



# Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària en un model d'inflamació pulmonar aguda en ratolí

Mònica Maijó Ferré

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals**  
**Departament de Fisiologia**  
**Facultat de Farmàcia**  
**Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB**

**EFFECTES DE LA SUPLEMENTACIÓ DIETÈTICA AMB  
PROTEÏNES PLASMÀTIQUES SOBRE LA RESPOSTA  
IMMUNITÀRIA EN UN MODEL D'INFLAMACIÓ PULMONAR  
AGUDA EN RATOLÍ**

Programa de Doctorat: **Biotecnologia Molecular**

Directors:

**Dra. Anna Pérez Bosque**  
Professora associada de Fisiologia

**Dr. Miquel Moretó Pedragosa**  
Catedràtic de Fisiologia

**Dr. Javier Polo Pozo**  
Responsable I+D, APC Europe SA

**Mònica Maijó Ferré**  
**Barcelona 2011**

### **III. RESULTATS**

---

L'apartat de Resultats d'aquest treball està dividit en 3 capítols, cadascun dels quals correspon a un dels objectius plantejats. La introducció, el material i mètodes, els resultats, la discussió i les conclusions que pertanyen al segon i tercer capítol estan recollits en articles publicats, exceptuant el primer capítol i els resultats annexes del segon i el tercer capítol.

## **Capítol 1. Posta a punt d'un model d'inflamació pulmonar aguda en ratolí mitjançant l'administració de lipopolisacàrid.**

En aquest capítol es mostren els resultats de la posta a punt del model d'inflamació pulmonar en ratolí en format article.



## 1.1. Introducció

Al llarg dels últims anys, s'ha observat que la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques té efectes beneficiosos en processos inflamatoris intestinals en rata (Pérez-Bosque *et al.*, 2004; 2006), porc (Peace *et al.*, 2011; Pierce *et al.*, 2005) i gall d'indi (Campbell *et al.*, 2004). En els animals de granja, el període post-deslletament sovint està associat a patologies intestinals, així com també a infeccions respiratòries. Tot i que les malalties pulmonars presenten una prevalença elevada durant el període posterior al deslletament, no hi ha gaires estudis que n'analitzin l'ús de suplementos dietètics en aquesta etapa.

Hi han diferents models animals per estudiar la lesió pulmonar aguda (LPA), els quals es basen en reproduir els desordres clínics associats a la patologia. Un dels models més utilitzat és la inducció de l'LPA mitjançant l'administració de lipopolisacàrid (LPS). L'ús de l'LPS té molts avantatges com a model d'inflamació pulmonar ja que és fàcil d'administrar, els resultats solen ser reproduïbles i ha estat acceptat com un model clínicament rellevant d'inflamació pulmonar (Harrod *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2002).

La inhalació de LPS desencadena una resposta inflamatòria aguda a l'espai aeri pulmonar (Rittirsch *et al.*, 2008). Aquesta s'inicia amb el reconeixement de l'LPS pel receptor TLR4 seguit de l'expressió de citocines proinflamatòries (com el TNF- $\alpha$ ), quimiocines, molècules d'adhesió, que dirigeixen la migració de neutròfils a través de les barreres endotelials i epitelials, que separen la sang de l'espai broncoalveolar (Lefort *et al.*, 2001; Schnyder-Candrian *et al.*, 2005).

Hi ha diferents subtipus de LPS, tot i que el més emprat és el d'*E. coli*. La bactèria *E. coli* presenta diferents soques, la soca O55:B5 ha estat àmpliament utilitzada en models d'inflamació pulmonar aguda a ratolins (Bae *et al.*, 2010; Mirzapozoba *et al.*, 2007). També trobem altres soques com l'O127:B8 (Xie *et al.*, 2009; Mabley *et al.*, 2009) o l'O26:B6 (Puljic *et al.*, 2007). L'ús de l'LPS de *S. enterica* no és tan ampli com el cas d'*E. coli*, tot i això s'ha utilitzat en alguns estudis (Zarbock *et al.*, 2008; Reutershan *et al.*, 2005). En tots els estudis la resposta als diferents subtipus de LPS provoquen una resposta inflamatòria aguda, notable i rellevant per als estudis corresponents.

Per tal de poder estudiar l'efecte dels suplementos dietètics, es va establir un model d'inflamació pulmonar aguda a ratolí. Es va escollir el model de LPS, concretament els LPS d'*E. coli* i el de *S. enterica*, per ser dues de les bactèries més comuns en els models de LPA. També es van estudiar dos temps de sacrifici per tal d'obtenir la pauta adequada.

## 1.2. Material i mètodes

### 1.2.1. Animals d'experimentació

Es van utilitzar ratolins de la soca C57BL/6 procedents de Harlan Iberica (Espanya), que es van mantenir en condicions estables de temperatura (22 +/- 3°C) i humitat (50 +/- 10%), i amb cicles de 12 h de llum/fosc a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els animals es van deslletar als 19 dies i van ser alimentats amb pinso control durant 2 setmanes. Durant tot el procediment experimental es va controlar el pes dels animals i el consum de pinso. La manipulació dels animals al llarg de tot el procés experimental, així com el seu sacrifici, es va dur a terme segons els procediments autoritzats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona i el Govern Català, seguint les recomanacions de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA, Guidelines for ethical care and use of animals, 1995)*.

### 1.2.2. Inflamació pulmonar

Per tal de poder estudiar els possibles efectes dels suplementes dietètics es va posar a punt un model d'inflamació pulmonar aguda, mitjançant l'administració intranasal de LPS. Es van testar dos LPS de dos bacteries diferents (*E. coli*; O128:B12 i *S. enterica enteritidis*; Sigma Aldrich, Espanya) i dos temps de sacrifici (6 h i 24 h). La inflamació pulmonar aguda es va induir mitjançant l'administració intranasal de 625 mg de LPS/kg pes de ratolí, i amb una pipeta es va introduir la meitat del volum a cada nariu. Prèviament a l'administració de l'LPS o el PBS, els ratolins es van anestesiar amb isoflurà. A continuació es mostren els grups experimentals que es van utilitzar:

1. **Control:** els ratolins van ser administrats amb PBS via intranasal. El sacrifici es va realitzar 24 h després de l'administració (n=8).
2. ***E. coli* 6 h:** els ratolins van ser administrats amb LPS d'*E. coli*. El sacrifici es va realitzar 6 h després de l'administració (n=8).
3. ***E. coli* 24 h:** els ratolins van ser administrats amb LPS d'*E. coli*. El sacrifici es va realitzar 24 h després de l'administració (n=8).
4. ***S. enterica* 6 h:** els ratolins es van administrar amb LPS de *S. enterica*. El sacrifici es va realitzar 6 h després de l'administració (n=8).
5. ***S. enterica* 24 h:** els ratolins es van administrar amb LPS de *S. enterica*. El sacrifici es va realitzar 24 h després de l'administració (n=8).



### 1.2.3. Disseny experimental

Els ratolins que es van sacrificar 24 h després de l'administració intranasal, sempre es van fer a primera hora del matí, i els sacrificats a les 6 h es van administrar a primera hora del matí i es van sacrificar 6 h després (Figura III-1). Els animals es van anestesiari amb ketamina (Imalgene® 500 Rhône Mèrieux, Lyon, França) i xilacina (Rompun® Bayer Leverkusen, Alemanya). La mort de l'animal es va produir a causa de la hipovolèmia deguda a l'extracció de sang per punció cardíaca. A continuació es va introduir una cànula a la tràquea, es van realitzar dos rentats broncopulmonars amb 0,5 mL de PBS cadascun i es va recollir el líquid broncoalveolar (BALF, *Brocoalveolar Lavage Fluid*). Posteriorment es va extreure el pulmó que es va emprar per l'obtenció dels leucòcits pulmonars (veure apartat 1.2.5.).

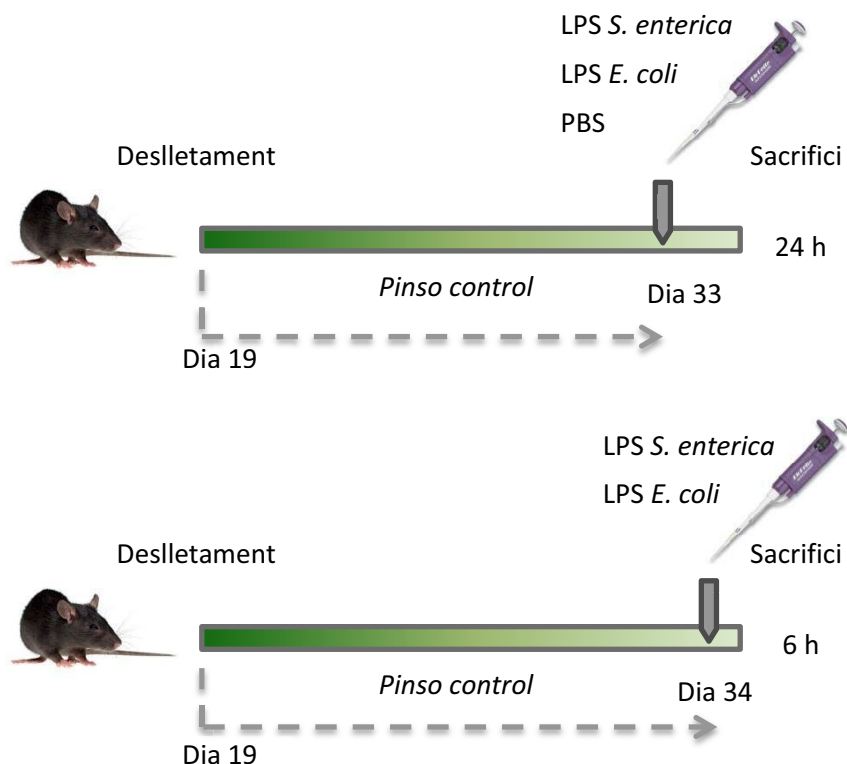


Figura III-1. Disseny experimental.

#### 1.2.4. Obtenció dels leucòcits de l'espai broncoalveolar

El BALF obtingut es va centrifugar a 950g durant 10 min a 4°C, i el sediment de cèl·lules es va resuspendre amb PBS-FBS (PBS amb 5% de FBS; *Fetal Bovine Serum*, Sigma Aldrich). Aquest sediment es va mantenir a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i el marcatge fenotípic (apartats 1.2.7. i 1.2.8.).

#### 1.2.5. Obtenció dels leucòcits pulmonars

Una vegada es va obtenir el BALF, es va extreure el pulmó i es va disgregar; posteriorment es va incubar amb agitació durant 90 min i a 37°C amb el medi d'incubació, que contenia: RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), un 5% FBS (Invitrogen), 100 U/mL penicil·lina (Invitrogen), 100 µg/mL estreptomina (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 2 mM L-Glutamina i 150 U/mL col·lagenasa tipus I (Invitrogen). El teixit es va fer passar per una malla amb un diàmetre de porus de 70 µm. La suspensió de cèl·lules obtinguda es va centrifugar a 600g durant 7 min a 4°C. El sobrenedant es va eliminar, i el sediment es va resuspendre en una solució de Percoll (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) al 40% en medi d'incubació sense col·lagenasa i es va afegir sobre una solució de Percoll al 80% en medi d'incubació sense col·lagenasa, després es va centrifugar a 600g durant 20 min a 15°C. Amb l'ajuda d'una pipeta de vidre es van recollir els leucòcits que estaven a la interfase i es van rentar amb la solució d'incubació sense col·lagenasa. Seguidament es van tornar a centrifugar (600g, 7 min a 4°C). Es van resuspendre amb PBS-FBS i es van mantenir a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i el marcatge fenotípic (apartats 1.2.7 i 1.2.8.).

#### 1.2.6. Obtenció dels leucòcits sanguinis

La sang es va obtenir per punció cardíaca amb una xeringa heparinitzada, i es va barrejar amb 7 mL de tampó de lisi d'eritròcits (0,17 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,01 M KHCO<sub>3</sub>, 0,0001 M EDTA, pH 7,3). Aquesta solució es va deixar reposar durant 5 min a temperatura ambient i passat aquest temps es va centrifugar a 300g durant 5 min a 25°C. El sediment de cèl·lules es va rentar amb PBS-FBS i es va tornar a centrifugar (300g, 5 min a 4°C). Finalment, el sediment cel·lular es va resuspendre amb PBS-FBS i es va desar a 4°C fins a realitzar el recompte cel·lular i el marcatge fenotípic (apartats 1.2.7 i 1.2.8.).

### 1.2.7. Viabilitat i recompte cel·lular

La viabilitat ens aporta informació sobre la idoneïtat del procés seguit per a l'aïllament dels leucòcits. Per discriminar les cèl·lules vives de les mortes es van utilitzar dues substàncies fluorescents, taronja d'acridina (AO; *Acridine Orange*) i bromur d'etidi (EBr, *Ethidium Bromide*). Les cèl·lules vives són capaces d'incorporar el colorant AO a través d'un mecanisme de transport actiu, en canvi, les cèl·lules mortes capten EBr per difusió simple.

La viabilitat cel·lular s'expressa com el nombre de cèl·lules vives respecte el nombre total de cèl·lules comptades. En tots els casos es va obtenir valors de viabilitat entre 90 i 95%. El recompte cel·lular es va realitzar segons la fórmula següent:

$$\text{n}^\circ \text{ cèl·lules}/\mu\text{L suspensió} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cèl·lules vives} \times \text{dilució}}{\text{n}^\circ \text{ de quadres comptats}} \times 160$$

On: 160, és el número de quadres que ocupa 1  $\mu\text{L}$  de la solució.

### 1.2.8. Marcatge fenotípic dels leucòcits per immunofluorescència

El marcatge de leucòcits per immunofluorescència es basa en la capacitat que tenen els anticossos monoclonals per unir-se específicament a un determinat antigen, en aquest cas, de membrana. Gràcies als diferents marcadors de superfície cel·lular, és a dir, als clústers de diferenciació (CD), és possible discriminar les diferents subpoblacions limfocítiques d'una suspensió cel·lular. En aquest estudi es va fer un marcatge directe de més d'un antigen de membrana a la mateixa cèl·lula.

El marcatge es va realitzar amb  $10^5$  cèl·lules de BALF i  $1,5 \times 10^5$  cèl·lules de sang i de pulmó. Les cèl·lules es van incubar amb els anticossos primaris monoclonals corresponents (indicats a la Taula III-1) durant 30 min, protegits de la llum i a  $4^\circ\text{C}$ . A continuació, es van rentar amb PBS-FBS i es van centrifugar a 600g durant 7 min a  $4^\circ\text{C}$ . El sediment de cèl·lules es va fixar amb paraformaldehid al 4%, i es van guardar a  $4^\circ\text{C}$  fins al moment de ser analitzades.

Taula III-1. Anticossos emprats en el marcatge directe de les poblacions leucocitàries

Anticòs	Població	Conjugat a <sup>1</sup>	Font <sup>2</sup>
<b>CD4</b>	Limfòcits T helper	PE-Cy7	<i>eBioscience</i>
<b>CD8</b>	Limfòcits T citotòxics	A647	<i>BD Pharmingen™</i>
<b>CD25</b>	Limfòcits activats	FITC	<i>eBioscience</i>
<b>Ly6G/CD68</b>	Neutròfils/ Monòcits	FITC/A647	<i>BD Pharmingen™</i>
<b>CD14</b>	Neutròfils/monòcits activats	PE	<i>eBioscience</i>

<sup>1</sup>Fluorocroms utilitzats: A647, Alexa Fluor 647®; FITC, fluoresceïn isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7. <sup>2</sup>eBioscience, Inc. (San Diego, CA, EUA), BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, EUA), Serotec (Dusseldorf, Alemanya).

### 1.2.9. Anàlisi de les poblacions leucocítiques

L'anàlisi cel·lular es va fer en el citòmetre de flux FACsARIA™ (BD Biosciences, New Jersey, EUA) de la Unitat de Citometria de Flux del Parc Científic de Barcelona.

El citòmetre permet diferenciar les cèl·lules en funció de la mida, de la rugositat, i de la fluorescència que emeten, en el cas de que es tractin de partícules marcades amb fluorocroms. Les dades obtingudes es van analitzar mitjançant el software Flowjo® (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

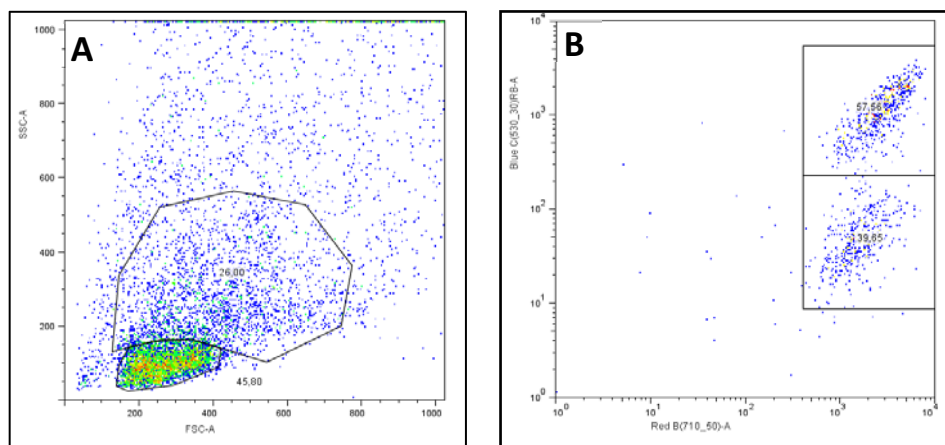


Figura III-2. Citograma d'una suspensió cel·lular. A) Citograma FCS-SSC representatiu, que conté tots les cèl·lules a la mostra, i es defineix en funció de la mida de les cèl·lules i de la seva rugositat; B) Exemple d'una finestra d'adquisició on són representades les cèl·lules mitjançant un citograma biparamètric de dispersió, en el qual la fluorescència de cada cèl·lula per l'anticòs marcat amb el primer fluorocrom es confronta amb el marcatge del segon.

### 1.2.10. Determinació de proteïnes

Es va emprar la tècnica colorimètrica descrita per Bradford (1976) i el colorant Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Alemanya). El reactiu conté el colorant Coomassie Brilliant Blue G-250, que es combina ràpidament amb les proteïnes quan es troben en medi àcid i forma un complex de color blau molt estable i d'elevat coeficient d'extinció que confereix una alta sensibilitat al mètode.

Es va preparar el colorant de Bio-Rad segons les instruccions del producte. Les mostres a analitzar es van preparar i es van mantenir en gel, al mateix temps que es va preparar la recta patró d'albumina (es va partir d'una concentració 1 mg/mL, i es van fer dilucions seriades 1:2 fins la concentració 0,015 mg/mL). A continuació es va afegir l'àcid fòrmic a la mostra (mostres i patrons) i la solució de Bio-Rad preparada. L'absorbància dels patrons i de les mostres es va llegir a una longitud d'ona de 595 nm en un espectrofotòmetre Labsystems Multiskan MS® (Fisher Scientific, EUA).

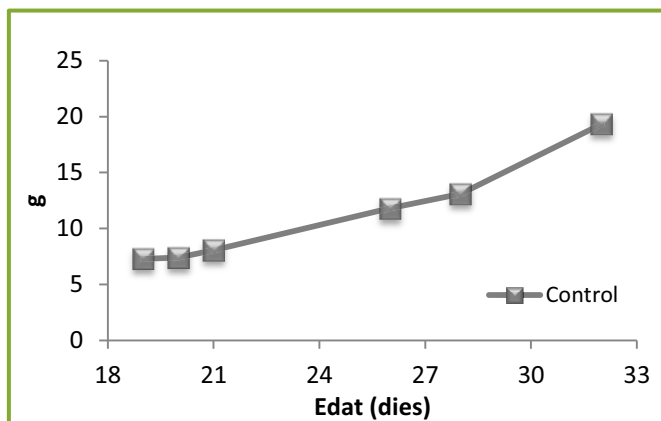
### 1.2.11. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadística de les dades presentades en aquest capítol es va realitzar amb el programa estadístic SPSS-14.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). L'anàlisi estadística es va realitzar valorant l'efecte dels dos LPS estudiats front el PBS, i l'efecte del temps de sacrifici (6 i 24 h) en cada LPS estudiat (LPS d'*E. coli* i LPS de *S. enterica*), mitjançant un estudi de la variància d'un factor (ANOVA). Les diferències estadísticament significatives corresponen a valors de  $P < 0,05$ .

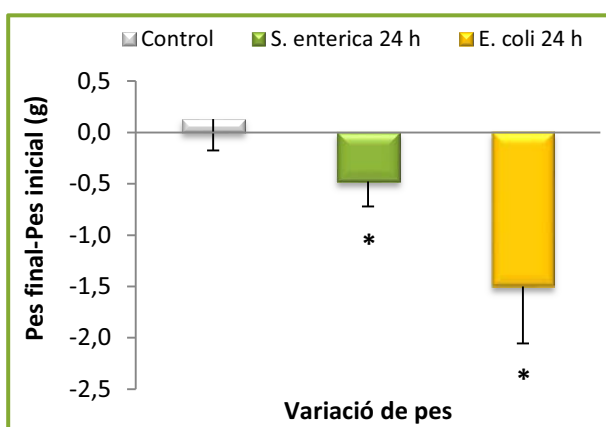
## 1.3. Resultats

### 1.3.1. Pes dels animals

L'evolució del pes dels animals ha estat similar en tots els grups, i el creixement no s'ha alterat durant les dues setmanes d'estabulació (Figura III-3). Els ratolins han mostrat una pèrdua de pes des de l'administració de l'LPS fins al sacrifici ( $P < 0,05$ ; Figura III-4). El grup administrat amb LPS de *E. coli* ha presentat una davallada més important de pes respecte el grup control ( $P < 0,05$ ).



**Figura III-3. Evolució del pes corporal dels ratolins.** L'evolució del pes s'ha seguit des del dia 19 (deslletament) fins al final del període experimental (14 dies de dieta). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 37 ratolins.



**Figura III-4. Variació de pes dels ratolins des de la inoculació del PBS/LPS fins al sacrifici 24 h després.** Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ).

### 1.3.2. Proteïnes i recompte cel·lular al BALF

L'administració de l'LPS ha augmentat la **concentració de proteïnes** a l'espai pulmonar, independentment de la soca bacteriana d'origen ( $P < 0,05$ ; Figura III-5). La diferència ha estat superior a les 24 h que a les 6 h després de l'administració de l'endotoxina.

L'administració de l'LPS ha incrementat 5 vegades el **recompte cel·lular** a l'espai broncopulmonar ja a les 6 h ( $P < 0,05$ , Figura III-6). Aquest increment no ha estat influït pel tipus de LPS. A les 24 h l'efecte de l'LPS és molt més evident, ja que l'increment està a l'entorn de 18 vegades ( $P < 0,05$ ). En aquest cas també, l'efecte de l'LPS és independent del seu origen.

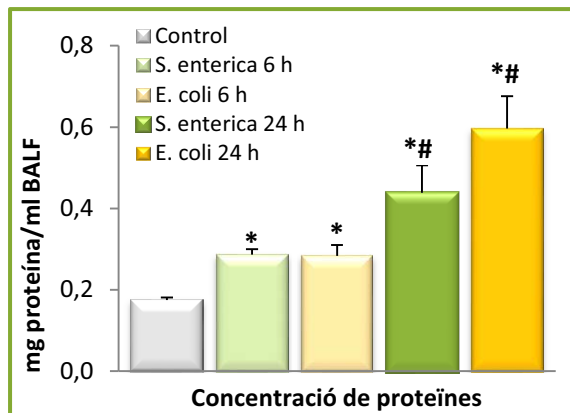


Figura III-5. Concentració de proteïnes al BALF. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

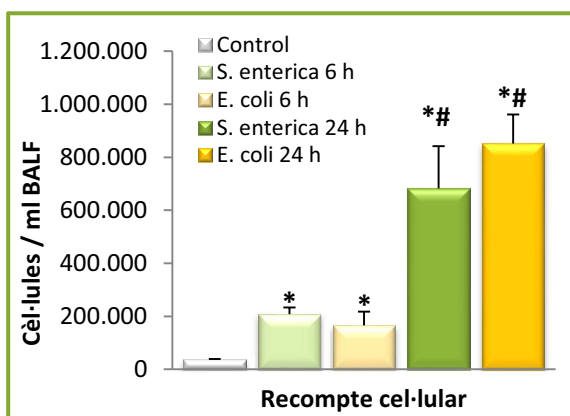


Figura III-6: Recpte de cèl·lules al BALF. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

### 1.3.3. Poblacions cel·lulars al BALF

Ambdós LPS han incrementat el percentatge de **neutròfils** i **monòcits activats** al BALF ( $P < 0,05$ ; Figura III-7). Aquest augment ha estat similar tant a les 6 h com a les 24 h després de l'administració de l'LPS.

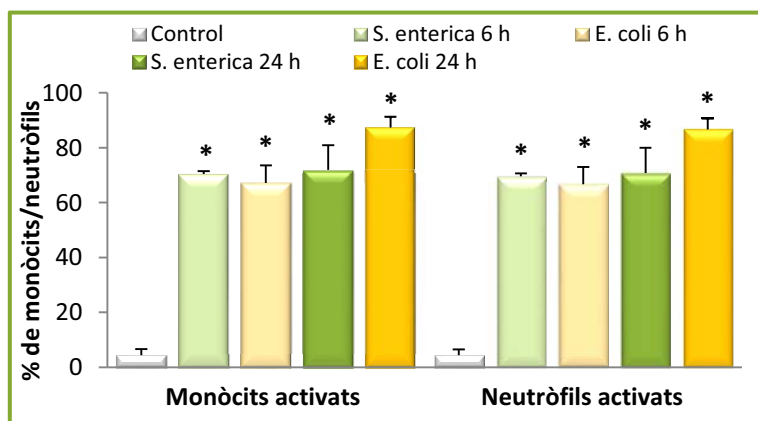
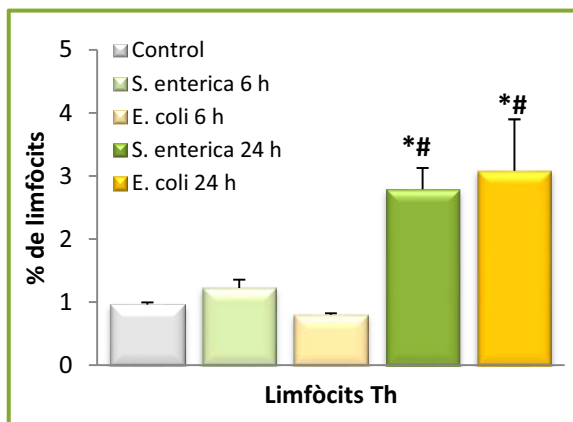


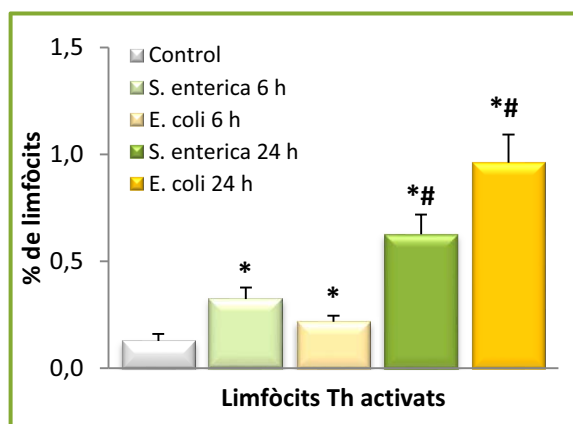
Figura III-7. Percentatge de monòcits i neutròfils activats al BALF. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ).

Al BALF, aproximadament hi ha un 1% de **limfòcits Th** (Figura III-8). L'administració de LPS no ha produït canvis en aquesta població a les 6 h de sacrifici; en canvi aquesta població, en els animals sacrificats 24 h després de l'administració de l'LPS, ha augmentat 2,9 vegades pel grup de *S. enterica* i 3,2 vegades pel grup d'*E. coli* ( $P < 0,05$ ).



**Figura III-8. Percentatge de limfòcits Th al BALF.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

Els animals administrats intranasalment amb PBS presenten un percentatge de **limfòcits Th activats** de  $0,13\% \pm 0,03\%$  (Figura III-9). L'efecte de l'LPS ha estat més elevat a les 24 h que a les 6 h després de l'administració de l'endotoxina. El percentatge de limfòcits Th activats s'ha incrementat fins a valors de  $0,63\% \pm 0,09\%$  pel grup *S. enterica* i de  $0,96\% \pm 0,13\%$  en el cas de *E. coli* ( $P < 0,05$ ).

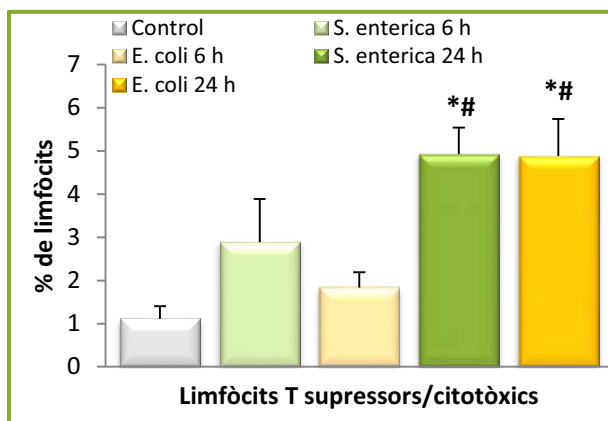


**Figura III-9. Percentatge de limfòcits Th activats al BALF.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

En el cas dels limfòcits T **supressors/citotòxics** al BALF (Figura III-10), els grups tractats amb LPS i sacrificats a les 6 h, no han presentat diferències estadísticament significatives respecte el grup



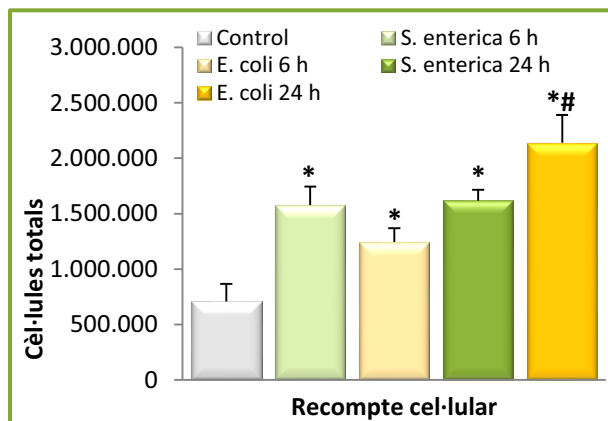
control. Ara bé, el percentatge d'aquesta població ha estat més elevada a les 24 h de l'administració ( $P < 0,05$ ), sense diferències entre els dos tipus de LPS.



**Figura III-10. Percentatge de limfòcits T supressors/citotòxics al BALF.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

#### 1.3.4. Poblacions cel·lulars a pulmó

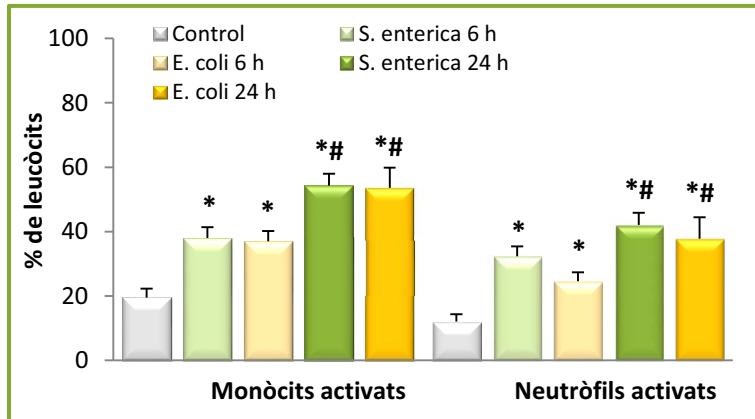
L'administració de l'LPS ha augmentat el nombre de **cèl·lules infiltrades** al teixit pulmonar, de forma independent al tipus de LPS ( $P < 0,05$ ; Figura III-11). L'LPS d'*E. coli* ha tingut més efecte a les 24 h de sacrifici que no pas a les 6 h ( $P < 0,05$ ), mentre que el de *S. enterica* té un efecte similar als dos temps estudiats.



**Figura III-11. Recompte de cèl·lules al pulmó.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

L'administració de l'LPS ha augmentat el percentatge de **neutròfils** i **monòcits activats** al pulmó ( $P < 0,05$ ; Figura III-12). De fet, a les 6 h de l'administració, els animals que han rebut l'endotoxina pràcticament han doblat el percentatge de monòcits ( $P < 0,05$ ); tot i que l'increment ha estat superior a les 24 h. Pel que fa als neutròfils, l'administració de LPS també ha produït un augment

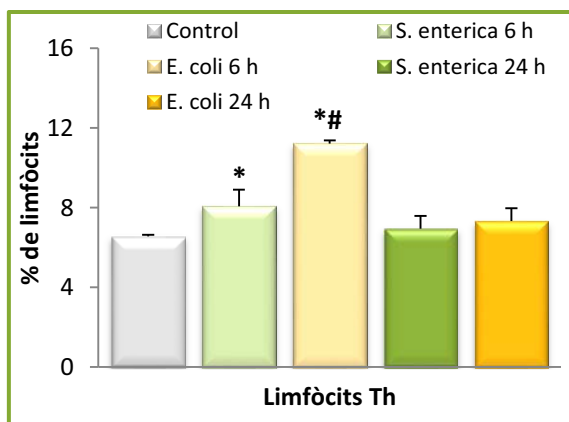
major d'aquesta població a les 24 h del sacrifici, triplicant-ne els valors ( $P < 0,05$ ), sense diferències entre els dos tipus de LPS.



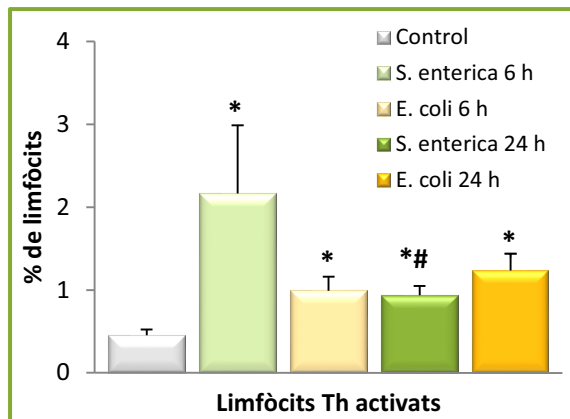
**Figura III-12. Percentatge de monòcits i neutròfils activats a pulmó.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

La població de **limfòcits Th** a pulmó (Figura III-13) només ha mostrat efectes de l'administració de l'LPS a les 6 h de sacrifici ( $P < 0,05$ ) i ha estat major per l'LPS d'*E. coli* ( $P < 0,05$ ).

L'administració de l'LPS ha incrementat el percentatge de **limfòcits Th activats**, tant a les 6 h com a les 24 h ( $P < 0,05$ ; Figura III-14). Tot i així l'efecte més rellevant ha estat a les 6 h d'haver administrat l'LPS de *S. enterica*.

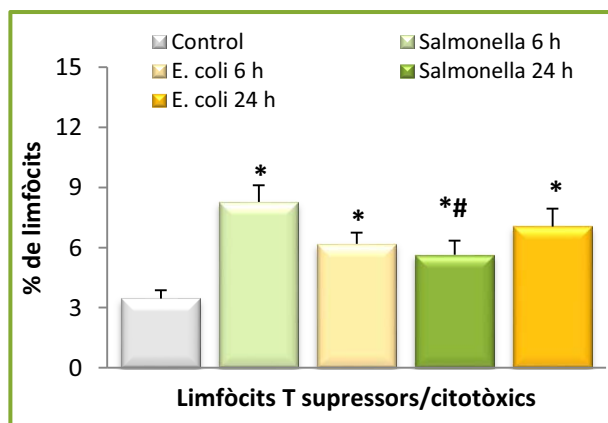


**Figura III-13. Percentatge de limfòcits Th a pulmó.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).



**Figura III-14. Percentatge de limfòcits Th activats a pulmó.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

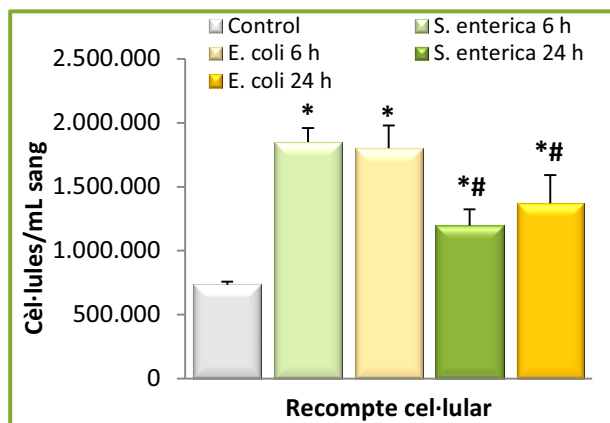
L'administració de LPS ha incrementat el percentatge dels **limfòcits T supressors/citotòxics** a pulmó ( $P < 0,05$ ; Figura III-15). Tot i així, l'efecte de l'LPS de *S. enterica* és superior a les 6 h que a les 24 h de la seva administració ( $P < 0,05$ ).



**Figura III-15. Percentatge de limfòcits T supressors/citotòxics a pulmó.** Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

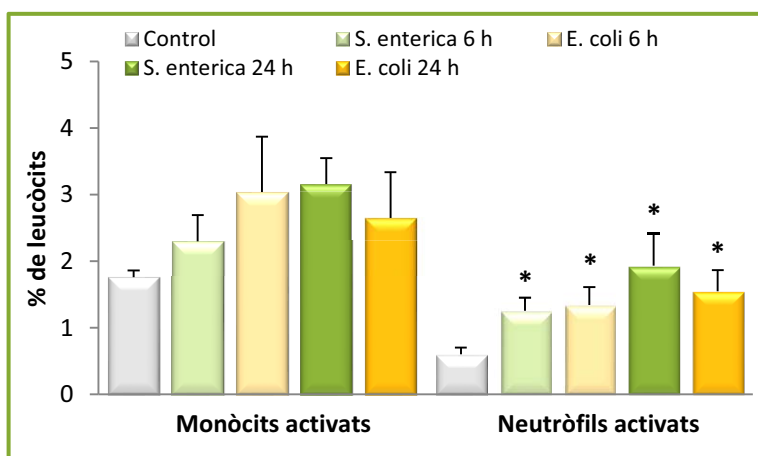
### 1.3.5. Poblacions cel·lulars a sang

El recompte de cèl·lules a sang perifèrica ha mostrat un augment més important a les 6 h (s'incrementa 2,5 vegades respecte el grup control) que a les 24 h d'administració de l'endotoxina (increment de 1,6 per *S. enterica* i de 1,8 per *E. coli*;  $P < 0,05$ ), sense diferències significatives entre ambdós LPS (Figura III-16).



**Figura III-16. Recompte de cèl·lules a sang.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

Respecte al percentatge de **monòcits** i **neutròfils activats** a sang, l'LPS només ha afectat als neutròfils, que han incrementat de forma similar als dos temps estudiats per ambdós LPS ( $P < 0,05$ ; Figura III-17).



**Figura III-17. Percentatge de monòcits i neutròfils activats a sang.** Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ).

L'administració de LPS tant de *S. enterica* com d'*E. coli* no ha provocat canvis en la població de limfòcits Th a sang (Figura III-18). En canvi, si que ha incrementat el percentatge de **limfòcits Th activats** a sang, a les 24 h de la seva administració ( $P < 0,05$ ; Figura III-19) i de forma similar per les dues endotoxines.

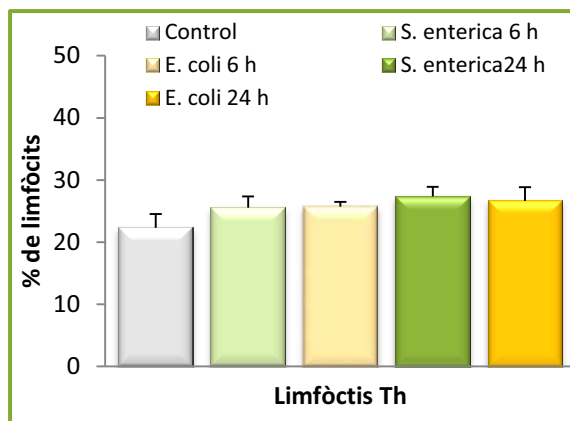


Figura III-18. Percentatge de limfòcits Th a sang. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins.

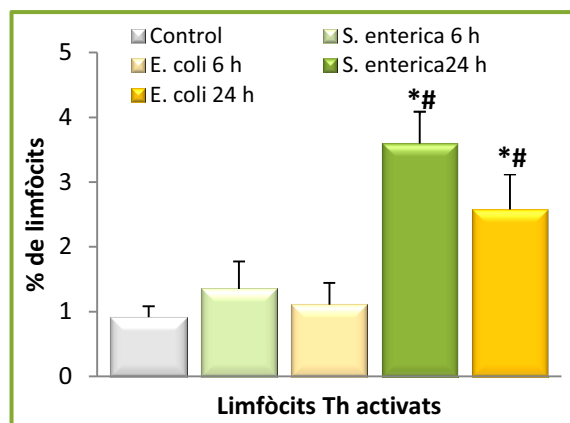


Figura III-19. Percentatge de limfòcits Th activats a sang. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i el grup control ( $P < 0,05$ ). #Diferències significatives entre els grups administrats amb LPS i sacrificats a les 6 h i els grups sacrificats a les 24 h ( $P < 0,05$ ).

L'administració de LPS no ha afectat la població de limfòcits T supressors/citotòxics a sang (Figura III-20), ni a les 6 h ni a les 24 h de sacrifici.

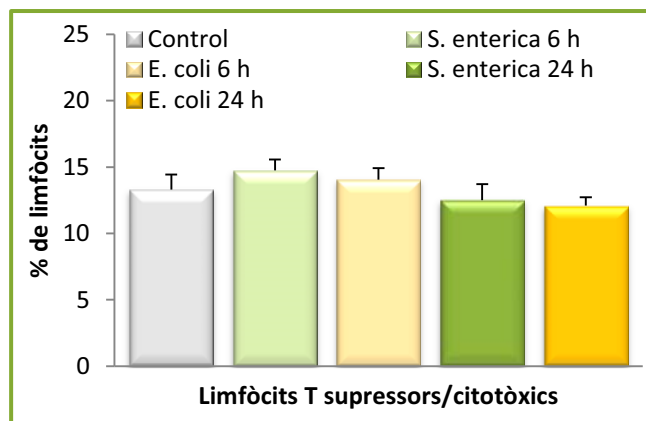


Figura III-20. Percentatge de limfòcits T supressors/citotòxics a sang. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins.

#### 1.4. Conclusions

La caracterització de la inflamació pulmonar induïda mitjançant l'administració nasal de dos LPS diferents (*E. coli* i *S. enterica*) i a dos temps de sacrifici, permet concloure que:

- ✓ Ambdós LPS produeixen una inflamació pulmonar, tot i que l'LPS procedent de la bactèria *E. coli* presenta una major infiltració cel·lular i també presenta una activació limfocitària més augmentada.
- ✓ El millor temps per estudiar les poblacions cel·lulars és a les 24 h d'haver administrat l'LPS, que és quant hi ha els efectes més rellevants.

## Capítol 2. Estudi de l'efecte de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la immunitat innata en animals sotmesos a una inflamació pulmonar aguda.

Els resultats d'aquests capítol es divideixen en dos apartats. En el primer apartat es mostren els efectes de la suplementació dietètica en la resposta innata inclosos en l'Article 1. En l'apartat de resultats annexes es mostren altres resultats involucrats en la resposta inflamatòria pulmonar innata.

### ***“Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury”***

*Maijó M., Miró Ll., Polo J., Campbell J., Russell L., Crenshaw J., Weaver E., Moretó M., Pérez-Bosque A.*

**Publicat (doi: 10.1017/S0007114511003655)**

*British Journal of Nutrition 2011*

*Factor d'impacte: 3,072 (2010)*

Els resultats obtinguts han donat lloc a les següents comunicacions a congressos:

- *Effects of spray-dried porcine plasma on nasal associated lymphoid tissue in a lung inflammation model in mice.*

A. Pérez-Bosque, **M. Maijó**, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, E. Weaver, J. Crenshaw, M. Moretó.

Pòster presentat al **ADSA ASAS Joint Meeting** a Indianàpolis (Indiana, EUA) del 7 a l'11 de juliol de 2008.

- *Dietary plasma protein supplementation attenuates the innate immune response in a mice model of pulmonary inflammation.*

**M. Maijó**, A. Pérez-Bosque, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, E. Weaver, J. Crenshaw, M. Moretó.

Pòster presentat al **Anual Meeting of American Association of Swine Veterinarians (AASV)** a Dallas (Texas, EUA) del 7 al 10 de març de 2009.

- *Dietary plasma protein supplementation ameliorates lung inflammation induced by LPS administration in mice.*

**M. Maijó**, A. Pérez-Bosque, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, E. Weaver, J. Crenshaw, M. Moretó.

Comunicació oral presentada al **International Immunonutrition Workshop (IIW)** a Platja d'Aro (Espanya) del 21 al 24 d'octubre de 2009.



***Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury***

*British Journal of Nutrition*, doi: 10.1017/S0007114511003655

**2.1. Resum de l'Article 1**

**Antecedents i objectius:** La suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques atenua la resposta immunitària mucosal al teixit difús i organitzat del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT), de forma que protegeix la mucosa intestinal d'una excessiva activació. A més, també s'ha observat que aquests suplementes poden modular la resposta immunitària mucosal a teixits extra-intestinals. Per tant el nostre objectiu ha estat investigar l'efecte de la suplementació amb proteïnes plasmàtiques sobre la resposta immunitària innata en un model d'inflamació pulmonar aguda a ratolí.

**Materials i mètodes:** Els ratolins s'han deslletat el dia 19 d'edat i s'han alimentat durant 14 dies amb les dietes experimentals: Control, dieta suplementada amb un 8% de plasma assecat per polvorització (SDP) o dieta suplementada amb un 2% de concentrat d'immunoglobulines (IC). Passat aquest temps s'ha induït una inflamació pulmonar mitjançant l'administració nasal de LPS i els ratolins s'han sacrificat a les 6 h (estudi de citocines i quimiocines) o a les 24 h (estudi de poblacions leucocitàries).

**Resultats:** L'administració de LPS ha incrementat el nombre de leucòcits, i leucòcits no limfocítics al BALF i al teixit pulmonar, tot i que l'increment és molt més important al BALF. Ambdós suplementes han reduït aquest increment al BALF ( $P < 0,05$ ) mentre que només l'SDP ha reduït la infiltració pulmonar ( $P < 0,05$ ). L'administració de LPS ha incrementat la població de neutròfils i ha reduït la de monòcits als tres teixits analitzats. Ambdues dietes (SDP i IC) han reduït el percentatge de neutròfils i monòcits residents dels animals no inflamats ( $P < 0,05$ ). La dieta SDP ha disminuït el percentatge de neutròfils a sang ( $P < 0,05$ ). L'LPS també ha provocat un augment del percentatge de neutròfils i monòcits activats en aquests teixits, i ambdues dietes han reduït en diferent grau l'activació de neutròfils i monòcits a BALF i a sang ( $P < 0,05$ ). Les citocines i quimiocines estudiades han mostrat una elevada resposta a les 6 h després de l'administració de l'LPS, i les dues dietes suplementades han disminuït entre un 20% i un 80% l'expressió de la majoria de citocines i quimiocines estudiades ( $P < 0,05$ ). A més s'ha observat un augment de la citocina antiinflamatòria IL-10 a pulmó en els grups alimentats amb les dietes SDP i IC i administrats amb LPS ( $P < 0,05$ ).

**Conclusió:** Les dietes SDP i IC interactuen amb les cèl·lules del GALT i redueixen la resposta pulmonar a l'LPS, possiblement, a través del sistema immunitari mucosal comú. Els resultats d'aquest estudi mostren que els suplementes dietètics poden ser una nova estratègia terapèutica per prevenir i atenuar la inflamació pulmonar.

## Dietary plasma proteins attenuate the innate immunity response in a mouse model of acute lung injury

Mònica Maijó<sup>1</sup>, Lluïsa Miró<sup>1</sup>, Javier Polo<sup>2</sup>, Joy Campbell<sup>3</sup>, Louis Russell<sup>3</sup>, Joe Crenshaw<sup>3</sup>, Eric Weaver<sup>4</sup>, Miquel Moretó<sup>1</sup> and Anna Pérez-Bosque<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Group of Physiology and Experimental Nutrition, Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Nutrition and Food Safety Research Institute, University of Barcelona, Avinguda de Joan XXIII s/n, E-08028, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>APC Europe S.A., Granollers, Spain

<sup>3</sup>APC, Inc., Ankeny, IA, USA

<sup>4</sup>Proliant Health and Biologicals, Ankeny, IA, USA

(Received 14 December 2010 – Revised 10 May 2011 – Accepted 6 June 2011)

### Abstract

We examined whether oral plasma protein supplements affect the innate immune response in a model of acute lung inflammation. Mice were fed diets supplemented with 8% spray-dried plasma (SDP) or 2% plasma Ig concentrate (IC) from day 19 (weaning) until day 34. The mice were challenged with intranasal lipopolysaccharide (LPS) at day 33 (and killed 24 h later for cytokine and leucocyte analyses) or at day 34 (and killed 6 h later for cytokine determinations). In bronchoalveolar lavage fluid (BALF), LPS increased the number of leucocytes by twenty-sevenfold, an effect that was partly prevented by both SDP and IC, and by twentyfold the percentage of activated monocytes, which was partly prevented by SDP. In the lung tissue, LPS increased the infiltrated leucocytes, and this effect was prevented in part by SDP. In unchallenged mice, both SDP and IC diets reduced the percentage of resident neutrophils and monocytes ( $P < 0.05$ ). In the blood, both SDP and IC completely prevented LPS-dependent monocyte activation ( $CD14^+$ ;  $P < 0.05$ ). LPS dramatically increased the concentration of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor) and chemokines (CXCL1, CCL2, CCL3 and CCL4) in BALF. The acute response of cytokine production was reduced by 20–80% by both SDP and IC. For chemokines, plasma supplements had no effect on LPS-induced CXCL1 expression but significantly reduced CCL2, CCL3 and CCL4 production ( $P < 0.05$ ). The results support the view that dietary plasma proteins can be used to attenuate endotoxin-associated lung inflammation.

**Key words:** Spray-dried animal plasma: Ig concentrate: Lipopolysaccharide

Acute lung injury is the result of the host response to either inhaled or endogenous noxious agents and is characterised by the activation of nasal and bronchoalveolar-associated lymphoid tissue. Since lungs are constantly exposed to a large number of micro-organisms and provide a common entry route for pathogens into the body, lung infection is one of the most frequent causes of morbidity and death in humans<sup>(1)</sup>. The inflammation cascade is initiated by the innate immune system, in which neutrophils have a key role in the inflammatory response as they contribute to the recruitment, activation and programming of antigen-presenting cells<sup>(2)</sup>. Furthermore, they generate chemotactic signals that attract monocytes and dendritic cells<sup>(3)</sup>.

Enteral nutrition has a role in the prevention or amelioration of inflammatory responses in systemic mucosae. Dietary

lycopene, a carotenoid with a powerful antioxidant capacity, can decrease eosinophilic infiltrates and reduce Th2 cytokine responses from lymph nodes, in a mouse model of allergic airway disease<sup>(4)</sup>. Dietary supplementation with amino acids such as glycine<sup>(5)</sup> and tryptophan<sup>(6)</sup> moderates lung inflammation, while dietary EPA and  $\gamma$ -linolenic acid reduce the risk of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome<sup>(7)</sup>. Traditional Chinese formulae<sup>(8,9)</sup> have also been shown to be effective in the treatment of acute inflammation in mice challenged with lipopolysaccharide (LPS).

The possible mechanisms for such a therapeutic action are not well understood. In some cases, the effects are attributed to the absorbed nutrients acting at extra-intestinal tissues, as is the case of antioxidant molecules, that once absorbed in the small intestine, reach the lung, where they prevent or

**Abbreviations:** BALF, bronchoalveolar lavage fluid; GALT, gut-associated lymphoid tissue; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IC, Ig concentrate; iNOS, inducible NO synthase; LPS, lipopolysaccharide; SDP, spray-dried plasma.

\* **Corresponding author:** Dr A. Pérez-Bosque, fax +34 934035901, email anna.perez@ub.edu

reduce oxidative processes<sup>(4)</sup>. In others, the mechanism is indirect, involving activation of new mediators that eventually reach the target tissues. This is the case for dietary lecithin, a source of PUFA-containing phospholipids that mediate an increase in lipid peroxidation and platelet-activating factor bioactivity in the lung<sup>(10)</sup>. A third mechanism involves interaction of luminal contents with mucosal elements. Certain dietary components interacting with the mucosal lymphoid tissue (gut-associated lymphoid tissue; GALT) can modulate the local immune response that, in turn, can modify the immune response of other mucosal lymphoid tissues due to the interconnection of the mucosal immune systems<sup>(11)</sup>. This is the mechanism by which oral bioactive proteins such as colostrum-derived proteins<sup>(12)</sup> or milk-derived proteins<sup>(13,14)</sup> modify the peripheral immune responses.

In rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, dietary supplementation with spray-dried plasma proteins (SDP) reduced the mucosal immune response in both the organised and diffused GALT, protecting the gut mucosal lymphoid tissue from excessive activation<sup>(15,16,17)</sup>. SDP can also modulate the mucosal immune response in extra-intestinal tissues; for example, in an epidemiological study of Canadian swine farms, feeding plasma proteins was associated with reduced mortality due to porcine reproductive and respiratory syndrome<sup>(18)</sup>. Other peripheral effects of dietary SDP involve changes in the activation of the pituitary–adrenal axis following an LPS challenge<sup>(19)</sup> and reduced mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the adrenal gland, spleen, hypothalamus, pituitary gland and liver<sup>(20)</sup>.

Since this class of supplements also improves the survival and performance of turkeys during a respiratory challenge stimulated by *Pasteurella multocida*<sup>(21)</sup>, we investigated the therapeutic potential of plasma supplements in a mouse model of acute lung inflammation, based on the intranasal administration of LPS. Specifically, we studied the innate immune system because this mediates the defence against pathogens and regulates tissue health and integrity<sup>(2)</sup>.

## Material and methods

### Animals and diets

Male C57BL/6 mice were supplied by Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and kept under stable temperature and humidity conditions, with a 12 h light–12 h dark cycle and free access to food and water. All protocols used in the present study were approved by the Ethics Committees for Animal Experimentation of the University of Barcelona (Barcelona, Spain) and the Catalan government. The animals were weaned at day 19 after birth, distributed at random in groups of seven to eight mice (two to three animals per cage) and fed the experimental diets for 2 weeks. This time period was adequate for plasma supplements to demonstrate their effect on immune response. The mice were monitored for food intake and body weight throughout the experimental period. Dietary treatments included (1) control: mice fed the control diet; (2) SDP: mice fed a diet with 8% SDP; (3) Ig concentrate (IC): mice fed a diet with 2% IC (provided the same amount

**Table 1.** Composition of experimental diets

Ingredient	Control	SDP (g/kg)	IC
Spray-dried animal plasma (SDP*)	–	80	–
Ig fraction concentrate (IC†)	–	–	20
Maize starch	199	308.8	223.6
Skimmed milk	531	340.5	486.7
Sugar	94.5	94.5	94.5
Soyabean oil	70	70	69.6
Cellulose	50	50	50
AIN-93 GM‡	35	35	35
AIN-93 VX‡	15	15	15
D,L-Methionine	2.5	3.2	2.6
Choline bitartrate	3	3	3
Total	1000	1000	1000

SDP, spray-dried plasma, IC, Ig concentrate.

\* SDP from porcine blood (AP-820; APC-Europe S.A., Granollers, Spain).

† APC-Europe S.A.

‡ Provided by Harlan Ibérica (Barcelona, Spain).

of Ig as the SDP diet); (4) LPS: mice fed a control diet and challenged with LPS; (5) LPS-SDP: mice fed the diet with 8% SDP and given LPS; (6) LPS-IC: mice fed the diet with 2% IC and treated with LPS.

SDP is a feed ingredient obtained by centrifuging blood from healthy pigs, and IC is obtained by removing most of the albumin from plasma, resulting in a fraction containing approximately 40% Ig<sup>(22)</sup>. Both ingredients were spray-dried to obtain a stable powder. Maintenance of the native structure of the protein was confirmed by immunoelectrophoresis and Western blotting<sup>(23)</sup>. The diets were balanced for energy and total N, and lysine and methionine were formulated to meet the National Research Council requirements<sup>(24)</sup> for laboratory animals (Table 1). The N content of the control diet was adjusted with milk protein. All diets were prepared by Harlan Ibérica.

### Lipopolysaccharide challenge

LPS from *Escherichia coli* (O128:B12; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was dissolved in PBS (625  $\mu$ g/ml). The mice (16–18 g body weight) were anaesthetised with isoflurane on day 33 (for 24 h sampling) or on day 34 of life (for 6 h sampling), and were administered 10  $\mu$ l of the LPS solution (or PBS) in each nostril. To collect bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung and blood for analysis of the lymphocytes (24 h after the LPS treatment) or cytokines (6 and 24 h after LPS), the mice were anaesthetised by intraperitoneal administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Blood was withdrawn by cardiac puncture. At the end of the experiment, the mice were killed by cervical dislocation. The samples used for protein and RNA determinations were immediately frozen with liquid N<sub>2</sub> and stored at –80°C.

### Bronchoalveolar lymphocytes

Bronchoalveolar lavage was performed by the intra-tracheal instillation of 1 ml PBS<sup>(25)</sup>. The BALF was recovered (0.8–0.9 ml) and centrifuged at 950 g for 10 min, and the pelleted BALF cells were re-suspended in PBS–FBS. The cells were

counted, and viability was determined with a solution of acridine orange and ethidium bromide. In all cases, cell viability was higher than 95%. The supernatant was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### Lung lymphocytes

Once BALF was obtained, the samples of the lung tissue were excised for protein, cell isolation and mRNA determinations. The lung lymphocytes were isolated according to Woolard *et al.*<sup>(25)</sup>. Briefly, the lung tissue was washed and later was finely minced and incubated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 5% FBS, 100 000 U/l penicillin, 100 mg/l streptomycin, 10 mM-HEPES, 2 mM-L-glutamine and 150 U/ml collagenase (Invitrogen). After incubation for 90 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in an automatic shaker, the remaining intact tissue was disrupted by passage through a 21-gauge needle. The suspension was centrifuged at 600 **g** for 7 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded, and the pellet was suspended in 40% Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Bucks, UK) layered onto 80% Percoll and centrifuged at 600 **g** for 20 min at  $15^{\circ}\text{C}$ . The cells at the interface were collected, washed in RPMI-1640 with FCS, HEPES and penicillin/streptomycin, and suspended in PBS-FBS. The cells were counted, and viability was determined as described earlier. In all cases, cell viability was higher than 75%.

### Blood lymphocytes

After cervical dislocation, the blood was drawn by cardiac puncture with a heparinised syringe and mixed with 7 ml of erythrocyte lysing buffer (0.17 M-NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 M-KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM-EDTA, adjusted at pH 7.3). This solution remained at room temperature for 5 min and was then centrifuged at 300 **g** for 5 min at  $25^{\circ}\text{C}$ . The cells obtained from the pellet were washed with PBS-FBS and centrifuged at 300 **g** for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded, and the cells were suspended in the same solution.

### Cell staining

The cells ( $3 \times 10^4$  for the BALF samples and  $1.5 \times 10^5$  for the lung and blood samples) were incubated with primary mouse monoclonal antibodies for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The primary antibodies used were anti-CD45 APC-A750 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA) for leucocytes; lymphocytes and non-lymphocytic leucocytes were separated by forward/side scatter; anti-CD68 A700 (eBioscience, Inc.) for monocytes, anti-Ly6G FITC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) for neutrophils, anti-CD14 PE (eBioscience, Inc.) for activated neutrophils/monocytes; and isotype control. The samples were subsequently washed in PBS-FBS and centrifuged at 600 **g** for 6 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Finally, the washed cells were fixed with 400  $\mu\text{l}$  of 4% w/v paraformaldehyde and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysis. The samples were analysed in a BD FACSAria™ Flow Cytometer at the Cytometry Unit of the Scientific and Technical Support Services of the University of Barcelona.

### Lung homogenate

The samples were homogenised in a lysis buffer containing 0.1 mM-EDTA, 0.1 mM-ethylene glycol tetraacetic acid, 1% Triton and 2% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The homogenate was centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  at 14 000 **g** for 10 min. The IL-10 was determined in the supernatant (see later). The amount of protein in the lung homogenate and supernatant was assayed by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### Cytokine and chemokine assays

The cytokines determined were IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte CSF (G-CSF). The chemokines CCL2, CCL3, CCL4 and CXCL1 were studied by means of the Bio-Plex Mouse Cytokine Panel (Bio-Rad) in samples of BALF supernatants from animals killed 6 and 24 h after the LPS challenge. The cytokine IL-10 was studied in samples of the lung homogenate with the Bio-Plex Mouse Cytokine Assay (Bio-Rad). The detection limits were 0.8 pg/ml for IL-1 $\alpha$ ; 5.8 pg/ml for IL-1 $\beta$ ; 12 pg/ml for TNF- $\alpha$ ; 1.4 pg/ml for IL-6; 8.1 pg/ml for GM-CSF; 2.3 pg/ml for G-CSF; 6.4 pg/ml for CCL2; 13 pg/ml for CCL3; 2.7 pg/ml for CCL4; and 1.6 pg/ml for CXCL1. The detection limit for IL-10 was 2.1 pg/ml.

### RNA extraction and RT

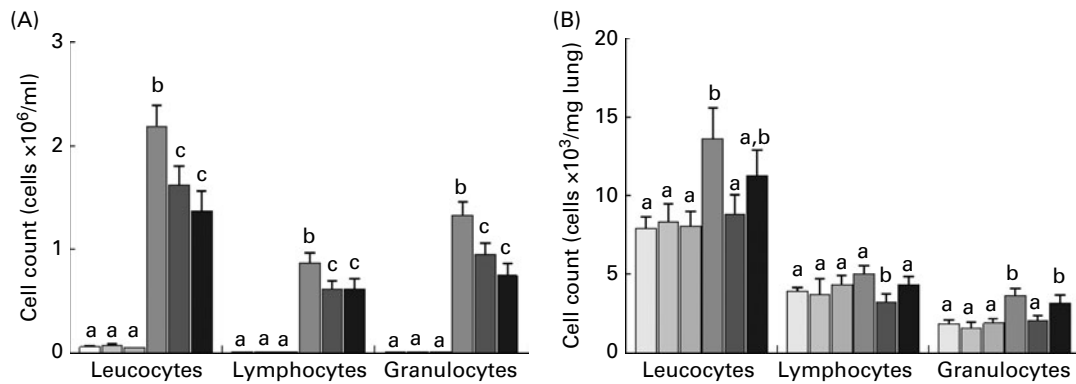
Frozen samples of lung tissue taken from animals 6 h after the LPS challenge were disrupted mechanically, and total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Extracted RNA was treated with RQ1 RNase-free DNAase (Promega, Inc., Madison, WI, USA) and reverse transcribed with Superscript™ III RT (Invitrogen) using an oligo-(dT)<sub>20</sub> primer, according to the supplier's protocol (Invitrogen).

### Real-time PCR

Complementary DNA served as a template in a 20  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 0.2  $\mu\text{mol/l}$  of each primer: inducible NO synthase (iNOS), forward: 5'-GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC AC-3', reverse: 5'-CGT ACC GGA TGA GCT GTG AAT T-3' (122 bp); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward: 5'-GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA-3', reverse: 5'-CCC TGT TGC TGT AGC CGT AT-3' (73 bp) and 2x SyBr® GreenER SuperMix (Invitrogen). Real-time PCR was performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The PCR conditions were as described previously<sup>(26)</sup>.

### Statistical analysis

All results are expressed as means with their standard errors. The effects of LPS and diets (and their interaction) on leucocyte populations and on iNOS expression were analysed by two-way factorial ANOVA, followed by the Bonferroni



**Fig. 1.** Cell count in (A) bronchoalveolar lavage fluid and (B) lung tissue in control (□), spray-dried plasma (SDP, ◻), Ig concentrate (IC, ◻), lipopolysaccharide (LPS, ◼), LPS-SDP (◼) and LPS-IC (◼) mice. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars,  $n$  7–8. (A) The LPS effect, the diet effect and the interaction between diet and LPS were significant in the three cell types ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$  and  $P < 0.05$ , respectively). (B) The LPS effect was significant in leucocytes and granulocytes ( $P = 0.018$ ); the diet effect was significant in the three cell types ( $P < 0.05$ ); the interaction between diet and LPS administration was significant only in lymphocytes ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Mean values with unlike letters were significantly different ( $P < 0.05$ )

*post hoc* test. Cytokine and chemokine concentrations were analysed by three-way ANOVA (LPS challenge, time, diet and their interactions), followed by the Bonferroni *post hoc* test, using SPSS 14.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Leucocyte counts and cell populations

Intra-nasal administration of LPS induced an immune response in BALF, lung tissue and blood that was consistent and reproducible, and with low variability. In the lung airways, there was massive leucocyte recruitment (thirty-fivefold increase in BALF;  $P < 0.001$ ; Fig. 1(A)), which was reduced by 25% by SDP ( $P < 0.05$ ) and by 37% by IC ( $P < 0.05$ ). LPS administration increased the recruitment of the lymphocytes and non-lymphocytic leucocytes into the lung airways ( $P < 0.05$ ), and both were significantly reduced by SDP and IC (Fig. 1(A)).

In control mice, the majority of BALF non-lymphocytic leucocytes was monocytes (94.3%), while only 2.6% were neutrophils (Table 2). This profile was reversed by LPS since the neutrophil population became several-fold higher than the monocyte population, and this cellular shift was not affected by dietary treatment. LPS also increased 3.5-fold the percentage of activated neutrophils and twentyfold the population of activated monocytes. Both SDP and IC supplements reduced the percentage of activated neutrophils, but only SDP prevented in part monocyte activation in the challenged mice (Table 2).

In the lung tissue, LPS increased leucocyte recruitment by 30% (Fig. 1(B)), and this effect was completely prevented by SDP supplementation. However, the effects of LPS on the relative distribution of leucocyte subsets (Table 2) were not modified by the plasma supplements. Interestingly, both supplements reduced the percentage of monocytes and neutrophils in the unchallenged groups. As to the degree of activation of these cells, LPS increased the percentage of activated neutrophils almost threefold and that of activated monocytes over thirtyfold, whereas dietary supplements did not modify this response.

In the blood, LPS induced a leucocyte distribution profile similar to that observed in the lung tissue, i.e. an increase in the percentage of activated neutrophils and monocytes (tenfold and threefold, respectively), which were partially inhibited by both plasma supplements (Table 2).

### Chemokine and cytokine

Chemokine and cytokine expression is presented in Figs. 2 and 3, respectively. Although most of the variables showed maximal responses at 6 h, there were still significant differences 24 h after the LPS challenge. In general, the response to LPS was a several-fold increase in the expression of cytokines and chemokines, both 6 and 24 h after the challenge.

The effect of LPS on chemokines at 6 h was significant, especially on the expression of CCL3 (a more than 1000-fold increase; Fig. 2). At 24 h, the response was still significant. Dietary treatment reduced chemokine production at both 6 h (CCL2, CCL3 and CCL4) and at 24 h (CCL3 and CCL4, Fig. 2).

For cytokines, the highest response was obtained for IL-6, TNF- $\alpha$  and G-CSF (more than 1000-fold increase; Fig. 3), and the response at 6 h, with the exception of IL-1 $\alpha$ , was higher than at 24 h. Both dietary treatments were effective in reducing cytokine concentration, including an 80% reduction in TNF- $\alpha$  and a 30% reduction in IL-1 $\alpha$  expression. In spite of increased variability in cytokine concentrations 24 h after LPS challenge, both dietary treatments reduced the levels of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  (Fig. 3). The expression of IL-10 in the lung tissue is shown in Fig. 4. LPS had no effect on its concentration in the tissue, but both SDP and IC supplements stimulated its expression in the challenged mice.

### Inducible NO synthase expression

In the lung tissue, LPS increased iNOS expression by 13% (LPS group, 1.13 (SEM 0.03); control group, 1.00 (SEM 0.02);  $P < 0.05$ ), and this effect was removed by both the SDP and IC supplements (LPS-SDP, 0.99 (SEM 0.04) and LPS-IC, 1.02 (SEM 0.02); both  $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Populations of neutrophils and monocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung and blood after 24 h administration in control, spray-dried plasma (SDP), Ig concentrate (IC), lipopolysaccharide (LPS), LPS-SDP and LPS-IC mice

(Mean values with their standard errors, *n* 7–8)

	LPS challenge	Control diet		SDP diet		IC diet		LPS effect	Diet effect	LPS × diet interaction
		Means	SEM	Means	SEM	Means	SEM	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
<b>BALF (%)</b>										
Non-lymphocytic leucocytes										
Neutrophils	No	2.6	0.2	2.0	0.2	3.2	0.5	< 0.001	NS	NS
	Yes	69.7	7.1	71.8	3.9	81.4	2.7			
Monocytes	No	94.3	0.7	94.7	0.8	93.7	0.9	< 0.001	NS	NS
	Yes	9.3	2.4	9.1	0.6	8.7	1.4			
Neutrophils										
Activated	No	24.0 <sup>a</sup>	5.5	18.5 <sup>b</sup>	4.4	17.4 <sup>b</sup>	1.8	< 0.001	0.048	NS
	Yes	84.2 <sup>a</sup>	1.1	78.1 <sup>b</sup>	3.7	75.7 <sup>b</sup>	3.7			
Monocytes										
Activated	No	0.8	0.2	0.6	0.2	0.6	0.1	< 0.001	0.042	0.049
	Yes	16.3 <sup>a</sup>	2.0	9.7 <sup>b</sup>	1.3	13.7 <sup>a,b</sup>	3.3			
<b>Lung (%)</b>										
Non-lymphocytic leucocytes										
Neutrophils	No	18.3 <sup>a</sup>	0.5	14.8 <sup>b</sup>	0.9	15.1 <sup>b</sup>	1.3	< 0.001	NS	0.038
	Yes	29.4	1.5	32.5	3.2	29.7	4.1			
Monocytes	No	19.1 <sup>a</sup>	2.4	12.2 <sup>b</sup>	1.3	13.4 <sup>b</sup>	1.7	< 0.001	NS	0.017
	Yes	32.1	3.9	28.7	3.3	32.6	4.1			
Neutrophils										
Activated	No	2.1	0.6	1.0	0.2	0.8	0.2	< 0.001	NS	NS
	Yes	5.4	1.1	7.2	2.0	7.2	2.0			
Monocytes										
Activated	No	0.5	0.2	0.3	0.1	1.1	0.4	< 0.001	NS	NS
	Yes	17.4	3.7	16.6	4.8	17.7	3.8			
<b>Blood (%)</b>										
Non-lymphocytic leucocytes										
Neutrophils	No	15.7 <sup>a</sup>	0.7	8.3 <sup>b</sup>	0.7	8.9 <sup>b</sup>	0.6	0.034	< 0.001	NS
	Yes	16.2 <sup>a</sup>	1.9	9.3 <sup>b</sup>	1.3	13.6 <sup>b</sup>	1.3			
Monocytes	No	19.7	1.1	16.6	2.1	16.6	1.9	< 0.001	NS	NS
	Yes	51.6	6.3	56.5	4.2	48.1	4.7			
Neutrophils										
Activated	No	0.32 <sup>a</sup>	0.03	0.57 <sup>b</sup>	0.09	0.67 <sup>b</sup>	0.09	< 0.001	NS	0.019
	Yes	3.5 <sup>a</sup>	0.7	1.5 <sup>b</sup>	0.4	1.8 <sup>b</sup>	0.5			
Monocytes										
Activated	No	1.0 <sup>a</sup>	0.2	1.0 <sup>a</sup>	0.1	1.7 <sup>b</sup>	0.2	< 0.001	NS	0.001
	Yes	3.2 <sup>a</sup>	0.5	1.9 <sup>b</sup>	0.4	1.4 <sup>b</sup>	0.2			

<sup>a,b</sup> Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (*P* < 0.05).

## Discussion

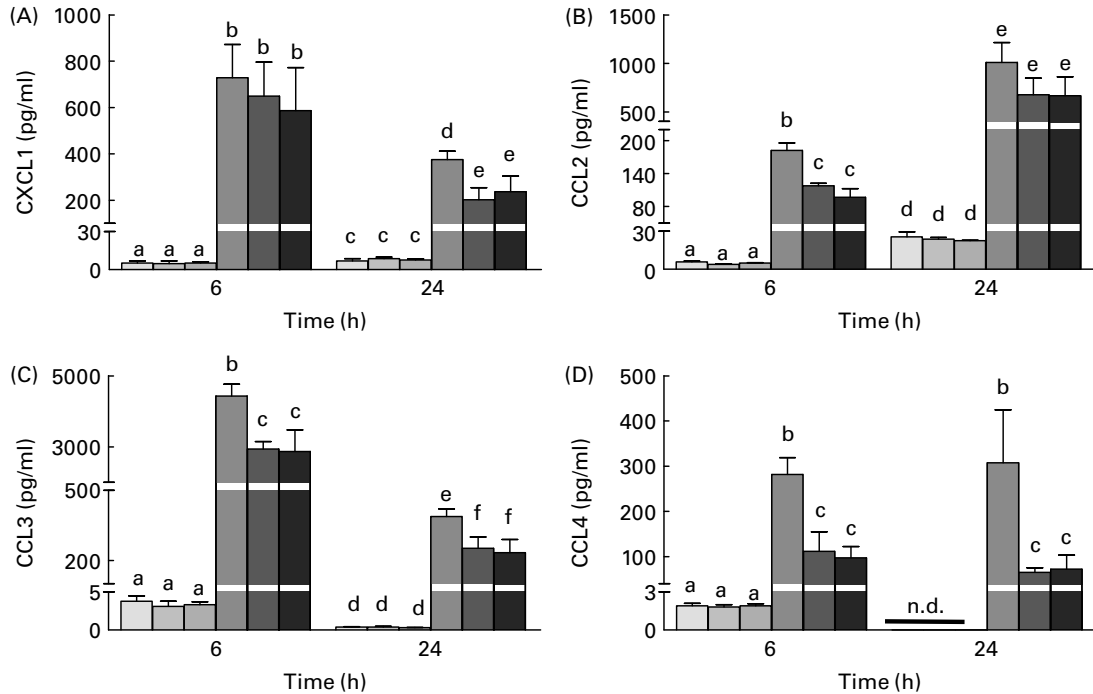
Dietary spray-dried plasma proteins are widely used in farm animal nutrition because they maintain normal intestinal barrier function and growth performance<sup>(27)</sup>. They also have anti-inflammatory effects as they attenuate the mucosal inflammatory response in the small intestine of rats exposed to a staphylococcal enterotoxin<sup>(28,29)</sup>; in humans, bovine immunoglobulin concentrates reduce the clinical effects of cryptosporidiosis with AIDS<sup>(30)</sup>.

In addition to its effects on gut homeostasis, which involve modulation of GALT<sup>(28)</sup>, animal plasma supplements can also affect lymphoid tissue populations and the expression of cytokines in peripheral tissues, such as the spleen and the liver<sup>(20)</sup>, and in the lungs<sup>(21)</sup>. These observations have led to the hypothesis that dietary plasma supplements may also be effective in modulating the response of the immune cells in the non-intestinal mucosal tissues such as the nasopharyngeal mucosa (nasal and bronchoalveolar-associated lymphoid tissue). This hypothesis is sustained by the existence of the common mucosal immune system that connects the inductive

sites (here the GALT) with the effector sites (nasal and bronchoalveolar-associated lymphoid tissue) for the generation of T lymphocyte responses<sup>(11)</sup>.

The study was done during the post-weaning period, because at this stage the mucosal immune system is still immature and therefore more susceptible to infection<sup>(31)</sup>; furthermore, we had demonstrated in rats that plasma supplements are already effective in this early period<sup>(17)</sup>. In the mouse model of acute lung inflammation induced by LPS, the pulmonary response is characterised by lymphocyte migration and the massive release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, which recruit monocytes and neutrophils into the lung airway and into the lung tissue<sup>(9,32)</sup>. We were primarily interested in the effects of SDP and IC on the innate immune response because of its triple role: first, mediating the defence against pathogens; secondly, detecting tissue damage, and finally, regulating tissue health and integrity<sup>(2)</sup>.

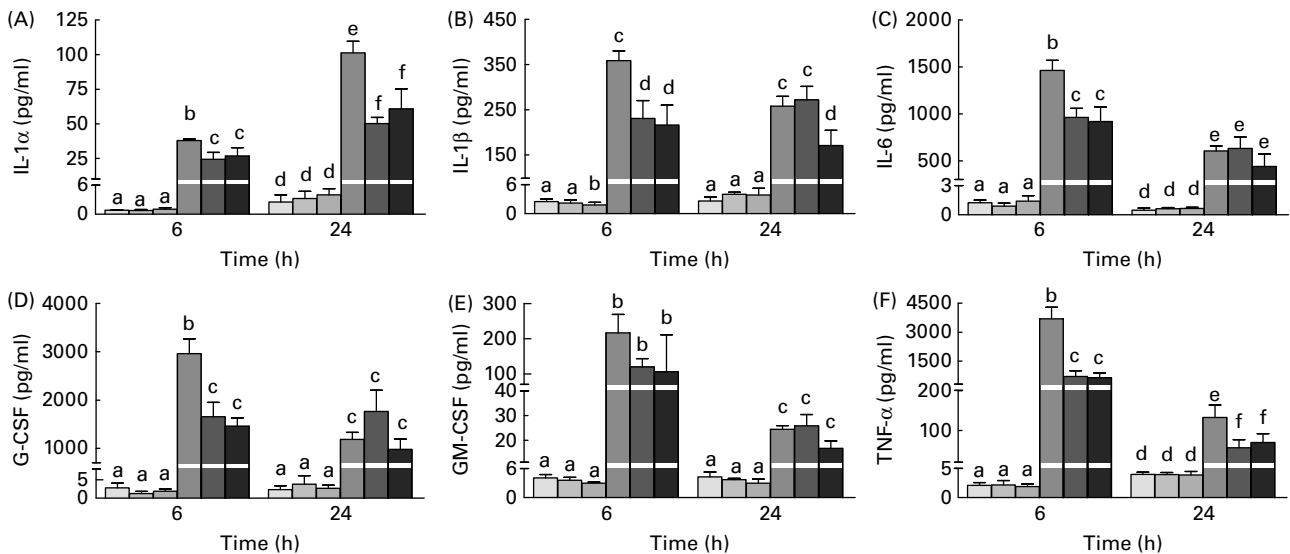
The main finding of the present study is that dietary supplementation with SDP or IC reduces the innate immune response to LPS inhalation. The reduction in leucocyte counts in BALF and the lung tissue, the lower concentration



**Fig. 2.** Concentration of (A) CXCL1, (B) CCL2, (C) CCL3 and (D) CCL4 in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid from control (□), spray-dried plasma (SDP, ◻), Ig concentrate (IC, ◻), lipopolysaccharide (LPS, ◻), LPS-SDP (◻) and LPS-IC (◻) mice 6 and 24 h after the LPS challenge. n.d., Not determined. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars,  $n = 5-6$ . The LPS effect was significant in the four chemokines studied ( $P \leq 0.001$ ); the diet effect was significant for CCL2 and CCL3 ( $P < 0.05$ ); the time effect was significant except for CCL4 ( $P < 0.001$ ); the interaction between diet and LPS was significant for CCL2 and CCL3 ( $P < 0.05$ ); the interaction between LPS and time was significant for all the chemokines except for CCL4 ( $P < 0.005$ ). <sup>a-f</sup>Mean values with unlike letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

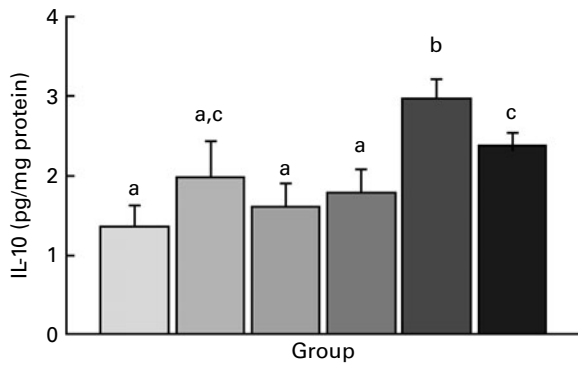
of pro-inflammatory cytokines and chemokines in BALF, and the lower iNOS expression in the lung tissue, all suggest a dietary-dependent reduction in the chemical mediators responsible for acute lung injury. These results agree with previous observations in rats indicating that dietary plasma

proteins protect the intestine from immune overstimulation caused by the intraperitoneal administration of *S. aureus* enterotoxin B<sup>(17)</sup>. The mechanism of action involves a reduction in the pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokine ratios in both Peyer's patches and the mucosa<sup>(26)</sup>.



**Fig. 3.** Concentration of (A) IL-1 $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (D) G-CSF, (E) GM-CSF and (F) TNF- $\alpha$  in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid from control (□), spray-dried plasma (SDP, ◻), Ig concentrate (IC, ◻), lipopolysaccharide (LPS, ◻), LPS-SDP (◻) and LPS-IC (◻) mice 6 and 24 h after the LPS challenge. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars,  $n = 5-6$ . The LPS effect was significant in the six cytokines studied ( $P < 0.001$ ); the diet effect was significant for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and G-CSF ( $P \leq 0.039$ ) and for TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ); the time effect was significant except for IL-1 $\beta$  ( $P \leq 0.010$ ); the interaction between diet and LPS was significant for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and G-CSF ( $P \leq 0.05$ ) and for TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ); the interaction between LPS and time was significant for all the cytokines except for IL-1 $\beta$  ( $P \leq 0.010$ ). <sup>a-f</sup>Mean values with unlike letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).





**Fig. 4.** Concentration of IL-10 in lung tissue from control (□), spray-dried plasma (SDP, ▤), Ig concentrate (IC, ▥), lipopolysaccharide (LPS, ▦), LPS-SDP (▧) and LPS-IC (▨) mice 6 h after the LPS challenge. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars,  $n$  5–6. <sup>a,b,c</sup> Mean values with unlike letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

In mice that were not exposed to LPS, the number of leucocytes recruited into the airway was low, with a clear predominance of monocytes, and a very low amount of neutrophils. The LPS challenge increased cell recruitment to the airway space; specifically, the percentage of neutrophils increased by 70%. These findings are consistent with the results reported by Reutershan *et al.*<sup>(32)</sup> who used a similar model. The primary function of neutrophils in the innate immune response is to contain and kill invading microbial pathogens<sup>(3)</sup>, and their concentration in BALF is a maximal 24 h after LPS administration<sup>(32)</sup>. In BALF and the lung tissue, LPS increased the proportion of activated neutrophils (three- and twofold, respectively) and of activated monocytes (twenty- and thirty-fourfold, respectively), as a consequence of the release of large amounts of chemokines, in agreement with the previous observations<sup>(9)</sup>. The effects of LPS on leucocyte counts in BALF were attenuated by SDP and IC, indicating lower cell infiltration, consistent with reduced eosinophil infiltration and lower degree of degranulation observed in the intestine of rats challenged with *S. aureus* enterotoxin B<sup>(28)</sup>. Both the plasma supplements reduced the percentage of activated neutrophils and monocytes in the lung airway; therefore, lower cell migration and smaller activation of inflammatory cells to the pulmonary tissue may reduce the potential damage to the respiratory epithelium and vascular endothelium associated with the inflammatory response.

The main effects of dietary supplementation with plasma proteins were observed in the lung airway, but there were also marked effects in the lung tissue and in peripheral blood. It is noteworthy that there is a reduction in the resident monocytes and neutrophils in the lung tissue, which implies a reduction in the normal pro-inflammatory state associated with the mucosal system<sup>(33)</sup>. At a systemic level, both diets decreased the percentage of activated monocytes and activated neutrophils induced by LPS, consistent with the reduction in the percentage of activated monocytes and activated neutrophils in the lung airway observed in the plasma-supplemented mice. The finding that diet reduces the activation of neutrophils and monocytes is important, because these populations are involved in the acute lung injury induced by LPS<sup>(34)</sup>.

Inhaled LPS increased cytokine and chemokine concentration as well as iNOS expression in the lung tissue and in BALF, in agreement with the previous observations<sup>(9)</sup>. Moreover, pro-inflammatory cytokines can alter the structure of the respiratory and vascular epithelia, which compromise the gas exchange. For example, excess TNF- $\alpha$  enhances the paracellular permeability of microvascular endothelial cells leading to tissue dysfunction and shock<sup>(35)</sup>. The present results show that LPS increased TNF- $\alpha$  concentration in BALF at 6 h, reaching a concentration 1700-fold higher than in the controls, which dropped to only sixtyfold 24 h after the challenge, consistent with the previous reports<sup>(36)</sup>. The concentration in BALF of the other pro-inflammatory cytokines studied was also dramatically increased at 6 h, confirming the observations of Yeh *et al.*<sup>(9)</sup> and partly prevented by both SDP and IC. The effects of SDP and IC on GM-CSF expression may be of special significance, because it plays an important role in the pathogenesis of acute and chronic lung disease<sup>(37)</sup>.

Since chemokines attract leucocytes into tissues, they are good indicators of the inflammatory state. CCL2 recruits monocytes, lymphocytes and basophils, and activates mast cells and basophils<sup>(38)</sup>. The pattern of the response of chemokines in BALF was similar to that of cytokines, i.e. most of them (CXCL1 and CCL3) showed an acute response that was greater at 6 h than at 24 h, whereas CCL2 was much more evident at 24 h after the challenge. Both SDP and IC attenuated the LPS-induced increase in chemokine concentration, and this effect is relevant due to the role of chemokines as inducers of cell migration into the bronchoalveolar space during inflammation.

The mechanism of action of dietary functional proteins is not well understood. Spray-dried plasma contains biologically active peptides and functional proteins including Ig (IgA, IgG and IgM), albumin and growth factors<sup>(23)</sup>. These proteins show special efficacy when the animals are exposed to environmental or immunological challenges. The IC supplement lacks most of the albumin fraction, and therefore it contains higher amounts of  $\gamma$ -globulins. Although it has been suggested that IgG is responsible for the SDP effects<sup>(39)</sup>, the contribution of other active plasma components to the functional effects of plasma supplements should also be considered. Plasma contains over 250 active peptides<sup>(40)</sup> that retain most of their biological activity after spray drying<sup>(23)</sup>. The main effects of SDP and IC involve regulation of mucosal GALT, which may be the result of reduced mucosal binding of luminal antigens mediated by plasma glycoproteins<sup>(39)</sup>. GALT regulation can also be ascribed to changes in the profile of the gut microflora<sup>(41)</sup> or to the biological activity of other plasma components either interacting with luminal extensions of dendritic cells or crossing the epithelium across M cells or through tight-junction complexes. Although the interaction of SDP and IC with the intestinal mucosa is not yet clarified, it is well demonstrated that plasma supplements modulate the expression of pro-inflammatory cytokines in the GALT of pigs<sup>(42)</sup> and rats<sup>(26)</sup>. Our studies in the rat model of mild intestinal inflammation<sup>(29)</sup> indicate that the mechanism by which plasma supplements reduce GALT activation may also involve profile modulation of cytokines<sup>(26)</sup>.

Cuzzocrea *et al.*<sup>(43)</sup> have shown that IL-10 has also an important role during acute lung inflammation, inhibiting the release of pro-inflammatory mediators such as IL-6<sup>(44)</sup> and iNOS<sup>(45)</sup>. In contrast to the mild response induced by *S. aureus* enterotoxin B in the intestine, the effects of LPS in the lung are characterised by increased leucocyte recruitment and strongly enhanced cytokine and chemokine production. However, even in this acute inflammatory condition, both SDP and IC inhibited the immune response, indicating that dietary modulation of intestinal lymphocyte proliferation<sup>(17)</sup> and cytokine expression<sup>(26)</sup> can reduce inflammatory responses in distant regions, albeit interconnected by the common mucosal immune system. The analysis of IL-10 in the lung tissue showed that both SDP and IC supplements can significantly increase its expression, supporting the view that the peripheral anti-inflammatory effects of plasma supplements also involve modulation of the cytokine ratios.

In conclusion, dietary SDP or IC interacts with the immune cells of GALT and reduces the pulmonary response to an LPS challenge, consistent with the hypothesis that there is extensive communication between the mucosal tissues through the common mucosal immune system. The present results support the view that oral intervention with plasma protein supplements is a new strategy for preventing, managing and attenuation of lung inflammation.

### Acknowledgements

The present study was supported by grant RDITCRD07-1-008 (Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain). The research group is also supported by grant 2009SGR0471 for Consolidated Research Groups (Generalitat de Catalunya). Mò. M., L. M. and Mi. M. reported no conflicts of interest; A. P.-B. and J. P. are employed by APC-Europe S.A. (Granollers, Spain); L. R., Joy C. and Joe C. are employed by APC, Inc., Ankeny, IA, USA; E. W. is employed by Proliant Health and Biologicals, Ankeny, IA, USA. The authors' contributions were as follows: Mi. M., J. P., L. R., Joy C., E. W., Joe C. and A. P.-B. designed the study; A. P.-B., Mò. M. and L. M. conducted the study; J. P. provided the essential materials; A. P.-B., Mò. M. and Mi. M. analysed the data and wrote the manuscript; Mò. M., J. P., L. R., Joy C., E. W., Joe C., Mi. M. and A. P.-B. discussed the results. All authors read and approved the final manuscript.

### References

- Augusto LA, Li J, Synguelakis M, *et al.* (2002) Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **277**, 23484–23492.
- Chaudhuri N & Sabroe I (2008) Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev* **9**, 236–242.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**, 173–182.
- Hazlewood LC, Wood LG, Hansbro PM, *et al.* (2010) Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 response and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Nutr Biochem* **22**, 95–100.
- Wheeler MD, Rose ML, Yamashima S, *et al.* (2000) Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L390–L398.
- Melchior D & Sève B (2008) Dietary tryptophan helps to preserve tryptophan homeostasis in pigs suffering from lung inflammation. *J Anim Sci* **86**, 3473–3479.
- Pontes-Arruda A, Demichele S, Seth A, *et al.* (2008) The use of an inflammation-modulating diet in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of outcome data. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **32**, 596–605.
- Xie YC, Dong XW, Wu XM, *et al.* (2009) Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Int Immunopharmacol* **9**, 194–200.
- Yeh CC, Lin CC, Wang SD, *et al.* (2007) Protective and immunomodulatory effect of Gingyo-san in a murine model of acute lung inflammation. *J Ethnopharmacol* **111**, 418–426.
- Muehlmann LA, Zanatta AL, Farias CL, *et al.* (2010) Dietary supplementation with soybean lecithin increases pulmonary PAF bioactivity in asthmatic rats. *J Nutr Biochem* **21**, 532–537.
- Kiyono H & Fukuyama S (2004) NALT- versus Peyer's patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* **4**, 699–710.
- Lilius EM & Marnila P (2001) The role of colostrum antibodies in prevention of microbial infections. *Curr Opin Infect Dis* **14**, 295–300.
- Cross ML & Gill HS (2000) Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr* **84**, S81–S89.
- Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, *et al.* (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr* **84**, S111–S117.
- Pérez-Bosque A, Amat C, Polo J, *et al.* (2006) Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. *J Nutr* **136**, 2838–2843.
- Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, *et al.* (2008) Dietary plasma proteins modulate the immune response of diffuse gut-associated lymphoid tissue in rats challenged with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *J Nutr* **138**, 533–537.
- Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Vicario M, *et al.* (2004) Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *Staphylococcus aureus* superantigen B. *J Nutr* **134**, 2667–2672.
- Dewey CE, Johnston WT, Gould L, *et al.* (2006) Postweaning mortality in Manitoba swine. *Can J Vet Res* **70**, 161–167.
- Carroll JA, Touchette KJ, Matteri RL, *et al.* (2002) Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: II. Effects on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of weaned pigs. *J Anim Sci* **80**, 502–509.
- Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, *et al.* (2002) Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J Anim Sci* **80**, 494–501.
- Campbell JM, Quigley JD III, Russell LE, *et al.* (2004) Efficacy of spray-dried bovine serum on health and performance of turkeys challenged with *Pasteurella multocida*. *J Appl Poult Sci Res* **13**, 388–393.
- Lee Y-Z, Sim JS, Al-Mashikhi S, *et al.* (1998) Separation of immunoglobulins from bovine blood by polyphosphate precipitation and chromatography. *J Agric Food Chem* **36**, 922–928.
- Borg BS, Campbell JM & Polo J, *et al.* (2002) Evaluation of the chemical and biological characteristics of spray-dried plasma protein collected from various locations around the

- world. Proceedings of 33rd Annual Meeting of the American of Swine Veterinarians, pp. 97–100. Kansas City, Missouri.
24. NRC (1995) *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th ed. Washington, DC: National Academy Press.
  25. Woolard MD, Huding D, Tabor L, *et al.* (2005) NK cells in gamma-interferon-deficient mice suppress lung innate immunity against *Mycoplasma* spp. *Infect Immun* **73**, 6742–6751.
  26. Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, *et al.* (2010) Dietary plasma protein supplements prevent the release of mucosal proinflammatory mediators in intestinal inflammation in rats. *J Nutr* **140**, 25–30.
  27. Campbell JM, Polo J, Russell LE, *et al.* (2010) Review of spray-dried plasma's impact on intestinal barrier function. *Livest Sci* **133**, 239–241.
  28. Moretó M & Pérez-Bosque A (2009) Dietary plasma proteins, the intestinal immune system and the barrier functions of the intestinal mucosa. *J Anim Sci* **87**, E92–E100.
  29. Pérez-Bosque A & Moretó M (2010) A rat model of mild intestinal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Proc Nutr Soc* **69**, 447–453.
  30. Greenberg PD & Cello JP (1996) Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13**, 348–354.
  31. Bailey M, Haverson K, Inman C, *et al.* (2005) The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc Nutr Soc* **64**, 451–457.
  32. Reutershan J, Basit A, Galkina EV, *et al.* (2005) Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**, L807–L815.
  33. Suzuki T, Chow CW & Downey GP (2008) Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1348–1361.
  34. Schuh K & Pah A (2009) Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochem Pharmacol* **77**, 1827–1834.
  35. Tracey KJ & Cerami A (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* **45**, 491–503.
  36. Larsson R, Rocksén D, Lilliehöök B, *et al.* (2000) Dose-dependent activation of lymphocytes in endotoxin-induced airway inflammation. *Infect Immun* **68**, 6962–6969.
  37. Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, *et al.* (2007) Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol* **557**, 230–235.
  38. Puneet P, Mochhala S & Bhatia M (2005) Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L3–L15.
  39. Van Dijk AJ, Niewold TA, Nabuurs MJ, *et al.* (2002) Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **49**, 81–86.
  40. Anderson NL & Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**, 845–867.
  41. Bhandari SK, Xu B, Nyachoti CM, *et al.* (2008) Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J Anim Sci* **86**, 836–847.
  42. Bosi P, Casini L, Finamore A, *et al.* (2004) Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci* **82**, 1764–1772.
  43. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, *et al.* (2002) Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of acute lung injury. *Eur Cytokine Netw* **13**, 285–297.
  44. Heyen JR, Ye S, Finck BN, *et al.* (2000) Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res* **77**, 138–147.
  45. Ogando D, Cella M, Ribeiro ML, *et al.* (2004) IL-10 inhibits nitric oxide synthesis in murine uterus. *Neuroimmunomodulation* **11**, 127–132.

## 2.2. Resultats annexes a l'Article 1.

El disseny experimental i els materials i mètodes són els mateixos que els exposats a l'Article 1.

### 2.2.1. Variables metabòliques

Durant tot el període experimental s'ha mesurat el **pes dels animals** i el **consum de pinso**, és a dir, des del deslletament (dia 19) fins al dia de sacrifici (dia 33 o 34).

L'**evolució del pes corporal** és similar en tots els grups durant els primers 28 dies. Els animals suplementats amb SDP han tingut un augment de pes significatiu, des del dia 28 fins al final de l'experiment (dia 34), respecte els animals que han estat alimentats amb la dieta control o amb el pinso IC ( $P < 0,05$ ; Figura III-21). Aquest efecte no s'ha observat en els ratolins alimentats amb la dieta IC.

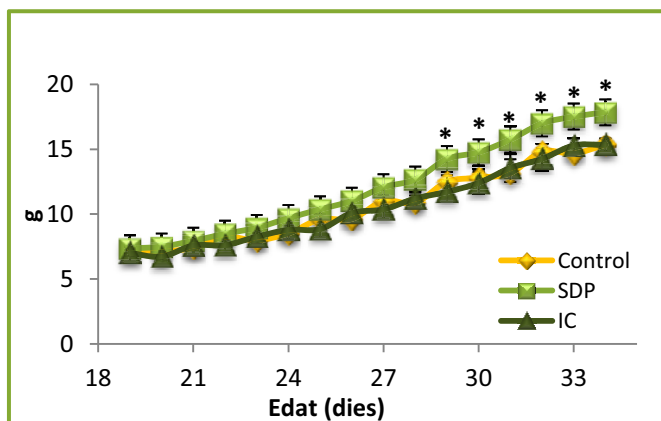


Figura III-21. Evolució del pes corporal dels ratolins sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. L'evolució del pes s'ha seguit des del dia 19 (deslletament) fins al final del període experimental (14 dies de dieta). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 33-35 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups ( $P < 0,05$ ).

L'**increment de pes** durant el període experimental és similar entre el grup Control i el grup IC, mentre que els ratolins alimentats amb la dieta SDP han crescut un 30% més que els altres animals ( $P < 0,05$ ; Figura III-22).

El **consum de pinso** és similar pels tres grups experimentals durant els primers 10 dies (Figura III-23), en canvi a partir del dia 30 fins el dia 34, el grup alimentat amb el pinso SDP ha presentat una ingesta major que els altres grups ( $P < 0,05$ ).

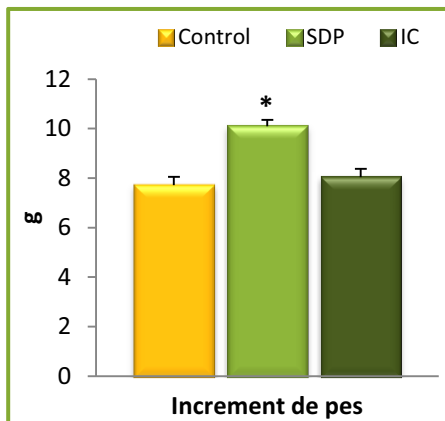


Figura III-22. Increment de pes dels ratolins sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. L'increment s'ha mesurat des del deslletament fins al final de l'experiment. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 33-35 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups ( $P < 0,05$ ).

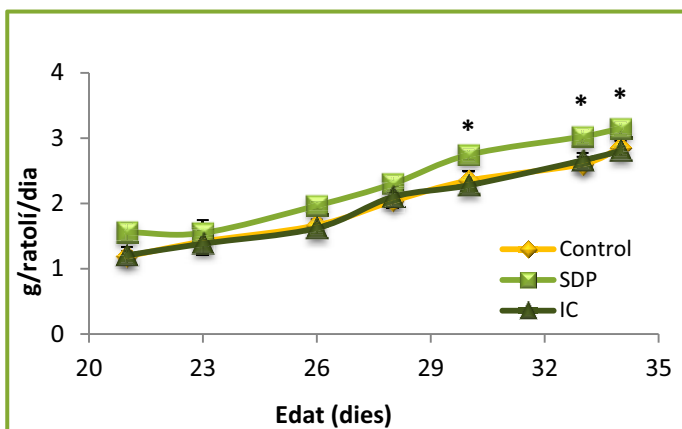


Figura III-23. Evolució del consum de pinso dels ratolins sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. L'evolució del consum de pinso s'ha seguit des del dia 19 (deslletament) fins al final del període experimental (14 dies de dieta). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 33-35 ratolins. \*Diferències significatives entre els grups ( $P < 0,05$ ).

### 2.2.2. Proteïnes al BALF

La concentració de **proteïnes al BALF** s'ha determinat mitjançant la tècnica de Bradford® utilitzant el colorant de BioRad®, tal com s'ha explicat en el capítol 1.

L'administració de LPS ha incrementat la concentració de proteïnes a l'espai alveolar ( $P < 0,05$ ; Figura III-24). L'efecte de l'LPS, sobre la concentració de proteïnes a l'espai alveolar, ha estat més evident a les 24 h que a les 6 h de la seva administració ( $P < 0,05$ ).

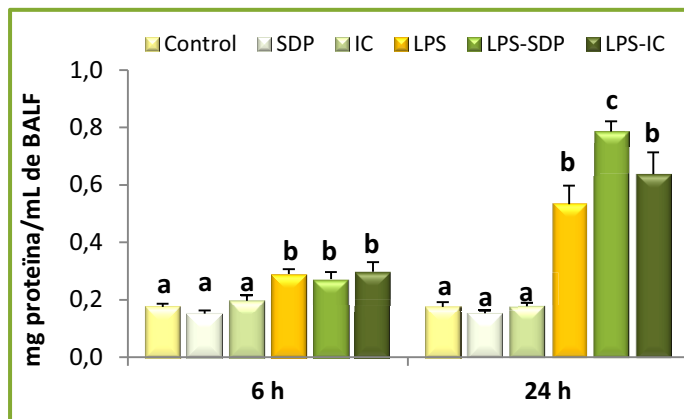


Figura III-24. Concentració de proteïnes al BALF d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra dins de cada temps de sacrifici ( $P < 0,05$ ).

### 2.2.3. Pes del pulmó i infiltració de leucòcits a pulmó.

El pes dels pulmons s'ha utilitzat com a indicador d'edema pulmonar, ja que comporta un augment del pes de l'òrgan. El pes humit dels pulmons dels animals inflamats, ha estat més elevat que el dels grups no inflamats ( $P < 0,05$ ; Figura III-25). Concretament, l'LPS ha augmentat un 26% el pes dels pulmons ( $P < 0,05$ ), sense ser afectat per la ingesta de les dietes suplementades. En canvi, la suplementació dietètica amb SDP ha reduït el pes dels pulmons dels animals no inflamats ( $P < 0,05$ ), mentre que la dieta IC s'ha mantingut en valors entremitjos entre el grup Control i el grup SDP.

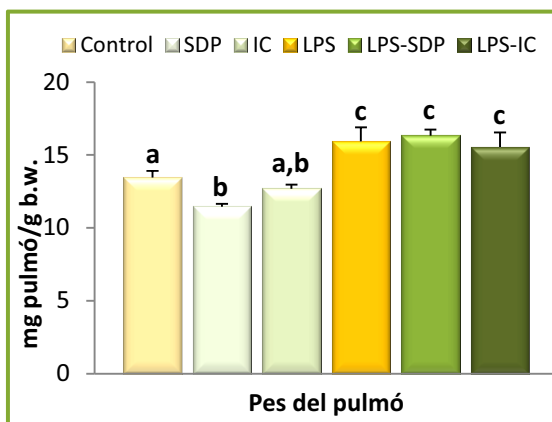


Figura III-25. Pes del pulmó d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).

L'administració de l'endotoxina ha incrementat la infiltració de leucòcits a pulmons en els animals del grup LPS ( $P < 0,05$ ; Figura III-26). La suplementació amb SDP ha evitat completament aquest efecte de l'endotoxina ( $P < 0,05$ ), per altra banda el grup suplementat amb la dieta IC ha atenuat l'efecte sense ser estadísticament significatiu.

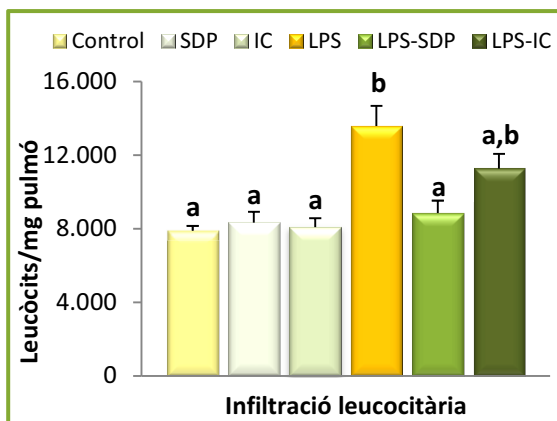


Figura III-26. Infiltració leucocitària a pulmó d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).

### 2.2.4. Perfil leucocitari a sang

L'administració de l'LPS ha produït canvis en el **perfil leucocitari a sang** (Figura III-27), ja que ha reduït el percentatge de limfòcits i ha augmentat el de leucòcits no limfocítics ( $P < 0,05$ ). Cap dels suplementes dietètics (SDP o IC) ha modificat el perfil d'aquestes poblacions, tant en els animals no inflamats com en els inflamats.

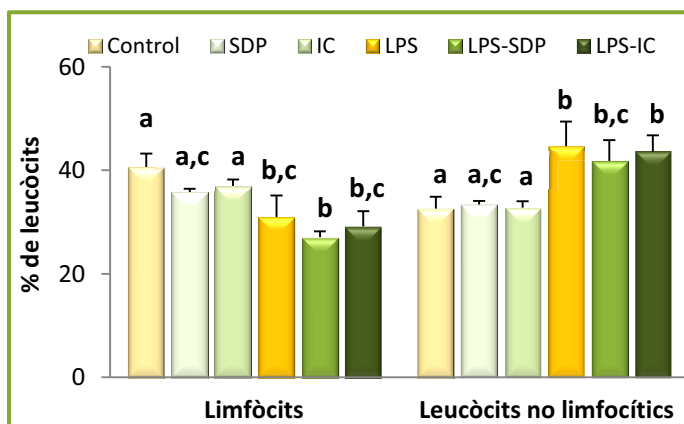


Figura III-27. Percentatge de limfòcits i leucòcits no limfocítics en sang d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).

### 2.2.5. Expressió de quimiocines al BALF

Les **quimiocines CCL5 i CCL11** s'han determinat amb el mateix mètode (kit de determinació de citocines/quimiocines de BioRad®) que les quimiocines representades en l'Article 1.

L'expressió de CCL5 ha presentat valors més elevats a les 6 h que a les 24 h de sacrifici, en els animals no inflamats ( $P < 0,05$ ; Taula III-2). L'LPS ha provocat un increment de les dues quimiocines estudiades, un efecte molt superior a les 6 h que a les 24 h de sacrifici ( $P < 0,05$ ). La

suplementació dietètica ha disminuït la concentració de CCL5 a les 24 h i a les 6 h per la CCL11 ( $P < 0,05$ ).

Taula III-2. Concentració de CCL5 i CCL11 a BALF d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC.

Citocina	Grup					
	Control	SDP	IC	LPS	LPS-SDP	LPS-IC
	<i>pg/mL</i>					
<b>CCL5 6 h</b>	2,17 ± 0,52 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,47 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,66 <sup>a</sup>	935 ± 134 <sup>b</sup>	776 ± 13 <sup>b</sup>	810 ± 221 <sup>b</sup>
<b>CCL5 24 h</b>	0,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	252 ± 25,4 <sup>b</sup>	154 ± 25,4 <sup>c</sup>	148 ± 26,8 <sup>c</sup>
<b>CCL11 6 h</b>	42,8 ± 6,45 <sup>a</sup>	52,8 ± 6,37 <sup>a</sup>	38,4 ± 14,6 <sup>a</sup>	1243 ± 120 <sup>b</sup>	644 ± 129 <sup>c</sup>	616 ± 141 <sup>c</sup>
<b>CCL11 24 h</b>	6,07 ± 3,32 <sup>a</sup>	47,5 ± 2,16 <sup>b</sup>	44,4 ± 32,4 <sup>b</sup>	347 ± 49,2 <sup>c</sup>	394 ± 63,8 <sup>c</sup>	267 ± 54,4 <sup>c</sup>

Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 6 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).



### Capítol 3. Estudi de l'efecte de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre la immunitat adaptativa i reguladora en animals sotmesos a una inflamació pulmonar aguda.

Els resultats d'aquests capítol es divideixen en dos apartats. En el primer es mostren els efectes de la suplementació dietètica en la resposta adquirida i reguladora inclosos en l'Article 2. En l'apartat de resultats annexes és mostren altres resultats involucrats en la resposta inflamatòria pulmonar adquirida i reguladora.

***“Dietary plasma proteins modulate the adaptive immune response in a mouse model of acute lung inflammation”***

*Maijó M., Miró Ll., Polo J., Campbell J., Russell L., Crenshaw J., Weaver E., Moretó M., Pérez-Bosque A.*

**Acceptat (24-11-2011)**

*Journal of Nutrition 2011*

*Factor d'impacte: 4,295 (2010)*

Els resultats obtinguts han donat lloc a les següents comunicacions a congressos:

- *La suplementación dietética con proteínas plasmáticas reduce la activación de linfocitos y la expresión de citocinas en un modelo de inflamación pulmonar en ratón*

**M. Maijó**, A. Pérez-Bosque, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, E. Weaver, J. Crenshaw, M. Moretó.

Pòster presentat al congrés: **XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)**, a Córdoba (Espanya) del 14 al 17 de Setembre del 2010

- *Dietary plasma protein supplementation ameliorates lung inflammation induced by LPS administration in mice*

A. Pérez-Bosque, **M. Maijó**, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, J. Crenshaw, E. Weaver, M. Moretó.

Comunicació oral presentada al **11<sup>th</sup> European Nutrition Conference (FENS)** a Madrid (Espanya) del 26 al 29 d'octubre del 2011.

## ***Dietary plasma proteins modulate the adaptive immune response in a mouse model of acute lung inflammation***

*Journal of Nutrition (Acceptat)*

### **3.1. Resum de l'Article 2**

**Antecedents i objectius:** En l'estudi anterior es va demostrar que les dietes suplementades amb proteïnes del plasma atenuaven la resposta immunitària innata en un model d'inflamació pulmonar. En aquest article s'ha estudiat la resposta immunitària adaptativa i reguladora, en el mateix model d'inflamació pulmonar, per tal de conèixer millor la resposta immunitària front l'LPS i caracteritzar el possible paper de les dietes SDP i IC en la modulació de la lesió pulmonar aguda.

**Materials i mètodes:** Els ratolins s'han deslletat i s'han alimentat amb les dietes experimentals durant 14 dies. Les dietes experimentals són: Control, SDP (suplementat amb un 8% de plasma assecat per polvortzació) i IC (suplementat amb un 2% de concentrat d'Ig). Passat aquest temps s'ha induït una inflamació pulmonar mitjançant l'administració nasal de LPS. Els ratolins s'han sacrificat 24 h després de l'administració de l'endotoxina, per fer l'estudi de les poblacions limfocitàries al teixit pulmonar i a sang. I també s'han sacrificat uns altres ratolins 6 h després de l'administració de l'endotoxina, per determinar la concentració de les citocines mediadores de la resposta adaptativa (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p40, IL-12p70, IL-13 i IL-17) a BALF i quantificar l'expressió de les citocines antiinflamatòries IL-10 (pulmó i jejú) i TGF- $\beta$ 1 (pulmó).

**Resultats:** L'administració de l'LPS ha reduït el percentatge de limfòcits Th a pulmó i a sang ( $P < 0,05$ ), i la dieta IC ha reduït aquest efecte a pulmó ( $P < 0,05$ ). En canvi, l'administració de la toxina ha augmentat l'activació dels limfòcits Th, efecte que ha estat completament evitat per la suplementació SDP i IC ( $P < 0,05$ ). Durant el procés inflamatori, han augmentat les poblacions Th1 i Th2 en ambdós teixits. Les dietes SDP i IC han aconseguit prevenir l'increment de resposta Th1 i només la dieta SDP ha disminuït l'efecte sobre la resposta Th2 ( $P < 0,05$ ). Els limfòcits T reguladors (Treg) han augmentat en els grups suplementats amb les dietes SDP i IC tant als animals inflamats com als administrats amb PBS. A sang l'administració de l'LPS ha produït una disminució en els limfòcits Treg només en els animals alimentats amb dieta control, en els grups suplementats no s'ha presentat aquesta disminució. L'administració de l'LPS ha augmentat l'expressió de totes les citocines estudiades ( $P < 0,001$ ). Les dietes suplementades SDP i IC han reduït l'increment de l'expressió de les citocines IL-2, IL-17 (només l'SDP), les citocines involucrades en la resposta Th1 (INF- $\gamma$ , IL-12p40, IL-12p70,) i les citocines involucrades en la resposta Th2 (IL-5 i IL-13), exceptuant

la IL-4. L'expressió de la citocina antiinflamatòria IL-10 a pulmó i jejú ha augmentat en els grups suplementats i inflamats amb LPS ( $P < 0,05$ ). En quant al TGF- $\beta$ 1, les dietes han previngut la reducció d'aquest factor en els grups inflamats ( $P < 0,05$ ).

**Conclusió:** Els nostres resultats mostren la capacitat de les dietes per modular la resposta immunitària pulmonar. Els suplementes SDP i IC redueixen l'activació dels limfòcits Th i incrementen els limfòcits Treg, proposem els suplementes amb proteïnes del plasma com a teràpia dietètica preventiva per les malalties inflamatòries pulmonars.

# Dietary Plasma Proteins Modulate the Adaptive Immune Response in Mice with Acute Lung Inflammation<sup>1–3</sup>

Mònica Maijó,<sup>4</sup> Lluïsa Miró,<sup>4</sup> Javier Polo,<sup>5</sup> Joy Campbell,<sup>6</sup> Louis Russell,<sup>6</sup> Joe Crenshaw,<sup>6</sup> Eric Weaver,<sup>7</sup> Miquel Moretó,<sup>4</sup> and Anna Pérez-Bosque<sup>4,5\*</sup>

<sup>4</sup>Department of Physiology, Faculty of Pharmacy and the Nutrition and Food Safety Research Institute of the Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>APC Europe S.A., Granollers, Spain; <sup>6</sup>APC Inc, Ankeny, IA; and <sup>7</sup>Proliant Health and Biologicals, Ankeny, IA

## Abstract

We examined the effects of oral plasma protein supplements on the pulmonary adaptive immune response in mice challenged with intranasal LPS. C57BL/6 mice were fed a control diet or a diet supplemented with plasma proteins [spray-dried plasma (SDP) 80 g/kg] or with an Ig concentrate (IC) 20 g/kg] from postnatal d 19 (weaning) until d 34. Mice were challenged with PBS or LPS from *Escherichia coli* at d 33 and killed 24 h later for leukocyte analyses or at d 34 and killed 6 h later for cytokine determination. LPS induced the activation of T helper (Th) lymphocytes in lung and blood and this response was reduced by SDP and IC ( $P < 0.05$ ). In both tissues, LPS increased the Th1 and Th2 subpopulations and this effect was inhibited by the two plasma protein supplements ( $P < 0.05$ ). The LPS challenge increased the expression of all the cytokines studied ( $P < 0.01$ ). SDP and IC reduced the expression of IFN $\gamma$ , IL-5, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, and IL-17 in both tissues, whereas they increased the percentage of regulatory Th lymphocytes in lung, even in PBS-treated mice ( $P < 0.05$ ). LPS reduced the concentration of mature TGF $\beta$ 1 ( $P < 0.05$ ) in the lung but did not modify the expression of IL-10. Mice exposed to LPS and supplemented with SDP or IC showed an increased expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 ( $P < 0.05$ ). Moreover, the two supplements increased the concentration of IL-10 in intestinal mucosa ( $P < 0.05$ ). Our results show that plasma supplementation reduces the immune response that characterizes the acute lung inflammation syndrome. J. Nutr. doi: 10.3945/jn.111.149070.

## Introduction

The lung is continuously exposed to a variety of potentially harmful agents, including pathogenic microorganisms, allergens, and particulate pollutants (1), and lung infection is one of the most frequent causes of morbidity and death in humans (2). The lung defense system can be divided into 2 broad categories, namely innate and adaptive immune responses. The innate immune system is evolutionarily conserved to provide immediate host defense in a broad manner. Vertebrates have evolved an additional adaptive immune system comprised of lymphocytes. This system provides a highly precise immune response directed

to specific components of microbial pathogens or molecules (1). Acute lung injury is associated with high morbidity and mortality and no specific treatments are available for this condition (3).

Enteral nutrition has been used to prevent inflammatory responses in systemic mucosa. For example, in a model of airway allergy, the carotenoid lycopene, with powerful antioxidant capacity, decreases eosinophilic infiltrates and reduces the cytokine response mediated by Th2<sup>8</sup> cells from mesenteric lymph nodes (4); also, flavonoids from licorice have been shown to be effective in the treatment of acute lung inflammation in mice exposed to LPS (5).

The inclusion of plasma proteins in farm animal diets has been associated with a decrease in mortality caused by the reproductive and respiratory syndrome (6). The mechanism of action of the antiinflammatory effects of oral plasma proteins, though still controversial, involves the mucosal organized and diffuse GALT. In rats, administration of SEB produces mild

<sup>1</sup> Supported by grant RDITCRD07-1-008 (Generalitat de Catalunya, Spain). The research group is also supported by grant 2009SGR0471 from Consolidated Research Groups (Generalitat de Catalunya, Spain).

<sup>2</sup> Author disclosures: M. Maijó, L. Miró, and M. Moretó, no conflicts of interest. J. Polo and A. Pérez-Bosque are employed by APC Europe SA. J. Campbell, L. Russell, and J. Crenshaw are employed by APC Inc. E. Weaver is employed by Proliant Health and Biologicals.

<sup>3</sup> Presented in part at the 11th European Nutrition Conference, Madrid, Spain, October 26–29, 2011 (A. Pérez-Bosque, M. Maijó, L. Miró, J. Polo, L. Russell, J. Campbell, E. Weaver, J. Crenshaw, M. Moretó. Dietary plasma protein supplementation ameliorates lung inflammation induced by LPS administration in mice).

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: anna.perez@ub.edu.

<sup>8</sup> Abbreviations used: BALF, broncho-alveolar lavage fluid; GALT, gut-associated lymphoid tissue; IC, Ig concentrate; LPS-IC, mice fed Ig concentrate diet and treated with LPS; LPS-SDP, mice fed spray-dried plasma diet and given LPS; PBS-IC, PBS-treated mice fed the Ig concentrate diet; PBS-SDP, PBS-treated mice fed spray-dried plasma diet; PE, phycoerythrin; SDP, spray-dried plasma; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; Th, T helper; Treg, regulatory T cell.

intestinal inflammation (7) and this response is partially blocked by dietary supplementation with animal plasma proteins, either SDP or an Ig-enriched plasma fraction (IC) (8–10). In both cases, there is a reduction in the GALT mucosal response (11). In a mouse model of spontaneous colitis, dietary supplementation with SDP (12) and IC (13) contributed to reducing several structural and functional alterations in the inflamed colon. In addition to their effects on GALT, plasma supplements also affect lymphoid tissue populations and the expression of cytokines in peripheral tissues, such as spleen and liver (14). The respiratory and intestinal immune systems share common mucosa-associated immunological features that are different from those of the systemic immune system (15) and are connected across the common mucosal immune system (16). Recent results in a mouse model of acute lung inflammation show that oral plasma proteins reduce the pulmonary response to an LPS challenge, consistent with the hypothesis that there is extensive communication between the mucosal tissues through the common mucosal immune system (17).

In a previous study focused on innate cellular and chemical responses to LPS challenge (17), we demonstrated that dietary plasma proteins prevent acute lung injury in the LPS mouse model of acute lung inflammation. The response was characterized by a significant release of cytokines, such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ; production of chemokines such as CCL2 and CCL4; recruitment of leukocytes, lymphocytes, and granulocytes; and increased oxidative stress. Dietary SDP and IC partially blocked the pulmonary innate response, thereby reducing the recruitment of neutrophils and lowering the expression of the cytokines and chemokines involved in this response (17).

Here, we studied the adaptive immune response in the same model of acute lung inflammation to better understand the immune response to the LPS challenge and further characterize the potential role of dietary SDP and IC supplements in the modulation of the acute lung inflammatory syndrome.

## Methods and Materials

**Mice and diets.** Male C57BL/6 mice were supplied by Harlan Ibérica and kept under stable temperature and humidity, with a 12-h-light/dark cycle and free access to food and water. All protocols used in this study were approved by the Ethical Committees for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalan government. Mice were weaned at postnatal d 19, distributed into random groups of 7–8 mice (2–3 mice/cage), and fed the experimental diets for 2 wk (Table 1). The dietary treatments tested were as follows: 1) PBS-treated mice fed the control diet (PBS group); 2) PBS-treated mice fed the SDP diet (PBS-SDP group); 3) PBS-treated mice fed the IC diet (PBS-IC group); 4) mice fed the control diet and challenged with LPS (LPS group); 5) mice fed the SDP diet and given LPS (LPS-SDP group); and 6) mice fed the IC diet and treated with LPS (LPS-IC group).

SDP is a feed ingredient obtained by centrifuging blood from healthy pigs. IC is obtained by removing most of the albumin from plasma, resulting in a fraction containing ~40% Ig (18). Both ingredients were spray-dried to obtain a stable powder. Maintenance of the protein native structure was confirmed by immuno-electrophoresis and Western blotting (19). Diets were balanced for energy and total nitrogen, and lysine and methionine were formulated to meet the NRC requirements (20) for laboratory animals. The IC diet was formulated to provide the same amount of Ig as the SDP treatment. The nitrogen content of the control diet was adjusted with milk protein. All diets were prepared by Harlan Ibérica.

**LPS-induced lung inflammation.** We used this model as previously described (17). Briefly, mice were anesthetized with isoflurane at d 33 (for 24-h sampling) or at d 34 (for 6-h sampling) and administered 625

**TABLE 1** Composition of experimental diets fed to weaned mice<sup>1</sup>

Ingredient	Control	SDP	IC
		<i>g/kg</i>	
SDP	–	80	–
IC <sup>2</sup>	–	–	20
Corn starch	199	309	224
Skim milk	531	341	487
Sugar	95	95	95
Soybean oil	70	70	70
Cellulose	50	50	50
AIN-93 GM <sup>2</sup>	35	35	35
AIN-93 VX <sup>2</sup>	15	15	15
DL-Methionine	2.5	3.2	2.6
Choline bitartrate	3	3	3

<sup>1</sup> IC, Ig concentrate (APC-Europe S.A.); SDP, spray-dried plasma (from porcine blood; AP-820P, APC-Europe S.A.).

<sup>2</sup> Provided by Harlan Ibérica.

mg LPS/kg body weight (LPS from *E. coli* O128:B12, Sigma) or PBS. To collect lung and blood for lymphocyte (24 h after the LPS treatment) and cytokine (6 h after LPS) analysis, mice were anesthetized by i.p. administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Blood was withdrawn by cardiac puncture. At the end of the experiment, the mice were killed by cervical dislocation. Samples used for protein and cytokine determinations were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at –80°C.

**BALF lymphocytes.** Broncho-alveolar lavage was performed by intratracheal instillation of 1 mL PBS, as previously described (21). Typically, 0.8–0.9 mL of BALF was recovered and centrifuged at 950  $\times$  g for 10 min. The supernatant was frozen at –80°C until further analysis.

**Lung lymphocytes.** Having obtained BALF, we excised two small samples of lung for protein and cytokine determinations. Lung lymphocyte isolation was performed as previously described (17). In all cases, cell viability was >80%.

**Blood lymphocytes.** Blood was drawn by cardiac puncture with a heparinized syringe and mixed with erythrocyte lysing buffer (NH<sub>4</sub>Cl 0.17 mol/L, KHCO<sub>3</sub> 0.01 mol/L, EDTA 0.1 mmol/L adjusted to pH 7.3). Blood lymphocytes were obtained following the method described in Maij $\acute{o}$  et al. (17). In all cases, cell viability was >95%.

**Cell staining.** Cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were incubated with primary mouse monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. The following primary antibodies were used: anti-CD45 APC-A750 (eBiosciences) for leukocytes, anti-CD4 PE-Cy7 (eBiosciences) for Th lymphocytes, anti-CD25 fluorescein isothiocyanate (eBioscience) for activated T lymphocytes, anti-FoxP3-PE (eBioscience) for regulatory T lymphocytes, anti-CD183 PE (R&D Systems) for Th type 1 lymphocyte, and anti-CD184 APC (BD Pharmingen) for Th type 2 lymphocyte. Samples were subsequently washed in PBS-FBS and centrifuged at 600  $\times$  g for 6 min at 4°C. Finally, washed cells were fixed with 4% (wt:v) paraformaldehyde and stored at 4°C until analysis. Samples were analyzed in a BD FACSAria<sup>TM</sup> Flow Cytometer at the Cytometry Unit of the Scientific Technical Support Services of the University of Barcelona. Cell analysis was done using FlowJo software (TreeStar). Lymphocytes were gated according to forward and side scatter on CD45+ cells.

**Cytokine determination.** The concentrations of cytokines IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, and IL-17 were determined using the Bio-Plex Mouse Cytokine Panel (Bio-Rad) in samples of BALF supernatants of mice killed 6 h after the LPS challenge. IL-10 was quantified using the Bio-Plex Mouse Cytokine Panel (Bio-Rad) in the supernatant of lung and jejunal mucosa homogenates. TGF $\beta$ 1 was analyzed in lung homogenate supernatant by using the TGF $\beta$ 1 Emax

immunoassay system (Promega). The tissues from lung and jejunum were homogenate with the methods previously described (17,22)

**Statistical analysis.** All results are expressed as means  $\pm$  SEM. Before statistical analysis, data were examined for normality and variance equality using the Levene test. In cases of unequal variance, the transformed (logarithmic) data were analyzed to confirm the conclusions from the original data. The effects of LPS and diets (and their interaction) on leukocyte populations and cytokine concentrations were analyzed by 2-way factorial ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test, using SPSS-17.0 software. PBS-treated mice had undetectable values for IL-4 and LPS; data from the LPS-SDP and LPS-IC groups were evaluated by ANOVA. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

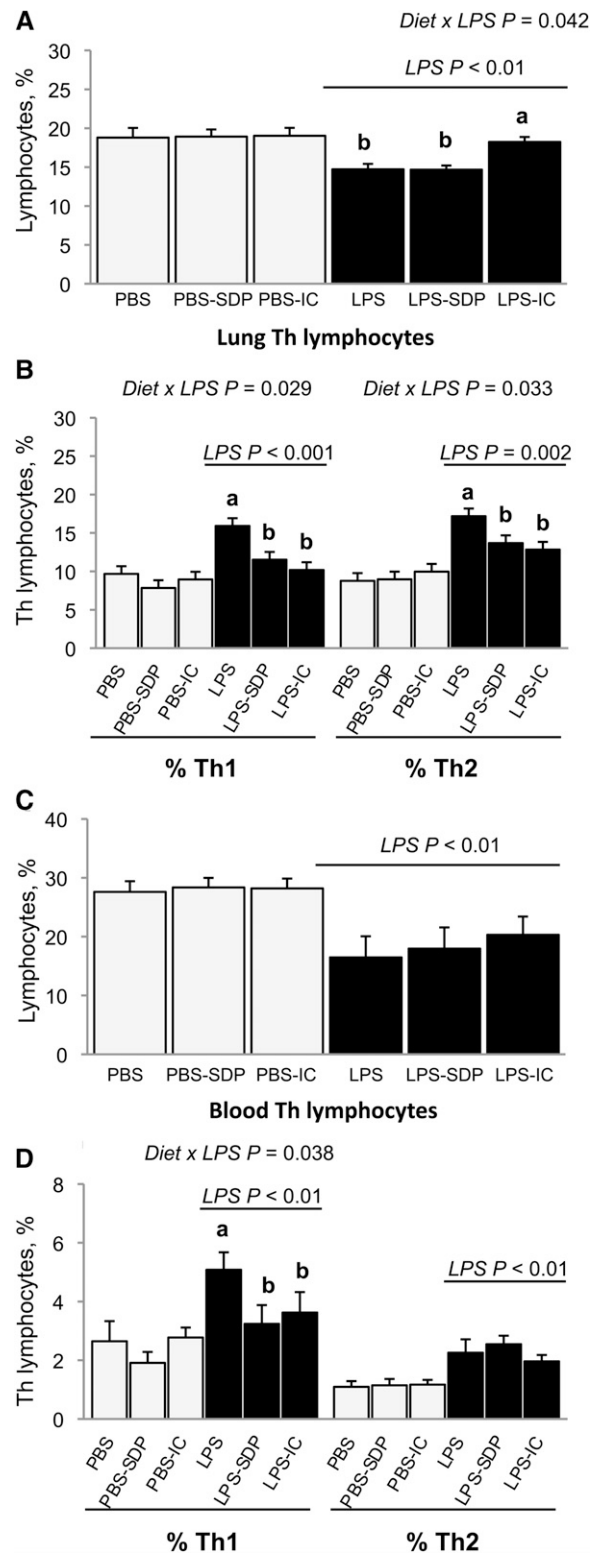
**Lymphocyte populations.** Intranasal administration of LPS induced a consistent and reproducible immune response in lung tissue and with low variability. In this tissue, Th cells accounted for 18% of the total lymphocyte population in PBS-treated mice (Fig. 1A). This percentage was reduced by the LPS challenge ( $P < 0.01$ ) and only the IC supplement blocked this response. Th lymphocytes differentiate into two major cell subtypes, Th1 and Th2, and LPS increased both (Fig. 1B). SDP and IC supplements suppressed the LPS effect on Th1 cells ( $P < 0.05$ ), but their effect on the Th2 population was lower, albeit significant ( $P < 0.05$ ).

The profile of the T cell response in blood was similar to that observed in the lung. LPS reduced the percentage of Th lymphocytes (Fig. 1C) and this effect was not prevented by dietary supplementation. The endotoxin challenge increased Th1 and Th2 cell responses by 48 and 52%, respectively (Fig. 1D) and plasma supplements were effective in preventing the effects only on the former ( $P < 0.05$ ).

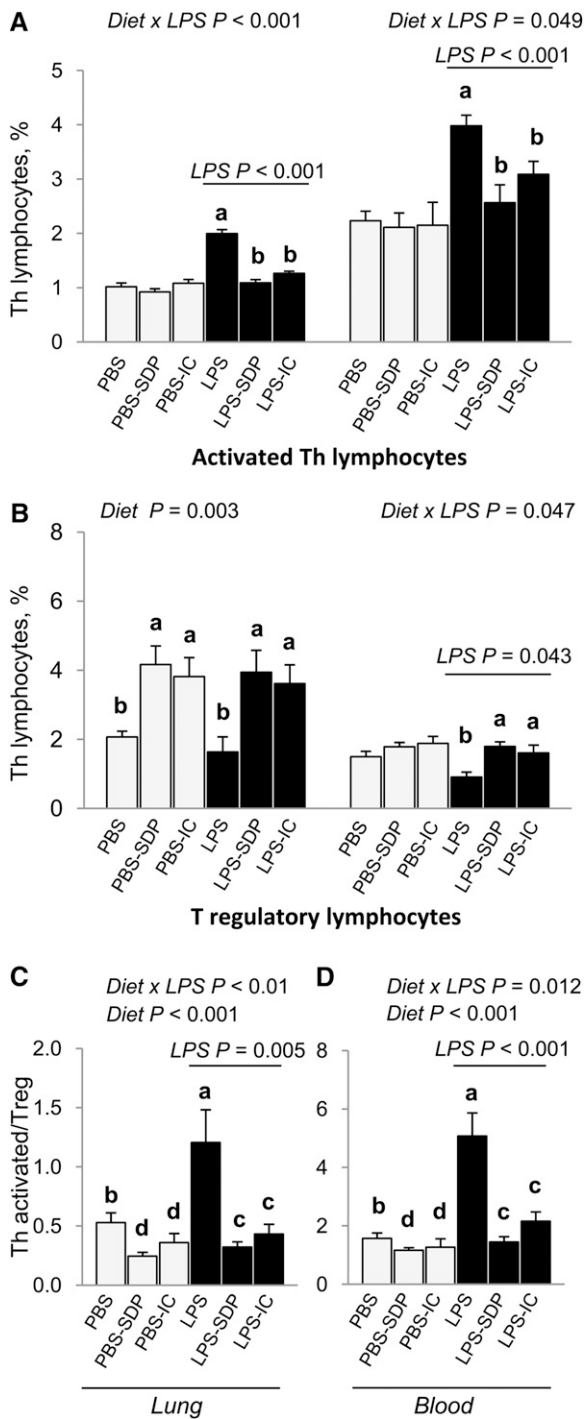
Activated Th cells accounted for 1.0% of the Th lymphocytes in the lung of PBS-treated mice (Fig. 2A); the LPS challenge doubled this value and both supplements prevented this effect ( $P < 0.05$ ). The Treg cells ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ) accounted for 2.1% of the Th lymphocyte population in the control group and dietary supplements doubled this value ( $P < 0.05$ ). No effect was observed after the LPS challenge; however, the Treg cells of mice fed plasma supplements increased to values similar to those found in PBS-treated mice. The ratio between activated Th and Treg cells revealed that LPS induced a proinflammatory state in the lung and this response was prevented by dietary supplementation ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B).

LPS increased the percentage of activated Th lymphocytes 1-fold ( $P < 0.05$ ) in blood and both supplements were effective at preventing (SDP) or reducing (IC) this effect (both  $P < 0.05$ ) (Fig. 2C). The LPS challenge reduced the percentage of Treg cells in blood and this effect was blocked by SDP and IC supplementation ( $P < 0.05$ ). The LPS challenge tripled the ratio between activated Th and Treg cells, and SDP and IC supplementation prevented the LPS effect, showing a similar profile to that in the plasma protein-supplemented, PBS-treated groups ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2D).

**Proinflammatory cytokine expression in BALF.** LPS administration increased IL-2, IL-17, Th1 (IFN $\gamma$ , IL-12p40, and IL-12p70), and Th2 (IL-4, IL-5, and IL-13) cytokine expression several-fold (all  $P < 0.001$ ) (Table 2). Both supplements prevented the LPS-induced increase in IL-2 release ( $P < 0.05$ ). The production of IL-17, the cytokine involved in the Th17 response, increased 49-fold ( $P < 0.05$ ) after LPS inhalation and only SDP supplementation reduced this effect ( $P < 0.05$ ). Both plasma supplements reduced the expression of Th1-related cytokines by between 20 and 40% (all Th1 cytokines,  $P < 0.05$ ).



**FIGURE 1** Percentages of Th lymphocytes in lung (A) and blood (C) and Th1 and Th2 subsets in lung (B) and blood (D) of mice fed a control, SDP, or IC diet for 2 wk and killed 24 h after the LPS or PBS challenge. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$ . Within the PBS and LPS groups, labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . LPS, mice fed control diet and challenged with LPS; LPS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with LPS; LPS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with LPS; PBS, mice fed control diet and challenged with PBS; PBS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with PBS; PBS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with PBS; SDP, spray-dried plasma; Th, T helper.



**FIGURE 2** Percentages of activated Th lymphocytes in lung and blood (A) and of Treg lymphocytes in lung and blood (B), and the ratio of activated Th:Treg in lung (C) and blood (D) of mice fed a control, SDP, or IC diet for 2 wk and killed 24 h after the LPS or PBS challenge. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$ . Within PBS and LPS groups, labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . LPS, mice fed control diet and challenged with LPS; LPS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with LPS; LPS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with LPS; PBS, mice fed control diet and challenged with PBS; PBS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with PBS; PBS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with PBS; SDP, spray-dried plasma; Th, T helper; Treg, regulatory T cell.

In the case of cytokines involved in the Th2 cell response, SDP and IC reduced the LPS-induced increase in IL-5 and IL-13 ( $P < 0.05$ ), with no effect on the expression of IL-4.

**Expression of antiinflammatory cytokines in lung.** The administration of LPS did not change the concentration of IL-10 in lung tissue; however, both dietary supplements increased the IL-10 production in lung tissue after LPS administration. Nevertheless, the challenge reduced the expression of mature TGF $\beta$ 1 ( $P < 0.05$ ) (Table 3) and this effect was prevented by SDP and IC.

**IL-10 expression in jejunum.** SDP and IC increased IL-10 expression in the jejunum of PBS-treated mice ( $P < 0.05$ ) (Table 3). LPS administration did not modify the profile of the control group; however, these dietary supplements also increased the IL-10 concentration in the jejunum mucosa of mice exposed to LPS ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

SDP is a highly complex mixture of functional peptides and proteins such as Ig and growth factors, with a high proportion of albumin (23). The IC contains a large amount of  $\gamma$ -globulins and a small quantity of albumin. In previous studies in the SEB model, there were some differences in the effects of SDP and IC on the mucosal GALT immune response, affecting the number of intraepithelial Th lymphocytes (10) or the expression of TNF $\alpha$  (22). In the present study, the effects of both supplements in the lung response to LPS were similar, except for IL-10 expression in lung tissue, which was only stimulated by SDP (discussed below). Therefore, although Ig present in plasma may be the main agents responsible for SDP activity, as suggested by van Dijk et al. (24), other functional proteins shared by both supplements may be responsible for the antiinflammatory effects attributed to plasma supplementation.

Our results show that dietary supplementation with SDP or IC reduces the adaptive immune response in the lung and increases the regulatory components of the pulmonary immune system in response to LPS inhalation, complementing previous results on innate immunity using the same model (17). The LPS challenge increased the percentage of Th1 lymphocytes as well as the production of the main cytokines involved in the Th1 response (IFN $\gamma$  and IL-12). These cells play a critical role in orchestrating host defense against pathogens and in the pathogenesis of many immune-mediated diseases (25). LPS stimulated the Th1 cell trafficking into the airways, thereby confirming the observation made by Mikhak et al. (25), and the Th1 cells then amplified the neutrophil inflammatory response initiated by LPS in the airway. Moreover, IL-17 is also involved in neutrophil recruitment into lung airways after endotoxin challenge (26). In our model, massive neutrophil recruitment was also observed in the lung airway and tissue (17). SDP and IC prevented the effects of LPS on Th1 response and reduced the release of IL-17. Similar effects were observed by Yeh et al. (27) in their model of LPS, in which treatment with Gingyo-San, a traditional Chinese medicinal formula, reduced the production of IL-12.

LPS also increased Th2 cells and therefore the release of cytokines involved in the Th2 response. Th2 lymphocytes are crucial in humoral immunity, because they stimulate B cell proliferation, participate in allergic responses, and protect against helminthic parasite infection (28). However, the Th2 cell response also involves the induction of lung eosinophil infiltration and mast cell activation. All these factors are thought to contribute to the pathological consequences of pulmonary infections, which involve airway hyper-responsiveness, epithelial damage, and mucus hypersecretion (29). Plasma supplements reduced the LPS effects on the Th2 cell response and can therefore attenuate the deleterious effects that accompany lung response to



**TABLE 2** BALF IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, and IFN $\gamma$  concentrations in mice fed a control, SDP, or IC diet for 2 wk, challenged with PBS or LPS, and killed 6 h later<sup>1</sup>

Cytokine	Group						P value		
	PBS	PBS-SDP	PBS-IC	LPS	PS-SDP	LPS-IC	Diet	LPS	Diet x LPS
	<i>ng/L</i>								
IL-2	0.60 ± 0.14	0.82 ± 0.16	1.15 ± 0.28	11.5 ± 0.78 <sup>a</sup>	8.71 ± 1.47 <sup>b</sup>	7.26 ± 1.02 <sup>b</sup>	≥0.05	<0.001	<0.05
IL-4	ND <sup>2</sup>	ND	ND	7.18 ± 0.66	5.34 ± 1.16	5.00 ± 1.46	≥0.05	—	—
IL-5	0.61 ± 0.05	0.63 ± 0.23	0.7 ± 0.11	12.1 ± 1.22 <sup>a</sup>	9.06 ± 1.51 <sup>b</sup>	6.74 ± 1.39 <sup>b</sup>	≥0.05	<0.001	<0.05
IL-12p40	11.7 ± 5.09	12.9 ± 1.10	10.2 ± 1.84	339 ± 33.7	217 ± 49.4	196 ± 51.7	≥0.05	<0.001	≥0.05
IL-12p70	1.36 ± 0.36	0.99 ± 0.17	0.90 ± 0.15	46.8 ± 2.16 <sup>a</sup>	35.4 ± 3.07 <sup>b</sup>	28.9 ± 6.87 <sup>b</sup>	≥0.05	<0.001	<0.05
IL-13	6.76 ± 2.31	7.72 ± 1.21	8.11 ± 0.82	369 ± 22.8 <sup>a</sup>	237 ± 38.6 <sup>b</sup>	235 ± 35.7 <sup>b</sup>	≥0.05	<0.001	<0.05
IL-17	0.30 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	14.7 ± 2.12 <sup>a</sup>	9.05 ± 1.86 <sup>b</sup>	9.91 ± 2.64 <sup>ab</sup>	<0.05	<0.001	<0.05
IFN $\gamma$	2.42 ± 0.38	2.66 ± 0.56	2.20 ± 0.36	46.0 ± 1.74 <sup>a</sup>	31.0 ± 2.05 <sup>b</sup>	29.8 ± 6.84 <sup>b</sup>	≥0.05	<0.001	<0.05

<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, *n* = 5–6. Within PBS and LPS groups, means in a row with superscripts without a common letter differ, *P* < 0.05. BALF, broncho-alveolar lavage fluid; LPS, mice fed control diet and challenged with LPS; LPS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with LPS; LPS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with LPS; PBS, mice fed control diet and challenged with PBS; PBS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with PBS; PBS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with PBS; SDP, spray-dried plasma;.

<sup>2</sup> Not detected (ND), detection limit (2.98 ng/L).

LPS. Similar results were obtained by dietary lycopene supplementation in a mouse model of allergic asthma (4).

LPS also promoted the activation of Th lymphocytes at both the local (lung tissue) and systemic (blood) levels. These effects were accompanied by enhanced release of IL-2 in the lung; this cytokine (almost exclusively produced by activated Th cells) promotes proliferation of lymphocytes, macrophages, and NK cells (30). The two plasma supplements also reduced the percentage of activated Th lymphocytes and in preventing the release of IL-2. This effect is consistent with the antiinflammatory response previously described for plasma supplements (22).

Inflammation is a response to tissue injury and is required for tissue repair and the clearance of infections. However, uncontrolled inflammation results in further tissue injury. Cytokines play crucial roles in modulating inflammation. Proinflammatory cytokines, such as IFN $\gamma$  and IL-12, promote inflammation by activating leukocytes and inducing tissue expression of chemoattractant agents. In contrast, antiinflammatory cytokines, like IL-10 and TGF $\beta$ , suppress the effects and expression of their proinflammatory counterparts. Given that perturbations in this network of cytokines can be deleterious to health, effector Th cells are tightly regulated to maintain immune homeostasis and control excessive inflammatory responses (31).

The mechanism by which oral plasma supplements modulate peripheral inflammation is not completely understood. However,

there is increasing evidence that signals initiated in the intestinal lumen of a different origin (dietary functional components, changes in the microflora, the presence of microbial cell wall components, even bacterial secreted products) can interact with the intestinal mucosa and are able to regulate immune responses outside the gastrointestinal tract (16). Probiotics can suppress the progression of experimental inflammatory bowel disease, atopic dermatitis, and rheumatoid arthritis by enhancing the generation of dendritic cells and Treg in the intestinal mucosa, causing an enrichment of Treg in the inflamed regions (32,33). Similar effects were observed with plasma proteins in an experimental model of inflammatory bowel disease. Plasma supplements ameliorate the inflammatory response by increasing the number of Treg in the inflamed colon as well as enhancing the IL-10 release (13). Therefore, there is evidence indicating that plasma supplements modulate the abundance of Treg in the intestine (the inductor site) and stimulated blood and lung Treg in the lung model (the effector site), both interconnected by the common mucosal system (16).

In addition to the effects on naturally occurring Treg in lung tissue and blood, SDP and IC reduced the activated Th:Treg cell ratio. Treg cells inhibit inflammation by counteracting the effects of other Th cells and contribute to suppressing innate and adaptive immune responses (34,35). TGF $\beta$  inhibits Th1 cell differentiation (36) and is essential for the development of Treg

**TABLE 3** IL-10 concentration in lung and jejunum and lung mature TGF $\beta$ 1 concentration in mice fed control, SDP, or IC diet for 2 wk, challenged with PBS or LPS, and killed 6 h later<sup>1</sup>

	Group						P value		
	PBS	PBS-SDP	PBS-IC	LPS	LPS-SDP	LPS-IC	Diet	LPS	Diet x LPS
	<i>pg/mg protein</i>								
Lung									
IL-10	1.37 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.78 ± 0.29 <sup>b</sup>	2.98 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.16 <sup>b</sup>	<0.05	<0.05	≥0.05
TGF $\beta$ 1	86.2 ± 12.7	82.4 ± 10.4	83.7 ± 7.72	64.4 ± 3.34 <sup>b</sup>	81.3 ± 3.22 <sup>a</sup>	86.0 ± 9.96 <sup>a</sup>	≥0.05	<0.05	<0.05
Jejunum									
IL-10	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	<0.05	≥0.05	≥0.05

<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, *n* = 5–6. Within PBS and LPS groups, means in a row with superscripts without a common letter differ, *P* < 0.05. LPS, mice fed control diet and challenged with LPS; LPS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with LPS; LPS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with LPS; PBS, mice fed control diet and challenged with PBS; PBS-IC, mice fed the Ig concentrate diet and challenged with PBS; PBS-SDP, mice fed the spray-dried plasma diet and challenged with PBS; SDP, spray-dried plasma.

cells and therefore for the maintenance of Th lymphocyte homeostasis. In our study, mice challenged with LPS had reduced mature TGF $\beta$ . This effect was prevented by supplementation with SDP and IC, thus attenuating the LPS-induced increase in Th1 lymphocytes.

SDP and IC stimulated the IL-10 production in the lung of inflamed mice. Other studies carried using a LPS model of acute lung inflammation in rats demonstrate that treatment with IL-10 after endotoxin instillation protects against acute lung injury, possibly by suppressing pulmonary infiltration of activated neutrophils (37). In the SEB model of intestinal inflammation, we show that the dietary modulation of intestinal inflammation is mediated by an increase in mucosal IL-10 expression, which reduced the release of proinflammatory cytokines (22). In the acute lung inflammation mouse model, the analysis of IL-10 in the mucosa of the jejunum showed similar results to those described for rats. On the basis of this finding and from previous results in the SEB model (8,10,22), we propose that changes in intestinal IL-10 are also involved in the modulation of the acute pulmonary response.

Our results show that dietary strategies that prevent intestinal inflammation modulate the lung immune response. This evidence supports the notion that the intestinal, nasopharyngeal, and bronchus mucosal immune systems are interconnected and interdependent. They also point to the enhancement of anti-inflammatory mediators as the mechanism that controls the pulmonary response to LPS challenge. Given that SDP and IC supplements reduced Th cell activation and increased Treg cells, we propose that protein plasma supplementation may be a useful therapeutic approach for diseases that cause secondary organ injury. Further work should be conducted to identify the plasma fraction responsible for the functional effects of the supplement and which elements of GALT initiate and mediate the immune response.

### Acknowledgments

M. Moretó, J.P., L.R., J. Campbell, E.W., J. Crenshaw, and A.P.-B. designed the research; A.P.-B., M. Maijón, and L.M. conducted the research; J.P. provided essential materials; A.P.-B., M. Maijón, and M. Moretó analyzed the data and wrote the paper; M. Maijón, J.P., L.R., J. Campbell, E.W., J. Crenshaw, M. Moretó, and A.P.-B. discussed the results. All authors read and approved the final manuscript.

### Literature Cited

- Suzuki T, Chow CW, Downey GP. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1348–61.
- Mizgerd JP. Lung infection—a public health priority. *PLoS Med.* 2006;3:e76.
- Zarbock A, Allegretti M, Ley K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol.* 2008;155:357–64.
- Hazlewood LC, Wood LG, Hansbro PM, Foster PS. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Nutr Biochem.* 2011;22:95–100.
- Xie YC, Dong XW, Wu XM, Yan XF, Xie QM. Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Int Immunopharmacol.* 2009;9:194–200.
- Dewey CE, Johnston WT, Gould L, Whiting TL. Postweaning mortality in Manitoba swine. *Can J Vet Res.* 2006;70:161–7.
- Pérez-Bosque A, Moretó M. A rat model of mild intestinal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:447–53.
- Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Vicario M, Castell M, Russell L, Campbell JM, Quigley JD, Polo J, Moretó M. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *Staphylococcus aureus* Superantigen B. *J Nutr.* 2004;134:2667–72.
- 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;136:2838–43.
- Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell JM, 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;138:533–7.
- Moretó M, Pérez-Bosque A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system and the barrier functions of the intestinal mucosa. *J Anim Sci.* 2009;87:E92–100.
- Moretó M, Miró LL, Maijón M, Polo J, Weaver E, Crenshaw J, Russell L, Campbell J, Pérez-Bosque A. Dietary spray-dried plasma protein supplements attenuate the changes in colitis markers in the Mdr1a<sup>-/-</sup> mouse model of colitis. *Gastroenterology.* 2009;136 Suppl 1:A771.
- Moretó M, Miró LL, Maijón M, Polo J, Weaver E, Weaver E, Crenshaw J, Russell L, Campbell J, Pérez-Bosque A. Dietary supplementation with porcine plasma proteins reduce lymphocyte recruitment and cytokine and chemokine expression in a mouse model of spontaneous colitis. *Gastroenterology.* 2010;138 Suppl 1:S743.
- 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.
- Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 2008;29:505–13.
- Forsythe P. Probiotics and lung diseases. *Chest.* 2011;139:901–8.
- 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.* Epub 2011 Sep 12.
- Lee Y-Z, Sim JS, Al-Mashikhi S, Nakai S. Separation of immunoglobulins from bovine blood by polyphosphate precipitation and chromatography. *J Agric Food Chem.* 1988;36:922–8.
- Borg BS, Campbell JM, Polo J, Russell LE, Rodríguez C, Ródenas J. Evaluation of the chemical and biological characteristics of spray-dried plasma protein collected from various locations around the world. *Am Assoc Swine Vet.* 2002;97:100.
- NRC. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th ed. Washington, DC: National Academy Press; 1995.
- Woolard MD, Huding D, Tabor L, Ivey JA, Simecka JW. NK cells in gamma-interferon-deficient mice suppress lung innate immunity against *Mycoplasma* spp. *Infect Immun.* 2005;73:6742–51.
- Pérez-Bosque A, Miró L, Polo J, Russell L, Campbell JM, 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.
- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:845–67.
- Van Dijk AJ, Niewold TA, Margry RJ, van den Hoven SG, Nabuurs MJ, Stockhofe-Zurwieden N, Beynen AC. Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2002;49:81–6.
- Mikhak Z, Farsidjani A, Luster AD. Endotoxin augmented antigen-induced Th1 cell trafficking amplifies airway neutrophilic inflammation. *J Immunol.* 2009;182:7946–56.
- Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, Laan M, Lötvall J, Lindén A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol.* 2003;170:4665–72.
- Yeh CC, Lin CC, Wang SD, Hung CM, Yeh MH, Liu CJ, Kao ST. Protective and immunomodulatory effect of Gingyo-san in a murine model of acute lung inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2007;111:418–26.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:975–87.
- Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Iikura M, Suto H, Galli SJ. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflam-

- mation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:48–55.
30. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 2004;28:109–23.
  31. Jaffar Z, Ferrini ME, Girtsman TA, Roberts K. Antigen-specific Treg regulate Th17-mediated lung neutrophilic inflammation, B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. *Eur J Immunol.* 2009;39:3307–14.
  32. Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology.* 2010;215:996–1004.
  33. Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:2159–64.
  34. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science.* 2007;317:627–9.
  35. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212:60–73.
  36. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26:579–91.
  37. Wu CL, Lin LY, Yang JS, Chan MC, Hsueh CM. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment with IL-10. *Respirology.* 2009;14:511–21.

### 3.2. Resultats annexes a l'Article 2.

El procediment experimental és el mateix que el definit a l'Article 2.

#### 3.2.1. Estudi de les poblacions cel·lulars a pulmó i sang

A més de les poblacions que s'han presentat en l'Article 2, s'han estudiat altres tipus cel·lulars com ara, els limfòcits T supressors/citotòxics i els limfòcits B. S'ha fet un marcatge directe amb anticossos monoclonals (Taula III-3). Les mostres s'han analitzat al citòmetre BD FACSAria™ de la unitat de Citometria del Parc Científic de Barcelona.

Taula III-3. Anticossos emprats en el marcatge directe de les poblacions leucocitàries

Anticòs	Població	Conjugat a <sup>1</sup>	Font <sup>2</sup>
<b>CD45</b>	Leucòcits	APC-A750	eBioscience
<b>CD19</b>	Cèl·lules B	PE-Cy7	eBioscience
<b>CD8</b>	Limfòcits T citotòxics	A647	BD Pharmingen
<b>CD25</b>	Limfòcits activats	FITC	eBioscience

<sup>1</sup>Fluorocroms utilitzats: A647, Alexa Fluor 647®; A700, Alexa Fluor 700®; APC, Allophycocyanin; APC-A750, Allophycocyanin–Alexa Fluor 750; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7. <sup>2</sup>eBioscience, Inc. (San Diego, CA, EUA), BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, EUA).

#### 3.2.2. Limfòcits T supressors/citotòxics a pulmó

Ni l'administració de l'LPS ni la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques ha modificat el percentatge de **limfòcits Ts/c** a pulmó (Figura III-28).

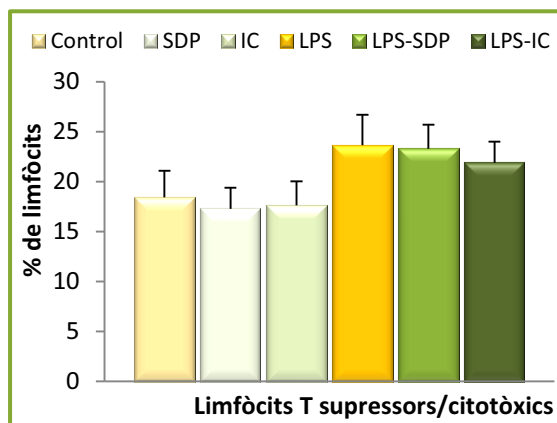


Figura III-28. Limfòcits T supressors/citotòxics a pulmó d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 7-8 ratolins.

### 3.2.3. Limfòcits B a pulmó

Els **limfòcits B** han estat un  $27,2\% \pm 1,11\%$  en els animals no inflamats i alimentats amb el pinso control (Figura III-29). L'administració de LPS ha reduït de forma lleugera el percentatge d'aquestes cèl·lules ( $P < 0,05$ ), sense cap efecte degut a les dietes experimentals.

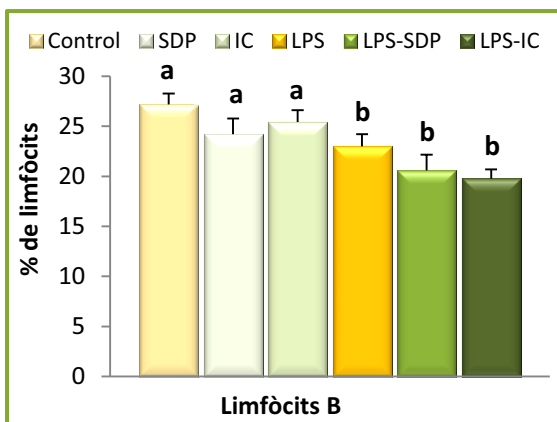


Figura III-29. Limfòcits B a pulmó d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.4. Limfòcits T supressors/citotòxics a sang

Els **limfòcits Ts/c** a sang han estat el  $18,7\% \pm 1,5\%$  dels limfòcits (Figura III-30). L'administració de LPS ha disminuït el percentatge dels limfòcits T citotòxics fins a valors de  $10,5\% \pm 2,0\%$  en el grup LPS ( $P < 0,05$ ), sense efectes significatius de les dietes.

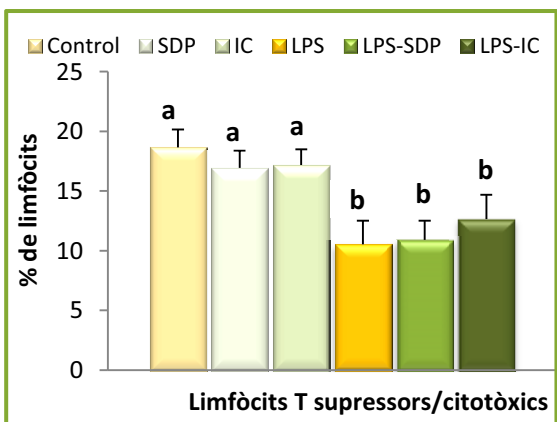


Figura III-30. Limfòcits T supressors/citotòxics a sang d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.5. Limfòcits B a sang

Els **limfòcits B** a sang han representat un  $35,2\% \pm 2,8\%$  dels limfòcits en el grup control (Figura III-31). Ni l'administració de l'endotoxina ni la suplementació dietètica han modificat el percentatge d'aquestes cèl·lules.

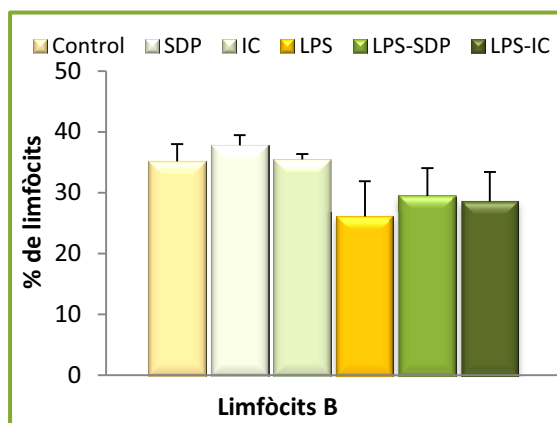


Figura III-31. Limfòcits B a sang d'animals exposats a LPS i sotmesos a una suplementació dietètica amb SDP o amb IC. Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  error estàndard de 8 ratolins.

### 3.2.6. Expressió de citocines al BALF

Les citocines estudiades a les 6 h de l'administració de l'LPS i esposades en l'article 2, també han estat analitzades a les 24 h.

L'administració de l'LPS ha provocat un considerable increment de l'expressió de les citocines proinflamatòries 24 h després de la seva administració (Taula III-4;  $P < 0,05$ ). La suplementació amb IC ha incrementat la concentració de IL-2 als animals no inflamats, mentre que l'ha reduït una vegada administrat l'LPS ( $P < 0,05$ ). L'administració de l'LPS ha incrementat de forma notable les citocines involucrades en la resposta Th1 (**IFN- $\gamma$**  i **IL-12p70**;  $P < 0,05$ ). Només en el cas de l'interferó ambdues dietes han aconseguit reduir-ne l'expressió més de la meitat ( $P < 0,05$ ). L'administració de l'LPS també ha incrementat de forma molt evident les citocines involucrades en la resposta Th2 (**IL-4**, **IL-5** i **IL-13**;  $P < 0,05$ ). Els grups suplementats amb les dietes experimentals no han presentat cap efecte de reducció en l'expressió de les citocines IL-4 i IL-13, i només la dieta IC ha aconseguit reduir lleugerament l'expressió de la citocina IL-5 ( $P < 0,05$ ). La **IL-17** ha augmentat més de 140 vegades en els animals inflamats respecte els animals administrats amb PBS, les dietes experimentals no han reduït la seva expressió.

Taula III-4. Concentració de les citocines: IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-13, IL-17 i IFN- $\gamma$  al BALF 24 h després de l'administració de LPS.

Citocina	Grup					
	Control	SDP	IC	LPS	LPS-SDP	LPS-IC
	<i>pg/mL</i>					
<b>IL-2</b>	0,67 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,23 <sup>b</sup>	5,38 ± 0,38 <sup>c</sup>	5,61 ± 0,69 <sup>c</sup>	3,42 ± 0,73 <sup>d</sup>
<b>IL-4</b>	N.D. <sup>2</sup>	N.D.	N.D.	1,87 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,07 <sup>a</sup>
<b>IL-5</b>	0,91 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,55 <sup>a</sup>	18,8 ± 1,57 <sup>b</sup>	16,0 ± 1,78 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,81 <sup>c</sup>
<b>IL-12p70</b>	1,68 ± 0,78 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,47 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,45 <sup>a</sup>	44,2 ± 6,68 <sup>b</sup>	51,2 ± 7,41 <sup>b</sup>	35,7 ± 2,48 <sup>b</sup>
<b>IL-13</b>	30,8 ± 2,58 <sup>a,b</sup>	22,7 ± 5,51 <sup>a</sup>	39,7 ± 6,88 <sup>b</sup>	72,9 ± 5,67 <sup>c</sup>	89,6 ± 8,86 <sup>c</sup>	62,6 ± 6,19 <sup>c</sup>
<b>IL-17</b>	0,58 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	87,6 ± 27,7 <sup>b</sup>	92,2 ± 32,0 <sup>b</sup>	102 ± 38,0 <sup>b</sup>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,24 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>a</sup>	85,5 ± 9,75 <sup>b</sup>	35,9 ± 8,72 <sup>c</sup>	40,5 ± 14,5 <sup>c</sup>

Els resultats estan expressats com a mitjana ± error estàndard de 6 ratolins. Diferències significatives entre els grups amb diferent lletra ( $P < 0,05$ ). <sup>2</sup>N.D: no detectat.