10):657.

- 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.* 2010;140(1):25–30.
- Pérez-Bosque A, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, Crenshaw J, Moreto M. Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *J Nutr.* 2008;138(3):533–537.
- Pérez-Bosque A, Amat C, Polo J, Campbell JM, Crenshaw J, Russell L, Moretó M. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned Rats. *J Nutr.* 2006;136(11):2838–2843.
- Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Castell M, Russell L, Campbell JM, Quigley JD, Polo J. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. aureus* superantigen B. *J Nutr.* 2004;134(10):2667–2672.
- Pistollato F, Iglesias RC, Ruiz R, Aparicio S, Crespo J, Lopez LD, Manna PP, Giampieri F, Battino M. Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer’s disease: A focus on human studies. *Pharmacol Res.* 2018;131:32–43.
- Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev.* 2016a;74(10):624–634.
- Pistollato F, Cano SS, Elio I, Vergara MM, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev.* 2016b;74(10):624–634.
- Powell N, Walker MM, Talley NJ. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(3):143–159.
- Puigoriol-Illamola D, Griñán-Ferré C, Vasilopoulou F, Leiva R, Vázquez S, Pallàs M. 11 β -HSD1 inhibition by RL-118 promotes autophagy and correlates with reduced oxidative stress and inflammation, enhancing cognitive performance in SAMP8 mouse model. *Mol Neurobiol.* 2018;55(12):8904–8915.

Q

Quigley III JD, Campbell JM, Polo J, Russell LE. Effects of spray-dried animal plasma on intake and apparent digestibility in dogs. *J Anim Sci*. 2004;82(6):1685–1692.

R

Ransohoff RM. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987–991.

Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, Siegart NM, Kasselman LJ. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2018;29(6):613–627.

Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C. Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*. 2012;64(12):931–935.

Rissman RA, Blas AL De, Armstrong DM. GABAA receptors in aging and Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2007;103(4):1285–1292.

Rodríguez C, Blanch F, Romano V, Saborido N, Rodenas J, Polo J. Porcine immunoglobulins survival in the intestinal tract of adult dogs and cats fed dry food kibbles containing spray-dried porcine plasma (SDPP) or porcine immunoglobulin concentrate (PIC). *Anim Feed Sci Technol*. 2007; 139, 201–211.

Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.

Rohn TT, Head E, Su JH, Anderson AJ, Bahr BA, Cotman CW, Cribbs DH. Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001;158(1):189–198.

Rosell-Cardona C, Griñan-Ferré C, Pérez-Bosque A, Polo J, Pallàs M, Amat C, Moretó M, Miró L. Reply to Nifli, A.-P. comment on "Rosell-Cardona et al. Dietary Spray-dried porcine plasma reduces neuropathological Alzheimer's disease hallmarks in SAMP8 mice. *Nutrients* 2021, 13, 2369". *Nutrients*. 2021;13(11):4065.

Ross DE, Marshall CW, Gulliver D, May HD, Norman RS. Defining genomic and predicted metabolic features of the *Acetobacterium* genus (2020). *mSystems*, 5(5):e00277–20.

Ruganzu JB, Zheng Q, Wu X, He Y, Peng X, Jin H, Zhou J, Ma R, Ji S, Ma Y, Qian Y, Wang Y, Yang W. TREM2 overexpression rescues cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice by reducing neuroinflammation via the JAK/STAT/SOCS signaling pathway. *Exp Neurol*. 2021;336:113506.

S

Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3240–3249.

Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci*. 2003;23:9796–9804.

Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, Versalovic J, Verdu EF, Dinan TG, Hecht G, Guarner F. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes*. 2013;4(1):17–27.

Savarin-Vuillat C, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics*. 2007;4(4):590–601.

Savignac HM, Corona G, Mills H, Chen L, Spencer JPE, Tzortzis G, Burnet PWJ. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. *Neurochem Int*. 2013;63(8):756–764.

Savignac HM, Couch Y, Stratford M, Bannerman DM, Tzortzis G, Anthony DC, Burnet PWJ. Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL-1 β levels in male mice. *Brain Behav Immun*. 2016;52:120–131.

Sawikr Y, Yarla NS, Peluso I, Kamal MA, Aliev G, Bishayee A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: the preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;108:33–57.

- Shah P, Nankova BB, Parab S, La Gamma EF. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res.* 2006;1107(1):13–23.
- Shen L, Liu L, Ji H-F. Alzheimer's disease histological and behavioral manifestations in transgenic mice correlate with specific gut microbiome state. *J Alzheimers Dis.* 2017;56(1):385–390.
- Shen XN, Niu LD, Wang YJ, Cao XP, Liu Q, Tan L, Zhang C, Yu JT. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(5):590–598.
- Sheng Y, Zhang L, Su SC, Tsai LH, Zhu JJ. Cdk5 is a new rapid synaptic homeostasis regulator capable of initiating the early Alzheimer-like pathology. *Cereb Cortex.* 2016;26:2937–2951.
- Simpson DSA, Oliver PL. Ros generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants.* 2020;9(8):1–27.
- Singhal G, Morgan J, Jawahar MC, Corrigan F, Jaehne EJ, Toben C, Breen J, Pederson SM, Manavis J, Hannan AJ, Baune BT. Effects of aging on the motor, cognitive and affective behaviors, neuroimmune responses and hippocampal gene expression. *Behav Brain Res.* 2020;383:112501.
- Skoog I, Gustafson D. Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2006;28(6):605–611.
- Sochocka M, Donskow-Łysoniewska K, Diniz BS, Kurpas D, Brzozowska E, Leszek J. The gut microbiome alterations and inflammation-driven pathogenesis of Alzheimer's disease—a critical review. *Mol Neurobiol.* 2019;56(3):1841–1851.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7–35.
- 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 Animal Sci.* 2015;93(1):298–305.
- Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.* 2019;167:231–255.

- Souder DC, Anderson RM. An expanding GSK3 network: implications for aging research. *GeroScience*. 2019;41(4):369–382.
- Srinivasan M, Lahiri DK. Significance of NF- κ B as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(4):471–487.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: An unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:369–389.
- Su JH, Zhao M, Anderson AJ, Srinivasan A, Cotman CW. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: Correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res*. 2001;898(2):350–357.
- Sugama S, Wirz SA, Barr AM, Conti B, Bartfai T, Shibasaki T. Interleukin-18 null mice show diminished microglial activation and reduced dopaminergic neuron loss following acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment. *Neuroscience*. 2004;128(2):451–458.
- Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010;68(10):930–941.
- Szablewski L. Human gut microbiota in health and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(2):549–560.

T

- Tai HC, Wang BY, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT. Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1):1–14.
- Tai LM, Ghura S, Koster KP, Liakaite V, Maienschein-Cline M, Kanabar P, Collins N, Ben-Aissa M, Lei AZ, Bahroos N, Green SJ, Hendrickson B, Van Eldik LJ, LaDu MJ. APOE-modulated A β -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *J Neurochem*. 2015;133(4):465–488.

- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr.* 1994;19(2):185–192.
- Tang Y, Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181–1194.
- Tanila H. The role of BDNF in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Dis.* 2017;97:114–118.
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, De Leon MJ. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(8):457–470.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem Journal.* 2017;474:1823–1836.
- Torrallardona D. Spray dried animal plasma as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2010;23(1):131–148.
- 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.* 2003;81(5):1220–1226.
- 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.* 2002;80:494–501.
- Toward R, Montandon S, Walton G, Gibson GR. Effect of prebiotics on the human gut microbiota of elderly persons. *Gut Microbes.* 2012;3(1):57–60.
- Tracy TE, Gan L. Acetylated tau in Alzheimer’s disease: an instigator of synaptic dysfunction underlying memory loss. *BioEssays.* 2017;39(4):1–9.
- Tsumagari R, Maruo K, Nakao T, Ueda S, Yamanoue M, Shirai Y. Motor dyscoordination and alteration of functional correlation between DGK γ and PKC γ in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Front Aging Neurosci.* 2021;13:573966.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009;1(6):1–12.

Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799–809.

U

Ullrich C, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci.* 2010;45(4):408–417.

V

Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev.* 2017;35:36–45.

Van der Wielen N, Moughan PJ, Mensink M. Amino acid absorption in the large intestine of humans and porcine models. *J Nutr.* 2017; 147(8):1493–1498.

Van Dijk A, Margry R, Van der Lee A, Hemke G, Beynen A. Growth performance and health status in weanling piglets fed spray-dried porcine plasma under typical Northern European conditions. *J Anim Physiol.* 2002;86:17–25.

Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol.* 2011;48(14):1592–1603.

Vinicius M, De Mello C, Vieira L, Cruz de Souza L, Gomes K, Carvalho M. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci.* 2019;26(33):1–11.

Vitale G, Salvioli S, Franceschi C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(4):228–240.

Vogels T, Murgoci AN, Hromádka T. Intersection of pathological tau and microglia at the synapse. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):109.

Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, Carlsson CM, Asthana S, Zetterberg H, Blennow K, Bendlin BB, Rey FE. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):13537.

Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr. The American Journal of Clinical Nutrition.* 2008;88(5):1438–1446.

W

Walrath T, Dyamenahalli KU, Hulsebus HJ, McCullough RL, Idrovo JP, Boe DM, McMahan RH, Kovacs EJ. Age-related changes in intestinal immunity and the microbiome. *J Leukoc Biol.* 2021;109(6):1045–1061.

Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schüffer W, Faßbender K. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):947–956.

Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol.* 2005;166: 409–419.

Wang R, Reddy PH. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1041–1048.

Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(16):2959–2977.

White CS, Lawrence CB, Brough D, Rivers-Auty J. Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2017;27(2):223–234.

Williams S, Chen L, Savignac HM, Tzortzis G, Anthony DC, Burnet PW. Neonatal prebiotic (BGOS) supplementation increases the levels of synaptophysin, GluN2A-subunits and BDNF proteins in the adult rat hippocampus. *Synapse.* 2016;70(3):121–124.

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman

FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105–108.

Wu TR, Lin CS, Chang CJ, Lin TL, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Young JD, Lai HC. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutiella sinensis*. *Gut*. 2019;68(2):248–262.

Y

Yang X, Yu D, Xue L, Li H, Du J. Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10(3):475–487.

Yang Y, Lu J, Zuo Y. Changes of synaptic structures associated with learning, memory and diseases. *Brain Sci Adv*. 2018;4(2):99–117.

Yuan XZ, Sun S, Tan C C, Yu JT, Tan L. The role of ADAM10 in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(2):303–322.

Z

Zhan X, Stamova B, Jin L-W, DeCarli C, Phinney B, Sharp FR. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*. 2016;87(22):2324–2332.

Zhang M, Zhao D, Zhou G, Li C. Dietary pattern, gut microbiota, and Alzheimer’s disease. *J Agric Food Chem*. 2020;68(46):12800–12809.

Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer’s disease. *Mol Brain*. 2011;4(1):3.

Zhao B, Ren B, Guo R, Zhang W, Ma S, Yao Y, Yuan T, Liu Z, Liu X. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF-κB transcriptional pathway. *Food Chem Toxicol*. 2017;109:505–516.

Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.

- Zhao Y, Dua P, Lukiw W. Microbial sources of amyloid and relevance to amyloidogenesis and Alzheimer's disease (AD). *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2015;5(1):177.
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020;30:492–506.
- Zheng, H, Cheng B, Li Y, Li X, Chen X, Zhang YW. TREM2 in Alzheimer's disease: Microglial survival and energy metabolism. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:395.
- Zhou Y, Wang Y, Quan M, Zhao H, Jia J. Gut microbiota changes and their correlation with cognitive and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;81(2):583–595.
- Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(12):723–738.
- Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. *Brain*. 2013;136:2677–2696.



ANNEX



L'article 1 presentat a la present tesi va rebre un comentari de la Dra. Artemissia-Phoebe Nifli publicat a *Nutrients* (doi: 10.3390/nu13114053). A continuació, s'adjunta la resposta que ha donat lloc a una publicació.

REPLY TO NIFLI, A.-P. COMMENT ON "ROSELL-CARDONA ET AL. DIETARY SPRAY-DRIED PORCINE PLASMA REDUCES NEUROPATHOLOGICAL ALZHEIMER'S DISEASE HALLMARKS IN SAMP8 MICE. NUTRIENTS 2021, 13, 2369"



Rosell-Cardona C, Griñán-Ferré C, Pérez-Bosque A, Polo J, Pallàs M, Amat C, Moretó M, Miró L.

Publicat, doi: 10.3390/nu13114065

Nutrients. 2021;13(11):4065.

Reply

Reply to Nifli, A.-P. Comment on “Rosell-Cardona et al. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer’s Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* 2021, 13, 2369”

Cristina Rosell-Cardona ¹, Christian Griñan-Ferré ², Anna Pérez-Bosque ¹, Javier Polo ³, Mercè Pallàs ², Concepció Amat ¹, Miquel Moretó ¹ and Lluïsa Miró ^{1,3,*}

¹ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute for Nutrition and Food Safety, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; cristina.rosell@ub.edu (C.R.-C.); anna.perez@ub.edu (A.P.-B.); camat@ub.edu (C.A.); mmoreto@ub.edu (M.M.)

² Department of Pharmacology, Toxicology, and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Neurosciences, CIBERNED, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; christian.grinan@ub.edu (C.G.-F.); pallas@ub.edu (M.P.)

³ APC Europe S.L.U., 08403 Granollers, Spain; javier.polo@apc-europe.com

* Correspondence: lluisa.miro@ub.edu; Tel.: +34-93-4024505



Citation: Rosell-Cardona, C.; Griñan-Ferré, C.; Pérez-Bosque, A.; Polo, J.; Pallàs, M.; Amat, C.; Moretó, M.; Miró, L. Reply to Nifli, A.-P. Comment on “Rosell-Cardona et al. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer’s Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* 2021, 13, 2369”. *Nutrients* 2021, 13, 4065. <https://doi.org/10.3390/nu13114065>

Academic Editor: Panteleimon Giannakopoulos

Received: 30 September 2021
Accepted: 4 November 2021
Published: 13 November 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Thank you for your comments on our recent work of the effects of supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) on neuropathological markers of Alzheimer’s disease (AD) [1]. The author widely describes the use of blood and blood containing food in different countries and its use in different periods of age, but we would like to point out that SDP is a plasma product, so it does not contain the blood cells fraction. Therefore, despite the fact that, as the author indicates, the consumption of raw blood and the SDP supplement improve the barrier function in the intestine [2,3] as well as food digestibility and growth [4], it should be noted that there are large differences between the two products, both in terms of the compounds they contain and in terms of safety.

At the component level, SDP is a complex mixture of many functional components such as albumin, immunoglobulins, transferrin, fibrinogen, growth factors and many other peptides, which can develop a biological activity, not only in the intestine but also at the systemic level, regardless of its nutritional value [5]. Its mechanism of action may involve the interaction of several of its functional components with cells in the body, as well as a prebiotic effect on the intestinal microbiota with anti-inflammatory effects, as observed by Moretó et al. [6].

Regarding the concern for security, it is necessary to mention a couple of aspects to consider. On the one hand, the blood used to produce SDP or serum bovine immunoglobulins (SBI), either from porcine or bovine origin, is obtained from healthy animals declared fit for human consumption after veterinary inspection by the competent authorities. This prevents the collection of blood from sick animals or animals coming from areas of OIE (World Organization for Animal Health) notifiable disease [7].

On the other hand, the manufacturing process of SDP and SBI has been extensively investigated to inactivate microorganisms of concern for either human or animal consumption [8]. In case of African Swine Fever virus (ASFV), recent publications [9,10] demonstrated that the different steps involved in the manufacturing process of SDP or SBI (spray-drying and storage at 20 °C for 14 days) can be considered robust inactivation steps according to World Human Organization (2004) guidelines for human plasma transfusion. Furthermore, with regard to the risk of bovine spongiform encephalopathy (BSE) of prions in the collected blood, in the case of blood from pigs there is no risk of prion diseases because encephalopathies has not been established in natural conditions in commercial

pigs [11] and, in the case of bovine origin, blood is not considered specific risk material according to the OIE and, in fact, blood and blood products, such as SBI or SDP, are included in the list of safe commodities like milk [12].

Although more studies are needed to understand its mechanism of action, SDP shows neuroprotective effects in the elderly population, increasing brain resilience and reducing neuroinflammation.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, C.R.-C., A.P.-B., J.P., L.M., C.G.-F., M.P., C.A. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by APC-Europe SLU (Granollers, Spain) by research contracts with the Bosch i Gimpera Foundation of the University of Barcelona. The research groups were also supported by grants 2017SGR945 and 2017SGR106 for Consolidated Research Groups, Generalitat de Catalunya, Spain. We also thank Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER funds (PID2019-106285RB) for financial support. CR-C was supported by a grant from the Bosch i Gimpera Foundation (Universitat de Barcelona).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universitat de Barcelona and the Catalan government (ref. 484/16 and 9272, respectively).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: C.R.-C., C.G.-F., A.P.-B., M.P., C.A., M.M. and have no conflicts of interests. J.P. and L.M. are employed by APC-Europe SLU. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Rosell-Cardona, C.; Griñan-Ferré, C.; Pérez-Bosque, A.; Polo, J.; Pallàs, M.; Amat, C.; Moretó, M.; Miró, L. Dietary spray-dried porcine plasma reduces neuropathological Alzheimer's disease hallmarks in SAMP8 mice. *Nutrients* **2021**, *13*, 2369. [CrossRef] [PubMed]
2. Nifli, A.-P. Comment on Rosell-Cardona et al. Dietary Spray-Dried Porcine Plasma Reduces Neuropathological Alzheimer's Disease Hallmarks in SAMP8 Mice. *Nutrients* **2021**, *13*, 4053. [CrossRef]
3. Miró, L.; Amat, C.; Rosell-Cardona, C.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Pérez-Bosque, A.; Moretó, M. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma attenuates colon inflammation in a genetic mouse model of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6760. [CrossRef] [PubMed]
4. Bosi, P.; Han, I.K.; Jung, H.J.; Heo, K.N.; Perini, S.; Castellazzi, A.M.; Casini, L.; Creston, D.; Gremokolini, C. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early-weaned pigs challenged with *E. coli* K88. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **2001**, *14*, 1138–1143. [CrossRef]
5. Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; González-Esquerra, R.; Polo, J. Impact of spray-dried plasma on intestinal health and broiler performance. *Microorganisms* **2019**, *7*, 219. [CrossRef]
6. Moretó, M.; Miró, L.; Amat, C.; Polo, J.; Manichanh, C.; Pérez-Bosque, A. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma has prebiotic effects on gut microbiota in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2926. [CrossRef]
7. OIE. 2021. Available online: <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/> (accessed on 9 September 2021).
8. Blázquez, E.; Rodríguez, C.; Ródenas, J.; Rosell, R.; Segalés, J.; Pujols, J.; Polo, J. Biosafety steps in the manufacturing process of spray-dried plasma: A review with emphasis on the use of ultraviolet irradiation as a redundant biosafety procedure. *Porcine Health Manag.* **2020**, *6*, 16. [CrossRef] [PubMed]
9. Blázquez, E.; Rodríguez, C.; Ródenas, J.; Rosell, R.; Segalés, J.; Pujols, J.; Polo, J. Effect of spray-drying and ultraviolet C radiation as biosafety steps for CSFV and ASFV inactivation in porcine plasma. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249935. [CrossRef] [PubMed]
10. Fischer, M.; Pikalo, J.; Beer, M.; Blome, S. Stability of African swine fever virus on spiked spray-dried porcine plasma. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 2806–2811. [CrossRef] [PubMed]
11. Hedman, C.; Bolea, R.; Marin, B.; Cobriere, F.; Filali, H.; Vazquez, F.; Pitarch, J.L.; Vargas, A.; Acin, C.; Moreno, B.; et al. Transmission of sheep-bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 14. [CrossRef]
12. OIE. 2021. Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_bse.pdf (accessed on 9 September 2021).

***DIETARY SUPPLEMENTATION WITH SPRAY-DRIED PORCINE
PLASMA ATTENUATES COLON INFLAMMATION IN A GENETIC
MOUSE MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE***

Miró L, Amat C, Rosell-Cardona C, Campbell JM, Polo J, Pérez-Bosque A,
Moretó M.

Publicat, doi: [10.3390/ijms21186760](https://doi.org/10.3390/ijms21186760).

Int J Mol Sci. 2020;21(18):6760.

Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma attenuates colon inflammation in a genetic mouse model of inflammatory bowel disease

Int J Mol Sci. 2020;21(18):6760. doi: 10.3390/ijms21186760.

Resum

Introducció. La malaltia inflamatòria intestinal (IBD, *inflammatory bowel disease*) és un desordre crònic del tracte gastrointestinal que es classifica en malaltia de Crohn i colitis ulcerosa. La causa de la malaltia es desconeix, tot i que factors ambientals, la microbiota intestinal i factors genètics tenen un paper important. La manca de funció de MDR1 s'associa a aquesta patologia humana. A més, hi ha una alteració de les respostes immunitàries innata i adaptativa que indueixen una secreció de citocines pro-inflamatòries i un increment de la permeabilitat de la barrera intestinal. Actualment, no hi ha una cura eficaç a llarg termini per a la IBD, així que intervencions nutricionals són una bona estratègia per tal de atenuar la simptomatologia. El plasma porcí assecat per atomització (SDP, *spray-dried porcine plasma*) modula la resposta immunitària intestinal en diferents models d'inflamació, tant en una resposta aguda induïda per l'administració de l'enterotoxina B d'*Staphylococcus aureus* (SEB, *S. aureus enterotoxin B*), com en una resposta crònica, on redueix la inflamació intestinal associada a l'edat.

Objectiu. Determinar si l'SDP pot atenuar la colitis en un model genètic d'IBD a ratolí.

Material i mètodes. Els ratolins salvatges (WT, *wild-type*) i els ratolins KO per *Mdr1a* (KO) van rebre un pinso control o un pinso suplementat amb SDP al 8% des del dia 21 (deslletament) fins al dia 56 d'edat. Es va determinar l'índex histopatològic a la mucosa de còlon; es va analitzar la funció de la barrera epitelial amb la determinació de la permeabilitat epitelial utilitzant dextrà fluorescent; i es va estudiar el sistema immunitari intestinal a través de citometria, Western Blot i PCR a temps real.

Resultats. Els ratolins KO van presentar una permeabilitat epitelial incrementada així com un augment de l'expressió de *Muc1* i *Muc4* i una menor abundància d'E-cadherina i *Muc2* (tots, $p < 0,001$). La suplementació amb l'SDP va prevenir aquests efectes (tots, $p < 0,05$). A més, va disminuir la inflamació del còlon observada en els ratolins KO, ja que va reduir la infiltració i activació de neutròfils i monòcits i el percentatge de limfòcits T col·laboradors activats a la mucosa del còlon (tots, $p < 0,05$). L'SDP també va atenuar l'expressió de citocines pro-inflamatòries (*iNos*, *Ifn- γ* i *Tnf- α*) i va augmentar la concentració de la citocina anti-inflamatòria IL-10 a la mucosa del còlon dels ratolins KO (tots, $p < 0,05$).

Conclusions. La suplementació dietètica amb l'SDP redueix la inflamació de la mucosa del còlon i millora la funció de barrera en un model murí d'IBD.



Article

Dietary Supplementation with Spray-Dried Porcine Plasma Attenuates Colon Inflammation in a Genetic Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease

Lluïsa Miró ^{1,2} , Concepció Amat ¹, Cristina Rosell-Cardona ¹, Joy M. Campbell ³,
Javier Polo ² , Anna Pérez-Bosque ^{1,*} and Miquel Moretó ¹

¹ Dept. of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, and Nutrition and Food Safety Research Institute, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; lluisa.miro@ub.edu (L.M.); camat@ub.edu (C.A.); cristina.rosell@ub.edu (C.R.-C.); mmoreto@ub.edu (M.M.)

² APC-Europe S.L.U., 08403 Granollers, Spain; javier.polo@apc-europe.com

³ APC LLC, 2425 SE Oak Tree Court, Ankeny, IA 50021, USA; Joy.Campbell@apcproteins.com

* Correspondence: anna.perez@ub.edu; Tel.: +34-934024505

Received: 28 June 2020; Accepted: 11 September 2020; Published: 15 September 2020



Abstract: Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma (SDP) can modulate the immune response of gut-associated lymphoid tissue. SDP supplementation reduces acute mucosal inflammation, as well as chronic inflammation associated with aging. The aim of this study was to analyze if SDP supplementation could ameliorate colitis in a genetic mouse model of inflammatory bowel disease (IBD). Wild-type mice and *Mdr1a* knockout (KO) mice were administered a control diet or an SDP-supplemented diet from day 21 (weaning) until day 56. The histopathological index, epithelial barrier, and intestinal immune system were analyzed in the colonic mucosa. KO mice had higher epithelial permeability, increased *Muc1* and *Muc4* expression, and lower abundance of E-cadherin and *Muc2* (all $p < 0.001$). SDP prevented these effects (all $p < 0.05$) and decreased the colonic inflammation observed in KO mice, reducing neutrophil and monocyte infiltration and activation and the percentage of activated T helper lymphocytes in the colonic mucosa (all $p < 0.05$). SDP also diminished proinflammatory cytokine expression and increased the anti-inflammatory IL-10 concentration in the colonic mucosa (all $p < 0.05$). In conclusion, dietary supplementation with SDP enhances colon barrier function and reduces mucosal inflammation in a mouse model of IBD.

Keywords: spray-dried plasma; anti-inflammatory; colitis; barrier function

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that is classically divided into Crohn disease and ulcerative colitis. In IBD, which is characterized by alternative recurrence and alleviation periods, patients suffer from abdominal pain, diarrhea, bloody stools, and weight loss [1]. It is a global disease, with increasing incidence and prevalence around the world [2].

The etiopathogenesis of IBD has not yet been elucidated, but environmental, gut microbial, and genetic factors all play important roles [3]. The intestinal inflammatory response in patients with IBD also involves deregulation of gut-associated lymphoid tissue (GALT) [4]. This tissue is divided into inductive sites, which include the mesenteric lymph nodes, Peyer's patches (in the small intestine), colonic patches, and isolated lymphoid follicles, and into effector sites, which include intraepithelial lymphocytes and lymphocytes from the *lamina propria* [5]. Dysfunction of the innate and adaptive immune responses triggers the release of numerous proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ), which results in epithelial cell damage and

apoptosis and alteration of the epithelial barrier [4]. The epithelial barrier comprises epithelial cells (enterocytes), tight junction proteins, and the mucosal layer [6] and constantly interacts with the underlying immune cells of the GALT [7]. In IBD patients, the integrity of the epithelial barrier is compromised, as shown by increased paracellular permeability and lower levels of tight junction proteins [8].

Although some drugs are able to modify the course of the disease and maintain remission, they are not effective in all patients and their long-term use may have adverse effects [9]. Therefore, alternative treatment strategies for IBD are necessary. Nutritional interventions may be a good candidate. Using the *Mdr1a* knockout (KO) mouse model of colitis [10,11], we previously showed that serum-derived bovine immunoglobulins (SBI) reduce colon permeability and the expression of oxidative markers and proinflammatory cytokines in the colonic mucosa, as well as leukocyte infiltration in the lamina propria and mesenteric lymph nodes [12,13]. Moreover, SBIs improve mucositis symptoms, tissue damage scores, and neutrophil and lymphocyte percentages in a rat model of mucositis [14].

Another dietary supplement that is widely used in farm animals to enhance growth and reduce both morbidity and mortality is spray-dried porcine plasma (SDP) [15,16]. This supplement can modulate the intestinal immune response to inflammatory agents. For example, it reduces T lymphocyte activation, preventing the release of proinflammatory cytokines, and improves the mucosal barrier function after staphylococcal enterotoxin B challenge in rodents [17–19]. In senescent mice, SDP supplementation reduces nonspecific basal immune activation associated with age (inflammaging) by promoting mucosal regulatory T helper (Th) lymphocytes (Treg lymphocytes) and interleukin (IL)-10 production [18]. Moreover, SDP attenuates cognitive decline and reduces brain capillary permeability, oxidative stress, and proinflammatory cytokine expression in the brain of senescent mice [20].

Given the ability of SBI effects reducing the severity of colitis in the *Mdr1a* KO mouse model [12,13], we wanted to study if SDP, a compound with well-documented antioxidant and anti-inflammatory activities, can also modulate the immune response and ameliorate colitis in this animal model.

2. Results

2.1. Morphological Effects of SDP in *Mdr1a* KO Mice

Colon of *Mdr1a* knockout (KO) mice were shorter and thicker than those of wild-type (WT) animals ($p < 0.001$; Figure 1A–C). The differences in colon diameter and wall thickness are clearly evident in the colon sections shown in Figure 1D. The SDP supplementation reduced colon weight and the ratio between colon weight and length (both, $p < 0.001$) while had no effects on colon length.

Histopathological and disease activity indices were increased in colitic mice (both $p < 0.001$; Figure 1E,F, respectively) and SDP supplementation had no significant effects. With the exception of ulceration, all specific parameters analyzed in the morphological study—mucus depletion, cryptitis, and lamina propria and transmural inflammation—were augmented in KO mice (all $p < 0.05$), and SDP did not modify these effects.

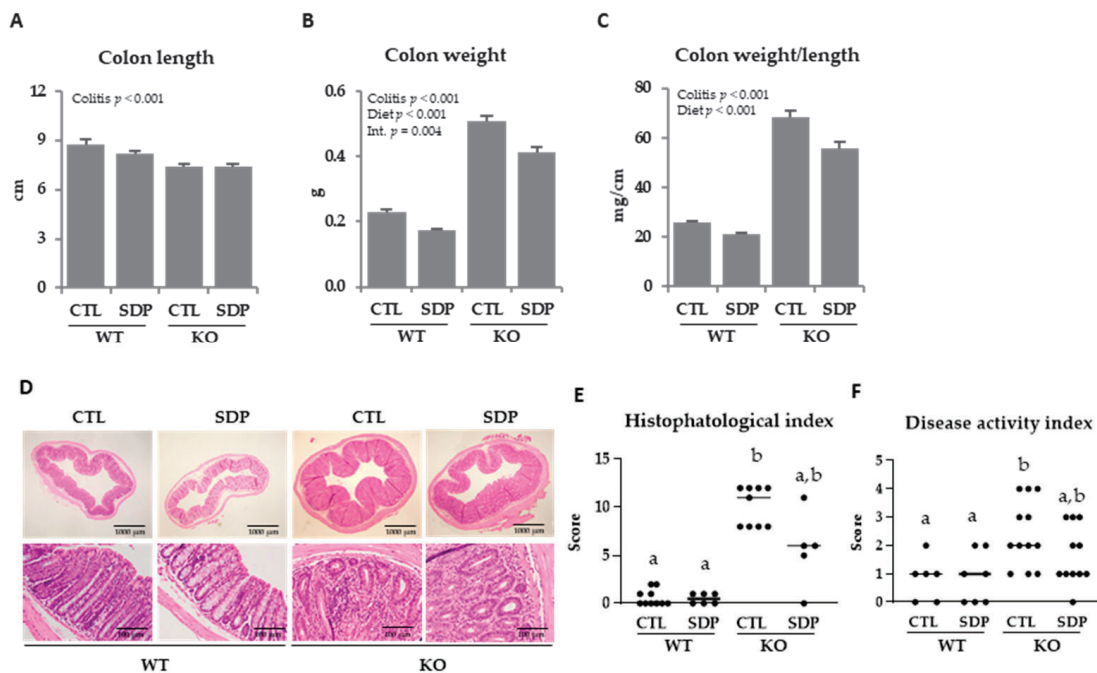


Figure 1. Effects of spray-dried porcine plasma (SDP) supplementation on colon morphology in *Mdr1a* knockout (KO) mice. (A) Colon length. (B) Colon weight. (C) Ratio between colon weight and colon length. (D) Representative images of hematoxylin and eosin staining from a histopathological study of the colonic mucosa. Top images were taken at low magnification ($\times 2$), whereas bottom images were taken at high magnification ($\times 20$). (E) Histopathological index. (F) Disease activity index. In panels A to C, results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ – 9 mice/group). In panels D and E, results are expressed as median ($n = 5$ – 12 mice/group). Means without a common letter differ, $p < 0.05$. CTL, control; Int, indicates the interaction between colitis and diet.

2.2. Effects of SDP on Colon Permeability in *Mdr1a* Knockout Mice

We next analyzed crypt permeability using 4KDa fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran accumulation (Figure 2A). The KO mice showed increased crypt permeability in the colon ($p = 0.001$; Figure 2B), with SDP supplementation preventing this increase ($p = 0.001$). Moreover, KO mice exhibited lower levels of β -catenin ($p = 0.003$, Figure 2C,D) and E-cadherin ($p = 0.001$, Figure 2C,E). E-cadherin abundance has been modified by SDP supplementation ($p = 0.010$), preventing the reduction observed in KO mice ($p = 0.046$).

KO mice showed increased expression of the transmembrane mucin 1 (*Muc1*) and mucin 4 (*Muc4*; both $p < 0.001$, Table 1). SDP supplementation reduced *Muc1* expression in KO mice ($p = 0.016$) and diminished *Muc4* expression in both WT and KO mice ($p = 0.005$). KO mice showed a substantial decrease in the expression of the secretory mucin 2 (*Muc2*; $p < 0.001$) and SDP supplementation attenuated this reduction ($p = 0.023$). Mucin 6 (*Muc6*) expression was similar in the two mouse groups and was also not altered by SDP supplementation. The KO animals had a lower expression of trefoil factor 3 (*Tff3*) than WT mice ($p = 0.036$) and SDP supplementation attenuated this effect, resulting in similar expression to that seen in WT mice (Interaction $p = 0.053$). Goblet cell number was examined using periodic acid-Schiff staining (Figure 3A). KO mice also had a lower number of goblet cells ($p < 0.001$, Figure 3B).

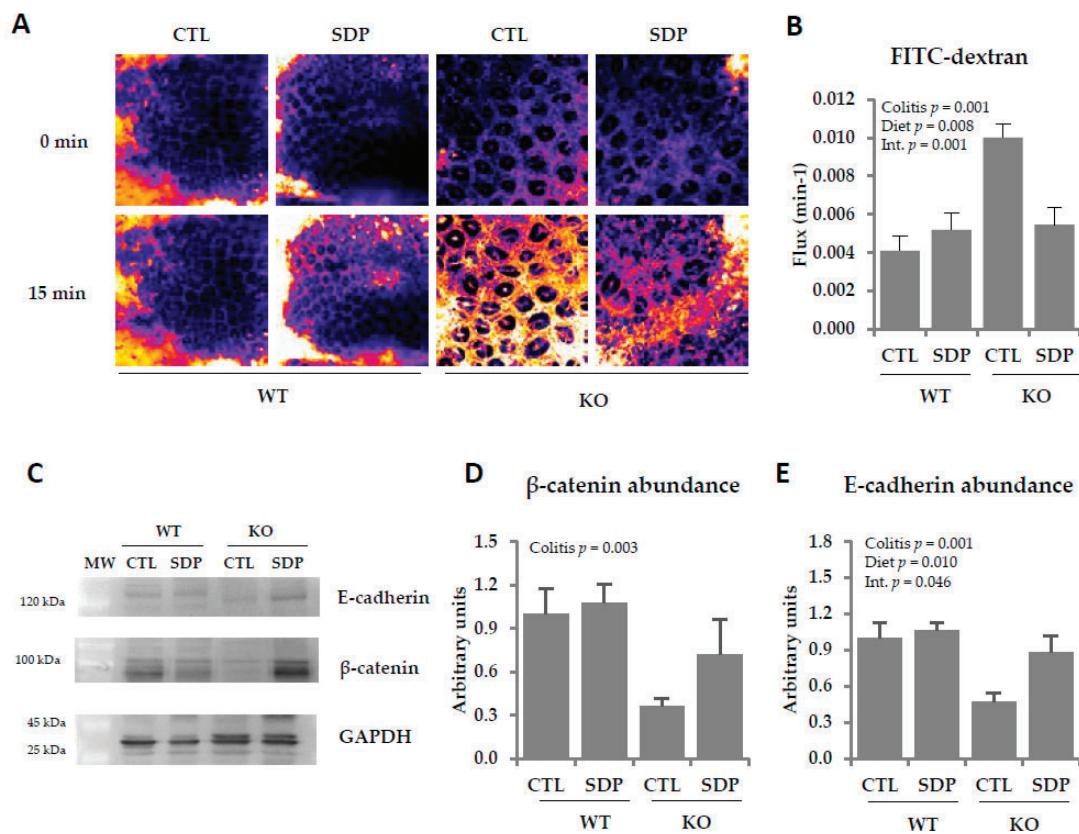


Figure 2. Effects of SDP supplementation on crypt permeability in the colonic mucosa of *Mdr1a* KO mice. (A) Representative images of FITC-dextran accumulation in the pericryptal sheath of the colonic mucosa after 15 min. All images were taken at the same magnification ($\times 63$). (B) Quantification of FITC-dextran accumulation in the pericryptal sheath of the colonic mucosa. (C) Representative Western blots of β -catenin (92 kDa), E-cadherin (132 kDa), and GAPDH (36 kDa). (D) β -catenin abundance in the colonic mucosa. (E) E-cadherin abundance in the colonic mucosa. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ – 7 mice/group). CTL, control; Int., indicates the interaction between colitis and diet; MW, molecular weight; SDP, spray-dried porcine plasma.

Table 1. Effects of SDP Supplementation on The Expression of *Mucin 1* (*Muc1*), *Mucin 2* (*Muc2*), *Mucin 4* (*Muc4*), *Mucin 6* (*Muc6*), and trefoil factor 3 (*Tff3*) in The Colonic Mucosa of *Mdr1a* knockout (KO) Mice.

	WT		KO		<i>p</i> Value		
	CTL	SDP	CTL	SDP	Colitis	Diet	Int.
<i>Muc1</i>	1.00 \pm 0.04	1.98 \pm 0.03	5.90 \pm 0.50	5.00 \pm 0.36	<0.001	ns	0.016
<i>Muc2</i>	1.00 \pm 0.09	0.84 \pm 0.04	0.21 \pm 0.03	0.35 \pm 0.03	<0.001	ns	0.023
<i>Muc4</i>	1.00 \pm 0.17	0.59 \pm 0.02	2.86 \pm 0.31	1.85 \pm 0.10	<0.001	0.005	ns
<i>Muc6</i>	1.00 \pm 0.20	0.96 \pm 0.36	1.17 \pm 0.17	0.90 \pm 0.15	ns	ns	ns
<i>Tff3</i>	1.00 \pm 0.16	0.97 \pm 0.09	0.42 \pm 0.08	0.92 \pm 0.13	0.036	ns	0.053

Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ – 5 mice/group). CTL, control; Int., interaction between colitis and dietary factors; *Muc1*, mucin 1; *Muc2*, mucin 2; *Muc4*, mucin 4; *Muc6*, mucin 6; ns, nonsignificant; SDP, spray-dried porcine plasma; *Tff3*, trefoil factor 3.

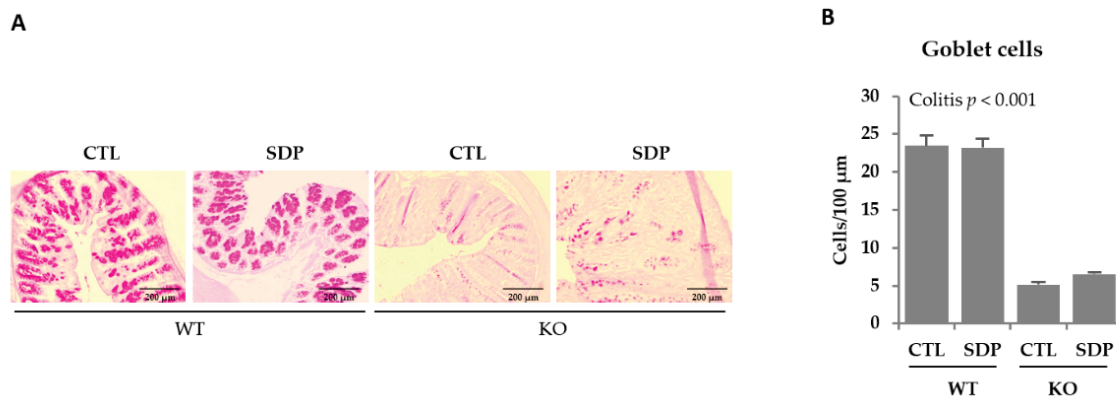


Figure 3. Effects of SDP supplementation on the levels of goblet cells in the colonic mucosa of *Mdr1a* KO mice. (A) Representative images periodic acid-Schiff staining of goblet cells in colon tissue. Images were taken at $\times 10$ magnification. (B) Quantification of goblet cells in the colonic mucosa. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-7$ mice/group).

2.3. Effects of SDP on the Immune System in the Lamina Propria and Intraepithelial Lymphocytes in *Mdr1a* KO Mice

KO mice showed considerable immune cell recruitment in the lamina propria ($p < 0.001$, Table 2). The SDP supplementation reduced the immune cell infiltration ($p = 0.003$), but this reduction was higher in KO mice ($p = 0.011$). The levels of neutrophils and monocytes, as well as the percentages of activated neutrophils and monocytes, were higher in KO than WT mice (all $p < 0.001$) and SDP reduced these effects ($p = 0.034$; $p = 0.044$, $p = 0.024$, and $p = 0.002$, respectively). KO mice had a lower percentage of dendritic cells ($p < 0.001$) but the percentage of activated cells tended to be higher ($p = 0.063$). On the other hand, dietary supplementation with SDP enhanced the abundance of this subset of cells, as well as their activation in the lamina propria, in both mouse groups (both $p < 0.001$). In KO mice, there was an increase in the percentage of activated Th lymphocytes ($p < 0.001$) and SDP supplementation reduced this percentage in both animal groups ($p = 0.009$). On the other hand, although the percentage of Treg lymphocytes was augmented in KO mice ($p < 0.001$), SDP increased this percentage more in KO mice than in WT mice ($p = 0.022$), resulting in a lower ratio between activated Th and Treg lymphocytes ($p < 0.001$).

Table 2. Effects of SDP Supplementation on The Immune Populations of The Lamina Propria of The Colonic Mucosa of *Mdr1a* KO Mice.

	WT		KO		<i>p</i> Value		
	CTL	SDP	CTL	SDP	Colitis	Diet	Int.
Cell count ($\times 10^6$)	1.55 \pm 0.17	1.14 \pm 0.19	16.0 \pm 1.07	11.1 \pm 0.97	<0.001	0.003	0.011
Monocytes	8.10 \pm 0.58	7.74 \pm 0.79	13.0 \pm 0.49	10.5 \pm 0.83	<0.001	0.044	ns
Act. monocytes	29.8 \pm 2.72	27.1 \pm 1.74	60.3 \pm 1.70	49.3 \pm 1.89	<0.001	0.002	ns
Neutrophils	19.0 \pm 2.19	17.5 \pm 2.52	38.9 \pm 1.39	31.4 \pm 2.08	<0.001	0.034	ns
Act. neutrophils	31.1 \pm 2.78	25.7 \pm 2.30	57.8 \pm 2.21	51.5 \pm 2.53	<0.001	0.024	ns
Dendritic cells	19.7 \pm 1.50	23.7 \pm 1.38	9.49 \pm 0.41	12.2 \pm 0.60	<0.001	<0.001	ns
Act. dendritic cells	4.51 \pm 0.79	9.29 \pm 1.29	6.36 \pm 0.46	10.7 \pm 1.34	0.063	<0.001	ns
Act. Th lymphocytes	6.80 \pm 0.69	5.32 \pm 0.58	17.0 \pm 0.85	13.8 \pm 0.60	<0.001	0.009	ns
Treg lymphocytes	3.26 \pm 0.45	3.34 \pm 0.53	5.77 \pm 0.52	8.81 \pm 0.55	<0.001	0.017	0.022
Act. Th/Treg lym. ratio	2.51 \pm 0.22	1.66 \pm 0.19	3.09 \pm 0.27	1.60 \pm 0.09	ns	<0.001	0.040

Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-14$ mice/group). Cell values are expressed as absolute number for cell count while monocytes, neutrophils, and dendritic cells are expressed as the percentage of nonlymphocytic leukocytes. Activated and regulatory cells are expressed as the percentage of the corresponding total subset. Act., activated; CTL, control; Int., interaction between colitis and dietary factors; ns, nonsignificant; SDP, spray-dried porcine plasma; Th, T helper; Treg, regulatory T helper.

KO mice had more infiltrated immune cells in the intraepithelial compartment than WT mice, and the levels of monocytes and neutrophils were increased (all $p < 0.001$, Table 3). Dietary supplementation reduced the amount of infiltrated immune cells and the percentage of neutrophils (both $p < 0.001$). In addition, KO mice had higher percentages of activated monocytes and activated neutrophils, and both subsets were reduced by SDP supplementation ($p = 0.007$ and $p = 0.030$, respectively). Dendritic cells and their activation were reduced in KO mice ($p = 0.025$ and $p = 0.003$, respectively), and SDP supplementation did not modify their percentage. Regarding activated Th and Treg lymphocytes, the former were increased in KO mice ($p < 0.001$) and were unchanged by SDP supplementation. In contrast, the abundance of the latter was not different between WT and KO mice but was increased by SDP supplementation ($p < 0.001$). Consequently, KO animals showed a higher ratio of activated Th to Treg lymphocytes than animals supplemented with SDP (both $p < 0.001$).

Table 3. Effects of SDP Supplementation on The Immune Population of The Intraepithelial Compartment In The Colonic Mucosa of *Mdr1a* KO mice.

	WT		KO		<i>p</i> Value		
	CTL	SDP	CTL	SDP	Colitis	Diet	Int.
Cell count ($\times 10^6$)	0.26 \pm 0.06	0.19 \pm 0.05	1.76 \pm 0.22	0.81 \pm 0.10	<0.001	<0.001	0.003
Monocytes	9.39 \pm 0.60	8.21 \pm 1.55	12.8 \pm 0.78	11.1 \pm 0.91	<0.001	ns	ns
Act. monocytes	5.90 \pm 1.17	3.88 \pm 0.49	19.6 \pm 1.71	13.1 \pm 0.58	<0.001	0.007	ns
Neutrophils	8.09 \pm 0.75	5.61 \pm 0.54	15.5 \pm 0.94	9.82 \pm 0.54	<0.001	<0.001	ns
Act. neutrophils	4.43 \pm 1.13	6.31 \pm 0.99	21.7 \pm 1.83	12.7 \pm 0.83	<0.001	0.030	0.002
Dendritic cells	20.1 \pm 2.55	19.1 \pm 2.22	15.0 \pm 1.42	16.4 \pm 0.76	0.025	ns	ns
Act. dendritic cells	20.9 \pm 2.78	20.0 \pm 2.02	13.8 \pm 0.68	17.7 \pm 0.63	0.003	ns	ns
Act. Th lymphocytes	6.08 \pm 0.18	6.37 \pm 0.76	16.1 \pm 0.94	13.0 \pm 0.74	<0.001	ns	ns
Treg lymphocytes	3.10 \pm 0.43	5.33 \pm 0.26	3.39 \pm 0.21	5.27 \pm 0.47	ns	<0.001	ns
Act. Th/Treg lymph. ratio	2.09 \pm 0.31	1.19 \pm 0.09	4.83 \pm 0.26	2.58 \pm 0.18	<0.001	<0.001	0.015

Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ –14 mice/group). Cell values are expressed as absolute number for cell count while monocytes, neutrophils, and dendritic cells are expressed as the percentage of nonlymphocytic leukocytes. Activated and regulatory cells are expressed as the percentage of the corresponding total subset. Act, activated; CTL, control; Int., interaction between colitis and dietary factors; ns, nonsignificant; SDP, spray-dried porcine plasma; Th, T helper; Treg, regulatory T helper.

2.4. Effects of SDP Supplementation on Inflammation Markers in *Mdr1a* KO Mice

The concentrations of the chemokines MIP-1 β and MCP-1 were augmented in the colonic mucosa in KO mice (both $p < 0.001$, Figure 4A,B) and SDP supplementation reduced their levels ($p = 0.026$ and $p = 0.025$, respectively). The concentrations of the cytokines IL-17 and IL-2 were also increased in KO mice ($p < 0.001$, Figure 4C,D), with SDP supplementation once again blocking the increase ($p = 0.026$ and $p = 0.012$, respectively).

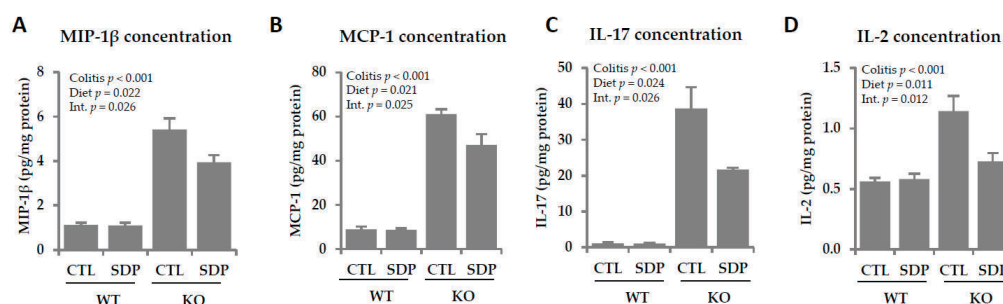


Figure 4. Effects of SDP supplementation on cytokine secretion in the colonic mucosa of *Mdr1a* KO mice. (A) MIP-1 β concentration; (B) MCP-1 concentration; (C) IL-17 concentration; (D) IL-2 concentration. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ –7 mice/group). CTL, control; IL-2, interleukin-2; IL-17, interleukin-17; Int., interaction between colitis and dietary factors; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein 1 beta; SDP, spray-dried porcine plasma.

In KO mice, the expression levels of *Inos*, *Ifn- γ* , and *Tnf- α* were increased (all $p < 0.001$, Figure 5), and SDP supplementation reduced all these effects ($p = 0.041$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively).

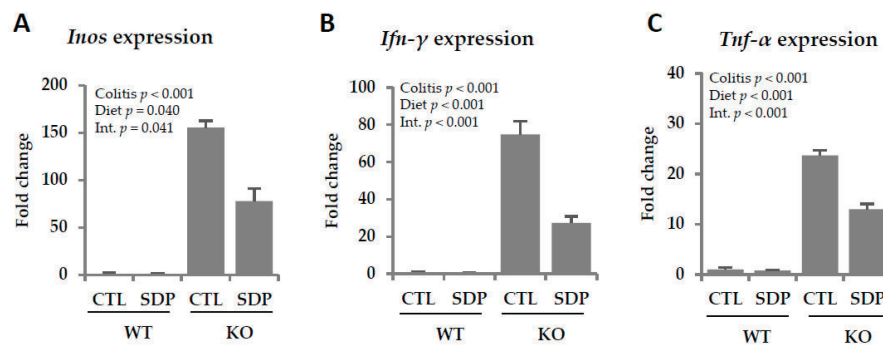


Figure 5. Effects of SDP supplementation on proinflammatory cytokine expression in the colonic mucosa of *Mdr1a* KO mice. (A) *Inos* expression; (B) *Ifn- γ* expression; (C) *Tnf- α* expression. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 4\text{--}7$ mice/group). CTL, control; *Inos*, inducible nitric oxide synthase; *Ifn- γ* , interferon-gamma; Int., indicates the interaction between colitis and dietary factors; SDP, spray-dried porcine plasma; *Tnf- α* , tumor necrosis factor-alpha.

SDP supplementation increased the concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 ($p = 0.049$, Figure 6A). No changes in the TGF- β concentration were observed in the colonic mucosa in KO mice or after SDP supplementation (Figure 6B).

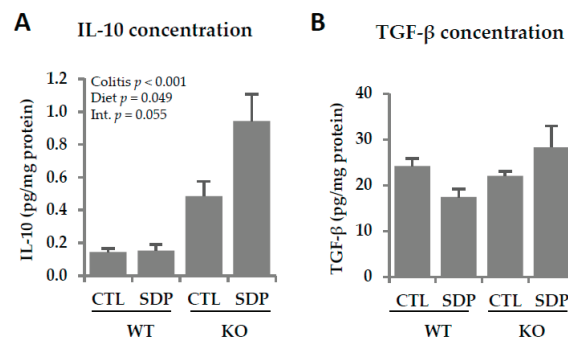


Figure 6. Effects of SDP supplementation on anti-inflammatory cytokine secretion in the colonic mucosa of *Mdr1a* KO mice. (A) IL-10 concentration; (B) TGF- β concentration. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5\text{--}7$ mice/group). CTL, control; IL-10, interleukin-10; Int., interaction between colitis and dietary factors; SDP, spray-dried porcine plasma; TGF- β , transforming growth factor-beta.

3. Discussion

The pathogenesis of IBD is still unknown. However, it is well-established that patients have a deregulated immune response involving increases in proinflammatory cytokines, which has been identified to contribute to disorders of the gastrointestinal tract [21]. In recent years, nutraceutical compounds, which include bioactive peptides and colostrum, have been reported to have beneficial effects in IBD patients [22]. Therefore, in the present study, we evaluated the effects of dietary supplementation with SDP on the evolution of IBD in a mouse model of spontaneous colitis.

The gastrointestinal tract can develop different inflammatory pathologies, with changes in epithelial permeability leading to altered mucosal functions [23]. Here, *Mdr1a* KO mice showed an increase in the histopathological index, indicating intestinal deterioration. In addition, KO mice had higher epithelial permeability and lower abundance of tight junction proteins than WT animals, which is consistent with the alterations in epithelial permeability and in tight junction structure observed in patients with ulcerative colitis and Crohn disease [8]. Although SDP supplementation did

not improve the histopathological index, it prevented the increase in crypt epithelial permeability and the reduction in E-cadherin abundance observed in *Mdr1a* KO animals. This effect is similar to that observed in the same model of colitis after supplementation with SBI, which is an immunoglobulin concentrate [12]. Previous work has also shown that SDP can prevent increases in small intestine permeability during acute intestinal inflammation induced by an enterotoxin [17].

IBD patients show lower abundance of goblet cells and changes in mucin expression and secretion [24], which reduce the thickness of the mucus layer [25] and thereby compromise barrier function. In addition to mucins, goblet cells also synthesize trefoil factors, which are secretory proteins that stabilize the mucus layer [26] and facilitate intestinal epithelial restitution [27]. Our *Mdr1a* KO mice showed a reduction in the number of goblet cells in the colon, as well as in the expression of *Muc2* and *Tff3*, which would contribute to an increase in the epithelial permeability of the colon [28]. Indeed, it has been described that a reduction in goblet cells and *Muc2* would be associated with an increase in pathogenic bacteria in the mucus layer and a greater penetration of these microorganisms into the mucosa [29]. SDP supplementation did not improve goblet cell abundance in KO mice but did attenuate the decrease in *Muc2* expression and maintained *Tff3* expression at similar levels to those of healthy animals. Therefore, SDP helps to maintain barrier integrity and prevent the entry of pathogenic microorganisms that could eventually perpetuate inflammation in the colonic mucosa.

Both MUC1 and MUC4 are membrane-bound mucins that are elevated in patients with IBD during the inactive phase of the disease, suggesting a crucial role of these mucins in the development of the condition [30]. In addition, aberrant expression of *Muc1* is involved in intestinal barrier dysfunction during inflammation, with overexpression of *Muc1* correlated with increased intestinal permeability [31]. On the other hand, neutrophil infiltration is associated with increased *Muc4* expression [32]. SDP supplementation reduced the overexpression of *Muc1* and *Muc4* observed in KO mice, suggesting that SDP-supplemented mice had lower immune activity and an enhanced colon barrier.

Mdr1a KO mice showed an increase in immune cell recruitment in the *lamina propria* and in the intraepithelial compartment, as observed in IBD patients [33]. This infiltration is triggered by monocytes, neutrophils, and Th lymphocytes [34]. The infiltration is accompanied by chemokines and cytokines that promote the recruitment and activation of these cells, leading to unrestrained accumulation of activated immune cells that impair mucosal homeostasis and perpetuate the inflammatory response [35]. We found that SDP supplementation reduced the accumulation of activated monocytes and neutrophils in the colonic mucosa, which is consistent with reduced production of MIP-1 β and MCP-1. This effect is notable because these chemokines are important mediators for the recruitment and accumulation of neutrophils and macrophages in colitis models [36]. The SDP diet also reduced the percentage of activated Th cells in the *lamina propria*, diminishing an immune subset that plays a main role in initiating and shaping IBD pathogenesis [37]. The decline in Th cell activation led to a reduction in proinflammatory cytokines, such as IL-2 and IFN- γ . This is noteworthy because activated Th lymphocytes are also characterized by alterations in cytokine production, which result in a disturbed balance between pro- and anti-inflammatory cytokines [38,39]. Along this line, similar effects of SDP supplementation have been observed in other rodent models of jejunum and pulmonary acute inflammation [40–42].

Th17 cells play an important role in host defense against extracellular pathogens but are also associated with the development of inflammatory responses such as those seen in IBD [43]. Here, *Mdr1a* KO mice showed a considerable increase in IL-17 release in the colonic mucosa, indicating a clear bias toward the Th17 immune response. SDP decreased the concentration of IL-17 in the colonic mucosa. This effect may be clinically relevant because IL-17 induces the release of chemokines and other chemoattractants from epithelial and endothelial cells that promote the inflammatory response through the recruitment of neutrophils [44]. Therefore, the reduced IL-17 release observed in KO mice supplemented with SDP might explain the lower activation of neutrophils and their reduced infiltration into the colonic mucosa. Similar effects of SDP supplementation were observed in mice

with acute lung inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), with a reduction in the activation of neutrophils and their infiltration into lung tissue [42,45].

Immune activation and proinflammatory cytokine release can disassemble tight junction proteins, increasing epithelial permeability [46]. This can trigger and perpetuate local inflammation in IBD [47]. Furthermore, both *Tnf- α* and *Ifn- γ* induce *Inos* expression, which also has deleterious effects on intestinal integrity [48]. In general, our results showed that SDP supplementation reduced the immune response during colitis development. A similar pattern was also observed with SBI supplementation in *Mdr1a* KO mice [13].

The intestinal mucosa is normally maintained in a state of controlled inflammation in which there is a balance between protective immune responses and tolerance to self-antigen and commensal bacteria [49]. Dendritic cells participate in the preservation of Th intestinal tolerance through the activation and maintenance of Treg cells [50], which in turn control immune responses in the gut by inhibiting the proliferation and effector functions of other T cells. Inflammation in IBD may be caused by an alteration in the balance between Treg and proinflammatory activated Th cells [51]. Our KO mice showed a reduced proportion of dendritic cells and activated dendritic cells, which correlates well with the reduction in the Treg population. In our experiments, SDP supplementation increased the percentage of dendritic cells and their activation in the lamina propria of the KO mice, as well as the proportion of Treg lymphocytes in the colonic mucosa. SDP supplementation also reduced the ratio between activated Th lymphocytes and Treg lymphocytes, indicating that SDP restores the balance between these lymphocyte populations. A similar response pattern has been observed in the Staphylococcal enterotoxin B model of mild intestinal inflammation [19] and in acute lung inflammation induced by LPS [45]. In both cases, the challenge increased the activated Th/Treg ratio while SDP restored the pre-challenge ratio. The importance of these effects lies in the role of Treg in the suppression of Th effector cells through the secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β [52].

SDP supplementation did not modify colon TGF- β concentration but did promote IL-10 release. The lack of a TGF- β response was unexpected because, in other inflammation models, such as intestinal and genitourinary acute inflammation models, SDP induces the secretion of TGF- β [41,53]. However, in acute lung inflammation, only mature TGF- β (and not total TGF- β) is increased by SDP [42].

On the other hand, SDP supplementation increased the release of IL-10 during chronic inflammation. These results are consistent with the acute intestinal inflammation induced by staphylococcal enterotoxin B [19], with the acute lung inflammation provoked by LPS [42], and with the uterine inflammation induced by stress [53], in which SDP supplementation increases the expression of this anti-inflammatory cytokine. In a very different condition, such as in a mouse model of senescence, SDP increases the brain concentration of IL-10, suggesting its participation in the regulation of immune responses in nonmucosal tissues [20]. All of these effects of SDP on IL-10 are remarkable because this cytokine plays an important anti-inflammatory role in restricting and suppressing the inflammatory responses, thus minimizing tissue damage in response to microbial challenges [54].

Besides the effect of SDP on the immune system itself, it can also act through changes in the intestinal microbiota. In this regard, Moretó et al. [55] showed that supplementation with SDP increases the proportion of bacterial families that improve intestinal barrier function and are well-known mediators of anti-inflammatory and tolerogenic responses, such as the Lactobacillaceae family. In fact, different species of the genus *Lactobacillus* have been shown to be effective in promoting the expression of *Il-10* [22] or in reducing the expression of adhesion molecules that promote leukocyte recruitment in an experimental colitis model [56].

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Experimental Design

Mdr1a knockout mice (FVB.129P2-Abcb1atm 1BorN7; KO mice) and the corresponding FVB wild type (WT mice) were purchased from Taconics (Germtown, NY, USA). We created a stable colony for KO animals in the specific pathogen free (SPF) area of the Animal Experimentation Service of the Barcelona Science Park (BSP). Animals were kept 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 Experimentation of the BSP (Permit number: P03-R1-08, approved 09/05/2008).

The animals were weaned at day 21 of age and then consumed the experimental diets until the end of the study. The animals were fed a control diet, or a diet supplemented with 8% of SDP, which is a protein-rich ingredient obtained from industrial fractionation of blood from healthy pigs intended for human consumption. Control and SDP diets were designed to provide balanced energy and nutrients. The experimental diets were prepared by APC-Europe S.L.U (Granollers, Spain) from base ingredients provided by Envigo (Bresso, Italy), and their composition is detailed in Table 4. The experimental groups used throughout the study were WT (WT mice fed control diet), KO (KO mice fed control diet), SDP (WT mice fed SDP diet), and KO-SDP (KO mice fed the SDP diet). Mice were maintained in the SPF area until day 28 of age, when they were transferred to a conventional housing area. Animals were killed by anesthesia overdose at 56 days of age.

Table 4. Diet composition.

Ingredients	Control Diet	Ingredients
SDP ¹	-	80
Dried skim milk	530.7	340.5
Corn starch	199.3	308.8
Sucrose	94.5	94.5
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	50
AIN-93-G-MX ²	35	35
AIN-93 VX ²	15	15
Choline bitartrate	3	3
Methionine	2.5	3.2

¹ SDP (spray-dried porcine plasma) was provided by APC-Europe S.L.U (Granollers, Spain); ² AIN-93 VX, vitamin mix; AIN-93-G-MX, mineral mix, both provided by Envigo (Bresso, Italy).

The clinical signs of colitis were analyzed using the disease activity index (DAI), which scores weight loss, stool consistency and bleeding, as described elsewhere [12].

4.2. Morphological Study

This procedure was carried out as described before [13]. Histopathological analysis was performed by the Pathological Anatomy Department of the Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain), under blind conditions. Analysis of the degree of histological alterations assigned values between 0–3 (absent-slight-moderate-severe). The variables studied were lamina propria and transmural cellular infiltration, cryptitis, ulcers and mucus depletion.

4.3. Intraepithelial Lymphocytes and Lamina Propria Lymphocytes Isolation

Lymphocytes isolation was carried out as previously described [13,57]. Briefly, the colon was extracted, washed with PBS and everted. Then, the tissue was incubated in a pre-digestion solution HBSS with 10% FBS (both Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 mM EDTA and 1 mM DTT (both Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 25 min at 37 °C in a shaker (Thermomixer Comfort Eppendorf®, 750 rpm). The cell suspension was filtered in a cell strainer of 75 µm and centrifuged at 500× g for 10 min at 4 °C.

The pelleted cells were resuspended in PBS-FBS and reserved until do the Percoll gradient. The cell suspension contains intraepithelial lymphocytes among other cell types.

The remainder colon was finely minced and incubated in digestion solution containing RPMI 1640, 5% FBS, penicillin/streptomycin, 10 nM HEPES, 2 mM L-Glutamine and 1500 U/mL collagenase (all, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 20 min in a shaker (Thermomixer Comfort Eppendorf®, 750 rpm). The cell suspension obtained was separated and the rest of tissue was incubated two additional times with the digestion solution. The cell suspension obtained was filtered in a 75 µm cell strainer and centrifuged at 500× g for 10 min at 4 °C. The pelleted cells were resuspended in PBS-FBS. This cell suspension contains the lamina propria lymphocytes among others cell types.

At this point, both types of enriched cell suspensions (from lamina propria and intraepithelial compartment) were proceed at the same time. Samples were centrifuged at 500× g for 10 min at 4 °C and were submit to gradient Percoll 40–80%. Leukocytes were transferred to a clean tube and centrifuged at 500× g 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. In all cases, cell viability was >90%.

4.4. Cell Staining

Cell staining was performed as described before [13]. Briefly, the staining was carried out on 1.5×10^4 cells in samples of the lamina propria, and on 7×10^4 cells of the intraepithelial subset. To stain extracellular markers, cells were incubated with the primary antibodies CD45, CD19, CD4, CD25, CD14 and CD11c (all from eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) and LY6G and CD86 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) for 30 min at 4 °C. To stain the intracellular markers, cells were fixed with paraformaldehyde 4% for 20 min at 4 °C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and permeabilized with Triton-X® for 15 min at 4 °C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were incubated with the primary antibodies FOXP3 (eBioscience Inc. San Diego, CA, USA) and CD68 (Serotec GmbH Kidlington, UK) for 30 min at 4 °C. Finally, cells were maintained in paraformaldehyde 4% until further analysis in the Aria cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) located at the Cytometry Unit of the Technical Services of the Universitat de Barcelona at the BSP. Results were analyzed using the Flowjo Software (Treestar Inc., Ashland, OR, USA). Cell markers to quantify each leukocyte population are detailed in Table 5.

Table 5. Cell Markers to Quantify Leukocyte Populations.

Population	Gate
Leukocytes	CD45 ⁺
B lymphocytes	CD19 ⁺ CD45 ⁺
T helper cells	CD4 ⁺ CD45 ⁺
Activated Th lymphocytes	CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ CD4 ⁺
Regulatory Th lymphocytes	CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ CD4 ⁺
Neutrophils	CD45 ⁺ non-lymphocytic leucocytes were separated by forward/side scatter Ly6G ⁺
Monocytes	CD45 ⁺ non-lymphocytic leucocytes were separated by forward/side scatter CD68 ⁺
Activated neutrophils	CD45 ⁺ non-lymphocytic leucocytes were separated by forward/side scatter Ly6G ⁺ CD14 ⁺
Activated monocytes	CD45 ⁺ non-lymphocytic leucocytes were separated by forward/side scatter CD68 ⁺ CD14 ⁺
Dendritic cells	CD11c ⁺ CD45 ⁺
Activated dendritic cells	CD45 ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺

4.5. Epithelial Fluorescent Dextran Permeability

This protocol was performed as previously described [12]. Briefly, the colon mucosa was scrapped and kept for 15 min in a petri dish which contained carbogenated Earl's solution at 37 °C to stabilize the sample. The fluorescent tracer fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran (FITC-dextran; molecular weight 4000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to study the crypt permeability. To carry out the monitoring of the ratio of fluorescence intensity of crypt luminal and pericryptal areas, tissue samples were incubated for 15 min and confocal images were taken every 3 min with a CLSM

SPII confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Two fields were captured per tissue per animal. The image was quantified with ImageJ software.

4.6. Western Blot

This procedure was carried out as described before [55]. Samples of colon mucosa were homogenized. Equal amounts of protein (100 µg) were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies against GAPDH (clone GAPDH-71.1; 1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), β-catenin (1:2000; NeoMarkers, Fremont, CA, USA), E-cadherin (clone H-108, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The blots were developed by using WesternDot 625 Western blot kits (Life Technologies, Paisley, UK) and quantified with ImageJ gel analyser software.

4.7. Real-Time PCR

RNA isolation, reverse transcription was performed as describe previously [20]. Total RNA was retrotranscribed using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Real-time PCR was performed using a cDNA template in a 20 µL reaction containing 0.2 µmol/L of each primer and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and carried out on a MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primers used to detect the genes of interest were cited elsewhere [18,45]. The target gene transcripts were quantified using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expression as a reference, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [58]. Product fidelity was confirmed by melt-curve analysis.

4.8. Cytokine Concentration

Samples of colon mucosa were homogenized as described before [13]. Cytokines were measured by Bio-Plex Cytokine Assay™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.9. Statistical Analysis

Results are presented as means ± SEM except for the disease activity index score, histopathological index and parameters used in the histopathological index, which are expressed as medians. A test was performed to detect outliers (Grubb test) and check the homogeneity of variance (Shapiro-Wilk test) and data normality (Shapiro-Wilk test) for all groups. Median values for nonparametric data were compared by the Kruskal-Wallis test. The effects of diet, colitis as well as their interaction (diet and colitis factors) were analyzed by two-way ANOVA followed by Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc test (applied between the different diets), using GraphPad Prism® software v 7.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$. A p value between 0.05 and 0.1 was suggestive of a true effect [59].

5. Conclusions

In conclusion, our findings showed that dietary supplementation with SDP reduces the amount of activated Th lymphocytes and promotes the presence of Treg cells in mice that spontaneously develop colitis; in turn, SDP increases the secretion of Il-10, which favored an anti-inflammatory immune profile. This cascade eventually reduces proinflammatory cytokines in the mucosa and restores the barrier properties of the colonic epithelium. The beneficial effect of SDP in this model suggests a role for plasma-derived supplements in preventing and ameliorating IBD.

Author Contributions: Conceptualization and design of the experiments, C.A., J.M.C., J.P., A.P.-B. and M.M.; methodology, L.M., C.A. and A.P.-B.; contribution with essential reagents and materials, J.M.C., J.P.; data analysis L.M., C.R.-C., A.P.-B. and M.M.; writing—original draft preparation, L.M. and C.R.-C., writing—review and editing, C.A., A.P.-B. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by APC-Europe SLU (Granollers, Spain) by research contracts with the Bosch i Gimpera Foundation of the University of Barcelona, by grant TRA2009 0317, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain and by grant RDITCRD07-1-0008, CIDEM, Generalitat de Catalunya. The research group was also supported by grant 2017SGR945 for Consolidated Research Groups, Generalitat de Catalunya, Spain. L. Miró was supported by a grant from the Torres Quevedo programme (reference PTQ-12-05394) of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad.

Conflicts of Interest: C.R.-C., C.A., A.P.-B., and M.M. declare that they have no conflict of interest; L.M. and J.P. are employed by APC-Europe S.L.U. J.M.C. is employed by APC LLC. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

Abbreviations

CTL	Control
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Inos	Inducible nitric oxide synthase
KO	Knockout
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 beta
Muc1	Mucin 1
Muc2	Mucin 2
Muc4	Mucin 4
Muc6	Mucin 6
MW	Molecular weight
SDP	Spray-dried porcine plasma
Tff3	Trefoil factor 3
TGF- β	Transforming growth factor-beta
Th	T helper
Treg	Regulatory Th lymphocytes
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
WT	Wild type

References

1. Geremia, A.; Biancheri, P.; Allan, P.; Corazza, G.R.; Di Sabatino, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 3–10. [[CrossRef](#)]
2. Molodecky, N.A.; Soon, I.S.; Rabi, D.M.; Ghali, W.A.; Ferris, M.; Chernoff, G.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Barkema, H.W.; et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **2014**, *142*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jeong, D.Y.; Kim, S.; Son, M.J.; Son, C.Y.; Kim, J.Y.; Kronbichler, A.; Lee, K.H.; Shin, J.I. Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* **2019**, *18*, 439–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Huang, Y.; Chen, Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 2490–2497. [[PubMed](#)]
5. Goto, Y.; Ivanov, I.I. Intestinal epithelial cells as mediators of commensal-host immune crosstalk. *Immunol. Cell Biol.* **2013**, *91*, 204–214. [[CrossRef](#)]
6. Okumura, R.; Takeda, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e338. [[CrossRef](#)]
7. Soderholm, A.T.; Pedicord, A. Intestinal epithelial cells: At the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology* **2019**, *158*, 267–280. [[CrossRef](#)]
8. Lee, S.H. Intestinal permeability regulation by tight junction: Implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* **2015**, *13*, 11–18. [[CrossRef](#)]

9. Schoultz, I.; Keita, A.V. Cellular and molecular therapeutic targets in inflammatory bowel disease-focusing on intestinal barrier function. *Cells* **2019**, *8*, 193. [[CrossRef](#)]
10. Resta-Lenert, S.; Smitham, J.; Barrett, K.E. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-}-mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *289*, G153–G162. [[CrossRef](#)]
11. Ho, G.T.; Aird, R.E.; Liu, B.; Boyapati, R.K.; Kennedy, N.A.; Dorward, D.A.; Noble, C.L.; Shimizu, T.; Carter, R.N.; Chew, E.T.S.; et al. MDR1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 120–130. [[CrossRef](#)]
12. 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.* **2015**, *308*, 1012–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pérez-Bosque, A.; Miró, L.; Maijó, M.; Polo, J.; Campbell, J.; Russell, L.; Crenshaw, J.; 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* **2016**, *11*, e0154823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bateman, E.; Weaver, E.; Klein, G.; Wignall, A.; Wozniak, B.; Plews, E.; Mayo, B.; White, I.; Keefe, D. Serum-derived bovine immunoglobulin/protein isolate in the alleviation of chemotherapy-induced mucositis. *Support. Care Cancer* **2016**, *24*, 377–385. [[CrossRef](#)]
15. Lallès, J.P.; Bosi, P.; Janczyk, P.; Koopmans, J.S.; Torrallardona, D. Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: A review. *Animals* **2009**, *3*, 1625–1643. [[CrossRef](#)]
16. Weaver, A.C.; Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; Polo, J.; Kim, D.W. Efficacy of dietary spray dried plasma protein to mitigate the negative effects on performance of pigs fed diets with corn naturally contaminated with multiple mycotoxins. *J. Anim. Sci.* **2014**, *92*, 3878–3886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pérez-Bosque, A.; Amat, C.; Polo, J.; Campbell, J.M.; Crenshaw, J.; Russell, L.; Moretó, M. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2838–2843. [[CrossRef](#)]
18. Miró, L.; Garcia-Just, A.; Amat, C.; Polo, J.; Moretó, M.; Pérez-Bosque, A. Dietary animal plasma proteins improve the intestinal immune response in senescent mice. *Nutrients* **2017**, *9*, 1346. [[CrossRef](#)]
19. 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.* **2010**, *140*, 25–30. [[CrossRef](#)]
20. Garcia-Just, A.; Miró, L.; Pérez-Bosque, A.; Amat, C.; Polo, J.; Pallàs, M.; Griñán-Ferré, C.; Moretó, M. Dietary spray-dried porcine plasma prevents cognitive decline in senescent mice and reduces neuroinflammation and oxidative stress. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 303–311. [[CrossRef](#)]
21. Sanchez-Muñoz, F.; Dominguez-Lopez, A.; Yamamoto-Furusho, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 4280–4288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ahn, S.I.I.; Cho, S.; Choi, N.J. Effect of dietary probiotics on colon length in an inflammatory bowel disease-induced murine model: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 1807–1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yoseph, B.P.; Klingensmith, N.J.; Liang, Z.; Breed, E.R.; Burd, E.M.; Mittal, R.; Dominguez, J.A.; Petrie, B.; Ford, M.L.; Coopersmith, C.M. Mechanisms of intestinal barrier dysfunction in sepsis. *Shock* **2016**, *46*, 52–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boltin, D.; Perets, T.T.; Vilkin, A.; Niv, Y. Mucin function in inflammatory bowel disease: An update. *J. Clin. Gastroenterol.* **2013**, *47*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sheng, Y.H.; Hasnain, S.Z.; Florin, T.H.J.; McGuckin, M.A. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 28–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aihara, E.; Engevik, K.A.; Montrose, M.H. Trefoil factor peptides and gastrointestinal function. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 357–380. [[CrossRef](#)]
27. Kjellek, S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1350–1369. [[CrossRef](#)]
28. Feng, L.; Chen, S.; Zhang, L.; Chen, Z. Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice. *Environ. Pollut.* **2019**, *254*, 112960. [[CrossRef](#)]
29. Sorribas, M.; de Gottardi, A.; Moghadamrad, S.; Hassan, M.; Spadoni, I.; Rescigno, M.; Wiest, R. Isoproterenol disrupts intestinal barriers activating gut-liver-axis: Effects on intestinal mucus and vascular barrier as entry sites. *Digestion* **2019**, *24*, 1–13. [[CrossRef](#)]

30. Vancamelbeke, M.; Vanuytsel, T.; Farré, R.; Verstockt, S.; Ferrante, M.; Van Assche, G.; Rutgeerts, P.; Schuit, F.; Vermeire, S.; Arijis, I.; et al. Genetic and transcriptomic bases of intestinal epithelial barrier dysfunction in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 1718–1729. [[CrossRef](#)]
31. Breugelmans, T.; Van Spaendonk, H.; De Man, J.G.; De Schepper, H.U.; Jauregui-Amezaga, A.; Macken, E.; Lindén, S.K.; Pintelon, I.; Timmermans, J.P.; De Winter, B.Y.; et al. In-depth study of transmembrane mucins in association with intestinal barrier dysfunction during the course of T cell transfer and DSS-induced colitis. *J. Crohns Colitis* **2020**, *31*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fischer, B.M.; Cuellar, J.G.; Diehl, M.L.; deFreytas, A.M.; Zhang, J.; Carraway, K.L.; Voynow, J.A. Neutrophil elastase increases MUC4 expression in normal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2003**, *284*, L671–L679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, S.H.; Kwon, J.E.; Cho, M.L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest. Res.* **2018**, *16*, 26–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Muthas, D.; Reznichenko, A.; Balendran, C.A.; Böttcher, G.; Clausen, I.G.; Kärrman Mårdh, C.; Ottosson, T.; Uddin, M.; MacDonald, T.T.; Danese, S.; et al. Neutrophils in ulcerative colitis: A review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand. J. Gastroenterol.* **2017**, *52*, 125–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Atreya, R.; Neurath, M. New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2008**, *1*, 175–182. [[CrossRef](#)]
36. Ajuebor, M.N.; Kunkel, S.L.; Hogaboam, C.M. The role of CCL3/macrophage inflammatory protein-1 α in experimental colitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *497*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Imam, T.; Park, S.; Kaplan, M.H.; Olson, M.R. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1212. [[CrossRef](#)]
38. Wallace, K.L.; Zheng, L.B.; Kanazawa, Y.; Shih, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 6–21. [[CrossRef](#)]
39. Múzes, G.; Molnár, B.; Tulassay, Z.; Sipos, F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 5848–5861. [[CrossRef](#)]
40. 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.* **2008**, *138*, 533–537. [[CrossRef](#)]
41. 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* **2016**, *8*, 657. [[CrossRef](#)]
42. Maijó, 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.* **2012**, *142*, 264–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Raza, A.; Yousaf, W.; Giannella, R.; Shata, M.T. Th17 cells: Interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2012**, *8*, 161–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Laan, M.; Cui, Z.H.; Hoshino, H.; Lötval, J.; Sjöstrand, M.; Gruenert, D.C.; Skoogh, B.E.; Lindén, A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2347–2352. [[PubMed](#)]
45. Maijó, 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.* **2012**, *107*, 867–875. [[CrossRef](#)]
46. Wang, F.; Graham, W.V.; Wang, Y.; Witkowski, E.D.; Schwarz, B.T.; Turner, J.R. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 409–419. [[CrossRef](#)]
47. Laukoetter, M.G.; Nava, P.; Nusrat, A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 401–407. [[CrossRef](#)]
48. Kolios, G.; Valatas, V.; Ward, S.G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: A universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* **2004**, *113*, 427–437. [[CrossRef](#)]
49. Izcue, A.; Coombes, J.L.; Powrie, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 313–338. [[CrossRef](#)]

50. Coombes, J.L.; Maloy, K.J. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 116–126. [[CrossRef](#)]
51. Eastaff-Leung, N.; Mabarrack, N.; Barbour, A.; Cummins, A.; Barry, S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Immunol.* **2010**, *30*, 80–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wan, Y.Y.; Flavell, R.A. TGF- β and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* **2008**, *28*, 647–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Song, M.; Liu, Y.; Lee, J.J.; Che, T.M.; Soares-Almeida, J.A.; Chun, J.L.; Campbell, J.M.; Polo, J.; Crenshaw, J.D.; Seo, S.W.; et al. Spray-dried plasma attenuates inflammation and improves pregnancy rate of mated female mice. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 298–305. [[CrossRef](#)]
54. Maynard, C.L.; Weaver, C.T. Diversity i the contribution of IL-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* **2008**, *226*, 219–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Angulo, S.; Llopis, M.; Antolín, M.; Gironella, M.; Sans, M.; Malagelada, J.R.; Piqué, J.M.; Guarner, F.; Panés, J. *Lactobacillus casei* prevents the upregulation of ICAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, G1155–G1162. [[CrossRef](#)]
56. Moretó, M.; Miró, L.; Amat, C.; Polo, J.; Manichanh, C.; Pérez-Bosque, A. Dietary supplementation with spray-dried porcine plasma has prebiotic effects on gut microbiota in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2926. [[CrossRef](#)]
57. Weigmann, B.; Tubbe, I.; Seidel, D.; Nicolaev, A.; Becker, C.; Neurath, M.F. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2307–2311. [[CrossRef](#)]
58. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
59. Curran-Everett, D.; Benos, J.D. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2004**, *287*, 189–191. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).