



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA



FACULTAT DE
FARMÀCIA

Treball de final de màster

Efectes de la suplementació amb proteïnes
plasmàtiques sobre el deteriorament cognitiu en un
model murí d'envelliment accelerat

Laura Subirà Marcé

Tutores: Lluïsa Miró Martí i Anna Pérez-Bosque

Departament de Bioquímica i Fisiologia

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Universitat de Barcelona

Setembre 2021

Abstract

En els últims anys, degut a l'augment de l'esperança de vida, ha augmentat l'interès per a assolir un envelliment saludable. El pas del temps és acompanyat d'un augment de l'estat inflamatori basal i una desregulació del sistema immunitari que facilita l'aparició de malalties neurodegeneratives com per exemple la malaltia d'Alzheimer (MA). La intervenció nutricional pot jugar un paper molt important en la lluita contra l'*inflammaging*. El plasma assecat per polvorització (SDP) presenta efectes anti-inflamatoris a nivell cerebral, ja que redueix l'estat oxidatiu i la neuroinflamació en ratolins senescents. L'objectiu d'aquest treball ha estat determinar els efectes de la suplementació amb SDP sobre marcadors de la MA. En aquest estudi es van utilitzar ratolins SAMP8 de 2 mesos (referència jove) i 6 mesos d'edat que van ser alimentats amb pinso control o bé amb pinso suplementat amb SDP durant 4 mesos. En aquests ratolins es va analitzar la memòria a curt i llarg termini, l'expressió cerebral de citocines pro-inflamatòries i altres marcadors característics de la MA. Els ratolins SAMP8 de 6 mesos presenten un deteriorament de la memòria a curt i llarg termini, associat a un increment de citocines pro-inflamatòries, al processament aberrant de precursors amiloides i a la fosforilació de la proteïna tau. En aquest estudi, hem observat que els ratolins SAMP8 alimentats amb pinso amb SDP mostren una reducció de marcadors característics de la MA, com són la pèrdua de memòria a curt i llarg termini, la presència de tau fosforilada, i la neuroinflamació. Així doncs, podem concloure que l'SDP mostra un cert paper neuroprotector davant la MA, ja que redueix marcadors característics d'aquesta patologia, reduint la neuroinflamació i la pèrdua de memòria.

Índex d'abreviatures

APP	Proteïnes precursors amiloides; <i>Amyloid precursor protein</i>
BSA	Albúmina sèrica bovina; <i>Bovine serum albumin</i>
CDK5	Ciclina dependent de quinasa 5; <i>Cyclin dependent kinase 5</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic; <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GSK3 β	Glucogen sintasa quinasa 3 beta; <i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>
ID	Índex de discriminació
IL	Interleucina
MA	Malaltia d'Alzheimer
NFT	Cabdells neurofibril·lars; <i>Neurofibrillary tangle</i>
NORT	Test de reconeixement d'objectes; <i>Novel object recognition test</i>
PBS	Solució amortidora de fosfats; <i>Phosphate-buffered saline</i>
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil; <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PVDF	Fluorur de polivinil; <i>Polyvinylidene fluoride</i>
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa en temps real; <i>Real time polymerase chain reaction</i>
SAMP8	Ratolí propens a la senescència accelerada 8; <i>Senescence accelerated mouse prone 8</i>
SDP	Plasma assecat per polvorització; <i>Spray-dried plasma</i>
Tgf- β	Factor de creixement transformador beta; <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Factor de necrosi tumoral; <i>Tumor necrosis factor</i>

Índex

1.- Introducció.....	5
1.1.- Envel·liment i deteriorament cognitiu	5
1.2.- Dieta i envelliment.....	6
1.3.- Efectes de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques	7
1.4.- Models animals per a l'estudi de la senescència	8
2.- Objectius	9
3.- Materials i mètodes	10
3.1.- Disseny experimental.....	10
3.2.- Homogeneïtzació de les mostres.....	11
3.3.- Determinació de proteïnes.....	12
3.4.- Western Blot	12
3.5.- ELISA.....	13
3.7.- Test de reconeixement d'objectes	15
3.8.- Anàlisi estadístic	16
4.- Resultats	17
4.1.- Consum de pinso i d'aigua.....	17
4.2.- Evolució i increment del pes corporal	17
4.3.- Memòria a curt i llarg termini.....	18
4.4.- Marcadors característics de la malaltia d'Alzheimer	20
4.5.- Neuroinflamació	21
5.- Discussió.....	23
5.1.- Efecte de la suplementació amb SDP sobre el pes corporal	23
5.2.- Efecte de la suplementació amb SDP sobre l'evolució de la malaltia d'Alzheimer	24
6.- Conclusions.....	27
7.- Bibliografia	28

1.- Introducció

A dia d'avui no existeix una definició universalment acceptada sobre l'envelliment. Tot i això, es pot considerar com la decadència funcional depenent del temps que afecta a la majoria d'organismes vius (1). L'acumulació gradual d'una gran varietat de danys moleculars i cel·lulars augmenten el risc de moltes malalties i en general, disminueixen les capacitats de l'individu. Malgrat tot, aquests canvis no són lineals ni uniformes, i existeix una gran variabilitat interpersonal.

Al llarg de les últimes dècades, l'esperança de vida ha anat augmentant en molts països, però el deteriorament físic i mental disminueix la qualitat de vida de la gent gran i n'augmenta les despeses mèdiques. Conèixer els processos i mecanismes que promouen o retarden l'envelliment és vital per aconseguir una bona qualitat de vida per a aquest col·lectiu.

Tanta importància cobra aquesta qüestió actualment, que la Assemblea General de les Nacions Unides ha declarat del 2021-2030 la Dècada de l'Envelliment Saludable dins la seva agenda per 2030. És necessari entendre les implicacions dels canvis demogràfics actuals, així com els principals obstacles que troben les persones grans, per a que les societats estiguin preparades per a atendre-les.

1.1.- Envelliment i deteriorament cognitiu

El deteriorament cognitiu progressiu es considera un element inevitable de l'envelliment, ja que existeix un increment en la senescència cel·lular de neurones i micròglia, un augment de l'apoptosi, de l'agregació de proteïnes, disfunció mitocondrial i també del grau d'oxidació de proteïnes, lípids i de DNA (2). Els agregats de proteïna com la β -amiloide, o la hiperfosforilació de la proteïna tau, són els principals marcadors a tenir en compte a l'hora d'avaluar el grau de neurodegeneració (3). La inflamació crònica i l'estrès oxidatiu també són factors implicats en la patogènesi de les malalties neurodegeneratives, ja que el sistema nerviós central està en constant comunicació amb el sistema immunitari (4).

Àrees específiques del cervell com el còrtex i l'hipocamp, són especialment vulnerables al deteriorament estructural i funcional associat a l'envelliment. Aquestes àrees del cervell juguen un paper important en la formació de records. Les malalties neurodegeneratives impliquen un deteriorament de les funcions cognitives, sobretot de l'aprenentatge i de la memòria (5). Els polimorfismes genètics i l'envelliment són els factors de risc més comuns per al desenvolupament d'aquestes, tot i que queda molt camí per recórrer per conèixer els processos involucrats en l'evolució d'aquestes afeccions.

1.2.- Dieta i envelliment

L'estil de vida, i més concretament la dieta, tenen un paper vital en l'aparició i progressió de moltes malalties no transmissibles associades a l'envelliment, com la hipertensió, la diabetis tipus II, i la síndrome metabòlica entre d'altres. La dieta pot ser una eina fonamental per a atenuar la immunosenescència i el deteriorament cognitiu (6). Ho pot fer regulant processos específics, disminuint la inflamació crònica i/o revertint canvis epigenètics que apareixen durant l'envelliment (7).

El correcte funcionament del sistema immunitari està directament influenciat pels aliments que ingerim. Tenir dèficits d'algunes vitamines o minerals, una insuficient ingesta proteica o consumir un excés d'àcids grassos saturats pot arribar a comprometre la capacitat de resposta i la regulació del sistema immunitari (8). De fet, la desnutrició és particularment comú entre les persones amb malalties neurodegeneratives (9).

La malaltia d'Alzheimer (MA) és un trastorn neurodegeneratiu que condueix al deteriorament cognitiu per l'acumulació i disposició de proteïna β -amiloide degut al processament aberrant de proteïnes precursors amiloides (APP), i la formació de cabdells neurofibril·lars (NFTs) per l'acumulació de proteïna tau hiperfosforilada (p-tau). Ambdós processos van acompanyats de pèrdua de neurones (10). Tau és una proteïna que s'uneix als microtúbuls i contribueix en l'estabilitat axonal. La hiperfosforilació de tau fa que aquestes proteïnes es desenganxin dels microtúbuls i s'acumulin en forma d'NFTs que alteren l'estabilitat axonal i la sinapsis i per tant, la funció neuronal (11). També s'ha demostrat la relació entre les citocines pro-inflamatòries i les malalties

neurodegeneratives. De fet, s'ha observat que l'expressió de citocines pro-inflamatòries com la interleucina (IL)-1 β , IL-6 o el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) és major en persones amb malalties neurodegeneratives cròniques i això n'accelera la progressió (12). Així doncs, una altra característica important de la MA és l'augment de l'estat inflamatori de baixa intensitat, que és conegut com a *inflammaging* (13). És per això que les intervencions dietètiques antioxidants i anti-inflamatòries poden ser útils en la prevenció del deteriorament cognitiu associat a l'envelliment.

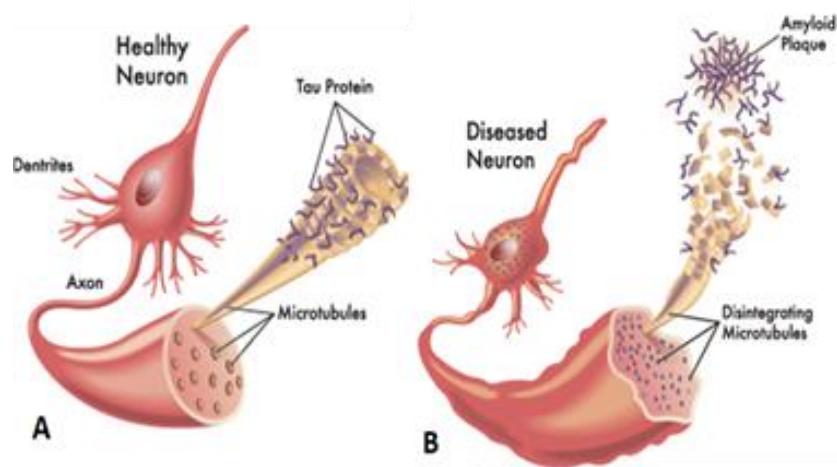


Figura 1. Comparació estructural entre una neurona sana i una neurona malmesa (14).
 (A) En una neurona sana la proteïna tau està unida als microtúbuls i promou l'estabilitat axonal.
 (B) En una neurona malmesa els microtúbuls es troben disgregats, i això promou la creació de cabdells neurofibril·lars originats per la hiperfosforilació de tau.

1.3.- Efectes de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques

Les proteïnes plasmàtiques d'origen boví i porcí s'utilitzen com a alternativa a l'ús dels antibiòtics com a promotors de creixement des de fa dues dècades (15). El plasma assecat per polvorització (SDP) s'obté de la sang d'animals destinats al consum humà. Aquest suplement s'adquireix afegint anticoagulant a la sang, i després aquesta se centrifuga per eliminar els eritròcits. El plasma obtingut s'asseca mitjançant polvorització. Aquest tractament permet mantenir l'activitat biològica de pèptids i proteïnes del plasma (16). L'SDP s'utilitza per a suplementar el pinso, i està constituït en un 78% per proteïnes. D'aquestes proteïnes el 50% és albúmina, un 25% globulina (α , β i γ), un 5 % fibrina i un 20 % altres proteïnes com haptoglobulina, transferrina, factors de creixement entre d'altres proteïnes i pèptids (17).

La prohibició de l'ús d'antibiòtics com a promotors del creixement per part de la Unió Europea va causar un augment en la recerca de dietes que milloressin el maneig dels trastorns intestinals associats al deslletament i promoguessin el creixement en animals lactants. La suplementació amb SDP redueix els nivells de citocines pro-inflamatòries durant aquest període i promou el creixement dels animals (18). El seu mecanisme d'acció es basa en atenuar la resposta del teixit limfoide associat a l'intestí o GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), que regula respostes immunitàries intestinals. A través del sistema immunitari comú a les mucoses, aquest efecte immunomodulador es reflecteix en altres àrees mucosals (19).

1.4.- Models animals per a l'estudi de la senescència

En models animals d'Alzheimer i Parkinson el sistema nerviós central pateix una resposta immunitària exacerbada derivada de la inflamació sistèmica (20). Els ratolins SAMP són ratolins que mostren un envelliment accelerat i per tant permeten estudiar diferents patologies associades a l'edat. Cada soca de ratolins SAMP mostra un fenotip específic. En concret, els ratolins SAMP8 mostren dèficit d'aprenentatge i memòria, i un estat inflamatori basal que augmenta amb l'edat (21).

Aquests dèficits es deuen a l'expressió anormal d'agents anti-oxidants i anti-inflamatoris, acumulació de pèptids neurotòxics, hiperfosforilació de tau, estrès del reticle endoplasmàtic, autofàgia i disrupció del metabolisme i de la microbiota intestinal (22). Tots aquests mecanismes sinèrgicament causen l'envelliment accelerat característic d'aquesta soca. La similitud als processos causants de moltes malalties neurodegeneratives en humans fan dels SAMP8 un model molt interessant per al seu estudi.

2.- Objectius

L'envelliment implica un procés d'inflamació crònica de baixa intensitat que pot promoure l'aparició de malalties neurodegeneratives. Durant els últims anys, la suplementació amb SDP ha demostrat disminuir la resposta inflamatòria en diferents models com per exemple la inflamació intestinal induïda per l'enterotoxina B d'*S. aureus* (23–25), la inflamació pulmonar induïda per lipopolisacàrid (26) i també en ratolins sotmesos a estrès durant l'embaràs (27).

Davant l'evident increment de l'esperança de vida i l'estat inflamatori característic de malalties neurodegeneratives com la MA, l'objectiu d'aquest treball és determinar si la suplementació amb SDP pot prevenir o atenuar la seva progressió. Per a dur a terme aquest objectiu general, s'han establert els següents objectius específics:

1. Determinar si la suplementació amb SDP modifica l'evolució del pes corporal de ratolins senescents.
2. Analitzar el paper de la suplementació amb SDP en l'evolució dels marcadors de la MA.
3. Estudiar els efectes de la suplementació amb SDP sobre la neuroinflamació.

3.- Materials i mètodes

3.1.- Disseny experimental

Es van comprar 36 ratolins mascles subministrats per l'empresa Envigo (Bresso, Itàlia). Els animals es van mantenir a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació sota condicions òptimes de temperatura (18-22 °C) i humitat (55 %). El protocol utilitzat per a realitzar l'estudi va ser prèviament aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i pel Govern de la Generalitat de Catalunya (referència 484/16 i 9272 respectivament).

Els animals es van separar als 2 mesos d'edat en grups de pes homogeni. Des del deslletament fins als 2 mesos van ser alimentats amb el pinso convencional d'estabulari (Envigo, Bresso, Itàlia). A partir dels 2 mesos fins als 4 mesos els ratolins van ser alimentats amb els pinsos experimentals (**Figura 1**). Els dos pinsos són iguals en quant a calories i a contingut de nitrogen, és a dir, de proteïnes. El contingut de nitrogen en el pinso control es va compensar afegint proteïnes làctiques. La composició dels diferents pinsos es troba detallada a la **Taula 1**. Des dels 2 mesos fins als 6 mesos es va fer un seguiment del consum de pinso i aigua, així com del pes dels animals.

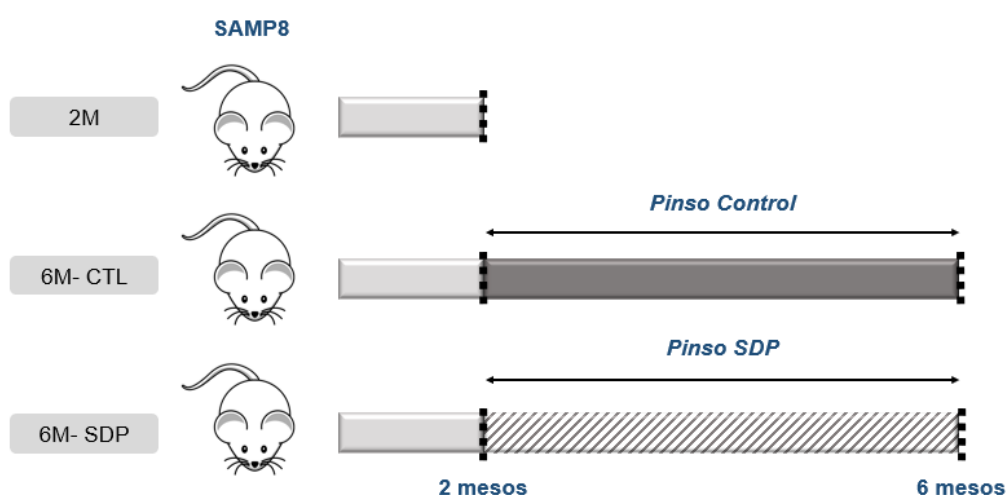


Figura 2. Disseny experimental emprat en l'estudi. Grup **2M**: animals de 2 mesos d'edat alimentats amb pinso d'estabulari; grup **6M-CTL**: animals alimentats amb pinso experimental control dels 2 als 6 mesos; grup **6M-SDP**: animals alimentats amb pinso experimental SDP dels 2 als 6 mesos.

Els animals es van sacrificar en la mateixa franja horària per evitar les possibles variacions degudes al ritme circadiari. Els animals es van anestesià amb ketamina a 90 mg/Kg (Imalgene®, Rhone Mèrieux, França) i xilacina a 10 mg/Kg (Rompun®, Bayer Leverkusen, Alemanya). Posteriorment, es va obtenir sang per punció cardíaca. Tot seguit, es van extreure els còrtex. Immediatament es van congelar amb nitrogen líquid i es van mantenir a -80 °C fins al moment de processar-les.

Taula 1. Composició dels pinsos experimentals

Ingredients	Pinso control	Pinso SDP
	g/kg	
SDP ¹	-	80,0
Llet en pols descremada	530,7	340,5
Blat de moro	199,3	308,8
Sacarosa	94,5	94,5
Oli de soja	70	70
Cel·lulosa	50	50
AIN-93-G-MX (94046) ²	35	35
AIN-93 VX (94047) ²	15	15
DL-Metionina	2,5	3,2
Bitartrat de colina	3	3

¹SDP (*Spray-dried plasma*) APC-Europe (Granollers, Espanya). ²AIN-93 MX, I AIN-93 VX, van ser subministrats per Envigo (Bresso, Itàlia).

3.2.- Homogeneïtzació de les mostres

Les mostres de cervell es van homogeneïtzar mitjançant un politró (Scientific Inc, Oxford, Regne Unit) en tampó de lisi (**Taula 2**), el qual facilita l'extracció de proteïnes. Les mostres es van centrifugar a 20.000 *g* i es va separar el sobrenedant per a utilitzar-lo posteriorment en la determinació de proteïnes, en la realització del Western blot i també en els kits ELISA. Totes les alíquotes es van conservar a -80 °C fins al moment de les determinacions.

Taula 2. Composició del tampó de lisi

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

Tots els productes han estat subministrats per Sigma Aldrich (St. Louis, MI, EUA). DTT: ditiotreitòl; EDTA: àcid etilendiaminotetracètic; PMSF: fluorur de fenilmetilsulfonil.

3.3.- Determinació de proteïnes

La concentració de proteïnes es va calcular seguint el mètode de Bradford, on s'utilitza albúmina sèrica bovina (BSA) per a realitzar una recta patró. Aquesta recta consisteix en una sèrie de concentracions de proteïnes conegudes on interpolar els valors d'absorbància de les mostres. El colorant que es va utilitzar va ser el colorant Bio-Rad® (Bio-Rad, Hercules, EUA), que conté Coomassie Brilliant Blue G-250, el qual forma un complex amb les proteïnes de color blau quan està en medi àcid.

La recta patró es va preparar a partir d'una solució mare de BSA 1 mg/mL, i es van fer dilucions en sèrie amb PBS. A continuació, es va preparar el colorant Bio-Rad®, diluït en aigua miliQ a una proporció 1:5 i es va filtrar a través d'un filtre Whatman® (Whatman International, Maidstone, Regne Unit). Per a preparar cada mostra es van afegir 15 µL d'àcid fòrmic, 35 µL de la mostra i 0,5 ml del colorant Bio-Rad® diluït. L'absorbància es va mesurar en un espectrofotòmetre Sunrise (Tecan, Männedorf, Suïssa) a 595 nm. La concentració de proteïnes de cada mostra es va calcular interpolant el valor d'absorbància de cada mostra a la recta patró de BSA mitjançant el programa GraphPad Prism® ver. 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

3.4.- Western Blot

El Western Blot és una tècnica analítica utilitzada per a detectar i identificar proteïnes específiques en una mostra. Per començar, és necessari

desnaturalitzar les proteïnes de les mostres. Per a solubilitzar la mostra es va barrejar la quantitat de mostra corresponent a 30 µg de proteïna en un tampó 5X Laemmli i es va escalfar a 95 °C en un bany sec durant 5 min.

A continuació, es va realitzar l'electroforesi, en la qual les proteïnes queden separades segons el seu pes molecular i la seva càrrega. El primer pas per a l'electroforesi és preparar els gels de poliacrilamida entre el 8 i el 12 %. Aquests gels tenen dues zones: la zona inferior o gel separador, que permet separar les proteïnes, i la zona superior o gel concentrador, que conté els pous on s'agrupa la mostra abans de començar a separar-se. Per a separar les proteïnes es van sotmetre a un camp elèctric de 80 V. Les proteïnes separades es van transferir a una membrana de fluorur de polivinil (PVDF) aplicant un camp elèctric. La transferència es va realitzar a 300 mA durant 2 h a 4 °C.

Finalment, es va realitzar una immunodetecció amb anticossos específics per a la proteïna d'interès. La membrana de PVDF es va incubar en una solució de bloqueig que contenia llet en pols al 5 % durant 2h, a temperatura ambient i en agitació constant, per tal d'evitar unions inespecífiques. Tot seguit, les membranes es van incubar amb els anticossos primaris durant tota la nit a 4 °C. Els anticossos primaris van ser: β -amiloide (1/500, Abcam, Cambridge, Regne Unit); tau (1/1000, Millipore, Billerica, MA, EUA); p-tau (Ser396, 1/1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); CDK5 (1/1000, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, EUA); p-CDK5 (1/1000, Abcam, Cambridge, Regne Unit); GSK3 (1/1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA); p-GSK3 (Ser9, Abcam, Cambridge, Regne unit) i β -actin (1/30000, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA). Després de realitzar diferents rentats per eliminar l'anticòs primari, es van incubar durant 2 h amb l'anticòs secundari. Per acabar, les bandes de proteïna es van revelar utilitzant l'aparell ChemiDOC XRS (Bio-Rad, Hercules, EUA) i es van quantificar la densitat de les bandes amb el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>).

3.5.- ELISA

L'assaig per immunoabsorció lligat a enzims (ELISA) és una tècnica de laboratori que permet detectar antígens i fragments de proteïnes de manera específica. Aquesta detecció es realitza a partir de la immobilització de l'antigen a la placa a través d'un anticòs de captura. La seva detecció es fa a partir d'un

altre anticòs enllaçat a un enzim, que genera un producte amb color que és detectat per espectrofotometria.

Els còrtex es van homogeneïtzar en un tampó fred 5 M de guanidina-HCl/50 mM Tris que contenia un cocktail inhibidor de proteases al 2 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA). La quantificació dels fragments d'amiloides β_{40} i β_{42} es va realitzar mitjançant els kits d'ELISA mouse A β_{40} i A β_{42} (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segons les instruccions del proveïdor.

3.6.- Expressió gènica per RT-PCR

Es va determinar l'expressió de les citocines interleuquina (IL)-17, IL-18 i el factor de creixement transformant β (TGF- β) mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en temps real.

En primer lloc es va aïllar l'RNA del còrtex seguint el protocol Garcia-Just et al., 2020 (28). Breument, es van homogeneïtzar les mostres amb Purezol™ (Bio-Rad, Hercules, EUA) i es va deixar actuar durant 10 min a 4 °C. A continuació, es va afegir cloroform (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), es va incubar durant 10 min, i es va centrifugar a 12.000 g a 4 °C durant 20 min. Seguidament, es va recollir la fase aquosa en un tub nou i es va afegir la mateixa proporció d'isopropanol fred (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) perquè precipités l'RNA. Posteriorment, es va tornar a centrifugar a 12.000 g a 4 °C durant 20 min i el precipitat es va rentar amb etanol 70 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). Es va centrifugar a 8.000 g a 4 °C durant 5 min i es va eliminar completament l'etanol. Finalment, les mostres es van resuspendre amb aigua lliure d'RNAsa (Invitrogen, Waltham, MA, EUA).

Aquest RNA es va quantificar utilitzant el Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, EUA). Per a determinar la concentració d'RNA es va mesurar l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. L'absorbància a 260 nm indica la concentració d'RNA i el quocient entre l'absorbància a 260 nm i a 280 nm indica la puresa de la mostra, que cal que sigui molt proper a 2. Totes les mostres van obtenir un quocient superior a 1,94.

L'RNA es va convertir en cDNA a través d'una reacció de retrotranscripció. Per a cada mostra es van retrotranscriure 2 μ g d'RNA utilitzant el kit SyBr®

GreenER Universal Master Mix (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Finalment, es va dur a terme la RT-PCR. Per a fer-la es van utilitzar encebadors específics per cada gen d'interès (**Taula 3**) a 0,02 µmol/L i SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, EUA).

Taula 3. Seqüències dels encebadors utilitzats

Gen	Forward	Reverse	Mida
<i>Il-17</i>	AGCAGCGATCATCCCTCAA	TTGCGCCAAGGGAGTTAAA	104 bp
<i>Il-18</i>	GTTTACAAGCATCCAGGCACAG	GAAGGTTTGAGGCGGCTTTC	151 bp
<i>Tgf-β</i>	CAGTGGCTGAACCAAGGAGACGG	CCCCGACGTTTGGGGCTGATC	119 bp
<i>Hprt1</i>	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT	CAGATTCAACTTGCGCTCATC	163 bp

Il-17: interleuquina 17; *Il-18*: interleuquina 18; *Tgf-β*: factor de creixement transformador β, *Hprt1*: Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1.

3.7.- Test de reconeixement d'objectes

Per tal de conèixer els efectes de la suplementació amb SDP sobre les funcions cognitives es va realitzar el test de reconeixement d'objectes (NORT; *Novel object recognition test*). Aquest test s'utilitza per a conèixer els efectes d'una intervenció sobre la memòria a curt i a llarg termini. Consisteix en determinar la diferència de temps d'exploració entre un objecte nou i un objecte conegut, ja que els ratolins tendeixen a explorar durant menys temps un objecte familiar que un de nou (29).

El laberint que es va utilitzar per a realitzar el test va ser de metacrilat negre de dos braços 25 cm de llarg x 5 cm d'amplada x 20 cm d'alçada disposats en un angle de 90 graus. Abans de començar el test, es va realitzar una fase d'habitució al laberint per a que el canvi d'ambient no modifiqués la conducta dels animals. Aquesta fase consisteix en col·locar cada animal en el laberint durant 10 min al dia, 3 dies abans de realitzar la següent fase, la familiarització.

Durant la familiarització es van col·locar dos objectes idèntics, un a cada extrem del laberint. A continuació es va situar al ratolí en el punt d'intersecció dels dos braços del laberint, i se'l va permetre explorar durant 10 min. Es va calcular el temps d'exploració de cada objecte, considerant aquest com el

temps en el que el nas del ratolí està a menys d'1 cm de distància de l'objecte però sense rosegat-lo.

El primer test de retenció avalua la memòria a curt termini. Es va realitzar 2 h després de la fase de familiarització. En un dels extrems del laberint es va deixar l'objecte familiar, i en l'altre extrem es va col·locar un objecte diferent. En aquesta fase també es va calcular el temps d'exploració de cada objecte deixant al ratolí 10 min per a explorar. En aquesta fase es va calcular l'índex de discriminació (ID), entès com:

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

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

Al cap de 24h de la fase de familiarització, es va realitzar el segon test de retenció. Aquest avalua la memòria a llarg termini. En aquesta fase es va mantenir l'objecte conegut de les fases anteriors en el mateix braç del laberint, i es va canviar l'objecte nou del primer test de retenció per un altre de diferent. El procediment va ser el mateix que en la prova de memòria a curt termini i també es va calcular l'ID.

3.8.- Anàlisi estadístic

Les dades es mostren com a mitjana $\pm$ error estàndard de la mitjana (SEM). Es va aplicar el test de Grubb's per determinar si hi havia valors fora de rang i el test de Shapiro-Wilk per conèixer si la mostra tenia una distribució normal. Com totes les dades van presentar una distribució normal, l'increment de pes dels ratolins alimentats amb les dues dietes es va analitzar mitjançant el test T-Student. A la resta de variables es va aplicar un anàlisi ANOVA d'una via. L'anàlisi estadística es va dur a terme amb el programa GraphPad Prism, versió 8 (La Jolla, CA, EUA). Es va considerar significativa una diferència de $p < 0,05$.

4.- Resultats

4.1.- Consum de pinso i d'aigua

La ingesta diària de pinso en els 2 grups experimentals va ser similar, d'entre 4-5 g per ratolí al dia, i en el cas de l'aigua entre 6-8 mL per ratolí al dia tal i com es pot veure en la **Taula 4**.

Taula 4. Consum de pinso i aigua dels diferents grups experimentals

Quinzenes	Consum de pinso (g)/dia/ratolí		Consum d'aigua (g)/dia/ratolí	
	6M-CTL	6M-SDP	6M-CTL	6M-SDP
1	5,0 ± 0,09	5,1 ± 0,10	7,2 ± 0,34	6,8 ± 0,39
2	5,2 ± 0,10	5,1 ± 0,10	6,8 ± 0,27	6,9 ± 0,43
3	5,0 ± 0,11	5,1 ± 0,12	6,6 ± 0,30	6,9 ± 0,46
4	4,9 ± 0,08	5,1 ± 0,09	6,5 ± 0,24	7,4 ± 0,52
5	5,0 ± 0,09	4,9 ± 0,10	7,2 ± 0,45	7,3 ± 0,43
6	4,8 ± 0,12	4,8 ± 0,09	7,1 ± 0,24	7,6 ± 0,40
7	5,0 ± 0,09	5,0 ± 0,08	7,2 ± 0,24	7,5 ± 0,48
8	5,0 ± 0,09	5,0 ± 0,09	7,0 ± 0,37	7,2 ± 0,44

Dades expressades com a mitjana ± SEM (n = 12 animals per grup).

4.2.- Evolució i increment del pes corporal

El pes corporal als 2 mesos d'edat va ser pràcticament el mateix en els dos grups experimentals (**Figura 3A**).

Durant els 4 mesos de consum de pinso experimental els ratolins dels 2 grups van augmentar de pes, tot i que la taxa d'increment de pes va ser superior en els ratolins alimentats amb el pinso suplementat amb l'SDP ($p < 0,001$).

El guany de pes total durant el període experimental va ser superior en els ratolins alimentats amb pinso SDP respecte als ratolins control ($p < 0,008$, **Figura 3B**)

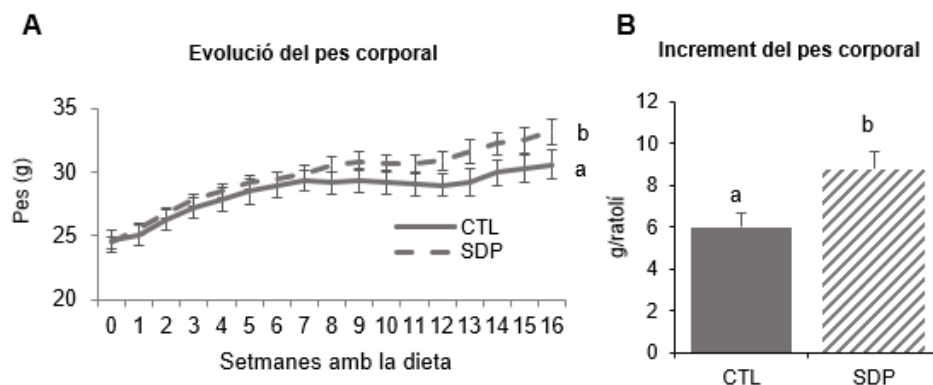


Figura 3. Evolució del pes corporal dels ratolins durant el període experimental (A) i increment del pes corporal (B). Els resultats estan expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n = 12$ animals per grup). Els grups amb lletra diferent presenten diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$).

4.3.- Memòria a curt i llarg termini

El NORT consta de quatre fases, la fase d'aclimatació, la de familiarització, el primer test de retenció (que avalua la memòria a curt termini), i el segon test de retenció (que avalua la memòria a llarg termini).

L'índex d'exploració es calcula comparant el temps que passen els ratolins explorant els objectes situats als dos extrems del laberint, respecte al temps total dins aquest. En aquest cas no es van trobar diferències significatives en quant a l'índex d'exploració entre grups (**Figura 4A**). A més, els ratolins dels tres grups experimentals van destinar un temps d'exploració semblant entre els dos objectes (**Figura 4B**).

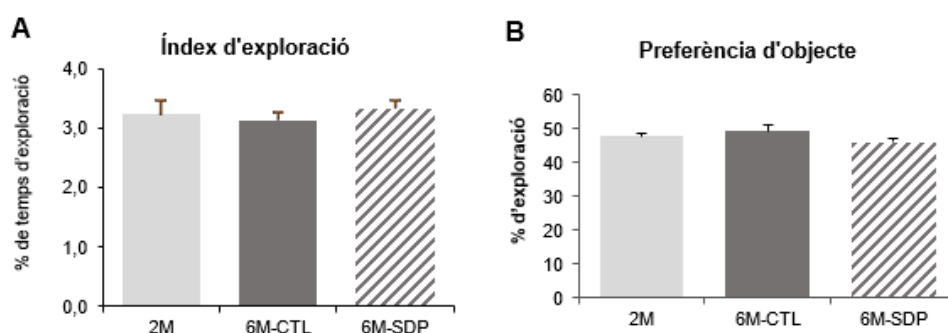


Figura 4. Índex d'exploració (A) i preferència d'objecte (B) dels ratolins realitzat durant la fase de familiarització. Els resultats estan expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n = 11-12$ animals per grup).

S'ha observat que quan els ratolins exploren el doble de temps l'objecte nou que el vell tenen memòria suficient com per diferenciar els dos objectes (30). Aquest fet suposa que ID sigui de 0,2 o superior. L'ID va disminuir significativament als 6 mesos d'edat en els ratolins alimentats amb pinso control ($p = 0,005$, **Figura 5A**). En canvi, els ratolins alimentats amb pinso SDP van conservar millor la memòria a curt termini als 6 mesos respecte els ratolins de la mateixa edat alimentats amb pinso control ($p = 0,024$). Als 2 mesos d'edat, el 92,9 % de ratolins van presentar memòria, mentre que als 6 mesos van ser el 45,5 % en el grup control ($p < 0,001$, **Figura 5B**). Aquest percentatge va augmentar fins al 92,9 % en els ratolins senescents alimentats amb pinso SDP ($p < 0,001$).

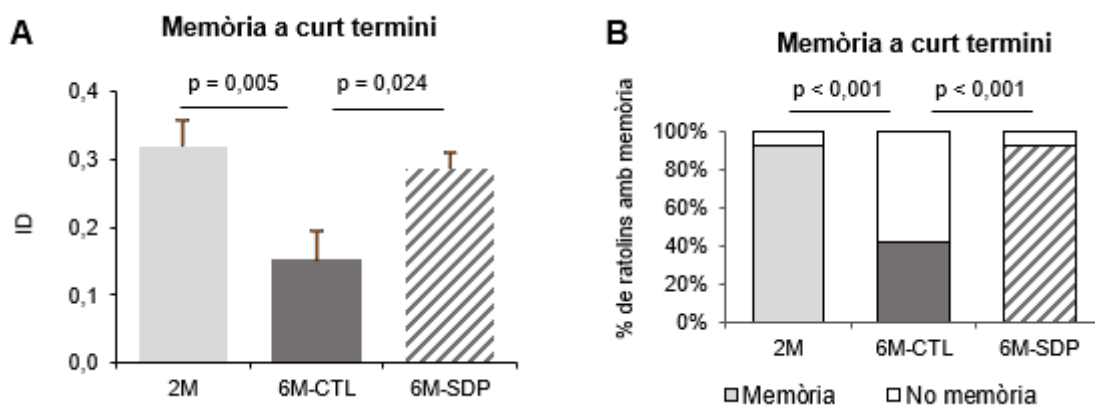


Figura 5. ID (A) i percentatge de ratolins amb memòria (B) a curt termini. Els resultats estan expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n = 11-12$ animals per grup). En el panell (B), les barres plenes representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació superior a 0,2 en el primer test de retenció. Les barres sense ompliment representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació inferior a 0,2.

La memòria a llarg termini es va avaluar en el segon test de retenció. Aquest es va dur a terme 24 h després de la fase de familiarització. Es va observar que als 6 mesos d'edat, els ratolins alimentats amb pinso control tenien un ID més baix que els ratolins joves ($p = 0,014$; **Figura 6A**). En canvi, la suplementació amb SDP va prevenir l'efecte de l'envelliment sobre la memòria a llarg termini als 6 mesos d'edat ($p = 0,017$). Un 78,6 % dels ratolins de dos mesos d'edat van tenir un ID superior a 0,2 (**Figura 6B**). Aquest percentatge va disminuir als 6 mesos d'edat en els ratolins alimentats amb pinso control ($p < 0,001$). En canvi, els animals suplementats amb SDP van presentar un percentatge similar als ratolins de 2 mesos d'edat.

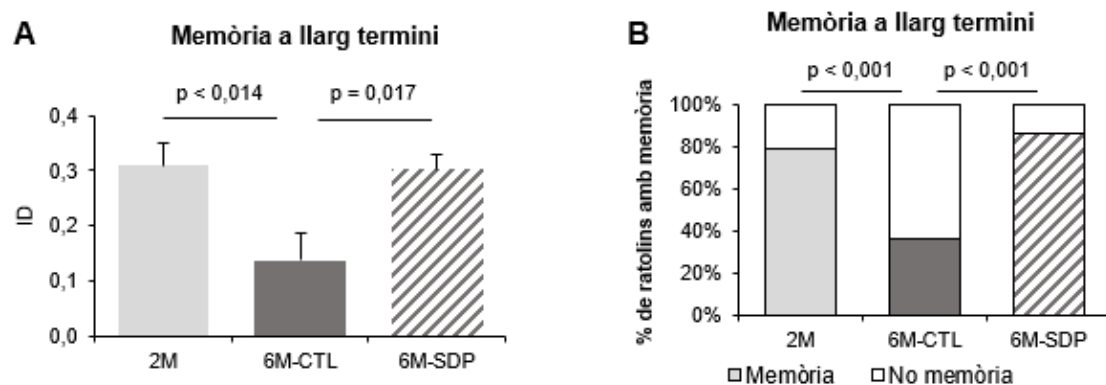


Figura 6. ID (A) i percentatge de ratolins amb memòria (B) a llarg termini. Els resultats estan expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n = 11-12$ animals per grup). En el panell (B), les barres plenes representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació superior a 0,2 en el segon test de retenció. Les barres buides representen el percentatge de ratolins amb un índex de discriminació inferior a 0,2.

4.4.- Marcadors característics de la malaltia d'Alzheimer

La concentració d'A β_{40} i A β_{42} estaven augmentades en el còrtex dels ratolins de 6 mesos d'edat ($p < 0,001$ en els dos casos; **Figura 7A** i **Figura 7B**) i la suplementació amb SDP va prevenir l'augment d'A β_{40} ($p = 0,0032$). L'abundància relativa de β -amiloide no va canviar ni en l'envelliment ni amb la suplementació amb l'SDP (**Figura 7C**).

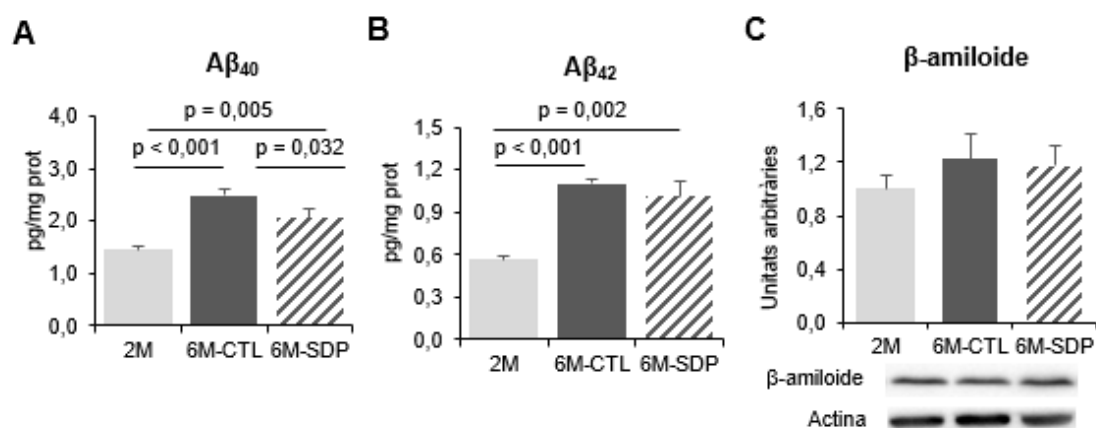


Figura 7. Concentració dels segments A β_{40} (A), A β_{42} (B) i abundància de β -amiloide (C) al còrtex. Resultats expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n=8-9$ animals per grup). Sota la figura, imatges representatives del Western Blot de la proteïna β -amiloide i d'actina (C).

En la **Figura 8A** es mostra com l'abundància de la tau fosforilada va augmentar als 6 mesos d'edat en el grup alimentat amb el pinso control ($p = 0,009$), mentre que aquest increment va ser atenuat en els ratolins alimentats amb el pinso suplementat amb SDP ($p = 0,032$).

L'abundància de GSK3 β fosforilada va disminuir durant l'envelliment ($p = 0,017$, **Figura 8B**), mentre que aquesta va ser major en el grup de ratolins alimentats amb pinso SDP en comparació amb els ratolins alimentats amb el pinso control ($p = 0,041$).

Respecte l'abundància de la CDK5 fosforilada, aquesta va augmentar en els ratolins senescents ($p = 0,008$, **Figura 8D**). La suplementació dietètica amb l'SDP va atenuar aquest efecte en els ratolins de 6 mesos suplementats ($p = 0,035$).

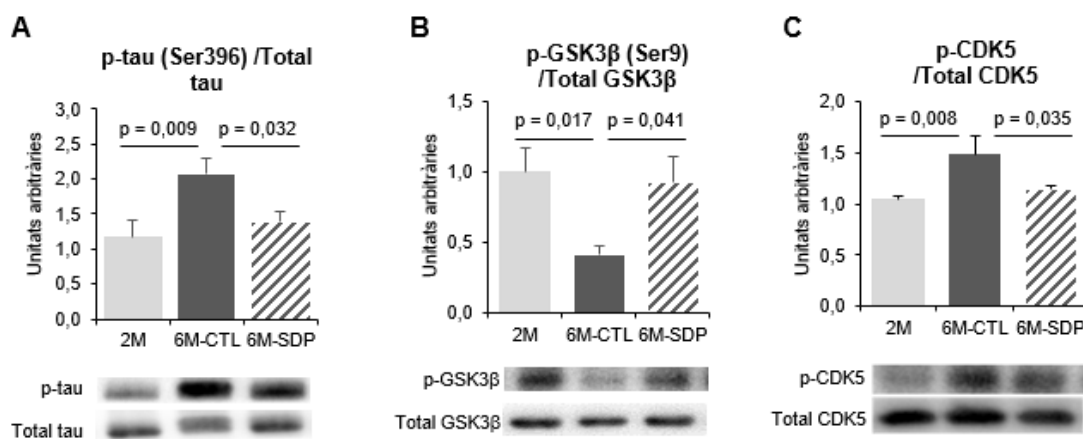


Figura 8. Abundància de p-tau (A), pGSK3 β (B) i pCDK5 (C) al cervell. Resultats expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n=8-9$ animals per grup). Sota les gràfiques hi ha imatges representatives del Western Blot de les proteïnes respectives. GSK3 β : Glucogen sintasa quinasa-3 beta, CDK5: Ciclina dependent de quinasa 5.

4.5.- Neuroinflamació

Tant la IL-17 com la IL-18 són citocines pro-inflamatòries. La seva expressió al còrtex cerebral va augmentar en els ratolins envellits ($p = 0,012$ i $p = 0,033$ respectivament, **Figura 9A** i **Figura 9B**). La suplementació dietètica amb SDP va prevenir aquest efecte en els ratolins senescents ($p = 0,005$ i $p = 0,004$ respectivament).

El Tgf- β és una citocina reguladora que fa que disminueixi la secreció de citocines inflammatòries. La seva expressió augmenta en els ratolins envellits i alimentats amb pinso SDP respecte als alimentats amb pinso control ($p = 0,029$; **Figura 9C**).

Si ens fixem en la relació IL-17/Tgf- β , als 6 mesos d'edat va ser major en el grup control que en el grup alimentat amb el pinso SDP ($p = 0,008$, **Figura 9D**). En quant a la relació IL-18/Tgf- β , tot i que l'envelliment no la va modificar, observem que va ser menor en els ratolins envellits alimentats amb pinso SDP comparat amb els alimentats amb pinso control ($p = 0,004$; **Figura 9E**).

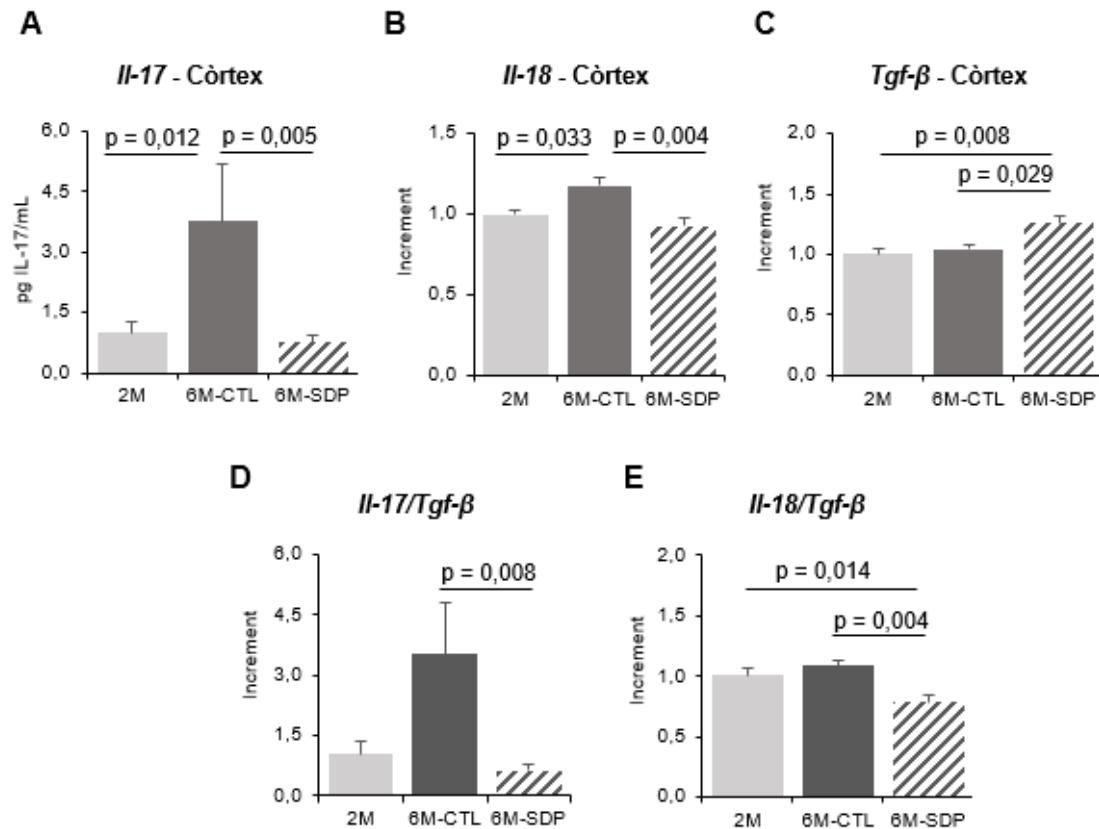


Figura 9. Expressió de la IL-17 (A), IL-18 (B), Tgf- β (C), ratio IL-17/Tgf- β (D) i ratio IL-18/Tgf- β (E) al còrtex. Els resultats estan expressats com a mitjana $\pm$ SEM ($n=8-9$ animals per grup); IL: interleucina, Tgf- β : factor de creixement transformador beta

5.- Discussió

L'envelliment va acompanyat d'un augment de l'estat inflamatori basal (4). Això afavoreix que apareguin moltes malalties característiques d'aquesta etapa, com per exemple les malalties neurodegeneratives. A més, al llarg de l'envelliment el sistema immunitari va perdent funcionalitat, la qual cosa promou una inflamació persistent de baixa intensitat. A aquest fenomen se'l coneix com a immunosenescència (31).

La inflamació persistent de baix grau es caracteritza per un augment de la producció de citocines i altres mediadors inflamatoris (32). La prevenció d'aquesta al llarg de la vida és vital, precisament per a evitar l'aparició de les malalties associades a l'envelliment. La utilització de complements nutricionals és una eina a tenir en compte a l'hora de combatre la inflamació associada a l'envelliment (33).

Els ratolins SAMP8 es caracteritzen per envellir de manera accelerada (22) i s'utilitzen de forma habitual com a model per a l'estudi de la MA i altres malalties relacionades amb la memòria i l'aprenentatge. En aquest estudi s'han utilitzat aquests ratolins per estudiar els efectes de l'SDP sobre l'envelliment tenint en compte l'evolució del pes corporal i diferents marcadors característics de la MA.

5.1.- Efecte de la suplementació amb SDP sobre el pes corporal

La malnutrició i, en conseqüència, la pèrdua de pes corporal són molt comuns en l'evolució de les malalties neurodegeneratives (9). La suplementació dietètica amb SDP va induir un major augment de pes dels ratolins envellits comparat amb els efectes de la dieta control. En aquest cas, els dos pinsos tenien la mateixa densitat energètica i el mateix contingut en proteïnes (16).

Alguns estudis realitzats en garrins acabats de deslletar també mostren una millora en el creixement quan els animals són alimentats amb el pinso SDP (34). En aquests estudis, al contrari al que hem observat nosaltres, també es mostra un augment significatiu de la ingesta de pinso (35). A més, aquests animals presenten menys infeccions a nivell intestinal i menor incidència de diarrea, el que podria conduir en un millor rendiment del creixement (36).

5.2.- Efecte de la suplementació amb SDP sobre l'evolució de la malaltia d'Alzheimer

En aquest estudi la suplementació dietètica amb SDP a partir dels 2 mesos d'edat va prevenir la pèrdua de memòria a curt i a llarg termini dels ratolins senescents. Això suggereix que la plasticitat sinàptica i la integritat neuronal estaven millor conservades en els ratolins alimentats amb el pinso suplementat amb l'SDP que en els del grup control, tal com es va observar en un estudi anterior (28).

Els efectes de l'envelliment sobre el deteriorament cognitiu i la pèrdua de memòria venen acompanyats d'un perfil inflamatori clar. És per això, que un suplement que pot reduir la inflamació intestinal i perifèrica podria reduir la neuroinflamació, ja que els dos teixits es troben connectats a través de l'eix intestí-cervell (33).

La presència de les plaques amiloides, els cabdells neurofibril·lars i la fosforilació de la proteïna tau, són les principals manifestacions patològiques de la MA (37). S'ha descrit que la disminució de les plaques β -amiloide i de la fosforilació de tau afavoreix l'aprenentatge i la memòria en ratolins senescents (38).

Els resultats obtinguts indiquen que als 6 mesos d'edat els ratolins SAMP8 presentaven un augment dels precursors amiloides ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$) i de la fosforilació de tau, fet que evidencia que aquests animals ja mostraven les primeres manifestacions patològiques de la MA. Aquests esdeveniments són conseqüents amb el deteriorament cognitiu que té aquesta soca de ratolins a aquesta edat i que es reflecteix en una reducció de la memòria a curt i llarg termini

D'altra banda, els animals alimentats amb el pinso suplementat amb SDP, van mostrar una menor abundància d'aquests marcadors característics de la MA, i per tant es podria considerar que aquest suplement té un cert efecte neuroprotector.

La hiperfosforilació de tau es deu al desequilibri de l'acció de diferents quinases i fosfatases, i porta a l'acumulació de NFTs i a la degeneració neuronal (11). La

proteïna tau forma part del citoesquelet de les neurones on participa en l'estabilització dels microtúbuls, i per tant, ajuda a mantenir la morfologia cel·lular i la funcionalitat axonal. Algunes de les principals quinases involucrades en les modificacions de tau i la degeneració neuronal són GSK3 β (quinasa 3 β de la glicogen sintasa) i CDK5 (quinasa 5 ciclina-depenent). GSK3 β , a més del paper en la patogènesi de les NFTs també promou vies proinflamatòries mitjançant l'activació del factor nuclear kappa B (NF- κ B). De fet, s'inhibeix quan es fosforila a Ser9, fet que estimula els seus efectes fisiològics relacionats amb la síntesi de glucosa (39) i redueix els nivells de NFTs (40).

D'altra banda, un augment descontrolat de CDK5 causa la deposició de pèptids β -amiloide, alteracions en la funcionalitat sinàptica, apoptosi neuronal i disfunció mitocondrial (41), processos que encaixen amb la patogènia de la MA. En el nostre estudi els ratolins senescents mostren una reducció de l'abundància de p-GSK3 β i un increment de p-CDK5 i aquests efectes són previnguts quan els ratolins reben la suplementació amb l'SDP. Aquests resultats es podrien relacionar amb la millora de la memòria degut a l'increment de la densitat sinàptica trobada en aquests ratolins (28).

Les malalties neurodegeneratives es caracteritzen per la pèrdua progressiva de poblacions neuronals, que amb el temps condueix a una pèrdua de memòria, de la funció motora i de l'habilitat de dur a terme tasques quotidianes (42). Existeix evidència sobre la importància de diferents vies del sistema immunitari en la progressió d'aquestes malalties (42). Una elevada expressió de la IL-17 i la activació de la seva via de senyalització estan implicats en la neurodegeneració i la pèrdua de memòria (43). Concretament, s'ha relacionat una concentració elevada d'aquesta citocina amb el grau de severitat i el progrés de la MA en pacients (44). A més, la neutralització de la IL-17 amb anticossos redueix alguns marcadors de neurodegeneració i la pèrdua de memòria en models animals (45).

La IL-18 incrementa la producció de β -amiloide, i l'expressió de les quinases GSK3 β i CDK5, que promouen la hiperfosforilació de tau, accelerant la progressió de la MA (46). En canvi, en ratolins knockout per IL-18 s'ha observat

una menor activació de cèl·lules de la micròglia (la principal forma de defensa en el sistema nerviós central), així com una menor pèrdua neuronal (47).

El Tgf- β és un gran inhibidor del creixement de diferents tipus cel·lulars, i participa en la regulació de la senescència cel·lular (48). A més, redueix la reactivitat de la micròglia *in vitro*, que acostuma a estar molt activada en la MA (49). El Tgf- β modula l'expressió de gens implicats en la proliferació cel·lular, la regulació del cicle cel·lular, la producció d'espècies reactives de l'oxigen, la reparació del DNA, regulació de telòmers i autofàgia. En la MA s'ha observat una alteració de la senyalització de Tgf- β (50).

En el nostre estudi, el pinso suplementat amb SDP va disminuir l'expressió de les citocines pro-inflamatòries IL-17 i IL-18 i va augmentar els nivells del mediador anti-inflamatori Tgf- β en els ratolins de 6 mesos. En conseqüència, la suplementació amb SDP promovia un perfil més anti-inflamatori, com mostra la reducció de la relació d'IL-17/Tgf- β i d'IL-18/Tgf- β . Aquests resultats juntament amb la reducció de p-tau i la prevenció de la pèrdua de memòria es podrien associar a un possible efecte neuroprotector de l'SDP. Els efectes anti-inflamatoris de l'SDP són consistents amb estudis anteriors on aquest suplement disminueix la producció de citocines pro-inflamatòries com IL-6, IL-1 β i TNF- α , i augmenta la concentració d'IL-10 cerebral en ratolins SAMP8 de 6 mesos d'edat (28).

6.- Conclusions

De l'anàlisi dels efectes de l'envelliment i de la suplementació dietètica amb SDP sobre marcadors característics de la malaltia d'Alzheimer (MA) es pot concloure que:

- La suplementació amb SDP afavoreix el guany de pes en ratolins senescents.
- La suplementació dietètica amb SDP mostra un cert paper neuroprotector davant la MA, ja que redueix marcadors característics d'aquesta patologia, com són la p-tau i les plaques amiloides, reduint la neuroinflamació i la pèrdua de memòria.

7.- Bibliografia

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194.
2. Boccardi V, Comanducci C, Baroni M, Mecocci P. Of energy and entropy: the ineluctable impact of aging in old age dementia. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
3. Diack AB, Alibhai JD, Barron R, Bradford B, Piccardo P, Manson JC. Insights into mechanisms of chronic neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1).
4. Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2018;154(2):204–19.
5. Bettio LEB, Rajendran L, Gil-mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;
6. Marsman D, Belsky DW, Gregori D, Johnson MA, Low Dog T, Meydani S, et al. Healthy ageing: the natural consequences of good nutrition—a conference report. Vol. 57, *European Journal of Nutrition*. 2018. p. S15–34.
7. Franzago M, Santurbano D, Vitacolonna E, Stuppia L. Genes and diet in the prevention of chronic diseases in future generations. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 1;21(7).
8. Lesourd B. Nutritional factors and immunological ageing. *Proc Nutr Soc*. 2006;65(3):319–25.
9. Droogsma E, Van Asselt DZB, Scholzel-Dorenbos CJM, Van Steijn JHM, Van Walderveen PE, Van Der Hooft CS. Nutritional status of community-dwelling elderly with newly diagnosed Alzheimer's disease: Prevalence of malnutrition and the relation of various factors to nutritional status. *J Nutr Heal Aging*. 2013;17(7):606–10.
10. Ozben T, Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2019 Oct 1;72:87–9.
11. Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(5):965–80.
12. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*. 2016 Jun 1;12(6):719–32.
13. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768–74.
14. Aaseth J, Buha A, Wallace DR, Bjørklund G. Xenobiotics, trace metals and genetics in the pathogenesis of tauopathies. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(4).
15. Pierce JL, Cromwell GL, Lindemann MD, Russell LE, Weaver EM. Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs. *J Anim Sci*. 2005;83(12):2876–85.
16. Borg B, Campbel J, Polo J. Evaluation of the chemical and biological characteristics of spray-dried plasma protein collected from various locations around the world. In: *Proceedings of 33rd Annual Meeting of the American of Swine Veterinarians*. Kansas City, Missouri; 2002. p. 97–100.
17. Howell NK, Lawrie RA. Functional aspects of blood plasma proteins. Separation and characterization. *Int J Food Sci Technol*. 1987;22(2):145–51.
18. Coffey RD, Cromwell GL. The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. *J Anim Sci*. 1995;73(9):2532–9.
19. 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(10).
20. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):217–24.
 21. 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):1–14.
 22. Liu B, Liu J, Shi J. SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2020 Apr 14;75(2):385–95.
 23. Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell J, Weaver E, et al. 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):533–7.
 24. Pérez-Bosque A, Moretó M. A rat model of mild intestinal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(3):447–53.
 25. Pérez-Bosque A, Polo J, Torrallardona D. Spray dried plasma as an alternative to antibiotics in piglet feeds, mode of action and biosafety. *Porc Heal Manag*. 2016;2.
 26. Maijó M, Miró L, Polo J, Campbell J, Russell L, Crenshaw J, et al. Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury. *Br J Nutr*. 2012;107(6):867–75.
 27. Song M, Liu Y, Lee J, Che T, Soares-Almeida J, Chun J, et al. Spray-dried plasma attenuates inflammation and improves pregnancy rate of mated female mice. *J Anim Sci*. 2015;93(1):298–305.
 28. Garcia-Just A, Miró L, Pérez-Bosque A, Amat C, Polo J, Pallàs M, et al. Dietary spray-dried porcine plasma prevents cognitive decline in senescent mice and reduces neuroinflammation and oxidative stress. *J Nutr*. 2020;150(2):303–11.
 29. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 2010;215(2):244–54.
 30. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1" Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31:47–59.
 31. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):92–105.
 32. Chen JM, Jiang GX, Li QW, Zhou ZM, Cheng Q. Increased serum levels of interleukin-18,-23 and-17 in chinese patients with alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014;38(5–6):321–9.
 33. Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni L. Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mech Ageing Dev*. 2014;136–137:59–69.
 34. Balan P, Staincliffe M, Moughan PJ. Effects of spray-dried animal plasma on the growth performance of weaned piglets—A review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020;1–16.
 35. Ermer PM, Miller PS, Lewis AJ. Diet preference and meal patterns of weanling pigs offered diets containing either spray-dried porcine plasma or dried skim milk. *J Anim Sci*. 1994;72(6):1548–54.
 36. 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):1220–6.
 37. ZX Z, RP Z, DS W, YB L. Fuzhisan Ameliorates the Memory Deficits in Aged SAMP8

- Mice via Decreasing A β Production and Tau Hyperphosphorylation of the Hippocampus. *Neurochem Res* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Sep 1];41(11):3074–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27518086/>
38. Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, Ramírez M. Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology*. 2013 Jan;64:137–44.
 39. Souder D, Anderson R. An expanding GSK3 network: implications for aging research. *GeroScience*. 2019 Aug 1;41(4):369–82.
 40. Hermida M, Dinesh Kumar J, Leslie N. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul*. 2017 Aug 1;65:5–15.
 41. 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):4328–42.
 42. Hammond TR, Marsh SE, Stevens B. Immune signaling in neurodegeneration. *Immunity*. 2019;50(4):955–74.
 43. Yin YH, Wen SR, Li GZ, Wang DS. Hypoxia enhances stimulating effect of amyloid beta peptide (25-35) for interleukin 17 and T helper lymphocyte subtype 17 upregulation in cultured peripheral blood mononuclear cells. *Microbiol Immunol*. 2009;53(5):281–6.
 44. Chunfang G, Ling W, Xiaoxia L. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*. 2013;64(2):477–85.
 45. Cristiano C, Volpicelli F, Lippiello P, Buono B, Raucci F, Piccolo M, et al. Neutralization of IL-17 rescues amyloid- β -induced neuroinflammation and memory impairment. *Br J Pharmacol*. 2019;176(18):3544–57.
 46. White CS, Lawrence CB, Brough D, Rivers-Auty J. Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2017;27(2):223–34.
 47. 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):451–8.
 48. Tominaga K, Suzuki HI. TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
 49. Herrera-molina R, Von Bernhardi R. Transforming growth factor- B 1 produced by hippocampal cells modulates microglial reactivity in culture. *Neurobiol Dis*. 2005;19:229–36.
 50. Das P, Golde T. Dysfunction of TGF- β signaling in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 2006;116(11):2855–7.