UNIVERSITAT DE BARCELONA

Efecto de los factores bioactivos de leche materna TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el desarrollo del sistema inmunitario de ratas nacidas a término y a pretérmino

Paulina Torres Castro

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

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

EFECTO DE LOS FACTORES BIOACTIVOS DE LECHE MATERNA TGF-β2, EGF Y FGF21 SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE RATAS NACIDAS A TÉRMINO Y A PRETÉRMINO

Paulina Torres Castro

Barcelona, 2019

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Secció de Fisiologia

Programa de doctorado:

ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

EFECTO DE LOS FACTORES BIOACTIVOS DE LECHE MATERNA TGF-β2, EGF Y FGF21 SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE RATAS NACIDAS A TÉRMINO Y A PRETÉRMINO

Memoria presentada por **Paulina Torres Castro** para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Esta tesis se ha realizado en el grupo de investigación de "Autoimmunitat i Tolerància" bajo la supervisión de la Dra. **Àngels Franch Masferrer** y el Dr. **Francisco J. Pérez Cano**.

Dra. Àngels Franch Masferrer (directora i tutora)
Dr. Francisco J Pérez Cano (director)
Paulina Torres Castro (Doctoranda)

Paulina Torres Castro

Barcelona, 2019

Esta tesis ha sido subvencionada por:

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad
Proyecto AGL 2013/48459-P

La doctoranda ha obtenido la beca predoctoral:

Beca de estudios de doctorado del programa de Becas
"UNIVERSIDADES DE EXCELENCIA 2015"
SENESCYT-DMPF-2015-1666-CO
Gobierno Nacional de la República del Ecuador

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Av. Joan XXIII, 27-31
08028 Barcelona

Tel. +34 934 024 505
angelsfranch@ub.edu
franciscoperez@ub.edu

Àngels Franch Masferrer i **Francisco J. Pérez Cano**, professors titulars de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia, de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que la memòria titulada "***Efecto de los factores bioactivos de leche materna TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el desarrollo del sistema inmunitario de ratas nacidas a término y a pretérmino***" presentada per **PAULINA TORRES CASTRO** per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció a la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia i, considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signem el present a Barcelona, 30 de octubre de 2019.

Dra. Àngels Franch Masferrer
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Dr. Francisco J. Pérez Cano
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Av. Joan XXIII, 27-31
08028 Barcelona

Tel. +34 934 024 505
angelsfranch@ub.edu
franciscoperez@ub.edu

Àngels Franch Masferrer i **Francisco J. Pérez Cano**, professors titulars de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia, de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que la memòria titulada "***EFECTO DE LOS FACTORES BIOACTIVOS DE LECHE MATERNA TGF-β2, EGF Y FGF21 SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE RATAS NACIDAS A TÉRMINO Y A PRETÉRMINO***" presentada per **PAULINA TORRES CASTRO** per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona, es presenta com a compendi de publicacions.

De les quatre publicacions que formen el cos de resultats de la tesi doctoral, una d'elles (publicació 4: "*Leptin and EGF supplementation enhance the immune system maturation in preterm suckling rats*") ha estat realitzada en co-autoria juntament amb la Dra. Blanca Grases-Pintó.

Per aquest motiu, a continuació es detalla la participació de la doctoranda Paulina Torres Castro en aquesta publicació. L'article inclou l'efecte de dos components diferents, d'una adipocina, la leptina (que no és objecte d'aquesta tesi) i del factor de creixement EGF (que si és objecte d'aquesta tesi).

En el marc del projecte AGL2013-48459P, que engloba l'estudi de l'efecte d'aquests dos components en un model de prematuritat, es va realitzar una intervenció nutricional conjunta, on ambdós grups experimentals es comparaven amb diversos grups de referència. Tant la doctoranda Paulina Torres-Castro com la recentment doctora Blanca Grases-Pintó, van participar de forma conjunta i compartida en totes les accions necessàries en el desenvolupament del disseny experimental.

Els resultats derivats de l'estudi de l'acció de la leptina, es van incorporar en forma de manuscrit a la tesi de la Dra. Blanca Grases-Pintó. Posteriorment, es va decidir portar a terme la publicació conjunta de l'efecte dels dos components estudiats (ja que compartien els grups de referència). Així, la present tesi, inclou l'article publicat, tot i que només es centra en els efectes d'EGF, i no en els efectes de la leptina (que no són objecte de la tesi i que formaven part de la tesi de Blanca Grases-Pintó).

I perquè així consti, signem el present a Barcelona, 30 de octubre de 2019.

Dra. Àngels Franch Masferrer
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Dr. Francisco J. Pérez Cano
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

"La verdadera fortaleza de un guerrero no está en su fuerza para mantener todo perfecto, sino en su honestidad para asumir la imperfección y tomarla como camino para evolucionar"

Silvia Rojas

Agradecimientos

Finalizar este período de formación me da mucha alegría y satisfacción. Han pasado 4 años, ha sido un período de aprendizaje continuo, de días buenos y malos, de estrés, de alegrías, de tristezas; en fin, de un sin número de situaciones y sentimientos los cuales han contribuido a mi evolución tanto a nivel personal como a nivel profesional.

Para poder iniciar este proceso de doctorado era necesario formar parte de un grupo de investigación y de un proyecto. Es por ello, que quiero dar mi agradecimiento a Margarida Castell quién fue mi primer punto de contacto y mi puerta de entrada al grupo de Autoinmunidad y Tolerancia (AiT). Especial agradecimiento para Àngels, por haber confiado en mí y sin conocerme haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de doctorado como parte de su línea de investigación y dentro de uno de sus proyectos.

Gracias a mis tutores Àngels y Francisco, por iluminar mi camino y ayudarme a llegar hasta aquí. Les agradezco su dedicación, paciencia y enseñanzas que me han brindado durante todo este largo período. Pueden tener la seguridad que han sembrado en tierra fértil y que gracias a ustedes el día de mañana yo seré una buena profesional. Gracias Àngels por todas las invitaciones al teatro de Manresa, he disfrutado mucho de cada una de las obras.

Gracias a todos quienes forman parte del grupo AiT, gracias por el trabajo en equipo, por las risas, por los cotilleos, por los desayunos; en fin, gracias por estar ahí durante estos cuatro años. Gracias a las post-doc Malen y Mar, las “viejovenes” del grupo, gracias por compartir cada día su alegría y sus ocurrencias. Gracias a ustedes, aquellos días de largas horas de laboratorio, sacrificio y estabulario son menos pesados y más amenos.

Gracias a Lidia, Blanca y Mar, por su ayuda en la puesta a punto de técnicas y en la obtención de los resultados de este trabajo. Gracias, porque han sido mis guías para aprender cada una de las técnicas y para resolver las dudas que han surgido a lo largo de este trabajo. ¡Gracias por todo! Y un especial agradecimiento a Blanca por toda su ayuda en el sprint final de esta tesis. ¡Mil gracias!

Gracias a María José por la ayuda en la interpretación de resultados de histología y por todos los consejos en la escritura de mi trabajo. Y en general, por todas las aportaciones en los diferentes artículos científicos. Gracias por darme ánimo en esta etapa final. ¡Gracias!

Gracias Sheila, por brindarme tu amistad y tus consejos. Sobre todo, gracias por contagiarme de tu alegría y buena vibra. Ya lo sabes, eres mi mejor regalo de cumpleaños. Gracias a Patri y Marta por sus consejos llenos de positivismo y pesimismo, son como el yin y yang, y me aportaron el equilibrio que necesitaba. Gracias a las tres por todos los cafés compartidos.

Gracias a Ignasi y Carla, por los momentos compartidos en el laboratorio y en los diferentes cursos y congresos a los cuales hemos asistido. Ignasi mucha suerte con tu tesis, seguro será un trabajo de 10. A la nueva doctoranda Karla, mis mejores deseos. Disfruta de este proceso que se llama "doctorado".

Gracias a las doctoras Mariona y Mar Rigo por todos los momentos compartidos, les deseo mucho éxitos en sus vida profesional.

También quiero agradecer a todos los miembros de la sección de la Fisiología: Manel, Trini, Toni, Nanen, Jordi, Rut, Raquel, Carmen, Montse, Pilar, Joana, Miquel, Emilia, Anna y Lluïsa. A todos los becarios y estudiantes de doctorado de los diferentes grupos del departamento. Gracias por la acogida y por todas las conversaciones entre pasillos, en las largas esperas frente a la impresora o en la "cofee room". Gracias por darme ánimo en esta etapa final.

A Vanessa y a David, gracias por la ayuda que me han brindado en diferentes situaciones, sobre todo cuando llegue en el 2016 y necesitaba situarme. ¡Gracias por todo!

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos. Gracias por apoyarme en todas las decisiones que tomo en mi vida y por estar ahí siempre cuando les necesito, a ustedes les dedico este trabajo. Gracias a mi hermano y Gabriela por cada uno de los videos y fotos de mi sobrino, me han dado mucha fuerza para llegar al final de este trayecto. Gracias Carlitos Maximiliano, con tu inocencia y alegría has sido mi inspiración y mi alegría de cada día.

Gracias Alberto por tu apoyo durante todo este período, ha sido una bendición tenerte y caminar a tu lado. Gracias por las largas esperas para cenar, por tu ayuda con el ingreso de la bibliografía, por apoyarme en aquellos fines de semana y vacaciones que me ha tocado trabajar, gracias por todos y cada uno de los sacrificios que han implicado estos últimos meses. Tú me has brindado esta fuerza que se necesita para llegar a este día tan importante en mi vida. Tú eres parte de este trabajo. Te amo.

Gracias a todas mis tías, tíos, primos y primas que han estado siempre pendientes y preocupándose por mí. Recibir sus mensajes siempre me han llenado de alegría y de fuerza. ¡Gracias!

Gracias a mis grupos de amigos “OhDios@s” y “empoderadas”, especialmente a mis mejores amigas Cecilia, Andrea, Gabriela y Sonita por brindarme su apoyo desde Ecuador y estar siempre ahí. Gracias a todas las amigas que he hecho en el transcurso de toda esta etapa de formación fuera de mi país: Alejandra, Fernanda, Silvia, Jimena, Tania, Mimita y Marie. Gracias por venir a visitarme y por todos los momentos compartidos.

Gracias a Paquita, Antonio, Carlitos, Carol, Cerqui y Daniela por haberme acogido, bridarme su amistad y estar pendientes de mis avances en la tesis. ¡Gracias!

En fin, gracias a Dios y a la vida por permitirme disfrutar de este día que ha sido tan anhelado durante estos cuatro años.

Gràcies a tothom

Índice

RESUMEN 1

INTRODUCCIÓN 3

1. LECHE MATERNA y SALUD DEL LACTANTE 5
1.1. Composición de leche humana 6
1.2. Cambios en la secreción láctea durante la lactancia 7
1.2.1. Calostro 7
1.2.2. Leche de transición 7
1.2.3. Leche madura 8

2. SISTEMA INMUNITARIO DEL NEONATO 9
2.1. Inmunidad innata neonatal 9
2.2. Inmunidad adaptativa neonatal 11
2.3. Inmunidad intestinal neonatal 12
2.3.1. Barrera intestinal y tejido linfoide asociado al intestino 12
2.3.2. Microbiota intestinal 15

3. COMPONENTES BIOACTIVOS DE LECHE HUMANA CON EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO 18
3.1. Componentes antiinfecciosos 21
3.1.1. Inmunoglobulinas 21
3.1.2. Lactoferrina y péptidos derivados 22
3.1.3. Oligosacáridos 23
3.2. Componentes que promueven el desarrollo del SI 24
3.2.1. Leucocitos 24
3.2.2. Citocinas 25
3.3. Componentes tolerogénicos de leche humana 26
3.4. Componentes antiinflamatorios de leche humana 26
3.5. Microbiota de leche humana 26

4. FACTORES DE CRECIMIENTO 28
4.1. Factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) 29
4.1.1. Estructura y síntesis de TGF-β 29
4.1.2. Receptores de TGF-β 31
4.1.3. Vías de señalización de TGF-β 32
4.1.4. Funciones de TGF-β sobre el sistema inmunitario 33
4.1.4.1. TGF-β en el sistema inmunitario innato 34
4.1.4.2. TGF-β en el sistema inmunitario adaptativo 34
4.1.4.3. TGF-β en la tolerancia oral 36
4.1.4.4. TGF-β en la homeostasis intestinal y microbiota 37
4.1.5. TGF-β en leche materna 38
4.2. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) 38
4.2.1. Estructura y síntesis de EGF 38
4.2.2. Receptores de EGF 40
4.2.3. Vías de señalización de EGF 40
4.2.4. Funciones biológicas de EGF 41
4.2.4.1. EGF y barrera intestinal 41
4.2.4.2. EGF y enterocolitis necrotizante 43
4.2.4.3. EGF y sistema inmunitario 45
4.2.5. EGF en leche materna 46
4.3. Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) 46
4.3.1. Estructura y síntesis de FGF21 47
4.3.2. Receptores de FGF21 47
4.3.3. Vías de señalización de FGF21 48
4.3.4. Funciones de FGF21 48
4.3.4.1. FGF21 y metabolismo de la glucosa 49
4.3.4.2. FGF21 y lipolisis 49
4.3.4.3. FGF21 y función intestinal 50
4.3.4.4. FGF21 en enfermedad inflamatoria crónica 50
4.3.5. FGF21 en leche materna 51

5. PREMATURIDAD Y LECHE MATERNA 53
5.1. Sistema inmunitario del neonato prematuro 53
5.2. Complicaciones de la prematuridad 53
5.3. Beneficios de la lactancia materna en la prematuridad 55

OBJETIVOS 59

RESULTADOS 63

Artículo 1. TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats 65

Artículo 2. Effect of TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation on the suckling rat intestinal maturation 85

Artículo 3. Modulation of the systemic immune response in suckling rats by breast milk TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation 109

Artículo 4. Leptin and EGF supplementation enhance the immune system maturation in preterm suckling rats 141

DISCUSIÓN 167

CONCLUSIONES 191

BIBLIOGRAFÍA 195

ANEXO 217

Anexo 1: artículo A preterm rat model for immunonutritional studies 219

Anexo 2: capítulo de libro "Actividad inmunomoduladora de concentrados proteicos de suero lácteo en las primeras etapas de vida".....239

Índice de figuras

Figura 1. Barreras del intestino y componentes que conforman las uniones entre las células epiteliales de la mucosa intestinal..... 13

Figura 2. Estructura y localización de las proteínas TJ implicadas en la regulación de la permeabilidad paracelular 14

Figura 3. Estructura y organización del GALT..... 15

Figura 4. Visión general de los factores que influyen sobre la microbiota intestinal durante las tres fases de desarrollo (fetal, infancia y niñez) 16

Figura 5. Representación de la influencia de la lactancia materna sobre el sistema inmunitario del neonato..... 20

Figura 6. Origen de la IgA secretora presente en leche humana..... . 22

Figura 7. Transferencia de factores de crecimiento de leche humana y principales funciones sobre diversos tejidos y órganos diana del lactante..... 29

Figura 8. Estructura de la subfamilia de TGF-β 30

Figura 9. Representación esquemática del proceso de activación del TGF-β.. 31

Figura 10. Principales vías de señalización del TFG-β dependientes o independientes de Smad 32

Figura 11. Activación del complejo latente TGF-β mediado por las integrinas αvβ6 y αvβ8 presentes en células epiteliales y dendríticas 33

Figura 12. Función reguladora de TGF-β en linfocitos B y T implicados en la respuesta inmunitaria adaptativa..... 35

Figura 13. Estructura tridimensional del EGF..... 39

Figura 14. Secuencia de la proteína precursora del EGF (prepro-EGF) 39

Figura 15. Principales vías de señalización del EGF 41

Figura 16. Efectos de EGF en el desarrollo, crecimiento y salud del tracto gastrointestinal 42

Figura 17. Regulación de la función de barrera intestinal por EGF: vías de señalización implicadas..... 43

Figura 18. Alteraciones de la barrera intestinal en la NEC experimental y beneficios de la suplementación con EGF 44

Figura 19. Estructura de FGF21..... 47

Figura 20. Mecanismo de acción de FGF21 48

Figura 21. Principales órganos diana de FGF21 y sus funciones..... 49

Figura 22. Relación entre FGF21 y enfermedades crónicas..... 50

Figura 23. Mecanismo de transferencia de FGF21 desde la leche materna al intestino del neonato..... 51

Figura 24. Alteraciones y consecuencias de la inmadurez de la barrera intestinal y del GALT en neonatos prematuros 54

Figura 25. Beneficios de la lactancia materna en neonatos prematuros y prevención de la NEC..... 57

Índice de tablas

Tabla 1. Principales componentes nutritivos de leche humana 6

Tabla 2. Clasificación funcional de los componentes bioactivos de leche humana que ejercen efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario del lactante 19

Tabla 3. Funciones de las citocinas presentes en leche humana sobre el sistema inmunitario del lactante 25

Tabla 4. Variaciones asociadas a la prematuridad de componentes bioactivos de leche humana con efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario..... 56

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
Ag	Antígeno
APC	Células presentadoras de antígeno
	Antigen-presenting cells
BAT	Tejido adiposo marrón
	Brown adipocyte tissue
BLIMP-1	Proteína-1 de maduración inducida por los linfocitos
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
	Bone morphogenetics proteins
DC	Células dendríticas
	Dendritic cells
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
	Epidermal growth factor
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
	Epidermal growth factor receptor
FcRn	Receptor Fc neonatal
FFA	Ácidos grasos libres
	Free fatty acids
FGF21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
	Fibroblast growth factor 21
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
	Fibroblast growth factor receptor
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
	Gut-associated lymphoid tissue
GDF	Factores de crecimiento y diferenciación
	Growth/differentation factors
GF	Factor de crecimiento
	Growth factor
GIP	Péptido inhibidor gástrico
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
GLP-1	Péptido similar al glucagón 1
	Glucagon-like peptide-1
Hb	Hemoglobina
HCT	Hematocrito
HMO	Oligosacáridos presentes en leche humana

	Human milk oligosacharides
IEC	Células epiteliales intestinales
	Intestinal epitelial cells
IEL	Linfocitos intraepiteliales
	Intraepithelial lymphocytes
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
	Insulin-like growth factor
IL	Interleucina
BMI	Índice de masa corporal
	Body mass index
KLB	β-klotho
KO	*Knock-out*
LAP	Péptido asociado a latencia
	Latency associated peptide
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
	Long-chain polyunsaturated fatty acids
LPS	lipopolisacárido
LTBP	Proteína de unión a TGF-beta latente
	Latent-transforming growth factor beta-binding protein
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
	Mitogen activated protein kinase
MCH	Hemoglobina corpuscular media
	Mean corpuscular hemoglobin
MCV	Volumen corpuscular medio
	Mean corpuscular volum
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
	Major histocompatibility complex
NEC	Enterocolitis necrotizante
	Necrotizing enterocolitis
NK	*Natural Killer*
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PT	Pretérmino
REF	Referencia
SGF	Factor de crecimiento de sarcoma
	Sarcoma growth factor
SI	Sistema inmunitario

sIgA	Inmunoglobulina A secretora *secretory IgA*
T	Término
Tc	T citotóxicos
TGF	Factor de crecimiento transformante *Transforming growth factor*
Th	T colaborador *T helper*
TJ	Uniones estrechas *Tight Junctions*
TCR	Receptor de linfocitos T *T cell receptor*
TLR	Receptor tipo *toll* *Toll like receptor*
TNF	Factor de necrosis tumoral *Tumor necrosis factor*
Treg	Linfocitos T reguladores
ZO	*Zona Occludens*

Resumen

El sistema inmunitario no es totalmente funcional en el momento del nacimiento, sino que va desarrollando su capacidad defensiva frente a patógenos durante las primeras etapas de vida. Esta inmadurez en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa es aún más acentuada en niños prematuros, y justifica su elevada susceptibilidad a padecer infecciones. En este contexto, la leche materna es la fuente de alimento más idónea para el recién nacido, ya que además de nutrientes contiene una gran variedad de factores bioactivos con propiedades inmunomoduladoras. Entre estos componentes se encuentran el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), el cual ha sido identificado en leche humana recientemente. Actualmente, se dispone de poca información sobre la influencia de dichos componentes bioactivos sobre el desarrollo del sistema inmunitario en edades tempranas.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis ha sido establecer el impacto de una suplementación dietética con TGF-β2, EGF y FGF21 en la maduración de la barrera intestinal, del sistema inmunitario intestinal y del sistema inmunitario sistémico en ratas lactantes nacidas a término y pretérmino.

Para alcanzar la primera parte de este objetivo, se utilizaron ratas Wistar nacidas a término que fueron suplementadas diariamente con TGF-β2, EGF o FGF21 desde el día de nacimiento y durante todo el período de lactancia. En relación al sistema inmunitario intestinal, se observó que la suplementación con los tres factores bioactivos ensayados induce cambios en la producción de citocinas y en la composición de linfocitos -tanto del compartimento intestinal inductor como del efector- siendo más evidentes en el caso de EGF y FGF21. Además, EGF y FGF21 también incrementaron la expresión génica de moléculas de defensa innata y de maduración intestinal, respectivamente. En ningún caso, se observó potenciación temprana de la función epitelial de barrera asociada a los suplementos administrados.

En el caso del sistema inmunitario sistémico, la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 promovió el desarrollo de un patrón de inmunoglobulinas plasmáticas asociado a una respuesta de tipo Th2, la cual es predominante en estas primeras etapas de vida. Además, la suplementación con estos factores condujo a pequeñas modificaciones en la composición de linfocitos esplénicos y su capacidad para secretar citocinas, sin afectar su respuesta proliferativa.

En una segunda fase del estudio, se determinó la influencia de la suplementación con EGF en ratas lactantes nacidas en condiciones de prematuridad. Se demostró que la suplementación diaria con EGF durante los primeros 17 días de vida es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria innata -incrementando la proporción de linfocitos

NK a nivel intestinal- y de contrarrestar parcialmente algunas de las alteraciones producidas por la prematuridad, como el desequilibrio en el patrón de inmunoglobulinas plasmáticas Th1/Th2, la permeabilidad intestinal, el tamaño de las células caliciformes y la expresión génica de algunas moléculas a nivel intestinal.

Globalmente, la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 durante la lactancia promueve el desarrollo del sistema inmunitario intestinal y sistémico en ratas lactantes nacidas a término. Además, en el caso de EGF se ha demostrado su influencia en la maduración de la función de barrera intestinal e inmunitaria en condiciones de prematuridad, lo cual podría reducir el riesgo de infección asociado a este tipo de parto.



INTRODUCCIÓN

1. LECHE MATERNA y SALUD DEL LACTANTE

La leche materna se considera la fuente de alimento más idónea para el recién nacido durante los primeros meses de vida, ya que está adaptada a los requerimientos del recién nacido (1). Es en esta primera etapa de vida, cuando el neonato requiere un aporte elevado de nutrientes para su crecimiento, desarrollo y maduración. Para el conjunto de población, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda iniciar la lactancia materna durante la primera hora de vida y mantenerla de forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida. Posteriormente, se recomienda la introducción adecuada de otros alimentos complementarios, manteniendo también la leche materna hasta los dos años (2).

Además de los nutrientes indispensables para el crecimiento y desarrollo del recién nacido, la leche contiene numerosos componentes bioactivos -inmunoglobulinas (Ig), hormonas, citocinas, oligosacáridos y bacterias, entre otros- que, de forma conjunta, contribuyen al efecto beneficioso de la leche materna en la salud del lactante (3). En este sentido, la leche contiene componentes bioactivos capaces de proteger al neonato ante una infección y/o inflamación, contribuir a la maduración de su sistema inmunitario (SI), promover su desarrollo y favorecer la correcta colonización de su intestino por parte de microorganismos beneficiosos (4-6).

En la actualidad, se dispone de datos epidemiológicos que demuestran los beneficios de la leche materna sobre el SI del neonato y, en consecuencia, sobre la salud del lactante. Así, se ha demostrado, que la leche humana confiere protección frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias, y dicha protección perdura en etapas posteriores al destete. También se ha observado una menor incidencia de enfermedades atópicas (alergias alimentarias y respiratorias) en niños con antecedes familiares alimentados con leche materna, en comparación con aquellos que no fueron amamantados. Otros estudios muestran una asociación entre lactancia materna y menor incidencia de enfermedades inmunomediadas, tales como enfermedad celiaca, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes tipo I, artritis reumatoide, enterocolitis necrotizante (NEC) y esclerosis múltiple (7-10).

1.1. COMPOSICIÓN DE LA LECHE HUMANA

La leche humana constituye una fuente muy completa de macronutrientes y micronutrientes, los cuales son indispensables para el crecimiento y desarrollo del recién nacido (11). El agua es el elemento predominante en la leche humana y representa el 87% de su volumen. Además de agua, la leche contiene una serie de nutrientes como son proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y vitaminas, entre otros (**Tabla 1**).

Tabla 1: Principales componentes nutritivos de la leche humana. Adaptada de (11).

Proteínas:	**Células:**	**Minerales y iones:**
inmunoglobulinas	células epiteliales	bicarbonato
α-lactoalbúmina	linfocitos	calcio
β-lactoglobulina	macrófagos	citrato
caseínas	neutrófilos	magnesio
enzimas	**Lípidos:**	fosfato
factores de crecimiento	vitaminas liposolubles	potasio
hormonas	(A, D, E i K)	sodio
lactoferrina	carotenoides	sulfato
lisozima	ácidos grasos	**Trazas de minerales:**
Nitrogenados no proteicos:	fosfolípidos	cobalto
α-amino nitrógeno	esteroles y colesterol	cromo
ácidos nucleicos	triglicéridos	cobre
ácido úrico	**Vitaminas hidrosolubles:**	flúor
creatina	ácido pantoténico	yodo
creatinina	biotina	hierro
glucosamina	colina	magnesio
nucleótidos	folato	molibdeno
poliaminas	inositol	níquel
urea	niacina	selenio
Hidratos de carbono:	riboflavina	zinc
glucopéptidos	tiamina	
lactosa	vitamina B_{12}	
oligosacáridos	vitamina B_6	
	vitamina C	

Los componentes nutricionales de la leche humana pueden tener diferentes orígenes. Algunos nutrientes se sintetizan en los lactocitos de la glándula mamaria, mientras que otros provienen de la dieta de la madre o de sus reservas en el organismo. Globalmente, la calidad nutricional de la leche humana es muy conservada; sin embargo, la composición de algunas vitaminas y ácidos grasos está muy influida por la dieta materna (4). Se estima que la composición media en macronutrientes en leche madura -de madre con parto a término- es

aproximadamente de 0,8-1,2 g/dL de proteína; 3,2-3,6 g/dL de lípidos y 6,7-7,8 g/dL de carbohidratos (mayoritariamente lactosa). La energía es del orden de 65-70 kcal/dL, y se correlaciona con el contenido en grasa de la leche humana (4).

1.2. CAMBIOS EN LA SECRECIÓN LÁCTEA DURANTE LA LACTANCIA

La leche es un fluido dinámico que varía su composición y volumen en el transcurso de la lactancia, además presenta diferencias entre individuos y entre especies. Su composición se encuentra muy influenciada por el estado de salud de la madre o por factores nutricionales. El volumen de leche secretado depende del ciclo de lactación y de factores individuales, pero la demanda del lactante es el mayor determinante (1, 12).

Con el fin de adaptarse a las necesidades del lactante, la composición de la leche humana experimenta variaciones intraindividuales a lo largo del periodo de lactancia. Este proceso de adaptación y evolución en su composición da lugar a tres tipos de secreción láctea: calostro, leche de transición y leche madura. Esta evolución en su composición brinda nutrición y protección apropiada al desarrollo del lactante en cada etapa del crecimiento (4, 12).

1.2.1. Calostro

El calostro es el primer fluido producido por la madre durante los primeros 4-5 días postparto. En comparación con la leche de transición y madura, el calostro tiene distinto volumen, apariencia y composición (1, 4). Se produce en pequeñas cantidades y presenta un bajo contenido de lactosa, potasio, calcio y grasa; en cambio, tiene un elevado contenido proteico (13). Además, el calostro es rico en componentes inmunitarios como la IgA secretora (sIgA), lactoferrina, leucocitos, factores de crecimiento -como el factor de crecimiento epidérmico (EGF)-, entre otros (5, 10). Por su composición se considera que la función principal del calostro es la de proteger al neonato del medio extrauterino ante su exposición a agentes patógenos ambientales (1, 10).

1.2.2. Leche de transición

La leche de transición se produce después del calostro, cuando las uniones estrechas del epitelio mamario empiezan a cerrarse, y hasta las dos semanas postparto (5, 13). Si bien mantiene algunas características del calostro, su producción es superior y su composición se ajusta a las necesidades nutricionales del crecimiento rápido del neonato (1). También contiene Ig y proteínas, pero en menor concentración que en

calostro. Además su proporción de lípidos, lactosa y vitaminas hidrosolubles es más elevada, aportando un mayor aporte calórico que el calostro (5).

1.2.3. Leche madura

La leche madura es el fluido que se secreta a partir de las 2 semanas postparto y hasta el final de la lactancia. Contiene un 90% de agua y un 10% de carbohidratos, proteínas y lípidos, dando como resultado una leche más acuosa (4). Se caracteriza por tener una menor concentración de componentes inmunológicamente activos, mayor volumen y un contenido en nutrientes adecuado para satisfacer las necesidades crecientes del lactante (10).

2. SISTEMA INMUNITARIO DEL NEONATO

El período neonatal es particularmente crítico ya que el neonato se expone a un gran número de microorganismos, proteínas y productos químicos con los que nunca había contactado previamente (14). Además, su resistencia frente a infecciones depende del balance entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. En el momento del nacimiento, las células del sistema inmunitario (SI) sistémico y mucosal ya están presentes y se ha demostrado también la presencia de anticuerpos en ambos compartimentos. Además, la mayoría de neonatos pueden responder apropiadamente frente a una inmunización (15). Sin embargo, el SI del neonato difiere del de los adultos, por lo cual se ha definido como "inmaduro" o "inmunodeficiente" (14). Dentro de las inmunodeficiencias del neonato se pueden mencionar, entre otras: la presencia de una barrera físico-química incompleta, menor funcionalidad de las células efectoras innatas, producción de sIgA limitada y retardada, función incompleta de la cascada del sistema del complemento y mecanismos antiinflamatorios insuficientes a nivel de mucosa respiratoria y gastrointestinal (12).

En el útero, el feto tiene una exposición muy limitada a antígenos (Ag), lo cual implica que su SI adaptativo es *naïve,* es decir presenta menor expresión de moléculas coestimuladoras y mayor requerimiento de estímulo para su activación (15, 16). Por tanto, la respuesta inmunitaria adaptativa en de los neonatos no es óptima y depende, en gran medida, de su respuesta inmunitaria innata para la protección frente a infecciones (17).

2.1. INMUNIDAD INNATA NEONATAL

El SI innato del neonato representa su primera línea de defensa y está formado por granulocitos (mayoritariamente neutrófilos), células presentadoras de Ag (APC), linfocitos *Natural Killer* (NK), entre otras (18). Estas células están disponibles de inmediato tras el nacimiento para proteger al neonato de una amplia gama de agentes patógenos (19).

Los **neutrófilos** son los principales componentes del SI innato y ejercen una función importante en la eliminación de bacterias durante una infección (20). Al nacer, a pesar de observarse un incremento transitorio en la concentración de neutrófilos en sangre, el neonato presenta un menor número de neutrófilos con funcionalidad

limitada (17). Los neutrófilos del neonato no tienen la capacidad de formar trampas extracelulares (NET), lo cual afecta su capacidad de destruir bacterias de manera efectiva. Además, presentan una menor expresión de moléculas de adhesión, como son la L-Selectina (CD62L) y la integrina MAC-1; alterando su unión al endotelio vascular. Además, los neutrófilos neonatales presentan una baja expresión de las moléculas tipo *Toll-like receptor* (TLR) como son TLR2 y TLR4, así como una menor funcionalidad de los neutrófilos en relación a la fagocitosis, explosión oxidativa y capacidad de degradación de los agentes infecciosos intracelulares (17). En general, los defectos en la amplificación, movilización y función de los neutrófilos implican una mayor susceptibilidad a la sepsis en los recién nacidos [101].

Las **células presentadoras de antígeno** (APC) neonatales -monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC)- tienen una baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo II y, en consecuencia, una menor capacidad funcional. Además, las APC neonatales presentan una baja expresión de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) y de TLR. En conjunto, las APC tienen una tendencia a dirigir la respuesta hacia un patrón asociado a linfocitos T *helper* 2 (Th2); hecho que se atribuye a las características mencionadas anteriormente y también a su baja capacidad de extravasación y migración a través del endotelio, y a una menor respuesta inflamatoria, lo cual provoca que los neonatos sean más vulnerables a agentes infecciosos (17).

El **sistema del complemento** es otro componente importante de la inmunidad innata. Este sistema está poco desarrollado en el neonato y no funciona a pleno rendimiento. Sus principales componentes (C1q, C4, C3, properdina y el factor B) se encuentran en menor concentración en los neonatos -en relación al adulto-, confiriendo una elevada susceptibilidad a infecciones y otras condiciones patológicas (20, 21).

Los **linfocitos NK** carecen de CD3 pero que expresan CD56 y NKp46, y son eficaces frente a infecciones virales y tumores. Durante las primeras etapas de gestación, los linfocitos NK están altamente regulados y muy hiporeactivos frente a células diana, como parte de su función protectora del feto en desarrollo (22, 23). A lo largo de toda la gestación, la función citolítica de los linfocitos NK incrementa paulatinamente. Al nacer, los linfocitos NK se presentan en elevadas proporciones, pero con baja capacidad citotóxica. Sin embargo, tienen un menor umbral de activación que brinda protección antiviral. En el período neonatal e incluso durante los primeros días de vida, la proporción de los linfocitos NK disminuye y presenta valores característicos de la edad adulta a los 5 años de edad (21, 23). Los linfocitos NK activados brindan protección mediante su función citolítica y su capacidad de secretar citocinas asociado a linfocitos T *helper* 1 (Th1) [101].

2.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA NEONATAL

La inmunidad adaptativa involucra a los linfocitos B y T, es una respuesta Ag-específica y requiere la adquisición de memoria inmunológica (24). La maduración de la inmunidad adaptativa se inicia en la etapa postnatal. Así, todos los recién nacidos tienen deficiencias en la activación de los linfocitos T, en la producción de citocinas, en la síntesis de Ig -por parte de los linfocitos B- y en las interacciones entre linfocitos T y B, en comparación con el adulto (24).

La inmunidad mediada por células implica dos tipos principales de linfocitos T, los **linfocitos T citotóxicos** (Tc, $CD8^+$) y los **linfocitos T *helper*** (Th, $CD4^+$). Los linfocitos T reconocen a patógenos cuando los receptores de la célula T (TCR) reconocen específicamente los segmentos peptídicos del patógeno en asociación con moléculas del MHC presentes en la superficie de las APC (25). Los linfocitos Tc participan en la erradicación de patógenos intracelulares como son los virus y reconocen Ag presentados por APC en asociación con moléculas del MHC de clase I.

Los linfocitos Th requieren la presentación del Ag asociado al MHC de clase II, y una vez activados se diferencian en **linfocitos $CD4^+$ Th1** y **Th2**, en función del perfil de citocinas que secretan (24). El fenotipo de linfocitos Th1 se considera "inflamatorio" y secreta interferón (IFN)-γ, IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF), entre otras. El fenotipo de linfocitos Th2 se considera "antiinflamatorio" y produce citocinas como son las interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (24).

Al nacer, las subpoblaciones de linfocitos se encuentran en menor concentración que en adultos y requieren su expansión clonal. Ésta tiene lugar durante las primeras semanas de vida y sigue el mismo patrón de expansión en todos los neonatos, independientemente de su edad gestacional (26). Además, los linfocitos T presentan una función deficiente, debido a la elevada proporción de linfocitos T *naïve* y la baja proporción de linfocitos T memoria circulantes (26). La elevada proporción de linfocitos T *naïve* en el neonato se puede atribuir a la ineficiente captación y presentación de Ag por parte de las DC, que es debido a la baja expresión de moléculas del MHC (clase I o clase II) (27).

Durante la vida fetal, la secreción de citocinas polariza la respuesta a un fenotipo Th2. Esta tendencia a Th2 podría ser un mecanismo preventivo frente a un rechazo del SI materno, ya que un incremento en la producción de citocinas de tipo Th1 se ha asociado a un mayor riesgo de aborto espontáneo (28). Así, la polarización hacia el fenotipo de linfocitos Th2 de los neonatos, explica su elevada vulnerabilidad a padecer diferentes tipos de infecciones. Se ha observado una menor producción de citocinas Th1 (IFN-γ) en neonatos en comparación con adultos, lo cual confiere una detección y eliminación de virus deficiente (29, 30). En este sentido, la maduración postnatal del SI se caracteriza por el desarrollo de una respuesta de tipo Th1/Th2 equilibrada (31).

El desarrollo de los **linfocitos T reguladores** (Treg) durante la etapa neonatal es crucial para el mantenimiento de la inmunotolerancia durante toda la vida. Estudios realizados en ratones y humanos sugieren que los linfocitos Treg que se desarrollan tras el nacimiento son claves en el establecimiento de la autotolerancia, incluyendo la tolerancia a Ag de bacterias comensales (32-34).

La inmunidad humoral involucra a los **linfocitos B** que reconocen moléculas de patógeno completas a través de Ig unidas a su superficie celular, que actúan como receptores de Ag (24). Los linfocitos B cuando se activan secretan anticuerpos específicos que permiten eliminar, a través de diferentes mecanismos, a agentes patógenos (35). En el neonato, el 95% de los linfocitos B son inmaduros y muestran una menor interacción con las APC y, en consecuencia, su capacidad de producir anticuerpos es inferior (36). Además, estos linfocitos tienen una menor capacidad de cambio de isotipo de Ig, hecho que justifica que la mayoría de Ig secretadas son de clase IgM (37).

A pesar de que la funcionalidad de los linfocitos B en el neonato es deficiente, éste nace con un elevado suministro de Ig procedentes de la madre -exclusivamente de clase IgG- que han sido transferidas a través de la placenta y que forman parte de su inmunidad pasiva (38). Las reservas de IgG materna únicamente se mantienen los primeros meses de vida y, posteriormente, será la leche materna la que proporcione las Ig necesarias -fundamentalmente de clase IgA- para la protección del lactante (39). Estas Ig protegerán al neonato contra infecciones durante los primeros meses de vida, hasta el momento en que el niño sea capaz de sintetizar sus propios anticuerpos.

2.3. INMUNIDAD INTESTINAL NEONATAL

La inmadurez en el neonato no afecta únicamente al SI sistémico sino también a nivel intestinal (40).

2.3.1. Barrera intestinal y tejido linfoide asociado al intestino

La barrera intestinal es una estructura compleja formada principalmente por cuatro componentes: la barrera física, la química, la inmunitaria y la microbiana (41) (**Figura 1)**.

La **barrera física** está constituida por una capa de células epiteliales columnares que forma la primera línea de defensa entre la luz intestinal y el medio interno. Las células mayoritarias son los enterocitos (> 80%), si bien también incluye las células Goblet, las células Paneth y células enteroendocrinas (42). Entre las células epiteliales se encuentran uniones complejas como las uniones estrechas (TJ), uniones adherentes y desmosomas, entre otras (43). Estas uniones controlan el paso de fluidos,

electrolitos y macromoléculas pequeñas, pero inhiben el paso de moléculas de mayor tamaño. Las uniones estrechas son las principales responsables de controlar la permeabilidad por vía paracelular (41).

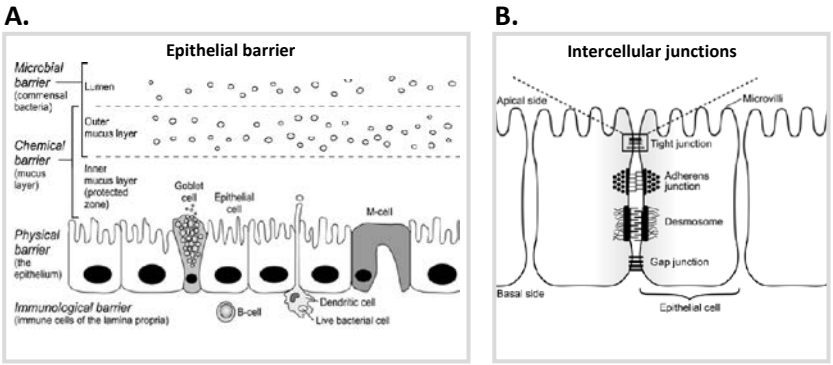


Figura 1. (A) Barreras del intestino y (B) componentes que conforman las uniones entre las células epiteliales de la mucosa intestinal. Adaptada de (41).

La formación de las TJ es clave para el mantenimiento de la permeabilidad intestinal y la función de barrera intestinal (**Figura 2**). Se han identificado varias proteínas de las TJ, entre las cuales se encuentran las proteínas transmembrana ocludina, claudinas y la molécula adhesivas de la unión (JAM), que se consideran cruciales para regular la permeabilidad paracelular (44). La ocludina es una proteína estructural y funcional de las TJ que participa en la señalización celular (45, 46). Las claudinas forman parte de una gran familia de proteínas que participan en la regulación de la permeabilidad paracelular y en la función de barrera epitelial (47, 48). En la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) -tanto en humanos como en modelos animales- se ha descrito que cambios en la expresión y localización de las proteínas ocludina y claudina se correlacionan con la disfunción de la barrera intestinal (49).

La **barrera química** consiste principalmente en la capa de moco que cubre el epitelio intestinal. El moco actúa como barrera, impidiendo la difusión de sustancias no deseadas, y como lubricante. El principal componente del moco son unas proteínas glicosiladas denominadas mucinas (41). Esta capa de moco es una barrera dinámica de defensa que contiene péptidos antimicrobianos y evita el contacto de las bacterias con el epitelio. Numerosos estudios muestran que la expresión génica de mucinas, la composición y secreción de moco se puede ver alterada por mediadores inflamatorios del huésped y de la microbiota intestinal (50).

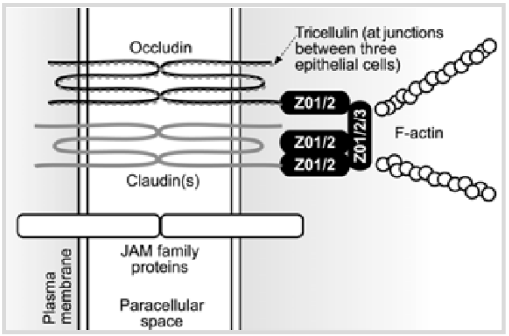


Figura 2. Estructura y localización de las proteínas de las uniones estrechas (TJ) implicadas en la regulación de la permeabilidad paracelular. Extraída de (41).

La **barrera inmunitaria** incluye como primera línea de defensa la sIgA la cual reconoce y reacciona específicamente con el Ag (41). El complejo sIgA-Ag se une a los receptores de sIgA de las células M y los Ag son transferidos a la lámina propia para su presentación por parte de las DC. Las APC en la lámina propia reciben Ag procedentes del lumen intestinal y los procesan y presentan a los linfocitos T. Las APC secretan IL-12 induciendo la diferenciación de los linfocitos Th activados a linfocitos de tipo Th1. Estos linfocitos secretan la citocina IFN-γ, la cual a su vez activa a macrófagos que secretan TNF-α. Al mismo tiempo, las APC también secretan la citocina inmunoreguladora IL-10, la cual limita la respuesta de tipo Th1 (41).

El SI intestinal lleva a cabo respuestas de tolerancia -frente a Ag inocuos- y de defensa inmunitaria -frente a patógenos- (51). Para evitar reaccionar contra Ag de la dieta y de la microbiota intestinal, el SI intestinal (incluyendo las APC y linfocitos T) se encuentra en un estado predominantemente "inmunosuprimido o tolerante" (52). Sin embargo, las bacterias comensales inducen una leve reacción inmunitaria que contribuye a un bajo nivel de inflamación basal que actúa como mecanismo de defensa intestinal (53).

El **SI intestinal o GALT** (tejido linfoide asociado al intestino) es un tejido linfoide secundario responsable del procesamiento de Ag que interactúan con la mucosa intestinal y de la consecuente respuesta inmunitaria (54). Existen dos ubicaciones principales de linfocitos a nivel intestinal: los sitios inductivos, donde se inicia la respuesta inmunitaria tras la estimulación específica por el Ag, que incluye las placas de Peyer. Además también hay los sitios efectores, responsables de ejecutar y completar la respuesta inmunitaria, en los cuales se pueden diferenciar dos subpoblaciones de linfocitos intestinales: los linfocitos de la lámina propia (LPL), localizados en la parte interna de las vellosidades, y los linfocitos intraepiteliales (IEL), localizados entre los enterocitos a lo largo de las vellosidades intestinales (55) (**Figura 3**).

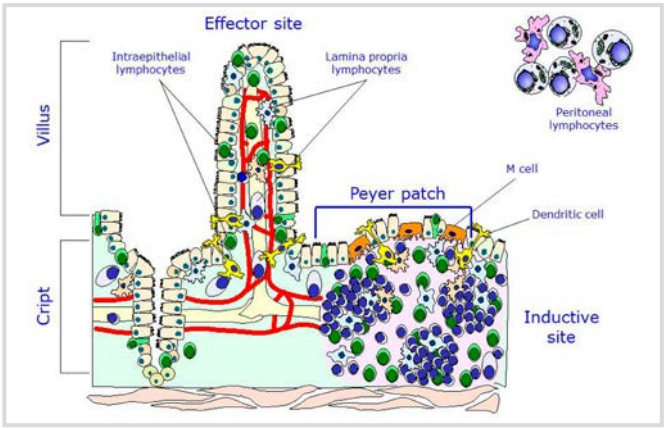


Figura 3. Estructura y organización del tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Extraída de (54).

2.3.2. Microbiota intestinal

Tras el nacimiento, la microbiota es muy inestable y sufre cambios dinámicos durante los primeros días de vida, llegando a ser más estable y similar a la microbiota adulta entre los 3 y 4 años de edad (56). Estudios sobre la microbiota intestinal han demostrado la importancia de su alteración o disbiosis en el desarrollo de diversos trastornos metabólicos como son la obesidad, diabetes, y enfermedades inmunomediadas com el asma (56). Kumbhare *et al.* (56) han planteado la existencia de tres fases con los factores que pueden modificar la microbiota intestinal a edades tempranas (**Figura 4**):

***Fase 1*.-** Es la fase fetal, actualmente se cree que la colonización bacteriana empieza en el útero y que la microbiota intestinal materna es la fuente principal del neonato. La microbiota establecida en esta fase persiste durante las primeras semanas de vida postnatal (57). La composición de la microbiota en esta fase dependerá de la salud y la dieta materna, la salud vaginal y la exposición a antibióticos a la que esté expuesta la madre durante la gestación, estos factores pueden modificar la microbiota intestinal materna, la cual de manera indirecta repercutirá en la microbiota fetal (en el útero) e incluso en la del recién nacido (56).

***Fase 2*.-** Es la fase comprendida entre los 0 y 24 meses (infancia), en la cual la microbiota intestinal experimenta coevolución con su propio huésped, siendo influenciada por varios factores (56). Así, se ha demostrado que el tipo de parto y la alimentación tienen efectos combinados sobre la microbiota intestinal del niño. Por un lado, el tipo de parto tiene un impacto crucial sobre el tipo de microbiota adquirida en ese momento. Concretamente, se ha demostrado que los niños nacidos

mediante cesárea tienen una microbiota menos diversa que los nacidos por vía vaginal; y que esta modificación de la microbiota afecta en la salud del niño y en su respuesta inmunitaria (57, 59).

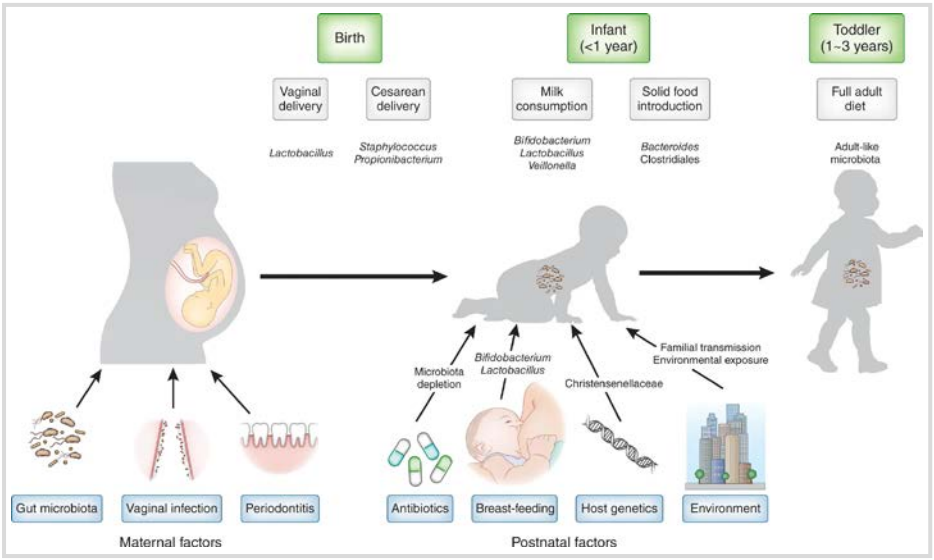


Figura 4. **Visión general de los factores que influyen sobre la microbiota intestinal durante las tres fases de desarrollo (fetal, infancia y niñez).** Extraída de (58).

Por otro lado, la alimentación del neonato -leche materna o fórmula infantil- tiene un efecto directo sobre su microbiota intestinal. En este sentido, se ha demostrado que la leche materna contiene ciertas proteínas y factores de estimulación que se hallan ausentes en leche de fórmula, los cuales favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino del lactante (60). Otro factor que también puede modificar la microbiota en esta fase es el uso de antibióticos. Se ha demostrado que la toma de antibióticos provoca cambios en la composición de la microbiota intestinal, inhibiendo su crecimiento o destruyendo tanto especies de bacterias beneficiosas como patógenas, permitiendo así el crecimiento excesivo de cepas resistentes a antibióticos y aumentando el riesgo del niño a padecer infecciones (56).

***Fase 3*.-** Corresponde al período comprendido entre los 2 y 4 años de edad (niñez). Se ha demostrado que entre los 3 y 4 años los cambios de la microbiota se estabilizan y se acoplan al huésped, siendo la microbiota intestinal similar a la de los adultos [25]. En esta fase, el destete y el inicio de la alimentación sólida marcan un período de modificaciones en la composición de la microbiota intestinal, con cambios en algunos grupos taxonómicos y un aumento en la diversidad microbiana intestinal (61, 62). Así, se ha demostrado que la introducción de la dieta sólida en la alimentación del lactante provoca un incremento en *los* géneros *Enterobacteria* y *Enterococci*, junto a una colonización por Bacteroides spp., *Clostridium* y *Estreptococus*, cambios que no

han sido observados en niños alimentados con fórmulas infantiles (63). Además, hay otros factores que pueden influir en esta fase como son los factores genéticos, la higiene y la exposición del niño a antibióticos.

3. COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA LECHE HUMANA CON EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

La leche humana contiene, además de nutrientes indispensables para el crecimiento y desarrollo del recién nacido, numerosos componentes bioactivos que realizan acciones beneficiosas sobre la salud del lactante.

Algunos de estos componentes bioactivos ejercen efectos específicos sobre el SI del neonato: ofreciendo protección frente a infecciones, promoviendo su desarrollo, facilitando la adquisición de tolerancia, controlando la respuesta inflamatoria y favoreciendo el desarrollo y establecimiento de una correcta microbiota intestinal (4, 64-66).

En la **Tabla 2** se muestra una clasificación no exhaustiva de estos factores bioactivos, en función de su actividad principal, en 5 grupos: 1) componentes antiinfecciosos, 2) componentes que promueven el desarrollo del SI, 3) componentes tolerogénicos, 4) componentes antiinflamatorios y, finalmente, 5) componentes bacterianos.

Esta clasificación es orientativa, ya que diversos componentes de la leche humana ejercen múltiples actividades (p.e., antiinfecciosa e inmunomoduladora), por lo cual resulta difícil adscribirlos a un único grupo, pero permite una visión global de su repercusión beneficiosa sobre el SI neonatal.

Tabla 2. Clasificación funcional de los componentes bioactivos de leche humana que ejercen efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario del lactante. Extraída de (64, 67-69)

1. Componentes antiinfecciosos
• Inmunoglobulinas secretoras: sIgA, sIgG, sIgM • Oligosacáridos (acción prebiótica y antimicrobiana) • Lactoferrina y lactoferricina • Lisozima • α-lactoalbúmina • κ-caseína • Lactadherina • Defensinas • Haptocorrina • Mucinas • Citocinas y quimiocinas • Leucocitos maternos • sCD14
2. Componentes que promueven el desarrollo del sistema inmunitario
• Leucocitos maternos: macrófagos, neutrófilos y linfocitos • Citocinas • Adipocinas: leptina, adiponectina, resistina, entre otras • Factores de crecimiento: EGF, TGF-β, IGF-1, IGF-2, entre otros • Nucleótidos • sCD14 • LC-PUFA: DHA y AA • Quimiocinas: G-CSF, MCP-1, entre otras
3. Componentes tolerogénicos
• Citocinas: TGF-β, IL-10 • LC-PUFA de la serie n-3 (DHA)
4. Componentes antiinflamatorios
• Citocinas antiinflamatorias: IL-10, TGF-β • Antagonistas del receptor de IL-1 • Receptores solubles de TNF-α y de IL-6 • Lactoferrina • Antioxidantes: α-tocoferol, β-caroteno, ácido ascórbico, catalasa • Inhibidores de proteasas: α-1-antitripsina, α-1-antiquimotripsina
5. Componentes bacterianos (microbiota)
• Bacterias predominantes: *Staphylococcus, Streptococcus, Propionibacterium* • Bacterias ácido-lácticas: *Bifidobacterium, Lactobacillus* • Bacterias de la cavidad oral: *Prevotella, Veillonella* • Bacterias de la piel: *Propionibacterium, Corynebacterium*

sIg:Inmunoglobulinas secretoras, sCD14: CD14 soluble, EGF: factor de crecimiento epidérmico, TGF: factor de crecimiento transformante, IGF: factor de crecimiento similar a la insulina, LC-PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, DHA: ácido docosahexaenoico, AA: ácido araquidónico, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, MCP-1: proteína-1 quimiotáctica de monocitos, IL: interleucina, TNF: factor de necrosis tumoral.

En la **Figura 5,** se representa de forma esquemática algunas de las repercusiones de la acción de determinados componentes bioactivos de la leche humana en el desarrollo y maduración del SI, así como también en la colonización microbiana en el intestino del neonato.

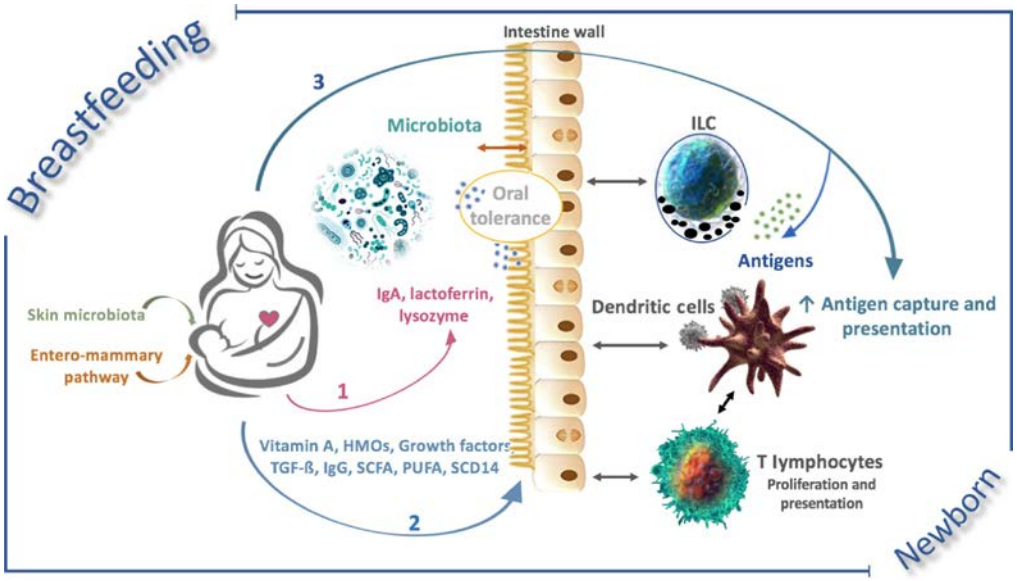


Figura 5. Representación de la influencia de la lactancia materna sobre el sistema inmunitario del neonato. La leche humana proporciona (1) una colonización saludable de microbiota intestinal que contribuirá a la homeostasis inmunitaria intestinal: componentes antiinfecciosos -como la IgA, lactoferrina y lisozima- protegerán contra la invasión de patógenos y los oligosacáridos (HMO) facilitarán la proliferación de bacterias beneficiosas (2), garantizando una función óptima de la barrera intestinal. Diversos componentes (factores de crecimiento, vitamina A) estimularán la maduración de la barrera intestinal, facilitarán la transferencia de antígenos y proporcionarán factores de respuesta inflamatoria epitelial (HMO, TGF-β, sCD14 ...). La leche materna inducirá una respuesta inmunitaria apropiada a largo plazo específica de antígeno (3): los factores con capacidad inmunomoduladora promoverán la funcionalidad de las células dendríticas (IgG, vitamina A) y condicionarán las respuestas inmunitarias inducidas (TGF-β, vitamina A, entre otras). Extraída de (10).

En los apartados siguientes, se describen los efectos beneficiosos que ejercen los diferentes tipos de componentes bioactivos de la leche materna -en función de su actividad antiinfecciosa, inmunomoduladora, tolerogénica, antiinflamatoria y probiótica- sobre el SI del lactante. Además, se comentan algunos de los principales componentes que presentan propiedades antiinfecciosas y/o inmunomoduladoras, y que podrían compensar las deficiencias del SI del recién nacido.

3.1. COMPONENTES ANTIINFECCIOSOS

Los componentes antiinfecciosos presentes en leche humana tienen como objetivo proteger a la glándula mamaria durante la lactación y al neonato en estas primeras etapas de vida, en que su SI está todavía inmaduro. El listado de componentes antiinfecciosos sigue aumentando y su actividad es muy diversa. Así, pueden actuar sobre patógenos específicos, familias de patógenos y múltiples familias simultáneamente. Además, su mecanismo de acción puede variar desde un efecto directo (p.e., inhibiendo la unión del patógeno a su receptor) a un mecanismo indirecto (p.e., modificando la composición de la microbiota intestinal) (8, 70).

En la **Tabla 2** se muestran algunos de los factores bioactivos responsables de la actividad antiinfecciosa de la leche humana. A continuación, se describe brevemente algunas de las características de las Ig, lactoferrina y oligonucleótidos de la leche materna.

3.1.1. Inmunoglobulinas

La IgA secretora (sIgA) es el isotipo mayoritario en leche humana (90%), si bien también están presentes sIgM e sIgG (71). La sIgA constituye el principal mecanismo de defensa específica en mucosas, principales vías de entrada para la mayoría de agentes infecciosos (64). La transferencia de sIgA al intestino del neonato, a través de la lactancia materna, es un mecanismo de defensa pasiva que puede compensar en parte el retraso en la producción de sIgA en el recién nacido (20, 72). La concentración de sIgA es elevada en calostro (12 g/L) y disminuye durante la lactancia, alcanzando valores de 1 g/L en leche madura (4, 73).

Como se ilustra en la **Figura 6,** la sIgA presente en leche humana es sintetizada por linfocitos B en la glándula mamaria que proceden mayoritariamente del intestino materno, a través de la vía enteromamaria (74, 75). Cuando la madre se expone a un nuevo patógeno entérico, éste es presentado por las DC en el GALT y se activan los linfocitos T y B. Los linfocitos B activados se diferencian a linfocitos productores de IgA (cambio de isotipo IgM a IgA). Éstos migran hacia la glándula mamaria y se diferencian a células plasmáticas secretoras de IgA. Esta IgA se une a receptores de Ig poliméricas (pIgR) y el complejo IgA-pIgR se transporta activamente a través de las células epiteliales hacia la superficie apical. En la superficie celular, parte del receptor permanece unido a la IgA, constituyendo la sIgA que se secreta en leche. A través de la lactancia materna, la sIgA llega intacta a la mucosa intestinal del neonato, donde se acumula y lo protege frente a infecciones de patógenos -incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos-, a los cuales ha estado expuesta previamente la madre. En

este sentido, la lactancia materna constituye un ejemplo único de integración entre la inmunidad mucosal de la madre y del neonato (39, 71, 74).

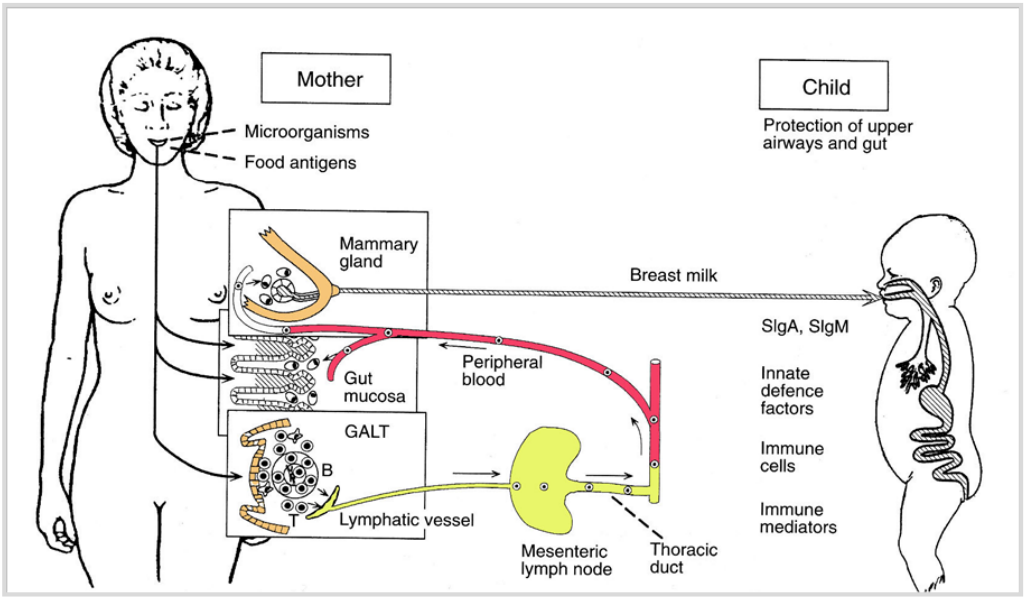


Figura 6. Origen de la IgA secretora presente en leche humana. La sIgA de la madre producida en respuesta a un nuevo patógeno entérico es sintetizada por linfocitos B procedentes del intestino que migran hacia la glándula mamaria, a través de la circulación enteromamaria. Adaptada de (74).

La sIgA protege las mucosas del lactante tanto a nivel intestinal, como también a nivel de los sistemas respiratorio y genitourinario. Su principal mecanismo de acción es la neutralización y exclusión inmunitaria. Por un lado, evita la adhesión de microorganismos a las superficies mucosas y, por otro, neutraliza las toxinas bacterianas e incrementa la excreción de virus (76).

Recientemente se ha demostrado que la sIgA tiene la capacidad de modular la composición, expresión génica y función metabólica de la microbiota intestinal mediante su unión -independiente de Ag- a las bacterias comensales del intestino (77).

3.1.2. Lactoferrina y lactoferricina

La lactoferrina es la proteína sérica más abundante en leche humana. Su concentración es más elevada en calostro (5-7 g/L) que en leche madura (1-3 g/L) (78). Es muy resistente a la proteólisis gastrointestinal, lo que permite la defensa de la mucosa intestinal y la protección frente a infecciones del tracto urinario (8).

Su acción antiinfecciosa es muy amplia y actúa sobre una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas. Por una parte, posee actividad bacteriostática la cual es debida a su capacidad de unión al hierro, de forma que actúa secuestrando el mismo e impidiendo su utilización por parte de bacterias, inhibiendo su multiplicación y crecimiento(79). Por otra parte, también ejerce una acción bactericida, produciendo alteraciones en la membrana bacteriana que conducen a la pérdida de su integridad y, en consecuencia, a su muerte (8, 70). Además, se ha demostrado que lactoferrina tiene actividad antiviral frente a determinados virus -tales como *Rotavirus, Cytomegalovirus, Herpes simplex,* entre otros-, y también acción antifúngica frente a C*andida albicans* (80).

Esta capacidad antiinfecciosa no es exclusiva de la lactoferrina íntegra, sino que cuando entra en contacto con la pepsina gástrica se produce lactoferricina, un péptido con actividad antiinfecciosa potente contra bacterias, hongos y virus (79, 81).

Lactoferrina tiene también una potente actividad inmunomoduladora sobre el SI del lactante. En la respuesta inmunitaria innata, se ha descrito que lactoferrina incrementa la actividad citotóxica de las células NK y la fagocitosis por parte de macrófagos. Por otra parte, en la respuesta inmunitaria adaptativa, lactoferrina activa y recluta las APC y promueve el desarrollo de linfocitos Th1 (82).

Lactoferrina posee también una potente actividad antiinflamatoria, ya que interfiere en la activación del factor de transcripción NF-κB e inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias (83). Por último, destacar que lactoferrina favorece el establecimiento de una microbiota intestinal beneficiosa en el lactante (84).

3.1.3. Oligosacáridos

Los oligosacáridos de leche humana (HMO) son el tercer componente más abundante de la leche humana, después de la lactosa y los lípidos (85). Los HMO son una mezcla compleja de más de 200 carbohidratos no digeribles (86).

En leche humana, el contenido y composición de HMO varía entre mujeres y también se modifica en cada etapa de lactancia. Generalmente, la concentración total de HMO es más elevada en calostro que en leche madura (87-89). Así, inicialmente la concentración de HMO puede exceder los 20 g/L y disminuir hasta valores de 5-12 g/L durante el período de lactancia (90).

La leche materna contiene tres principales tipos de HMO: los fucosilados (35-50 %), los sialilados (12-14 %) y los neutros no-fucosilados (42-55 %) (91). En los fucosilados se incluye la 2'-fucosilactosa (2'-FL) y en los neutros se incluye la lacto-N-neotetraosa (LNnT) (85). Los HMO neutros son los más abundantes con más del 75% del total de HMO en leche materna (85).

Los HMO constituyen un componente importante para la protección del neonato durante la lactancia. Los HMO pueden actuar mediante mecanismos de acción dependientes de la microbiota -interactuando con la microbiota- y/o independientes de la microbiota -interactuando con patógenos o células del lactante- (92).

En este sentido, los HMO son capaces de modificar la composición de la microbiota del neonato, mediante su acción prebiótica que promoverá el crecimiento de bifidobacterias. Su utilización por parte de la microbiota da lugar a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que ejercen múltiples funciones -de forma indirecta- a nivel de las células epiteliales e inmunitarias intestinales (92).

Por otra parte -y entre otras funciones independientes de la microbiota- se ha descrito que los HMO ejercen una acción antiinfecciosa en el neonato, debido a que su estructura es similar a la de receptores específicos de patógenos localizados en la superficie del epitelio intestinal. En este caso, los HMO actúan como "falsos receptores" ya que interaccionan con el patógeno, evitando la infección y favoreciendo su eliminación (93). Además, los HMO pueden promover cambios en la expresión génica de elementos de respuesta del lactante como mucinas o TLR, entre otros (94).

3.2. COMPONENTES QUE PROMUEVEN EL DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO

La leche humana contiene su propio SI y una gran variedad de factores celulares y solubles que, sin duda, facilitan el desarrollo, diferenciación y maduración del SI intestinal y sistémico del neonato (**Tabla 2).** Entre ellos, cabe destacar el potencial de algunos factores de crecimiento en la maduración del SI intestinal (función de barrera, entre otras) y también a nivel sistémico (inmunidad innata y adaptativa) **(**ver **apartado 2.1 y 2.2)**. A continuación, se comentan algunos aspectos relativos a las células inmunitarias y a las citocinas presentes en leche humana.

3.2.1. Leucocitos

Los leucocitos son células que forman parte del SI materno y se hallan presentes en leche humana. Su concentración varía en función de la etapa de lactancia, siendo máxima en calostro ($\sim 4x10^9$/L) y manteniéndose relativamente elevada en leche madura ($\sim 10^8$-10^9/L). Estos leucocitos incluyen macrófagos (55-60% del total de leucocitos) y neutrófilos (30-40%) y, en menor proporción, linfocitos (5-10%) (64, 95).

Se ha demostrado que los leucocitos presentes en leche materna que llegan al intestino del lactante presentan sus moléculas de superficie prácticamente intactas, y mantienen su estado de activación y viabilidad celular. Todo ello sugiere que estos

leucocitos maternos podrían desempeñar una función inmunitaria clave en el espacio temporal comprendido entre el nacimiento y el desarrollo del SI del lactante (64, 69).

3.2.2. Citocinas

Las citocinas son glucoproteínas multifuncionales implicadas en la comunicación intercelular y en la activación del SI. Están presentes en la fracción acuosa de la leche humana y su concentración varia ampliamente dependiendo del período de lactancia. Concretamente se han detectado numerosas citocinas como son la IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α y TGF-β, entre otras (64, 67). Estas citocinas se encuentran a bajas concentraciones (del orden de pg/L) y provienen principalmente de células de la glándula mamaria, si bien los leucocitos activos presentes en leche son también capaces de producir determinadas citocinas (96).

El aporte de citocinas a través de la leche materna es importante para el neonato, ya que su capacidad de producir citocinas se encuentra muy limitada en las primeras etapas de vida (67). Se ha sugerido que, de forma global, las citocinas presentes en leche materna modulan la actividad del SI del lactante y controlan la respuesta inflamatoria (97). En la **Tabla 3** se recogen algunas de las funciones que ejercen determinadas citocinas presentes en leche humana sobre el SI del lactante.

Tabla 3. Funciones de las citocinas presentes en leche humana sobre el sistema inmunitario del lactante. Información extraída de (4, 67, 98, 99).

CITOCINAS	FUNCIONES
IL-1β	Factor trófico intestinal y del sistema inmunitario, proinflamatoria
IL-2	Modula el desarrollo de linfocitos T
IL-6	Factor trófico intestinal, proinflamatoria, activador de linfocitos B
IL-7	Promueve el desarrollo de linfocitos T y del timo
IL-8	Factor trófico intestinal, actividad quimiotáctica de leucocitos
IL-10	Factor trófico intestinal, antiinflamatoria, promueve la tolerancia oral
IFN-γ	Estimula la respuesta Th1, suprime la respuesta Th2
TNF-α	Estimula la respuesta inflamatoria
TGF-β	Factor trófico intestinal, antiinflamatoria, promueve la tolerancia oral

IL: interleucina, IFN: interferón, TNF: factor de necrosis tumoral, TGF: factor de crecimiento transformante.

3.3. COMPONENTES TOLEROGÉNICOS DE LECHE HUMANA

En el período postnatal, el SI del recién nacido adquiere la habilidad de discriminar entre Ag potencialmente peligrosos de aquellos Ag inocuos, frente a los cuales se induce un estado de tolerancia. En este sentido, se ha demostrado que la lactancia materna promueve este proceso. Ello justifica la menor incidencia de alergias alimentarias en niños alimentados exclusivamente con leche materna, en comparación con aquellos que no fueron amamantados (8, 64).

Como se muestra en la **Tabla 2**, el efecto tolerogénico de la leche humana se ha asociado a determinadas citocinas, tales como TGF-β **(ver apartado 4.1.4.3.**) e IL-10; y también a determinados ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA).

3.4. COMPONENTES ANTIINFLAMATORIOS DE LECHE HUMANA

A pesar de que la inflamación es un mecanismo defensivo beneficioso que participa en la protección al neonato de la infección, una respuesta inflamatoria exagerada puede ocasionar lesiones tisulares importantes. Actualmente, está claramente establecido el potencial antiinflamatorio inherente de la leche humana, el cual controla el proceso inflamatorio y asegura una respuesta inmunitaria innata adecuada y efectiva en cada caso, evitando lesiones colaterales en el lactante (8, 64).

Esta capacidad antiinflamatoria se puede atribuir a distintos componentes de la leche humana (**Tabla 2**), entre los cuales se incluyen citocinas antiinflamatorias como TGF-β (**ver apartado 4.1.5.**), receptores específicos y antagonistas de citocinas proinflamatorias, lactoferrina, antioxidantes, antiproteasas y algunos LC-PUFA.

3.5. MICROBIOTA DE LECHE HUMANA

La leche materna es el primer alimento probiótico del neonato ya que contiene una comunidad diversa de microorganismos; concretamente, hasta la fecha se han aislado más de 200 filotipos agrupados en 50 géneros diferentes (100). El origen de la población bacteriana de leche materna no está aún muy bien entendido, se cree que el origen es la piel materna, la boca del bebé y/o endógenamente el tracto intestinal materno a través de un mecanismo que involucra las células inmunitarias; la denominada vía enteromamaria (101).

A pesar de existir grandes variaciones interindividuales e interpoblacionales, cada vez hay más estudios que coinciden en la identificación de los géneros *Staphylococus*, *Streptococus* y *Propionibacteria* como miembros de la microbiota de la leche y parece ser que están presentes universalmente en la leche humana independientemente de las características maternas o infantiles estudiadas (102, 103). Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se encuentran comúnmente en leche materna; sin

embargo, a pesar de detectarse consistentemente en todas las muestras y poblaciones en las que han sido estudiadas, representan una minoría de la población bacteriana detectada (104). Cabe destacar que, gracias a nuevas técnicas de secuenciación, se han podido identificar bacterias asociadas al intestino que son anaerobias estrictas (*Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalebacterium*, *Roseburia* y *Ruminococcus*, entre otras), las cuales son muy difíciles de identificar mediante técnicas tradicionales de laboratorio (103, 105, 106).

La microbiota asociada a la leche humana contribuye a la instauración de la microbiota intestinal inicial de los neonatos, y tiene una función relevante en la modulación y desarrollo del SI de los neonatos. Así, la microbiota intestinal en esta etapa de lactancia es responsable del cambio de la respuesta inicial de tipo Th2 intrauterina a una respuesta balanceada Th1/Th2 (6). Las bacterias presentes en calostro y en leche madura estimulan la respuesta antiinflamatoria y la producción de determinadas citocinas, previniendo algunas enfermedades inflamatorias y la expresión de patologías inmunomediadas, como son el asma y la dermatitis atópica, entre otras (6).

4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento (GF) son un grupo de polipéptidos que actúan sobre el crecimiento celular, generalmente promoviendo y, en algunos casos, inhibiéndolo. Además, regulan muchas otras funciones celulares vitales, como son el control de la diferenciación celular, entre otros procesos. Su mecanismo de secreción es, fundamentalmente, paracrina o autocrina y, en algunas ocasiones, es endocrina; proporcionando el mecanismo de secreción más adecuado según su función (107).

Durante el desarrollo embrionario, los factores de crecimiento son cruciales para regular la supervivencia neuronal, determinar el destino celular y establecer una conectividad adecuada. Además, cabe destacar que en leche humana se han identificado numerosos GF. En los primeros días de lactancia, los GF presentes en leche se encuentran en elevadas concentraciones y participan tanto en la protección como en la maduración del intestino del lactante (67, 73, 108). En algunos casos, se ha demostrado su transferencia al lactante a través de la leche materna; entre ellos, el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), entre otros. Además, se han descrito sus efectos sobre el crecimiento y maduración de diversos órganos y sistemas del recién nacido (**Figura 7**)(98, 108).

Además de estos GF, en leche materna también se han identificado el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). En relación a TGF-β, a pesar de ser un GF, generalmente se le ha categorizado como citocina, con un patrón antiinflamatorio que propicia la inducción de tolerancia oral en el recién nacido (64). Respecto a FGF21, si bien es considerado también un GF en base a su estructura, no desempeña las funciones características de éstos. Su presencia en leche humana, de rata y ratón ha sido descrita recientemente por Gavaldà *et al*., (109). Actualmente, FGF21 se considera una adipocina con diversas funciones metabólicas, de forma similar a las adipocinas leptina y adiponectina también presentes en leche humana (64).

Se ha demostrado la capacidad inmunomoduladora de diversos GF, los cuales podrían modificar la respuesta inmunitaria y, en el caso que estén presentes en leche materna, podrían modular el desarrollo del SI y del intestino en el neonato (110).

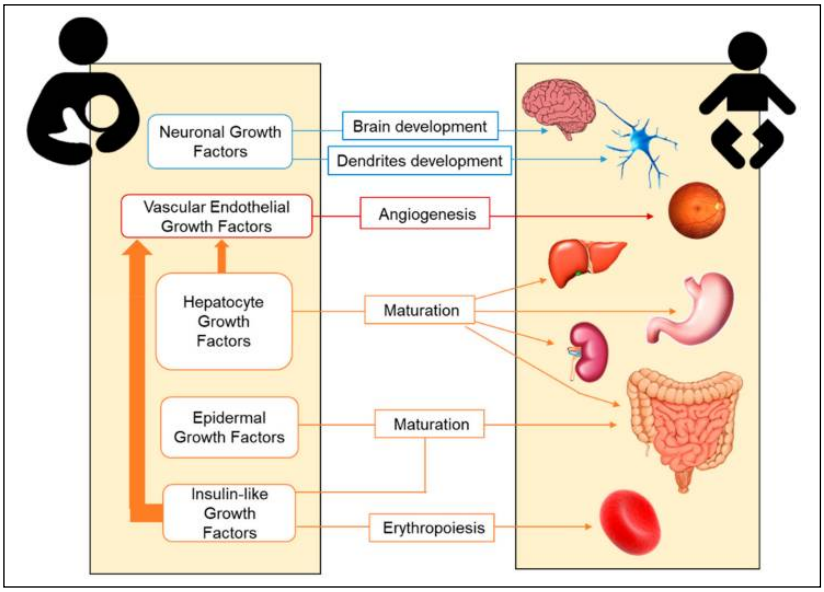


Figura 7: Transferencia de factores de crecimiento de leche humana y principales funciones sobre diversos tejidos y órganos diana del lactante. Extraída de (98).

4.1. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-β (TGF-β)

En 1978, Todaro y De Larco descubrieron que las células 3T3 de sarcoma murino trasformadas por virus producían un "factor" que inducía la transformación de fibroblastos de riñón de rata (NRK) no neoplásicos a células con fenotipo neoplásico (111). Estos autores lo denominaron "factor de crecimiento de sarcoma" (SGF) y analizaron su actividad transformadora en base a su capacidad para promover el crecimiento en agar de las células NRK. Estos resultados permitieron demostrar que SGF era una mezcla de 2 péptidos. Uno de estos péptidos competía con EGF por el mismo receptor e inducía la formación de pocas colonias de células NRK en agar; a este compuesto lo denominaron "factor de crecimiento transformante-α" (TGF-α). El segundo péptido, en presencia de pequeñas cantidades de EGF, inducía el crecimiento de un mayor número de colonias de células NRK; a éste lo denominaron "factor de crecimiento transformante-β" (TGF−β, *transforming growth factor*). Inicialmente, se creyó que TGF−β era una hormona y que únicamente actuaba como tal, pero en 1981 Roberts *et al.* (112) identificaron a TGF−β como la molécula involucrada en diversos procesos biológicos (113).

4.1.1. Estructura y síntesis de TGF-β

El factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) es una proteína homodimérica de 25 kDa (112). Forma parte de una gran familia que está compuesta por más de 33 miembros agrupados en subfamilias en función de su estructura. Estas subfamilias

son los factores de crecimiento transformante-β (TGF-β), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), los factores de crecimiento y diferenciación (GDF) y las activinas, entre otras (113).

En mamíferos, la subfamilia TGF-β está formada por tres isotipos: TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 y, en particular, el TGF-β1 es uno de los miembros más importantes en la regulación del SI (114). La estructura peptídica de los tres miembros de la familia TGF-β es muy similar (**Figura 8**). Los tres se sintetizan en forma de precursores: TGF-β1 de 390 aa y, TGF-β2 y TGF-β3 con 412 aa (115). Su estructura incluye un péptido de señal en la porción N-terminal (20-30 aa) -necesario para su secreción celular-, una región denominada "péptido asociado a latencia" o LAP (249 aa) -la cual se libera por la activación del compuesto- y, finalmente, la porción bioactiva de TGF-β (112-114 aa) localizada en la región C-terminal (112, 114, 116). Esta última porción contiene nueve cisteínas, de las cuales siete son esenciales para la dimerización y la estabilidad del polipéptido (112).

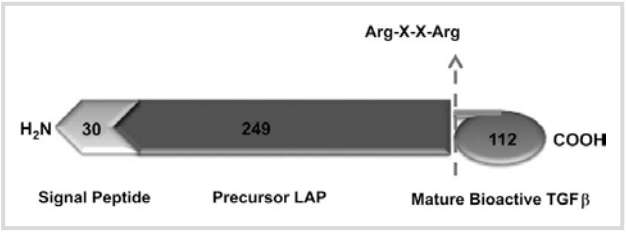


Figura 8. Estructura de la subfamilia de factores de crecimiento transformante-β (TGF-β). Extraída de (115).

Todas las isoformas de TGF-β de mamíferos comparten una gran similitud en su secuencia de aa, aunque existen pequeñas diferencias. Así, TGF-β1 muestra un 75% de similitud con TGF-β2 y, aproximadamente, un 80% con TGF-β3, mientras que TGF-β2 tiene un 80% de similitud con TGF-β3 (112).

Las tres isoformas de TGF-β están ampliamente distribuidas en tejidos embrionarios y de adultos. Prácticamente, cualquier tipo de célula de los tejidos epitelial, endotelial, hematopoyético, neuronal y conectivo puede producir TGF-β y expresar receptores específicos para esta proteína. TGF-β1 se expresa en células del tejido endotelial, hematopoyético y conectivo. TGF-β2 es mayoritariamente expresado en células epiteliales y neuronales, y TGF-β3 se expresa principalmente en células mesenquimales. Durante el desarrollo, TGF-β1 y TGF-β3 se expresan de forma precoz en estructuras que sufren morfogénesis, mientras que TGF-β2 se expresa, posteriormente, en el epitelio maduro y diferenciado (113).

La forma inactiva de TGF-β es procesada en el aparato de Golgi por endopeptidasas, dando lugar a la formación de un pequeño complejo latente (**Figura 9**).

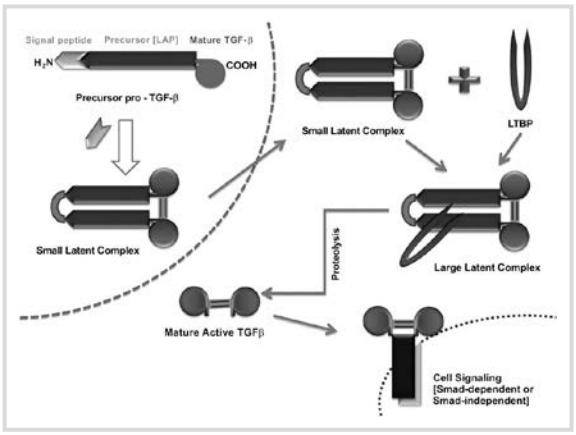


Figura 9. Representación esquemática del proceso de activación del factor de crecimiento transformante- β (TGF-β). Extraída de (115).

Este pequeño complejo latente contiene un homodímero maduro no covalente de TGF-β unido a dos LAP, y es secretado por la célula. En la matriz extracelular, este complejo se une a la proteína LTBP (proteína de unión a TGF-β latente), generando un complejo latente grande. Esta forma latente de TGF-β queda secuestrada a nivel de la matriz extracelular y requiere su posterior activación. La proteína activa de TGF-β puede ser liberada del complejo inactivo por hidrólisis proteolítica o por interacción física con la proteína trombospondina 1 o con las integrinas αvβ6 y αvβ8, entre otras (115). Finalmente, la forma activa de TGF-β tras su unión a receptores específicos de la superficie celular iniciará diversas respuestas celulares (113).

4.1.2. Receptores de TGF-β

Los receptores de la subfamilia de TGF-β son proteínas del tipo tirosina quinasa, de los cuales se han identificado dos receptores funcionales -TGFβRI (tipo I, 53-65 kDa) y TGFβRII (tipo II, 83-110 kDa)-, y 3 receptores no funcionales -TGFβRIII (250 a 310 kDa), TGFβRIV (60 kDa) y TGFβRV (400 kDa)- (114, 116). Concretamente, TGF-β1 y TGF-β2 se unen a los receptores TGFβRI y TGFβRII para ejercer sus funciones biológicas, las cuales son similares para ambos compuestos (112).

En ratas lactantes, se ha demostrado la presencia de receptores TGFβR1 y TGFβR2 en la membrana apical de enterocitos del intestino delgado; cuya expresión incrementa con la edad del animal (117, 118). Por otra parte, en ratones neonatos C57BL/6N se ha evidenciado que la máxima expresión de ambos receptores a nivel intestinal tiene lugar a los 14 días de vida, y tras el destete (21 días) su expresión permanece relativamente constante hasta los 60 días de edad (108).

4.1.3. Vías de señalización de TGF-β

El compuesto activo de TGF-β, tras su unión al receptor tetramérico, es capaz de iniciar múltiples vías de señalización celular (**Figura 9**). Inicialmente, TGF-β se une al homodímero de TGFβRII y, seguidamente, al homodímero de TGFβRI, dando como resultado la formación del receptor complejo tetramérico Para que TGF-β2 tenga una señalización óptima, requiere de un receptor adicional (TGFβRIII), el cual optimiza la unión inicial de TGF-β2 a TGFβRII (119).

Tras la formación del receptor complejo, TGFβRII tiene la capacidad de fosforilar el dominio citoplasmático de TGFβRI. La vía de señalización se inicia con la actividad quinasa de TGFβRI. La vía clásica de activación es la vía de señalización dependiente de Smad, si bien TGF-β puede activar otras vías de señalización independientes de Smad como son: la vía de señalización MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y la PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa), entre otras. La activación de una u otra vía de señalización depende específicamente del tipo celular y de los estímulos presentes en el entorno celular (**Figura 10**) (119, 120).

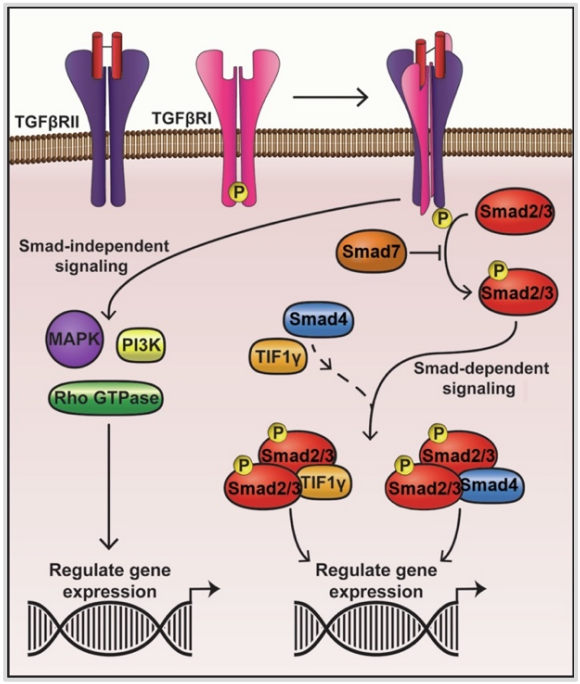


Figura 10. Principales vías de señalización del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) dependientes o independientes de Smad. Extraída de (121).

4.1.4. Funciones de TGF-β sobre el sistema inmunitario

TGF-β es un GF multifuncional y su función depende de diversos factores como son el tipo celular, su estado de diferenciación, las condiciones de crecimiento, así como, la presencia de otros GF (112, 122). Sin embargo, TGF-β se produce como un complejo inactivo que requiere ser activado para dar inicio a la cascada de señalización. Así, la activación de TGF-β es un paso previo imprescindible para su funcionalidad y, por tanto, es un factor determinante en su regulación (123).

Activación de TGF-β mediada por integrinas

Las funciones de TGF-β sobre el SI están cuidadosamente reguladas, no solo a nivel de producción de citocinas, sino también por la activación del complejo latente. En los últimos años, se ha descrito que las DC -las cuales producen esta citocina y responden a ella- están implicadas en la activación de TGF-β y, en consecuencia, participan en la homeostasis inmunitaria, particularmente del SI mucosal (121).

Una de las principales vías de activación de TGF-β está mediada por su unión a integrinas de tipo αv (**Figura 11**). Específicamente, las integrinas αvβ6 y αvβ8 son las principales implicadas en la activación de TGF-β *in vivo*. Así, la integrina αvβ6 se expresa en las células epiteliales, mientras que la integrina αvβ8 se expresa en DC; esta última tiene un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria (121). Además, en presencia de la forma activa de TGF-β y de otras citocinas, ambas integrinas participan en el control de la respuesta antiinflamatoria y proinflamatoria mediada por linfocitos T (123).

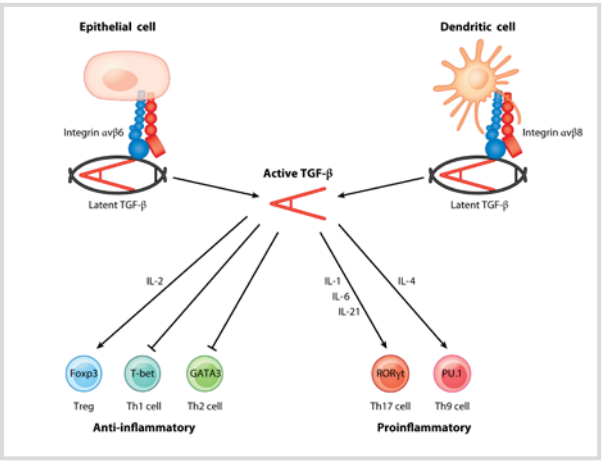


Figura 11. **Activación del complejo latente TGF-β mediado por las integrinas αvβ6 y αvβ8 presentes en células epiteliales y dendríticas, respectivamente.** Extraído de (119).

El miembro de la superfamilia de TGF-β más estudiado en el SI es el TGF-β1, el cual tiene un papel fundamental en el control de la homeostasis intestinal e inflamación. Más recientemente, se ha descrito que otros miembros de la superfamilia de TGF-β también participan en la regulación de la respuesta inmunitaria (120). Múltiples tipos de células inmunitarias expresan ligandos de la superfamilia de TGF-β y/o receptores, respondiendo a estos GF de forma autocrina, paracrina o endocrina. TGF-β ejerce efectos sobre el SI, tanto innato como adaptativo (119, 121).

4.1.4.1.TGF-β en el sistema inmunitario innato

A nivel de inmunidad innata, TGF-β1 es un potente factor quimiotáctico de monocitos, neutrófilos y mastocitos. También participa en la polarización funcional de macrófagos y neutrófilos de un fenotipo inflamatorio tipo I (con actividad fagocítica) a un fenotipo de tipo II (con gran capacidad para secretar citocinas como IL-6, IL-11 y TGF-β) (121).

4.1.4.2. TGF-β en el sistema inmunitario adaptativo

- ***TGF-β y linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$***

La mayoría de estudios de TGF-β se han centrado en linfocitos T, como efectores y reguladores de la respuesta inmunitaria adaptativa y de la tolerancia. TGF-β1 es un potente inhibidor de la proliferación de linfocitos T y afecta también la supervivencia celular (120). En ratones, se ha demostrado que el déficit selectivo de TGF-β o la incapacidad de inducir la señalización celular en linfocitos T, comporta el desarrollo de un síndrome autoinmunitario grave e incluso letal en estos animales. Este hecho pone de manifiesto la importancia de TGF-β en la regulación de la función de linfocitos T (124, 125).

Como se muestra en la **Figura 12**, TGF-β ejerce un papel central en la diferenciación de linfocitos T CD4$^+$ *naïve* a diferentes subpoblaciones efectoras y permite la plasticidad entre diferentes respuestas mediadas por linfocitos T CD4$^+$. Así, TGF-β1 promueve la diferenciación a Treg Foxp3$^+$ y a linfocitos Th17, dependiendo de la ausencia o presencia de citocinas proinflamatorias, respectivamente (126, 127). Además, esta citocina inhibe la diferenciación a las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2 (128, 129). Por otra parte, en presencia de IL-4, TGF-β1 promueve la diferenciación de linfocitos T CD4$^+$ a linfocitos Th9, los cuales ejercen una función de defensa frente a infecciones por helmintos y frente a tumores y respuestas alérgicas (130). Además, se ha observado que los linfocitos Th17 en fase de desarrollo, en presencia de IL-23, son capaces de producir TGF-β3 y transformarse en linfocitos patogénicos Th17 (120).

Además de la regulación sobre los linfocitos T CD4$^+$, TGF-β es capaz de regular la funcionalidad de los linfocitos T CD8$^+$. Así, en estudios *in vitro* se ha demostrado que TGF-β inhibe la proliferación de linfocitos T CD8$^+$ (131). Además, TGF-β ejerce un efecto supresor sobre la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8$^+$, mediante la inhibición de la expresión de perforina e IFN-γ, entre otros mecanismos (**Figura 12**). En este sentido, en un modelo murino se ha demostrado que la ausencia de TGFβRII en la superficie de los linfocitos T, comporta un aumento de su actividad citotóxica (132). Por tanto, TGF-β parece controlar *in vivo* la activación y expansión homeostática de los linfocitos T CD8$^+$. Por otra parte, la señalización de TGF-β en linfocitos T CD8$^+$ induce su apoptosis durante la infección bacteriana, evitando la sobreproliferación bacteriana (119).

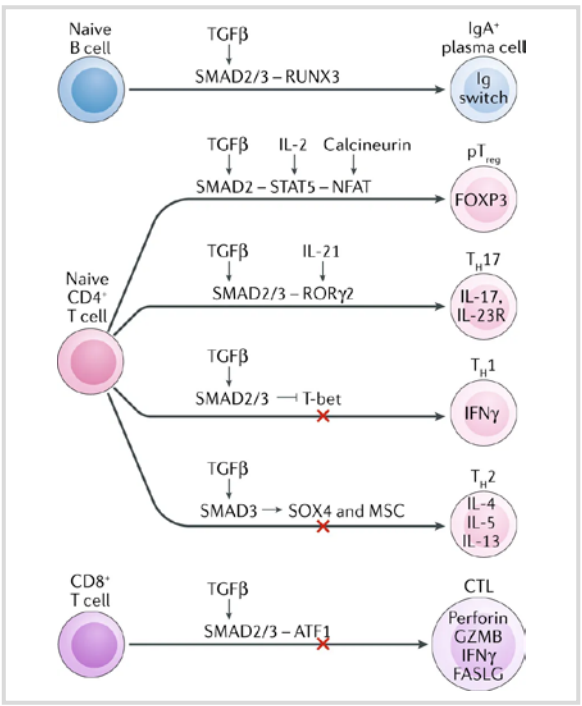


Figura 12. Función reguladora de TGF-β en linfocitos B y T implicados en la respuesta inmunitaria adaptativa. Destacar especialmente su función en la diferenciación de linfocitos T CD4$^+$ *naïve* a diferentes subpoblaciones de linfocitos T efectores y reguladores de la respuesta inmunitaria. Extraída de (133).

Globalmente, los efectos descritos de TGF-β sobre linfocitos T son dependientes de la presencia de otros factores secretados y de receptores de la superficie celular, dando lugar a una supresión o activación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Concretamente, la inhibición de la respuesta inmunitaria por TGF-β puede ser mediada a través de la inducción de linfocitos Treg y la supresión de linfocitos Th1, Th2 y T CD8$^+$. En cambio, cuando TGF-β induce la diferenciación de linfocitos TCD4$^+$

naive a linfocitos efectores Th17 o Th9 se activa la respuesta inmunitaria adaptativa (**Figura 12**).

- ***TGF-β y linfocitos B***

Además de regular la respuesta mediada por linfocitos T, los miembros de la superfamilia TGF-β también regulan el desarrollo y función de los linfocitos B, los cuales ejercen un papel crucial en la inmunidad adaptativa -mediante actividades dependientes o independientes de anticuerpo- (120).

Recientemente, se han descrito diferentes acciones de TGF-β sobre los linfocitos B, que van desde la influencia en su desarrollo en la médula ósea hasta su maduración y diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, e incluyen también su implicación en el proceso de tolerancia (120).

En estudios *in vitro* en ratón y humanos, se ha demostrado que la adición de TGF-β inhibe la proliferación de linfocitos B, previamente estimulados con mitógeno (134, 135). Además, TGF-β ejerce un potente efecto proapoptótico sobre los linfocitos B, tanto a nivel de sus precursores en la médula ósea como en linfocitos B periféricos maduros (120). Actualmente, y a pesar de los estudios realizados, no se dispone de información clara en relación a la interacción entre TGF-β y linfocitos B. Sin embargo, se ha sugerido que TGF-β podría regular la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos de forma indirecta, a través de la inducción de linfocitos Treg (120).

TGF-β regula la activación de linfocitos B mediante la inhibición de la síntesis de IgG y también del cambio de isotipo (IgM) a isotipos de clase IgG (136). Por el contrario, TGF-β promueve la producción de anticuerpos IgA por los linfocitos B, induciendo el cambio de isotipo de IgM a IgA a nivel de las mucosas (137, 138). Este cambio de isotipo a IgA, dependiente de TGF-β, se ha asociado a un incremento en la transcripción de ciertos elementos promotores (137) (**Figura 12**)**.** En ratones, se ha demostrado que la ausencia de señalización de TGF-β en linfocitos B comporta una marcada reducción de los niveles de IgA, tanto a nivel sistémico como mucosal (139). Además, la inhibición de la expresión de Smad2 en linfocitos B causa una reducción de la síntesis de IgA. Estos resultados reflejan la importancia de TGF-β y de Smad2 en la regulación de la producción de IgA (140).

4.1.4.3. TGF-β en la tolerancia oral

Un componente esencial de la barrera intestinal es la sIgA, producida por linfocitos B y secretada hacia la luz intestinal. La sIgA actúa neutralizando virus y bacterias patógenas (sIgA de alta-afinidad), mientras que restringe la penetración de bacterias comensales (sIgA de baja afinidad). En este sentido, la IgA contribuye al mantenimiento de la tolerancia mucosal (76). Como se ha mencionado

anteriormente, TGF-β tiene un papel crucial en la generación de linfocitos B productores de IgA en los tejidos y órganos inductores del GALT.

La producción de sIgA en el GALT tiene lugar a través de vías dependientes e independientes de linfocitos T, y el TGF-β participa en ambas vías. En el ambiente tolerogénico del intestino, el ácido retinoico secretado por las células epiteliales intestinales (IEC) promueve el desarrollo de células dendríticas que expresan la integrina αE o CD103, generando factores antiinflamatorios como el TGF-β, IL-10 y ácido retinoico (141). Estos factores promueven la generación de linfocitos Treg que a su vez producen las citocinas TGF-β e IL-10 (142). Además, los linfocitos Treg pueden adquirir un fenotipo distinto (Th foliculares Foxp3$^+$) que induce el cambio de isotipo a IgA en linfocitos B del GALT (143).

4.1.4.4. TGF-β en la homeostasis intestinal y microbiota

TGF-β participa en las interacciones que se establecen entre la microbiota y el GALT. A nivel intestinal, esta citocina regula la diferenciación de linfocitos T CD4$^+$ (a Treg y Th17), linfocitos B, fagocitos y IEC. Las IEC y los fagocitos, que reciben estímulos de la microbiota y diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4$^+$, son la fuente principal de TGF-β bioactivo (144). Estas interacciones son importantes en el desarrollo y mantenimiento de la barrera epitelial de la mucosa intestinal (145).

En el compartimento intestinal, se ha demostrado que TGF-β2 puede inhibir directamente la inflamación del epitelio intestinal en desarrollo (146). En este contexto, esta citocina disminuye la permeabilidad intestinal mediante el incremento en la expresión de proteínas de las *TJ* (147), las cuales promueven la correcta colonización del epitelio intestinal por bacterias específicas (148). En cerdo, se ha demostrado que TGF-β2, de forma sinérgica con lipopolisacáridos, estimula la reparación del epitelio intestinal, facilitando la homeostasis durante la colonización intestinal (149). Además, la inducción de los linfocitos Treg intestinales por TGF-β también contribuye, de forma indirecta, a la homeostasis intestinal (150).

Estudios recientes llevadas a cabo por Sitarik *et al.* han demostrado que la concentración de TGF-β en leche materna podría explicar, en parte, la variabilidad interindividual en la composición de la microbiota intestinal en niños lactantes, incrementando su riqueza y diversidad (151). En este sentido, se ha demostrado la influencia de TGF-β1 y TGF-β2, presentes en leche materna, en la composición de la microbiota intestinal del neonato. Se ha observado que TGF-β2 ejerce una mayor influencia en la microbiota que TGF-β1. Así, se ha demostrado que hay una asociación entre elevadas concentraciones de TGF-β2 en leche y un incremento en la abundancia relativa de determinadas bacterias, incluyendo miembros de las familias *Streptococcaceae* y *Ruminococcaceae;* y una disminución en miembros de *Staphylococcaceae*. Sin embargo, se desconoce si este efecto es debido únicamente a TGF-β o es el resultado conjunto con otros compuestos bioactivos (24).

4.1.5. TGF-β en leche materna

Como se ha comentado en apartados anteriores, el TGF-β es una potente citocina inmunosupresora presente en leche materna de diversas especies, cuya función es la de conferir protección y regular la respuesta inmunitaria en el recién nacido desde su nacimiento hasta el destete (152, 153). La leche humana contiene diversas isoformas de TGF-β, siendo TGF-β2 la más abundante y representando el 95% del total de esta proteína (154).

En humanos, TGF-β está presente principalmente en calostro y en menor concentración en leche madura (155). En ratones, se ha demostrado que la concentración de TGF-β1 incrementa durante los primeros 14 días de vida y disminuye posteriormente hasta el final de la lactancia (día 21). En esta especie, la concentración de TGF-β2 en leche es similar al inicio y al final de la lactancia (108).

En estudios realizados en leche de madres con partos prematuros, se ha demostrado que la concentración de TGF-β2 es significativamente superior a la presente en leche de madres con partos a término (73).

La presencia de elevadas concentraciones de TGF-β en leche materna representa un aporte exógeno -a través de la lactancia- de este factor bioactivo al lactante, en un momento en que éste no tiene la capacidad de producirlo en cantidades suficientes de forma endógena (155, 156).

Así, el TGF-β presente en leche materna puede ejercer diversas funciones en el intestino del lactante, como mantener la homeostasis inmunitaria a nivel intestinal, regular la inflamación (efecto antiinflamatorio), promover la producción y el cambio de isotipo a IgA, participar en la tolerancia oral e, incluso, influir en la composición de la microbiota intestinal del lactante (151, 157, 158).

4.2. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) fue descubierto por el grupo de investigación de Stanley Cohen en 1962, a partir de extractos de glándula submaxilar de ratón, y se demostró que aceleraba la erupción del diente incisivo y la apertura del párpado en animales neonatos. Esta sustancia novedosa se denominó EGF, ya que tenía la capacidad de estimular la proliferación de las células epiteliales (159).

4.2.1. Estructura y síntesis de EGF

EGF es un polipéptido de 6 kDa, compuesto por 53 aa que presenta una estructura tridimensional con seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro

intramoleculares, los cuales son fundamentales para su efecto y afinidad a sus receptores de membrana (160-163) (**Figura 13**).

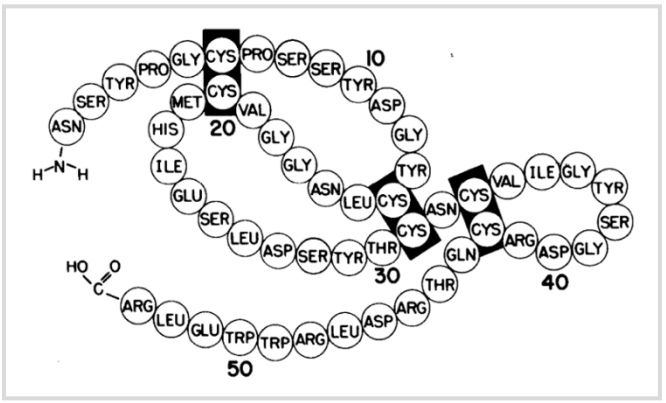


Figura 13. Estructura tridimensional del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Extraída de (161).

Al igual que sucede en otros GF, EGF se produce en forma de un compuesto precursor inactivo soluble (Pre-pro-EGF), el cual es activado por proteólisis y secretado al medio extracelular (86). El precursor inactivo está constituido por un total de 1207 y 1217 aa en humanos y ratones, respectivamente (**Figura 14**). Los primeros 20-29 aminoácidos constituyen el péptido señal, mientras que la parte activa (53 aa) se encuentra localizada entre una zona de 950 y 184 aa en humanos y 956 y 188 aa en ratones (164).

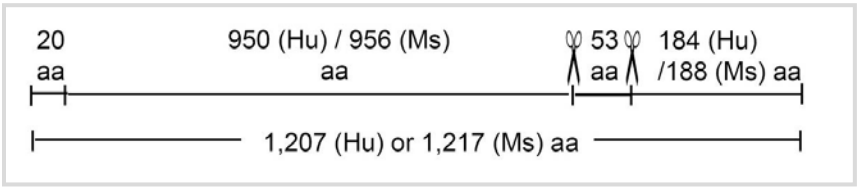


Figura 14. Secuencia de la proteína precursora del factor de crecimiento epidérmico (Prepro-EGF). Los sitios de corte para liberar EGF activo están marcados con iconos de tijera. Aminoácidos (aa), Humanos (Hu), Ratones (Ms). Extraída de (164).

Se ha detectado EGF en una gran variedad de fluidos y secreciones corporales -como son la leche, saliva, orina, plasma, fluido intestinal, o fluido amniótico, entre otros-, los cuales son producidos y secretados por las glándulas mamarias, glándulas submaxilares, riñones, glándulas de Brunner del duodeno y placenta, respectivamente (164). En ratones, las glándulas submaxilares son el principal tejido

de producción de EGF, mientras que, en humanos y ratas, la producción de EGF en glándulas salivares y su concentración en saliva es baja (164).

La presencia de EGF en los fluidos biológicos mencionados indica que se trata de un proceso de secreción exocrina (165). Además, EGF es un péptido ácido resistente al pH ácido del estómago y a la degradación por enzimas proteolíticos, por lo que llega intacto a la luz intestinal (166, 167).

4.2.2. Receptores de EGF

Este factor de crecimiento actúa sobre receptores específicos denominados EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (168), también conocidos como ErbB1 o HER1, que pertenecen a la gran familia EGFR/ErbB (164). EGFR es una proteína de 170 kDa con actividad tirosina quinasa que ha sido identificado mayoritariamente en la membrana basolateral de los enterocitos intestinales (168), aunque también se expresa en la superficie de membrana de otros tipos celulares (169).

Se ha observado que este receptor se encuentra expresado en el feto, donde EGF cumple un papel importante en la proliferación celular, morfogénesis y diferenciación de células epiteliales (170). En algunos estudios *in vivo*, con ratones, se ha observado que existe un incremento en la expresión de EGFR a nivel del epitelio intestinal durante los primeros 12 días de lactancia, disminuyendo posteriormente. En el momento del destete, su expresión es similar a la de ratones de 60 días de edad (108).

4.2.3. Vías de señalización de EGF

EGF ejerce distintas funciones biológicas a través de su unión a receptores específicos. Tras su unión al receptor, éste dimeriza, activa la actividad tirosina quinasa, inicia la autofosforilización y activa la cascada de señalización intracelular (171). EGF puede activar varias vías de señalización como son Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/Mtor and PLCγ/PKC (164). Las cascadas de señalización más conocidas son la MAPK y la PI3K (**Figura 15**).

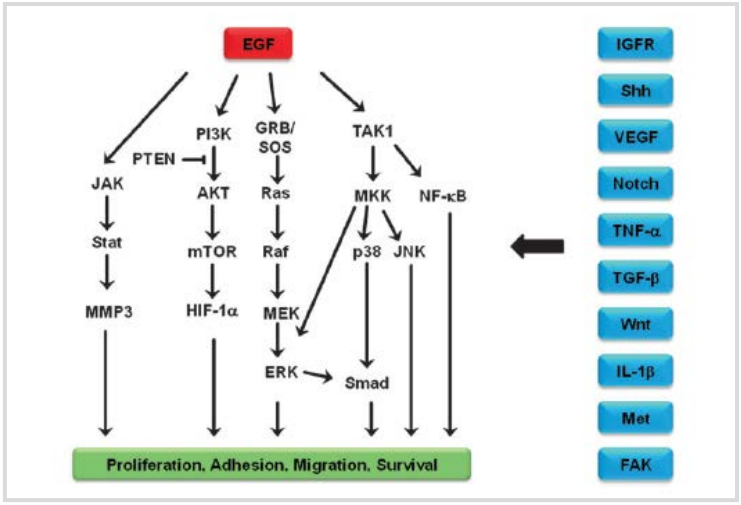


Figura 15. Principales vías de señalización de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Extraída de (172).

4.2.4. Funciones biológicas de EGF

EGF es el prototipo de una familia de factores de crecimiento que tienen un papel importante en la proliferación, diferenciación y migración de diversos tipos celulares, especialmente en células epiteliales (173, 174) (**Figura 16**). Así, EGF contribuye al desarrollo, mantenimiento y reparación del intestino delgado. Diversas investigaciones han demostrado su efecto sobre la proliferación de las células epiteliales de la mucosa intestinal, modulación del sistema inmunitario, disminución de la apoptosis, mejora de la absorción de nutrientes y de la función de barrera intestinal (167).

4.2.4.1. EGF y barrera intestinal

Se ha descrito que, en la etapa uterina, EGF ya es capaz de acelerar la maduración de la actividad de enzimas intestinales y de estimular el crecimiento intestinal (165). La importancia de EGF se ha demostrado por la observación que los ratones EGFR *knock-out* (EGFR KO) morían prematuramente o en el útero. Además, aquellos ratones que sobrevivían tenían un desarrollo anómalo de varios tejidos y padecían una enteritis hemorrágica grave similar a la enterocolitis necrotizante (NEC) en humanos (175).

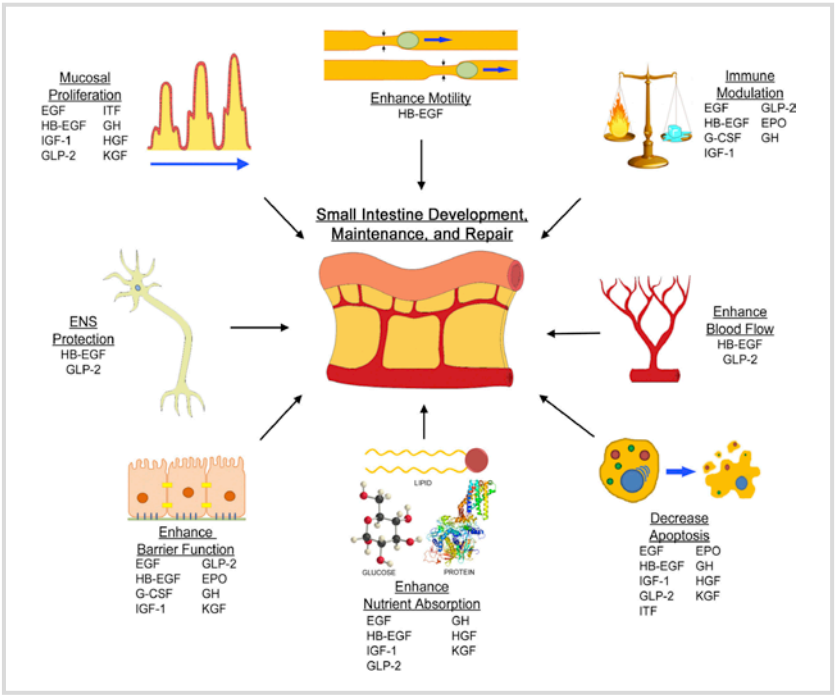


Figura 16. Efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el desarrollo, crecimiento y salud del tracto gastrointestinal. Extraído de (167).

Como se ha mencionado, EGF está presente en diversos fluidos (fluido amniótico, orina fetal, leche materna, bilis, y saliva), los cuales pueden entrar en contacto directo con el intestino en desarrollo. Se ha descrito que EGF ejerce una variedad de acciones a nivel intestinal. Concretamente es un factor trófico y citoprotector de los enterocitos e interviene activamente en la regulación intestinal. En este sentido, EGF mantiene la integridad de la barrera intestinal, lo cual es esencial para la absorción de nutrientes y el buen funcionamiento del organismo, tanto en humanos como en otras especies (160, 167).

En ensayos *in vivo* -con ratones- se ha demostrado que EGF tiene un papel importante en el desarrollo intestinal, ya que favorece el incremento de longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas. Además, promueve la proliferación de los enterocitos y estimula la secreción de enzimas digestivas como son tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, sucrasa, maltasa y lactasa; las cuales favorecen la absorción de nutrientes y el crecimiento de los animales (160).

Además, se ha demostrado que EGF -a través de las cascadas de señalización MAPK y PLC/PKC- regula la función de barrera y la expresión de proteínas de unión estrecha

(160), tal y como se muestra en la **Figura 17**. Además, EGF podría modular la expresión de F-actina y G-actina. Por otro lado, y a través de la vía PLC/PKC, EGF brinda protección frente a oxidantes; inhibiendo la activación del factor de transcripción NF-κB y estabilizando al factor IκBα. Así, EGF favorece la unión de F-actina y confiere protección a la función de barrera del enterocito (160).

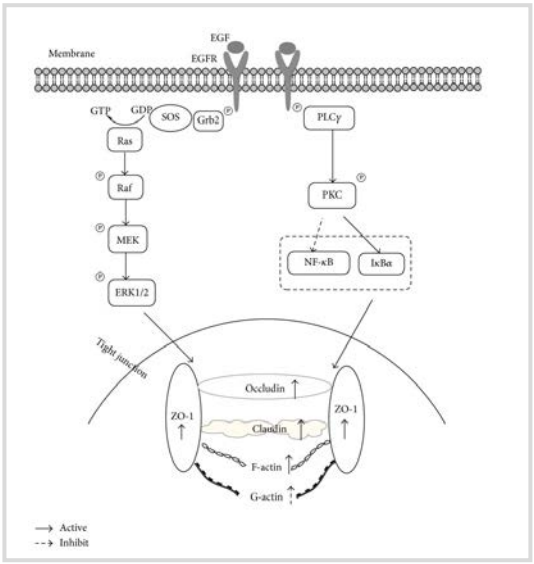


Figura 17. Regulación de la función de barrera intestinal por EGF: vías de señalización MAPK y PLC-γ/PKC implicadas. Extraída de (160).

Diversos estudios han mostrado que EGF también es capaz de controlar la homeostasis mucosal, favoreciendo la secreción de mucinas y evitando la colonización por patógenos (160). Muchas de estas acciones son importantes para la adaptación del neonato que pasa de un medio de nutrición intrauterino al extrauterino (162, 176), donde EGF puede tener un papel activo en el crecimiento y maduración de la mucosa intestinal del neonato (177).

4.2.4.2. EGF y enterocolitis necrotizante

Los neonatos prematuros tienen un intestino más inmaduro en comparación con el de bebés nacidos a término; esta mayor inmadurez podría contribuir al desarrollo de la NEC (168, 178). Además, los prematuros son tratados frecuentemente con antibióticos y, en algunos casos, alimentados con fórmulas infantiles que alteran aún más su microbiota intestinal; incrementando la translocación de bacterias patógenas (162, 176).

Si bien existe poca información en humanos, se ha descrito una cierta asociación entre EGF y NEC. Así, se ha demostrado una menor concentración de EGF en saliva

de bebés prematuros con NEC, en comparación con bebés prematuros que no habían desarrollado esta enfermedad. Además, se ha observado una correlación positiva entre bajos niveles de EGF y mayor grado de prematuridad. Por ello, se considera que el contenido de EGF en estos fluidos podría ser un marcador predictivo de NEC (135). En este sentido, la suplementación con EGF en la alimentación de los recién nacidos prematuros podría ser una estrategia efectiva en la prevención de NEC (167).

Además, se considera que la alimentación del recién nacido con fórmulas infantiles incrementa el riesgo de padecer NEC, y en cambio la alimentación con leche materna reduce la incidencia de NEC (179). La leche materna y, especialmente el calostro son la principal fuente de EGF posnatal; y su concentración es inversamente proporcional a la edad gestacional del neonato. Las fórmulas infantiles no contienen EGF, lo cual podría explicar por qué no se recomienda la alimentación de bebés prematuros con fórmulas infantiles (179, 180).

- ***Efecto de EGF en la barrera intestinal (NEC)***

En la **Figura 18**, se muestran -de forma gráfica- algunas de las alteraciones intestinales que se producen en un modelo experimental de rata con NEC (181). Concretamente, la inducción de NEC provoca un incremento de la permeabilidad intestinal paracelular, en comparación al grupo control. Además, se observan cambios en la morfología de las células goblet, en la producción de mucinas y en la composición de proteínas de la unión estrecha (181).

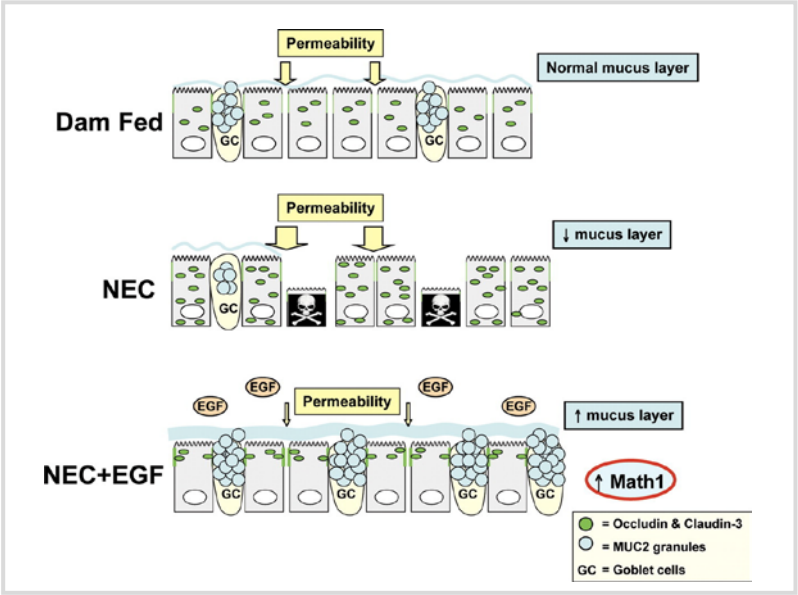


Figura 18. Alteraciones de la barrera intestinal en la enterocolitis necrotizante (NEC) experimental y beneficios de la suplementación con EGF. Extraída de (181).

En este modelo experimental, la suplementación con EGF disminuye la permeabilidad intestinal paracelular, incrementa la densidad de células goblet, incrementa la producción de mucina y normaliza la expresión de algunas de las proteínas principales de la unión estrecha (ocludina y claudina-3) en intestino delgado (181).

- ***Efecto de EGF en la respuesta inflamatoria (NEC)***

En la NEC existe un desequilibrio entre la respuesta proinflamatoria activa y una protección inadecuada antiinflamatoria (182). Concretamente, en un modelo experimental de NEC -inducida en rata- se ha observado una elevada expresión de citocinas proinflamatorias (IL-18 e IL-12), las cuales se asocian directamente con la gravedad de la lesión (182).

Además, se ha observado que los bebés con NEC tienen altos niveles de respuesta proinflamatoria con altos niveles del factor activador de plaquetas, TNF-α, IL-18 y óxido nítrico (NO) (182). La administración enteral de EGF ha demostrado que favorece a una disminución de la citocina IL-18 (proinflamatoria) e incremento de la citocina IL-10 (antiinflamatoria) durante NEC experimental (183).

- ***Efecto de EGF en la apoptosis de enterocitos (NEC)***

Se cree que la apoptosis empieza a ocurrir en la etapa fulminante de la enfermedad y que es influenciada por EGF. En un modelo de ratas con NEC se ha observado que la apoptosis de enterocitos es mediada por el regulador de apoptosis BAX. Así, un aumento en la expresión de Bax pro-apoptótico y una expresión reducida de Bcl-2 anti-apoptótico crea un entorno que favorece la apoptosis. En este sentido, Clark et. al. 2005, han demostrado que la suplementación con EGF a ratas con NEC experimental, disminuía el regulador BAX e incrementaba los niveles del marcador anti-apoptótico Bcl-2, disminuyendo de esta manera la apoptosis (184). Así, parece ser que el tratamiento con EGF podría favorecer el equilibrio de genes pro y anti-apoptopicos, favoreciendo la supervivencia celular (184).

4.2.4.3. EGF y sistema inmunitario

No existen investigaciones actuales que evalúen los efectos de EGF sobre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Únicamente se dispone de un artículo publicado por Carpenter y Wahl en 1990, los cuales recopilaron diversos estudios *in vitro* -realizados en células y órganos diversos- y las respuestas fisiológicas tras la adición de EGF exógeno (185). A nivel de sistema inmunitario, se demostró en diferentes estudios que EGF promueve la capacidad quimiotáctica y fagocítica de macrófagos, incrementa la respuesta proliferativa de linfocitos T y la secreción de

IFN-γ . Asimismo, EGF ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad inmunosupresora de linfocitos T (185).

4.2.5. EGF en leche materna

EGF es uno de los factores de crecimiento más abundantes en leche humana. Su concentración en calostro puede llegar a ser más de 500 veces superior a la de otros GF (160). EGF está presente en elevadas concentraciones en el calostro humano (200 mg/L) y su concentración decrece durante el período de lactancia (30–50 mg/L, en leche madura). También se ha demostrado la presencia de EGF en leche de muchas otras especies pero en cantidades menores (186). Además, se ha observado que EGF en leche tiene una concentración inversamente proporcional a la edad gestacional del recién nacido, es decir, cuanto más prematuro es el lactante, más EGF está presente en la leche materna (179).

El factor de crecimiento EGF -presente en leche- es un compuesto bioactivo clave en el desarrollo del intestino del lactante y en la prevención de la NEC, especialmente en los primeros días de vida (179). A pesar de ello, el papel de EGF sobre el sistema inmunitario está poco estudiado; además el EGF está ausente en las fórmulas infantiles destinadas a lactantes (167).

4.3. FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21 (FGF21)

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), pertenece a la súperfamilia de citocinas que agrupa numerosas funciones biológicas como son: el crecimiento y diferenciación celular, la angiogénesis, el desarrollo embrionario, la cicatrización tisular, así como, la regulación metabólica (187-191). En humanos, se han descrito 22 formas de FGF, las cuales han sido divididas en 7 subfamilias de acuerdo a su estructura y su mecanismo de acción (190-192). Específicamente FGF21, así como FGF19 y FGF23, pertenece a la subfamilia endocrina hFGF que se caracterizan por actuar de forma endocrina y regular el metabolismo energético en diferentes órganos (192, 193).

El FGF21 fue inicialmente identificado en embriones de ratones y clonado por primera vez por el grupo de Nishimura en el año 2000. Sin embargo, su efecto como regulador metabólico ha sido identificado en el año 2005 (194). Más tarde, otros estudios han demostrado que la expresión de FGF21 se incrementa bajo diferentes situaciones de estrés, como el medioambiente, ayuno, obesidad y estrés oxidativo. En este sentido, parece ser que FGF21 es un regulador importante para la adaptación del cuerpo en respuesta a estresores (195).

FGF21 fue categorizado como un factor de crecimiento de fibroblastos debido a su estructura, ya que contiene un dominio común y comparte más de un 30% de secuencia con otros FGF (196).

4.3.1. Estructura y síntesis de FGF21

FGF21 es una proteína formada por 209 aa con un peso molecular de aproximadamente 22,3 kDa (190). FGF21 está formado por un núcleo estructural de 120 aa, un dominio de 14 aa en la región C-terminal que es de vital importancia para la interacción con el coreceptor β-klotho (KLB) y para la activación de FGF21 (197) (**Figura 19**).



Figura 19. Estructura del factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21). SP (señal peptídica N-terminal), FGFR (sitio de unión al receptor), KL (sitio de unión al correceptor). Extraída de (190).

FGF21 es una hormona que se expresa predominantemente en hígado. Sin embargo, bajo condiciones de estrés como son la malnutrición, exposición al frío y ejercicio, otros tipos de tejido como el tejido adiposo blanco y marrón, músculo y páncreas también lo pueden secretar (196).

4.3.2. Receptores de FGF21

Se han identificado 5 tipos diferentes de receptores para FGF, denominados FGFR (FGFR1-5), FGF21 tiene la capacidad de ejercer sus funciones sobre los receptores FGFR 1-4 (193, 198). Estos receptores son glicoproteínas de la superficie celular con un tamaño de 55 a 150 kDa (190).

Varios estudios han determinado que FGF21 necesita del coreceptor KLB para activar los receptores FGFR1, FGFR3 y FGFR4; además, se conoce que la mayoría de las acciones de FGF21 son mediadas a través de los receptores FGFR1 y FGFR3 (190).

KLB es un coreceptor transmembrana de FGF21, que ha sido encontrado en el hígado y tejido adiposo pero no en el músculo esquelético (192). La unión de KLB con FGF21 se realiza en la región C-terminal de FGF21 (198).

Por otro lado, un estudio cuantificó la expresión de los diferentes FGFR en muestras de intestino delgado durante el periodo posnatal en ratones y observó que la

expresión incrementaba desde el nacimiento al día 14 de vida. Tras este periodo, observaron que la expresión de los receptores empezaban a disminuir hasta los 18 días y que no existían cambios en el período de destete entre los 21 y 60 días (108).

4.3.3. Vías de señalización de FGF21

El mecanismo de señalización de FGF21 es complejo, y como se ha mencionado anteriormente requiere de la unión de FGF21 a su coreceptor KLB y a su receptor FGFR (**Figura 20**). Al unirse, forma un complejo receptor estable KLB/FGFR que activa la vía de señalización (192, 198). Tras la unión, FGFR dimeriza y se autofosforila en los residuos del receptor tirosina para formar un complejo con Grb2/Sos, que es capaz de activar ERK y Akt a través de las vías de señalización MAPK y PI3K (198).

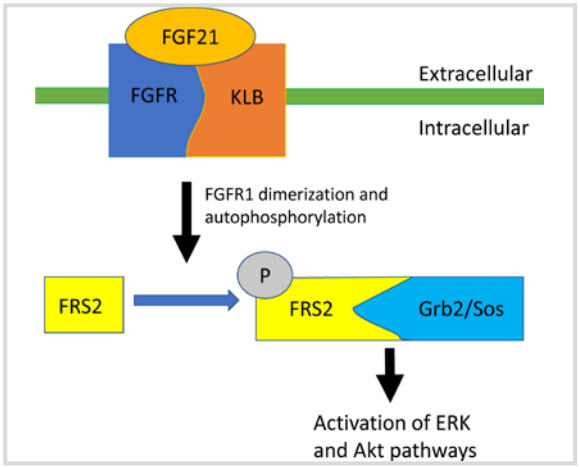


Figura 20. Mecanismo de acción de FGF21. ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), Sos (*Son of Sevenless*). Extraída de (193).

4.3.4. Funciones de FGF21

La acción de FGF21 no es restrictiva a un solo tejido, ya que no participa en un proceso fisiológico único, sino que por el contrario su expresión desencadena varias acciones fisiológicas (**Figura 21**). De hecho, en la última década se ha evaluado la acción de FGF21 en diversas funciones fisiológicas, por lo que algunos estudios sugieren su potencial terapéutico en el manejo de enfermedades crónicas como son la diabetes, obesidad o artritis entre otros (196).

4.3.4.1. FGF21 y metabolismo de la glucosa

Ensayos en animales han demostrado que FGF21 disminuye los niveles de glucosa en sangre en animales diabéticos y previene el deterioro del control glucémico en ratones deficientes de insulina (**Figura 21**). Además, se han descrito diversas vías bioquímicas por medio de las cuales FGF21 puede regular la glicemia: 1) a través de la captación de glucosa en diversos tipos de células grasas, 2) reduciendo los ácidos grasos libres y la lipotoxicidad en tejidos, 3) regulando el flujo de glucosa hepático, 4) disminuyendo el glucagón y, 5) modulando la glucosa y secreción de insulina. Es por ello que estas observaciones han aumentado el interés médico de este polipéptido como tratamiento para diabetes (188, 196).

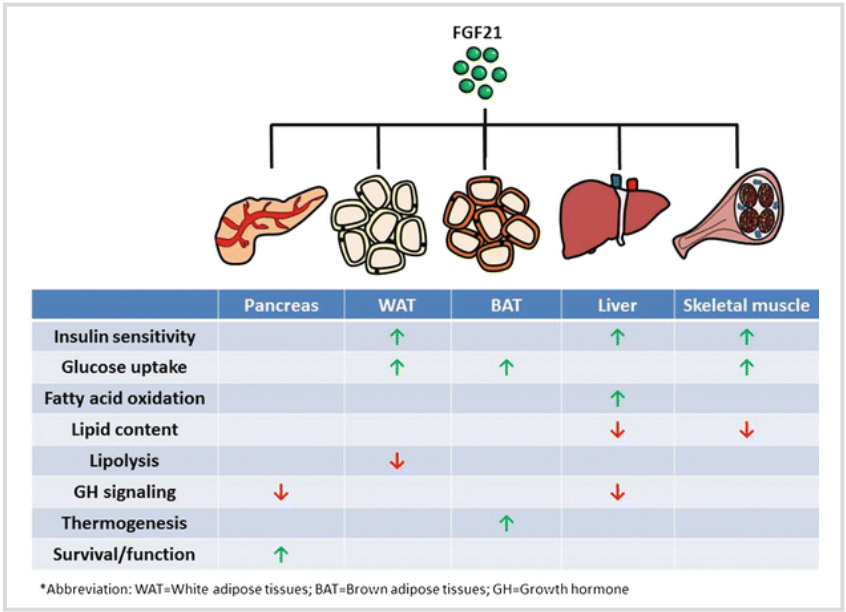


Figura 21. Principales órganos diana de FGF21 y sus funciones. Extraída de (194).

4.3.4.2. FGF21 y lipolisis

El ayuno suele acompañarse de una elevada movilización y liberación de ácidos grasos libres (FFA) a circulación, debido a que se acelera la lipólisis en los depósitos de grasa. En estudios preclínicos en ratón, estos cambios coinciden con un incremento de FGF21 en el hígado y a nivel sistémico. Así, FGF21 parece ser un factor regulador en el proceso de ayuno, induciendo la lipolisis y favoreciendo la comunicación entre el hígado y el tejido adiposo (196).

4.3.4.3. FGF21 y función intestinal

En ratones neonatos se ha demostrado que la suplementación oral con FGF21 induce la expresión de ciertas hormonas intestinales, como el péptido similar al glucagón (GLP1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP) y enzimas digestivas como son la lactasa, sucrasa, isomerasa y maltasa glucomilasa. Estos resultados han revelado nuevas funciones de FGF21 como un factor hormonal que contribuye a la función neonatal intestinal a través de su presencia en la leche materna (109).

4.3.4.4. FGF21 en enfermedad inflamatoria crónica

En estudios con ratones se ha demostrado que el tratamiento con FGF21 es efectivo aliviando la inflamación por lipopolisacáridos (LPS), se ha demostrado que reprime la producción de la citocina inflamatoria IL-1β a través de potenciar la expresión de la citocina IL-10 (199). Por otro lado, se ha demostrado en ratones con artritis inducida por colágeno, que el tratamiento con FGF21 mejora la gravedad de la artritis a través de la reducción de la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular, disminuyendo la expresión de proteínas proinflamatorias como son TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-γ y MMP-3 (200).

En la **Figura 22** se presentan los posibles mecanismos de acción de FGF21 mediante los cuales modula la gravedad de las enfermedades inflamatorias crónicas. FGF21 tiene la capacidad de regular la expresión de las citocinas proinflamatorias a través de la modulación de NF-κB y IκBα, mientras que también promueve una acción antiinflamatoria directa regulando STAT3 y IL-10 (199).

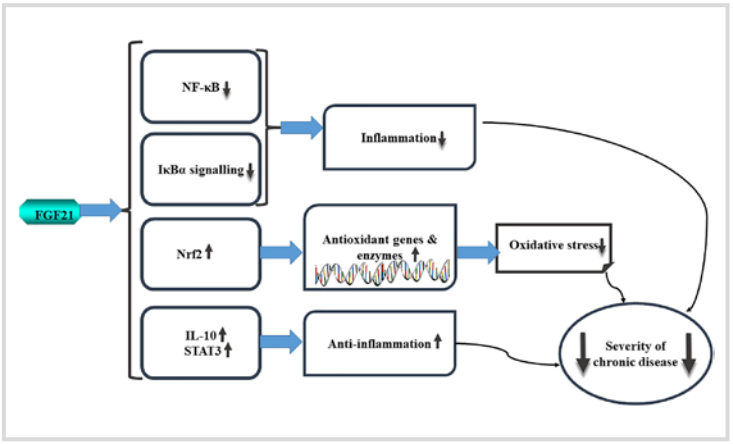


Figura 22. Relación entre FGF21 y enfermedades crónicas. Extraída de (196).

Por un lado, se ha demostrado que el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) es mediador de las principales funciones antiinflamatorias de

IL-10 (201) y, por otro lado, el tratamiento de ratones diabéticos con FGF21 ha demostrado un incremento de la fosforilación de STAT3 (202). Así, STAT3 parece estar favoreciendo las respuestas antiinflamatorias inducidas por el tratamiento con FGF21 (199).En humanos, investigaciones recientes han demostrado que pacientes con artritis reumatoide tienen elevados niveles de FGF21 en circulación, por lo que parece ser que FGF21 podría regular y proteger de la inflamación (203).

4.3.5. FGF21 en leche materna

En el 2015, el grupo de investigación de Gavaldà-Navarro cuantificó por primera vez la concentración de FGF21 en leche de humanos y roedores (109). Observaron que el FGF21, presente en la leche, no contribuye a los niveles sistémicos de FGF21 y que era mayormente retenido en el estómago e intestino de ratones neonatos (109). Así, propusieron que FGF21 actuaba localmente en el intestino de ratones neonatos, regulando la expresión y actividad de enzimas digestivas y hormonas como GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1) y GIP1 (péptido inhibidor de la glucosa 1) (109).

Otro estudio observó una asociación entre el incremento de la expresión de FGF21 al nacer y la inducción del tejido adiposo marrón conocido como BAT (*Brown adipocyte tissue*), sugiriendo que FGF21 podría tener una función importante en las adaptaciones metabólicas del neonato al medio extrauterino (204).

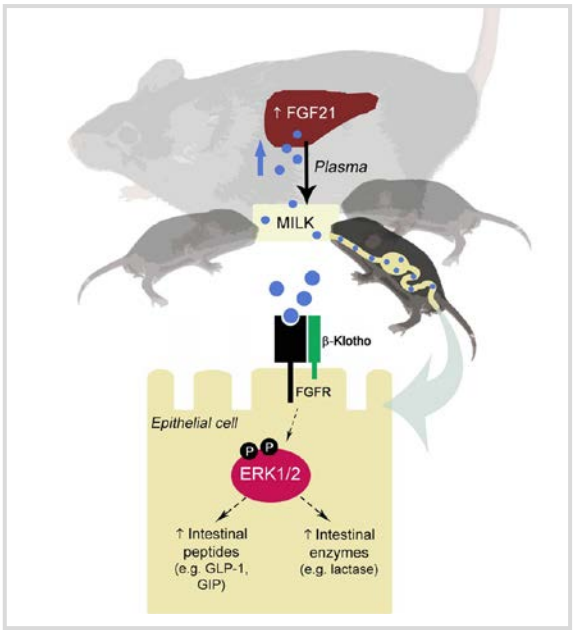


Figura 23. Mecanismo de transferencia de FGF21 desde la leche materna al intestino del neonato. Extraída de (109).

De la misma manera que para otros GF, FGF21 también puede ser transferido desde la leche materna al intestino neonatal (**Figura 23**). Así, en roedores, el porcentaje de FGF21 en la sangre de la madre, tras su paso a la glándula mamaria y a la leche, parece ser la principal fuente del neonato. En el intestino del ratón recién nacido, FGF21 se acopla con sus receptores KLB-FGFR presentes en las células epiteliales y promueve la producción de péptidos y de enzimas digestivas (109).

Tras estos estudios en los que se plantea a FGF21 como uno de los factores endocrinos presentes en leche materna capaz de contribuir a la maduración del sistema gastrointestinal neonatal, al menos en roedores, se abre una nueva línea de investigación en este sentido (109).

5. PREMATURIDAD Y LECHE MATERNA

La OMS estima que la prematuridad afecta a 15 millones de neonatos cada año. Se consideran prematuros aquellos bebés nacidos vivos antes de haber cumplido las 37 semanas de gestación. Los neonatos nacidos a pretérmino se clasifican en base a su edad gestacional en: extremadamente prematuros (EPT, <28 semanas), muy prematuros (VPT, 28 a <32 semanas) y prematuros moderados (PT, 32 a <37 semanas) (205, 206).

5.1. SISTEMA INMUNITARIO DEL NEONATO PREMATURO

Los niños prematuros tienen un SI más inmaduro que los nacidos a término (24). En general, los prematuros presentan mayores deficiencias en su SI innato y adaptativo, así como también en la interacción entre ambos sistemas (27).

La **inmunidad innata** en prematuros tiene menor capacidad para responder adecuadamente frente a infecciones, en relación a los neonatos nacidos a término. Ello se atribuye a deficiencias en determinadas proteínas y péptidos solubles y en la respuesta celular frente a las infecciones (24). Estas proteínas y péptidos antimicrobianos son secretados por los leucocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos), y su producción se correlaciona positivamente con la edad gestacional (27).

Todas las vías del sistema del complemento (clásica, alternativa y la vía de las lectinas) en neonatos prematuros tiene una menor capacidad para destruir patógenos (207). En este sentido, los neonatos prematuros exhiben una menor producción de las proteínas C1 y C4 (vía clásica), factor B (vía alternativa) y de la proteína de unión a la manosa (vía de las lectinas) (208, 209).

En relación a la fagocitosis, los prematuros tienen una concentración reducida de neutrófilos y monocitos, así como de sus precursores, que afecta la capacidad del neonato para combatir infecciones (210). Ello se atribuye a una presencia menor de factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF, GM-CSF) (211). Por otro lado, los neutrófilos de neonatos prematuros tienen menor capacidad de migración hacia los focos de infección, debido a la baja expresión de moléculas de adhesión, como son la L- y E-selectina (212). Por otra parte, los monocitos de prematuros, a pesar de tener una menor capacidad de producir

citocinas, presentan una eficiencia en la fagocitosis y destrucción de patógenos intracelulares similar a la de los neonatos nacidos a término (213).

Respecto a las APC de prematuros -en comparación con los nacidos a término, éstas presentan una menor expresión de las moléculas del MHC- II y, por tanto, tienen una menor capacidad para activar los linfocitos T implicados en la respuesta inmunitaria adaptativa (214).

El **SI adaptativo** de los neonatos prematuros -además de presentar una activación deficiente de los linfocitos T- tiene una menor capacidad para secretar citocinas por parte de linfocitos Th (fundamentalmente de tipo Th2) y para producir Ig por parte de linfocitos B (24, 206). Por otro lado, la transferencia pasiva de IgG materna al feto (la cual se produce a partir de las 32 semanas de gestación) se encuentra disminuida en los neonatos prematuros, existiendo una relación directa entre los niveles de IgG circulantes y su edad gestacional (215) (216).

El **sistema intestinal** en neonatos prematuros es más inmaduro, en comparación con los nacidos a término (**Figura 24**). En relación a la barrera intestinal, la prematuridad comporta una alteración en las *TJ* del epitelio intestinal y, en consecuencia, una mayor permeabilidad intestinal. Además, la capa de moco y la capacidad de regeneración celular también se encuentran reducidas. Ésta marcada inmadurez en la función de la barrera del epitelio intestinal, conjuntamente con la reducida funcionalidad del GALT, son responsables de su elevado riesgo de padecer inflamación y lesión intestinal (217).

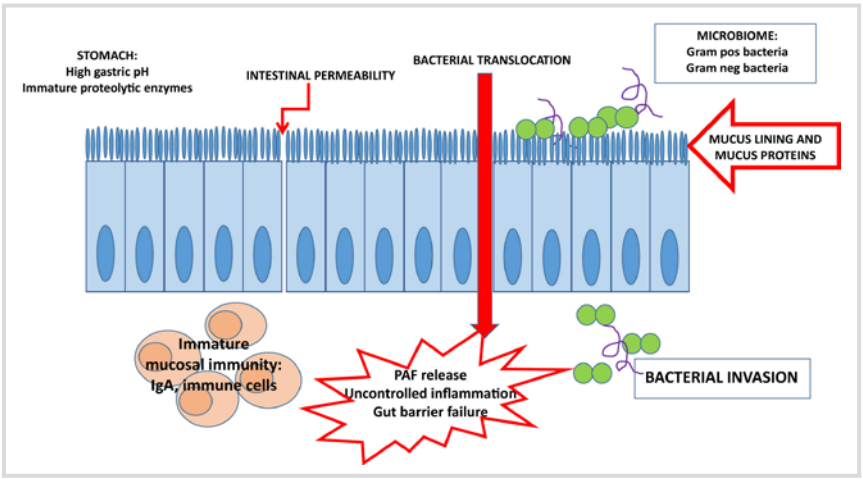


Figura 24. Alteraciones y consecuencias de la inmadurez de la barrera intestinal y del GALT en neonatos prematuros. Extraída de (218).

La composición de la **microbiota intestinal** de los neonatos prematuros difiere de la de los nacidos a término. Los neonatos prematuros presentan un mayor contenido

de bacterias del género *Enterococcaceae* y *Lactobacillus* y una menor proporción de *Streptococcus, Staphylococcus, Bifidobacterium* y *Bacteroidetes*, en comparación con los nacidos a término por parto vaginal (219). Además, los prematuros presentan un elevado contenido de bacterias consideradas patógenas, lo cual se atribuye a su estancia hospitalaria, exposición a antibióticos, ausencia de lactancia materna y alteración en la motilidad intestinal, entre otros factores. Durante el período de hospitalización de los prematuros en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (NICU), a causa de la inmadurez de su SI intestinal en conjunción con el tratamiento con antibióticos, hay un elevado riesgo de padecer infecciones nosocomiales o la colonización intestinal por parte de bacterias como *Clostridium difficile (220)*.

5.2. COMPLICACIONES DE LA PREMATURIDAD

La enterocolitis necrotizante (NEC) es la emergencia gastrointestinal más común en recién nacidos prematuros (221). Actualmente, la NEC sigue siendo la principal causa de mortalidad en neonatos prematuros, especialmente en aquellos con un peso al nacer inferior a 1500 g y en los nacidos antes de las 36 semanas de gestación (222).

La NEC afecta principalmente a nivel intestinal, concretamente las lesiones se localizan en el íleon terminal, el ciego y el colon ascendente, y en estas regiones se observa hemorragia y necrosis inflamatoria (181, 223). Los principales factores de riesgo de padecer la NEC son la prematuridad, la alimentación enteral, la colonización bacteriana y la hipoxia intestinal (224). La razón por la cual afecta más a recién nacidos prematuros no está del todo definida, si bien podría atribuirse a la inmadurez de la barrera mucosal, a la elevada permeabilidad intestinal y a la alteración de la respuesta inmunitaria intestinal (222).

Las manifestaciones clínicas de la NEC incluyen la distensión abdominal, eritema de la pared abdominal, la presencia de sangre en heces, gangrena intestinal y perforación, sepsis y shock (225).

5.3. BENEFICIOS DE LA LACTANCIA MATERNA EN LA PREMATURIDAD

Es bien conocido que la alimentación de neonatos prematuros con fórmula infantil está asociada con el desarrollo de complicaciones graves como la NEC (226), mientras que la lactancia materna le brinda un efecto protector (226). Por este motivo, una estrategia clave para prevenir la NEC es la alimentación con leche humana de la propia madre o procedente de Bancos de leche (leche de donantes sanas) (68). Sin embargo, debido a complicaciones asociadas con el nacimiento prematuro -como son la inmadurez de la glándula mamaria y factores sociodemográficos, entre otros- muchas madres de prematuros no pueden ofrecer leche humana a sus hijos (68).

Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de los componentes bioactivos de leche humana materna sufre variaciones durante el período de lactancia. También se ha demostrado que la prematuridad y concretamente la edad gestacional del neonato influye en el contenido de algunos componentes bioactivos presentes en la leche materna, lo cual constituye un proceso adaptativo favorable para el neonato prematuro (73).

A continuación, en la **Tabla 4** se incluyen los factores bioactivos -con efectos beneficiosos sobre el SI del lactante- cuya concentración se modifica en la leche de madres con parto prematuro, en comparación con la de madres con parto a término.

Tabla 4. Variaciones asociadas a la prematuridad de componentes bioactivos de leche humana con efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario. Adaptado de (67).

Componentes bioactivos		Leche humana VPT *vs.* T	Leche humana PT *vs.* T
Proteínas	Lactoferrina	VPT < T	PT = T
	Lisozima	VPT > T	
	Lactadherina	VPT < T	
	Defensina-α		PT > T
Componentes celulares	Macrófagos	VPT > T (calostro)	PT = T
	Neutrófilos		PT > T
Inmunoglobulinas	sIgA	VPT > T	PT > T
Citocinas	IL-2		PT > T (calostro)
	IL-6		PT< T
	IL-8	VPT < T	PT = T
	IL-10	VPT > T	
	TNF-α	VPT < T	PT = T
Quimiocinas y otros factores solubles	CXCR-1		PT > T
	sCD14		PT > T
	TNF-RI	VPT < T	
	G-CSF		PT< T
	MCP-1		PT < T (leche madura)
Factores de crecimiento	TGF-β	VPT > T	PT > T
	EGF	VPT > T	PT > T
Oligosacáridos	HMO		PT > T
	GM3		PT< T
	GD3		PT > T
Otros factores inmunes	LC-PUFA		PT > T
	Nucleótidos (AMP y hipoxano)		PT < T

VPT: muy prematuro (28 a >32 semanas), PT: prematuro moderado tardío (32 a <37 semanas), T: neonatos a término: 40 semanas de gestación, sIgA: Inmunoglobulina A secretora, IL: interleucina, TNF: factor de necrosis tumoral, CXCR: receptor de quimiocina, sCD14: CD14 soluble, TNF-RI: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1, TGF: Factor de crecimiento transformante, EGF: Factor de crecimiento epidérmico, HMO: oligosacáridos presentes en leche materna, LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, AMP: adenosín monofosfato.

Los componentes bioactivos de la leche humana brindan al neonato prematuro múltiples factores de protección frente a la NEC (**Figura 25**).

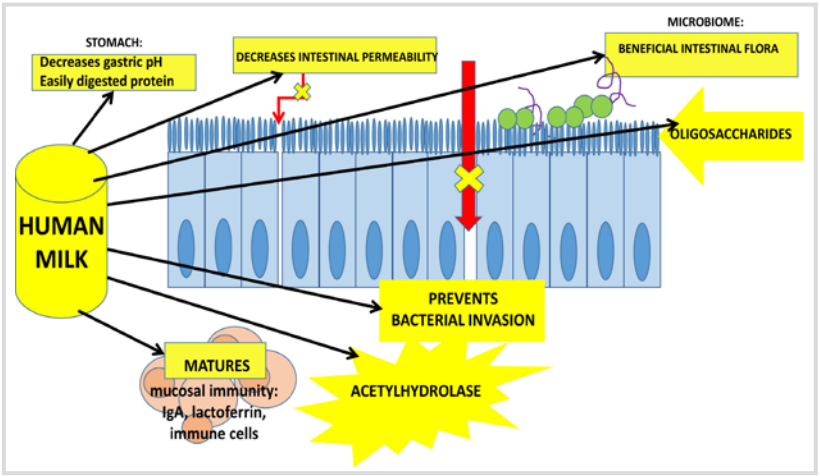


Figura 25. Beneficios de la lactancia materna en neonatos prematuros y prevención de la enterocolitis necrotizante (NEC). Extraída de (218).

Concretamente, la leche de madres de prematuros presenta elevadas concentraciones de componentes bioactivos con acción antiinfecciosa, inmunomoduladora y antiinflamatoria; así como factores que promueven el desarrollo y colonización bacteriana del intestino (227-230). Así, la alimentación con leche humana revierte varias de las afectaciones que padecen los neonatos prematuros, mejorando la motilidad intestinal, favoreciendo el cambio de la microbiota intestinal a favor de especies bacterianas no patogénicas y disminuyendo la permeabilidad intestinal (221, 231).



OBJETIVOS

El sistema inmunitario inicia su desarrollo durante la gestación y continúa durante la etapa postnatal, de forma que el neonato nace con un sistema inmunitario que no es completamente funcional. Debido a esta inmadurez en su capacidad defensiva, los neonatos presentan una respuesta limitada frente a patógenos y, por tanto, un mayor riesgo de padecer procesos infecciosos. En este sentido, los recién nacidos prematuros tiene una inmadurez más pronunciada y un desarrollo más lento tanto del sistema inmunitario, así como de la función de barrera intestinal que es la encargada de impedir el paso de agentes externos. En cualquier caso, la maduración progresiva del sistema inmunitario neonatal permite que, pasados ciertos años de vida, su capacidad de respuesta se vaya asemejando a la del adulto.

En este periodo postnatal, durante el cual el sistema inmunitario está en fase de desarrollo, es cuando el aporte de ciertos componentes de la leche materna ejerce un papel clave. Así, la leche materna no sólo presenta componentes nutricionales, sino que provee al lactante de una amplia variedad de factores bioactivos con propiedades inmunomoduladoras.

Entre estos factores, se encuentran citocinas promotoras de tolerancia -como el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2)-, factores de crecimiento -como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), u otros factores reguladores de diversos procesos metabólicos del neonato -como el recientemente hallado en leche materna, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). Sin embargo, a pesar de que estos factores presentan múltiples funciones descritas en el adulto, se dispone de poca información en edades tempranas.

En base a estos antecedentes, la ***hipótesis*** que se plantea en la presente tesis es que **factores bioactivos de leche materna, como TGF-β2, EGF y FGF21, pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo del sistema inmunitario neonatal.**

En base a esta hipótesis, el ***objetivo general*** de la tesis ha consistido en:

Establecer el impacto de una suplementación dietética con TGF-β2, EGF y FGF21, en la maduración de la barrera intestinal, del sistema inmunitario intestinal y del sistema inmunitario sistémico en ratas lactantes nacidas a término y pretérmino.

Para lograr este objetivo general, se han propuesto los siguientes ***objetivos específicos***:

1. **Evaluar el efecto inmunomodulador de la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 en ratas lactantes nacidas a término.**

   - Establecer el impacto de la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 en la **función de barrera epitelial** y el **sistema inmunitario intestinal**.

     Los resultados obtenidos de este objetivo forman parte de las siguientes publicaciones:

     - **Artículo 1**: TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats. *Nutrients,* 2018; 10: E1171.

     - **Artículo 2**: Effect of TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation on the suckling rat intestinal maturation (manuscrito que será enviado a la revista *Cells*).

   - Determinar la influencia de la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el **sistema inmunitario sistémico**.

     Los resultados obtenidos de este objetivo constituyen la siguiente publicación:

     - **Artículo 3**: Modulation of the systemic immune response in suckling rats by breast milk TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation. *British Journal of Nutrition* (en revision).

2. **Evaluar el efecto inmunomodulador de la suplementación con EGF en ratas lactantes nacidas a pretérmino.**

   - Establecer la influencia de la suplementación con EGF en la **función de barrera intestinal** y el **sistema inmunitario intestinal** y **sistémico.**

     Los resultados obtenidos de este objetivo han dado lugar a la publicación:

     - **Artículo 4:** Leptin and EGF supplementation enhance the immune system maturation in preterm suckling rats. *Nutrients*, 2019; 11: E2380.



RESULTADOS

ARTÍCULO 1

"TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats"

Paulina Torres-Castro, Mar Abril-Gil, María J. Rodríguez-Lagunas, Margarida Castell, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch

Nutrients **(2018) 10 (9): 1171**

(doi: 10.3390/nu10091171)

Índex d'impacte (2018): 4,171
Categoria: 16/86 (Q1) en *NUTRITION & DIETETICS*

Los resultados del presente artículo han estado presentados en las siguientes comunicaciones:

- *Growth factors supplementation influences the intestinal lymphocyte functionality in suckling rats.* Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Abril-Gil, M; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. 10th Anniversary International Symposium on Immunonutrition (Madrid), julio 2017. Publicación: *Ann Nutr Metab,* 2017; 71: 31–79 (doi: 10.1159/000478672).

- *The supplementation of TGF-β2, EGF or FGF21 in suckling rats influences mesenteric lymph node cell composition.* Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Abril-Gil, M; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. XI Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), Noviembre 2017.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la influencia de determinados factores de crecimiento presentes en la leche materna -como el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), sobre el desarrollo de la respuesta inmunitaria intestinal inductora.

Material y métodos: Las ratas Wistar se suplementaron diariamente con TGF-β2, EGF o FGF21, durante todo el período de lactancia. Los días 14 y 21 de vida, los linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) se aislaron, se determinó su fenotipo celular, así como su funcionalidad linfocitaria -capacidad de proliferar y secretar citocinas frente a una estimulación con mitógeno-.

Resultados: La suplementación con TGF-β2, EGF o FGF21 modificó la composición de linfocitos en GLM. Concretamente, a día 14, todos los suplementos administrados disminuyeron el porcentaje de linfocitos *natural killer* (NK) con fenotipo inmaduro ($CD8^+$), y redujeron la relación CD8αα/CD8αβ a día 21. Además, el patrón de citocinas fue modificado por los tres suplementos nutricionales, siendo la secreción de interleucina (IL)-13 inferior a la del grupo referencia.

Conclusión: La suplementación diaria con estos factores de crecimiento, durante el período de lactancia, favorecen la maduración de los linfocitos de GLM durante el periodo neonatal.

nutrients

MDPI

Article

TGF-β2, EGF, and FGF21 Growth Factors Present in Breast Milk Promote Mesenteric Lymph Node Lymphocytes Maturation in Suckling Rats

Paulina Torres-Castro [1,2], Mar Abril-Gil [1,2], María J. Rodríguez-Lagunas [1,2], Margarida Castell [1,2], Francisco J. Pérez-Cano [1,2,*] and Àngels Franch [1,2]

1 Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mtorreca29@alumnes.ub.edu (P.T.-C.); mariadelmar.abril@ub.edu (M.A.-G.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); angelsfranch@ub.edu (À.F.)

2 Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

* Correspondence: franciscoperez@ub.edu; Tel.: +34-934-024-505

Received: 6 August 2018; Accepted: 24 August 2018; Published: 27 August 2018

check for updates

Abstract: Breast milk, due to its large number of nutrients and bioactive factors, contributes to optimal development and immune maturation in early life. In this study, we aimed to assess the influence of some growth factors present in breast milk, such as transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor 21 (FGF21), on the immune response development. Newborn Wistar rats were supplemented daily with TGF-β2, EGF, or FGF21, throughout the suckling period. At day 14 and 21 of life, lymphocytes from mesenteric lymph nodes (MLNs) were isolated, immunophenotyped, and cultured to evaluate their ability to proliferate and release cytokines. The main results demonstrated that supplementation with TGF-β2, EGF, or FGF21 modified the lymphocyte composition in MLNs. At day 14, all supplementations were able to induce a lower percentage of natural killer (NK) cells with the immature phenotype ($CD8^+$), and they reduced the CD8αα/CD8αβ ratio at day 21. Moreover, the cytokine pattern was modified by the three treatments, with a down regulation of interleukin (IL)-13 secretion. These results showed the contribution of these growth factors in the lymphocytes MLNs immune maturation during the neonatal period.

Keywords: growth factors; breast milk; immunonutrition; cytokines; lymphocytes

1. Introduction

At time of birth, the intestine is immature, not only anatomically, but also metabolically and immunologically [1–3]. Intestinal development is a key process in early life because it includes important functions related to growth and survival. It is important to develop mechanisms to digest and absorb nutrients in an efficient way [4]. Moreover, the intestine begins hosting the gut microbiota and establishing appropriate host immune responses against pathogens [2]. The intestinal maturation process can be conditioned through synergy of several factors, such as genetics, microbial colonization, and nutrition [1–3].

Breast milk is the gold standard to feed the newborn because it includes a rich number of components, which are essential for optimal growth and development [5]. It also contains a high number of bioactive factors, which participate in the immune maturation process of infants [2,6]. Among these components, immunoglobulins (Igs), cytokines, and growth factors (GFs) have an important role [7–9]. In this sense, the effects of several GFs present in maternal milk that promote

intestinal maturation have been described, although their impact on immune development is still unclear [9].

On the one hand, the transforming growth factor-β (TGF-β) family members have multifunctional actions involved in maintaining intestinal homeostasis, regulating inflammation, and allergy development [10–12]. TGF-βs act on different types of leukocytes, to control the initiation and resolution of immune responses through the recruitment, activation, and survival of cells [12,13]. TGF-β2 is the predominant isoform present in human and rat breast milk; it reaches the neonatal intestine where, at birth, endogenous production is low and increases towards weaning [3,10,12]. In infants, breast milk TGF-βs play an important role in developing immune response and promoting oral tolerance development [12].

On the other hand, one of the most abundant GFs in breast milk is the epidermal growth factor (EGF), the concentration of which is 500 times more than other GFs present in breast milk [14]. Its concentration is very high in colostrum and it decreases significantly during suckling, both in human and rodent milk, suggesting that EGF plays a role in the promotion of early neonatal intestinal growth [2,15]. In fact, EGF is a key intestinal regulator in protecting intestinal barrier integrity, essential for the absorption of nutrients and the exclusion of pathogens, in both humans and animals [14,16,17]. EGF is a polyfacetic molecule, which acts by regulating different processes, such as cell growth, survival, migration, apoptosis, proliferation, and differentiation. In early life, milk EGF seems to be one of the crucial components involved in the prevention of necrotizing enterocolitis (NEC) [1,14].

EGF and TGF-β together with the immunosuppressive interleukin (IL)-10, also present in breast milk, are involved in the functional development of the gastrointestinal mucosa, tolerance acquisition, and inflammation downregulation in damaged intestinal cells [6,7].

In recent years, new components present in breast milk have been discovered. This is the case of the fibroblast growth factor 21 (FGF21), which belongs to the hormone-like subgroup within the FGF superfamily, and has been found in rodent and human milk [16]. The FGF21 present in milk, seems to be involved in local actions in the neonatal intestine. It is a highly active pleiotropic factor, involved in multiple aspects of metabolism through a variety of mechanisms, where it regulates both the expression and activity of digestive enzymes, and the synthesis and release of several intestinal hormone factors [16,18]. All these effects make FGF21 a good candidate to be studied, due to its possible contribution to neonatal intestinal function.

Overall, because TGF-β2, EGF, and FGF21 are biologically active factors found in breast milk and are suggested to be involved in neonatal intestine maturation; our hypothesis is that they could also have an important role in the immune development process in early life. Therefore, the main objective of the current study was to ascertain whether the effect of a daily supplementation with these compounds could promote immune response development, during the suckling period in rats. The effects of the supplementations on mesenteric lymph nodes (MLNs), an inductor site of the gut associated lymphoid tissue (GALT), were studied specifically during and at the end of the suckling period, in terms of lymphocyte phenotypic composition and on the immune functionality, such as their lymphoproliferative and cytokine production abilities.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Pregnant Wistar rats (G15) were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), and were individually housed in cages under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 h light:dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The pregnant rats were monitored daily and allowed to deliver naturally. The day after birth was reported as day 1. The studies were performed in accordance with institutional guidelines, for the care and use of laboratory animals, and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) at the University of Barcelona (UB) and Catalonia Government (CEEA-UB Ref. 220/15, UB/DAAM 8521).

2.2. Dietary Supplementation

The suckling pups were unified in litters of nine pups per mother and were randomized into four groups, formed by three litters each (n = 27 pups/group). This sample size was required for each group, as previous studies have demonstrated the remarkable role of variability among litters [19]. The Appraising Project Office's program, from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante) was used for such estimation, to detect statistically significant differences among groups, assuming there was no dropout rate and a type I error of 0.05 (two-sided).

Besides the reference group (REF group), three supplemented groups based on nutritional intervention were created: the transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF), and the fibroblast growth factor 21 (FGF21). All animals were identified daily, weighed, and supplemented by oral gavage with a volume of 10 mL/kg/day during the suckling period, from day 1 to day 21 of age. The suckling pups were separated from their mothers 30 min before oral administration, to allow gastric emptying. All daily handling was done at the same period of the day, to avoid modifications in biological rhythms. All actions were performed as described in previous studies in the group, References [19,20].

TGF-β2, EGF, and FGF21 groups were supplemented with recombinant human TGF-β2, recombinant rat EGF, and recombinant human FGF21 (all from Peprotech®, Rocky Hill, NJ, USA). The products were reconstituted according to the manufacturer's recommendations.

The dose of TGF-β2 was 35 µg/kg/day, which was based on the amount of TGF-β2 found in the last lactation rat milk (62 ng/mL), and the milk intake by pups within 4−14 days of age [3]. The dose of EGF was 100 µg/kg/day, which had been demonstrated to be effective as a treatment in a rat model of NEC [21]. Finally, the dose of FGF21 was 5 µg/kg/day, an amount that was established in relation to TGF-β2, which has been found in a 1:10 ratio FGF21:TGF-β2 [10,16]. The REF group received a matched volume of the vehicle used for the GFs administration (1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffer saline (PBS)).

2.3. Measurement of Growth and Development

Body weight was registered daily throughout the study. Two end points were established, at day 14 and at the end of the suckling period at day 21. At these times, prior to sacrifice, the pups were anesthetized with intramuscular ketamine (90 mg/kg; Imalgene®, Merial, Barcelona, Spain) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Barcelona, Spain); and body length (nose-anal) was measured. These data allowed the calculation of morphologic variables, such as the body mass index (BMI, g/cm^2) and Lee index, for assessing obesity in rats (($g^{1/3}$/cm) × 1000).

2.4. Sample Collection and Processing

Once anesthetized, MLNs and small intestine (SI) were obtained through a ventral laparotomy. The SI was weighed, measured, and divided into three equal length portions. Gut washes (GWs) were obtained from the distal SI. Briefly, the intestine was flushed with cold PBS and cut into 5 mm pieces. The tissue was incubated with PBS (10 min, 37 °C, shaking), centrifuged (538 g, 10 min, 4 °C), and later, supernatant was collected and stored at −20 °C until Igs quantification.

2.5. Quantification of Intestinal IgA and IgM by ELISA

The IgA and IgM content were quantified in GWs from day 21 of study, by ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, MD, USA), as previously described in Reference [19]. GWs were diluted at 1:20 (IgA) and 1:10 (IgM). Data were expressed as µg/g of tissue.

2.6. Lymphocyte Isolation from Mesenteric Lymph Nodes

The MLNs were placed in complete culture medium, containing Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA), 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% penicillin streptomicin (PenStrep; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 0.05 mM 2-β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany). MLNs lymphocytes were obtained in sterile conditions by passing the tissue through a cell strainer (40 µm, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The cell suspensions were centrifuged (538 g, 10 min, 4 °C), and the pellet was resuspended with complete RPMI medium. The cell counts and viabilities were determined using an automated cell counter, after staining the cells with trypan blue (Countess™, Invitrogen, Madrid, Spain), following usual laboratory procedures, as described in Reference [22]. The lymphocytes were immediately used to characterize their phenotype, and to determine their ability to proliferate and secrete cytokines.

2.7. Mesenteric Lymph Node Cells Stimulation and Proliferation Assay

MLNs cell activation was performed in sterile conditions, using 96-well tissue culture plates (TPP®, Trasadingen, Switzerland), which were pre-incubated with 200 µL/well of monoclonal antibodies (mAbs) anti-CD3 (10 µg/mL, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and anti-CD28 (2 µg/mL, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) (2 h, 37 °C, 5% CO_2). Then, MLNs lymphocyte suspensions (5×10^4 cells/mL) were added to each well. A total of eight wells were used for each sample: four pre-incubated with the mitogenic mAbs (stimulated cells, SC) and four without pre-incubation (non-stimulated cells, NSC). The plates were incubated for 48 h, at 37 °C and 5% CO_2. Four hours before the end time of the incubation, 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU, 20 µL/well, Merck, Darmstadt, Germany) was added to measure its incorporation as an indicator of DNA synthesis in a colorimetric immunoassay.

The plates were centrifuged (210 g, 5 min) and supernatants were collected and stored at −80 °C, until cytokine analysis. After fixation, the anti-BrdU mAbs and peroxidase conjugated anti-BrdU mAbs and 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine (TMB) were added, following the manufacturer's recommendations of the BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Merck, Darmstadt, Germany). The absorbance (Abs) was measured at 450 nm (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finland). Data were expressed as a proliferation rate as follows: Proliferation rate = (A/B), where, A = ((Abs-SC − Abs-NSC)/Abs-NSC) $_{\text{supplemented group}}$, and B = ((Abs-SC − Abs-NSC)/Abs-NSC) $_{\text{reference group}}$.

2.8. Quantification of Cytokine Secretion by Mesenteric Lymph Node Lymphocytes

Supernatants collected after the cell stimulation process described above, were used for the quantification of IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A, interferon (IFN)-γ, and tumor necrosis factor (TNF)-α concentration using a ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay, according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA, USA) and as previously described in Reference [19]. Each analyte's concentration was detected using the MAGPIX instrument (Luminex Corp., Austin, TX, USA), in the facilities of the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB), and the results were analyzed using xPONENT® 4.2 software (Luminex Corp., Austin, TX, USA). The limits of detection were as follows: 2.10–8600 pg/mL for IL-2; 0.85–3500 pg/mL for IL-4; 14–55,700 pg/mL for IL-10; 3.17–13,000 pg/mL for IL-13; 2.61–2675 pg/mL for IL-17A; 4.35−17,800 pg/mL for IFN-γ; and 3.08−12,600 pg/mL for TNF-α.

2.9. Immunofluorescence Staining and Flow Cytometry Analysis

Lymphocytes from MLNs (5×10^4 cells) were immunophenotyped by multiple immunofluorescence staining technique. Mouse anti-rat mAbs conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-a protein (PerCP), allophycocyanin (APC) or APC-cyanine(Cy)7 were used, as in previous studies [19]. For cell subset differentiation, five different mAbs panels were used; Panel 1: TCRαβ/NKR-P1A/CD8α; Panel 2: CD8α/CD8β/TCRγδ; Panel 3: αE integrin/CD62L/CD8α/CD4; Panel 4: CD45RA/TLR4/CD8α/CD4/CD25; and Panel 5: CD25/CD4/Foxp3. With the first panel, NK cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^-$), natural killer T (NKT) cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^+$), and TCRαβ$^+$ cells (TCRαβ$^+$ NKR-P1A$^-$) could be differentiated, which

in combination with the TCRγδ$^+$ cells (obtained from Panel 2) constituted the total of T cells. B cells (CD45RA$^+$) were identified with Panel 4. The mAbs used in this study are detailed in the Supplementary Materials (Table S1).

Briefly, cells were incubated with a mixture of 10 µL of saturating concentrations of each mouse anti-rat mAbs in PBS pH 7.2, containing 2% FBS and 0.1% sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), at 4 °C in darkness for 20 min. For T reg evaluation, an intracellular staining was performed. For that, cells previously labeled with anti-CD4-PE and anti-CD25-FITC mAbs, were fixed/permeabilized using a specific buffer kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). Then, intracellular staining with anti-Foxp3-APC mAb was carried out, under the same conditions as extracellular staining. After washing, all stained cells were fixed with 0.5% paraformaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) and stored at 4 °C in darkness, until analysis by flow cytometry. For each sample, a positive control staining using each isotype matched mAbs and a negative control without staining were included. Analyses were performed in a Gallios™ Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in the CCiT-UB. Data were assessed by FlowJo® version 10 software (Tree Star Inc., Ashland, Covington, KY, USA). Results were expressed as percentages of positive cells in the lymphocyte population, selected according to their forward- and side-scatter characteristics (FSC/SSC) using previous studies protocols [19], or in a selected population. The gating strategy was specific for each panel used, but overall, markers (e.g., CD8α in Panel 1, αE integrin, and CD62L in Panel 3) were evaluated in specific gate subsets (e.g., NK, NKT, or T cells in Panel 1, and CD8 or CD4 cells in Panel 3).

2.10. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the IBM Social Sciences Software Program (SPSS, version 22.0, Chicago, IL, USA). Levene's and Shapiro–Wilk tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. When the results demonstrated equality of variance and normal distribution, a one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed. Nonparametric tests were carried out when normal distribution and equality of variance did not exist. Specifically, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were used to assess significance for independent samples. Significant differences were established at $p < 0.05$. Data in the text, tables, and figures are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M).

3. Results

3.1. Animal Growth

Body growth was assessed in the three groups receiving supplementation (TGF-β2, EGF, and FGF21), and compared with those receiving the vehicle (REF). Body weight increased during suckling period in the REF group ($p < 0.05$) and the supplementations did not affect this growth pattern (Supplementary Materials, Figure S1). With respect to morphometric variables and SI growth, there were no differences among the studied groups at any age considered (Table 1).

Table 1. Morphometric variables and small intestinal growth.

		BMI	Lee Index	SI Relative Weight	SI Relative Length
		(g/cm^2)	($\sqrt[3]{}$g/cm) × 1000)	(%)	(%)
Day 14	REF	0.365 ± 0.009	332.9 ± 3.473	3.51 ± 0.05	118.29 ± 5.49
	TGF-β2	0.373 ± 0.010	336.9 ± 3.844	3.59 ± 0.14	114.34 ± 4.28
	EGF	0.340 ± 0.007	327.0 ± 2.845	3.48 ± 0.06	122.64 ± 2.91
	FGF21	0.371 ± 0.009	337.4 ± 4.044	3.18 ± 0.06	105.59 ± 5.31
Day 21	REF	0.404 ± 0.010 $^{\Psi}$	319.5 ± 2.551 $^{\Psi}$	4.15 ± 0.24 $^{\Psi}$	89.57 ± 3.12 $^{\Psi}$
	TGF-β2	0.404 ± 0.009 $^{\Psi}$	320.8 ± 3.225 $^{\Psi}$	4.25 ± 0.09 $^{\Psi}$	85.65 ± 2.20 $^{\Psi}$
	EGF	0.404 ± 0.007 $^{\Psi}$	322.9 ± 2.574	4.38 ± 0.07 $^{\Psi}$	88.34 ± 2.20 $^{\Psi}$
	FGF21	0.420 ± 0.011 $^{\Psi}$	329.0 ± 4.053	4.78 ± 0.17 $^{\Psi}$	89.97 ± 4.01 $^{\Psi}$

BMI: body mass index. SI: small intestine. TGF-β2: transforming growth factor-β2. EGF: epidermal growth factor. FGF21: fibroblast growth factor 21. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M) ($n = 9$). $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. day 14 at same group.

All groups increased BMI, SI relative weight, and SI relative length with age ($p < 0.05$, day 21 vs. day 14). Regarding the Lee index, only the animals from the REF group and those supplemented with TGF-β2, showed significant differences associated with age ($p < 0.05$), but the supplementation with EGF and FGF21 did not display such a significant age difference.

3.2. IgA and IgM Concentration in Gut Wash

Intestinal secretory IgA and IgM were determined at day 21 of life. At that age, the pups' intestinal levels were not entirely influenced by maternal breast milk, as happens earlier in life when breast milk (very rich in IgA) is the only source of food. Nevertheless, none of the interventions (TGF-β2, EGF, and FGF21 supplemented groups) showed significant differences regarding IgA or IgM, compared to the REF group (Supplementary Materials, Figure S2).

3.3. Mesenteric Lymph Node Lymphocytes Composition

The proportion of the main lymphocyte subsets in MLN was established during (day 14) and at the end of (day 21) suckling period. On both days, most of the MLN cells (~75%) were T cells, the majority of them being TCRαβ$^+$ cells and only ~3% TCRγδ$^+$ cells; B cells counted for about 15–18%, NK and NKT cells represented subpopulations with less than 3% of total lymphocytes, and Treg cells were ~4% (Table 2).

Table 2. Main lymphocyte subsets in mesenteric lymph nodes.

		Reference	TGF-β2	EGF	FGF21
Day 14	T cells (%)	75.90 ± 1.80	77.90 ± 1.39	74.36 ± 1.88	79.60 ± 1.50
	T TCRαβ$^+$ (%)	72.90 ± 1.98	75.24 ± 1.29	71.22 ± 1.94	75.90 ± 1.20
	T TCRγδ$^+$ (%)	3.00 ± 0.20	2.66 ± 0.20	3.14 ± 0.23	3.70 ± 0.40
	NK (%)	1.63 ± 0.30	1.22 ± 0.08	1.35 ± 0.12	1.42 ± 0.17
	NKT (%)	1.15 ± 0.14	1.18 ± 0.20	0.94 ± 0.05	0.98 ± 0.06
	B cells (%)	17.65 ± 1.65	16.19 ± 1.40	19.62 ± 1.23	15.86 ± 1.07
Day 21	T cells (%)	74.60 ± 1.36	75.86 ± 1.10	75.29 ± 1.20	76.41 ± 0.69
	T TCRαβ$^+$ (%)	71.57 ± 1.44	73.28 ± 1.14	72.93 ± 1.26	73.10 ± 0.77
	T TCRγδ$^+$ (%)	3.07 ± 0.15	2.58 ± 0.15	2.36 ± 0.13 $^{*,\Psi}$	3.31 ± 0.13
	NK (%)	0.95 ± 0.07 $^{\Psi}$	0.79 ± 0.06 $^{\Psi}$	0.77 ± 0.08 $^{\Psi}$	1.05 ± 0.07
	NKT (%)	1.57 ± 0.07 $^{\Psi}$	1.55 ± 0.11	1.39 ± 0.21	1.63 ± 0.18 $^{\Psi}$
	B cells (%)	14.67 ± 0.71	14.30 ± 0.64	12.95 ± 1.19 $^{\Psi}$	13.23 ± 0.62

Results are expressed as mean ± S.E.M ($n = 9$). * $p < 0.05$ vs. reference (REF) group at same age; $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. day 14 at same group.

Although at 14 days there were no differences among the supplemented groups, some differences could be seen at 21 days (Table 2). At the end of the suckling period, only the EGF supplementation showed a significant decrease in the percentage of TCRγδ$^+$ cells, compared to the REF group ($p < 0.05$). Moreover, the REF and groups supplemented with TGF-β2 and EGF decreased the NK cell proportion, in comparison to the same group at 14 days ($p < 0.05$). The animals from the REF and FGF21 groups increased the percentage of NKT cells with age, and only those from the EGF group were able to decrease the proportion of TCRγδ$^+$ and B cell percentages at day 21 ($p < 0.05$ vs. day 14).

The percentage of CD8$^+$ cells and the CD8αα/CD8αβ ratio from MLNs lymphocytes, were determined as indicators of immune maturation (Figure 1). The proportion of CD8$^+$ cells did not show significant differences, either associated with age (day 14 vs. day 21) or to any of the supplementations, compared to the REF group (Figure 1a). However, regarding the results from CD8αα/CD8αβ ratio, the EGF supplementation induced a significant increase at 14 days ($p < 0.05$ vs. REF, Figure 1b). At day 21, in all supplemented groups, the CD8αα/CD8αβ ratio had decreased when they were compared to their respective group at day 14, but no differences among the interventions and the REF groups were found (Figure 1b).

Nutrients **2018**, *10*, 1171

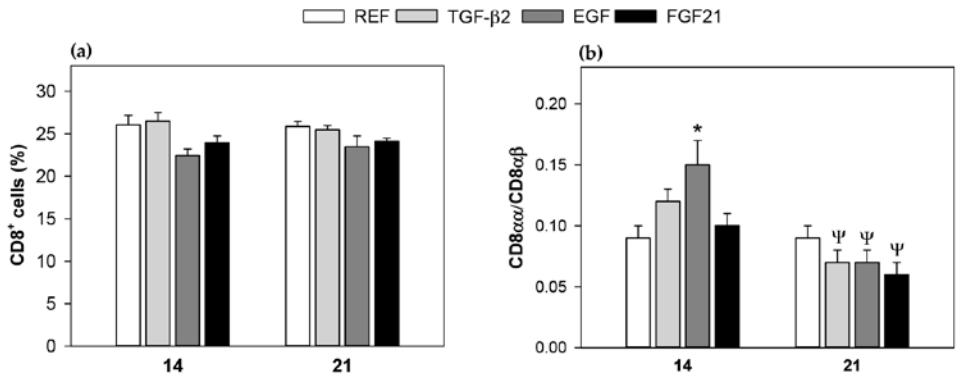


Figure 1. Proportion of $CD8^+$ cells and ratio $CD8\alpha\alpha/CD8\alpha\beta$ in mesenteric lymph nodes at 14 and 21 days of life. (**a**) % $CD8^+$ cells; (**b**) The ratio $CD8\alpha\alpha/CD8\alpha\beta$ was calculated as the quotient of the percentages of $CD8\alpha\alpha$ cells and $CD8\alpha\beta$ cells in $CD8^+$ cells (%). Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M) ($n = 9$). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. reference group (REF group) at same age; $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. same group at day 14. TGF-β2: transforming growth factor-β2. EGF: epidermal growth factor. FGF21: fibroblast growth factor 21.

Further analysis of $CD8^+$ and $CD8^-$ subsets revealed some changes associated with the supplementations (Figure 2).

Regarding the $TCR\alpha\beta^+$ subsets ($CD8^+$ and $CD8^-$, respectively, Figure 2a,b), no changes due to supplementation were found either at 14 or at 21 days, with respect to the REF group. Only, the supplementation with FGF21 decreased the proportion of $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$ (~8%), when values from day 21 were compared to day 14 (Figure 2a, $p < 0.05$). The $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^-$ cell percentage (Figure 2c), increased due to supplementation with EGF and FGF21 at 14 days, with only the latter achieving statistical significance, but these changes were not observed at the end of the suckling period (day 21). However, both interventions showed a 50% decrease in the $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^-$ cell proportion associated with age ($p < 0.05$, day 21 vs. day 14). Moreover, the $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$ cell proportion in the EGF group (Figure 2d), was lower than the REF group at day 21 ($p < 0.05$). In relation to the NKT population ($CD8^-$ and $CD8^+$ subsets), only the NKT $CD8^-$ subset showed changes associated with age for all groups (Figure 2e), but not due to the supplementations.

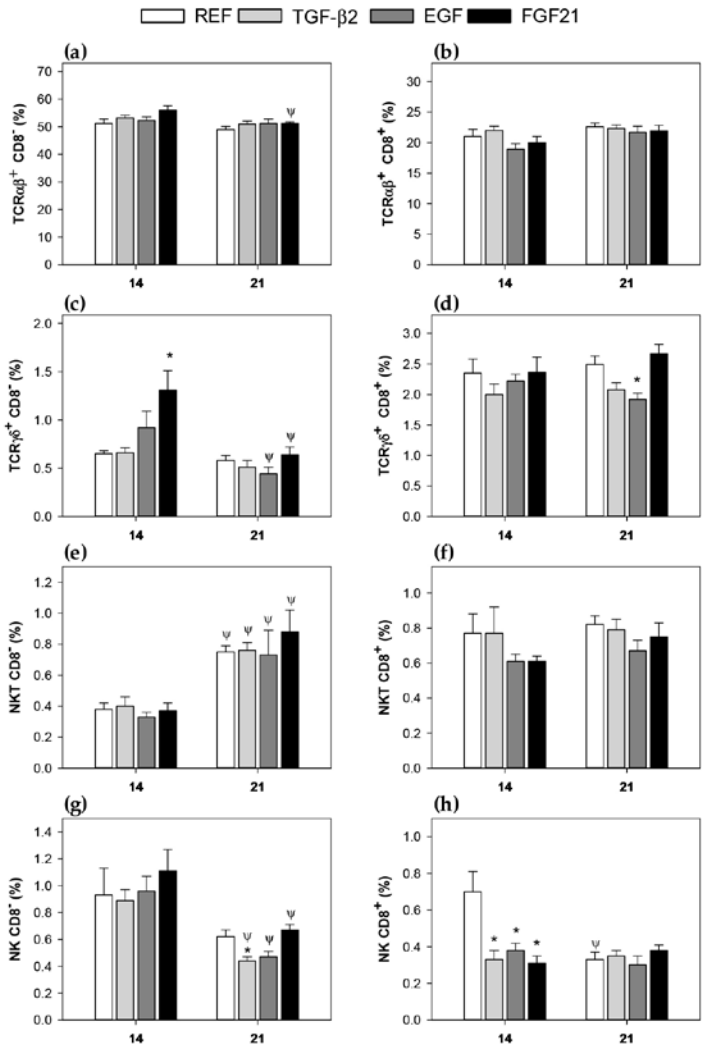


Figure 2. Percentages of $CD8^+$ and $CD8^-$ lymphocyte subsets in mesenteric lymph nodes at 14 and 21 days of life. (**a**) $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$; (**b**) $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$; (**c**) $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^-$; (**d**) $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$; (**e**) NKT $CD8^-$; (**f**) NKT $CD8^+$; (**g**) NK $CD8^-$; and (**h**) NK $CD8^+$. Results are expressed as mean ± S.E.M ($n = 9$). Statistical difference: * $p < 0.05$ vs. REF group at same age; $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. same group at day 14.

However, NKT $CD8^+$ cell proportions were not affected (Figure 2f). Results from the NK cell population showed that in supplemented groups, there was a decrease in NK $CD8^-$ cell proportions related to age (Figure 2g, $p < 0.05$, day 21 vs. day 14), and that only supplementation with TGF-β2 induced a significant decrease compared with the REF group at 21 days (Figure 2g, $p < 0.05$ vs. REF). The phenotype of the intestinal NK cells based on CD8 expression, could be considered as immature (NK $CD8^+$) or more mature (NK $CD8^-$). The three supplementations were able to decrease the proportion of NK cells expressing CD8 at 14 days (Figure 2h), which reached similar values to those from reference 21-day-old rats. Thus, only the REF group decreased its percentage of NK $CD8^+$ cells at 21 days, with respect to day 14 (Figure 2h).

Nutrients **2018**, *10*, 1171

The lymphocytes' commitment to the mucosal compartment were studied by means of the proportion of cells expressing two adhesion molecules of importance in the intestinal homing; thus, the total percentage of cells bearing the selectin CD62L and the αE integrin were determined (Figure 3).

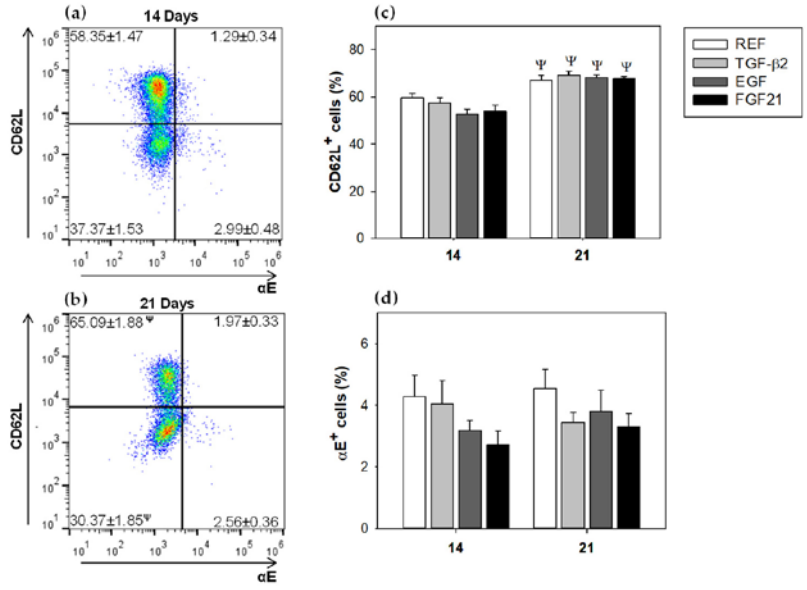


Figure 3. Surface expression of αE integrin and CD62L selectin, in mesenteric lymph nodes at 14 and 21 days of life. (**a**) CD62L/αE integrin surface expression at 14 days, (**b**) CD62L/αE integrin surface expression at 21 days, (**c**) $CD62L^+$ cells (%) and (**d**) αE^+ cells (%). Results are expressed as mean ± S.E.M ($n = 9$). Statistical difference: $^{\Psi}$ $p > 0.05$ vs. same group at day 14.

Figure 3a,b show the molecular pattern of αE/CD62L on day 14 and 21. The CD62L molecule was expressed on both days in high proportion of cells (~60%). Although the percentage of $CD62L^+$ cells increased significantly with age in all studied groups (Figure 3a–c, $p < 0.05$), none of the supplemented groups induced significant differences, when they were compared to the REF group at the same age. The αE^+ cells were present in a proportion lower than 5% at both studied times (Figure 3b–d) and were not modified by any GFs administration (Figure 3d).

The percentages of integrin αE^+ cells and selectin $CD62L^+$ cells in $CD8^+$, $CD4^+$, and B cells were further studied (Table 3). None of the supplemented groups showed significant differences, compared to the REF group at the same age. All studied groups increased $CD62L^+$ $CD8^+$ and $CD62L^+$ $CD4^+$ percentages with age ($p < 0.05$, day 21 vs. day 14). The REF group increased (~15%) αE^+ B cells subset proportion, with respect to the same group at 14 days, whereas all supplemented groups decreased (~20%) this subset with age ($p < 0.05$). In addition, the supplementation with EGF and FGF21, decreased the percentage of αE expression in $CD4^+$ cells with age. Although there was a tendency to increase with age, the proportion of $CD62L^+$ in B cells in all groups, it was only significant in the TGF-β2 group ($p < 0.05$).

At the end of the suckling period, activated CD4 cells ($Foxp3^-$ $CD25^+$ $CD4^+$ cells) and Treg cells ($Foxp3^+$ $CD25^+$ $CD4^+$ cells) were also studied, and no changes were found due to diets (day 21), with all groups together having a mean percentage of 1.22 ± 0.12 and 3.81 ± 0.11, respectively.

Table 3. Surface expression of the αE integrin and the CD62L selectin in $CD4^+$, $CD8^+$, and B cells in mesenteric lymph nodes.

		14 Days			
		Reference	**TGF-β2**	**EGF**	**FGF21**
%αE	$CD8^+$	2.75 ± 0.72	2.92 ± 0.49	2.94 ± 0.52	2.88 ± 0.44
	$CD4^+$	2.81 ± 0.39	3.07 ± 0.45	4.46 ± 0.34	3.80 ± 0.26
	B cells	15.98 ± 1.61	18.33 ± 1.39	18.92 ± 2.50	20.32 ± 3.12
%CD62L	$CD8^+$	65.27 ± 1.56	62.38 ± 3.47	59.25 ± 2.52	59.21 ± 3.55
	$CD4^+$	59.55 ± 1.76	55.41 ± 2.36	53.61 ± 1.37	53.65 ± 2.40
	B cells	48.43 ± 2.77	46.6 ± 2.05	38.77 ± 2.08	37.29 ± 4.78
		21 Days			
		Reference	**TGF-β2**	**EGF**	**FGF21**
%αE	$CD8^+$	3.84 ± 0.48	2.98 ± 1.04	3.70 ± 0.48	3.97 ± 0.66
	$CD4^+$	2.83 ± 0.75	2.61 ± 0.52	1.94 ± 0.18 $^{\Psi}$	2.52 ± 0.30 $^{\Psi}$
	B cells	18.43 ± 1.83 $^{\Psi}$	13.03 ± 1.55 $^{\Psi}$	14.95 ± 1.69 $^{\Psi}$	15.75 ± 1.16 $^{\Psi}$
%CD62L	$CD8^+$	71.49 ± 1.38 $^{\Psi}$	72.10 ± 1.93 $^{\Psi}$	70.78 ± 2.19 $^{\Psi}$	72.88 ± 2.37 $^{\Psi}$
	$CD4^+$	66.02 ± 1.74 $^{\Psi}$	68.24 ± 1.64 $^{\Psi}$	66.66 ± 0.42 $^{\Psi}$	66.80 ± 1.22 $^{\Psi}$
	B cells	56.79 ± 2.25	60.92 ± 2.17 $^{\Psi}$	60.82 ± 3.92	57.61 ± 2.37

Results are expressed as mean ± S.E.M (n = 9). $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. day 14 at same group.

3.4. Proliferation and Cytokine Production by Mesenteric Lymph Nodes Cells

To determine the functional capacity of MLN lymphocytes, we studied their proliferative response and their ability to secrete cytokines on days 14 and 21. With regard to the proliferation of MLNs cells on days 14 and 21, GFs supplementations were not able to significantly modify such lymphocyte function induced by anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (Supplementary Materials, Figure S3). However, cytokine production was influenced by GFs supplementation (Table 4).

The pattern of cytokines released from MLNs cells at day 14, showed a high secretion of IFN-γ, followed by IL-10. In the conditions tested, the secretion of IL-2, IL-4, IL-13, IL-17A, and TNF-α was lower than 90 pg/mL. IL-10/TNF-α (anti-inflammatory/pro-inflammatory cytokines) and IFN-γ/IL-4 (Th1/Th2) ratios were also calculated. No changes in the cytokine pattern at day 14 were detected by GFs supplementation. However, at day 21, some changes appeared due to supplementations and due to age. IL-2 production was 5–10 times higher due to age in the REF, TGF-β2, and EGF groups ($p < 0.05$ day 21 vs. day 14). IL-4 levels were ~50% lower in the EGF group at day 21, than those at day 14 ($p < 0.05$). The groups that received EGF and FGF21 for 21 days, decreased the IL-10 content ~1.5 times with respect to their values at day 14 ($p < 0.05$). IL-13 secretion was lower at day 21 with respect to day 14, in the EGF and FGF21 groups ($p < 0.05$), and the three GFs groups showed lower values than those present in the REF group ($p < 0.05$). The lower levels of IFN-γ production at day 21 compared to day 14 were only significant in the REF group, which accounted for a 50% reduction ($p < 0.05$). Moreover, TNF-α release decreased (~30%) with age in the REF, TGF-β2, and FGF21 groups, whereas supplementation with EGF increased TNF-α production ($p < 0.05$ vs. REF group).

The IL-10/TNF-α ratio decreased according to age in the EGF and FGF21 groups, and in the EGF group, values were significantly lower than the REF group ($p < 0.05$).

Table 4. Cytokine production by mesenteric lymph node cells after in vitro stimulation.

		14 Days		
(pg/mL)	**Reference**	**TGF-β2**	**EGF**	**FGF21**
IL-2	42.71 ± 5.96	39.24 ± 5.66	50.45 ± 6.66	56.72 ± 11.04
IL-4	89.82 ± 13.00	57.14 ± 7.81	82.65 ± 12.47	74.97 ± 12.18
IL-10	879.82 ± 239.40	688.01 ± 145.14	1450.87 ± 296.29	1326.99 ± 217.06
IL-13	25.38 ± 5.64	17.53 ± 3.03	31.91 ± 4.28	26.18 ± 4.03
IL-17A	71.98 ± 26.92	70.22 ± 20.16	60.12 ± 13.61	50.82 ± 9.53
IFN-γ	10323.26 ± 2391.46	8302.75 ± 1964.09	9329.17 ± 1662.87	7882.51 ± 2810.34
TNF-α	8.76 ± 0.98	9.48 ± 0.68	9.19 ± 1.16	7.40 ± 0.25
IL-10/TNF-α	115.00 ± 33.11	79.71 ± 21.80	170.87 ± 43.10	178.05 ± 29.25
IFN-γ/IL-4	110.35 ± 20.65	195.32 ± 61.39	124.85 ± 37.55	103.80 ± 26.93
		21 Days		
(pg/mL)	**Reference**	**TGF-β2**	**EGF**	**FGF21**
IL-2	390.57 ± 141.49 $^{\Psi}$	383.80 ± 89.21 $^{\Psi}$	244.79 ± 80.37 $^{\Psi}$	270.16 ± 114.54
IL-4	70.52 ± 10.51	52.21 ± 7.69	48.52 ± 1.91 $^{\Psi}$	66.60 ± 8.80
IL-10	705.45 ± 63.95	514.70 ± 55.30	508.26 ± 61.43 $^{\Psi}$	542.36 ± 78.82 $^{\Psi}$
IL-13	19.51 ± 2.44	12.92 ± 0.74 *	9.91 ± 1.24 $^{*,\Psi}$	9.83 ± 1.65 $^{*,\Psi}$
IL-17A	59.97 ± 7.14	46.91 ± 4.03	52.30 ± 10.7022	41.24 ± 11.77
IFN-γ	4231.26 ± 365.41 $^{\Psi}$	4488.50 ± 416.14	6900.74 ± 1129.78	4595.11 ± 1058.87
TNF-α	6.63 ± 0.11 $^{\Psi}$	6.55 ± 0.20 $^{\Psi}$	10.02 ± 0.40 *	5.91 ± 0.38 $^{\Psi}$
IL-10/TNF-α	106.47 ± 9.73	80.13 ± 9.55	50.48 ± 5.72 $^{*,\Psi}$	95.64 ± 17.03 $^{\Psi}$
IFN-γ/IL-4	64.25 ± 9.61	111.99 ± 25.23	147.25 ± 27.9166	81.50 ± 25.37

Results are expressed as mean ± S.E.M (n = 9). * $p < 0.05$ vs. REF group at same age; $^{\Psi}$ $p < 0.05$ vs. day 14 at same group.

4. Discussion

At birth, the immune system is immature, as evidenced by a poor antibody production and low proliferative response of immune cells. In addition, there are mucosal immune impairments, such as low intestinal IgA content, reduced number of B lymphocytes in the intestinal mucosa, and few intestinal T cells [23]. Immune development is driven, among other factors, by components of breast milk. It is known that growth factors, such as TGF-β2 and EGF, regulate the immune response in early life and confer protective effects against gut mucosal inflammation by enhancing oral tolerance [1,2,7]. FGF21, which is also present in maternal milk, is a less-studied component and could be involved in such effects as well [16]. The current study aimed to evaluate whether supplementation with TGF-β2, EGF, or FGF21 had a role in immune maturation in early life. A rat pup model was used to evaluate the effect of a daily supplementation with TGF-β2, EGF, or FGF21 during suckling on the GALT, particularly in the MLNs, which is an inductor site of intestinal immune response. We assessed the immune maturation by functions, such as lymphoproliferation, cytokine production ability, and establishing lymphocyte MLNs composition.

Regarding growth, the body weight of pups was not modified due to supplementation with any of the GFs studied. These results were in line with other investigations, in which rats receiving either TGF-β2 [10] or EGF [24,25] during the first two weeks of life did not change their body weight. Likewise, although a study showed that the body weight of FGF21-knockout mice compared to wild-type 3-month-old mice was not different [26], its physiological role as a weight regulating factor was discussed [18]. Overall, it seems that the tested GFs, under the conditions we used, did not have a key role in the growth of neonates.

Intestinal length and weight are useful tools for evaluating the primary impact of a nutrient on the maturation of the rat small intestine [27]. The GFs supplementation in the current study did not affect these variables. However, it has been reported that suckling rats receiving intraperitoneal administration of EGF (100 μg/kg) for only two days, increased stomach and intestinal weights [24]; and that rat pups receiving oral administration of EGF through formula at concentrations exceeding

the reported concentrations of EGF in rodent milk, enhanced intestinal growth (weight and length) [15]. Thus, in agreement with our results, only high doses of these compounds seem to be able to modify intestinal growth.

Although no impact on the body and intestinal growth due to any of these GFs was observed, some effects of TGF-β2, EGF, or FGF21 on immune variables have been shown to be specific; and therefore, the influence of each GF tested on MLN lymphocyte maturation will be discussed separately.

Transforming growth factor-β (TGF-β) has a wide range of biological activities and among them, it has an important role in cell proliferation and differentiation. TGF-β acts as a cytokine having predominantly suppressive effects on the growth of T and B lymphocytes. In this study, the supplementation of suckling rats with TGF-β2 did not have a significant influence on unspecific MLNs proliferative cell response. This result contrasted with a report showing that suckling rats receiving a whey-enriched TGF-β formula, down-regulated the MLNs lymphocyte proliferative response to specific antigen after being sensitized [28]. On the other hand, we observed that MLNs cells after TGF-β2 supplementation did not modify the changes in IL-2 and TNF-α secretion associated with age, but attenuated IL-13 production at day 21 with respect to reference animals. The attenuation on IL-13 production, a Th2 cytokine linked to allergic processes [29–31], agrees with results showing that Brown Norway rat pups receiving a formula with TGF-β2 between 4 and 18 days of life shifted the immune response from a Th2 type towards a Th1 profile [13]. Likewise, it is known that low levels of IL-13 in colostrum and mature milk are associated with less eczema in early life [32]. Thus, our results suggested that early TGF-β2 intake could play an important role in the prevention of Th2 mediated alterations, such as allergy.

In the current study, the TGF-β2 supplementation was already able to modulate MLN lymphocyte composition in suckling rats. It decreases the proportion of the immature phenotype of the intestinal NK cells (NK $CD8^+$) on day 14 at levels observed later (day 21); which indicated a positive action on the intestinal immune maturation. This developmental pattern, decreasing CD8 expression in the NK cell surface with age, has previously described in rat neonatal intraepithelial lymphocytes (IEL) and MLN cells [19,27]. In line with this, we found that, although no changes in total $CD8^+$ cells were observed due to TGF-β2 supplementation, a lower CD8αα/CD8αβ ratio at day 21, compared to day 14 appeared. This ratio has been described to be reduced according to age in healthy MLNs cells from suckling rats [19], thus our results may suggested a promotion of the intestinal immune system maturation. This contrasts with results in BALB/c mice pups, showing higher $CD8^+$ T cell proportions when their lactating mothers were treated with mAbs, against TGF-β twice a week from delivery until weaning [33]. On the other hand, we did not find changes in the MLNs Treg ($CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$) cell proportion. However, some authors have suggested that oral tolerance induced by breastfeeding could depend on TGF-β signaling from breast milk, which would be able to up-regulate $Foxp3^+$ cells [33].

Regarding the intestinal humoral immune response, it is known that IgA is poorly produced by the neonate mucosal immune system [1,28], and that TGF-β1 and TGF-β2 from mammalian milk are able to stimulate the synthesis of mucosal IgA [28,33]. Thus, TGF-β acting in synergy with IL-10, can promote IgA production and oral tolerance induction [28]. However, our results did not show significant changes in the intestinal IgA and IgM content of the suckling rats. This lack of effect could be due to the fact that breast milk contains IgA and IgM, which are transferred to the pups, and then these milk antibodies in the intestine would mask the pups' own levels. For this reason, intestinal IgA and IgM assessment cannot be a good marker of nutritional supplementation at this level.

Epidermal growth factor (EGF) is a peptide that modulates a variety of biological responses, such as cell proliferation and differentiation [14]. It is known that it has a clear effect on epithelium, where it accelerates maturation and stimulates cell proliferation [34–36]. However, in the current study, we have not detected any effect of the EGF supplementation on the proliferative response of MLNs cells in the suckling pups. There is evidence that EGF prevents and reduces the incidence and severity of NEC by modulating important transcription factors for cytokine regulation [37], and it is known that the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines may play a key role in the development

of NEC [17]. This effect may be attributable to a down-regulation of pro-inflammatory IL-18 and to an increase of anti-inflammatory IL-10 at the site of injury [17,37]. Here we found that, 21-day EGF supplementation increased TNF-α and decreased IL-13 production by MLNs cells. The changes in these two cytokines, contained in maternal milk [32,38], could be associated with positive effects. Indeed, decreased IL-13 can be useful in the prevention of allergy, as stated for TGF-β2 [29–31]. Moreover, EGF supplementation kept the levels of TNF-α on day 21 at the same level as that on day 14, which could play in favor of its own effects because it is known that EGF receptor (EGF-R) is up-regulated by TNF-α [39]. Regarding MLNs cell composition, EGF supplementation shares some maturate effects with TGF-β2, such as the induction of lower levels of NK $CD8^+$ cells and $CD8\alpha\alpha/CD8\alpha\beta$ ratio.

Finally, focusing on fibroblast growth factor 21 (FGF21), recent studies showed that its function is not limited to the regulation of metabolism, but that it is also involved in the protection of multiple physiological processes, such as oxidation, inflammation, atherosclerosis, and aging processes [40]. A recent study demonstrated that, in the spleen of mice with collagen-induced arthritis (CIA), FGF21 reduces the expression of inflammatory cytokines, such as IL-17, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, and MMP3, whereas IL-10 levels were increased, compared to PBS treated CIA mice [41]. In line with this, we have not found any significant difference with respect to non-supplemented animals on MLNs inflammatory cytokines, but the FGF21 supplementation decreased IL-13 at 21 days, as we also found with the other GFs, suggesting, therefore, its role in preventing allergic events.

It is known that FGF21 is present in breast milk and does not contribute to systemic levels in mouse neonates, but appears to act locally on the mouse neonatal intestine [16]; and it is unknown whether this factor plays an important role in the maturation of the immune system. We found that suckling rats receiving FGF21 promoted maturation of the early life intestinal immune system by accelerating the decrease in the proportion of NK $CD8^+$ cells and the decrease in the $CD8\alpha\alpha/CD8\alpha\beta$ cell ratio in MLNs, as well as TGF-β2 and EGF. This is the first time that the immunomodulatory effect of FGF21 has been demonstrated in early life.

5. Conclusions

In conclusion, our study demonstrated that supplementation with TGF-β2, EGF, or FGF21 during the suckling period had an immunoregulatory effect. Although some specific effects appeared, the three growth factors were able to modulate similar aspects of MLN cells, such as promoting lymphocyte maturation, as observed by increasing NK cells with a more mature phenotype ($CD8^-$) and reducing IL-13 production, which could be useful in avoiding allergic processes. Further studies should be carried out to establish the effect of the supplementation of TGF-β2, EGF, or FGF21 on the response of suckling pups in other parts of the intestinal immune system, such as in the intestinal epithelium or even at the systemic level.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1171/s1, Figure S1: Growth curve of all studied groups during the suckling period (from 1 to 21 days of life), Figure S2: IgA and IgM concentration in gut wash from 21-day-old animals after the different nutritional interventions, Figure S3: Proliferation of mesenteric lymph nodes lymphocytes at 14 and 21 days of life, Table S1: List of monoclonal antibodies (mAbs) used for immunophenotyping the mesenteric lymph nodes (MLN) cells.

Author Contributions: M.J.R.-L., M.C., F.J.P.-C., and À.F. conceived and designed the experiments; P.T.-C. and M.A.-G. performed the experiments; P.T.-C., F.J.P.-C., and À.F. analyzed the data and wrote the manuscript. F.J.P.-C. and À.F. have primary responsibility for the final content. All the authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2013-48459-P). Paulina Torres-Castro holds a fellowship from the National Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT-DMPF-2015-1666-CO).

Acknowledgments: The authors thank Lidia Marín-Morote for their help with the laboratory work. The authors also thank J. Comas and his laboratory technicians from the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiT-UB) for their assistance in the cytometry service.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Turfkruyer, M.; Verhasselt, V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2015**, *28*, 199–206. [CrossRef] [PubMed]
2. García, C.; Duan, R.D.; Brévaut-Malaty, V.; Gire, C.; Millet, V.; Simeoni, U.; Bernard, M.; Armand, M. Bioactive compounds in human milk and intestinal health and maturity in preterm newborn: An overview. *Cell. Mol. Biol.* **2013**, *59*, 108–131. [CrossRef] [PubMed]
3. Penttila, I.A.; van Spriel, A.B.; Zhang, M.F.; Xian, C.J.; Steeb, C.B.; Cummins, A.G.; Zola, H.; Read, L.C. Transforming growth factor-β levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr. Res.* **1998**, *44*, 524–531. [CrossRef] [PubMed]
4. Buddington, R.K.; Sangild, P.T. Companion animals symposium: Development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 1506–1519. [CrossRef] [PubMed]
5. Jacobi, S.K.; Odle, J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 687–696. [CrossRef] [PubMed]
6. Castellote, C.; Casillas, R.; Ramírez-Santana, C.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M.; Moretones, M.G.; López-Sabater, M.C.; Franch, À. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 1181–1187. [CrossRef] [PubMed]
7. Field, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
8. Andreas, N.J.; Kampmann, B.; Mehring Le-Doare, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum. Dev.* **2015**, *91*, 629–635. [CrossRef] [PubMed]
9. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [CrossRef] [PubMed]
10. Penttila, I.A.; Flesch, I.E.; McCue, A.L.; Powell, B.C.; Zhou, F.H.; Read, L.C.; Zola, H. Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups. *Gut* **2003**, *52*, 1579–1586. [CrossRef] [PubMed]
11. Sanjabi, S.; Oh, S.A.; Li, M.O. Regulation of the immune response by TGF-β: From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022236. [CrossRef] [PubMed]
12. Penttila, I.A. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *J. Pediatr.* **2010**, *156*, S21–S25. [CrossRef] [PubMed]
13. Penttila, I. Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary β-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatr. Res.* **2006**, *59*, 650–655. [CrossRef] [PubMed]
14. Tang, X.; Liu, H.; Yang, S.; Li, Z.; Zhong, J.; Fang, R. Epidermal growth factor and intestinal barrier function. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 1927348. [CrossRef] [PubMed]
15. Berseth, C.L. Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am. J. Physiol.* **1987**, *253*, G662–G665. [CrossRef] [PubMed]
16. Gavaldà-Navarro, A.; Hondares, E.; Giralt, M.; Mampel, T.; Iglesias, R.; Villarroya, F. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13717. [CrossRef] [PubMed]
17. Coursodon, C.F.; Dvorak, B. Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Curr. Opin. Pediatr.* **2012**, *24*, 160–164. [CrossRef] [PubMed]
18. Kharitonenkov, A.; DiMarchi, R. Fibroblast growth factor 21 night watch: Advances and uncertainties in the field. *J. Intern. Med.* **2017**, *281*, 233–246. [CrossRef] [PubMed]
19. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 486–495. [CrossRef] [PubMed]
20. Rigo-Adrover, M.D.M.; Van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preventive effect of a synbiotic combination of galacto- and fructooligosaccharides mixture with *Bifidobacterium breve* M-16V in a model of multiple rotavirus infections. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1318. [CrossRef] [PubMed]

21. Maynard, A.A.; Dvorak, K.; Khailova, L.; Dobrenen, H.; Arganbright, K.M.; Halpern, M.D.; Kurundkar, A.R.; Maheshwari, A.; Dvorak, B. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2010**, *299*, G614–G622. [CrossRef] [PubMed]
22. Camps-Bossacoma, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Untersmayr, E.; Castell, M. Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *42*, 182–193. [CrossRef] [PubMed]
23. Basha, S.; Surendran, N.; Pichichero, M. Immune responses in neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 1171–1184. [CrossRef] [PubMed]
24. Hormi, K.; Lehy, T. Transforming growth factor-alpha in vivo stimulates epithelial cell proliferation in digestive tissues of suckling rats. *Gut* **1996**, *39*, 532–538. [CrossRef] [PubMed]
25. Pollack, P.F.; Goda, T.; Colony, P.C.; Edmond, J.; Thornburg, W.; Korc, M.; Koldovský, O. Effects of enterally fed epidermal growth factor on the small and large intestine of the suckling rat. *Regul. Pept.* **1987**, *17*, 121–132. [CrossRef]
26. Camporez, J.P.; Asrih, M.; Zhang, D.; Kahn, M.; Samuel, V.T.; Jurczak, M.J.; Jornayvaz, F.R. Hepatic insulin resistance and increased hepatic glucose production in mice lacking FGF21. *J. Endocrinol.* **2015**, *226*, 207–217. [CrossRef] [PubMed]
27. Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castellote, C.; Castell, M. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 537310. [CrossRef] [PubMed]
28. Zhang, M.F. The Role of Milk Transforming Growth Factor-β (TGF-β) in the Development of the Infant Gut and Gut Mucosal Immune System. Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Adelaide, Australia, 2000.
29. Wills-Karp, M.; Luyimbazi, J.; Xu, X.; Schofield, B.; Neben, T.Y.; Karp, C.L.; Donaldson, D.D. Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma. *Science* **1998**, *282*, 2258–2261. [CrossRef] [PubMed]
30. Kubo, T.; Morita, H.; Sugita, K.; Akdis, C.A. Introduction to mechanisms of allergic diseases. In *Middleton's Allergy Essentials*; Holgate, S., Sheikh, A., Eds.; Elsevier: New York, NY, USA, 2017; pp. 1–27. ISBN 978-0-323-37579-5.
31. Bao, K.; Reinhardt, R.L. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine* **2015**, *75*, 25–37. [CrossRef] [PubMed]
32. Munblit, D.; Treneva, M.; Peroni, D.G.; Colicino, S.; Chow, L.Y.; Dissanayeke, S.; Pampura, A.; Boner, A.L.; Geddes, D.T.; Boyle, R.J.; et al. Immune components in human milk are associated with early infant immunological health outcomes: A prospective three-country analysis. *Nutrients* **2017**, *9*, 532. [CrossRef] [PubMed]
33. Sakaguchi, K.; Koyanagi, A.; Kamachi, F.; Harauma, A.; Chiba, A.; Hisata, K.; Moriguchi, T.; Shimizu, T.; Miyake, S. Breast-feeding regulates immune system development via transforming growth factor-β in mice pups. *Pediatr. Int.* **2018**, *60*, 224–231. [CrossRef] [PubMed]
34. Dvorak, B.; Halpern, M.D.; Holubec, H.; Williams, C.S.; McWilliam, D.L.; Dominguez, J.A.; Stepankova, R.; Payne, C.M.; McCuskey, R.S. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, *282*, G156–G164. [CrossRef] [PubMed]
35. Weaver, L.T.; Walker, W.A. Epidermal growth factor and the developing human gut. *Gastroenterology* **1988**, *94*, 845–847. [CrossRef]
36. Wong, W.M.; Wright, N.A. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **1999**, *23*, S83–S88. [CrossRef] [PubMed]
37. Halpern, M.D.; Dominguez, J.A.; Dvorakova, K.; Holubec, H.; Williams, C.S.; Meza, Y.G.; Ruth, M.C.; Dvorak, B. Ileal cytokine dysregulation in experimental necrotizing enterocolitis is reduced by epidermal growth factor. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2003**, *36*, 126–133. [CrossRef] [PubMed]
38. Hanson, L.Å.; Korotkova, M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin. Neonatol.* **2002**, *7*, 275–281. [CrossRef] [PubMed]
39. Takeyama, K.; Dabbagh, K.; Lee, H.M.; Agustí, C.; Lausier, J.A.; Ueki, I.F.; Grattan, K.M.; Nadel, J.A. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3081–3086. [CrossRef] [PubMed]

40. Yan, J.; Wang, J.; Huang, H.; Huang, Y.; Mi, T.; Zhang, C.; Zhang, L. Fibroblast growth factor 21 delayed endothelial replicative senescence and protected cells from H_2O_2-induced premature senescence through SIRT1. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 4492–4501. [PubMed]
41. Li, S.M.; Yu, Y.H.; Li, L.; Wang, W.F.; Li, D.S. Treatment of CIA mice with FGF21 down-regulates TH17-IL-17 axis. *Inflammation* **2016**, *39*, 309–319. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ARTÍCULO 2

"Effect of TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation on the suckling rat intestinal maturation"

Paulina Torres-Castro, Blanca Grases-Pintó, Mar Abril-Gil, Margarida Castell, María J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch

Manuscrito que será enviado a la revista *Cells*

Índice de impacto (2018): 5,656
Categoría: 40/193 (Q1) en *CELL BIOLOGY*

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de la suplementación con el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) -componentes bioactivos presentes en leche materna- sobre la maduración de la función de barrera intestinal y del sistema inmunitario intestinal efector de ratas lactantes.

Material y métodos: Para ello se suplementaron diariamente ratas Wistar con TGF-β2, EGF o FGF21 durante el período de lactancia. Se evaluó la funcionalidad de la barrera epitelial intestinal -mediante un ensayo de permeabilidad *in vivo*- y se realizó un estudio histomorfométrico e inmunohistoquímica intestinal. Además, se determinó la expresión génica de proteínas intestinales asociadas a uniones estrechas, mucinas, receptores tipo *toll* (TLR), entre otros. Finalmente, también se estableció el efecto de los suplementos administrados sobre la composición de linfocitos intraepiteliales (IEL).

Resultados: Se demostró que el período comprendido entre 10 y 14 días de vida era óptimo para realizar estudios de la función de barrera intestinal en ratas lactantes. Ninguno de los factores bioactivos ensayados mostró un efecto significativo sobre el desarrollo de la función de barrera. Sin embargo, todos ellos fueron capaces de modular la expresión génica de moléculas intestinales y promover una mayor maduración de los IEL, según demuestran los cambios fenotípicos observados; como, por ejemplo, la relación CD8αα/CD8αβ. Los componentes bioactivos EGF y FGF21 fueron los que mostraron mayor actividad.

Conclusión: La suplementación diaria con TGF-β2, EGF y FGF21 modula parcialmente la maduración de la función de barrera intestinal y promueve el desarrollo de los IEL intestinales durante el período neonatal.

cells

MDPI

Article

Effect of TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation on the suckling rat intestinal maturation

Paulina Torres-Castro [1,2], Blanca Grases-Pintó [1,2], Mar Abril-Gil [1,2], Margarida Castell [1,2], María J. Rodríguez-Lagunas [1,2], Francisco J. Pérez-Cano [1,2*] and Àngels Franch [1,2]

[1] Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona
blancagrases@ub.edu (B.G-P); mtorreca29@alumnes.ub.edu (P.T-C); lmarinmorote@gmail.com (L. M-M); mariadelmar.abril@ub.edu (M.A-G); margaridacastell@ub.edu (M.C); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R-L); angelsfranch@ub.edu (A.F).
[2] Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB)
* Correspondence: franciscoperez@ub.edu (F.J.P-C); Tel.: +34 93 402 45 05.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Growth factors (GF) such as transforming growth factor β (TGF-β), epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 21 (FGF21) play important roles in the development of the gastrointestinal (GI) tract, specifically on the intestine. The aim of this study was to determine the effect of the supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 of suckling rats on intestinal maturation. For this, Wistar rats were daily supplemented with TGF-β2, EGF and FGF21 during the suckling period. We evaluated the functionality of the intestinal epithelial barrier through an in vivo dextran permeability assay, along with a histomorphometric and immunofluorescence study. Also, we studied gene expressions of tight junctions-associated proteins, mucins (MUC), toll-like receptors (TLRs), neonatal Fc receptor (FcRn) and BLIMP-1. Moreover, we established the intraepithelial lymphocytes (IEL) composition. Our study demonstrated that the best age to perform studies of the intestinal barrier function in suckling rats was between 10 and 14 days of life. During the suckling period, the supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 showed important intestinal maturation signs. These results suggest that TGF-β2, EGF and FGF21 modulate the neonatal maturation of the intestinal barrier function and the intestinal intraepithelial lymphocyte composition during neonatal period.

Keywords: Growth factors, breast milk, neonatal rats, intestinal immunity.

1. Introduction

The intestinal epithelium has several different cell types working together to balance numerous functions such as absorption, antigen recognition, maintenance of mucosal integrity and protection from pathogens [1]. The mucus layer covering the epithelial cells along with the tight junctions (TJs) allow the continuity of the crypt-villus structure characteristic of the small intestine [2]. This intestinal epithelium, together with the network of the immune cells located beside, constitutes the first major barrier of the intestinal system, that is involved in the gut homeostasis and provides the so-called "intestinal barrier function" [3].

The part of this barrier adjacent to the intestinal lumen comprises the secretions of the Goblet cells and Paneth cells, which mainly represent mucins and antimicrobial peptides, respectively [4,5]. Below this layer it can be found the most predominant type of cells in the intestine, the intestinal epithelial cells (IECs), which are mainly involved in the absorption and act as a fence against pathogens [6]. They possess pattern-recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NOD), which recognize antigens on

pathogenic bacteria and participate in innate immunity and inflammatory responses [6]. IECs can act as a barrier due to the TJs, which are a group of proteins located at their apical-lateral membranes [7]. TJs are composed of transmembrane proteins (e.g. claudins, occludin) and cytosolic proteins (e.g. ZO-1) that participate in the regulation of the paracellular passage of ions, solutes, and water [7]. Various extracellular stimuli can modify both TJ barrier function and paracellular permeability and their adequate function might prevent several diseases [7].

Intraepithelial lymphocytes (IELs) are small round cells within the epithelium [8] found along the full length of the intestinal tract, thus located both in the small and large intestines [3]. These IELs are mainly composed of T cells and innate lymphoid cells (ILCs), however they lack B cells due to their location under the basal membrane in the lamina propria [6]. Upon exposure to antigens, IELs produce cytokines and growth factors (GFs) to recruit effector cells, destroy pathogens and stimulate epithelial repair, thus IELs regulate both innate and adaptive responses in order to promote protection against infection and maintenance of barrier function [8,9].

On the first days of life, luminal factors begin to stimulate immune cells present in the gut compartment [10]. In this context, breast milk bioactive compounds such as GFs play a pivotal role directing immune protection as well as promoting the development of adaptive immune responses [9].

GF such as transforming growth factor β (TGF-β), epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 21 (FGF21), all present in breast milk, play important roles in the development of the gastrointestinal (GI) tract [11]. These actions involve specific receptors that are found in the epithelium, such as EGFR/ErbB1, TGFβRI/TGFβRII, and FGFR1-4 for TGF-β, EGF and FGF21, respectively [12]. The study of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) is of great importance for understanding the mechanisms and interactions of nutritional supplementations with the immune system and to clarify the phenotype and function of lymphocytes involved in immunological responses at the mucosal level. We hypothesized that these three GF could also have an important developmental role in the small intestine. In this regard, the purpose of this study was to determine whether daily supplementation with TGF-β2, EGF or FGF21 could modulate intestinal maturation and the development of the IEL during and at the end of the suckling period.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Pregnant Wistar rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were housed in individual cages under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 light:dark cycle with free access to the commercial diet corresponding to the American Institute of Nutrition 93M formulation [13] (Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, USA) and water *ad libitum*. Pregnant rats were monitored daily until delivery and allowed to deliver naturally. The day of birth was identified as day 1 of life. Pups had free access to the nipples and rat diet. Animals were weighed daily, and handling was done in the same time range to avoid the influence of biological rhythms. The procedures of this study were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona (UB) and by the Catalonia Government (CEEA-UB Ref. 220/15, UB/DAAM 8521). Two experimental designs (ED) were carried out: one to study the changes in the intestinal barrier functionality associated to age (ED1) and another to evaluate the effects of the supplementation with GFs on the intestinal barrier and on IEL phenotype (ED2) (Supplementary Figure 1).

2.2. Intestinal barrier function study (ED1)

In the first experimental design (ED1), an in vivo study was performed in order to evaluate the changes that occur in the intestinal epithelial barrier function during the suckling period. This would be useful to establish the age of closure of the intestinal barrier for later determining the best day to

later evaluate the influence of different bioactive factors on that function (ED2). For that, Wistar rats (n=9 pups per group) with ages of 10- and 14-day-old (corresponding to the suckling period), 21-day-old (weaning day) and also 28-day-old rats (one week after weaning) were used. After euthanasia blood for the permeability assay and small intestine tissues for gene expression evaluation were collected.

2.3. Growth factors supplementation study (ED2)

The second *in vivo* study was performed in order to evaluate the effect of the supplementation with GFs in the intestinal epithelial barrier function and to study the changes in the IEL phenotype during the suckling period. For this, on the first day of life, litters were unified to nine pups per lactating mother and were randomly distributed into four experimental groups: reference group (REF), transforming growth factor β2 (TGF-β2) group, epidermal growth factor (EGF) group and fibroblast growth factor 21 (FGF21) group (n= 3 litters of 9 pups each/group). The sample size estimation was performed as described in previous studies [14].

The supplementation was conducted over the course of the suckling period. All pups were weighted every day and separated from their mothers 30 min before oral administration, to allow gastric emptying and then supplemented by oral gavage with a volume of 10 mL/kg/day, from day 1 to day 21 of age, as described in previous studies in the group [15,16].

TGF-β2, EGF and FGF21 groups were supplemented with recombinant human TGF-β2, recombinant rat EGF and recombinant human FGF-21, respectively, all from Peprotech® (Rocky Hill, New Jersey, USA). These products were reconstituted in Phosphate-Buffered Solution (PBS, pH 7.2) with 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The dose of TGF-β2 was of 35 μg/Kg/day, the dose of EGF was of 100 μg/Kg/day and the dose of FGF21 was of 5 μg/Kg/day, all of them based on their physiological concentration in breast milk and as performed in previous approaches [14, 17-20]. The REF group received a matched volume of the vehicle used for the GFs (1% BSA in PBS).

2.4. Samples collection and processing

ED1 had four time points of sample collection (10, 14, 21 and 28 days) and ED2 included three time points of sample collection (10, 14 and 21 days) with n=9 pups each/group (3 per litter). In both designs, rats were anaesthetized intramuscularly with ketamine (90 mg/kg; Imalgene, Merial, Spain) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Spain) and sacrificed by exsanguination. Only in ED1 and on day10 of ED2, blood samples were collected by cardiac puncture in order to evaluate the intestinal permeability. Then, the abdomen was opened and the entire small intestine was removed. After dissection, small intestine was flushed with cold saline solution to remove the contents. Intestine was weighted, measured and divided into three equal length portions, designated as proximal small intestine (pSI), medial small intestine (mSI) and distal small intestine (dSI). Once the sample was divided, samples of the mSI portion (two 5 mm pieces) of animals from both ED1 and ED2 with 10 and 21 days were cut and placed into tubes with RNAlater™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Lithuania) and stored at -20 ºC until PCR analysis. On the other hand, in ED2 dSI portions (three 5 mm pieces) of 10-day-old animals were put into histology cassettes (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and fixed overnight using 4% paraformaldehyde (CH_2O 37-38%, Panreac, Barcelona, Spain) for histological and immunofluorescence assays. Then, the pSI portion was cleaned of the remaining fat and mesenteric tissue, then was opened lengthwise along the mesenteric line and was cut into 2 cm pieces. After, they were put into tubes with Hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) without calcium and magnesium, and stored in ice until the IELs obtaining process.

138 *2.5. Intestinal permeability assay*

139 Wistar pups received an oral administration of 4 kDa-dextran conjugated to fluorescein
140 isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich), molecule that crosses the intestine through the paracellular
141 pathway. Firstly, pups were separated from their respective mothers 1 h before the administration to
142 allow gastric emptying and to avoid the interference of milk components with the dextran solution.
143 It was dissolved in PBS (pH 7.2; 154 mM sodium chloride (NaCl, Scharlab, Spain), 3.99 mM sodium
144 dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Carlo Erba Reagents, Milan, Italy) and 16 mM
145 disodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, Carlo Erba Reagents) at the dose of 500
146 mg/kg. Oral administration was performed using low-capacity syringes (Hamilton Bonaduz,
147 Bonaduz, Switzerland) adapted to oral 23-gauge gavage tubes (ASICO, Westmont, IL, USA), as
148 previously described [15]. After 4 h of the administration, in order to evaluate the pass of the dextran
149 to blood, the animals were euthanized (ketamine (90 mg)/xylazine (10 mg/kg), plasma was obtained,
150 diluted and, the fluorescence emission was analysed by triplicate at an excitation wavelength of 490
151 nm, in the Modulus™ Microplate spectrophotometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA) [21].
152 A reference sample pool obtained by animals given an equivalent volume of PBS, was used to rule
153 out autofluorescent background. Results are expressed as mean of concentration FITC dextran in
154 plasma (μg/mL).

155 *2.6. Intestinal histomorphometric study*

156 Once samples from the 10-day-old rats from ED2 were fixed, the intestinal tissues were
157 dehydrated in serial dilutions of 70%-100% ethanol and then Xylene (Honeywell Chemicals, Belgium,
158 paraffin-embedded, microtome-sectioned and counterstained with periodic acid-Schiff (PAS)-
159 hematoxylin stain, as previously described [21, 22]. The slides were mounted with coverslips using
160 ProLong™ Gold Antifade Mountant (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The observation of the
161 intestinal architecture was accomplished using a bright-field microscope at 100X and 400X coupled
162 to a camera (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan). All the morphometric
163 measurements were processed with the Image J. software (Image Processing and Analysis in Java,
164 National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). In order to evaluate morphometric
165 architecture of intestinal villi; villi height (junction of the villi- crypts to the top villi), width villi
166 (middle of the villi), area villi and epithelium perimeter of the villi (outer layer of the villi) were
167 measured [22]. For this, 4-10 villi per each section of dSI from n= 4 animals per group were evaluated.
168 On the other hand, the number of Goblet cells per villi were counted and were expressed as PAS-
169 positive cells. Statistical analysis was done with the average values of each animal.

170 *2.7. Intestinal Immunohistochemical analyses*

171 Immunofluorescence staining for different tight junctions was performed as previous described
172 [21]. Occludin, zona occludens 1 (ZO-1), claudin-2 and claudin-4 staining were performed using the
173 same initial tissue process described before. For this purpose, paraffin was removed by xylene-
174 ethanol gradient. For antigen retrieval, sections were boiled in TRIS EDTA solution pH 9 and then
175 twice washed with PBS solution. Then slides were permeabilized with PBS solution with 0.2%
176 Tween 20. To block non-specific binding sites, slides were bathed in PBS-BSA 1% solution for 30 min
177 at room temperature. For immunostaining, the primary antibodies (Ab) and dilutions used were anti-
178 occludin (1:100), anti-ZO-1 polyclonal (1:50), anti-claudin-2 (1:100), and anti-claudin-4 polyclonal
179 (1:50), all from Thermo Fisher Scientific. The sections were incubated overnight at 5ºC with primary
180 antibodies, and, after incubation, the slides were rinsed three times with PBS-0.05% Tween 20 for 10
181 min.
182 The tissue was then incubated with the secondary Ab for 1h at 5 ºC in a humidity chamber, the
183 Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L, Invitrogen, USA) diluted 1:1000 in blocking solution.
184 Then, sections were washed three times with PBS-0.05% Tween 20. Finally, for nuclei staining,
185 sections were incubated 10 min in humidity chamber with DAPI (1:1000, Invitrogen), then were

rinsed three times with PBS for 10 min and mounted with Fluoromount G™ (Invitrogen). Controls were incubated with secondary Ab only.

Images were taken with a fluorescence laser and optical microscope coupled to a camera (BX41, Olympus, Germany) at 400X magnification and stored in tiff format. The time of exposition was adapted to each staining, but the control images were acquired with the same time of exposition. Image analysis and treatment were performed using the ImageJ program (Image Processing and Analysis in Java). Images that were modified for contrast and brightness to enhance their visualization were processed in the same way as the images corresponding to their respective controls.

2.8. Isolation and purification of IEL

Intestinal IEL suspensions were obtained and processed individually from the pSI tissue of each animal form the ED2. From the intestinal samples, IEL were removed by subsequent incubations, at 37 °C in a shaker, once with 1,4-dithiothreitol (DTT, 1 mM, 20 min, Sigma Aldrich) in HBSS and twice with EDTA (5 mM, 15 min, Sigma Aldrich) in HBSS. After each incubation, released cells were decanted from the tissue pieces and centrifuged to obtain a cell pellet. Pellets from each step were resuspended in HBSS and collected. Finally, the resulting cell suspension was centrifuged (538 g, 5 min, 4 ºC) to remove the supernatant without the sediment (containing IEL and IEC from all steps) [10,22]. This sediment was then subjected to a cell purification gradient using 44–67.5% Percoll® (Sigma-Aldrich). Lymphocytes were resuspended in complete culture medium containing Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich), 1% L-glutamine (Sigma Aldrich), 1% penicillin streptomicin (PenStrep; Sigma-Aldrich) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and cell number and viability were determined using a CountessTM Automated Cell Counter (Invitrogen) following usual laboratory procedures [10,23]. Lymphocytes were immediately used to analyze their phenotype.

2.9. Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis

Lymphocyte immunofluorescence staining and flow cytometry analysis were performed. The IELs (2 × 105 cells/mL) were stained with anti-rat monoclonal antibody (mAb) conjugated to FITC, phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-a-protein (PercP), allophycocyanin (APC) or APC-cyanine (Cy)7, as in previous studies [14, 15]. The mAbs used in this study were anti-CD4, anti-CD8α, anti-CD8β, anti-TCRαβ, anti-TCRγδ, anti NKR-P1A, anti-CD45RA and anti-CD25 (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-αE (CD103) and anti-CD62L (Biolegend, San Diego, USA) and anti-TLR4 (Novus Biologicals, Littleton, USA). A negative control staining using an isotype matched mAb was included in each cell sample. For cell subset differentiation four different Ab panels were used: Panel 1: TCRαβ/NK/CD8α; Panel 2: CD8α/CD8β/TCRγδ; Panel 3: CD103/CD62L/CD8α/CD4 and Panel 4: CD45RA/TLR4/CD8α/CD4/CD25. With the first panel could be differentiated NK cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^-$), NKT cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^+$), and also T TCRαβ$^+$ cells (TCRαβ$^+$NKR-P1A$^-$), the last proportion in combination with the TCRγδ$^+$ cells (obtained from the Panel 2) constituted the total of T cells. B cells (CR45RA$^+$) were identified with the Panel 4 in order to confirm their absence in the IELs suspension.

Analyses were performed as in previous studies [14,15] and analyzed with use of Gallios™ Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in the Flow Cytometry Unit of the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). The obtained data were assessed with FlowJo version 10 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Results are expressed as percentages of positive cells in the lymphocyte population selected according to their forward/scatter characteristics (FSC/SSC) or in a particular selected population.

2.10. Reverse transcription and quantitative PCR in small intestine samples

To begin this process, intestinal samples from ED1 and from day 10 and 21 in ED2, conserved in RNAlaterTM were transferred into a FastPrep-24TM lysing matrix tube (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) for homogenization process (30 s) with FastPrep-24 equipment (MP Biomedicals), as previously described [23,24]. Then, RNA was obtained using an RNeasy® mini kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. Once RNA was obtained, the purity and concentration were determined by a NanoPhotometer (BioNova Scientific, S.L. Fremont, CA, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA using TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, AB, Weiterstadt, Germany) in a thermal cycler (PTC-100, Programmable Thermal Controller, NJ Research Inc., MA, USA). Gene expression levels were measured by real-time PCR (ABI Prism 7900 HT, AB) using TaqMan® Gene Expression Assays. The specific PCR TaqMan® primers (AB) used to perform the PCR quantitative assay were: Oclu (Rn00580064_m1, I), Cla-4 (Rn01196224_s1), ZO-1 (Rn02116071_s1, I), Muc2 (Rn01498206_m1, I), Muc3 (Rn01481134_m1, I), TLR2 (Rn02133647_s1, I), TLR4 (Rn00569848_m1, I), TLR5 (Rn04219239_s1, I), TLR7 (Rn01771083_s1, I), TLR9 (Rn01640054_m1, I), and Fcgrt (Rn00583712_m1, I, encoding for the neonatal Fc receptor (FcRn), Prdm1 (Rn03416161_m1, I, encoding for Blimp-1) and the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR. Rn00562362_m1, I). The relative gene expression of genes of interest was normalized with the housekeeping genes Gusb (β-glucuronidase, Rn00566655_m1, I) using the 2-ΔΔCt method [25]. Results are expressed as percentage of values of each experimental group normalized to the mean value obtained for the reference group, which was set at 100%.

2.11. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the IBM Social Sciences Software Program (SPSS, version 22.0, Chicago, IL, USA). Levene's and Shapiro-Wilk tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. When the results demonstrated equality of variance and normal distribution, a one-way ANOVA test was performed. Nonparametric tests were performed when normal distribution and equality of variance did not exist. Specifically, Kruskal-Wallis and Mann–Whitney U tests were used to assess significance for independent samples. Significant differences were established at $p < 0.05$. All data in the text, tables and figures are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M).

3. Results

3.1. Intestinal barrier function development during the suckling period

The in vivo intestinal permeability to 4 kDa-FITC-dextran during the suckling period and one week after weaning (day 28), (Figure 1A). Results show a higher permeability on day 10 and 14 with respect to days 21 and 28. Moreover, an acute decrease in the intestinal permeability was observed at the end of the suckling period (day 21) which was similar on day 28, suggesting a higher maturity of the intestinal barrier. In basis of the above results, the gene expression of some molecules involved in the intestinal barrier function was evaluated at two time points: high permeability (d10) and low permeability (d21) (Figure 1B). It can be observed that at 21 days all molecules analyzed (occludin, ZO-1, claudin-4, MUC-2 and MUC-3) show higher expression with respect to day 10 ($p<0.05$). Taking into account these results, the time range comprised between 10 and 14 days, when the epithelial barrier function is not yet fully mature, could be adequate to perform studies on the influence of the GFs in suckling rats. Although there was no significant difference between the permeability on day 10 and 14, a higher value was observed on day 10 (Figure 1A). In addition a lower TJ and mucins gene expression was found at day 10 with respect to day 21 ($p<0.05$, Figure 1B). Thus, in order to perform intestinal epithelial barrier function studies of the supplementation with the GFs, the age of 10 days was established.

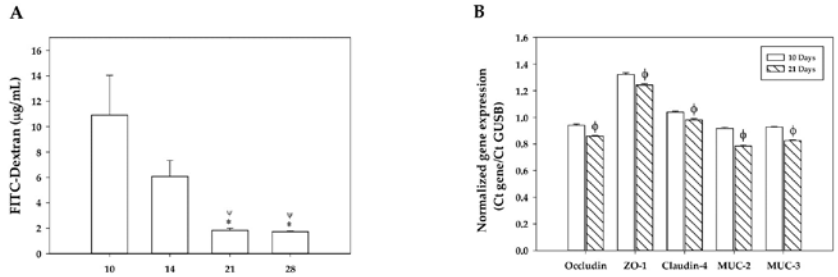


Figure 1. Intestinal barrier function development during the suckling period without supplementation. A) Intestinal permeability to 4 kDa-FITC-dextran during the suckling period (10 and 14 days), weaning period (21 days) and one week after weaning (28 days). B) Gene expression of tight junction molecules occludin, zona occludens 1 (ZO-1) and claudin-4 and mucins (MUC-2 and MUC-3) of small intestine samples at 10 and 21 days of lactation, results normalized are shown as ratio Ct gen/Ct Gusb; thus lower bars mean higher gene expression than taller bars. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n= 9 pups per group). Statistical differences: *p<0.05 *vs.* day 10, $^{\Psi}$ p<0.05 *vs.* day 14 and $^{\phi}$p<0.001 *vs.* day 10.

3.2. *Effect of supplementation with milk GFs on the intestinal epithelial barrier function*

Based on the previous results and in order to evaluate the influence of the supplementation with GFs on the intestinal barrier function, intestinal permeability, gene expression, histomorphometric and immunofluorescence studies of the intestine were performed. At 10 days, no changes were observed due to TGF-β2, EGF or FGF21 supplementation on intestinal permeability (Figure 2A). Moreover, when the relative gene expression of proteins involved in TJ and mucins were determined (Figure 2B) only MUC-3 levels were increased due to EGF supplementation (Figure 2B, p<0.05 *vs.* REF group).

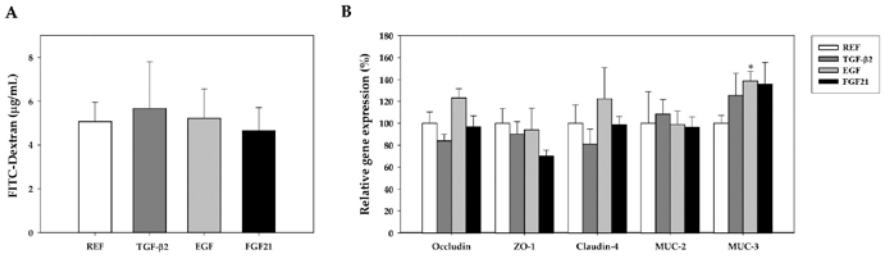


Figure 2. Influence of growth factors supplementation in the intestinal barrier function at 10 days of life. A) Intestinal permeability to 4kDa-FITC-dextran at 10 days. B) Relative expression of tight junction molecules occludin, zona occludens 1 (ZO-1) and Claudin-4 and mucin genes (MUC-2 and MUC-3) were quantified by real-time PCR in small intestinal samples at 10 days. Relative gene expression was calculated with respect to REF, which corresponded to 100% of transcription. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 9 pups per group). Statistical differences: *p<0.05 *vs.* REF group at same age.

Furthermore, on day 21, none of the GF supplementations was able to modify occludin, ZO-1, claudin-4, MUC-2 or MUC-3 gene expression (Supplementary Table 1). Most of the gene expression values in all experimental groups were between 80-120% of the REF group. However, although no

306 statistical differences were found, expression of MUC-2 in the EGF-supplemented group tended to
307 be reduced (~ 60%) and supplementation with FGF21 induced higher expression in claudin 4 (~150)
308 and MUC-3 (~145). In addition, after 21 days of supplementation, the relative expression of several
309 toll like receptors such as TLR-2,-4,-5,-7,-9 was evaluated (Supplementary Table 1). All TLRs showed
310 similar Ct target gene/ Ct GUSB gene ratio with values between (~0.95 - ~1.12), being the TLR5 the
311 one with the highest expression. Only the supplementation with EGF showed a trend to decrease the
312 expression of TLR-9 (~ 50%).The relative expression of genes encoding FcRn and BLIMP-1 was also
313 performed on day 21 (Supplementary Table 1). Only, FGF21 supplementation was able to decrease
314 FcRn gene expression (~30%) with respect to REF group.

315 The histomorphometric analysis did not allow to observe an effect due to the supplementations
316 (Table 1). In this regard, the supplementation with FGF21 showed a tendency to increase villi width
317 (~21%), villi height (~10%) and villi area (~35%) and also it showed a tendency to increase the ratio
318 Goblet cells/villi (~20%). Moreover, in order to observe the changes in the distribution of occludin,
319 ZO1 and claudins -2 and -4 due to supplementation with GF, immunofluorescent staining was
320 performed (Supplementary Figure 2). Supplementation with FGF21 showed similar occludin staining
321 pattern to REF group whereas supplementation with TGF-β2 and EGF provided images with lower
322 levels of fluorescence. Moreover, supplementation with TGF-β2 showed higher level of fluorescence
323 of ZO-1 with respect to REF group but, supplementation with EGF and FGF21 showed a similar
324 staining profile to REF group. The staining pattern of claudin-2 was similar among GF groups.
325 Finally, claudin-4 was localized in the villus tip in the REF group whereas supplementation with
326 TGB-β2 and FGF21 showed higher fluorescence levels and a different staining contour. On the other
327 hand, supplementation with EGF showed lower fluorescence levels with respect to REF group
328 (Supplementary Figure 2).

329 **Table 1.** Histomorphometric variables of small intestine: villi width, height, area, perimeter and the
330 number of Goblet/villi at day 10 of the suckling period.

	REF	TGF-β2	EGF	FGF21
Villi width (μm)	119.2 ± 8.4	101.9 ± 8.5	128.7 ± 10.9	150.7 ± 10.8
Villi height (μm)	415.9 ± 24.4	431.9 ± 19.0	402.3 ± 42.4	455.0 ± 25.1
Villi area (μm²)	43638.0 ± 2878.8	39854.8 ± 2110.3	35620.5 ± 4272.3	58704.0 ± 7784.7
Villi perimeter (μm)	1042.7 ± 79.1	941.8 ± 33.6	1028.3 ± 95.8	1042.2 ± 54.9
Goblet cells/villi	4.7 ± 0.4	5.9 ± 2.1	4.7 ± 0.6	5.6 ± 0.4

331 Results are expressed as a mean ± S.E.M. (n= 9 per group).

332 *3.3. Intraepithelial lymphocytes (IELs) composition*

333 The main lymphocytes subsets in IELs were quantified at 14 and 21 days of life, being the NK
334 cells the phenotype with the highest percentage (~30-50%), followed by NKT (~18-34%) and finally T
335 cells (~19-27%) (Table 2). None of the GFs supplementations modified the main subsets either at 14
336 or at 21 days with respect to the REF group. However, differential effects between day 14 and day 21
337 due to the supplementations were observed. On the one hand, all the supplemented groups showed
338 a lowering age effect on the proportion of NKT cells (~35% reduction, $p<0.05$ *vs.* day 14) that was not
339 observed in the REF group. In addition, the supplementation with EGF and FGF21 until day 21
340 decreased the percentage of T cells (~20 %) with respect to day 14 ($p<0.05$) due to a reduction in the
341 TCR$\alpha^{\beta+}$ cells (~35%, $p<0.05$). In contrast, NK cell proportion, that did not changed due to age in the
342 REF group, showed an increase of about 23% with EGF and 46% with FGF21 supplementations
343 ($p<0.05$ day 21 *vs.* day 14).

344 **Table 2.** Main lymphocyte subset in intraepithelial lymphocytes.

		REF	TGF-β2	EGF	FGF21
Day 14	T cells (%)	23.90 ± 5.11	27.18 ± 2.60	25.45 ± 1.25	27.56 ± 0.86
	T TCRαβ⁺ (%)	16.36 ± 1.15	14.68 ± 1.64	13.48 ± 1.38	14.67 ± 0.79
	T TCRγδ⁺ (%)	12.32 ± 1.54	12.49 ± 1.25	11.97 ± 0.27	12.90 ± 0.69
	NK (%)	38.80 ± 0.82	41.71 ± 3.52	41.70 ± 1.90	33.92 ± 2.92
	NKT (%)	28.90 ± 2.88	29.45 ± 1.96	28.32 ± 1.47	34.05 ± 2.31
	CD4⁺(%)	3.20 ± 1.04	2.08 ± 0.44	3.26 ± 0.98	2.02 ± 0.25
Day 21	T cells (%)	23.76 ± 2.43	26.91 ± 1.56	19.21 ± 0.74$^{\Psi}$	23.01 ± 0.47$^{\Psi}$
	T TCRαβ⁺ (%)	11.75 ± 2.29	13.68 ± 0.85	8.07 ± 0.34$^{\Psi}$	9.79 ± 0.23$^{\Psi}$
	T TCRγδ⁺ (%)	12.01 ± 0.30	13.29 ± 1.08$^{\Psi}$	11.14 ± 0.49	13.23 ± 0.55
	NK (%)	44.76 ± 1.26	47.46 ± 3.15	51.20 ± 1.77$^{\Psi}$	49.37 ± 1.24$^{\Psi}$
	NKT (%)	20.90 ± 4.08	20.28 ± 1.29$^{\Psi}$	20.13 ± 0.75$^{\Psi}$	18.23 ± 0.41$^{\Psi}$
	CD4⁺(%)	4.53 ± 0.84	3.44 ± 0.58	3.60 ± 0.47	4.51 ± 0.11$^{\Psi}$

345 Results are expressed as a mean ± S.E.M. (n= 9 per group).
346 Statistical differences: Ψ P>0.05 *vs.* same group at day 14.

347 The CD8⁺ co-expression was also studied in each of the main subsets (Figure 3). No changes were
348 observed due to supplementations or age in the proportion of CD8⁺ cells in TCRαβ⁺ subset with
349 exception of the lowering age effect induced by FGF21 (25% reduction, $p<0.05$ day 21 *vs.* day 14,
350 Figure 3A). In contrast, all studied groups showed lower values of CD8⁺ cells in the TCRγδ⁺
351 population with age ($p<0.05$, Figure 3B) and, in addition, the supplementation with TGF-β2 showed
352 an increase in this proportion at 14 days of life with respect to REF group ($p<0.05$, Figure 3B).
353 Moreover, the supplementation with EGF and FGF21 showed a decrease in the proportion of NKT
354 cells co-expressing CD8 at 21 days due to both supplementation and age effect (Figure 3C, $p<0.05$).
355 In the case of NK CD8⁺ cells, the EGF supplementation was the only one to increase their proportion
356 at day 21 with respect to 14 days (25% increase, Figure 3D)

357

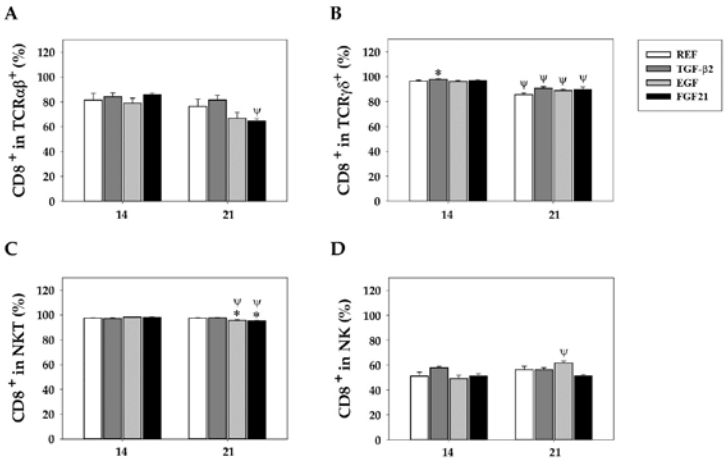


Figure 3. Percentage of CD8⁺ lymphocyte subsets in IELs at 14 and 21 days of life. A) TCRαβ⁺CD8⁺; B) TCRγδ⁺CD8⁺; C) NKT CD8⁺; and D) NK CD8⁺. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n= 9 pups per group). Statistical differences: *p<0.05 *vs.* REF group at same age, $^{\Psi}$p<0.05 *vs.* same group at day 14.

When analyzing the overall presence of CD8⁺ cells, it can be observed that the high proportion found on day 14 (60-70%) in all groups decreased with age down to 50% on day 14 (p<0.05, Figure 4A). In addition, only the supplementation with FGF21 was able to accelerate such age-associated reduction with respect to REF group (p<0.05). In contrast, FGF21 supplementation doubled the proportion of CD4⁺ cells (Table 2) at 21 days (p<0.05 vs. day 14).

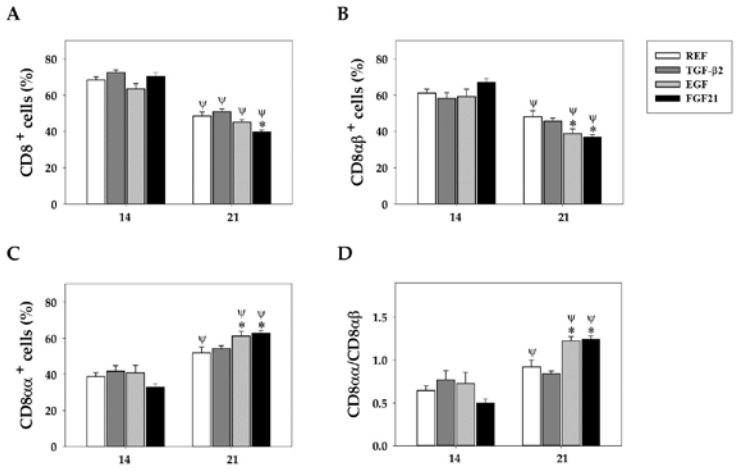


Figure 4. Proportion of CD8⁺ cells, CD8αβ⁺ cells, CD8αα⁺ cells, and ratio CD8αα/CD8αβ in IEL at 14 and 21 days of life. A) % CD8⁺ cells; B) CD8αβ⁺ cells; C) CD8αα⁺ cells and D) CD8αα/CD8αβ ratio. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n= 9 pups per group). Statistical differences: *p<0.05 *vs.* REF group at same age, $^{\Psi}$p<0.05 *vs.* same group at day 14.

Regarding the results from the CD8αα/CD8αβ analysis, the results in the REF group showed a relative reduction in CD8αβ⁺ cells (Figure 4B) and an increase in CD8αα⁺ cells (Figure 4C) leading to an age-associated pattern of increasing CD8αα/CD8αβ ratio (Figure 4D). The supplementations with EGF and FGF21 matched this behavior ($p<0.05$) by also decreasing the proportion of CD8αβ⁺ cells (~15%) and increasing the proportion of CD8αα⁺ cells (~13%) at 21 days with respect to 14 days ($p<0.05$). Therefore, the ratio CD8αα/CD8αβ showed an increase about ~35% with EGF and FGF21 supplementation at 21 days ($p<0.05$ *vs.* 14 days). Moreover, these changes observed in EGF and FGF21 groups due to age were also observed with respect to the REF group, being the ratio CD8αα/CD8αβ higher than the REF group in both cases at day 21. With respect to TGF-β2 group no changes were observed due to the supplementation or to age.

3.4. Intraepithelial lymphocytes (IELs) homing and activation patterns

The surface αE/CD62L molecular pattern was evaluated at 14 (data not shown) and 21 days of life (Figure 5). As it can be observed, the αE⁺CD62L⁻ cell phenotype is the one with the highest proportion at 21 days (around 80% in REF group). This cell phenotype was also predominant at 14 days however in all groups its proportion increased with age, independently of the supplementation given. In addition, some changes with respect to REF group were found due to TGF-β2 supplementation at 14 days ($p<0.05$, data not shown) and to FGF21 at 21 days (Figure 5D, $p<0.05$ *vs.* REF group). With regard to the other αE/CD62L subsets, only changes due to age were observed. On the one hand, the supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 induced higher proportions of αE-CD62L- and αE-CD62L⁺ subsets at 21 days of life with respect to day 14 ($p<0.05$), however these changes were not observed in the REF group. On the other hand, only FGF21 had lower values of αE⁺CD62L⁺ cells ($p<0.05$, day 21 *vs.* day 14).

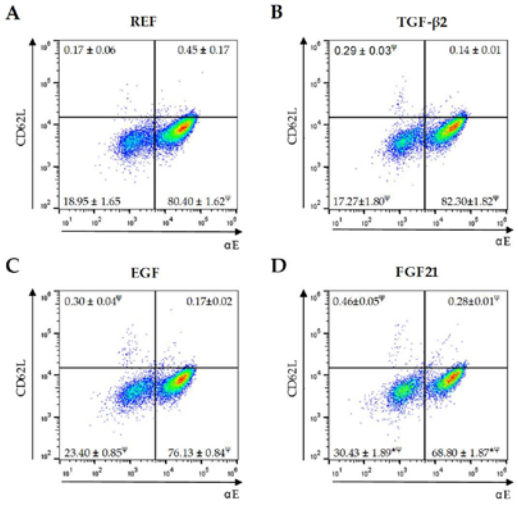


Figure 5. Surface expression of αE integrin and CD62L selectin in IELs at 21 days of life. CD62L/αE integrin surface expression in A) REF group; B) TGF-β2 supplemented animals, C) EGF supplemented animals; and D) FGF21 supplemented animals. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n= 9 pups per group). Statistical differences: *$p<0.05$ *vs.* REF group at same age, $^{\Psi}p<0.05$ *vs.* same group at day 14.

The percentages of integrin αE⁺ cells and selectin CD62L⁺ cells in CD8⁺, CD4⁺ and CD8⁺CD4⁺ were further studied (data not shown). As expected, all studied groups also showed age-associated changes in αE and CD62L expressions in the CD8⁺ subset ($p<0.05$ day 21 *vs.* day 14). However, only the EGF supplementation was able to induce changes with respect to the REF group, thus, an increase (~48%) in the proportion of αE⁻CD62L⁻ in CD8⁺ subset and a decrease (~4%) in the overall presence of αE molecules in CD8⁺ at day 21 ($p<0.05$ *vs.* REF group) was observed.

In addition, no changes due to supplementation were observed in the presence of either αE or CD62L molecules in the CD4⁺ cells with respect to REF group. Regarding the αE/CD62L pattern in CD8⁺CD4⁺ cells, only the supplementation with FGF21 increased the proportion of αE⁺CD62L⁺ (~36%) and also decreased that of αE⁺CD62L⁻ (48%) with respect to REF group at 21 days (data not shown, $p<0.05$).

Finally, we also determined the overall CD25 and TLR4 surface expression of the isolated lymphocytes at 14 days of life (data not shown) and at 21 days of life (Figure 6). In the case of CD25 all the supplementations induced changes with respect to 14 days whereas no changes due to age were observed in the REF group. With regard to TLR4⁺ cells, only the supplementation with FGF21 induced a slight increase in its proportion ($p<0.05$ *vs.* REF group at 21 days, Figure 6).

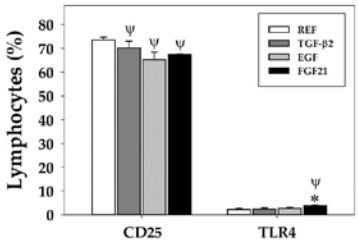


Figure 6. Percentage of CD25 and TLR4 in IELs at 21 days of life. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n= 9 pups per group). Statistical differences: *$p<0.05$ *vs.* REF group at same age, ᵠ$p<0.05$ *vs.* same group at day 14.

4. Discussion

Newborns have an immature intestine with an underdeveloped barrier function. In the first days of life large quantities of macromolecules cross the epithelium into systemic circulation, involving high susceptibility to infective agents and even increasing the chances to develop necrotizing enterocolitis [26]. For that reason, it is essential that the newborn intestinal barrier and immunity matures fast and appropriately.

In general, it is known that certain bioactive compounds present in breast milk play an important role in the development of the gastrointestinal (GI) tract [11]. For instance, EGF, a molecule clearly involved in the intestinal growth [27], TGF-β2, a key cytokine regulating immune tolerance [28] and FGF21, a recent factor with metabolic functions in the early life described to be present in breast milk [19], may participate in this maturation process. The presence of specific receptors (EGFR/ErbB1, TGFβRI/TGFβRII and FGFR1-4, respectively) found in the newborn intestinal epithelium reinforces a local role in the intestine [12]. In this context, the present study was designed to determine the effect of TGF-β2, EGF and FGF21 on the development of the intestinal growth, barrier function and the intestinal effector immune response, by means of IEL evaluation during and at the end of the suckling period.

As a general view, none of the interventions with the bioactive factors assayed were able to impact the intestinal growth in terms of weight and length or histological analysis. Although there is no abundant literature about TGF-β2 or FGF21 on intestinal development, it is widely accepted that

EGF has an important function in early development of the intestinal architecture by increasing villi height, crypt depth, etc., in different animal models (pigs, rabbits, mice, rats) [27]. In our study EGF did not induce such changes, however, it has to be taken into account that in the case of rats, some of these effects have been described after receiving EGF by a non-physiological route such as the intraperitoneal one [29]; or using oral administration of EGF in concentrations that exceed its physiological concentration in rodent milk [30] which may explain such differences reported in the literature.

Regarding the maturation of the intestinal functionality, the present study shows that, using the suckling rat as a model, the intestinal barrier function by means of the permeability experiments performed, is still in development during the first two weeks of life. These results are in agreement with previous studies showing that suckling rats at the end of their suckling period have gut closure followed by a marked permeability decrease, in addition to an intestinal lymphocyte development during the suckling period [10, 31-33]. Moreover, our results reinforce the existence of a functional immaturity in the middle of the suckling period (14 days) which is associated to lower gene expression of TJ proteins (occludin, ZO-1 and claudin-4) and secretory mucin genes (MUC-2 and MUC-3) with respect to weanling rats. These results are also in line with previous results in rodents, but also humans, which have increased TJs protein expression throughout early life inducing a barrier function maturation [34]. Thus, we consider that this particular period, might be adequate to study the influence of external factors, such as dietary components, in the intestinal barrier function.

The first aim of this study was to determine if the supplementation with these bioactive breast milk factors participate in the maturation of the neonatal intestinal barrier. On the one hand, it is known that after birth, breast milk have an important role in enhancing intestinal growth and function in various neonatal animal models [30], process in which the formation of TJs is a key step for the enhancement of the epithelial barrier [35]. Although the supplementations with the breast milk factors in our study did not have a significant effect on permeability or TJ gene expression or localization, other studies have shown that TGF-α and EGF are able to decrease gut permeability by increasing the expression of TJs proteins [27, 36, 37]. On the other hand, as showed in our results, the mucin production ability associated to age in early life seems to be enhanced by EGF supplementation, but not with the other factors. Specifically, MUC-3 gene expression is increased in the EGF group after 10 days of supplementation. In line with this, it has been described a positive association between TNF-α and MUC-3 mRNA expression in mice ileal samples at 14 days of life [38] and lower expression in patients with alterations in the protective function of the intestine such as in the case of the Chrohn's disease patients [39]. Thus, according to these data, we could infer that MUC-3 increase might be caused by higher TNF-α levels in the GALT. In this case, as stated in a previous study performed in our group, EGF supplementation is able to increase TNF-α production by MLNs cells in suckling rats [14] which could explain the rise in the MUC-3 gene expression observed in the present study. For the other breast milk factors, the lack of effect of TGF-β2 and FGF21 supplementations on intestinal permeability, TJs gene expression and localization cannot be discussed due to the absence of literature, thus further investigation should be performed to corroborate our findings.

In addition to the developmental epithelial barrier function study, we have determined the expression of FcRn and BLIMP-1, two genes that are present in the early postnatal intestinal epithelium which expression is used for intestinal maturation assessment [40-42]. In rodents, their expression decreases throughout the suckling period and is minimum at weaning, suggesting that these molecules may not be functional in the adult rodent gut and therefore are specific during this particular period [40, 42]. On the one hand, FcRn acts as the intestinal IgG receptor, that allows to bind and transfer this particular Ig from the gut lumen to the systemic circulation and thereby, the levels of FcRn expression determine the serum concentration of IgG in pups' plasma [43]. On the other hand, some studies suggest that BLIMP-1 is a regulating-element in gut maturation [40]. Globally, their expressions were not affected by the supplementations with exception of the group receiving FGF21, in which a significant decrease in the expression of FcRn was observed. It can be suggested then, that this factor is accelerating the gut maturation process that is accompanied with

493 the reduction in the expression of this IgG receptor. Parallel studies evaluating the impact of FGF21
494 on systemic immune response using this model did not show though an impact on the overall plasma
495 IgG levels at the end of suckling.
496 Finally, for an effective gate-keeper function development of the intestinal epithelium it is also
497 necessary an acquisition of adult-like TLR signaling [44]. In order to evaluate that, we determined
498 the relative expression of TLR-2,-4,-5,-7,-9 and the impact of the three studied breast milk bioactive
499 factors. Only the supplementation with EGF was able to show a down-modulatory effect on TLR-9
500 gene expression at 21 days of life. On the contrary, the expression of TLR-9 in samples of small
501 intestine of Swiss Webster mice is increased with age [45], thus promoting more intense immune
502 responses. In addition, this study demonstrated at in vitro and in vivo levels that the activation of
503 TLR9 with CpG-DNA limits TLR4 signaling in enterocytes and reduces the severity and the extent of
504 an experimental NEC [45]. Taking all these information into account, our results are in line with the
505 participation of EGF in the prevention of inflammatory disorders in early life such as NEC, when the
506 intestinal mucosa is still in development.
507 The GALT development process during suckling is also well documented in humans [46] and
508 even more exhaustively in rodents [47]. Specifically, the number of IELs in rats expands after birth
509 [47] and the proportion of IEL subsets shows an age-dependent maturation process [47]. It is
510 suggested that IELs, besides participating in effector and regulatory immune responses, can
511 participate in tissue surveillance and maintenance of barrier function [8, 48]. Thus, or aim was to also
512 evaluate the effect of the supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 in this part of the intestinal
513 defense.
514 In agreement with previous findings [10, 47, 49-51], our study shows that the main IEL subsets
515 are NK and NKT cells. In fact, it has been suggested that the predominance of both NK and NKT cell
516 subpopulations in the small intestinal epithelium is characteristic in rat early life, much more than in
517 adults, and therefore suggesting a protective role during the suckling period [10, 47, 52].
518 With regard to NK cells, here it is shown that their proportion is high and invariable with age
519 over suckling, which corroborated our previous findings [10, 52]. However, EGF and FGF21
520 supplementations increased such proportion at the end of the suckling period, suggesting a
521 potentiation of the innate immunity at this stage. This effect was not accompanied with changes in
522 the co-expression of CD8 in their surface, a marker mostly present during suckling, but not later in
523 NK cells, which has been ascribed to a characteristic intestinal phenotype [10, 47, 52]. With respect to
524 intraepithelial NKT cells, this study did not show a clear age-decreasing pattern obtained previously
525 in our group that even arrived to lower values of 1% of IEL in adult rats [52]. However, the
526 supplementation with all three bioactive factors did show that pattern and, in addition, EGF and
527 FGF21 even down regulated the CD8 surface molecule. These overall findings on NK and NKT
528 lineages may suggest that the supplementation with these bioactive factors, and specifically with EGF
529 and FGF21, may reflect a higher immune maturation of IELs in the small intestine.
530 In addition to the cells involved in the innate immune responses in early life, T cells are also a
531 major population in the IEL compartment during this period, without changes in proportion during
532 the last week of suckling, as observed in previous studies [10, 49-51]. Regarding the interventions
533 and similar to the effect of EGF and FGF21 on the NKT cells, these active factors also induced lower
534 T cell proportion at the end of the suckling period with respect to day14. However, it is known that
535 intestinal T cells are highly heterogeneous and are distinguished based on T-cell surface receptors
536 TCRγδ or αβ, αα or αβ chains on the CD8 molecule or the CD4 membrane co-receptor [53, 54]. In
537 fact, the T cell age-decreasing pattern found here after EGF and FGF21 supplementation during
538 suckling is associated to a reduction in TCRαβ and CD8 stainings, without affecting TCRγδ or CD4
539 cell subsets. On the contrary, $CD4^+$ cell proportion raised in the FGF21 group at the end of suckling.
540 The most remarkable result to emerge from the data is that the supplementation with TGF-β2
541 was able to increase the proportion of T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$ cells at 14 days with respect to REF animals. It
542 has been previously described that this T cell subset colonize the epithelium the first days of life and
543 has an important immunoprotective and immunoregulatory role in this period [55]. To date, preterm
544 infants with NEC have lower levels of T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$ cells with respect to term infants [56] and the

loss of this subset could represent a disproportional lack of immune regulatory function in the IEL compartment [57]. Thus, it can be hypothesized that the action of this important subset in early life may be driven by TGF-β2 pathways.

Continuing with the idea of phenotypical diversity of IELs, and focusing on CD8 expression, we found a clear process in which the CD8αβ phenotype domains during early suckling were later substituted by a high proportion of CD8αα cells, indicating a clear developmental pattern of the CD8αα/CD8αβ ratio, partially in agreement with previous studies [10]. This developmental change is even potentiated in those animals receiving EGF and FGF21 supplementations, but not those administrated with TGF-β2. Thus, the first both bioactive breast milk factors seem to be acting on the maturation of IEL, overall promoting a CD8 phenotype more typical from the intestine (CD8αα).

One of the molecules mediating the selective localization or intestinal retention of IELs is the integrin αE (CD103) [58]. The αE integrin mediates T cell adhesion to epithelial cells through its binding to E-cadherin (CD62L), a member of the cadherin family of adhesion molecules that is expressed selectively on epithelial cells [58]. It is known that αE integrin is widely expressed on intestinal IELs in both humans and rodents [24, 51, 58]. The supplementation with TGF-β2 during two weeks induced higher levels of $\alpha E^{+}CD62L^{-}$ cell phenotype, which is the predominating during life. This effect is in line with previous studies suggesting that TGF-β can be involved in αE expression at the surface of IELs [7, 59].

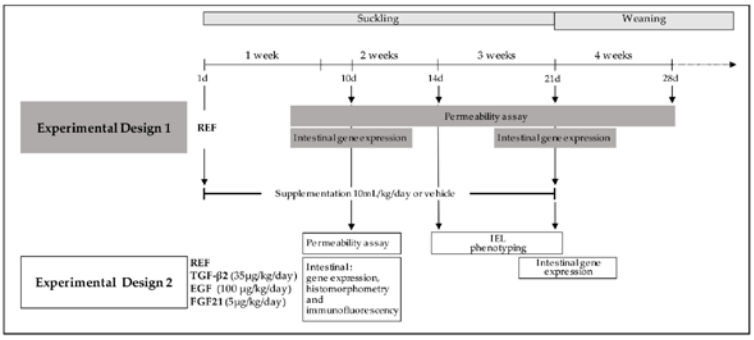
On the other hand, FGF21 seems to negatively influence the proportion of $\alpha E^{+}CD62L^{-}$ cells after 21 days of supplementation. In a study conducted in adult αE deficient mice, the results showed that this molecule is a key homing actor for T cells, particularly for T $TCR\alpha\beta^{+}$ cells with respect to T $TCR\gamma\delta^{+}$ [58]. In line with this, our results showed a lower $\alpha E^{+}CD62L^{-}$ cell proportion in the FGF21 group at day 21 which may be linked to the lower T $TCR\alpha\beta^{+}$ cell proportion also found that day.

Finally, in the current study, the TLR4 surface expression on IELs was also studied, and very low proportion of IEL were positive for such marker. The low presence of this molecule lends support to previous findings reported in suckling rats at birth [60] and in the IELs surface at the end of suckling [51]. In regard to the interventions performed, the supplementation with FGF21 during 21 days was associated with an increase in the proportion of $TLR4^{+}$ IELs. This effect could be explained by the fact that TLR4 expression in both enterocytes and immune cells might increase in response to stressors such as formula feeding and asphyxia stress [61]. In this sense, FGF21 has been considered as a stress hormone in several pathological conditions [62, 63] thus the plausible explanation of the effect of FGF21 on TLR4 may be that FGF21 is acting as a stress inductor in this context to potentiate immune responses, which are still not fully orchestrated in early life.

5. Conclusions

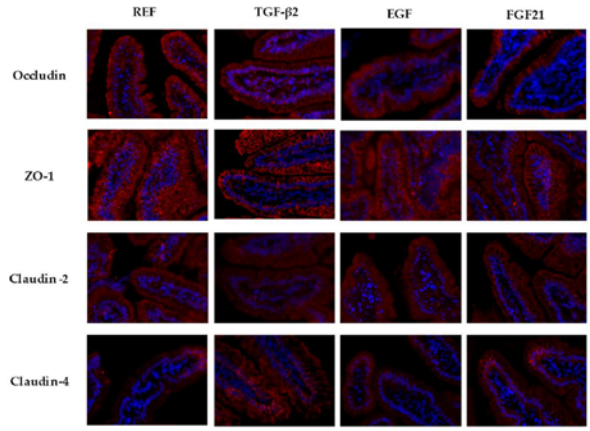
In conclusion, our study demonstrates the ability of TGF-β2, EGF and FGF21 to modulate the neonatal maturation of the intestinal barrier function and the IELs composition. On the one hand, the intestinal immunomodulatory action of FGF21 has been described for the first time here, thus further studies should target this GF to better understand its role in the immune system. On the other hand, these results reinforce the role of the bioactive factors present in breast milk in the development of the intestine and immunity. Further work is needed to fully understand the implications of these factors during suckling, and mainly in the first days of life. Overall, this study opens the door to further experimental studies performed in a population with underdeveloped barrier function such as preterm newborns, when the immaturity of the immune system is more remarkable.

588 **Supplementary Materials:** The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1.



589

590 **Supplementary Figure 1.** Experimental design. Experimental design 1 corresponds to REF animals and
591 Experimental design 2 corresponds to supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21.



592

593 **Supplementary Figure 2.** Immunohistochemical staining of occludin, ZO-1, claudin-2, -4 in rat distal
594 small intestine at 10 days of life in all experimental groups (REF, TGF-β2, EGF and FGF21). DAPI
595 stained nuclei (blue) and in red the different proteins assayed. Images taken at 400 x.

596 **Author Contributions:** The authors' contributions were as follows: À.F., M.C., M.J.R.-L. and FJ.P-C conceived
597 and designed the research; all authors carried out the experiments; B.G-P, P.T.-C., F.J.P.-C. and À.F. analysed
598 and interpreted the results; P.T.-C. and F.J.P.-C. contributed to the initial draft of the manuscript; all authors
599 were involved in the critical revision of the manuscript; À.F and FJ.P-C have primary responsibility for the final
600 content. All authors have read and approved the final version of the manuscript for publication.

601 **Funding:** This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and
602 Competitiveness (AGL2013-48459-P). P.T.-C. holds a fellowship from the National Secretary of Higher
603 Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT-DMPF-2015-1666-CO). B.G.-P. holds a
604 fellowship from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2014-068134).

605 **Acknowledgments:** In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author
606 contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind
607 (e.g., materials used for experiments).

608 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

References

1. Santaolalla, R.; Abreu, M.T. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* **2012**, *28*, 124-129.
2. Vitale, S.; Picascia, S.; Gianfrani, C. The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes. *Mol Cell Pediatr* **2016**, *3*, 20.
3. Ma, T.Y.; Nighot, P.; Al-Sadi, R. Chapter 25 - Tight junctions and the intestinal barrier. In *Physiology of the gastrointestinal tract* sixth ed.; Said, H.M., Ed. Academic Press: 2018; pp. 587-639.
4. Peterson, L.W.; Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14*, 141-153.
5. Kurashima, Y.; Goto, Y.; Kiyono, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur J Immunol* **2013**, *43*, 3108-3115.
6. Isani, M.A.; Delaplain, P.T.; Grishin, A.; Ford, H.R. Evolving understanding of neonatal necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* **2018**, *30*, 417-423.
7. Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* **2013**, *70*, 631-659.
8. Mayassi, T.; Jabri, B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol* **2018**, *11*, 1281-1289.
9. Battersby, A.J.; Gibbons, D.L. The gut mucosal immune system in the neonatal period. *Pediatr Allergy Immunol* **2013**, *24*, 414-421.
10. Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; González-Castro, A.M.; Pelegrí, C.; Castell, M.; Franch, A. Developmental changes in intraepithelial T lymphocytes and NK cells in the small intestine of neonatal rats. *Pediatr Res* **2005**, *58*, 885-891.
11. Shelby, R.D.; Cromeens, B.; Rager, T.M.; Besner, G.E. Influence of growth factors on the development of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* **2019**, *46*, 51-64.
12. Schumacher, M.A.; Danopoulos, S.; Al Alam, D.; Frey, M.R. Growth factors in the intestinal tract. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, sixth ed.; Hamid M. Said, Ed. Academic Press: 2018; 10.1016/b978-0-12-809954-4.00003-7pp. 71-101.
13. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **1993**, *123*, 1939-1951, doi:10.1093/jn/123.11.1939.
14. Torres-Castro, P.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats. *Nutrients* **2018**, ***10***, E1171.
15. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br J Nutr* **2018**, ***119***, 486-495.
16. Rigo-Adrover, M.D.M.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preventive effect of a synbiotic combination of galacto- and fructooligosaccharides mixture with *Bifidobacterium breve* M-16V in a model of multiple rotavirus infections. *Front Immunol* **2018**, **9**, 1318.
17. Maynard, A.A.; Dvorak, K.; Khailova, L.; Dobrenen, H.; Arganbright, K.M.; Halpern, M.D.; Kurundkar, A.R.; Maheshwari, A.; Dvorak, B. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2010**, ***299***, G614-622.
18. Penttila, I.A.; Van Spriel, A.B.; Zhang, M.F.; Xian, C.J.; Steeb, C.B.; Cummins, A.G.; Zola, H.; Read, L.C. Transforming growth factor-β levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res* **1998**, ***44***, 524-531, doi:- 10.1203/00006450-199810000-00010 L1 - file:///C:/Users/AIT2018/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Penttila et al. - 1998 - Transforming growth factor-β levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum.pdf.
19. Gavaldà-Navarro, A.; Hondares, E.; Giralt, M.; Mampel, T.; Iglesias, R.; Villarroya, F. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep* **2015**, ***5***, 13717.
20. Penttila, I.A.; Flesch, I.E.; McCue, A.L.; Powell, B.C.; Zhou, F.H.; Read, L.C.; Zola, H. Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups. *Gut* **2003**, ***52***, 1579-1586.

21. Grases-Pintó, B.; Torres-Castro, P.; Marín-Morote, L.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Leptin and EGF supplementation enhance the immune system maturation in preterm suckling rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 2380.
22. Grases-Pintó, B.; Torres-Castro, P.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. A preterm rat model for immunonutritional studies. *Nutrients* **2019**, *11*, 999.
23. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Supplementation with 2'-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, *8*, 372.
24. Camps-Bossacoma, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Untersmayr, E.; Castell, M. Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. *J Nutr Biochem* **2017**, **42**, 182-193.
25. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408.
26. Anderson, R.C.; Dalziel , J.E.; Gopal, P.K.; Bassett, S.; Ellis, A.; Roy, N.C. The role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis. In *Colitis*, M, F., Ed. 2012; pp. 3-30.
27. Tang, X.; Liu, H.; Yang, S.; Li, Z.; Zhong, J.; Fang, R. Epidermal growth factor and intestinal barrier function. *Mediators Inflamm* **2016**, ***2016***, 1927348.
28. Sanjabi, S.; Oh, S.A.; Li, M.O. Regulation of the immune response by TGF-β: from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2017**, **9**, a022236, doi:-10.1101/cshperspect.a022236 L1 - file:///C:/Users/AIT2018/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Sanjabi, Oh, Li - 2017 - Regulation of the immune response by TGF-β from conception to autoimmunity and infection.pdf.
29. Hormi, K.; Lehy, T. Transforming growth factor-alpha in vivo stimulates epithelial cell proliferation in digestive tissues of suckling rats. *Gut* **1996**, *39*, 532-538.
30. Berseth, C.L. Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am J Physiol* **1987**, *253*, G662-665.
31. Cummins, A.G.; Steele, T.W.; LaBrooy, J.T.; Shearman, D.J. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut* **1988**, *29*, 1672-1679.
32. Thompson, F.M.; Mayrhofer, G.; Cummins, A.G. Dependence of epithelial growth of the small intestine on T-cell activation during weaning in the rat. *Gastroenterology* **1996**, *111*, 37-44.
33. Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Marín-Gallén, S.; Franch, A.; Castell, M. Neonatal immunoglobulin secretion and lymphocyte phenotype in rat small intestine lamina propria. *Pediatr Res* **2005**, *58*, 164-169.
34. Turfkruyer, M.; Verhasselt, V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis* **2015**, **28**, 199-206.
35. Coursodon, C.F.; Dvorak, B. Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* **2012**, *24*, 160-164.
36. Clark, J.A.; Doelle, S.M.; Halpern, M.D.; Saunders, T.A.; Holubec, H.; Dvorak, K.; Boitano, S.A.; Dvorak, B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2006**, *291*, G938-949.
37. Hering, N.A.; Andres, S.; Fromm, A.; van Tol, E.A.; Amasheh, M.; Mankertz, J.; Fromm, M.; Schulzke, J.D. Transforming growth factor-β, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr* **2011**, *141*, 783-789.
38. McElroy, S.J.; Prince, L.S.; Weitkamp, J.H.; Reese, J.; Slaughter, J.C.; Polk, D.B. Tumor necrosis factor receptor 1-dependent depletion of mucus in immature small intestine: a potential role in neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, *301*, G656-666.
39. Buisine, M.P.; Desreumaux, P.; Debailleul, V.; Gambiez, L.; Geboes, K.; Ectors, N.; Delescaut, M.P.; Degand, P.; Aubert, J.P.; Colombel, J.F., et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **1999**, *5*, 24-32.
40. Arévalo Sureda, E.; Weström, B.; Pierzynowski, S.G.; Prykhodko, O. Maturation of the intestinal epithelial barrier in neonatal rats coincides with decreased FcRn expression, replacement of vacuolated enterocytes and changed Blimp-1 expression. *PLoS One* **2016**, *11*, e0164775.
41. Rodewald, R.; Kraehenbuhl, J.P. Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol* **1984**, *99*, 159s-164s.

42. Muncan, V.; Heijmans, J.; Krasinski, S.D.; Büller, N.V.; Wildenberg, M.E.; Meisner, S.; Radonjic, M.; Stapleton, K.A.; Lamers, W.H.; Biemond, I., et al. Blimp1 regulates the transition of neonatal to adult intestinal epithelium. *Nat Commun* **2011**, *2*, 452.
43. Roopenian, D.C.; Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 715-725.
44. Nguyen, M.; Leuridan, E.; Zhang, T.; De Wit, D.; Willems, F.; Van Damme, P.; Goldman, M.; Goriely, S. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. *PLoS One* **2010**, *5*, e10407.
45. Gribar, S.C.; Sodhi, C.P.; Richardson, W.M.; Anand, R.J.; Gittes, G.K.; Branca, M.F.; Jakub, A.; Shi, X.H.; Shah, S.; Ozolek, J.A., et al. Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* **2009**, *182*, 636-646.
46. Nagatake, T.; Kunisawa, J.; Kiyono, H. Lymphoid tissues associated with gastrointestinal (GI) mucosa. In *Lymph Node Metastasis in Gastrointestinal Cancer*, Natsugoe, S., Ed. Springer Singapore: Singapore, 2019; pp. 111-126.
47. Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castellote, C.; Castell, M. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin Dev Immunol* **2012**, *2012*, 537310.
48. Shea-Donohue, T. Chapter 26 - Gut barrier: adaptive immunity. In *Physiology of the gastrointestinal tract* sixth ed.; Said, H.M., Ed. Academic Press: 2018; pp. 641-661.
49. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Burleigh, S.; Fåk Hållenius, F.; Prykhodko, O.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Influence of leptin and adiponectin supplementation on intraepithelial lymphocyte and microbiota composition in suckling rats. *Front Immunol* **2019**, *10*, 2369.
50. Pérez-Cano, F.J.; Marín-Gallén, S.; Castell, M.; Rodríguez-Palmero, M.; Rivero, M.; Franch, À.; Castellote, C. Bovine whey protein concentrate supplementation modulates maturation of immune system in suckling rats. *Br J Nutr* **2007**, *98*, S80-S84.
51. Rigo-Adrover, M.D.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preclinical immunomodulation by the probiotic *Bifidobacterium breve* M-16V in early life. *PLoS One* **2016**, *11*, e0166082.
52. Marín-Gallén, S.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M.; Castellote, C.; Franch, A. Intestinal intraepithelial NK and NKT cell ontogeny in Lewis rats. *Dev Comp Immunol* **2008**, *32*, 1405-1408.
53. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 331-341.
54. Sheridan, B.S.; Lefrançois, L. Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect. *Curr Gastroenterol Rep* **2010**, *12*, 513-521.
55. Gibbons, D.L.; Haque, S.F.; Silberzahn, T.; Hamilton, K.; Langford, C.; Ellis, P.; Carr, R.; Hayday, A.C. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol* **2009**, *39*, 1794-1806.
56. Weitkamp, J.H.; Rosen, M.J.; Zhao, Z.; Koyama, T.; Geem, D.; Denning, T.L.; Rock, M.T.; Moore, D.J.; Halpern, M.D.; Matta, P., et al. Small intestinal intraepithelial TCRγδ+ T lymphocytes are present in the premature intestine but selectively reduced in surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One* **2014**, *9*, e99042.
57. Bhagat, G.; Naiyer, A.J.; Shah, J.G.; Harper, J.; Jabri, B.; Wang, T.C.; Green, P.H.; Manavalan, J.S. Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 281-293.
58. Schön, M.P.; Arya, A.; Murphy, E.A.; Adams, C.M.; Strauch, U.G.; Agace, W.W.; Marsal, J.; Donohue, J.P.; Her, H.; Beier, D.R., et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* **1999**, *162*, 6641-6649.
59. Kang, S.G.; Park, J.; Cho, J.Y.; Ulrich, B.; Kim, C.H. Complementary roles of retinoic acid and TGF-β1 in coordinated expression of mucosal integrins by T cells. *Mucosal Immunol* **2011**, *4*, 66-82.
60. Caplan, M.S.; Simon, D.; Jilling, T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* **2005**, *14*, 145-151.
61. Leaphart, C.L.; Cavallo, J.; Gribar, S.C.; Cetin, S.; Li, J.; Branca, M.F.; Dubowski, T.D.; Sodhi, C.P.; Hackam, D.J. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* **2007**, *179*, 4808-4820.
62. Thiessen, S.E.; Vanhorebeek, I.; Derese, I.; Gunst, J.; Van den Berghe, G. FGF21 response to critical illness: effect of blood glucose control and relation with cellular stress and survival. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100*, E1319-1327.
63. Kim, K.H.; Lee, M.S. FGF21 as a stress hormone: the roles of FGF21 in stress adaptation and the treatment of metabolic diseases. *Diabetes Metab J* **2014**, *38*, 245-251.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

768

ARTÍCULO 3

"Modulation of the systemic immune response in suckling rats by breast milk TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation"

Paulina Torres-Castro, Blanca Grases-Pintó, Mar Abril-Gil, Margarida Castell, María J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch

British Journal of Nutrition **(en revisión)**

Enviado: 30/10/2019 referencia: BJN-RA-19-1073

Índice de impacto (2018): 3,319
Categoría: 34/87 (Q2) en *NUTRITION & DIETETICS*

Los resultados del presente artículo han estado presentados en las siguientes comunicaciones a congresos:

- *Effect of growth factors supplementation on the antibody immune response in suckling rats*. Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Rodríguez-Lagunas, M.J; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. Xè Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), noviembre 2016.

- *Functionality of spleen lymphocytes from suckling rats is modulated by breast milk growth factors*. Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Abril-Gil, M; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. XI International Conference on Immunonutrition (Londres), septiembre 2018. Publicación: *Ann Nutr Metab,* 2017; 71: 31–79. (doi: 10.1159/000478672).

- *Spleen lymphocytes cell composition is modulated by breast milk growth factors.* Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Abril-Gil, M; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. XII Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), noviembre 2018.

RESUMEN

Objetivo: Determinar si la suplementación con el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) -compuestos presentes en la leche materna- promueve la maduración del sistema inmunitario sistémico de ratas lactantes.

Material y métodos: Se suplementaron ratas Wistar recién nacidas, diariamente, con los factores de crecimiento mencionados, mediante una sonda oral durante todo el período de lactancia (21 días de vida). Los días 14 y 21 de vida, se obtuvo plasma para la cuantificación de inmunoglobulinas (Ig) y se aislaron linfocitos esplénicos, con el fin de determinar su fenotipo celular y su funcionalidad linfocitaria -capacidad proliferativa y secreción de citocinas- tras ser estimulados.

Resultados: La suplementación con estos factores bioactivos ejerce una función clave en el desarrollo del sistema inmunitario sistémico. A los 14 días de vida, se observó que el suplemento con EGF es capaz de incrementar la proporción de linfocitos B a valores correspondientes a animales de 21 días de edad. Al final del período de lactancia (día 21), los tres factores de crecimiento aumentaron la concentración plasmática de los isotipos IgG1 e IgG2a (asociados a una respuesta de tipo Th2) Además, el suplemento con FGF21 logró equilibrar el patrón de citocinas Th1/Th2. Finalmente, la administración de EGF y FGF21 modificó la composición de linfocitos en tejido esplénico.

Conclusión: La suplementación diaria con estos factores bioactivos de leche materna, principalmente EGF y FGF21, ejerce una función moduladora de la respuesta inmunitaria sistémica en las primeras etapas de vida.

British Journal of Nutrition

Modulation of the systemic immune response in suckling rats by breast milk TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation

Journal:	*British Journal of Nutrition*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Torres-Castro, Paulina; University of Barcelona, Dept. of Physiology Grases-Pintó, Blanca; University of Barcelona, Dept. of Physiology Abril-Gil, Mar (Maria del Mar); University of Barcelona, Dept. of Physiology Castell Escuer, Margarida; University of Barcelona, Dept. of Physiology Rodriguez-Lagunas, Maria ; University of Barcelona, Dept. of Physiology Pérez-Cano, Francisco; University of Barcelona, Dept. of Physiology Franch Masferrer, Àngels; University of Barcelona, Dept. of Physiology
Keywords:	Growth factors, systemic immunity, neonatal rats, breast milk
Subject Category:	Nutritional Immunology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Cambridge University Press

Modulation of the systemic immune response in suckling rats by breast milk TGF-β2, EGF and FGF21 supplementation

Paulina Torres-Castro[1,2], Blanca Grases-Pintó[1,2], Mar Abril-Gil[1,2], Margarida Castell[1,2], María J. Rodríguez-Lagunas[1,2], Francisco J. Pérez-Cano[1,2]*, Àngels Franch[1,2]

[1] Section of Physiology, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

[2] Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

***Corresponding author:** Francisco J. Pérez-Cano, Section of Physiology, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, Av. Joan XXIII 27-31, 08028-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 05. (email: franciscoperez@ub.edu)

Short Title: Milk growth factors and neonatal immunity

Key words: Growth factors, breast milk, neonatal rats, systemic immunity

For Review Only

ABSTRACT

Neonatal immune responses are functionally deficient and less competent compared to those of adults, which increases the risk of infections. Breast milk is a rich fluid containing bioactive compounds such as specific growth factors (GF) that contribute to the maturation of the immune system in early life. The aim of this study was to determine whether the transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 21 (FGF21), compounds present in breast milk, could promote systemic immune maturation. For this purpose, newborn Wistar rats were daily supplemented with these GF by oral gavage during the suckling period (21 days of life). At day 14 and 21 of life, plasma for Ig quantification was obtained and spleen lymphocytes were isolated, immunophenotyped and cultured to evaluate their ability to proliferate and release cytokines. Results showed that the supplementation with these GF plays a key role in immune system development. The main result was obtained at day 14 when supplementation with EGF increased B cell proportion to levels reached at day 21. At the end of the suckling period, all GF increased the plasma levels of IgG1 and IgG2a isotypes, FGF21 balanced the Th1/Th2 cytokine response, and only EGF along with FGF21 modified the spleen lymphocyte composition. These results suggest that these milk bioactive factors - mainly EGF and FGF21- have a modulatory role in the systemic immune responses in early life.

For Review Only

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) recommends exclusive breastfeeding during the first months of life[1]. Breastfeeding is the natural way of providing newborns with the nutrients they need for healthy growth and development, and plays a major role in infectious disease prevention, with less than half of the mortality rate being attributed to common infections.

Breast milk has a perfect and dynamic composition of nutrients and bioactive factors involved in the baby's protection[2,3,4]. It changes from colostrum through to transitional milk to mature milk, colostrum being the first fluid produced by mothers after delivery, transitional milk produced in the middle lactation period and finally the mature milk, which lasts until the end of the lactation period[2,5,6]. All three types of breast milk have different characteristics in terms of volume, appearance and composition[7]. Whereas colostrum has the highest concentration of immune factors, transitional milk, while different to mature milk, shares some of its characteristics because it is produced in a critical period to allow the nutritional and functional requirements of the rapidly developing newborn[5, 8].

Breast milk has many bioactive factors, such as oligosaccharides, hormones, enzymes, immunoglobulins, lactoferrin, growth factors (GF), cytokines, anti-inflammatory agents and microorganisms. Although they are not fully understood they are implicated in a wide range of benefits for the neonate and probably in the prevention of some diseases, such as asthma, atopy, diabetes, obesity, and inflammatory bowel disease[9,10,11]. These components of immunity are transferred to the newborn from the mother, providing an ideal environment that protects against infection and helps in the development of the infant intestinal mucosa, microbiota and their own immunologic defences[12]. Thus, some of these components are being developed and tested for potential medical applications as prophylactic or therapeutic treatments[5].

In particular, breast milk GF have diverse effects on the intestinal tract, vasculature, nervous system and endocrine system of babies[5]. Breast milk contains a large number of GF and in high concentrations, which change in each lactation period[5,13]. The transforming growth factor (TGF)-β family constitutes the most abundant cytokine of breast milk, and consists of three isoforms (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3)[14,15,16]. Although human breast milk contains all the isoforms, 95% comprises TGF-β2, and its levels are higher in early milk, and are reduced towards weaning[17,18]. TGF-β in breast milk is associated with oral tolerance induction in the newborn through IgA antibody production modulation and its participation in the differentiation of regulatory T cells[19,20].

For Review Only

Epidermal growth factor (EGF) is detected in many body fluids, including colostrum and milk[21]. EGF is also one of the most abundant GF in the milk, more than 500 times higher than other GF[22], and its concentration decreases during lactation, with its average levels in colostrum being 2000-fold higher than in mature milk[5]. EGF plays a role in the prevention of necrotizing enterocolitis (NEC), the downregulation of proinflammatory cytokines, the upregulation of anti-inflammatory cytokines and in the maintenance of the intestinal barrier function[4,12]. Moreover, it is involved in cellular proliferation and maturation, and acts in conjunction with other immune factors to assist in the development of gut-associated lymphoid tissue (GALT)[4].

Finally, fibroblast growth factor 21 (FGF21) has been found in human, rat and mouse breast milk, having in humans levels that do not differ significantly between colostrum and mature milk[23]. In neonates, FGF21 is responsible of the induction of brown adipose tissue (BAT) thermogenesis, which is a key process in the adaptation of neonates to the extrauterine environment[24] and recent findings reveal that FGF21 is involved in controlling neonatal mice digestive and endocrine function in developing intestine[23].

In a previous study, we have demonstrated that supplementation with EGF, TGF-β2 and FGF21 is able to promote intestinal lymphocyte maturation in newborn suckling rats[25]. We hypothesized that they could also have an additional developmental role, at the systemic immune level. In this context, the main objective of this study was to determine whether daily supplementation with these three GF could promote systemic immune development during (day 14) and at the end (day 21) of the suckling period.

METHODS

Animals

Sixteen G15 pregnant Wistar rats (RjHan:WI, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were individually housed in cages under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 h light:dark cycle until they delivered naturally in the animal facilities of the Faculty of Pharmacy and Food Science. They were fed a commercial diet corresponding to the American Institute of Nutrition 93M formulation[26] (Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, USA) and water *ad libitum*. The studies were performed in accordance with the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the

For Review Only

University of Barcelona (UB) and by the Catalonia Government (CEEA-UB Ref. 220/15, DAAM 8521).

Experimental design

The experimental design and sample size was in line with previous studies[25,27]. The day after birth was registered as day 1 of life, and litters were unified to nine pups per lactating mother and randomly distributed into four experimental groups: Reference group (REF), transforming growth factor-β2 group (TGF-β2), epidermal growth factor group (EGF) and fibroblast growth factor group (FGF21) (n= 27 pups/group), in order to investigate the effects of these GF on systemic immune response.

Daily, during the suckling period (from 1 to 21 days of life), all pups were identified, weighed and supplemented by oral gavage with a volume of 10 mL/kg/day of the GF of interest. The pups were separated from their mothers 30 min before oral administration to allow gastric emptying. Handling was done at the same period of the day to avoid modifications in biological rhythms. All these actions were performed as described in previous studies in the group[27, 28].

Dietary supplementation

TGF-β2, EGF and FGF21 groups were supplemented with recombinant human TGF-β2, recombinant rat EGF and recombinant human FGF21 (all from Peprotech®, Rocky Hill, New Jersey). These products were reconstituted in phosphate-buffered solution (PBS, pH 7.2) with 0.1% bovine serum albumin (BSA, SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The dose of TGF-β2 was 35 µg/kg/day, the dose of EGF was 100 µg/kg/day and the dose of FGF21 was 5 µg/kg/day, based on the literature regarding physiological concentrations in breast milk and used in previous studies[13,23,25,29,30]. The REF group received matched volume of the vehicle (1% BSA in PBS) used for diluting the GF.

Sample collection and processing

Samples were collected at two different end points, at day 14 and 21 of life, corresponding to the middle and the end of the rat suckling period, respectively. On these days, pups were anaesthetized intramuscularly with ketamine (90 mg/kg, Imalgene, Merial, Spain) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Spain) and sacrificed by exsanguination. Blood samples were collected by cardiac puncture and then centrifuged (10000 x *g*, 5 min, room temperature). After plasma separation, samples were stored at -20 °C until Ig analysis. Moreover, thymus, spleen and liver were obtained and

For Review Only

weighed. Data is expressed as relative weight (%, organ weight (g)/ 100 g of body weight). Spleen was also collected and stored on ice until processing.

Immunoglobulin quantification

Plasma samples were diluted at 1:10000 for IgA, IgM and IgG isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c) quantification by a commercially available kit (ProcartaPlex Rat Antibody Isotyping Panel, Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, as in previous studies[31]. Mean fluorescence intensities for each analyte in each sample were detected using the MAGPIX instrument (Luminex Corp., Austin, Texas, USA), and the results were analysed using xPONENT software (Luminex Corp.) in the Flow Cytometry Unit of the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiT-UB). Data were expressed as µg/mL. Total IgG was calculated adding up all the isotypes. The quantitative determinations were performed with the following limits of detection: IgG1 1289−940,000 pg/mL, IgG2a 2332−566,667 pg/mL, IgG2b 3155−2300,000 pg/mL, IgG2c 4801−3500,000 pg/mL, IgA 576−420,000 pg/mL, and IgM 233−170,000 pg/mL.

Lymphocyte isolation from spleen

Spleens were obtained, weighed, and placed in complete culture medium containing Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% foetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin streptomycin (PenStrep) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol, all from Merck (Darmstadt, Germany). Then, in sterile conditions the spleens were mashed through a nylon mesh cell-strainer (40 µm, Falcon® Cell Strainers, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and spleen lymphocyte suspensions were obtained after lysis of erythrocytes[32]. Then, cells were centrifuged (500 × *g*, 10 min, 4 °C) and resuspended with complete RPMI medium. Cell counting and viability were determined by an automated cell counter after staining dead cells with trypan blue (CountessTM, Invitrogen, Madrid, Spain) following usual laboratory procedures[33].

Lymphocytes were immediately used to analyse their phenotype and their ability to proliferate and secrete cytokines after mitogen stimulation.

Spleen cells stimulation and proliferation assay

Spleen cells (5 x 10^5 cells/mL) were plated in sterile conditions in 96-well tissue culture plates (TPP®, Trasadingen, Switzerland) pre-incubated (2 h, 37 °C and 5% CO_2) with 200 µL/well of monoclonal antibodies (mAb) anti-CD3 (10 µg/mL) and anti-CD28 (2 µg/mL), both from BD Biosciences (San

For Review Only

Diego, California, USA). A total of eight wells were used for each sample (4 pre-incubated with the mitogenic mAb (stimulated cells, SC) and 4 without the stimuli (non-stimulated cells, NSC). Cells were incubated for 48 h, 37 °C and 5% CO_2. Four hours before the end time of the incubation, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 20 µL/well, Merck) was added in order to measure its incorporation as an indicator of DNA synthesis in a colorimetric immunoassay[25,27].

Afterwards, the culture plates were centrifuged (210 x *g*, 5 min) and supernatants were collected and stored at -80 °C until cytokine analysis. After fixation, the anti-BrdU mAb and peroxidase conjugated anti-BrdU mAb and 3,3,5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were added, following the manufacturer's recommendations of the BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Merck). Colour reaction was measured at a 450 nm wavelength in a spectrometer (Multiskan MS, Labsystems, Finland). Data were expressed as proliferation rate (%), this proliferation rate being = (A/B) x 100, where, A=[(Abs-SC –Abs-NSC) / Abs-NSC] for the supplemented group, and B = [(Abs-SC – Abs-NSC)/ Abs-NSC] for the REF group.

Quantification of cytokine secretion

Supernatants obtained after cell activation were used for quantification of IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ and TNF-α concentrations using a ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay, according to the manufacturer's instructions (eBioscience) and as described above. The quantitative determinations were performed with the following limits of detection: 2.10−8600 pg/mL, 0.85−3500 pg/mL, 14−55,700 pg/mL, 4.35−17,800 pg/mL, and 3.08−12,600 pg/mL, for each cytokine, respectively.

Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis

Lymphocytes from spleen were immunophenotyped by immunofluorescence staining and flow cytometry analysis. The spleen lymphocytes (5×10^5 cells/mL) were stained with anti-rat mAb conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-a protein (PercP), allophycocyanin (APC) or APC-cyanine (Cy)7, as in previous studies[25, 27]. The mAb used in this study were anti-CD4, anti-CD8α, anti-CD8β, anti-TCRαβ, anti-TCRγδ, anti-NKR-P1A, anti-CD45RA and anti-CD25 (all from BD Biosciences), anti- CD103 (αE-integrin) and anti-CD62L (Biolegend, San Diego, USA) and anti-Foxp3 (eBioscience).

Briefly, lymphocyte cells were incubated with a mixture of 10 µL of saturating concentrations of each mouse anti-rat mAb in PBS pH 7.2 containing 2% FBS (Sigma Aldrich) and 0.1% sodium azide (Na_3N, Merck), at 4 °C in darkness for 20 min. Moreover, as T reg were also evaluated as $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$, an extracellular staining with anti-CD4-PE and anti-CD25-FITC mAb was combined with an

For Review Only

intracellular staining with anti-Foxp3-APC mAb by using a fixation/permeabilization specific buffer kit (eBioscience). A negative control staining using an isotype-matched mAb was included in each cell sample. Once the samples were washed, all stained cells were fixed with 0.5% p-formaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) and stored at 4 °C in darkness until analysis by flow cytometry. Analyses were performed in a Gallios™ Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in the Flow Cytometry Unit of the CCiT-UB. The obtained data were assessed with FlowJo version 10 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Results are expressed as percentages of positive cells in the lymphocyte population selected according to their forward- and side-scatter characteristics (FSC/SSC) or in a particular selected subpopulation.

For cell subset differentiation, five different mAb panels were used: Panel 1: TCRαβ/NK/CD8α, Panel 2: CD8α/CD8β/TCRγδ, Panel 3: CD103/CD62L/CD8α/CD4, Panel 4: CD45RA/CD8α/CD4/CD25, and Panel 5: CD25/CD4/Foxp3. With the first panel NK cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^-$) and NKT cells (NKR-P1A$^+$ TCRαβ$^+$) could be differentiated, as well as T TCRαβ$^+$ cells (TCRαβ$^+$ NKR-P1A$^-$), which in combination with the TCRγδ$^+$ cells (obtained from the Panel 2) constituted the total of T cells. B cells (CR45RA$^+$), were identified with Panel 4.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the IBM Social Sciences Software Program (SPSS, version 22.0, Chicago, IL, USA). Levene's and Shapiro–Wilk tests were applied to assess variance equality and normal distribution, respectively. When the results demonstrated equality of variance and normal distribution, a one-way ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc test were performed. Non-parametric tests were performed when normal distribution and equality of variance did not exist. Specifically, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were used to assess significance for independent samples. Significant differences were established at $P < 0{\cdot}05$. All data in the text, tables and figures are expressed as the means ± standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Animal and organ weights

The mean body weight of all suckling rats at 14 and 21 days of life was 34.81 ± 0.63 g and 60.09 ± 0.92 g, respectively, without differences among groups. Likewise, the relative weights of organs

For Review Only

(spleen, thymus and liver) did not differ between the REF group and the supplemented groups' (Supplementary Table 1).

Plasmatic IgG, IgM and IgA concentration

All studied groups increased IgA concentration ($P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14) (Fig. 1c) in an age-dependent manner, but this pattern was not found for IgM or IgG. The rat supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 showed a tendency to increase (~26%) the synthesis of IgG at both 14 and 21 days with respect to the REF group, without significant differences (Fig.1a). No significant differences were found between supplemented groups compared to REF group plasma concentration of IgM and IgA (Fig.1b, 1c).

Plasmatic IgG isotypes concentration

In addition to total levels of IgG, the plasma concentration of each IgG isotype and the Th1/Th2 immune-balance were also studied (Fig. 2). Nutritional supplementations with TGF-β2, EGF and FGF21 increased IgG1 (Fig. 2a) and IgG2a (Fig. 2b) production (Th2-related antibodies in rats[34,35]) without affecting IgG2b (Fig. 2c) and IgG2c (Fig. 2d) synthesis (Th1-related antibodies in rats[34,35]) with respect to the REF group ($P<0{\cdot}05$).

All supplemented groups decreased the Th1/Th2 antibody pattern ratio at day 14 with different percentages of reduction: TGF-β2 (~20%), EGF (~22%) and FGF21 (~34%). This effect was also found at day 21, when supplemented groups reduced the Th1/Th2 ratio by about 29% (TGF-β2), 14% (EGF) and 29% (FGF21). However, only the supplementation with TGF-β2 and FGF21 caused a significant decrease in the Th1/Th2 ratio at both days compared to the REF group ($P<0{\cdot}05$) (Fig. 2e).

Proliferation and cytokine production by spleen lymphocytes

To determine the functional capacity of suckling rats' spleen lymphocytes, we studied their proliferative response and their ability to secrete cytokines induced by anti-CD3 and anti-CD28 mAb during the suckling period (day 14 and 21) (Fig. 3a). Regarding proliferation ability on day 14, the GF supplementations showed no significant differences with respect to the REF group and at 21 days all the supplementations had a tendency to increase the proliferation rate by around 15−24% but without reaching statistical significance.

Concerning cytokine pattern secreted by spleen lymphocytes at days 14 and 21, the supplementations did not induce significant changes compared to the REF group. Only some changes associated with age were observed ($P<0{\cdot}05$) (Fig. 3b−3f). However, after calculating the IFN-γ/IL-4 ratio as an indicator of

For Review Only

the Th1/Th2 balance (Fig. 3g), it was found that the supplementation with FGF21 was the only one able to decrease this ratio at day 21 compared to the REF group ($P<0{\cdot}05$).

Spleen lymphocyte composition

The proportion of the main lymphocyte subsets in the spleen was established during (day 14) and at the end (day 21) of the suckling period (Fig. 4). In suckling rats' splenocytes, B cells constituted the main lymphocyte population followed by T TCR$\alpha\beta^+$ and NK cells, and in a smaller proportion T TCR$\gamma\delta^+$ and NKT cells (Fig. 4).

At day 14, only the supplementation with EGF was able to promote the development of B cells ($P<0{\cdot}05$ *v.* REF group) by increasing its proportion up to levels found in 21-d-old rats (Fig. 4a). Regarding day 21, the supplementation with EGF and FGF21 did not promote maturation, however they induced a significant decrease in the proportion of the main cell subsets such as T, $CD8^+$, $CD4^+$ and NKT lymphocytes (Fig. 4b, 4e, 4f and 4h). Moreover, we calculated the B cell /T cell ratio and all groups showed a value ~4 in both days, and only the supplementation with EGF showed a tendency to increase this ratio (27%) at 14 days of life. In summary, these results show that EGF and FGF21 supplementation but not TGF-β2 was able to modify the proportions of the main subsets of spleen lymphocytes. In addition, Treg cell subset in all groups at both ages behaved similar, having proportions between 0.5-0.7% in all cases.

Further analysis of $CD8^+$ and $CD8^-$ subpopulations was performed (Supplementary Table 2). T TCR$\alpha\beta^+$ and TCR$\gamma\delta^+$ subsets showed a proportion of 29−35% and 60−70% of $CD8^+$ cells, respectively, in all groups at both days 14 and 21. Only the supplementation with FGF21 decreased (~30%) the proportion of T TCR$\alpha\beta^+$ $CD8^+$ at day 21 of life compared to the REF group ($P<0{\cdot}05$). The proportion of $CD8^+$ in NKT subset was 78−84% for all groups at 14 and 21 days. NK subset accounted to a proportion of $CD8^+$ cells of about 35−40% at both ages. No significant differences were found in the percentage of NKT and NK subsets in supplemented groups compared to REF group.

The expression of the adhesion molecules L-selectin (CD62L) and αE integrin (CD103) displayed no significant differences due to the supplementation with respect to the REF group at days 14 and 21 (Supplementary Table 2). In all cases, the proportion of cells expressing CD62L show a trend to increase with age (~64% rise, day 21 *v.* day 14) and the percentage of cells expressing CD103 tend to decrease with age (~63% of reduction, day 21 *v.* day 14) without significant differences among groups.

For Review Only

DISCUSSION

Neonatal immune responses are limited, less competent and functionally deficient than in adults and newborns also had a lower number of immune cells in their lymphoid organs[36]. In this regard, breast milk components have a role in the development of this immature immune system[8].

Some authors have been researching the effects of TGF-β2, EGF and FGF21 -growth factors present in breast milk- on GALT, but scarce evidence can be found about the effect of these bioactive factors on the systemic immunity in newborns[37]. Previously, some research performed in our group has demonstrated the effect of the supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 on the promotion of the intestinal lymphocyte maturation in newborn suckling rats[25]. The present study was designed to determine whether daily supplementation with these three GF could promote systemic immune development during the postnatal period, and for this, the spleen was chosen as a representative systemic lymphoid organ to evaluate the immune system status.

This study has found that supplementation with TGF-β2, EGF and FGF21 did not influence body weight or the relative weights of spleen, thymus and liver. In accordance with the present results, previous studies have demonstrated that oral administration of EGF (40 mg/kg/day) did not have any effect on liver weight in rabbits[38]. In addition, in another study, thymus and spleen of 4-week-old wild-type and FGF21 knockout mice showed similar weights[39]. However, a strong relationship between breast-fed infants and thymus size has been reported in the literature, suggesting the role of breast milk components at this level[40,41]. In light with this, Sakaguchi *et al.* (2018) demonstrated that the thymus of breast milk-fed pups was slightly larger than that of milk formula-fed mice[42]. Moreover, in the same study, mice from mothers that received anti-TGF-β mAb from delivery until weaning had a lower thymus weight than control pups, suggesting that breast milk influences thymus growth and development partly through TGF-β[42]. However, further studies must be conducted as it is still unclear whether TGF-β directly affects thymic cells. Even though there was a slight influence on the thymus weight, the data observed from other studies and our results suggest that these GF, under the conditions used here, did not play an important role in the body weight or spleen, thymus and liver relative weights during the suckling period.

For Review Only

303 It is well established that newborns have lower antibody concentrations compared to later in life[2,43].
304 Our results from plasma IgG, IgM and IgA concentrations in control conditions at days 14 and 21
305 showed an increase at the end of the suckling period. Moreover, IgA was the last antibody isotype to
306 appear in rat plasma with an increase in the third week of the suckling period, in agreement with the
307 findings from other studies[39]. It is known that newborn rodents during the first week of life produce
308 antibodies depending on Th2-responses in contrast to adult rats, which show a Th1 response[43,44,45].
309 Thus, the Th1/Th2 balance could indicate the maturation state in young rats: at birth, the immune
310 system is characterized by a predominant Th2 response and maturation is associated with an improved
311 Th1 response[46]. Our results show an increase in the GF supplemented groups in IgG1 and IgG2a
312 levels, which are associated with a Th2 response in rats. These results suggest that all
313 supplementations, especially TGF-β2 and FGF21, may confer immune protection on the pups through
314 favouring the typical response at this stage, the Th2 response. However, and in contrast to our results, it
315 is reported that Brown Norway rats of 18 and 28 days of life that received formula supplemented with
316 TGF-β2 (100 ng/mL) showed a decrease in Th2-associated IgG1[47], thus further studies should be
317 carried out in order to clarify the role of these GF in humoral immunity development.

318 Moreover, the neonatal cytokine secretion is also Th2 oriented, the Th1/Th2 profile depending on
319 various factors such as the nutrition and microenvironment [48]. In line with this, and evaluating the *ex*
320 *vivo* cytokine production, as in this study, it has been clearly reported that antigen-presenting cells from
321 the cord blood of newborns, after a mitogenic stimulation, are more prompted to establish a Th2-type
322 cytokine secretion (IL-4, IL-5, and IL-10) pattern than a Th1-type cytokine secretion profile (IFN-γ),
323 thus contributing to Th2 orientation[48,49].

324 Our results indicate that supplementation with TGF-β2 and EGF did not have an overall effect on
325 splenocyte cytokine secretion after a mitogen stimulation, and therefore cannot be aligned with the
326 results from the Ig described above and the Th1/Th2 shaping. In contrast with the lack of effect in
327 terms of cytokine production of these GF in the current study, it has been reported that Brown Norway
328 suckling rats receiving a TGF-β2-supplemented formula between 4 and 18 days of life regulated the
329 Th1/Th2 immune cytokine profile at mRNA level in the spleen[47].

330 However, FGF21 supplementation decreased the IFN-γ/IL-4 (Th1/Th2) ratio compared to REF group at
331 21 days in suckling rats, thus enhancing the Th2 direction as also observed in the Ig pattern. Very little
332 is known about the immunomodulatory role of this particular GF, also considered as an adipokine,
333 although some authors suggest that FGF21 can be used to counteract inflammatory disorders[50]. One

For Review Only

study reported that the supplementation with FGF21 to collagen-induced arthritis mice alleviated the disease by down-regulating the levels of IL-6, IL-17, IL-1, and TNF-α in mouse spleen[51]. In addition, another study with Kunming mice (KM) evaluating the supplementation with FGF21 on the toxicity of lipopolysaccharide (LPS) showed that FGF21 significantly decreased the serum contents of inflammatory cytokines, such as IL-1β and TNF-α, whereas it increased those of the cytokine IL-10[52]. In our study no effects on inflammatory cytokines were found due to FGF21 administration.

As mentioned in the literature, all GF, such as TGF-β2, EGF and FGF21, are compounds that have a wide range of biological activities but, from the three studied here, only TGF-β2 and EGF have an important role in cell proliferation and differentiation[12,53,54]. With regard to the capacity of neonatal spleen lymphocytes to proliferate, we observed that regardless of the supplementation of suckling rats, there is limited lymphoproliferative ability during early life. This low spleen lymphoproliferative response during suckling has been previously described and suggested to play a key role in the maintenance of tolerance during this period, a fact that could be attributed to the lymphocyte immaturity and to the low percentages of functional $CD4^+$ and $CD8^+$ cells[36]. In contrast with the lack of modulation by the GF in our approach, it has been shown that Wistar suckling rats receiving oral administration of a whey-enriched TGF-β formula at the same time as receiving low doses of ovalbumin (OVA) down-regulated their proliferative specific spleen cell response[55].

Overall, the Th2 direction induced by these bioactive factors during the suckling period, could be of importance in this particular period. After weaning, as breast milk consumption is stopped, the pups are not going to receive as much of these components and it should be expected that their effect promoting Th2 responses may disappear. Further studies, evaluating the circulating levels of these GF and their effects before and after weaning would be critical to shed some light on this aspect.

A strength in our approach has been to study the appearance of lymphocyte subsets in the spleen of newborn Wistar rats during the suckling period by means of multiple immunofluorescence and flow cytometry. It is known that lymphocyte composition of rat spleen during suckling shows an immature pattern, which, at weaning, differs from that of adult animals[36]. B lymphocytes constitute the earliest occurring population in the spleen after birth, and during the suckling period these cells have an immature phenotype characterized by low surface IgM expression[36]. In the current study, and focusing on this particular subset, the supplementation with EGF was able to modify spleen lymphocyte composition in suckling rats. At day 14, supplementation with EGF increased ~15% the proportion of B cells, tended to increase (~33%) production of IgM and also showed a tendency to increase (27%)

For Review Only

the ratio between B-cell and T-cell percentage with respect to the REF group. Our results did not show significant differences regarding B cells with either the TGF-β2 or FGF21 supplementation. Although very little is known about FGF21 in this regard, it has been suggested that TGF-β regulates B-cell activation by inhibiting Ig synthesis and class-switching to the majority of IgG isotypes[54]. In line with this, mice from lactating mothers that received anti-TGF- β mAb twice a week from delivery until weaning showed a decrease in B cell proportion[42].

It has been described that the T cell appearance in neonatal spleen is slower than that of B cells as is reflected by the low proportion of T lymphocytes in neonatal rat spleens during the suckling period and a progressive increase with age[36], in line with the current results. In addition, another indicator of the stage of the immune development in the spleen and linked to T cells is the proportion of $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets[36]. Early neonatal life in the spleen (< 10 days) is characterized by a low proportion of $CD4^+$ cells and $CD8^+$ cells with immature phenotype. In the second phase of the suckling period (10–21 days), the number of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells increases[36].

Regarding the GF supplementation effects at day 21 of life, both EGF and FGF21 decreased the proportion of T cells, $CD8^+$cells and $CD4^+$cells, and avoided the age increase observed in the REF group, but in contrast, the supplementation with TGF-β2 did not alter any of these proportions and behaved in the same way as the REF group. Other studies have not provided information with which to compare, and only a study that is contradictory to ours has been found, showing that 1- and 4-week-old FGF21-knockout mice have a low percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ spleen cells, and a thymus-independent action has been suggested[39].

NK and NKT cells also constitute a low percentage of spleen lymphocytes during the suckling period. As in previous studies, we have found that during the suckling period, spleen NK cells are as abundant as T cells, suggesting that these pivotal cells in innate immunity, play a key role during early life when the acquired immune responses are not yet fully developed[36]. Focusing on the supplementations' effect, none of the GF affected NK proportions but both EGF and FGF21 − but not TGF-β2 − decreased the proportion of NKT at day 21. NKT cells are a T-cell population that expresses cell surface markers characteristic of NK cells and T cells, it having been suggested that these cells have an important immune regulatory function by bridging innate and acquired immune responses[56]. Thus, this modulatory action of EGF and FGF21 could be interpreted as harmful, however, it is possible that it could be a way to control the large amounts of Th1 and Th2 cytokines that activated NKT can produce, and that can participate, for example, in the development of IgE-mediated allergic asthma[57,58,59]. Our

For Review Only

396 results might indicate that lower proportions of NKT due to the supplementation of EGF and FGF21 at
397 the end of the suckling period could be beneficial in the prevention of allergic diseases, which are
398 highly prevalent at these stages of life[60,61].

399 In summary, although very little information is available with respect to the effect of these growth
400 factors on the systemic immune response in newborns, this study demonstrates that supplementations
401 with TGF-β2, EGF and FGF21 have an impact on the immune development. This effect mainly
402 involves a regulation of the Th1/Th2 balance -in terms of associated cytokines and Ig- that induces a
403 Th2 polarization, but also, in some cases, affects the spleen lymphocyte composition. Further studies
404 are needed to confirm these findings and the differential actions ascribed to each particular breast milk
405 growth factor.

406

407 **Acknowledgements:** The authors would like to thank Lidia Marín-Morote for their help with the
408 laboratory work. We also thank Dr J Comas and his laboratory technicians from the 'Centres Científics
409 i Tecnològics' from the University of Barcelona (CCiT-UB) for their expert assistance in the cytometry
410 service.

411 **Financial support:** This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy,
412 Industry and Competitiveness (AGL2013-48459-P). P.T.-C. holds a fellowship from the National
413 Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT-DMPF-
414 2015-1666-CO). B.G.-P. holds a fellowship from the Spanish Ministry of Economy, Industry and
415 Competitiveness (BES-2014-068134).

416 **Conflict of Interest:** "None"

417 **Authorship:** The authors' contributions were as follows: À.F., M.C., M.J.R.-L. and FJ.P-C conceived
418 and designed the research; all authors carried out the experiments; B.G-P, P.T.-C., F.J.P.-C. and À.F.
419 analysed and interpreted the results; P.T.-C. and F.J.P.-C. contributed to the initial draft of the
420 manuscript; all authors were involved in the critical revision of the manuscript; À.F and FJ.P-C have
421 primary responsibility for the final content. All authors have read and approved the final version of the
422 manuscript for publication.

For Review Only

REFERENCES

1. World Health Organization (2013) *WHO recommendations on postnatal care of the mother and newborn*. *WHO Library Cataloguing-in Publication Data* no. WQ 500. Geneva: WHO.

2. Cacho NT, Lawrence RM (2017) Innate immunity and breast milk. *Front Immunol* **8**, 584.

3. Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L *et al.* (2015) Longitudinal study of cytokine expression, lipid profile and neuronal growth factors in human breast milk from term and preterm deliveries. *Nutrients* **7**, 8577-8591.

4. Lewis ED, Richard C, Larsen BM *et al.* (2017) The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin Perinatol* **44**, 23-47.

5. Ballard O, Morrow AL (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* **60**, 49-74.

6. Walker A (2010) Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr* **156**, S3-7.

7. Le Doare K, Holder B, Bassett A *et al.* (2018) Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Front Immunol* **9**, 361.

8. Field CJ (2005) The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* **135**, 1-4.

9. Järvinen KM, Martin H, Oyoshi MK (2019) Immunomodulatory effects of breast milk on food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* **123**, 133-143.

10. Victora CG, Bahl R, Barros AJ *et al.* (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **387**, 475-490.

11. Berdi M, de Lauzon-Guillain B, Forhan A *et al.* (2019) Immune components of early breastmilk: association with maternal factors and with reported food allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* **30**, 107-116.

12. Turfkruyer M, Verhasselt V (2015) Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis* **28**, 199-206.

13. Penttila IA, Van Spriel AB, Zhang MF *et al.* (1998) Transforming growth factor-β levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res* **44**, 524-531.

14. Nath AP, Braun A, Ritchie SC *et al.* (2019) Comparative analysis reveals a role for TGF-β in shaping the residency-related transcriptional signature in tissue-resident memory CD8+ T cells. *PLoS One* **14**, e0210495.

15. Saito S, Yoshida M, Ichijo M *et al.* (1993) Transforming growth factor-beta (TGF-β) in human milk. *Clin Exp Immunol* **94**, 220-224.

For Review Only

16. David CJ, Massagué J (2018) Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 419-435.

17. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C *et al.* (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* **141**, 1181-1187.

18. Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H *et al.* (1999) Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clinical Immunol* **104**, 1251-1257.

19. Ogawa J, Sasahara A, Yoshida T *et al.* (2004) Role of transforming growth factor-β in breast milk for initiation of IgA production in newborn infants. *Early Hum Dev* **77**, 67-75.

20. Ando T, Hatsushika K, Wako M *et al.* (2007) Orally administered TGF-β is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 916-923.

21. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H *et al.* (2002) Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G156-164.

22. Tang X, Liu H, Yang S *et al.* (2016) Epidermal growth factor and intestinal barrier function. *Mediators Inflamm* **2016**, 1927348.

23. Gavaldà-Navarro A, Hondares E, Giralt M *et al.* (2015) Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep* **5**, 13717.

24. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ *et al.* (2010) Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* **11**, 206-212.

25. Torres-Castro P, Abril-Gil M, Rodríguez-Lagunas MJ *et al.* (2018) TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats. *Nutrients* **10**, E1171.

26. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.

27. Grases-Pintó B, Abril-Gil M, Rodríguez-Lagunas MJ *et al.* (2018) Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br J Nutr* **119**, 486-495.

For Review Only

28. Rigo-Adrover MDM, van Limpt K, Knipping K *et al.* (2018) Preventive effect of a synbiotic combination of galacto- and fructooligosaccharides mixture with *Bifidobacterium breve* M-16V in a model of multiple rotavirus infections. *Front Immunol* **9**, 1318.

29. Penttila IA, Flesch IE, McCue AL *et al.* (2003) Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups. *Gut* **52**, 1579-1586.

30. Maynard AA, Dvorak K, Khailova L *et al.* (2010) Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G614-622.

31. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K *et al.* (2018) Supplementation with 2'-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 372.

32. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C *et al.* (2007) Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol* **149**, 535-542.

33. Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À *et al.* (2017) Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. *J Nutr Biochem* **42**, 182-193.

34. Gracie JA, Bradley JA (1996) Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol* **26**, 1217-1221.

35. Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D *et al.* (1994) Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* **24**, 1627-1631.

36. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S *et al.* (2007) Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. *Dev Comp Immunol* **31**, 1264-1277.

37. Schumacher MA, Danopoulos S, Al Alam D *et al.* (2018) Growth factors in the intestinal tract. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Sixth Edition ed., pp. 71-101 [Hamid M. Said, editor]: Academic Press.

38. Opleta K, O'Loughlin EV, Shaffer EA *et al.* (1987) Effect of epidermal growth factor on growth and postnatal development of the rabbit liver. *Am J Physiol* **253**, G622-626.

39. Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H *et al.* (2017) Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. *Sci Rep* **7**, 330.

40. Garly ML, Trautner SL, Marx C *et al.* (2008) Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. *J Pediatr* **153**, 683-688.

For Review Only

41. Yajima M, Hoshiba J, Terahara M *et al.* (2007) Reduced thymic size and numbers of splenic CD4+ and CD8+ cells in artificially reared mouse pups. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2420-2427.

42. Sakaguchi K, Koyanagi A, Kamachi F *et al.* (2018) Breast-feeding regulates immune system development via transforming growth factor-β in mice pups. *Pediatr Int* **60**, 224-231.

43. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S (2004) Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* **4**, 553-564.

44. Adkins B (2000) Development of neonatal Th1/Th2 function. *Int Rev Immunol* **19**, 157-171.

45. Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C *et al.* (2012) The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin Dev Immunol* **2012**, 537310.

46. Härtel C, Adam N, Strunk T *et al.* (2005) Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol* **142**, 446-453.

47. Penttila I (2006) Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatr Res* **59**, 650-655.

48. Kotiranta-Ainamo A, Rautonen J, Rautonen N (2004) Imbalanced cytokine secretion in newborns. *Biol Neonate* **85**, 55-60.

49. Trivedi HN, HayGlass KT, Gangur V *et al.* (1997) Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions. *Hum Immunol* **57**, 69-79.

50. Itoh N (2014) FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 107.

51. Li SM, Yu YH, Li L *et al.* (2016) Treatment of CIA mice with FGF21 down-regulates TH17-IL-17 axis. *Inflammation* **39**, 309-319.

52. Li JY, Wang N, Khoso MH *et al.* (2018) FGF-21 elevated IL-10 production to correct LPS-induced inflammation. *Inflammation* **41**, 751-759.

53. Wong WM, Wright NA (1999) Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **23**, S83-88.

54. Sanjabi S, Oh SA, Li MO (2017) Regulation of the immune response by TGF-β: from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022236.

55. Zhang M (2000) The role of milk transforming growth factor-β (TGF-β) in the development of the infant gut and gut mucosal immune system. PhD Thesis, University of Adelaide.

56. Marín-Gallén S, Pérez-Cano FJ, Castell M *et al.* (2008) Intestinal intraepithelial NK and NKT cell ontogeny in Lewis rats. *Dev Comp Immunol* **32**, 1405-1408.

57. Kalliomäki MA, Isolauri E (2004) Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**, 739-752.

For Review Only

551 58. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA (2009) Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset
552 with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* **129**, 1628-1642.
553 59. Iwamura C, Nakayama T (2010) Role of NKT cells in allergic asthma. *Curr Opin Immunol* **22**,
554 807-813.
555 60. Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ *et al.* (2017) Environmental determinants of allergy and asthma in
556 early life. *J Allergy Clin Immunol* **140**, 1-12.
557 61. Caminati M, Durić-Filipović I, Arasi S *et al.* (2015) Respiratory allergies in childhood: recent
558 advances and future challenges. *Pediatr Allergy Immunol* **26**, 702-710.

559

560

For Review Only

561 **Suppl. Table 1.** Effect of the supplementation with growth factors on body weight and relative organ
562 weights in suckling rats (Mean values with their standard errors, *n* 9 pups per group)

Weight	REF		TGF-β2		EGF		FGF21	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Day 14								
Animals (g)	35.53	0.94	35.61	1.56	32.30	0.85	34.62	0.41
Spleen (%)	0.67	0.06	0.70	0.04	0.66	0.03	0.62	0.06
Thymus (%)	0.35	0.01	0.37	0.02	0.36	0.03	0.42	0.05
Liver (%)	3.57	0.11	3.36	0.13	3.52	0.12	3.24	0.15
Day 21								
Animals (g)	61.90‡	2.32	60.42‡	1.64	58.40‡	1.37	58.42‡	1.35
Spleen (%)	0.58	0.02	0.61	0.03	0.60	0.03	0.63	0.02
Thymus (%)	0.44‡	0.02	0.45‡	0.02	0.44‡	0.03	0.45	0.02
Liver (%)	4.30‡	0.16	4.52‡	0.14	4.25‡	0.19	4.54‡	0.10

563 REF, reference, TGF-β2, transforming growth factor-β2, EGF, epidermal growth factor.
564 FGF21, fibroblast growth factor 21.
565 Statistical differences: ‡ $P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14 (ANOVA).
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579

For Review Only

Suppl. Table 2. Effect of the supplementation with growth factors on the percentage of $CD8^+$ and $CD8^-$ lymphocyte subsets and of adhesion molecules in spleen lymphocytes of suckling rats (Mean values with their standard errors, *n* 9 pups per group analysed in uniplicate)

	REF		TGF-β2		EGF		FGF21	
Day 14	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
T cells (%)								
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$/Total	2.43	0.37	2.47	0.23	1.82	0.22	2.47	0.28
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$/Total	5.00	0.66	5.32	0.45	4.37	0.48	6.07	0.71
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$/T $TCR\alpha\beta^+$	32.21	1.52	31.64	0.73	29.30	1.01	29.05	1.06
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$/T $TCR\alpha\beta^+$	67.79	1.52	68.36	0.73	70.70	1.01	70.95	1.06
T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$/T $TCR\gamma\delta^+$	62.05	2.53	61.03	1.83	63.01	2.48	61.87	2.10
T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^-$/T $TCR\gamma\delta^+$	37.95	2.53	38.97	1.83	36.99	2.48	38.13	2.10
NKT cells (%)								
NKT $CD8^+$/NKT	83.99	3.02	84.51	1.07	79.74	3.21	79.98	1.53
NKT $CD8^-$/NKT	16.02	3.02	15.49	1.07	20.26	3.21	20.02	1.53
NK cells (%)								
NK $CD8^+$/NK	38.64	2.62	39.19	3.43	31.40	4.12	35.83	2.94
NK $CD8^-$/NK	61.36	2.62	60.81	3.43	68.60	4.12	64.17	2.94
Adhesion molecules (%)								
$CD103^+$/Total	1.82	0.33	1.73	0.22	1.32	0.27	1.34	0.22
$CD62L^+$/Total	11.34	1.27	11.95	1.17	10.22	0.87	12.11	0.72
Day 21								
T cells (%)								
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$/Total	3.80‡	0.25	3.85‡	0.45	2.94‡	0.27	2.67*	0.10
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$/Total	7.54‡	0.60	7.28	0.93	6.21‡	0.47	5.93	0.30
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$/T $TCR\alpha\beta^+$	33.77	1.16	34.67	1.40	32.10	1.61	31.20	1.67
T $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^-$/T $TCR\alpha\beta^+$	66.23	1.16	65.33	1.40	67.90	1.61	68.80	1.67
T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$/T $TCR\gamma\delta^+$	71.83‡	1.84	65.80	3.90	65.30	2.88	65.71	4.09
T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^-$/T $TCR\gamma\delta^+$	28.17‡	1.85	34.20	3.90	34.70	2.88	34.29	4.09
NKT cells (%)								
NKT $CD8^+$/NKT	79.34	3.08	84.98	1.94	81.95	2.69	78.42	2.89
NKT $CD8^-$/NKT	20.65	3.08	15.03	1.94	18.05	2.69	21.58	2.89
NK cells (%)								
NK $CD8^+$/NK	43.94	1.95	41.03	1.21	41.50	1.78	40.17	1.52
NK $CD8^-$/NK	56.06	1.95	58.98	1.21	58.50	1.78‡	59.83	1.52
Adhesion molecules (%)								
$CD103^+$/Total	0.67‡	0.1	1.35	0.32	0.95	0.24	0.92	0.22
$CD62L^+$/Total	18.63‡	1.7	17.22	2.92	15.53‡	1.79	14.28	1.55

REF, reference, TGF-β2, transforming growth factor, EGF, epidermal growth factor, FGF21, fibroblast growth factor 21.

Statistical differences: **P*>0·05 *v.* reference group, ‡ *P*>0·05 *v.* same group at day 14 (ANOVA).

For Review Only

586
587 **Figure Legends**

588 **Figure 1.** Effect of growth factor supplementation on plasma IgG (a), IgM (b) and IgA (c) from the
589 four groups -reference (REF), transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF)
590 and fibroblast growth factor 21 (FGF21)- over the suckling period (day 14 and 21). Values (μg/mL) are
591 means (*n* 9 pups per group analysed in duplicate) with their standard errors represented by vertical bars.
592 Statistical differences: ‡ $P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14 (Mann-Whitney U test).

593 **Figure 2.** Effect of growth factor supplementation on plasma IgG isotypes from the four groups -
594 reference (REF), transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF) and
595 fibroblast growth factor 21 (FGF21)- over the suckling period (day 14 and 21). IgG1 (a), IgG2a (b),
596 IgG2b (c), IgG2c (d) and Th1/Th2 antibody pattern ratio (e). Values (μg/mL) are means (*n* 9 pups per
597 group analysed in duplicate) with their standard errors represented by vertical bars. Statistical
598 differences: ‡ $P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14 (Mann-Whitney U test).

599 **Figure 3.** Effect of growth factor supplementation on proliferative response and cytokine production by
600 spleen lymphocytes after *in vitro* mitogen-stimulation from the four groups -reference (REF),
601 transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor
602 21 (FGF21)- over the suckling period (day 14 and 21). Proliferation rate (a) and cytokine concentration
603 (pg/mL) of IL-2 (b), IL-4 (c), IL-10 (d), IFN-γ (e), TNF-α (f) and the IFN-γ/IL-4 ratio (g). Values are
604 means (*n* 9 pups per group analysed in quadruplicate or duplicate for proliferation assay or cytokine
605 secretion, respectively) with their standard errors represented by vertical bars. Statistical differences:
606 * $P<0{\cdot}05$ *v.* REF group, ‡ $P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14 (Mann-Whitney U test).

607 **Figure 4.** Effect of growth factor supplementation on the main spleen lymphocyte subsets from the
608 four groups -reference (REF), transforming growth factor-β2 (TGF-β2), epidermal growth factor (EGF)
609 and fibroblast growth factor 21 (FGF21)- over the suckling period (day 14 and 21). B cells (a), T cells
610 (b), T TCRαβ$^+$cells (c), T TCRγδ$^+$ cells (d), CD8$^+$ cells (e), CD4$^+$ cells (f), NK cells (g) and NKT cells
611 (h). Values (% respect total lymphocytes) are means (*n* 9 pups per group analysed in uniplicate) with
612 their standard errors represented by vertical bars. Statistical differences: * $P<0{\cdot}05$ *v.* REF group,
613 ‡ $P<0{\cdot}05$ *v.* same group at day 14 (ANOVA).

For Review Only

Fig. 1

Cambridge University Press

Fig. 2

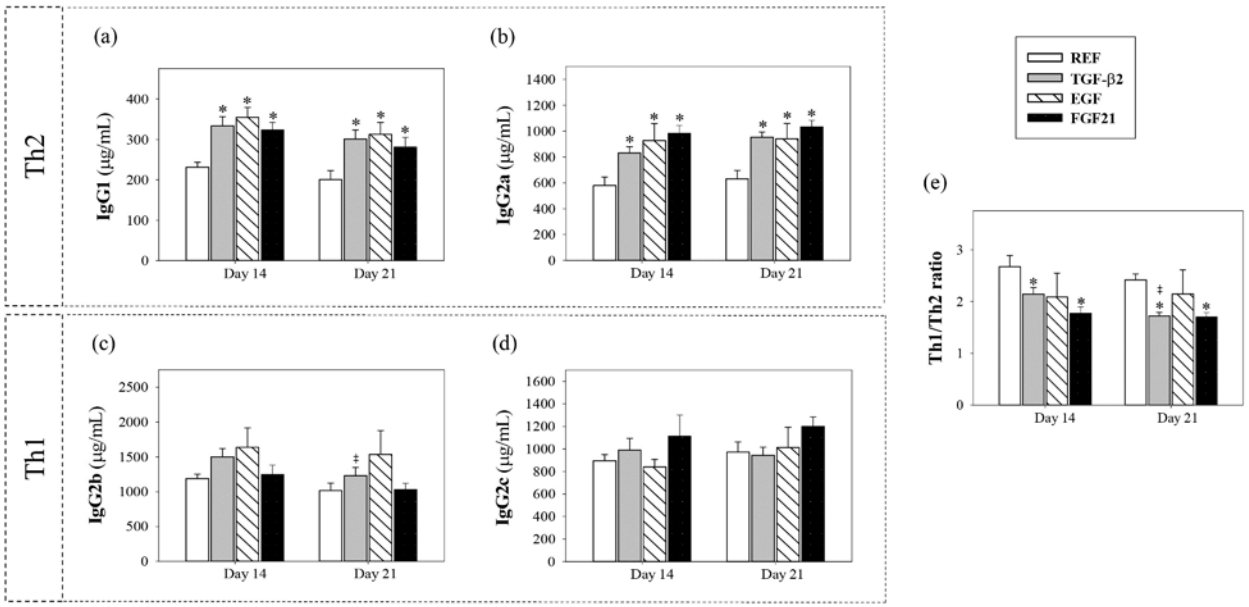

Th2
Th1
(a)
IgG1 (μg/mL)
(b)
IgG2a (μg/mL)
(c)
IgG2b (μg/mL)
(d)
IgG2c (μg/mL)
Day 14
Day 21
REF
TGF-β2
EGF
FGF21
(e)
Th1/Th2 ratio

Fig. 3

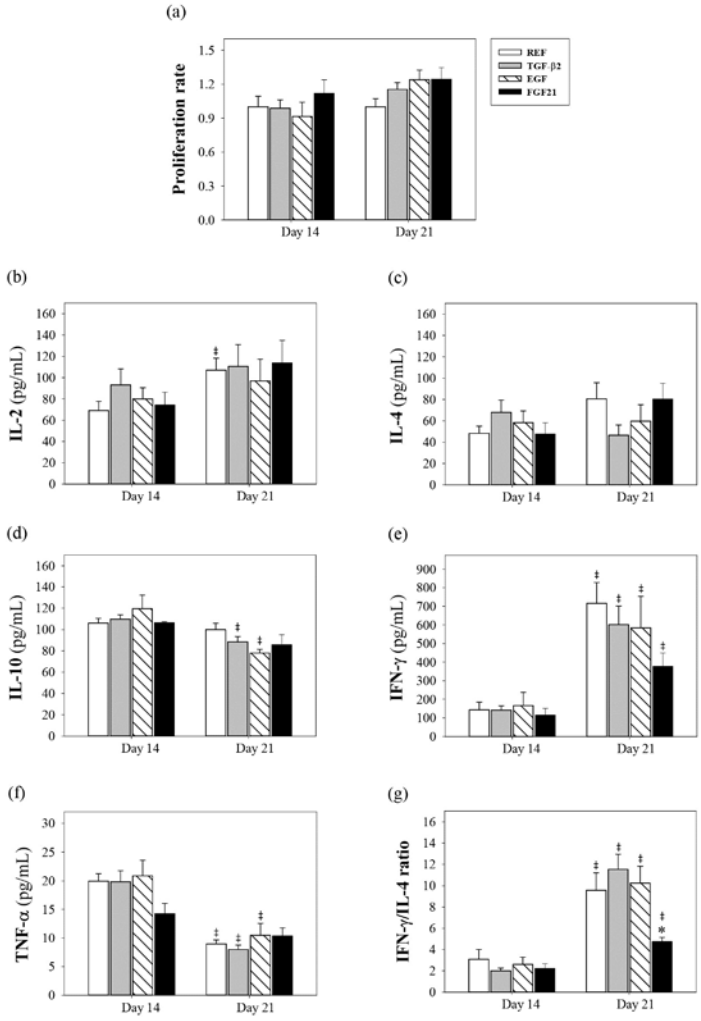
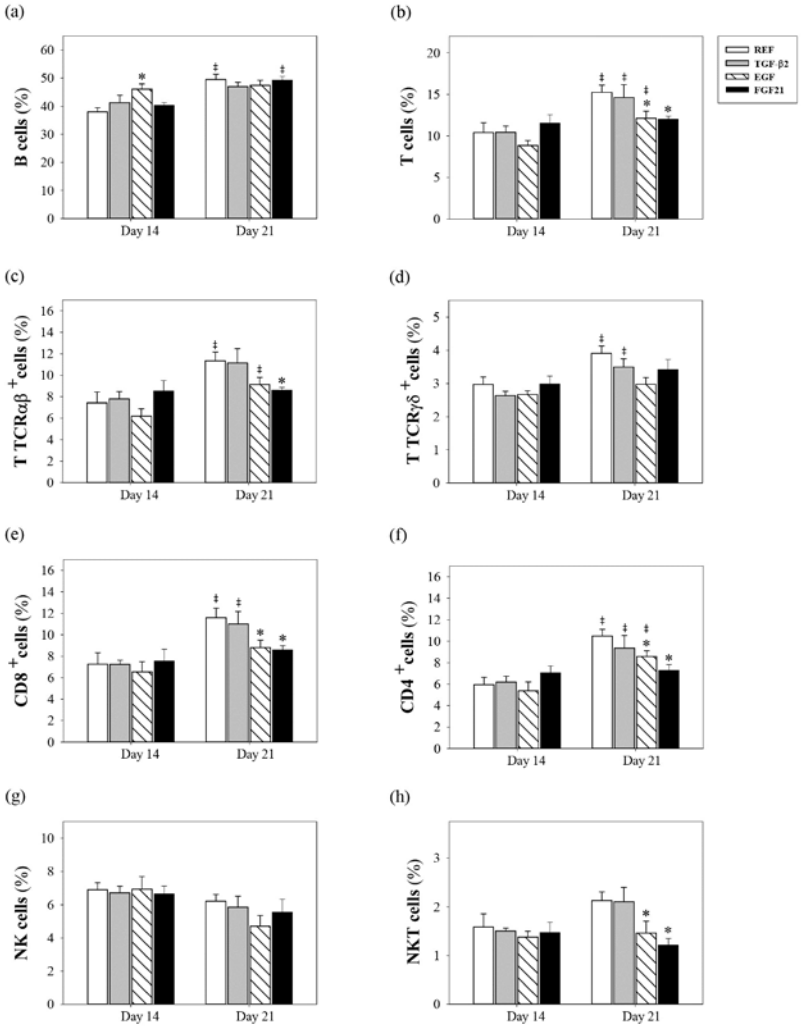

(a)
Proliferation rate
REF
TGF-β2
EGF
FGF21
Day 14
Day 21
(b)
IL-2 (pg/mL)
(c)
IL-4 (pg/mL)
(d)
IL-10 (pg/mL)
(e)
IFN-γ (pg/mL)
(f)
TNF-α (pg/mL)
(g)
IFN-γ/IL-4 ratio

Fig. 4


(a)
B cells (%)
Day 14
Day 21
(b)
T cells (%)
REF
TGF β2
EGF
FGF21
(c)
T TCRαβ +cells (%)
(d)
T TCRγδ +cells (%)
(e)
CD8 +cells (%)
(f)
CD4 +cells (%)
(g)
NK cells (%)
(h)
NKT cells (%)

ARTÍCULO 4

"Leptin and EGF supplementation enhance the immune system maturation in preterm suckling rats"

Blanca Grases-Pintó, Paulina Torres-Castro, Mar Abril-Gil, Margarida Castell, María J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch

Nutrients **(2019) 11 (10): 2380**

(doi: 10.3390/nu11102380)

Índex d'impacte (2018): 4,171
Categoria: 16/86 (Q1) en *NUTRITION & DIETETICS*

Los resultados del presente artículo han estado presentados en las siguientes comunicaciones:

- *Epidermal growth factor promotes the intestinal barrier maturation of preterm rats.* Torres-Castro, P; Duran-Castells, C; Marín-Morote, L; Abril-Gil, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. XI ISIN London Conference on Immunonutrition (Londres), septiembre 2018.

- *Immune system development in a rat model of prematurity for immunonutrition studies*. Torres-Castro, P; Grases-Pintó, B; Abril-Gil, M; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. IV Workshop anual INSA-UB: Ciència i propietats del cava i el vi (Santa Coloma de Gramenet), noviembre 2018.

- *Enhancement of intestinal epithelial barrier maturation in preterm rats by leptin and epidermal growth factor.* Grases-Pintó, B; Torres-Castro, P; Marín-Morote, L; Abril-Gil, M; Rodríguez-Lagunas, M.J; Castell, M; Pérez-Cano, F.J; Franch, À. XIII Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), noviembre 2019.

RESUMEN

Objetivo: Determinar si la suplementación nutricional con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), durante el periodo de lactancia, es capaz de promover la maduración del sistema inmunitario sistémico e intestinal en condiciones de prematuridad.

Material y métodos: Para ello, ratas Wistar prematuras -obtenidas mediante una cesárea un día antes al parto natural- recibieron un suplemento diario con EGF mediante una sonda oral, durante los primeros 17 días de vida. Además del grupo suplementado -objeto de estudio-, también se dispuso de un grupo de animales referencia nacidos a término y un segundo grupo nacido a pretérmino, los cuales recibieron vehículo. A lo largo del estudio se registró el peso corporal. El día 10 postnatal, se determinó el hemograma y la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos. Este mismo día, se evaluó la expresión génica intestinal, la permeabilidad intestinal y se realizó un estudio histomorfométrico del intestino delgado. A tiempo final (día 17), se determinó la composición de linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y de bazo. Finalmente, los días 10 y 17 se determinó el patrón de inmunoglobulinas (Ig) plasmáticas.

Resultados: Las ratas prematuras mostraron ciertas deficiencias, en comparación con las nacidas a término. Se demostró un bajo peso corporal, un recuento de eritrocitos inferior, menor concentración de IgG e IgM en plasma y una disminución del porcentaje de linfocitos B. También se demostró la presencia de una mayor proporción de linfocitos Th y Tc TCR$\alpha\beta^{+}$ en GLM, así como también una mayor permeabilidad intestinal. Cabe destacar que la suplementación dietética con EGF durante 17 días fue capaz de revertir algunas de estas deficiencias y promover el desarrollo del sistema inmunitario de los animales prematuros.

Conclusión: Los resultados obtenidos sugieren que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) promueve la maduración del sistema inmunitario sistémico e intestinal en condiciones de prematuridad.

nutrients

MDPI

Article

Leptin and EGF Supplementation Enhance the Immune System Maturation in Preterm Suckling Rats

Blanca Grases-Pintó [1,2,†], Paulina Torres-Castro [1,2,†], Lidia Marín-Morote [1,2], Mar Abril-Gil [1,2], Margarida Castell [1,2], María J. Rodríguez-Lagunas [1,2], Francisco J. Pérez-Cano [1,2,*] and Àngels Franch [1,2]

1 Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; blancagrases@ub.edu (B.G.-P.); mtorreca29@alumnes.ub.edu (P.T.-C.); lmarinmorote@gmail.com (L.M.-M.); mariadelmar.abril@ub.edu (M.A.-G.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); angelsfranch@ub.edu (À.F.)

2 Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

* Correspondence: franciscoperez@ub.edu; Tel.: +34-934-024-505

† Both authors contributed equally to this work.

Received: 31 July 2019; Accepted: 15 September 2019; Published: 6 October 2019

check for updates

Abstract: In preterm newborns the immaturity of the immune system is remarkable, with reduced innate and adaptive immune responses. Many bioactive compounds in breast milk, such as growth factors and adipokines, contribute to the immune system's maturation in early life. However, studies on the immunoregulatory activity in preterm neonates are practically nonexistent. The aim of the present study was to determine whether a nutritional supplementation in early life with leptin or epidermal growth factor (EGF) was able to promote the maturation of the systemic and intestinal immune system in preterm conditions. For this purpose, premature rats were daily supplemented by oral gavage with leptin or EGF. Term and Preterm groups receiving vehicle were used as controls. Preterm rats showed deficiencies compared to full-term ones, such as lower body weights, erythrocyte counts, plasma IgG and IgM concentrations and B cell percentages, and higher values of Th and Tc TCR$\alpha\beta^+$ cells in mesenteric lymph nodes, and intestinal permeability, among others. However, leptin and EGF supplementation were able to revert some of these deficiencies and to improve the premature immune system's development. These results suggest that leptin and EGF are involved in enhancing the maturation of the systemic and intestinal immune system in preterm conditions.

Keywords: prematurity; suckling rat; leptin; EGF; adaptive immunity; innate immunity; breast milk

1. Introduction

Prematurity is one of the main causes of neonatal death. Advances in medicine over the years have enabled the survival of preterm newborns who would previously have died [1]. In premature infants, the third trimester is missed, triggering an incomplete development in the fetus and its organs, making these babies more susceptible to neural and respiratory problems, among other complications [2]. Moreover, the gastrointestinal tract of term infants—which should also develop in the last trimester—is immature at the time of birth, and consequently, more undeveloped in preterm newborns than in term ones. The underdeveloped intestine and other factors, such as the immature intestinal immune system, unestablished microbiota, or the high intestinal permeability, make the premature infant predisposed to suffering from necrotizing enterocolitis (NEC), a common disease in premature babies [3].

It is well known that breast milk constitutes the optimal source of nutrition for the newborn [4]. As this is also the first choice to nourish preterm babies, if the mother is unable to produce the

volume of milk required, donor milk is preferred to infant formula [5]. However, in cases where the newborn is very premature, parenteral nutrition is the first option, since the intestine is not ready to receive food [6]. Nevertheless, 5 days after birth the mother can start to give small volumes of breast milk until reaching the enteral volume, reducing parenteral nutrition and facilitating weight gain [7]; and when the preterm infants' birth weight is very low, it is recommended to supplement the donor milk with fortifier powders from bovine milk to increase protein, calcium, and vitamin D levels, among other factors [8]. Hence, breast milk feeding is recommended for preterm babies because of its effect of reducing NEC [9–12], promoting brain development [13], stimulating intestinal maturation [6], promoting the development of oral tolerance [14], and reducing infections [15]. Moreover, preterm breastfed infants showed a lower metabolic syndrome rate, less insulin and leptin resistance, and lower blood pressure, later in life than newborns nourished with infant formula [5,16].

In addition to inter and intra-individual differences among the milk composition of mothers, some differences between term and preterm milk have also been described. Hence, preterm breast milk has higher levels of protein, free amino acids, and sodium [5], but lower levels of lactose have been described [17]. Interestingly, preterm breast milk has higher concentrations of immune factors such as lactoferrin, cytokines (IL-6, IL-10, TNF-α), and secretory immunoglobulin (Ig)A than term breast milk [5], stimulating the immature immune system of the preterm newborn [18]. In addition, breast milk contains other bioactive factors with immunomodulatory properties, such as growth factors (transforming growth factor (TGF)-β and epidermal growth factor (EGF)) and adipokines (leptin and adiponectin) [19,20]. We have recently demonstrated in term rats that leptin and EGF supplementations during the suckling period are able to enhance early immune system development [21–23]. However, the influence of these bioactive compounds on the preterm immune system remains unexplored. We hypothesize that these milk bioactive factors could also have a role in the development of the immature immune system in premature conditions. Thus, the aim of the present study was to determine the effects of supplementation with leptin and EGF on the immune systems of premature suckling rats. Specifically, we focused the study on evaluating the effects of leptin and EGF on different variables of innate and adaptive immunity affected by premature delivery [24].

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Twenty-one pregnant Wistar rats from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) at different stages of gestation were used. Specifically, nine of them were at 13 days of gestation (G13), three at 14 days of gestation (G14) and nine at 15 days of gestation (G15). Dams were individually housed in cages, fed with chow and water *ad libitum*, and monitored daily. The animals were maintained under controlled temperature and humidity conditions, in a 12:12 h light:dark cycle in the Animal Facility of the Faculty of Pharmacy and Food Science.

The studies were performed in accordance with the criteria outlined by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Experimental procedures were reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (CEEA/UB reference 148/18).

2.2. Experimental Design

Three G14 pregnant dams were allowed to deliver naturally at term (day 22 of gestation). G13 pregnant dams (n = 9) had a caesarean (C)-section one day before normal delivery (day 21 of gestation), giving birth to preterm pups. Due to the possible impact of surgery on the dams, they were not allowed to keep the neonates, so the pups were accepted and breastfed by surrogate dams. G15 dams (n = 9) were allowed to deliver at term one day before term dams. These dams nursed the pups born in preterm conditions (i.e., surrogate dams). It was important that surrogate dams had delivered two days before the C-section to ensure that they had enough milk in their breasts to breastfeed preterm pups. Litters were culled to 10 pups per lactating dam and they had free access to

the nipples and rat diet during 17 days of the suckling period. Handling was done in the same time range to avoid the influence of biological rhythms.

2.3. Dietary Supplementation

Rats were distributed into four experimental groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin and P+EGF. Each group was composed of three litters (n = 30 pups/group). T group was formed by the three lactating dams with their corresponding litters delivered at term. P group was formed by three surrogate mothers with three litters delivered by C-section. P+Leptin group was formed by another three surrogate mothers with three litters delivered by C-section and supplemented during 17 days with a solution of 0.7 µg/kg/day of leptin (PeproTech®, Rocky Hill, NJ, USA) in mineral water. The P+EGF group was formed by another three surrogate mothers with three litters from those delivered by C-section but they were supplemented over 17 days with a solution of 100 µg/kg/day of EGF (PeproTech®) in mineral water. These doses were selected according to previous studies showing immunomodulatory effects [21–23]. The T and P groups were administered with the same volumes of vehicle as the supplemented groups (10 mL/kg/day) during the first 17 days of suckling. To allow gastric emptying, litters were separated from their dam a half-hour before oral supplementation. Meanwhile animals were weighed daily. Pups received the supplements daily by oral gavage using low-capacity syringes (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Switzerland) adapted to oral 25 or 23-gauge gavage tubes (ASICO, Westmont, IL, USA), as previously described [22].

On the days of sacrifice (i.e., 10 and 17), the lengths (nose−anus) of the animals were also measured. On the same days, the body mass index (BMI) was determined, calculated as body weight/length^2 (g/cm^2), as was the Lee index, calculated as $\sqrt[3]{\text{weight/length}} \times 1000$ ($\sqrt[3]{\text{g/cm}}$).

2.4. Caesarean Intervention

To obtain premature pups in P, P+Leptin, and P+EGF groups, a C-section at G21 was required. The procedure was based on the methodology described previously [24]. Dams, anesthetized with isofluoran inhalation, were immediately sacrificed by cervical dislocation, in order to avoid pups being affected by the administration of a longer exposure to anesthesia. Immediately, the offspring were extracted one by one by hysterectomy. They were separated from the placenta, the umbilical cord was cut and emptied, the airway was cleared of fluid with a paper towel, and respiratory function was activated with a soft massage on the chest. They were then cleaned carefully with warm physiological serum (37 °C) to remove the remaining blood, and a knot was made with the umbilical cord. Then, they were randomly distributed among the nine surrogate mothers' cages. Preterm pups were mixed with the bedding of the cage so that they acquired the smell of the new mother to avoid their rejection. Preterm rats were accepted by the corresponding surrogate mothers, which had previously been separated from their own offspring, except two pups that were kept to help prevent cannibalism by the surrogate dam.

2.5. Sample Collection and Processing

At day 10, animals were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany), exsanguinated, and the small intestine (SI) was collected. On this day, three random rats from each litter (9 rats/group) were used to analyze blood cell count, plasmatic Ig concentration, and the phagocytic activity of leukocytes. Another three rats from each litter (9 rats/group) were used to perform histomorphometric and immunofluorescence staining studies and determine the gene expressions and permeability of the SIs. Moreover, livers, spleens, and thymuses from all rats were collected and weighed. In addition, small and large intestines were measured.

Blood samples collected in heparin/lithium tubes were used to perform the phagocytic assay. After that, the remaining blood was centrifuged to obtain plasma for Ig quantification following previous conditions [22]. An automated hematological analyzer (Spincell 3, Spinreact, Barcelona, Spain) was

used to determine the composition of the cellular elements of the blood. For the histological study, the SI was washed and a 1 cm portion from the distal jejunum was cut, placed in cassettes and fixed in 4% paraformaldehyde, as previously described [24]. Moreover, another 0.5 cm portion of the distal jejunum was immediately conserved in RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, USA), incubated at 4 °C overnight, and stored at −20 °C until PCR analysis.

At day 17, rats were anesthetized as described above. Similar to day 10, blood samples were collected to determine the Ig pattern from plasma. Furthermore, livers, thymuses, and spleens were weighted, and intestines were measured. Moreover, mesenteric lymph nodes (MLNs) were also obtained [22].

2.6. Phagocytic Assay

To evaluate the phagocytic activity of leukocytes, the commercial kit Phagotest® (Glycotope, Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used according to the manufacturer's instructions, as previously described [24]. Briefly, opsonized fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled *Escherichia coli* were added to the heparinized blood and incubated for 10 min at 37 °C. Then, the tubes were placed in ice to stop phagocytosis. After washing and centrifugation, cells were incubated in a lysis solution in order to eliminate the erythrocytes and fix the leukocytes. Finally, the cellular DNA was stained with a propidium iodide solution.

Analyses were performed using a Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB) and assessed by FlowJo v10 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) as previously described [24]. The phagocytic activity was expressed as the percentage of fluorescent cells (monocytes or granulocytes) in the particular population studied. The mean fluorescence intensity, indicative of the extent of phagocyte efficiency was also quantified.

2.7. Immunoglobulin Quantification

Plasma IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c concentrations were quantified by a ProcartaPlex Rat Antibody Isotyping Panel (eBioscience, Frankfurt, Germany), according to the manufacturer's protocol and previous studies [22]. Results were analyzed by the Luminex MAGPIX analyzer (Luminex®, Austin, TX, USA) at the CCiT-UB. Assay sensitivity was as follows: 0.48 pg/mL for IgA, 0.02 ng/mL for IgM, 0.78 ng/mL for IgG1, 0.02 ng/mL for IgG2a, 0.11 ng/mL for IgG2b, and 0.19 pg/mL for IgG2c.

2.8. MLN and Spleen Lymphocytes Isolation

Lymphocytes from MLNs and spleens were isolated, as previously described [21,22], by passing the tissues individually through a sterile 40 µm mesh cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). A resultant cell suspension from the spleen required an additional step to lyse the erythrocytes [22]. Cell counting and viability were assessed by Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Lymphocytes from both organs were then used to study their phenotype.

2.9. Lymphocyte Immunofluorescence Staining and Flow Cytometry Analysis

For flow cytometry analysis, lymphocytes (2×10^5) from spleens and MLNs were labeled with mouse anti-rat monoclonal antibodies (mAb) conjugated to FITC, phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-a protein (PercP), allophycocyanin (APC), or BD Horizon™ BV421, as in previous studies [21,22]. In this case, the mAb used were anti-CD4, anti-CD8α, anti-CD8β, anti-TCRαβ, anti-NKR-P1A, anti-TCRγδ, and anti-CD45RA (BD Biosciences, San Diego, USA). After staining with standard procedures [21], analyses were performed using a Gallios™ Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) at the CCiT-UB. All results were assessed by the FlowJo v.10 software.

2.10. Intestinal Permeability Assay

At day 10, the permeability of the intestinal epithelial barrier was also determined *in vivo* by the paracellular passage of 4 kDa-dextran into the blood, as previously described [24]. Briefly, a solution of 4 kDa-dextran conjugated to FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was orally administered to rats using the low-capacity syringes adapted to oral gavage tubes. There was an additional group of animals that was only administered with an equivalent volume of PBS (10 mL/kg) to rule out the background fluorescent levels of the types of samples. After 4 h of the dextran administration, the animals were euthanized and plasma was obtained, diluted, and the fluorescence emission was quantified in triplicate at an excitation wavelength of 490 nm in the Modulus™ Microplate spectrophotometer (Turner Byiosystems, Sunnyvale, CA, USA).

2.11. Periodic Acid–Schiff Staining

By increasing the gradient of ethanol, fixed intestinal samples were dehydrated. Then, they were paraffin-embedded, cut into 5 µm sections, deparaffinized and rehydrated for periodic acid–Schiff (PAS) staining, as previously described [24]. The observation of the intestinal architecture was performed using the bright-field of an Olympus BX41 microscope (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan). All the morphometric measurements were processed with the ImageJ program (image processing and analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The sample size was six animals, representative of the three litters in each experimental group (2 animals/litter). Six to ten villi were selected randomly from each animal and the villi's heights, widths and epithelium perimeters were measured. Moreover, the number of goblet cells per villus and their corresponding areas were also evaluated.

2.12. Small Intestine Gene Expression

SI portions kept in RNAlater® were homogenized for 30 s in lysing matrix tubes (MP Biomedicals, Illkirch, France) using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals), as previously described [25]. Total RNA was extracted by RNeasy® mini kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. RNA quantification was performed with a NanoPhotometer (BioNova Scientific, CA, USA). Later, cDNA was obtained in a thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller using TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). The specific PCR TaqMan® primers (Applied Biosystems) used to assess gene expression with real-time PCR (ABI Prism 7900 HT, AB) were: *MUC-2* (Rn01498206_m1), *MUC-3* (Rn01481134_m1), *Prdm1* (Rn03416161_m1, I, encoding for Blimp-1), *Fcgrt* (Rn00583712_m1, I, encoding for FcRn), *zona occludens (ZO)-1* (Rn02116071_s1), *occludin* (Rn00580064_m1), and *claudin-4* (Rn01196224_s1). The relative gene expressions were normalized with the housekeeping gene Gusb (Rn00566655_m1, I) using the 2–ΔΔCt method, as previously described [26]. Results are expressed as percentage of values of each supplemented group normalized to the mean value obtained for the reference group (T group), which was set at 100%.

2.13. Immunofluorescence Study of Tight-Junction Proteins

Immunofluorescence staining for occludin, ZO-1, claudin-2, and claudin-4 proteins were performed using the same paraffin-embedded intestine previously described for PAS staining. Briefly, after deparaffinizing the slides with xylene (Honeywell Chemicals, Diegem, Belgium) for 25 min at 60 °C, the intestine sections were rehydrated in serial dilutions of 100%–30% ethanol, and finally, with PBS solution. Antigen unmasking was performed using a TRIS EDTA solution at pH 9 (10 mM Tris-aminomethane (Scharlau, Barcelona, Spain), 1 mM etilendiaminotetraacetic acid (EDTA, Analyticals, Montedison Group, Milan, Italy)) with 0.05% Tween 20 (Fagron, Barcelona, Spain) at 100 °C for 20 min and then washed twice with PBS solution. Then slides were permeabilized with PBS solution with 0.2% Tween 20 (5 min), followed by 30 min of blocking using PBS with bovine

serum albumin (BSA 1%) solution. The sections were incubated overnight at 5 °C in a humidity chamber with primary antibodies diluted in blocking solution. The antibodies used in this study were anti-occludin, anti-ZO-1 polyclonal, anti-claudin-2, and anti-claudin-4 polyclonal, all from Thermo Fisher Scientific. The dilutions used were 1:50 for ZO-1 and claudin-4, and 1:100 for occludin and claudin-2. After incubation, the slides were rinsed three times with PBS-0.05% Tween 20 for 10 min. Then, sections were incubated 1 h at 5 °C in a humidity chamber with secondary antibodies. Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L, Invitrogen, Carlsbad, MA, USA) was diluted 1:1000 in blocking solution. Sections were washed three times with PBS-0.05% Tween 20. Finally, nuclei were stained, sections were incubated 10 min in the humidity chamber with DAPI (1:1000, Invitrogen), then they were rinsed three times with PBS for 10 min and mounted with Fluoromount G™ (Invitrogen). Controls were incubated with secondary antibodies only.

Images were taken with a fluorescence laser and optical microscope (BX41, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan) at 40× magnification and stored in tiff format. The time of exposition was adapted to each staining, but the control images were acquired with the same exposition time. Image analyses and treatments were performed using the ImageJ program. Images that were modified for contrast and brightness to enhance their visualization were processed in the same way as the images corresponding to their respective controls.

2.14. Statistical Analysis

Statistics were performed by the software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 22.0, Chicago, IL, USA). The Levene's test was used to assess the homogeneity of variance and the Shapiro–Wilk test to evaluate the distribution of the results. When there was a normal distribution and equality of variance existed, a conventional one-way ANOVA test was carried out, followed by the Bonferroni post hoc test. On the other hand, results having different variances and/or different distributions were evaluated by the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney U post hoc test. Significant differences were established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Body Weight and Other Morphometric Variables

Body growth assessment in all four groups during the study showed that, as expected, the weight of non-supplemented preterm rats was lower than that of the term pups during the first 9 days ($p < 0.05$), achieving similar values of the T group after this day. Although EGF supplementation to preterm pups was not able to revert this lower weight, animals from the P+Leptin group reached term values at day 7, two days before the P and P+EGF groups did ($p < 0.05$, Figure 1).

Interestingly, morphometric variables, such as BMI and the Lee index, were also evaluated at day 10 and 17 of the study without observing any changes due to prematurity or supplementation. Although relative weights of the spleen, thymus, and liver were not modified due to prematurity or supplementation, a decrease in relative small and large intestine length was observed in P+Leptin and P+EGF groups at the end of the study (day 17) ($p < 0.05$, Table 1).

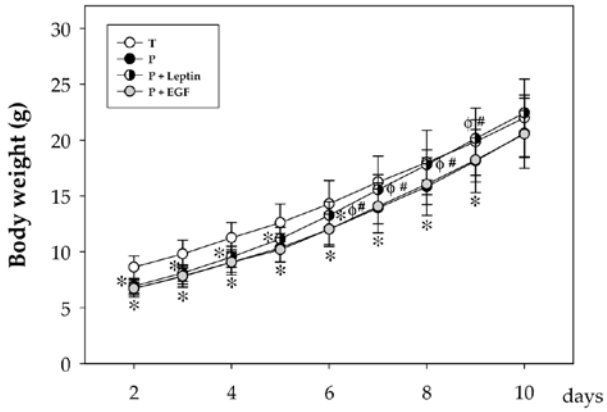


Figure 1. Body weight from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) the first 10 days of the study. Results are expressed as mean ± SD (n = 12–30 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; $^{\#}$ $p < 0.05$ versus P+EGF group.

Table 1. Morphometric variables and relative organ weights or lengths from Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) groups at days 10 and 17.

	Day 10			
	T	**P**	**P+Leptin**	**P+EGF**
BMI (g/cm^2)	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Lee Index (($\sqrt[3]{}$g/cm) × 1000)	337.51 ± 7.59	341.57 ± 5.00	337.19 ± 6.45	341.13 ± 8.85
Spleen weight (%)	0.57 ± 0.10	0.59 ± 0.09	0.62 ± 0.07	0.53 ± 0.21
Thymus weight (%)	0.34 ± 0.07	0.33 ± 0.06	0.32 ± 0. 13	0.39 ± 0.04
Liver weight (%)	3.21 ± 0.29	3.45 ± 0.39	3.41 ± 0.14	3.25 ± 0.41
Small intestine length (%)	163.90 ± 20.83	171.31 ± 20.45	158.78 ± 17.00	156.19 ± 19.43
Large intestine length (%)	19.07 ± 2.57	18.75 ± 2.64	17.11 ± 1.63	19.25 ± 2.44
	Day 17			
BMI (g/cm^2)	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.03
Lee Index (($\sqrt[3]{}$g/cm) × 1000)	327.61 ± 5.67	329.46 ± 13.07	329.72 ± 6.64	336.63 ± 9.34
Spleen weight (%)	0.49 ± 0.05	0.54 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.51 ± 0.16
Thymus weight (%)	0.41 ± 0.08	0.42 ± 0.07	0.43 ± 0.09	0.44 ± 0.06
Liver weight (%)	3.82 ± 0.21	3.87 ± 0.34	3.70 ± 0.30	3.82 ± 0.31
Small intestine length (%)	93.08 ± 11.15	94.67 ± 7.23	84.36 ± 10.30 * $^{\varphi}$	89.06 ± 10.56 $^{\varphi}$
Large intestine length (%)	14.25 ± 2.12	13.75 ± 2.86	12.50 ± 1.92 *	12.38 ± 2.46 *

Relative organ weight or length was calculated as weight or length of the organ divided by the body weight × 100. Data are expressed as mean ± SD (n = 9–12 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group. BMI: body mass index.

3.2. Blood Cell Count

On day 10, blood cell count was assessed. No effect due to prematurity or leptin supplementation was observed in the leukocyte count. However, the supplementation with EGF was able to increase the leukocyte cell count due to a higher count of the three populations studied, lymphocytes, monocytes, and granulocytes ($p < 0.05$, versus T, P, and P+Leptin groups, Table 2).

However, preterm rats showed a lower count of erythrocytes compared to the T group ($p < 0.01$, Table 2) and supplementation with both milk bioactive components was not able to revert it ($p < 0.01$ versus T group). Preterm animals had lower hemoglobin (Hb) concentrations and hematocrits (HCT), but higher mean corpuscular hemoglobin (MCH) levels and mean corpuscular volumes (MCVs) ($p < 0.05$ versus T group). Although the count of erythrocytes was not modified in preterm animals supplemented with leptin or EGF, the nutritional interventions were able to revert some of these alterations by inducing a tendency to increase HCTs and to significantly increase Hb concentrations and MCH values ($p < 0.01$ versus P group and $p < 0.01$ versus T and P groups, respectively, Table 2). Moreover, leptin nutritional intervention increased the MCVs ($p < 0.01$ versus P group). Platelet count was not influenced either by prematurity or the nutritional interventions.

Table 2. Blood cell count from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 10 of the suckling period.

	Day 10			
	T	**P**	**P+Leptin**	**P+EGF**
Leukocytes ($\times 10^9$/L)	2.48 ± 0.58	2.45 ± 0.68	2.52 ± 0.45	3.57 ± 1.31 $^{*\varphi\,\Delta}$
Lymphocytes ($\times 10^9$/L)	1.71 ± 0.49	1.65 ± 0.50	1.74 ± 0.48	2.41 ± 1.02 $^{*\varphi\,\Delta}$
Monocytes ($\times 10^9$/L)	0.23 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.22 ± 0.05	0.31 ± 0.10 $^{*\varphi\,\Delta}$
Granulocytes ($\times 10^9$/L)	0.54 ± 0.20	0.59 ± 0.31	0.55 ± 0.20	0.85 ± 0.39 $^{*\varphi\,\Delta}$
Erythrocytes ($\times 10^{12}$/L)	3.41 ± 0.25	3.03 ± 0.21 *	3.12 ± 0.22 *	3.10 ± 0.33 *
Hb (g/L)	82.90 ± 5.75	78.37 ± 5.13 *	85.52 ± 5.27 $^{\varphi}$	82.94 ± 6.48 $^{\varphi}$
HCT (%)	28.95 ± 2.02	27.09 ± 2.45 *	28.53 ± 2.54	27.93 ± 2.08
MCV (fL)	86.22 ± 3.40	90.74 ± 3.95 *	92.01 ± 4.08 $^{\varphi}$	90.04 ± 4.08 *
MCH (pg)	24.64 ± 1.04	25.83 ± 1.37 *	27.48 ± 2.00 $^{*\varphi}$	26.71 ± 1.94 $^{*\varphi}$
Platelets ($\times 10^{12}$/L)	467.45 ± 81.99	502.94 ± 89.08	514.44 ± 63.64	455.25 ± 96.91

The results are expressed as mean ± SD (n = 18 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; $^{\Delta}$ $p < 0.05$ versus P+Leptin group. Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin.

3.3. Phagocytic Function of Blood Leukocytes

The phagocytic activity of blood leukocytes was studied at day 10, focusing on monocytes and granulocytes. Although no changes due to prematurity or supplementation were observed in granulocyte phagocytic activity, animals supplemented with leptin showed higher phagocytic activity in their monocytes compared with the T and P groups ($p < 0.01$, Figure 2A,B). Moreover, the phagocytic efficiency of these leukocytes was not modified by either the prematurity or the supplementation (Figure 2C,D).

Nutrients **2019**, *11*, 2380

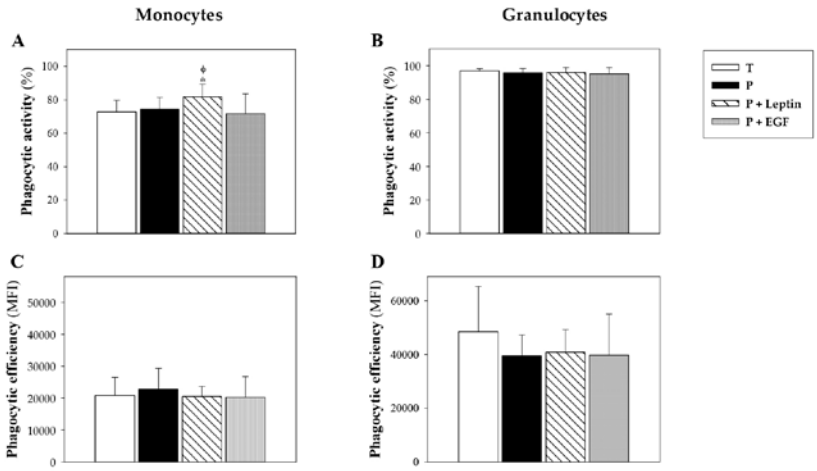


Figure 2. Phagocytic function of blood leukocytes from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF). Phagocytic activity (**A**,**B**) and efficiency (**C**,**D**) at day 10 from monocytes and granulocytes, respectively. Results are expressed as mean ± SD (n = 9 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.01$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group.

3.4. Plasma IgA, IgM and IgG Concentrations

On days 10 and 17, plasma IgA, IgM, IgG, and IgG isotypes (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and the Th1/Th2-immune response balance) were quantified and summarized in Figures 3 and 4. In all Ig, a relative, age-associated increase was detected between 10 and 17-day-old rats owing to a normal immune development in all groups ($p < 0.05$, Figure 3).

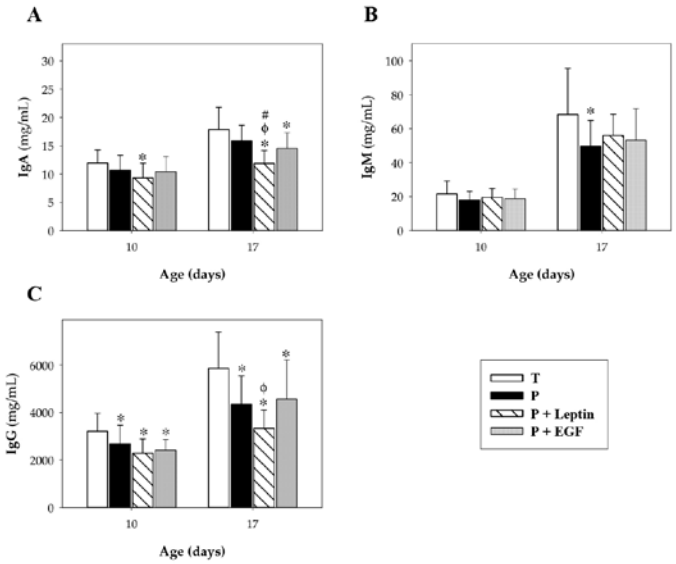


Figure 3. Plasma Ig concentrations at day 10 and 17. Plasma IgA (**A**), IgM (**B**), and IgG (**C**) concentrations from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF), are expressed as mean ± SD (n = 8–12 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; # $p < 0.05$ versus P+EGF group.

Nutrients **2019**, *11*, 2380

Although no changes were observed in IgA due to prematurity, leptin and EGF supplementations were able to decrease IgA levels at day 17 ($p < 0.01$ versus T and P group and $p < 0.05$ versus T group, respectively, Figure 3A). In the case of leptin, this significant decrease could already be seen at day 10 ($p < 0.01$ versus T group). Moreover, animals delivered prematurely showed lower concentrations of IgM at day 17 compared to full-term ones ($p < 0.05$, Figure 3B), without modification at day 10. However, supplementation with leptin or EGF was not able to revert this change associated with prematurity.

Regarding IgG and its isotypes, prematurity reduced the concentration of IgG ($p < 0.01$ versus T group, Figure 3C) and three of its isotypes (IgG1, IgG2b, and IgG2c) ($p < 0.01$ versus T group, Figure 4A,C,D) on both days studied, without modifying the IgG2a concentration (Figure 4B). The Th1/Th2 ratio was calculated considering the Th1-related IgG isotypes (IgG2b and IgG2c) and the Th2-related ones (IgG1 and IgG2a) in rats [27,28]. Results showed that prematurity induced lower Th1 antibody response, which was evidenced by a decrease in the Th1/Th2 ratio on both days studied ($p < 0.01$, Figure 4E).

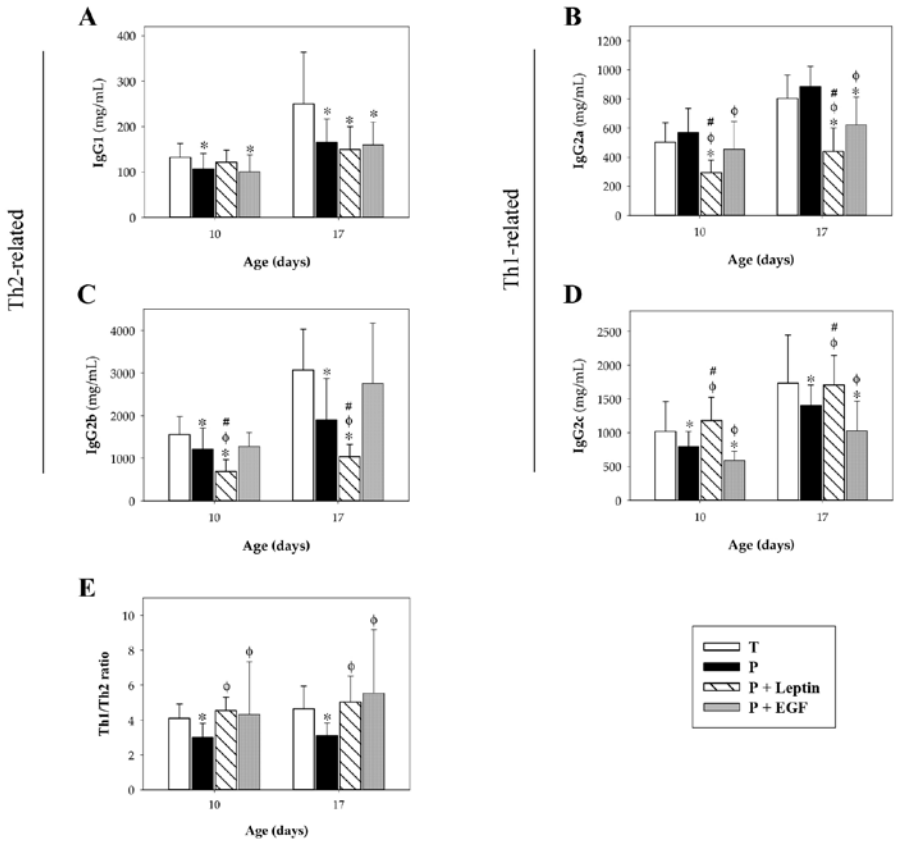


Figure 4. Plasmatic concentration of IgG subclasses at days 10 and 17. IgG1 (**A**), IgG2a (**B**), IgG2b (**C**), IgG2c (**D**), and Th1/Th2 ratios (**E**) from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) are expressed as mean ± SD (n = 8–12 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; # $p < 0.05$ versus P+EGF group.

The supplementation with leptin, but not EGF, showed a tendency to increase IgG1 at day 10 (Figure 4A). Nevertheless, at day 17, P+Leptin and P+EGF groups showed similar IgG1 levels to the P group, having lower values compared to the T group ($p < 0.01$). With regard to IgG2a, leptin and EGF

supplementations decreased its concentration at day 17 ($p < 0.01$ versus T and P groups) and in the case of leptin, this change could already be detected at day 10 ($p < 0.01$ versus T, P and P+EGF groups, Figure 4B). Moreover, leptin supplementation decreased IgG2b concentration compared with the others studied groups ($p < 0.01$, Figure 4C). Finally, leptin supplementation increased the concentration of IgG2c to levels achieved by term animals ($p < 0.05$ on both days studied versus P and P+EGF groups, Figure 4D), whereas EGF decreased IgG2c levels on both days studied ($p < 0.01$ versus T and P groups, Figure 4D). Overall, the changes produced by leptin and EGF supplementations reverted the Th1/Th2 ratio decrease induced by prematurity on both days studied, inducing a Th1/Th2 ratio similar to that found in the T group ($p < 0.01$ versus P group, Figure 4E).

3.5. Lymphocyte Composition of the Spleen and MLN

At day 17, the lymphocyte pattern was characterized in the spleen and MLN and summarized in Figures 5 and 6. The main population present in the spleen was B cells and the percentages of the rest of the populations were lower (Figure 5). On the other hand, these percentages changed in the MLN, where the main population was Th, followed by B cells and Tc TCRαβ$^+$; and in lower proportions, Tc TCRγδ$^+$, NK, and NKT cells (Figure 6).

In the spleen, although no changes in phenotypical composition appeared due to prematurity, a tendency to decrease the proportion of B, Th, and Tc TCRαβ$^+$ cells was observed, but without reaching statistical significance (Figure 5A). Leptin supplementation for 17 days was not able to revert these effects induced by prematurity, and in addition, it decreased the percentage of Tc TCRαβ$^+$ cells even more ($p < 0.05$). However, animals supplemented with EGF increased the splenic B cell proportion to similar levels of those of the T group ($p < 0.01$ versus P group, Figure 5A). Moreover, a decrease in Th and Tc TCRαβ$^+$ was observed due to EGF supplementation ($p < 0.05$ versus T, P, and P+Leptin groups, Figure 5A). In regard to the CD8 co-receptor, no changes were observed on splenocytes on account of prematurity or leptin supplementation. Nevertheless, EGF supplementation decreased the CD8$^+$ cell percentage ($p < 0.01$, Figure 5B). This change was due to a reduction in the proportion of both CD8αα$^+$ and CD8αβ$^+$ cells ($p < 0.05$, Figure 5B).

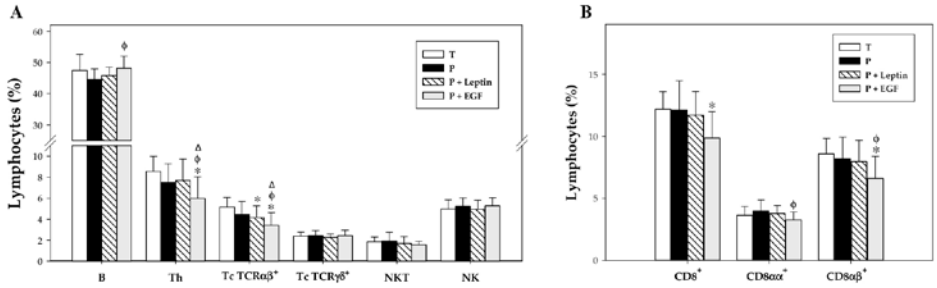


Figure 5. Main lymphocyte subsets (**A**) and CD8$^+$ cells and their both forms (CD8αα$^+$ and CD8αβ$^+$) cell percentages (**B**) in the spleen from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 17. The results are expressed as mean ± SD (n = 8–12 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; $^{\Delta}$ $p < 0.05$ versus P+Leptin group.

Regarding lymphocytes from MLN, despite there being no significant changes observed in the Tc TCRγδ$^+$, NKT, NK, and CD8$^+$ subsets of premature rats with respect to term ones, a decrease in B cell percentages and an increase in Th and Tc TCRαβ$^+$ proportions were observed in non-supplemented preterm rats ($p < 0.05$ versus T group, Figure 6). Leptin supplementation for 17 days did not produce any significant effect on the lymphocyte composition of the MLN. However, EGF increased B cell percentages ($p < 0.05$ versus P group, Figure 6A) and decreased Th and Tc TCRαβ$^+$ cell proportions ($p < 0.05$ versus T, P, and P+Leptin group), with the same tendency observed in splenocytes. Moreover,

an increase in the NK subset was observed in rats supplemented with EGF ($p < 0.05$ versus T, P, and P+Leptin groups, Figure 6A). Furthermore, the $CD8^+$ lymphocyte proportion in MLN was not affected by prematurity or leptin supplementation, but EGF supplementation for 17 days was able to decrease its percentage. This decrease was caused by a reduction in $CD8\alpha\beta^+$ cell percentage ($p < 0.01$ versus T, P, and P+Leptin groups).

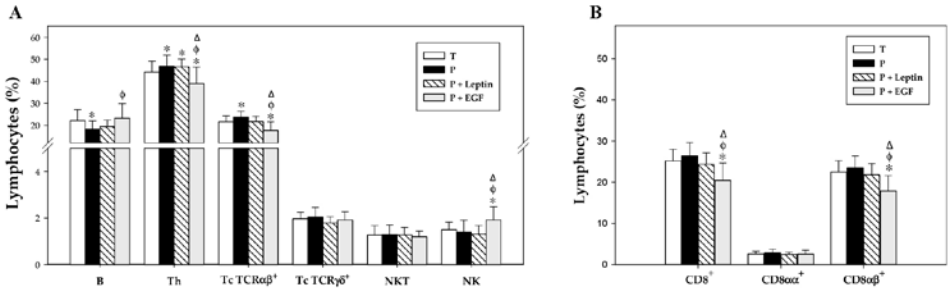


Figure 6. Main lymphocyte subsets (**A**) and $CD8^+$cells and their both forms ($CD8\alpha\alpha^+$ and $CD8\alpha\beta^+$) cell percentages (**B**) in the mesenteric lymph nodes (MLNs) from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 17. The results are expressed as mean ± SD (n = 8–12 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; $^{\Delta}$ $p < 0.05$ versus P+Leptin group.

3.6. Intestinal Barrier Function

To study the intestinal permeability, an in vivo assay was performed evaluating the paracellular pass of the 4 kDa-dextran labeled with FITC at day 10 (Figure 7). Premature animals had lower intestinal permeability, showing a lower concentration of FITC dextran in their plasma compared to that found in animals from T group ($p < 0.05$, Figure 7). Leptin and EGF supplementation for 10 days was able to revert this effect, reaching FITC-dextran levels similar to those observed in term rats ($p < 0.05$ in P+Leptin and P+EGF groups versus P group, Figure 7).

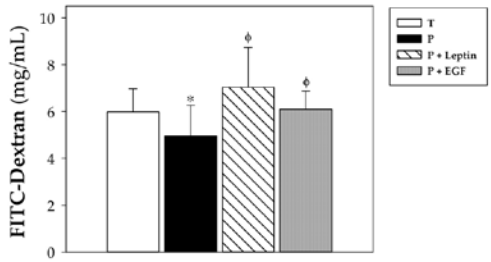


Figure 7. Intestinal permeability to 4 kDa-FITC-dextran from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 10. Results are expressed as mean ± SD (n = 9 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group.

3.7. Intestinal Histomorphometric Study

At day 10, the morphology of the distal jejunum was also evaluated, focusing on intestinal villi and goblet cell characteristics. The variables of the villi studied—widths, heights, and perimeters—are summarized in Table 3. No histological differences due to prematurity or supplementations were observed in the villi's variables. In regard to the goblet cells, animals born in preterm conditions showed a lower number of the cells in the villi, which, in addition, were smaller ($p < 0.05$ versus T group, Figure 8). Although the P+Leptin and P+EGF group also exhibited a lower number of goblet

cells ($p < 0.05$ versus T group), they had a similar area with respect to the T group, reversing the prematurity effect ($p < 0.05$ versus P group, Figure 8).

Table 3. Histomorphometric variables of the small intestine: villi widths, heights, and perimeters from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 10 of suckling period.

	T	P	P+Leptin	P+EGF
Villi width (μm)	165.91 ± 29.73	157.70 ± 29.17	166.96 ± 12.67	157.19 ± 32.49
Villi height (μm)	571.40 ± 104.95	547.55 ± 41.60	502.00 ± 49.46	487.76 ± 75.86
Villi perimeter (μm)	1223.07 ± 181.95	1213.25 ± 115.10	1176.00 ± 148.57	1102.18 ± 184.14

The results are expressed as a mean ± SD (n = 6 pups/group).

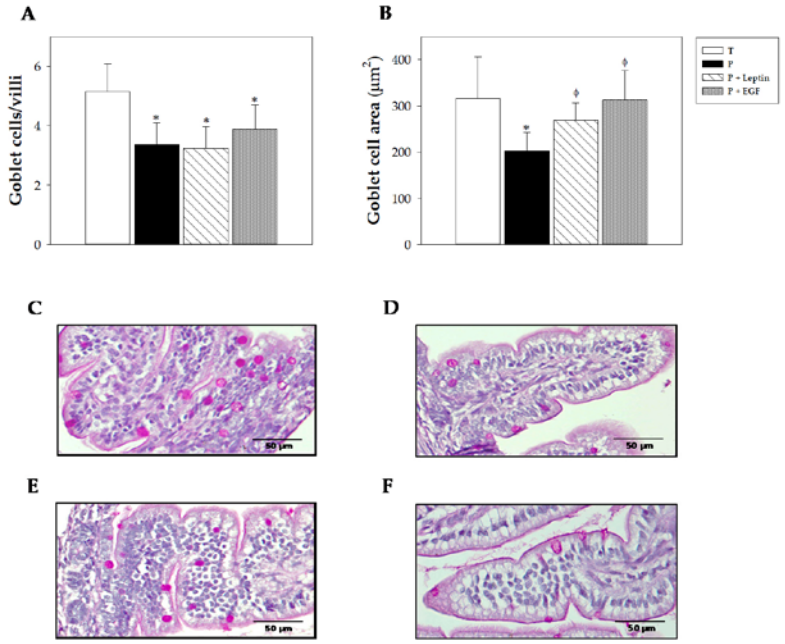


Figure 8. Number of goblet cells/villi (**A**), goblet cells area (**B**), and representative images of histological sections of the jejunum with periodic acid–Schiff (PAS) staining from the four groups: Term (**C**), Preterm (**D**), P+Leptin (**E**), and P+epidermal growth factor (P+EGF) (**F**) at day 10 of the suckling period. Results of Figure 8A,B are expressed as mean ± SD (n = 6 pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group. Goblet cells with densely stained granules can be observed along the length of the villi (Figure 8C–F). Scale bar = 50 μm for 400 ×.

3.8. Intestinal Gene Expression

The gene expression of proteins involved in mucus production, such as MUC-2 and MUC-3; molecules used as biomarkers of intestinal maturation, such as Blimp-1 and FcRn; and proteins from tight junctions, such as ZO-1, occluding, and claudin-4, were evaluated at day 10 (Figure 9). In regard to the expression of mucins, premature animals had lower *MUC-2* gene expression without changes in the *MUC-3* gene ($p < 0.01$ versus T group, Figure 9A). Leptin supplementation increased both mucins' gene expression; however, this increase was only significant for *MUC-3* ($p < 0.01$ versus T, P, and P+EGF groups, Figure 9A). No changes were observed after the EGF supplementation.

With reference to the gene expression of the intestinal maturation biomarkers Blimp-1 and FcRn, an increase in *FcRn* was observed in preterm rats, and leptin was not able to revert this effect, showing values similar to the P group ($p < 0.01$ versus T group, Figure 9B). No significant differences were detected between groups on *Blimp-1* gene expression. Moreover, the gene expression of tight junction proteins was also analyzed, but they were not modified by either the prematurity or the supplementation (Figure 9C). EGF did not induce any effect at the expression levels of the genes studied.

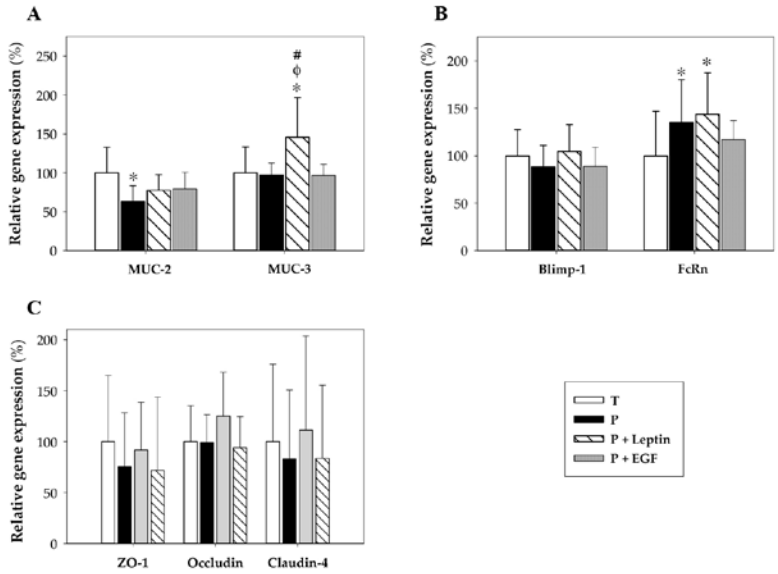


Figure 9. Gene expression in small intestine samples from the four groups: Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) at day 10 of the suckling period. *MUC-2* and *MUC-3* (**A**), *Blimp-1* and *FcRn* (**B**), *ZO-1*, *occludin*, and *claudin-4* (**C**). Results are expressed as mean ± SD ($n = 9$ pups/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ versus T group; $^{\varphi}$ $p < 0.05$ versus P group; # $p < 0.05$ versus P+EGF group.

3.9. Intestinal Immunofluorescent Study

Immunofluorescent staining was performed in order to observe the changes in the distribution of occludin, ZO-1 and claudin-2 and -4 due to prematurity or nutritional interventions. The staining pattern of occludin was similar among studied groups and localized in the apical membrane (Figure 10). A delocalization of ZO-1 in the P group was observed compared to the T group. Nevertheless, P+EGF reached a similar staining pattern to the T group. In addition, claudin-2 and -4 were also studied. Both T and P groups showed a similar staining pattern to claudin-2 but P+EGF showed an increase in fluorescence levels with respect to the T group. Moreover, claudin-4 showed an increase in fluorescence stain in premature rats with respect to term rats (Figure 10). In regard to supplementations, P+Leptin and P+EGF showed a staining pattern similar to that of the T group.

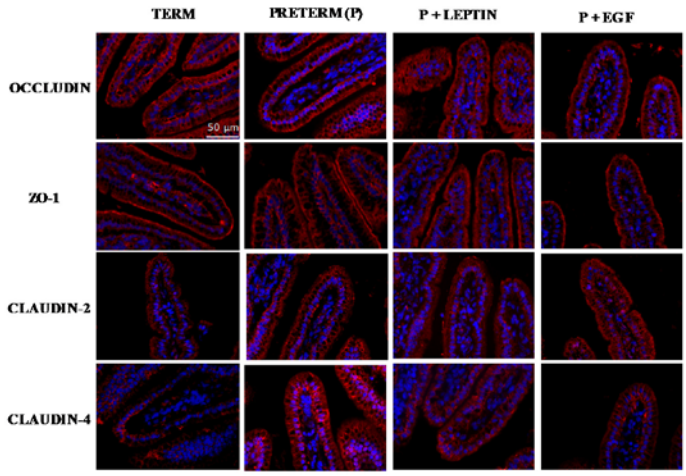


Figure 10. Immunofluorescent staining of small intestine tissue for occludin, ZO-1, claudin-2, and claudin-4. Representative images from Term (T), Preterm (P), P+Leptin, and P+epidermal growth factor (P+EGF) intestines at day 10. Similar results were obtained in five animals in each group. Nuclei were stained with DAPI (blue). Localization of occludin, ZO-1, claudin-2, and claudin-4 (red) were observed by fluorescence microscopy at 400× magnification. Scale bar: 50 µm.

4. Discussion

We have previously reported that in full-term rats the supplementation with leptin and EGF during the whole suckling period results in an enhancement of both the systemic and intestinal immune system [21–23]. However, little is known about the activity of these compounds in the naïve immune system of the preterm infant. These results prompted us to study whether those effects could also be observed in the rats born in preterm conditions. For that, a preterm rat model, recently set up in our laboratory, was used [24]. To achieve our aims, preterm rats born by C-section were supplemented with leptin and EGF during the first 17 days of life. The data presented here demonstrate that the supplementation with leptin was able to increase the hemoglobin concentration, to enhance phagocytic activity of monocytes, to modify plasma Ig concentration to a Th1 pattern, to revert the premature effect on intestinal permeability, to increase goblet cells' area, and to increase *MUC-3* gene expression. In addition, EGF supplementation increased both leukocyte and erythrocyte counts, decreased Th, T TCR$\alpha\beta^+$ and CD8$^+$ cell percentages, and increased the B cell proportion in MLNs and the spleen. Moreover, both milk components reversed prematurity's effects on intestinal permeability and goblet cell size.

With regards to body growth, the body weight of premature pups was lower than full-term ones only during the first 9 days, with no differences detected between them after that day. These results were similar to those observed in the preterm rat model, for which lower weight was observed during the whole study (10 days) [24], confirming in our model, the well-known observation that the length of gestation period has an effect on body weight. Although EGF-supplemented rats showed the same pattern as the P group, interestingly, leptin-supplemented pups were able to achieve the weight of the T group two days before the P group. Although a weight loss was expected, given the satiating role of leptin described in adults [29,30], no changes in body weight were observed in previous studies performed with rats supplemented with leptin during the whole suckling period [21,31]. However, it has to be taken into account that those rats were born at term, while in our study they were born prematurely. Moreover, no differences were found between BMIs, Lee indices, or organ relative weights. The punctual decrease observed in the relative length of small and large intestine due to leptin and EGF supplementations was not in line with that found in other studies performed in term rats [21,23,32].

Moreover, there is no information regarding the impact of leptin or EGF on the intestinal growth in preterm conditions. Therefore, further studies are needed to better understand the role of these components in the context of prematurity.

Focusing on the blood cell count, the preterm rats showed lower counts of erythrocytes, and lower Hb concentrations and HCTs compared to term ones. In addition, they showed higher MCH levels and MCVs, suggesting the presence of a macrocytic hyperchromic anemia. This result was in line with the macrocytic anemia observed in humans and in our previous study in preterm rats [24,33]. Premature infants may have anemia due to multiple factors, such as rapid body growth, low plasma levels of erythropoietin, or inadequate nutrient intake, among others [34,35]. Although the supplementation with leptin and EGF was not able to revert the erythrocyte count, the MCV or MCH, it was able to increase the mean Hb concentration compared to the P group. Little is known about the effect of leptin or EGF in erythropoiesis and even less in prematurity, but it might be a mechanism to compensate the reduced number of erythrocytes. However, the effect of EGF raising the leukocyte count could be explained by its role in hematopoiesis, increasing cellular proliferation and decreasing the apoptosis of hematopoietic stem cells in mice [36,37].

Newborns have a very immature immune system, due to a reduced adaptive immune response because of their lack of contact with pathogens until birth. Thus, the infant is mainly protected by an immature innate immunity. In our study, although no differences were observed in both phagocytic activity and the efficiency of both monocytes and granulocytes because of the prematurity and EGF supplementation. Rats supplemented with leptin showed a higher phagocytic activity of their monocytes. This result is in accordance with the role of leptin in enhancing the phagocytic activity of monocytes/macrophages in adult rodents [38,39]. This increase might be beneficial to the preterm newborn, since it implies an early maturation of the innate immune response.

In preterm animals, the concentrations of IgM and IgG were lower than T group. In line with our results, it has been described that human preterm infants have lower serum IgM and IgG concentrations, which, in addition, correlates positively with the gestational age and the weight of the baby at the time of birth [40]. The lower IgG concentration was not reverted by these breast milk components. Moreover, the supplementation with leptin and EGF reduced the plasma IgA concentration on both days studied and at day 17, respectively. It has been previously described that B cells have leptin receptors on their surfaces, suggesting a direct effect of leptin on B cell function [39]. However, little is known about the effect of leptin or EGF on IgA secretion. Nevertheless, we have previously reported the ability of leptin to decrease IgA in the intestinal compartment at the end of the suckling period in full-term rats [21]. Nevertheless, it must be taken into account that the main concentration of IgA detected in the intestine compartment comes from the mother's milk and not from the newborn. Further studies must be directed to ascertain the mechanisms involved in this decrease due to leptin supplementation.

In regard to IgG isotypes, this model of prematurity induced a reduction in both Th1-related IgG (IgG2b and IgG2c) and Th2-related IgG (IgG1), reducing the Th1/Th2 ratio compared with rats that were born at term. This result is in accordance with the bias towards a Th2 response described for preterm humans [41], making preterm infants more vulnerable to infections. Leptin is suggested to enhance the Th1 response and to inhibit the Th2 one [19,42]. In our study, with the exception of IgG2b, a decrease in both IgG1 and IgG2a, and an increase in IgG2c, was observed. Thus, these changes counteract the Th1/Th2 imbalance present in preterm animals. On the other hand, little is known about the effect of EGF on IgG isotypes and we reported here, the influence of this growth factor on IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c. Preterm rats supplemented with EGF showed a decrease in IgG1, IgG2a, and IgG2c, increasing the Th1/Th2 ratio. These effects suggest that leptin and EGF might enhance the Th1 response, improving the Th1/Th2 balance, representative of later stages. Thus, both supplementations seem to be involved in promoting the adequate initial immune homeostasis induced by breast milk that encourages a shift from an intrauterine Th2 predominant response to a Th1/Th2 balanced response [43,44].

In the present study, we have described for the first time, the effect of prematurity on the rat lymphocyte composition in the spleen and MLN, and also the impact of a supplementation with leptin or EGF on its composition. It has been previously described that preterm infants have a lower absolute number of B, Th, Tc, and NK cells in cord blood compared to term ones [45,46]. On the contrary, Correa-Rocha et al. reported that premature infants had a higher percentage of Th and Tc and a lower percentage of NK and B cells in cord blood [45]. Similar results in lymphocyte composition were observed in our study, where the prematurity condition lowered the proportion of B cells and raised those of Th and Tc TCR$\alpha\beta^+$ cells in MLNs at day 17. Nevertheless, no changes were observed in the lymphocyte pattern in the spleen.

Regarding the influence of milk bioactive components on the lymphocyte composition at day 17, leptin supplementation did not reverse any of the effects induced by prematurity in either studied compartment. Nevertheless, rats supplemented with EGF showed higher levels of B cells and lower percentages of Th and Tc TCR$\alpha\beta^+$ in both studied lymphoid organs, modifying premature changes observed in MLNs. Little is known about the effect of this growth factor on the spleen lymphocyte composition. So, these results are a first approach to elucidate the role of this growth factor modulating lymphocyte pattern in prematurity. Furthermore, in MLNs, EGF was also able to increase NK cell percentage at day 17. Little is known about the effect of EGF on NK cells, but the enhancement of this population in early life could be beneficial to the preterm infants who have a higher rate of infections due to their immature immune systems [41]. Regarding the cells bearing CD8 molecules, EGF was able to decrease that cell proportion in premature rats, in both compartments, but acting in different ways. While the diminution of the CD8$^+$ percentage was due to a lower proportion of CD8$\alpha\beta^+$ in the MLNs, the decrease in the spleen was caused by both forms of CD8 co-receptor (CD8$\alpha\alpha$ and CD8$\alpha\beta$). However, the influence of EGF in the CD8$^+$ cell population has scarcely been explored.

Those changes in phenotypical lymphocyte proportions in both the spleen and MLNs due to leptin and EGF supplementation would also lead to a modification in their patterns of secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Following on, in previous studies in term rats supplemented with these bioactive compounds, we observed changes in the cytokines released by cultured lymphocytes from MLNs and spleen [21–23]. Particularly, leptin was able to promote an anti-inflammatory pattern of cytokines [21,22], whereas EGF induced the release of pro-inflammatory cytokines [23].

At day 10 of the suckling period, the intestinal barrier function was studied by means of the evaluation of the permeability to 4-kDa-dextran. Previous studies carried out in our laboratory reported a decrease in intestinal permeability due to prematurity [24]. This unexpected output was also observed in the present study, thus confirming this result. The supplementation with leptin or EGF for 10 days was able to revert this effect and increase the intestinal permeability to values observed in full-term rats. Supporting this result, an increase in the intestinal paracellular permeability after an intraperitoneal injection of leptin was also reported in rats [47]. Nevertheless, that suggests the outcome of the review that EGF plays an important role in regulating intestinal permeability and epithelial barrier integrity [48]. In this sense, Clark et al. described that EGF treatment decreased intestinal paracellular permeability, reducing the concentration of lactulose in blood compared to the control group [49].

In the intestinal histomorphometric study, no changes were observed in the variables studied in the villi between groups. In respect to cells, the three preterm groups showed a lower number of goblet cells, and in the case of the P group, they were of a smaller size than those from the T group. However, leptin and EGF supplementations were able to increase goblet cell size. In this regard, it has been reported that a smaller size and density of the goblet cells could be related to immaturity, producing less mucus at the intestinal barrier level [49]. Thus, leptin and EGF could promote the maturation of these cells, improving mucus production. Moreover, it has been described that a supplementation with EGF increased goblet cell density and mucin production [49].

Goblet cells are specialized epithelial cells that play an important role in the intestine by synthesizing and secreting mucus, including MUC-2, which is responsible for the gel-forming mucins [50]. Although no changes were observed in *MUC-3* gene expression, premature rats showed lower *MUC-2* levels than full-term ones. So, the decrease in *MUC-2* gene expression could be related to the lower number and size of goblet cells observed in the histomorphometric study. Moreover, the tendency to increase *MUC-2* gene expression by leptin supplementation might be related with its capacity to increase goblet cell size. Moreover, although prematurity did not modify *MUC-3* gene expression, nutritional intervention with leptin was able to increase its expression. This effect was previously observed in rats after leptin supplementation during suckling, after a perfusion of leptin in the rat's colon or after adding leptin in an *in vitro* study [2]. EGF was previously reported to increase *MUC-2* gene expression [49]. However, this result was not observed in our study. Therefore, more studies are needed to elucidate the role of this growth factor on the expression of mucins.

The neonatal Fc receptor (FcRn) mediates the transfer of IgG from the placenta to the fetus, and from suckled maternal milk to the neonatal circulation [51]. The expression of this gene is a good biomarker of the process of intestinal maturation in lactating rats because it is highly expressed in early life and decreases at weaning [52]. Thus, a higher expression of this gene in preterm rats could mean a higher intestinal immaturity compared to the term ones. However, leptin or EGF supplementation was not able to revert this change. Neither the prematurity nor the supplementations modified *Blimp-1* gene expression, suggesting that neither of them have a role in the expression of this gene, which is also associated with maturation, in premature conditions.

The formation and localization of tight junctions is important for the maintenance of intestinal permeability, and for the epithelial barrier function [49]. For this reason, gene expressions of *ZO-1*, *occludin* and *claudin-4* were studied. However, no differences were found in their gene expressions due to prematurity or supplementations. Nevertheless, other approaches show the involvement of those proteins in related functions. Subsequently, in an *in vitro* study, the addition of 100 ng/mL of leptin to Caco-2 BBe cell culture decreased *occludin* gene expression [53]. Regarding EGF, Xu et al. showed that its oral administration to early weaned piglets promoted *ZO-1*'s and *occludin*'s gene expressions [54]. In addition, another study demonstrated that a supplementation with EGF was able to increase *occludin*'s gene expression in rats with NEC [49].

To gain more in-depth knowledge about tight junction proteins, an immunofluorescent staining of the small intestine was performed. ZO-1 has an important role in tight-junction assembly, while claudin-4 is a key molecule for barrier-forming [55]. Takehara et al. reported that higher expression of claudin-4 is related to an increased paracellular permeability [56]. Supporting that result, in our study non-supplemented preterm rats that had higher permeability showed an increase in claudin-4 fluorescent intensity compared to term rats. Moreover, rats supplemented with leptin or EGF showed lower permeability, and their claudin-4 fluorescence was similar to animals born at term. Furthermore, the supplementation with EGF showed an increased fluorescence of claudin-2. Little is known about the effect of EGF on this tight-junction protein; however, in NEC neonatal mice models, animals with NEC had increased claudin-2 expression and intestinal permeability [57]. Therefore, the increase in claudin-2 expression could be related with the higher permeability found in the EGF-supplemented rats. Further studies are needed to better understand the role of these components on tight-junction proteins.

5. Conclusions

Overall, the results obtained in this study show that prematurity produces, among other changes, a delay in the maturation of the neonatal immune system. However, the daily supplementation with leptin or EGF during the suckling period is able to partially counteract some of these changes: specifically, some aspects of both the systemic and intestinal immune system of preterm rats, reinforcing the role of both bioactive components of human milk in terms of modulating the intestinal barrier's function and the immune response in early life.

Author Contributions: À.F., M.C., M.J.R.-L., and F.J.P.-C. conceived and designed the research; all authors carried out the experiments and the data analysis and were involved in the interpretation of the data; À.F., B.G.-P., P.T.-C., and F.J.P.-C. contributed to the initial draft of the manuscript; all authors were involved in the critical revision of the manuscript; À.F. and F.J.P.-C. have primary responsibility for the final content. All authors have read and approved the final version of the manuscript for publication.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2013-48459-P). B.G.-P. holds a fellowship from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2014-068134). P.T.-C. holds a fellowship from the National Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT-DMPF-2015-1666-CO).

Acknowledgments: The authors would like to thank Clara Duran and Caterina Mascaró for their help with the laboratory work. We also thank the Biochemistry Section of the Faculty of Pharmacy and Food Science from the University of Barcelona for the use of their Modulus™ Microplate spectrophotometer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Boquien, C.Y. Human milk: An ideal food for nutrition of preterm newborn. *Front. Pediatrics* **2018**, *6*, 295. [CrossRef] [PubMed]
2. El Homsi, M.; Ducroc, R.; Claustre, J.; Jourdan, G.; Gertler, A.; Estienne, M.; Bado, A.; Scoazec, J.Y.; Plaisancié, P. Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2007**, *293*, G365–G373. [CrossRef] [PubMed]
3. Neu, J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 629S–634S. [CrossRef] [PubMed]
4. Gartner, L.M.; Morton, J.; Lawrence, R.A.; Naylor, A.J.; O'Hare, D.; Schanler, R.J.; Eidelman, A.I.; American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* **2005**, *115*, 496–506. [PubMed]
5. Underwood, M.A. Human milk for the premature infant. *Pediatrics Clin. North Am.* **2013**, *60*, 189–207. [CrossRef]
6. Garcia, C.; Duan, R.D.; Brévaut-Malaty, V.; Gire, C.; Millet, V.; Simeoni, U.; Bernard, M.; Armand, M. Bioactive compounds in human milk and intestinal health and maturity in preterm newborn: An overview. *Cell. Mol. Biol.* **2013**, *59*, 108–131.
7. Ehrenkranz, R.A. Early nutritional support and outcomes in ELBW infants. *Early Hum. Dev.* **2010**, *86*, 21–25. [CrossRef]
8. Rochow, N.; Landau-Crangle, E.; Fusch, C. Challenges in breast milk fortification for preterm infants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2015**, *18*, 276–284. [CrossRef]
9. Sisk, P.M.; Lovelady, C.A.; Dillard, R.G.; Gruber, K.J.; O'Shea, T.M. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J. Perinatol.* **2007**, *27*, 428–433. [CrossRef]
10. Meinzen-Derr, J.; Poindexter, B.; Wrage, L.; Morrow, A.L.; Stoll, B.; Donovan, E.F. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J. Perinatol.* **2009**, *29*, 57–62. [CrossRef]
11. Cacho, N.T.; Parker, L.A.; Neu, J. Necrotizing enterocolitis and human milk feeding: A systematic review. *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 49–67. [CrossRef] [PubMed]
12. Patel, A.L.; Kim, J.H. Human milk and necrotizing enterocolitis. *Semin. Pediatrics Surg.* **2018**, *27*, 34–38. [CrossRef] [PubMed]
13. Isaacs, E.B.; Fischl, B.R.; Quinn, B.T.; Chong, W.K.; Gadian, D.G.; Lucas, A. Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. *Pediatrics Res.* **2010**, *67*, 357–362. [CrossRef] [PubMed]
14. van Odijk, J.; Kull, I.; Borres, M.P.; Brandtzaeg, P.; Edberg, U.; Hanson, L.A.; Høst, A.; Kuitunen, M.; Olsen, S.F.; Skerfving, S.; et al. Breatfeedig and allergic disease: A multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* **2003**, *58*, 833–843. [CrossRef] [PubMed]

15. Vohr, B.R.; Poindexter, B.B.; Dusick, A.M.; McKinley, L.T.; Wright, L.L.; Langer, J.C.; Poole, W.K.; NICHD Neonatal Research Network. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics* **2006**, *118*, e115–e123. [CrossRef]
16. Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* **2012**, *129*, e827–e841. [CrossRef] [PubMed]
17. Gidrewicz, D.A.; Fenton, T.R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics* **2014**, *14*, 216. [CrossRef]
18. Lewis, E.D.; Richard, C.; Larsen, B.M.; Field, C.J. The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 23–47. [CrossRef]
19. Carbone, F.; La Rocca, C.; Matarese, G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* **2012**, *94*, 2082–2088. [CrossRef]
20. Field, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1–4. [CrossRef]
21. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 486–495. [CrossRef] [PubMed]
22. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Enhancement of immune maturation in suckling rats by leptin and adiponectin supplementation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1786. [CrossRef] [PubMed]
23. Torres-Castro, P.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats. *Nutrients* **2018**, *10*, 1171. [CrossRef] [PubMed]
24. Grases-Pintó, B.; Torres-Castro, P.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. A preterm rat model for immunonutritional studies. *Nutrients* **2019**, *11*, 999. [CrossRef] [PubMed]
25. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Supplementation with 2′-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 372. [CrossRef] [PubMed]
26. Camps-Bossacoma, M.; Abril-Gil, M.; Franch, À.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M. Induction of an oral sensitization model in rats. *Clin. Immunol. Endocr. Metab. Drugs* **2014**, *1*, 89–101. [CrossRef]
27. Gracie, J.A.; Bradley, J.A. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 1217–1221. [CrossRef] [PubMed]
28. Saoudi, A.; Bernard, I.; Hoedemaekers, A.; Cautain, B.; Martinez, K.; Druet, P.; De Baets, M.; Guéry, J.C. Experimental autoimmune myasthenia gravis may occur in the context of a polarized Th1- or Th2-type immune response in rats. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7189–7197.
29. Ahima, R.S.; Prabakaran, D.; Mantzoros, C.; Qu, D.; Lowell, B.; Maratos-Flier, E.; Flier, J.S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **1996**, *382*, 250–252. [CrossRef]
30. Friedman, J.M.; Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **1998**, *395*, 763–770. [CrossRef]
31. Picó, C.; Oliver, P.; Sánchez, J.; Miralles, O.; Caimari, A.; Priego, T.; Palou, A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int. J. Obes. (Lond.)* **2007**, *31*, 1199–1209. [CrossRef] [PubMed]
32. Hormi, K.; Lehy, T. Transforming growth factor-α in vivo stimulates epithelial cell proliferation in digestive tissues of suckling rats. *Gut* **1996**, *39*, 532–538. [CrossRef] [PubMed]
33. Hoffbrand, A.V. Folate deficiency in premature infants. *Arch. Dis. Child.* **1970**, *45*, 441–444. [CrossRef] [PubMed]
34. Widness, J.A. Pathophysiology of anemia during the neonatal period, including anemia of prematurity. *Neoreviews* **2010**, *9*, e520. [CrossRef] [PubMed]
35. Strauss, R.G. Anaemia of prematurity: Pathophysiology and treatment. *Blood Rev.* **2010**, *24*, 221–225. [CrossRef] [PubMed]

36. Piryani, S.O.; Kam, A.Y.F.; Kliassov, E.G.; Chen, B.J.; Spector, N.L.; Chute, J.P.; Hsu, D.S.; Chao, N.J.; Doan, P.L. Epidermal growth factor and G-CSF signaling are synergistic for hematopoietic regeneration. *Stem Cells* **2018**, *36*, 252–264. [CrossRef] [PubMed]
37. Doan, P.L.; Himburg, H.A.; Helms, K.; Russell, J.L.; Fixsen, E.; Quarmyne, M.; Harris, J.R.; Deoliviera, D.; Sullivan, J.M.; Chao, N.J.; et al. Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration following radiation injury. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 295–304. [CrossRef] [PubMed]
38. La Cava, A.; Matarese, G. The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 371–379. [CrossRef] [PubMed]
39. Francisco, V.; Pino, J.; Campos-Cabaleiro, V.; Ruiz-Fernández, C.; Mera, A.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gómez, R.; Gualillo, O. Obesity, fat mass and immune system: Role for leptin. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 640. [CrossRef]
40. Alkan Ozdemir, S.; Ozer, E.A.; Kose, S.; Ilhan, O.; Ozturk, C.; Sutcuoglu, S. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *29*, 972–976. [CrossRef]
41. Melville, J.M.; Moss, T.J. The immune consequences of preterm birth. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 79. [CrossRef] [PubMed]
42. Procaccini, C.; Jirillo, E.; Matarese, G. Leptin as an immunomodulator. *Mol. Asp. Med.* **2012**, *33*, 35–45. [CrossRef] [PubMed]
43. Sprockett, D.; Fukami, T.; Relman, D.A. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 197–205. [CrossRef] [PubMed]
44. Dzidic, M.; Boix-Amorós, A.; Selma-Royo, M.; Mira, A.; Collado, M. Gut microbiota and mucosal immunity in the neonate. *Med. Sci.* **2018**, *6*, 56. [CrossRef] [PubMed]
45. Correa-Rocha, R.; Pérez, A.; Lorente, R.; Ferrando-Martínez, S.; Leal, M.; Gurbindo, D.; Muñoz-Fernández, M.Á. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatrics Res.* **2012**, *71*, 590–597. [CrossRef] [PubMed]
46. Duijts, L.; Bakker-Jonges, L.E.; Labout, J.A.; Jaddoe, V.W.; Hofman, A.; Steegers, E.A.; van Dongen, J.J.; Hooijkaas, H.; Moll, H.A. Fetal growth influences lymphocyte subset counts at birth: The generation R study. *Neonatology* **2009**, *95*, 149–156. [CrossRef] [PubMed]
47. Le Dréan, G.; Haure-mirande, V.; Ferrier, L.; Bonnet, C.; Hulin, P.; de Coppet, P.; Segain, J.P. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1059–1070. [CrossRef]
48. Tang, X.; Liu, H.; Yang, S.; Li, Z.; Zhong, J.; Fang, R. Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 1927348. [CrossRef]
49. Clark, J.A.; Doelle, S.M.; Halpern, M.D.; Saunders, T.A.; Holubec, H.; Dvorak, K.; Boitano, S.A.; Dvorak, B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: Protective effect of EGF treatment. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2006**, *291*, G938–G949. [CrossRef]
50. Birchenough, G.M.; Johansson, M.E.; Gustafsson, J.K.; Bergström, J.H.; Hansson, G.C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 712–719. [CrossRef]
51. Rodewald, R.; Kraehenbuhl, J.P. Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 159s–164s. [CrossRef]
52. Arévalo Sureda, E.; Weström, B.; Pierzynowski, S.; Prykhodko, O. Maturation of the intestinal epithelial barrier in neonatal rats coincides with decreased FcRn expression, replacement of vacuolated enterocytes and changed Blimp-1 expression. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164775. [CrossRef] [PubMed]
53. Kim, C.Y.; Kim, K.H. Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 BBe cells. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 26–35. [CrossRef] [PubMed]
54. Xu, S.; Wang, D.; Zhang, P.; Lin, Y.; Fang, Z.; Che, L.; Wu, D. Oral administration of Lactococcus lactis-expressed recombinant porcine epidermal growth factor stimulates the development and promotes the health of small intestines in early-weaned piglets. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 225–235. [CrossRef] [PubMed]
55. Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 631–659. [CrossRef] [PubMed]

56. Takehara, M.; Nishimura, T.; Mima, S.; Hoshino, T.; Mizushima, T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 825–831. [CrossRef]
57. Bergmann, K.R.; Liu, S.X.; Tian, R.; Kushnir, A.; Turner, J.R.; Li, H.L.; Chou, P.M.; Weber, C.R.; De Plaen, I.G. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 1596–1606. [CrossRef] [PubMed]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



DISCUSIÓN

Al nacer, el neonato pasa de un medio prácticamente estéril -en el útero- a un medio externo donde se expone a un elevado número de microorganismos, proteínas y productos químicos con los que nunca había contactado anteriormente (16). En esta etapa, la respuesta inmunitaria neonatal es limitada, menos competente y funcionalmente deficiente con respecto a adultos, tanto en humanos como en animales (7, 232). Así, se conoce que los neonatos tienen una respuesta inmunitaria innata y adaptativa inmadura (20) y que esta situación es aún más evidente en neonatos prematuros (24).

Los primeros días de vida, el neonato se beneficia de un sistema inmunitario (SI) maternoinfantil "híbrido", en que los factores maternos tienen una función importante en la defensa inmunitaria, así como, en el desarrollo de la inmunidad adaptativa del neonato (233). En este sentido, el desarrollo del SI es conducido, entre otros factores, por componentes bioactivos de la leche materna (7). Algunos de éstos, como son el factor de crecimiento transformante-β2 (TGF-β2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), regulan la respuesta inmunitaria neonatal en primeras etapas de vida y ofrecen protección frente a procesos de infección/inflamación de la mucosa intestinal (177). Así, se conoce que TGF-β2 favorece la tolerancia oral (152), mientras que EGF está implicado en la prevención de la enterocolitis necrotizante (NEC), que es la enfermedad gastrointestinal más común en recién nacidos prematuros (183, 234). Además, en estudios previos de nuestro grupo de investigación se cuantificó y comparó la concentración de diferentes componentes bioactivos en leche humana -entre ellos, TGF-β2 y EGF- de madres con parto a término y a pretérmino, correspondiente a diferentes fases de lactación (calostro, leche de transición y madura) (73). Los resultados mostraron que la concentración de TGF-β2 y EGF era mayor en calostro que en leche de transición y madura. Además, su contenido era superior en leche de madres de niños prematuros, en relación a los nacidos a término (73). Este hecho sugirió la implicación de estos dos factores bioactivos en el proceso de maduración fisiológica de los neonatos y, especialmente, en aquellos nacidos en condiciones de prematuridad; en los cuales un mayor aporte de TGF-β2 y EGF a través de leche materna podría representar un mecanismo de compensación en situaciones de inmadurez extrema.

Por otra parte, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) ha sido ampliamente estudiado en la última década por su implicación en la regulación de la homeostasis energética (196). Investigaciones recientes han mostrado que también está presente en leche materna (109). Este descubrimiento ha abierto una nueva puerta de investigación, revelando que FGF21 podría cumplir funciones como factor hormonal que contribuye a la función intestinal del neonato (109). Actualmente la información de que se dispone es escasa, si bien se ha descrito que uno de los efectos

que ejerce FGF21 en el neonato es la inducción del tejido adiposo marrón, como parte del proceso de adaptación del neonato al medio extrauterino (109).

En general, pocos estudios han evaluado el efecto de estos factores bioactivos presentes en leche materna sobre el SI de animales sanos, lo cual ha motivado a **estudiar la influencia de la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el SI de ratas lactantes nacidas a término y a pretérmino, objetivo de esta tesis.**

Estudios previos del grupo de investigación, han caracterizado el patrón de desarrollo fenotípico y funcional de los linfocitos en ratas nacidas a término, tanto del SI sistémico como intestinal, desde el nacimiento, durante el período de lactancia y tras el destete (232, 235, 236). Se ha evidenciado que el SI de ratas se desarrolla progresivamente durante las primeras 3 semanas de vida y que una semana después del destete su patrón aún no es similar al de rata adulta (236). Así, el uso de rata neonata constituye un modelo muy útil para el estudio del desarrollo del SI, ya que el periodo de gestación es muy limitado (21 días) y comporta que estos animales nazcan con un sistema defensivo muy inmaduro y, por tanto, óptimo para poder estudiar el impacto de diversos tipos de intervención con el objetivo de modificarlo. Concretamente, esta tesis está dividida en dos partes, en la primera parte se ha utilizado el modelo de ratas nacidas a término, y en la segunda parte se ha usado un modelo de ratas prematuras.

Así, en la primera parte de la tesis se evaluó la capacidad inmunomoduladora de TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el desarrollo del SI durante el período de lactancia (**Artículos 1**, **2** y **3**).

Para realizar este estudio se utilizaron ratas Wistar nacidas a término. Desde el día 1 hasta los 21 días de vida, los animales lactantes recibieron diariamente por vía oral el suplemento correspondiente. El grupo REF recibió únicamente el vehículo de administración del suplemento (PBS con 0,1% de albumina sérica bovina o BSA). El grupo TGF-β2 recibió una dosis de 35 µg/kg/día, dosis que fue calculada en base a la concentración de TGF-β2 presente en leche de rata y el consumo aproximado de leche que toman las crías entre los 4-14 días de edad (237). La dosis de EGF fue de 100 µg/kg/día, la misma que ha demostrado ser efectiva como tratamiento en un modelo de rata con NEC (238). Finalmente, la dosis de FGF21 fue de 5 µg/kg/día, la cual fue establecida en base a la concentración de TGF-β2 y FGF21 presente en leche materna de rata; así, se estableció que por 1 unidad de FGF21 hay aproximadamente 10 unidades de TGF-β2 (cociente 1:10) (109, 237).

Una de las limitaciones de este trabajo fue el no cuantificar en sangre los niveles endógenos, así como la absorción intestinal de los compuestos administrados TGF-β2, EGF y FGF21. Ahora bien, por una parte, se conoce que TGF-β2, EGF y FGF21 están presentes en leche materna y que disminuyen durante el período de lactancia, cubriendo la falta de síntesis propia del neonato durante los primeros días de vida

(108). Por otra parte, se ha descrito que el intestino delgado maduro tiene la capacidad de sintetizar los factores de crecimiento (GF) necesarios para el normal crecimiento intestinal y reparación mucosal (108, 239), como por ejemplo TGF-β (127), EGF (129), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) (239, 240), factor de crecimiento queratinocítico (KGF) (239) y péptido similar al glucagón-2 (GLP-2) (239). Además, algunos estudios han demostrado que la administración oral de roedores con TGF-β y EGF comporta un incremento de su concentración sanguínea (241, 234). Por tanto, estos estudios confirman la absorción intestinal de ambos compuestos (TGF-β2 y EGF). Sin embargo, en el caso de FGF21 se ha descrito en ratones que su aporte a través de la leche materna no incrementa su concentración plasmática (109), lo que sugiere que su efecto fisiológico se desarrolla a nivel intestinal.

Los resultados de esta primera parte están recogidos en los **Artículos 1, 2** y **3**. Con respecto al crecimiento, la suplementación diaria con TGF-β2, EGF o FGF21 -desde el nacimiento y durante todo el período de lactancia- no ha modificado el peso corporal de las crías, el índice de masa corporal (IMC), ni el índice de Lee (**Artículo 1**). Estos resultados fueron similares a otras investigaciones, en que ratas que recibieron TGF-β2 (118) o EGF (163, 242) durante las dos primeras semanas de vida, no mostraron cambios en su peso corporal. De forma similar, un estudio ha demostrado que ratones KO-FGF21, en comparación con ratones de tipo salvaje (WT), no tenían un peso corporal diferente (243); sin embargo, su actividad fisiológica como factor regulador de peso sigue siendo motivo de discusión (196). En general, podría sugerirse que los GF en estudio -en las condiciones experimentales de estudio- no tienen un papel clave en el crecimiento corporal de los neonatos.

Otra de las variables estudiada de desarrollo corporal ha sido el peso de órganos: bazo, timo e hígado (**Artículo 2**). Al igual que en el peso corporal, la suplementación con los GF de estudio (TGF-β2, EGF o FGF21) no ha modificado el peso de estos órganos. De forma contraria a nuestros resultados, Sakaguchi *et al*. ha descrito que el crecimiento y desarrollo del timo se correlaciona con el consumo de leche materna y su contenido en TGF-β (153). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la dosis de suplementación de TGF-β2 no ha modificado el peso del timo. Por otro lado, de forma similar a nuestros resultados, un estudio ha demostrado que la administración oral de EGF (40 mg/kg/día) no tiene efecto en el peso del hígado de conejos (244). Así mismo, un estudio con ratones FGF21 KO de 4 semanas de edad ha mostrado un peso similar de su timo y bazo respecto a los ratones WT (189). Por tanto, parece ser que FGF21 no tendría un efecto significativo en el peso de estos órganos. Estos resultados sugieren que los componentes bioactivos de leche materna estudiados -bajo las condiciones usadas- no ejercen una acción trófica significativa en los órganos de estudio (bazo, timo y hígado) durante el período de lactancia; de forma similar a lo descrito para el peso corporal.

La longitud y peso intestinal se utilizan como herramientas para evaluar el impacto primario de un nutriente sobre la maduración del intestino delgado de ratas (236). La suplementación con los GF de estudio no afectó estas variables (**Artículo 1**). Sin

embargo, se ha descrito en ratas lactantes que la administración de EGF (100 µg/kg) -por vía intraperitoneal (i.p.), durante solo dos días- incrementa el peso del estómago u del intestino (163). Además, se ha demostrado en ratas neonatas -que recibieron EGF, por vía oral, a través de fórmula en concentraciones que exceden las concentraciones fisiológicas de EGF presente en leche de roedores- mejoran el crecimiento intestinal (peso y longitud) (166). Así, de acuerdo con nuestros resultados, parece ser que se requeriría una dosis más elevada de estos compuestos para lograr modificaciones del crecimiento intestinal.

A pesar de no existir impacto en el crecimiento corporal e intestinal con ninguno de los GF, el objetivo principal de esta tesis se ha centrado en estudiar los efectos de TGF-β2, EGF y FGF21 en la respuesta inmunitaria en desarrollo. Por ello se procedió a evaluar la influencia de cada factor en diferentes variables indicadoras de maduración. Por un lado, se ha determinado en muestras sanguíneas la permeabilidad intestinal y se han cuantificado las diferentes subclases de Ig plasmáticas. A partir de muestras de intestino delgado, se cuantificaron las Ig intestinales, se analizó su estructura intestinal y cuantificó determinadas proteínas de unión estrecha, así como la expresión génica de marcadores de función inmunitaria intestinal. Además, a partir del intestino delgado proximal se aislaron los linfocitos intraepiteliales (IEL), así como también linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y de bazo, para establecer su fenotipo linfocitario y funcionalidad. Todas estas variables han permitido establecer el efecto de estos factores sobre la función de barrera epitelial y sobre el SI intestinal -inductor y efector- y sistémico.

A continuación, se discuten los efectos de la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 en el SI de rata lactantes nacidas a término. El análisis se ha realizado para cada uno de los GF de manera separada. En primer lugar, se comentan los resultados correspondientes al grupo suplementado con TGF-β2, seguido por los resultados del grupo EGF y, finalmente, se discuten los resultados correspondientes al grupo suplementado con FGF21.

El **factor de crecimiento transformante-β (TGF-β)** es un factor de crecimiento multifuncional (112). Al actuar principalmente como citocina tiene un amplio rango de actividades biológicas y, entre ellas, ejerce una función importante en la proliferación y diferenciación celular (245). A nivel del SI, TGF-β actúa como un interruptor celular para regular la función inmunitaria, de manera que se ha demostrado que TGF-β promueve la producción de IgA, por parte linfocitos B (120, 152). Además, la función principal de TGF-β en el SI es mantener la tolerancia oral mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos (132, 245).

En nuestro estudio, a nivel sistémico, se determinó la concentración de IgG, IgM e IgA en plasma. La suplementación con TGF-β2 no modificó la concentración de estas Ig (**Artículo 3**), siendo su concentración similar a la descrita en ratas lactantes por nuestro grupo de investigación en estudios previos (246). Además, se determinó la concentración de isotipos de IgG, concretamente IgG1 e IgG2a asociadas a una

respuesta Th1 y IgG2b e IgG2c, asociadas a una respuesta Th2 en roedores (247, 248). El estudio de isotipos permite evaluar el perfil de respuesta Th1/Th2. La suplementación con TGF-β2 incrementó la concentración de los isotipos asociados a una respuesta Th2 (IgG1 e IgG2a), lo que provocó una disminución en la proporción Th1/Th2 (**Artículo 3**). Contrario a nuestros resultados, Penttilla *et al.* mostraron que ratas que recibieron fórmula suplementada con TGF-β2 (100 ng/mL) presentaban una disminución de la concentración de la IgG1 (Th2) (249). Los autores concluyeron que -durante el período de lactancia- la suplementación con TGF-β2 favorece una respuesta Th1 (249), lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio. De hecho, nuestros resultados sugiren que TGF-β2 participa en la potenciación de la respuesta Th2, necesaria en estas primeras etapas de vida y que será substituida por un mayor predominio de la respuesta Th1 a medida que la concentración de éste, y otros factores promotores, disminuya en leche materna.

Con respecto a la respuesta inmunitaria humoral intestinal, la IgA es escasamente producida por el SI mucosal del neonato (7, 152). TGF-β1 y TGF-β2, factores presentes en la leche de mamíferos, tienen la capacidad de estimular la síntesis de IgA mucosal (152, 153). Así, TGF-β -en sinergia con IL-10- promueve la producción de IgA y la inducción de tolerancia oral (152). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios significativos en el contenido intestinal de IgA o IgM de ratas lactantes con la suplementación de TGF-β2. Este resultado podría ser debido a que la leche materna contiene elevada concentración de IgA e IgM, que son transferidas a las crías para cubrir la deficiencia de los primeros días, hecho que enmascara la cuantificación de la producción endógena. Por esta razón, la evaluación de IgA e IgM intestinal -a nivel de proteína- no permite analizar de forma adecuada los efectos derivados exclusivamente del neonato. En estudios futuros, debería cuantificarse la expresión génica de elementos de respuesta humoral para poder descartar la influencia materna en estas determinaciones.

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad -tanto de los linfocitos esplénicos como intestinales- se evaluó su respuesta proliferativa inespecífica y su capacidad de secretar citocinas, tras la estimulación con mitógeno (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28) mediante un ensayo "in vitro" (**Artículos 1** y **3**).

En relación a la capacidad proliferativa, la suplementación con TGF-β2 no influyó sobre la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos ni de linfocitos procedentes de GLM (**Artículos 1** y **3**). De forma contraria a este resultado, se ha demostrado en ratas lactantes que la administración de una fórmula de suero de leche enriquecida con TGF-β disminuye la respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (152). Así pues, el papel del TGF-β2 en esta función debe ser abordado de nuevo en futuros experimentos para clarificar su participación en este proceso.

Del mismo ensayo se obtuvieron sobrenadantes, en los cuales se cuantificó la concentración de citocinas secretadas, otra variable que permite evaluar el perfil de respuesta Th1/Th2. La suplementación con TGF-β2 no modificó la secreción de

citocinas por parte de linfocitos esplénicos (**Artículo 3**). A diferencia de nuestros resultados, Penttila *et al.* observaron un incremento en la expresión génica de citocinas representativas del perfil Th1 (IL-18, IL-12p40, IL-12p35 y IFN-γ) en bazo de ratas alimentadas con fórmula suplementada con TGF-β2, durante el periodo de lactancia (249). Esta contradicción de nuevo insta a nuevas investigaciones.

En linfocitos de GLM, la suplementación con TGF-β2 atenuó la producción de IL-13 a 21 días, con respecto al grupo REF (**Artículo 1**). IL-13 es una citocina de respuesta Th2 asociada a procesos alérgicos (250-252). Además se ha descrito que TGF-β2 tiene la capacidad de polarizar la respuesta inmunitaria de tipo Th2 hacia un perfil Th1 (249). También, se conoce que bajos niveles de IL-13 en calostro y leche madura se asocian a un menor riesgo de eczema en edades tempranas (154). Por consiguiente, nuestros resultados sugieren que el aporte de TGF-β2 podría ser útil en la prevención de alteraciones mediadas por una respuesta Th2, como son las alergias.

Por otra parte, en el presente proyecto se ha estudiado el impacto de la suplementación con estos factores bioactivos en ratas neonatas Wistar -durante el período de lactancia- sobre la composición linfocitaria en tres compartimentos: a nivel intestinal inductor (en GLM), a nivel intestinal efector (en IEL) y a nivel sistémico (en bazo).

Se ha descrito que TGF-β regula la activación de linfocitos B y favorece la síntesis de IgA (136, 245, 253); sin embargo, nuestros resultados no evidenciaron un efecto significativo en esta población celular. La suplementación con TGF-β2, si bien no mostró cambios en las principales poblaciones linfocitarias (Th, Tc, NK y B) en ninguno de los tres compartimentos estudiados (**Artículos 1, 2** y **3**), produjo algunos cambios puntuales a nivel de subpoblaciones.

En nuestro grupo de investigación se ha descrito el patrón de desarrollo de subpoblaciones linfocitarias en ratas lactantes. Se ha demostrado que durante la lactancia las células NK -tanto en IEL como en linfocitos de GLM- experimentan el cambio desde un fenotipo típico $CD8^+$ a un fenotipo específico intestinal ($CD8^-$) (236, 254). En GLM, la suplementación con TGF-β2 disminuyó la proporción del fenotipo inmaduro del intestino (NK $CD8^+$) a los 14 días, alcanzando valores similares a los ccorrespondientes a 21 días de edad; resultado que indica una acción positiva en la maduración inmunitaria intestinal. Por otro lado, a pesar de no observar cambios en el total de linfocitos $CD8^+$ -debido a la suplementación con TGF-β2 en ninguno de los compartimentos estudiados- se observó una disminución del cociente CD8αα/CD8αβ en GLM a los 21 días de edad. En ratas lactantes se ha descrito que este cociente en GLM disminuye con la edad del animal (254), por lo que este resultado sugiere una promoción de la maduración del SI intestinal.

En IEL, la suplementación con TGF-β2 fue capaz de incrementar la proporción de linfocitos T $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$ a los 14 días. Por un lado, Weitkamp *et al.* mostró que bebés prematuros con NEC tenían una baja proporción de células $TCR\gamma\delta^+$ $CD8^+$, con respecto

al grupo control (255). Por otro lado, Bhagat *et al.* describió que la pérdida de células TCR$\gamma\delta^+$ CD8$^+$ podría representar una ausencia de regulación inmunitaria en el compartimento de IEL (256). Teniendo en cuenta estas consideraciones, este resultado sugiere que la suplementación con TGF-β2 podría tener un papel en la prevención de la NEC ya que promueve un incremento en la proporción de linfocitos TCR$\gamma\delta^+$ CD8$^+$, el cual constituye una de las primeras líneas de defensa en la mucosa intestinal de ratas neonatas cuando la inmunidad adaptativa no está totalmente desarrollada.

En los tres compartimentos estudiados, se han analizado también marcadores de adhesión celular CD103 (αE integrina) y CD62L (L-selectina), ambos involucrados en la adhesión y movilización de linfocitos hacia el intestino (257). Globalmente, la suplementación con TGF-β2 no modificó la proporción de células que expresaban la αE integrina ni la molécula CD62L (**Artículos 1,2** y **3**). A pesar de que se ha descrito que TGF-β, en modelos controlados *in vitro* e *in* vivo, regula la expresión de αE-integrina en la superficie de IEL (258-260), regulando de esta manera la infiltración de linfocitos. Así, los GLM han sido el único compartimento en el cual se ha evidenciado efectos por la suplementación de TGF-β2, ya que se ha observado una disminución de la proporción de las células NK (NK CD8$^+$) y una reducción del cociente CD8αα/CD8αβ, cambios que evidencian la maduración del SI y la protección inmunitaria que brinda este compuesto a edad temprana.

De forma paralela al desarrollo inmunitario cabe destacar el desarrollo de la función epitelial de barrera intestinal. En este sentido, se ha descrito que los neonatos tienen un intestino inmaduro con una barrera poco desarrollada (261), la cual debe adaptarse a la transición del medio intrauterino a la vida extrauterina (262, 263). En los primeros días de vida una gran cantidad de moléculas cruzan el lumen intestinal a través del epitelio hacia la circulación sistémica y es por ello que los neonatos son más susceptibles a procesos infecciosos que pueden cursar con diarrea e incluso NEC (41). Por esta razón, resulta esencial que la barrera intestinal de neonatos madure rápida y apropiadamente. Con la finalidad de conocer el efecto de los factores bioactivos -objeto de estudio-sobre la función de barrera a nivel intestinal, se ha estudiado la permeabilidad intestinal y la expresión génica de algunas moléculas intestinales clave. Como fase previa, fue necesario definir la edad adecuada para realizar estudios de la función intestinal de barrera en ratas lactantes, por lo que se hizo necesario un estudio previo de permeabilidad durante el período de lactancia y destete (1-28 días). Este definió que, debido a la elevada permeabilidad intestinal y al bajo nivel de expresión de proteínas de la unión estrecha, la edad adecuada para realizar estudios de la función intestinal de barrera en ratas lactantes era entre 10 y 14 días de vida (**Artículo 2**). En línea con nuestros resultados, algunos autores han mostrado que en ratas lactantes el cierre de la barrera intestinal ocurre entre los 19 y 22 días de vida, asociado con una disminución de la permeabilidad y la activación de linfocitos T en el GALT (264, 265).

Así, en base a los resultados obtenidos en la fase previa, se evaluó la permeabilidad a moléculas de dextrano (4 KDa) unidas a FITC mediante un ensayo *in vivo* a los 10 días (**Artículo 2**) y se cuantificó la expresión génica de proteínas de unión estrecha (ocludina, ZO-1, claudina-2 y claudina-4) y mucinas (Muc-2 y Muc-3). La suplementación con TGF-β2 no mostró ningún efecto sobre la función de barrera ni sobre la expresión de las proteínas intestinales estudiadas. De forma opuesta a este resultado, un estudio *in vitro* demostró que TGF-β tenía la capacidad de disminuir la permeabilidad intestinal debido al incremento de proteínas de unión estrecha (147). Sin embargo, debe tenerse en consideración que se ha descrito que los GF actúan a través de receptores presentes en la luz intestinal, preferentemente en sitios de inflamación o en sitios conde la función de barrera se encuentra alterada por lesiones (147), hecho que podría justificar la falta de acción de TGF-β2 observada en nuestro estudio.

Para una función efectiva de cierre de barrera en el epitelio del intestino son necesarios niveles de TLR adecuados (266). Por este motivo, también se determinó la expresión génica de TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-7 y TLR-9 en ratas al final de la lactancia (21 días de edad). La suplementación con TGF-β2 no indujo ninguna modificación sobre la expresión de los TLR estudiados, siendo su expresión similar a la del grupo REF.

Finalmente, se cuantificaron dos genes que se expresan durante el desarrollo del epitelio en la etapa postnatal como son FcRn y BLIMP-1 (267). Por un lado, FcRn tiene la función de ser receptor de IgG, es decir que los niveles de la expresión de FcRn determinan la concentración de IgG en suero plasmático (268). Por otro lado, algunos estudios sugieren que BLIMP-1 regula el proceso de maduración intestinal (267). Su expresión se pierde en la transición de la lactancia al destete en roedores y, por esta razón, algunos autores sugieren que estos dos genes no tienen un papel funcional en el intestino de roedores adultos (267-269). La suplementación con TGF-β2 no mostró ningún efecto sobre estos dos genes indicativos de maduración intestinal, siendo su nivel de expresión similar a la del grupo referencia.

Finalmente, para completar el estudio de la barrera intestinal en animales de 10 días de edad se estudiaron variables morfométricas de las vellosidades intestinales (ancho, altura, área y perímetro), así como también de las células goblet; a partir de secciones de tejido intestinal y mediante la tinción de PAS. Los resultados mostraron que la suplementación con TGF-β2 no modificó la morfología de las vellosidades intestinales ni la proporción de células goblet.

Por otro lado, también se realizó un estudio inmunohistoquímico con la finalidad de observar la distribución de las proteínas de unión estrecha (ocludina, ZO-1, claudina-2 y claudina-4) en el epitelio intestinal. La suplementación con TGF-β2 indujo un aumento en la intensidad de fluorescencia para las proteínas ZO-1 y claudina-4. Este resultado es interesante, ya que se conoce que la proteína ZO-1 tiene un papel

relevante en el ensamblaje de las uniones estrechas (TJ) y que claudina-4 es una proteína importante para la formación de la barrera intestinal (169). Además, Fromm *et. al.* -mediante ensayos *in vitro*- demostraron que TGF-β1 incrementa la expresión génica de claudina-4 y que, a través de este mecanismo, refuerza la función epitelial de barrera (147). La divergencia en los resultados obtenidos de expresión génica y los de inmunolocalización no permiten afirmar con seguridad si la suplementación con TGF-β2 favorece o no la formación de la barrera intestinal, por lo que se requieren estudios posteriores para confirmar los resultados obtenidos.

En resumen, la suplementación dietética con TGF-β2 favorece la maduración del SI neonatal. Concretamente, en el presente estudio se ha observado un incremento en la concentración plasmática de IgG1 e IgG2a (tipo Th2). En el compartimento de GLM se han evidenciado la mayor parte de efectos asociados a la suplementación con TGF-β2, destacando la disminución en la secreción de IL-13, la disminución de la proporción de células NK $CD8^+$ y una reducción del cociente de linfocitos CD8αα/CD8αβ; cambios importantes que evidencian la maduración del SI y la protección inmunitaria que brinda TGF-β2.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos con la suplementación de EGF, los cuales se presentan en el mismo orden utilizado anteriormente para la suplementación con TGF-β2.

El **factor de crecimiento epidérmico (EGF)** es un péptido que modula una gran variedad de respuestas biológicas como son el crecimiento, la supervivencia, la migración, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular (160, 168, 176). Además, está ampliamente descrita su acción localizada en epitelio intestinal, desarrollando su capacidad de acelerar las funciones anteriormente mencionadas (162, 176, 270).

De forma similar al grupo suplementado con TGF-β2, la administración de EGF no modificó la concentración plasmática de IgG, IgM e IgA (**Artículo 3**). Además, los resultados obtenidos mostraron que -al igual que para TGF-β2- la suplementación con EGF incrementó la concentración de IgG1 e IgG2a sin modificar, en este caso, la relación Th1/Th2, como sucedía en el caso del grupo TGF-β2 (**Artículo 3**). Esta actividad inmunomoduladora de EGF no había sido anteriomente descrita en ningún otro tipo de aproximación y, por tanto, no existe información que permita comparar nuestros resultados. En cualquier caso, parece ser que a nivel sistémico la suplementación con EGF potencia la respuesta Th2 característica de la etapa neonatal (85). Por otro lado, no se observaron cambios en el contenido de IgA ni de IgM intestinal en ratas lactantes, resultado similar al mostrado con la suplementación de TGF-β2 (**Artículo 1**). Al igual que para el grupo TGF-β2, se evaluó la capacidad proliferativa y la capacidad de secretar citocinas de los linfocitos esplénicos y de GLM tras ser estimuladas con mitógeno (**Artículos 1** y **3**). La suplementación con EGF no mostró un efecto

significativo en estas dos variables a nivel sistémico, de forma similar a la suplementación con TGF-β2 (**Artículo 3**). Asimismo, la suplementación con EGF tampoco modificó la respuesta proliferativa de linfocitos de GLM (**Artículo 1**). Sin embargo, se ha descrito que EGF es capaz de prevenir y reducir la incidencia y gravedad de la NEC, modulando factores de trascripción críticos que participan en la regulación de citocinas (183). En este sentido, Halpern *et al.* demostraron que el efecto protector de EGF frente a la NEC se debe a la disminución de la citocina proinflamatoria IL-18 y al incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10, en el foco de la lesión intestinal (94,99). Nuestros resultados muestran que, a los 21 días, la suplementación con EGF en rata sana incrementó la producción de TNF-α y disminuyó la de IL-13 por parte de linfocitos de GLM (**Artículo 1**). Los cambios en estas dos citocinas -presentes en la leche materna- podrían estar asociados a efectos beneficiosos (80, 154). Así, por un lado, la disminución de IL-13 puede comportar un efecto positivo en el caso de procesos alérgicos, de forma similar a lo descrito para TGF-β2 (250-252). Por otro lado, la suplementación con EGF comportó una producción de TNF-α a día 21 similar a la del día 14, por lo que parece ser que EGF podría ser una proteína que se autorregula incrementando TNF-α, citocina capaz de regular su propio receptor EGF-R (170).

A diferencia del grupo suplementado con TGF-β2, la suplementación con EGF modificó la composición de las principales poblaciones linfocitarias en bazo de ratas lactantes a las dos edades de estudio, 14 y 21 días (**Artículo 3**). Así, por un lado, la suplementación con EGF incrementó un 15% la proporción de linfocitos B, mostró una tendencia (~33%) a incrementar la producción de IgM y también mostró una tendencia (~27%) a incrementar la relación de linfocitos B/T, con respecto al grupo REF a los 14 días.

Por otro lado, a los 21 días de vida, la suplementación con EGF disminuyó la proporción de linfocitos T, de linfocitos $CD8^+$ (Tc), de linfocitos $CD4^+$(Th) y de células NKT en bazo (**Artículo 3**). Acorde con estudios previos del grupo de investigación, la proporción de linfocitos T esplénicos fue inferior a la de linfocitos B en esta etapa de vida (232). Se conoce que esta baja proporción se mantiene durante el período de lactancia y que va incrementando con la edad (232). Sin embargo, la suplementación con EGF mantuvo la misma proporción de linfocitos B a lo largo de todo el período de lactancia, incrementando únicamente la proporción de linfocitos T con la edad (**Artículo 3**).

Con respecto a las células NK y NKT, nuestros resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por estudios previos del mismo grupo de investigación en ratas lactantes (232). Por un lado, las células NK de bazo fueron tan abundantes como los linfocitos T las primeras dos semanas del período de lactancia. Este resultado tiene un papel importante a temprana edad cuando la respuesta inmunitaria adaptativa aún no está plenamente desarrollada (232). Por otro lado, la suplementación con EGF disminuyó la proporción de células NKT a 21 días (**Artículo 3**). Este tipo celular es una población de linfocitos T que expresa marcadores característicos de células NK y de linfocitos T en su superficie celular. Algunos autores indican que las células NKT tienen una

función inmunitaria reguladora, que constituye un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (271). Las células NKT activadas producen una gran cantidad de citocinas Th1 y Th2, que ejercen una función reguladora en enfermedades autoinmunitarias y alérgicas (272-274). Además, Umetsu *et al.* sugirieron como herramienta para la prevención de alergias la utilización de terapias que promovieran el desarrollo de linfocitos t reg e inhibieran la función de células NKT (274). Así, este resultado podría indicar que la suplementación con EGF tiene una actividad reguladora y preventiva frente a enfermedades alérgicas en neonatos.

Respecto a la composición de linfocitos en los dos comportamientos intestinales estudiados (GLM e IEL), la suplementación con EGF no mostró cambios en las principales poblaciones linfocitarias (**Artículos 1** y **2**). Sin embargo, al realizar el análisis de las subpoblaciones, los resultados en GLM mostraron que la suplementación con EGF comparte algunos efectos de maduración con TGF-β2, como son la capacidad de promover una menor proporción de células NK $CD8^+$ y la disminución del cociente CD8αα/CD8αβ (**Artículo 1**).

Por otra parte, en las subpoblaciones de IEL, se observó que la suplementación con EGF disminuyó la proporción de los IEL NKT $CD8^+$ e incrementó la de IEL NKT $CD8^-$ (**Artículo 2**); resultado que no fue observado en el grupo suplementado con TGF-β2. Investigaciones previas del grupo de investigación establecieron que el cambio de fenotipo típicamente sistémico ($CD8^+$) a un fenotipo intestinal característico ($CD8^-$) es un cambio importantes para el desarrollo de IEL en ratas tras su nacimiento (236). Este resultado sugiere que la suplementación con EGF podría estar acelerando la maduración del SI mucosal. Por otra parte, se conoce que los IEL $CD8^+$ puede expresar esta molécula en forma homodimérica ($\alpha\alpha$) o heterodimérica ($\alpha\beta$), siendo el fenotipo CD8$\alpha\alpha$ el mayoritario. El suplemento con EGF disminuyó la proporción de IEL CD8$\alpha\beta^+$ e incrementó la de IEL CD8$\alpha\alpha^+$ a los 21 días de edad (**Artículo 2**). En un trabajo previo del grupo de investigación se demostró que, en ratas adultas, la proporción de IEL que expresan la molécula CD8$\alpha\alpha$ es 2-3 veces superior a la de aquellos que expresan CD8$\alpha\beta$. Por tanto este resultado sugiere que la suplementación con EGF, mediante el incremento en la proporción de IEL CD8$\alpha\alpha$ está promoviendo la maduración del SI intestinal.

En relación a los marcadores de adhesión celular αE integrina y CD62L, la suplementación con EGF, y de forma similar al grupo suplementado con TGF-β2, no modificó ninguna de las dos moléculas en ninguno de los tres compartimentos estudiados.
Respecto a la maduración intestinal neonatal (permeabilidad y cierre de la barrera intestinal) y, de forma similar a TGF-β2, el suplemento con EGF no modificó la permeabilidad intestinal (**Artículo 2**). Este resultado difiere al descrito en otros estudios que han demostrado *in vitro* que EGF es un regulador importante de la permeabilidad paracelular, ya que incrementa la expresión de proteínas de unión estrecha (275). Con respecto a la expresión génica de los TLR, la suplementación con

EGF disminuyó la expresión del gen TLR-9 a los 21 días (**Artículo 3**). Gribar *et al.* mostraron -en muestras de intestino delgado de ratones Swiss Webster- que la expresión de TLR-9 disminuye con la edad del embrión y que incrementa en el momento del nacimiento (276). Además, los autores sugieren que las proporciones de señal, tanto de TLR-4 como de TLR-9, pueden contribuir al desarrollo de la NEC (168). Así, nuestros resultados sugieren que EGF puede modular la expresión de TLR-9 en la mucosa intestinal durante el desarrollo del neonato, pudiendo ser este un mecanismo de acción de EGF en la prevención de la NEC.

Al igual que para TGF-β2, la suplementación con EGF no modificó la expresión génica de las proteínas de unión estrecha ocludina, ZO-1 y claudina-4 ni de las proteínas intestinales utilizadas como marcadores de maduración (FcRn y BLIMP-1); sin embargo, sí que modificó la expresión de las mucinas.. Nuestros resultados mostraron que la suplementación con EGF incrementa la expresión génica de MUC-3 a los 10 días (**Artículo 3**). Con respecto a este resultado, McElroy *et al.* demostraron el papel del TNF-α en el incremento de los niveles de mRNA de MUC-3 en muestras de intestino de ratón a los 14 días de vida (277). Teniendo en cuenta esto y que nuestros resultados previos mostraban como linfocitos estimulados de GLM procedentes de animales suplementados con EGF incrementaban la producción de TNF-α (**Artículo 1**), se podría inferir que el incremento hallado en nuestro estudio de MUC-3 es causado por el incremento de la producción de TNF-α en el GALT. Además, algunos estudios han mostrado que MUC-3 tiene un papel de protección en el epitelio intestinal y que se observa una menor expresión en pacientes con enfermedad de Crohn (278).

Por último, el suplemento con EGF no modificó de forma significativa las variables morfométricas de las vellosidades ni la proporción de células goblet. Además, en el estudio inmunohistoquímico, la suplementación con EGF -y de forma contraria a TGF-β2- mostró una menor intensidad de fluorescencia en las proteínas ocludina y claudina-4, en comparación con el grupo REF (**Artículo 2**). Por un lado, y de forma similar a nuestro resultado, Clark *et.al.* demostraron que el tratamiento con EGF de ratas con NEC promovía la formación de las TJ y que específicamente redistribuía y disminuía la expresión de ocludina (181). Por otro lado, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que EGF controla los niveles de claudina-2 y claudina-4 (279). Por todo ello, nuestros resultados refuerzan la idea que EGF tiene un papel importante en la formación y distribución de las proteínas de unión estrecha.

En resumen, al igual que para TGF-β2 nuestros resultados han demostrado que la suplementación de EGF también favorece a la maduración del SI del neonato. Así, el grupo EGF comparte los efectos indicativos de maduración evidenciados para el grupo TGF-β2, como son el incremento de la concentración plasmática de Ig de tipo Th2 (IgG1 e IgG2a), la menor secreción ex vivo de IL-13, la disminución en la proporción de células NK CD8$^+$ y la reducción en el cociente CD8αα/CD8αβ en GLM. Ahora bien, de forma diferencial, el grupo EGF mostró cambios en el fenotipo de linfocitos esplénicos (B, T, Tc, Th y NKT) y de IEL (NKT CD8$^+$, NKT CD8$^-$, CD8αα$^+$ y CD8αβ$^+$) e indujo cambios en

algunas proteínas intestinales como son MUC-3 y TLR-9. Por tanto, EGF desempeña acciones importantes a nivel defensivo que podrían estar implicadas en la prevención de alergias o de la NEC y en la maduración del SI. Dada la escasa información que existe del efecto de EGF sobre el SI de neonatos sanos se requieren más estudios para confirmar estos resultados.

Finalmente, y en relación al **factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21)**, estudios recientes han mostrado que su función no se halla limitada a la regulación del metabolismo, sino que recientemente se ha demostrado que también está involucrado en la protección frente a múltiples procesos fisiológicos como son oxidación, inflamación, aterosclerosis y proceso de envejecimiento (280). Es por ello que su posible función en el desarrollo del sistema defensivo neonatal presenta un elevado interés. En relación a la respuesta inmunitaria humoral, el grupo suplementado con FGF21, si bien no modificó la concentración plasmática de IgG, IgM e IgA (**Artículo 3**), sí que mostró un efecto sobre las subclases de IgG. Específicamente, FGF21 incrementó la concentración de IgG1 e IgG2a, induciendo una disminución del cociente Th1/Th2, de forma similar a los factores anteriores (**Artículo 3**). Por otro lado, a nivel intestinal, no se observaron cambios en el contenido intestinal de IgA e IgM en ratas lactantes (**Artículo 1**). Al no existir información del efecto de este compuesto sobre la repuesta inmunitaria, resulta difícil discutir y comparar los resultados obtenidos; sin embargo, resulta sorprendente que FGF21 presente a nivel humoral los mismos efectos que TGF-β2 y EGF, componentes bioactivos de leche materna ampliamente estudiados por los beneficios que brindan al neonato en los primeros días de vida.

Similar a los dos grupos anteriores, se evaluó la capacidad proliferativa y la capacidad de secretar citocinas de células de bazo y de GLM (**Artículos 3** y **1**). Por un lado, la suplementación con FGF21 no tuvo un efecto significativo sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos esplénicos y de GLM (**Artículos 1** y **3**). En relación a la capacidad para secretar citocinas, la suplementación con FGF21 mostró un efecto significativo tanto en bazo como en GLM. Por un lado, en linfocitos esplénicos, la suplementación con FGF21 no modificó la secreción de las citocinas estudiadas, sin embargo disminuyó el cociente IFN-γ/IL-4 (Th1/Th2), con respecto al grupo REF a los 21 días (**Artículo 3**). Por otro lado, en linfocitos de GLM, la suplementación con FGF21 disminuyó la secreción de IL-13 a 21 días, resultado ya observado con la suplementación de TGF-β2 y EGF (**Artículo 1**). Algunos autores han descrito que FGF21 podría ser un compuesto terapéutico atractivo en el tratamiento de trastornos inflamatorios (199, 281). En este sentido, en ratones con artritis inducida por colágeno, se ha demostrado que la suplementación con FGF21 regula los niveles de varias citocinas esplénicas como IL-6, IL-17, IL-1 y TNF-α (281). Además, en otro estudio en ratones Kunming, se evaluó el efecto de FGF21 sobre la toxicidad de lipopolisacárido (LPS, 5 mg/kg). Los autores describieron que la suplementación con FGF21 disminuye la concentración plasmática de citocinas proinflamatorias (IL-1β y TNF-α) e incrementa la de citocinas antiinflamatorias (IL-10) (199). Los resultados

obtenidos con la suplementación de FGF21 sobre las citocinas secretadas muestra un patrón que sugiere una tendencia a una respuesta Th2, de forma similar a los otros dos componentes estudiados.

Es conocido que FGF21 está presente en leche materna, tanto de humanos como de roedores (109). En ratones neonatos, se ha demostrado que la lactancia no contribuye a los niveles sistémicos de FGF21 en las crías y que actúa localmente en el intestino neonatal (109); sin embargo, se desconoce la participación de este componente sobre la maduración del SI. Por tal motivo, en este trabajo se ha estudiado la composición linfocitaria en bazo, GLM e IEL de ratas lactantes. En bazo, la suplementación con FGF21, al igual que el grupo suplementado con EGF, modificó la composición de las principales poblaciones linfocitarias en ratas al final de la lactancia (día 21) (**Artículo 3**). Así, la suplementación con FGF21 disminuyó la proporción de linfocitos T, linfocitos $CD8^+$ (Tc), linfocitos $CD4^+$(Th) y células NKT (**Artículo 3**). A nivel intestinal, la suplementación con FGF21 no produjo cambios en las principales poblaciones linfocitarias de células de GLM. Sin embargo, en el compartimento intraepitelial, la suplementación con FGF21 fue capaz de disminuir la proporción de IEL $CD8^+$ y de incrementar la de linfocitos $CD4^+$ a los 21 días. Este resultado sugiere que la suplementación con FGF21 podría regular la respuesta inmunitaria, así como mediar la tolerancia inmunológica durante el período de lactancia (**Artículos 1** y **2**).

Al igual que los grupos anteriores también se llevó a cabo el análisis de las subpoblaciones para los tres compartimentos estudiados. En bazo, la suplementación con FGF21 no mostró cambios significativos en ninguna de las subpoblaciones al igual que los grupos suplementados con TGF-β2 y EGF (**Artículo 3**). Por otro lado, en GLM, la suplementación con FGF21 promovió la maduración del SI causando un incremento en la proporción de células NK $CD8^-$ y una disminución en la relación de linfocitos CD8αα/CD8αβ, resultados similares a los grupos suplementados con TGF-β2 y EGF (**Artículo 1**).

A nivel de IEL, la suplementación con FGF21 disminuyó la subpoblación IEL NKT $CD8^+$ e incrementó la de IEL NKT $CD8^-$, a los 21 días de vida (**Artículo 2**); de forma similar a EGF. EL cambio en estas dos subpoblaciones podría indicar un efecto de maduración de FGF21 a nivel intestinal. Otro cambio observado a 21 días en este compartimento, fue la disminución de IEL $CD8\alpha\beta^+$ y el incremento de IEL $CD8\alpha\alpha^+$; resultado similar al observado con EGF (**Artículo 3**). Se ha descrito que el incremento en el porcentaje de IEL $CD8\alpha\alpha$ a temprana edad es un indicador de maduración, por tanto, la suplementación con FGF21 parece favorecer la maduración del SI intestinal durante el período de lactancia.

Respecto a los marcadores de adhesión celular αE integrina y CD62L, la suplementación con FGF21 mostró una influencia negativa en la subpoblación de IEL αE^+CD62L^- a los 21 días. En un estudio con ratones deficientes de αE se ha descrito que esta molécula es clave para los linfocitos T, particularmente para los T $TCR\alpha\beta^+$ (257). Así, este resultado podría estar relacionado con el bajo porcentaje de la subpoblación

de IEL T TCRαβ$^+$ encontrados en este trabajo a 21 días por efecto de la suplementación con FGF21.

Finalmente, también se determinó la expresión de superficie de las moléculas TLR4 y CD25 en IEL. Nuestros resultados mostraron una baja proporción de IEL que expresaran TLR4, similar a lo demostrado en otros estudios con ratas lactantes (182, 282). Además, la suplementación con FGF21 se asoció con un incremento en la proporción de IEL TLR4$^+$ en IEL a los 21 días. Este resultado podría explicarse con el hecho de que la expresión de TLR4 en enterocitos y en células inmunitarias puede incrementar en respuesta a situaciones de estrés, como son la alimentación con fórmula y la asfixia (283). Por otro lado, FGF21 se considera una hormona de estrés en diferentes condiciones patológicas (280, 284). Así, el efecto de FGF21 sobre la expresión de TLR4 sugiere que FGF21 favorece la respuesta inmunitaria a temprana edad, actuando como un inductor de estrés.

Para entender mejor el impacto de la suplementación con FGF21 sobre la maduración intestinal, se evaluó su efecto sobre la permeabilidad intestinal y la expresión génica de proteínas intestinales. Al igual que los grupos TGF-β2 y EGF, la suplementación con FGF21 no modificó significativamente la permeabilidad intestinal (**Artículo 2**). Además, no se observaron cambios en la expresión génica de las proteínas de unión estrecha (ocludina, ZO-1 y claudina-4), mucinas (MUC-2 y MUC-3) y TLR (TLR-2,-4,-5,-7,-9) (**Artículo 2**). Con respecto a la expresión génica de las proteínas intestinales BLIMP-1 y FcRn, la suplementación con FGF21 no modificó la expresión génica de BLIMP-1. No obstante, sí que causó una disminución significativa de la expresión génica de FcRn (**Artículo 2**). Así, parece ser que la suplementación con FGF21 disminuye este receptor de IgG como parte del proceso de potenciación de la maduración intestinal.

Con respecto al estudio de las variables morfométricas de las vellosidades y células goblet, la suplementación con FGF21 mostró una tendencia a incrementar el ancho, longitud y área de las vellosidades (**Artículo 2**). En relación a la distribución de las proteínas de unión estrecha (ocludina, ZO-1, claudina-2 y claudina-4) en el epitelio intestinal, la suplementación con FGF21 mostró un incremento en la intensidad de fluorescencia de la claudina-4; similar al mostrado para TGF-β2. Se ha descrito que la proteína Claudina-4 cumple una función importante en la formación de la barrera intestinal (147). Así, al igual que TGF-β2, parece ser que FGF21 participa en la formación de la barrera intestinal, sin embargo, es necesario un estudio más profundo para ratificar esta función.

En resumen, este trabajo ha demostrado por primera vez el efecto inmunomodulador de FGF21 en edades tempranas. FGF21 es capaz de promover la maduración del SI del neonato, de forma similar a la de los otros dos compuestos estudiados. Así, se ha evidenciado que comparte con TGF-β2 y EGF algunos efectos importantes en los diferentes compartimentos estudiados. En este sentido, a nivel sistémico incrementó

la concentración plasmática de IgG1 e IgG2a (de tipo Th2) y en linfocitos de GLM redujo la secreción de IL-13 y la proporción de linfocitos de fenotipo NK CD8$^+$. Curiosamente, FGF21 mostró un efecto similar a EGF, a nivel sistémico e intestinal. Así, compartieron los mismos cambios en relación al fenotipo de linfocitos esplénicos (T, Tc, Th y NKT) y de IEL (NKT CD8$^+$, NKT CD8$^-$, CD8$\alpha\alpha^+$ y CD8$\alpha\beta^+$). De manera particular, FGF21 mostró otros cambios a nivel sistémico, como una reducción del cociente IFN-γ/IL-4 y del porcentaje de linfocitos T TCR$\alpha\beta^+$. En el compartimento intraepitelial, FGF21 modificó el fenotipo de IEL (CD8$^+$, αE^+/CD62L$^-$ y TLR4$^+$) y causó cambios en la expresión génica de FcRn. Así, FGF21 parece ser que es un compuesto bioactivo de leche materna importante, que cumple varias funciones que favorecen la maduración del SI y que podría ser clave en la prevención de enfermedades alérgicas.

A partir de los resultados de los **Artículos 1, 2** y **3** se ha demostrado que la suplementación diaria con TGF-β2, EGF y FGF21 durante el período de lactancia ejerce un efecto sobre la respuesta inmunitaria humoral, el fenotipo linfocitario y el patrón de citocinas secretadas. Además, se ha observado que los tres componentes modifican la expresión génica de algunas proteínas a nivel intestinal.

Así, la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 en ratas lactantes nacidas a término promueve el desarrollo del SI inmaduro del neonato, tanto a nivel intestinal como sistémico. Sin embargo, nuestros resultados han mostrado que EGF ha sido el factor de crecimiento con más indicadores de maduración en las variables estudiadas. En base a los efectos beneficiosos de EGF en ratas lactantes nacidas a término, se ha planteado conocer la influencia de este componente bioactivo sobre el SI en condiciones de prematuridad, donde la inmadurez es más marcada.

Como fase previa, y dada la escasa información disponible, se requirió desarrollar y caracterizar un "**modelo de rata prematura"** para establecer biomarcadores que fueran diferenciales respecto a los de ratas nacidas a término (**Anexo 1**). Para ello, se realizó un estudio con ratas prematuras (grupo PT) y nacidas a término (grupo T) durante los primeros 10 días de vida, edad correspondiente al punto medio del período de lactancia (21 días). Cabe destacar que las ratas prematuras obtenidas por cesárea -horas antes de la previsión de parto natural- presentaron una viabilidad del 100%. Las variables de estudio en este modelo experimental fueron: variables indicativas de desarrollo corporal -peso corporal, peso de órganos, BMI e índice de Lee-; variables sanguíneas -recuento de leucocitos, eritrocitos y plaquetas; hemoglobina (Hb), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), y hemoglobina corpuscular media (MCH-, variables de respuesta inmunitaria humoral (Ig) y variables de respuesta inmunitaria innata (barrera intestinal y fagocitosis).

Al comparar los resultados del grupo PT respecto al grupo T, se evidenció que los animales prematuros tenían un menor peso corporal y de órganos durante todo el período de estudio. Por otra parte, el análisis del hemograma mostró que los animales

prematuros presentaban un recuento de eritrocitos inferior y un VCM superior al grupo T, resultado que sugiere un estado de anemia macrocítica. En relación a las Ig plasmáticas, los animales prematuros presentaron una menor concentración de Ig totales, así como también de IgG e IgM; respecto al grupo T.

El estudio de la barrera intestinal comprendió el análisis de variables morfométricas de las vellosidades intestinales (ancho, altura, área y perímetro) y el estudio morfológico de las células goblet (área). La prematuridad no afectó las variables morfológicas de las vellosidades, sin embargo; en las células goblet se evidenció una superficie celular menor en animales prematuros que en los nacidos a término, lo que implica una menor producción de moco en la barrera intestinal. Con respecto a la actividad fagocítica de los monocitos y granulocitos, ésta no resultó ser afectada por la prematuridad y, únicamente, se observó que los animales prematuros presentaban un menor porcentaje de monocitos con capacidad fagocítica, resultado que explicaría en parte la mayor susceptibilidad a infecciones de prematuros.

Los resultados obtenidos en la puesta a punto del "**modelo de rata prematura"** (**Anexo I**) permitieron establecer biomarcadores indicativos de prematuridad en rata, tanto de la respuesta inmunitaria innata (barrera intestinal y fagocitosis) como adaptativa (Ig), los cuales son de gran utilidad para estudios de inmunonutrición.

Aunque de forma previa se ha descrito en ratas nacidas a término, que la suplementación con EGF favorece la maduración del SI sistémico e intestinal (**Artículos 1,2** y **3**), poco se conoce acerca de la activad de este compuesto en el SI de neonatos nacidos de forma prematura. Por esto, utilizando la información que nos brindó la serie experimental de rata prematura (**Anexo I**), se realizó una nueva serie experimental incluyendo un grupo con intervención nutricional -suplementación con EGF- (**Articulo 4**). Así, para esta serie experimental además del grupo T y PT, se dispuso de un grupo de ratas prematuras suplementadas con EGF durante los primeros 17 días de vida (grupo PT+EGF).

En relación al crecimiento, el peso corporal de las ratas prematuras fue inferior que las del grupo T durante los primeros 9 días de vida, sin diferencias significativas en los días posteriores. Este resultado fue similar al observado en el modelo de ratas prematuras, donde se observó el bajo peso durante todo el estudio (10 días, **Anexo I**), confirmando así que el tiempo de gestación tiene un efecto sobre el peso corporal. El grupo PT+EGF mostró la misma curva de crecimiento que el grupo PT y no se observaron diferencias significativas en el BMI, índice de Lee y peso relativo de órganos, resultado similar al obtenido con ratas nacidas a término que fueron suplementadas con EGF (**Artículo 1**). También se observó una disminución puntual en las longitudes de intestino delgado y grueso debido a la suplementación de EGF, resultado contrario a lo encontrado en el estudio de ratas a término (**Articulo 1**). Para comprender este resultado, serán necesarios más estudios que evalúen el papel de este componente a este nivel y en el contexto de prematuridad.

Respecto al análisis hematológico, las ratas prematuras presentaron un bajo recuento de eritrocitos, concentración de Hb y HCT comparado con el grupo T. Además, al igual que en la serie experimental de rata prematura (**Anexo I**), el grupo PT mostró valores elevados de MCH y MCV, sugiriendo la presencia de anemia macrocítica (285, 286). Se conoce que los neonatos prematuros pueden tener anemia debido a múltiples factores, como son el rápido crecimiento corporal, bajos niveles de eritropoyetina en plasma o debido a la inadecuada ingesta de nutrientes, entre otros (287, 288). La suplementación de ratas prematuras con EGF no fue capaz de revertir los cambios provocados por la prematuridad en el recuento de eritrocitos, MCV o MCH. No obstante, la suplementación con EGF incrementó la concentración de Hb respecto al grupo PT. Aunque poco se conoce del efecto de EGF en la eritropoyesis y aún menos en prematuridad, el incremento de Hb podría ser un mecanismo implicado en la homeostasis para compensar el recuento reducido de eritrocitos. Por otro lado, la suplementación con EGF incrementó el recuento de leucocitos, resultado que podría ser explicado por su acción en la hematopoyesis, incrementando la proliferación celular y disminuyendo la apoptosis de las células madres hematopoyéticas, tal y como se ha descrito en ratón (289, 290).

El neonato nace con un SI adaptativo que es denominado *naïve*, es decir, inmaduro, que no tiene una respuesta inmunitaria adaptativa óptima y que depende en gran medida de su respuesta inmunitaria innata para la protección contra infecciones. En nuestro estudio, no se observaron diferencias en la actividad fagocítica, ni en la eficiencia de monocitos y granulocitos por efecto de la prematuridad ni por la suplementación con EGF.

En animales prematuros, la concentración de IgM e IgG fueron inferiores que en el grupo T (**Artículos 4**). En la misma línea que nuestros resultados, se ha descrito que los bebés prematuros tienen concentraciones séricas de IgM e IgG bajas, y que, además, estos valores se correlacionan positivamente con la edad gestacional y el peso del neonato en el momento del nacimiento (291). Esta reducida concentración de IgG no pudo ser revertida por la suplementación con EGF (**Artículo 4**). Por otro lado, la suplementación con este componente bioactivo redujo la concentración plasmática de IgA, existiendo poca información acerca de este efecto de EGF.

Con respecto a las subclases de IgG, este modelo de prematuridad indujo una reducción de las subclases de IgG relacionadas con la respuesta Th1 (IgG2b y IgG2c) y Th2 (IgG1), reduciendo el cociente Th1/Th2 en comparación con el grupo T. Este resultado demuestra una tendencia hacia una respuesta Th2, similar a la descrita en bebés prematuros (24). Por otro lado, las ratas prematuras administradas con EGF mostraron una disminución de IgG2a e IgG2c, incrementado el cociente Th1/Th2 (**Artículo 4**), en relación con las ratas prematuras sin suplementación. Estos resultados sugieren que EGF podría promover la respuesta Th1 y mejorar el balance Th1/Th2 a un valor representativo de las últimas etapas de lactancia. Así, la suplementación con EGF parece estar proporcionando una respuesta inmunitaria adecuada, induciendo un

cambio de una respuesta predomínate intrauterina de células Th2 a una respuesta balanceada de Th1/Th2 (69, 292).

En el presente estudio, se ha descrito por primera vez el efecto de prematuridad en la composición de linfocitos esplénicos y de GLM, y también el impacto de una suplementación con EGF sobre esta composición. Se ha descrito previamente que bebés prematuros tienen un menor recuento -en valores absolutos- de linfocitos B, Th, Tc y NK en sangre de cordón umbilical, en comparación con los nacidos a término (210, 293). Por el contrario, Correa-Rocha *et al.* describieron que bebés prematuros presentaban un elevado porcentaje de linfocitos Th y Tc y un bajo porcentaje de linfocitos NK y B en sangre de cordón umbilical (210), resultados similares a los observados en el presente estudio, en que la condición de prematuridad disminuyó la proporción de linfocitos B y elevó la de linfocitos Th y Tc TCR$\alpha\beta^+$ de GLM a los 17 días (**Artículo 4**). Sin embargo, no se observaron cambios en la composición de linfocitos esplénicos (**Artículo 4**).

Con respecto a la composición de linfocitos a día 17, las ratas suplementadas con EGF mostraron una elevada proporción de linfocitos B y un bajo porcentaje de linfocitos Th y Tc TCR$\alpha\beta^+$ en ambos compartimentos estudiados, revirtiendo los cambios observados en GLM en el grupo PT.. Un efecto similar fue observado en ratas nacidas a término con la suplementación de EGF (**Artículos 1** y **3**), confirmando así, el papel de este factor de crecimiento en la modulación del SI. Además, estos resultados representan una primera aproximación para esclarecer el papel de EGF en la modulación del patrón de linfocitos en prematuridad. Por otra parte, en GLM, la suplementación con EGF incrementó el porcentaje de linfocitos NK a los 17 días de edad. Poco es conocido acerca del efecto de EGF sobre la subpoblación de linfocitos NK, aunque el incremento de esta población en los primeros días de vida podría ser beneficiosa para los bebés prematuros, ya que éstos tienen una mayor probabilidad de padecer infecciones debido a su SI inmaduro (24). Por otra parte, con respecto a los linfocitos $CD8^+$, EGF fue capaz de disminuir la proporción de esta subpoblación en ratas prematuras en ambos compartimentos de estudio, pero actuando mediante diferentes vías. Por un lado, la disminución del porcentaje de linfocitos $CD8^+$ en GLM fue debido a la reducción de la proporción de linfocitos CD8$\alpha\beta^+$ (**Artículo 4**), resultado que también se observó en ratas nacidas a término (**Artículo 1**). Por otro lado, la disminución en el bazo fue causada por la disminución de linfocitos que expresaban ambas formas de correceptores de CD8 (CD8$\alpha\alpha$ y CD8$\alpha\beta$) (**Artículo 4**). Cabe recalcar que la influencia de EGF sobre la población de linfocitos $CD8^+$ en prematuridad no había sido explorada anteriormente.

A los 10 días del período de lactancia, se estudió la función de barrera intestinal, mediante la evaluación de la permeabilidad intestinal. En la puesta a punto del modelo de rata prematura se demostró una disminución en la permeabilidad intestinal, en relación al grupo T (**Anexo I**). Este resultado inesperado fue también observado en el modelo de prematuridad con suplementación, confirmando así el resultado obtenido

en el **Anexo I**. La suplementación con EGF durante los primeros 10 días de vida, fue capaz de revertir este efecto e incrementar la permeabilidad intestinal a valores observados en ratas nacidas a término (**Artículo 4**). Existen evidencias científicas que ponen de manifiesto que EGF tiene una función importante en la regulación de la permeabilidad intestinal y la integridad de la función de barrera (56, 160). Además, Clark *et al*. han descrito que el tratamiento con EGF disminuye la permeabilidad paracelular intestinal, reduciendo la concentración plasmática de lactulosa respecto al grupo referencia (181). Así, la hipótesis del posible efecto de EGF a nivel de barrera, tan sólo observable en casos de alteración, como se había postulado anteriormente en la discusión, podría verse confirmada con este resultado.

Del estudio histomorfométrico del intestino delgado se puede destacar que no se observaron cambios a nivel de vellosidades entre los grupos de estudio (**Artículo 4**). Sin embargo, en el análisis de las células goblet, se observó que los dos grupos de animales prematuros (PT y PT+EGF) mostraban un menor recuento y que -en el caso del grupo PT- éstas tenían un tamaño inferior a las del grupo T. Sin embargo, la suplementación con EGF fue capaz de incrementar el tamaño de las células goblet. En este sentido, se ha descrito que un tamaño pequeño y una baja densidad de células goblet podrían estar relacionados con una mayor inmadurez intestinal, acompañado de una menor producción de moco a nivel de la barrera intestinal (181). Por otro lado, se ha descrito que la suplementación con EGF incrementa la densidad de células goblet y la producción de moco (181). Así, el resultado obtenido en el grupo PT+EGF sugiere que EGF promueve la maduración de las células goblet, lo cual podría implicar una mayor producción de moco y, en definitiva, un efecto beneficioso sobre la función de barrera intestinal del neonato prematuro.

Las células goblet son células epiteliales especializadas que tienen un papel importante en el intestino, ya que sintetizan y secretan moco, incluyendo varias mucinas entre ellas la mucina MUC-2 (294). En este sentido, se analizó la expresión de genes MUC-2 y MUC-3 (**Artículo 4**) y, a pesar de que no se observaron cambios en la expresión génica de MUC-3; en el grupo PT se observó una menor expresión del gen MUC-2, en comparación al grupo T. La disminución en la expresión génica de MUC-2 podría estar relacionada con el bajo recuento y el menor tamaño de las células goblet. Otros autores han demostrado previamente que EGF incrementa la expresión génica de MUC-2 (181). Sin embargo, este resultado no se pudo ratificar en nuestro estudio. Por lo tanto, se requieren más estudios para esclarecer el papel de este factor de crecimiento en la expresión de mucinas.

Tal y como se ha mencionado en el contexto de las ratas nacidas a término, el receptor neonatal (FcRn) es mediador de la transferencia de IgG desde la placenta al feto, y de la leche materna a la circulación neonatal (295). La expresión de este gen es un buen indicador del proceso de maduración intestinal en ratas lactantes, se conoce que se encuentra altamente expresado a edades tempranas y que decrece con el destete (267). Así, la mayor expresión hallada de este gen en el grupo PT podría significar un mayor grado de inmadurez intestinal, respecto al grupo T (**Artículo 4**). La

suplementación con EGF fue capaz de revertir este cambio a valores similares del grupo T. Por otro lado, ni la prematuridad ni la suplementación modificó la expresión del gen Blimp-1, sugiriendo que ninguna de las condiciones tiene un papel en la expresión de este gen.

La permeabilidad intestinal y la función de barrera intestinal en condiciones de prematuridad también dependen de la formación y localización de las proteínas de unión estrecha (181). Por esta razón, en este contexto, también se estudió la expresión de los genes ZO-1, ocludina y claudina-4. Aunque no se encontraron modificaciones significativas en la expresión de estos genes ni por la prematuridad ni por la suplementación con EGF, otros autores han sugerido que EGF está involucrado en esta función. En este sentido, Xu *et al.* mostraron que tras la administración oral de EGF a cerdos destetados se promovía la expresión génica de ZO-1 y ocludina (296). Además, otro estudio demostró que la suplementación con EGF era capaz de incrementar la expresión génica de ocludina en ratas con NEC (181).

Con el fin de profundizar en la expresión y localización de las proteínas de unión estrecha, se realizaron tinciones mediante técnicas de inmunofluorescencia del intestino delgado de las proteínas ZO-1 y claudina-4, moléculas importantes para la formación de la barrera intestinal (169). Además, Takehara *et al.* demostraron que una mayor expresión de claudina-4 está relacionada con un incremento de la permeabilidad paracelular (297). En nuestra aproximación, se observó una mayor intensidad del marcaje fluorescente de claudina-4 en el grupo PT comparado con el grupo T, resultado que podría explicar el cambio observado en la permeabilidad intestinal. Además, las ratas suplementadas con EGF, que presentaban una menor permeabilidad, también mostraron una menor intensidad de fluorescencia de claudina-4, similar al grupo T (**Artículo 4**). Este resultado también se observó en las muestras de intestino delgado de ratas nacidas a término (**Artículo 2**). Por otro lado, la suplementación con EGF mostró un incremento de fluorescencia de claudina-2. En este sentido, en un modelo de ratones neonatos con NEC, se observó un incremento de fluorescencia de claudina-2 y de la permeabilidad (298). Así, el incremento de fluorescencia de claudina-2 podría estar relacionado con una mayor permeabilidad observada en el grupo PT+EGF. Sin duda, se necesitan más estudios para entender mejor el papel de la prematuridad y de EGF sobre las proteínas de unión estrecha.

Por tanto, la suplementación con EGF de ratas prematuras es capaz de evitar diversas alteraciones derivadas de dicha condición- que justifican la elevada susceptibilidad de los neonatos prematuros a padecer procesos infecciosos e inflamatorios.

En resumen, *se puede concluir que la suplementación con TGF-β2, EGF y FGF21 durante el período de lactancia, favorece la maduración del sistema inmunitario sistémico e intestinal en ratas lactantes nacidas a término y, en el caso de EGF, también en ratas nacidas de forma prematura. Debido a la escasa información de los efectos de estos factores bioactivos de leche materna sobre el sistema inmunitario del neonato sano, se requieren estudios adicionales que permitan profundizar en los efectos observados y confirmar si son extrapolables a humanos. De confirmarse estos resultados, TGF-β2, EGF y FGF21 serían tres compuestos bioactivos importantes que mejorarían las fórmulas infantiles actuales y que brindarían mayor protección pasiva a los neonatos que por diversos motivos no pueden recibir lactancia materna.*



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la presente tesis permiten extraer las siguientes conclusiones:

En relación al efecto de **TGF-β2, EGF y FGF21 sobre la función de barrera epitelial y el sistema inmunitario intestinal en ratas lactantes nacidas a término**,

- En el tejido linfoide asociado al intestino, la suplementación con los factores bioactivos ensayados produce cambios en la secreción de citocinas y en la composición de linfocitos -tanto del compartimento intestinal inductor (ganglios linfáticos mesentéricos), como del efector (linfocitos intraepiteliales)-. Estas modificaciones son más evidentes en el caso de EGF y FGF21.

- Ninguno de los suplementos administrados promueve la maduración precoz de la función epitelial de barrera. Sin embargo, EGF y FGF21 incrementan la expresión génica de moléculas de defensa innata y de maduración intestinal, respectivamente.

Con respecto al impacto de **TGF-β2, EGF y FGF21 sobre el sistema inmunitario sistémico en ratas lactantes nacidas a término**,

- La suplementación dietética con TGF-β2, EGF y FGF21 -durante el período de lactancia- promueve el desarrollo de un patrón de inmunoglobulinas plasmáticas asociado a una respuesta linfocitaria Th2, la cual es predominante en las primeras etapas de vida.

- La administración de TGF-β2, EGF y FGF21 -durante el período de lactancia- ejerce un efecto leve sobre la composición de linfocitos esplénicos y la secreción de citocinas, sin afectar su capacidad proliferativa.

Globalmente, la suplementación dietética con TGF-β2, EGF y FGF21 -durante la lactancia- influye en la maduración de diversos elementos defensivos en edades tempranas, promoviendo el desarrollo del sistema inmunitario, tanto intestinal como sistémico. Cabe destacar la novedad de los efectos inmunomoduladores de FGF21 descritos en estas aproximaciones.

En relación a la influencia de **EGF sobre la función de barrera epitelial y el sistema inmunitario intestinal y sistémico en ratas lactantes nacidas a pretérmino**,

- La suplementación dietética diaria con EGF, durante los primeros 17 días de vida, potencia la respuesta inmunitaria innata -incrementando la proporción de linfocitos NK en ganglios linfáticos mesentéricos, y contrarresta parcialmente algunas de las alteraciones inmunitarias asociadas a la prematuridad, como el desequilibrio en el patrón de inmunoglobulinas Th1/Th2, la permeabilidad intestinal, el tamaño de células caliciformes y la expresión génica intestinal.

En general, en un modelo de prematuridad en rata desarrollado en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la suplementación con EGF durante la lactancia desempeña un papel clave en la maduración de la función de barrera intestinal e inmunitaria, lo cual podría comportar un riesgo menor de padecer infecciones asociadas al parto prematuro.



BIBLIOGRAFÍA

1. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015;91:629-35.

2. World Health Organization. WHO recommendations on postnatal care of the mother and newborn. Geneva: *WHO*; 2013. Report No.: WQ 500.

3. Murtaugh MA, Lechtenberg E, Sharbaugh C. Nutrición durante la lactancia. Nutrición en las diferentes etapas de la vida. México: Mc Graw Hill Education; 2014.

4. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60:49-74.

5. Di Benedetto MG, Bottanelli C, Cattaneo A, Pariante CM, Borsini A. Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development. *Brain Behav Immun*. 2019.

6. Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Drago L. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns' immune system: a mini review. *Front Microbiol.* 2017;8:2100.

7. Turfkruyer M, Verhasselt V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28:199-206.

8. Lawrence R. Host-resistence factors an immunological significance of human milk. In: Lawrence RA, Lawrence RM, editors. Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession. 7 ed. Maryland Heights: *Elsevier*; 2011. p. 153-95.

9. Lanari M, Sogno Valin P, Natale F, Capretti MG, Serra L. Human milk, a concrete risk for infection? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25 Suppl 4:75-7.

10. Vieira Borba V, Sharif K, Shoenfeld Y. Breastfeeding and autoimmunity: Programing health from the beginning. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79.

11. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48:53 67.

12. Cacho NT, Lawrence RM. Innate immunity and breast milk. *Front Immunol*. 2017;8:584.

13. Mosca F, Giannì ML. Human milk: composition and health benefits. P*ediatr Med Chir*. 2017;39:155.

14. Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. In: Taylor SL, editor. *Adv Food Nutr Res*. 54: Academic Press; 2008. p. 45-80.

15. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc.* 2000;59:177-85.

16. Mujico JR, Marcos A. Factores inmonológicos de la leche materna. Inmunonutrición en la salud y la enfermedad: Médica Panamericana; 2011.

17. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, Davidson B, Salles É, Bhatia J, et al. Innate immunity of neonates and infants. *Front Immunol.* 2018;9:1759.

18. Belderbos ME, Levy O, Meyaard L, Bont L. Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013;24:102-13.

19. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:379-90.

20. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10:1171-84.

21. Kumar SK, Bhat BV. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol Lett.* 2016;173:42-54.

22. Tregoning JS, Wang BL, McDonald JU, Yamaguchi Y, Harker JA, Goritzka M, et al. Neonatal antibody responses are attenuated by interferon-γ produced by NK and T cells during RSV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:5576-81.

23. Lee YC, Lin SJ. Neonatal natural killer cell function: relevance to antiviral immune defense. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:427696.

24. Melville JM, Moss TJ. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci.* 2013;7:79.

25. Bujdoso R, Young P, Harkiss GD, McConnell I. Antigen presentation in the sheep: generation of antigen-specific T-cell lines. *Immunology.* 1989;66:559-64.

26. Walker JC, Smolders MA, Gemen EF, Antonius TA, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol.* 2011;73:53-8.

27. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. J *Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24:25-31.

28. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. Int Rev Immunol. 2002;21:471-95.

29. Maródi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun.* 2006;74:1999-2006.

30. Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol.* 2005;142:446-53.

31. Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:1119-27.

32. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science*. 2015;348:589-94.

33. Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong HA, Gearty SV, Pauli ML, Nosbaum A, et al. A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity.* 2015;43:1011-21.

34. Thome JJ, Bickham KL, Ohmura Y, Kubota M, Matsuoka N, Gordon C, et al. Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues. *Nat Med.* 2016;22:72-7.

35. Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol*. 1997;9:235-40.

36. Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. J Infect. 2015;71 Suppl 1:S112-20.

37. Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, Lewis DB, Ito S, Aruffo A, et al. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest.* 1995;95:66-75.

38. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. C*lin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.

39. Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Håversen L, Silfverdal SA, Mattsby-Baltzer I, et al. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;987:199-206.

40. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LM, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes.* 2010;1:367-82.

41. Anderson RC, Dalziel JE, Gopal PK, Bassett S, Ellis A, Roy NC. The role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis. *Colitis.* 2012. p. 3-30.

42. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-60.

43. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17:375-412.

44. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1337-45.

45. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993;123:1777-88.

46. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:883-917.

47. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology.* 2000;118:1001-11.

48. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 2001;120:411-22.

49. Barmeyer C, Harren M, Schmitz H, Heinzel-Pleines U, Mankertz J, Seidler U, et al. Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G244-52.

50. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:1131S-41S.

51. Rautava S, Walker WA. Academy of Breastfeeding Medicine Founder's Lecture 2008: Breastfeeding- An Extrauterine Link Between Mother and Child. *Breastfeeding Medicine.* 2009;4:3-10.

52. Bienenstock J, Forsythe P, Karimi K, Kunze W. Neuroimmune aspects of food intake. *International Dairy Journal.* 2010;20:253-8.

53. Bibiloni R, Schiffrin EJ. Intestinal host-microbe interactions under physiological and pathological conditions. *Int J Inflam.* 2010;2010:386956.

54. Rueda-Cabrera R, Gil A. Nutrición en inmunidad en el estado de salud. In: Panamericana M, editor. Tratado de Nutrición. 4. Madrid, España: Médica Panamericana; 2017.

55. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients.* 2018;10.

56. Kumbhare SV, Patangia DVV, Patil RH, Shouche YS, Patil NP. Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *J Biosci.* 2019;44.

57. Vaishampayan PA, Kuehl JV, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol.* 2010;2:53-66.

58. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016;22:713-22.

59. Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm Gn. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr.* 2008;138:1796S-800S.

60. Marcobal A, Sonnenburg JL. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota*. Clin Microbiol Infect.* 2012;18:12-5.

61. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*. 2015;17:852.

62. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature.* 2018;562:583-8.

63. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol.* 1982;15:189-203.

64. Hosea Blewett HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The Immunological Components of Human Milk. In: Taylor SL, editor. *Adv Food Nutr Res*. 54: Academic Press; 2008. p. 45-80.

65. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr*. 2010;156:S3-7.

66. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr.* 2017;171:647-54.

67. Lewis ED, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin Perinatol*. 2017;44:23-47.

68. Patel AL, Kim JH. Human milk and necrotizing enterocolitis. S*emin Pediatr Surg.* 2018;27:34-8.

69. Dzidic M, Boix-Amorós A, Selma-Royo M, Mira A, Collado MC. Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate. *Med Sci (Basel).* 2018;6.

70. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2007;37:7-36.

71. Jakaitis BM, Denning PW. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol.* 2014;41:423-35.

72. Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30 Suppl 2:S2-7.

73. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011;141:1181-7.

74. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine.* 2003;21:3382-8.

75. Telemo E, Hanson LA. Antibodies in milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996;1:243-9.

76. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011;4:603-11.

77. Nanthakumar NN, Meng D, Newburg DS. Glucocorticoids and microbiota regulate ontogeny of intestinal fucosyltransferase 2 requisite for gut homeostasis. *Glycobiology.* 2013;23:1131-41.

78. Rai D, Adelman AS, Zhuang W, Rai GP, Boettcher J, Lönnerdal B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(12):1539-47.

79. Jahani S, Shakiba A, Jahani L. The antimicrobial effect of lactoferrin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int J Infect*. 2015;2:e27954.

80. Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. Semin Neonatol. 2002;7:275-81.

81. Fernandes KE, Carter DA. The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms of Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. *Front Microbiol.* 2017;8:2.

82. Telang S. Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense. *Nutrients.* 2018;10(9).

83. Håversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol.* 2002;220(2):83-95.

84. Mastromarino P, Capobianco D, Campagna G, Laforgia N, Drimaco P, Dileone A, et al. Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals.* 2014;27(5):1077-86.

85. Hegar B, Wibowo Y, Basrowi RW, Ranuh RG, Sudarmo SM, Munasir Z, et al. The role of two human milk oligosaccharides, 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose, in infant nutrition. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2019;22:330-40.

86. Lönnerdal B, Hernell O. An opinion on "staging" of infant formula: a developmental perspective on infant feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;62:9-21.

87. Xu G, Davis JC, Goonatilleke E, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB. Absolute quantitation of human milk oligosaccharides reveals phenotypic variations during lactation. *J Nutr.* 2017;147:117-24.

88. Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*. 2001;11:365-72.

89. Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Müller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br J Nutr.* 2010;104:1261-71.

90. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012;22:1147-62.

91. Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:143-69.

92. Azagra-Boronat I, Rodríguez-Lagunas MJ, Castell M, Pérez-Cano FJ. Prebiotics for gastrointestinal infections and acute diarrhea. In: Watson RR, Preedy VR, editors. Dietary interventions in gastrointestinal diseases: *Academic Press*; 2019. p. 179-91.

93. Zopf D, Roth S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet.* 1996;347:1017-21.

94. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K, Van't Land B, Tims S, Stahl B, et al. Oligosaccharides modulate rotavirus-associated dysbiosis and TLR gene expression in neonatal rats. *Cells.* 2019;8.

95. Hassiotou F, Geddes DT. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Adv Nutr.* 2015;6(3):267-75.

96. Lönnerdal B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:11-25.

97. Brenmoehl J, Ohde D, Wirthgen E, Hoeflich A. Cytokines in milk and the role of TGF-beta. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(1):47-56.

98. Gila-Diaz A, Arribas SM, Algara A, Martín-Cabrejas MA, López de Pablo Á, Sáenz de Pipaón M, et al. A review of bioactive factors in human breastmilk: a focus on prematurity. *Nutrients.* 2019;11.

99. Goldman AS. The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed Med.* 2007;2:195-204.

100. Martín V, Mañes-Lázaro R, Rodríguez JM, Maldonado-Barragán A. Streptococcus lactarius sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61:1048-52.

101. Ruiz L, García-Carral C, Rodriguez JM. Unfolding the human milk microbiome landscape in the omics era. *Front Microbiol.* 2019;10:1378.

102. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6:e21313.

103. Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, et al. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J Hum Lact.* 2015;31:406-15.

104. Chen PW, Lin YL, Huang MS. Profiles of commensal and opportunistic bacteria in human milk from healthy donors in Taiwan. *J Food Drug Anal.* 2018;26:1235-44.

105. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012;96:544-51.

106. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 2014;16:2891-904.

107. Sporn MB, Roberts AB. The multifunctional nature of peptide growth factors. In: Sporn MB, Roberts AB, editors. Peptide growth factors and their receptors I. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*; 1990. p. 3-15.

108. Zhang M, Liao Y, Lönnerdal B. Milk growth factors and expression of small intestinal growth factor receptors during the perinatal period in mice. *Pediatr Res.* 2016;80:759-65.

109. Gavaldà-Navarro A, Hondares E, Giralt M, Mampel T, Iglesias R, Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep*. 2015;5:13717.

110. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 2005;135:1-4.

111. de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:4001-5.

112. Roberts AB, Sporn MB. The Transforming Growth Factor-βs. In: Sporn MB, Roberts AB, editors. Peptide growth factors and their receptors I. New York, NY: *Springer New York*; 1991. p. 419-72.

113. Lifshitz V, Frenkel D. TGF-β. In: Kastin AJ, editor. Handbook of biologically active peptides. second ed. Boston: *Academic Press*; 2013. p. 1647-53.

114. Batlle E, Massagué J. Transforming growth factor-β signaling in immunity and cancer. *Immunity*. 2019;50:924-40.

115. Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Curr Mol Med.* 2010;10:565-78.

116. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.

117. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1537S-43S.

118. Penttila IA, Flesch IE, McCue AL, Powell BC, Zhou FH, Read LC, et al. Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups. *Gut*. 2003;52:1579-86.

119. Travis MA, Sheppard D. TGF-β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82.

120. Tamayo E, Alvarez P, Merino R. TGFβ superfamily members as regulators of B cell development and function-implications for autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19.

121. Kelly A, Houston SA, Sherwood E, Casulli J, Travis MA. Regulation of innate and adaptive immunity by TGF-β. In: Alt F, editor. Advances in Immunology. 134: *Academic Press*; 2017. p. 137-233.

122. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. Bulletin of the World Health Organization. 2010;88.

123. Worthington JJ, Fenton TM, Czajkowska BI, Klementowicz JE, Travis MA. Regulation of TGFβ in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology*. 2012;217:1259-65.

124. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359:693-9.

125. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:770-4.

126. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-8.

127. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179-89.

128. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* 2002;195:1499-505.

129. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* 2000;165:4773-7.

130. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:295-307.

131. McKarns SC, Schwartz RH. Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J Immunol.* 2005;174:2071-83.

132. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99-146.

133. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:419-35.

134. Petit-Koskas E, Génot E, Lawrence D, Kolb JP. Inhibition of the proliferative response of human B lymphocytes to B cell growth factor by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 1988;18:111-6.

135. Warner BW, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005;14:175-80.

136. Kehrl JH, Thevenin C, Rieckmann P, Fauci AS. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol.* 1991;146:4016-23.

137. Lebman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol.* 1990;144:952-9.

138. Van Vlasselaer P, Punnonen J, de Vries JE. Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells. *J Immunol.* 1992;148:2062-7.

139. Borsutzky S, Cazac BB, Roes J, Guzmán CA. TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *J Immunol.* 2004;173:3305-9.

140. Klein J, Ju W, Heyer J, Wittek B, Haneke T, Knaus P, et al. B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate. *J Immunol.* 2006;176:2389-96.

141. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* 2011;32:412-9.

142. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007;204:1757-64.

143. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, et al. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science.* 2009;323:1488-92.

144. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev.* 2017;279:70-89.

145. Nowarski R, Jackson R, Flavell RA. The stromal intervention: regulation of immunity and inflammation at the epithelial-mesenchymal barrier. *Cell.* 2017;168:362-75.

146. Rautava S, Nanthakumar NN, Dubert-Ferrandon A, Lu L, Rautava J, Walker WA. Breast milk-transforming growth factor-β_2 specifically attenuates IL-1β-induced inflammatory responses in the immature human intestine via an Smad 6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology.* 2011;99:192-201.

147. Hering NA, Andres S, Fromm A, van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, et al. Transforming growth factor-β, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr.* 2011;141:783-9.

148. Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut.* 2006;55:1512-20.

149. Nguyen DN, Sangild PT, Ostergaard MV, Bering SB, Chatterton DE. Transforming growth factor-β2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307:G689-99.

150. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 2012;489:231-41.

151. Sitarik AR, Bobbitt KR, Havstad SL, Fujimura KE, Levin AM, Zoratti EM, et al. Breast milk transforming growth factor β is associated with neonatal gut microbial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65:e60-e7.

152. Zhang M. The role of milk transforming growth factor-β (TGF-β) in the development of the infant gut and gut mucosal immune system. Adelaide: University of Adelaide; 2000.

153. Sakaguchi K, Koyanagi A, Kamachi F, Harauma A, Chiba A, Hisata K, et al. Breast-feeding regulates immune system development via transforming growth factor-β in mice pups. *Pediatr Int.* 2018;60:224-31.

154. Munblit D, Treneva M, Peroni DG, Colicino S, Chow LY, Dissanayeke S, et al. Immune components in human milk are associated with early infant immunological health outcomes: a prospective three-country analysis. *Nutrients.* 2017;9.

155. Oddy WH, Rosales F. A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:47-59.

156. Penttila IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *The Journal of Pediatrics*. 2010;156:S21-S5.

157. Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol.* 2012;13:925-31.

158. Ogawa J, Sasahara A, Yoshida T, Sira MM, Futatani T, Kanegane H, et al. Role of transforming growth factor-β in breast milk for initiation of IgA production in newborn infants. *Early Hum Dev.* 2004;77:67-75.

159. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem.* 1962;237:1555-62.

160. Tang X, Liu H, Yang S, Li Z, Zhong J, Fang R. Epidermal growth factor and intestinal barrier function. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1927348.

161. Esquirol Caussa J, Herrero Vila E. Epidermal growth factor, innovation and safety. *Med Clin (Barc).* 2015;145:305-12.

162. Weaver LT, Walker WA. Epidermal growth factor and the developing human gut. *Gastroenterology.* 1988;94:845-7.

163. Hormi K, Lehy T. Transforming growth factor-alpha in vivo stimulates epithelial cell proliferation in digestive tissues of suckling rats. *Gut.* 1996;39:532-8.

164. Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;28:2-11.

165. Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P. Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J Biol Chem.* 2003; 278:45255 68.

166. Berseth CL. Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am J Physiol.* 1987;253:G662-5.

167. Shelby RD, Cromeens B, Rager TM, Besner GE. Influence of growth factors on the development of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2019;46:51-64.

168. Nair RR, Warner BB, Warner BW. Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2008;32:107 13.

169. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:631-59.

170. Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96:3081-6.

171. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:881-914.

172. Langhans SA. Epidermal growth factor (EGF). In: Choi S, editor. Encyclopedia of Signaling Molecules. Cham: *Springer* International Publishing; 2018. p. 1587-93.

173. Alexander PB, Yuan L, Yang P, Sun T, Chen R, Xiang H, et al. EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence. *Cell Res.* 2015;25:135-8.

174. Bedford A, Chen T, Huynh E, Zhu C, Medeiros S, Wey D, et al. Epidermal growth factor containing culture supernatant enhances intestine development of early-weaned pigs in vivo: potential mechanisms involved. *J Biotechnol.* 2015;196-197:9-19.

175. Li AK, Schattenkerk ME, Huffman RG, Ross JS, Malt RA. Hypersecretion of submandibular saliva in male mice: trophic response in small intestine. *Gastroenterology.* 1983;84:949-55.

176. Wong WM, Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1999;23:S83-8.

177. Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev.* 1993;14(6):710-28.

178. Coursodon CF, Dvorak B. Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24:160-4.

179. Dvorak B, Fituch CC, Williams CS, Hurst NM, Schanler RJ. Concentrations of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in preterm milk. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:407-9.

180. Xiao X, Xiong A, Chen X, Mao X, Zhou X. Epidermal growth factor concentrations in human milk, cow's milk and cow's milk-based infant formulas. *Chin Med J (Engl).* 2002;115:451-4.

181. Clark JA, Doelle SM, Halpern MD, Saunders TA, Holubec H, Dvorak K, et al. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G938-49.

182. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005;14:145-51.

183. Halpern MD, Dominguez JA, Dvorakova K, Holubec H, Williams CS, Meza YG, et al. Ileal cytokine dysregulation in experimental necrotizing enterocolitis is reduced by epidermal growth factor. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36(1):126-33.

184. Clark JA, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, Dvorakova K, Halpern MD, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. A*m. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005;288(4):G755-G62.

185. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265:7709-12.

186. Playford RJ, Macdonald CE, Johnson WS. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:5-14.

187. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Regulation of longevity by FGF21: Interaction between energy metabolism and stress responses. *Ageing Res. Rev.* 2017;37:79-93.

188. Kharitonenkov A, DiMarchi R. Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field. *J Intern Med.* 2017;281:233-46.

189. Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima YI, et al. Fgf21 regulates T-cell development in the neonatal and juvenile thymus. *Sci Rep*. 2017;7:330.

190. Kilkenny DM, Rocheleau JV. The FGF21 receptor signaling complex: Klothoβ, FGFR1c, and other regulatory interactions. *Vitam Horm.* 2016;101:17-58.

191. Degirolamo C, Sabbà C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15:51 69.

192. Zhang X, Yang L, Xu X, Tang F, Yi P, Qiu B, et al. A review of fibroblast growth factor 21 in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2019.

193. Yuan D, Wu BJ, Henry A, Rye KA, Ong KL. Role of fibroblast growth factor 21 in gestational diabetes mellitus: A mini-review. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;90:47-55.

19*4. Cheng TW, Leung PS. FGF21. In: Choi S, editor. Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer* International Publishing; 2018. p. 1703-8.

195. Zhang F, Yu L, Lin X, Cheng P, He L, Li X, et al. Minireview: roles of fibroblast growth factors 19 and 21 in metabolic regulation and chronic diseases. *Mol Endocrinol.* 2015;29:1400-13.

196. Opoku YK, Liu Z, Afrifa J, Khoso MH, Ren G, Li D. Therapeutic role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) in the amelioration of chronic diseases. *Int J Pept Res Ther.* 2019.

197. Ribas Aulinas F. Regulació de FGF21 en la cèl·lula muscular. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2014.

198. Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:223-41.

199. Li JY, Wang N, Khoso MH, Shen CB, Guo MZ, Pang XX, et al. FGF-21 elevated IL-10 production to correct LPS-induced inflammation. *Inflammation.* 2018;41:751-9.

200. Yu Y, Li S, Liu Y, Tian G, Yuan Q, Bai F, et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) ameliorates collagen-induced arthritis through modulating oxidative stress and suppressing nuclear factor-kappa B pathway. *Int Immunopharmacol.* 2015;25:74-82.

201. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol.* 2004;172:567-76.

202. Xu P, Zhang Y, Jiang X, Li J, Song L, Khoso MH, et al. Canine fibroblast growth factor 21 ameliorates hyperglycemia associated with inhibiting hepatic gluconeogenesis and improving pancreatic beta-cell survival in diabetic mice and dogs. *PLoS One*. 2016;11:e0155598.

203. Hulejová H, Andrés Cerezo L, Kuklová M, Pecha O, Vondráček T, Pavelka K, et al. Novel adipokine fibroblast growth factor 21 is increased in rheumatoid arthritis. *Physiol Res.* 2012;61:489-94.

204. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. Cell Metab. 2010;11:206-12.

205. WHO. Preterm birth. Geneva: World Health Organization; 2015.

206. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RAA, Severino VO, Rocha LP, Monteiro MLGD, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31:1227-33.

207. Fietta A, Sacchi F, Bersani C, Gialdroni Grassi G, Stronati M, Gancia P, et al. Complement-dependent bactericidal activity for E. coli K12 in serum of preterm newborn infants. *Acta Paediatr Scand.* 1987;76:37-41.

208. McGreal EP, Hearne K, Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology.* 2012;217:176-86.

209. Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M, Macdonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, et al. Two factors of the lectin pathway of complement, l-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates*. Mol Immunol.* 2009;46:551-8.

210. Correa-Rocha R, Pérez A, Lorente R, Ferrando-Martínez S, Leal M, Gurbindo D, et al. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatr Res.* 2012;71:590-7.

211. Carr R, Modi N. Haemopoietic colony stimulating factors for preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;76:F128-F33.

212. Nussbaum C, Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol.* 2011;90:74-81.

213. Currie AJ, Curtis S, Strunk T, Riley K, Liyanage K, Prescott S, et al. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect Immun.* 2011;79:1588-96.

214. Pérez A, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum Immunol*. 2010;71:151-7.

215. Van den Berg JP, Westerbeek EAM, van der Klis FRM, Berbers GAM, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: A review of the literature. *Early Hum Dev.* 2011;87:67-72.

216. Jaswon M, Katz D. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;80:F158-F.

217. Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:629S-34S.

218. Maffei D, Schanler RJ. Human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis! *Semin Perinatol.* 2017;41:36-40.

219. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;79:763-72.

220. Alonso-Larruscain I, Oikonomopoulou N, M SR. Probióticos: empleo en neonatología y perinatología. In: Álvarez Calatayud G, Marcos A, editors. Probióticos, prebióticos y salud: Evidencia científica. 2016. Madrid: Ergon; 2016. p. 191-9.

221. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). *Pediatr Res.* 2008;63:117-23.

222. Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol.* 2003;8:449-59.

223. Israel E. Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier. *Acta Paediatr.* 1994;83:27-32.

224. Frost BL, Caplan MS. Probiotics and prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23:151-5.

225. Dvorak B. Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2004;31:183-92.

226. Isani MA, Delaplain PT, Grishin A, Ford HR. Evolving understanding of neonatal necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30:417-23.

227. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes.* 2013;4:17 30.

228. Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr.* 2010;156:S26-30.

229. Zhou P, Li Y, Ma LY, Lin HC. The role of immunonutrients in the prevention of necrotizing enterocolitis in preterm very low birth weight infants. *Nutrients*. 2015;7:7256-70.

230. Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martínez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, et al. Longitudinal study of cytokine expression, lipid profile and neuronal growth factors in human breast milk from term and preterm deliveries. *Nutrients*. 2015;7:8577-91.

231. Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C, Heitkemper M, Ou CN, Smith EO. Early feeding, feeding tolerance, and lactase activity in preterm infants. *J Pediatr.* 1998;133:645-9.

232. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, González-Castro A, Franch À, Castell M. Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. *Dev Comp Immunol*. 2007;31:1264-77.

233. Battersby AJ, Gibbons DL. The gut mucosal immune system in the neonatal period. Pediatr Allergy Immunol. 2013;24(5):414-21.

234. Dvorak B, Williams CS, McWilliam DL, Shinohara H, Dominguez JA, McCuskey RS, et al. Milk-borne epidermal growth factor modulates intestinal transforming growth factor-alpha levels in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2000;47:194-200.

235. Pérez-Cano FJ, Castellote C, González-Castro AM, Pelegrí C, Castell M, Franch A. Developmental changes in intraepithelial T lymphocytes and NK cells in the small intestine of neonatal rats. *Pediatr Res.* 2005;58:885-91.

236. Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C, Castell M. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:537310.

237. Penttila IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, et al. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res.* 1998;44:524-31.

238. Maynard AA, Dvorak K, Khailova L, Dobrenen H, Arganbright KM, Halpern MD, et al. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G614-22.

239. Ziegler TR, Estívariz CF, Jonas CR, Gu LH, Jones DP, Leader LM. Interactions between nutrients and peptide growth factors in intestinal growth, repair, and function. *J Parenter Enteral Nutr.* 1999;23:S174-83.

240. Yateman ME, Claffey DC, Cwyfan Hughes SC, Frost VJ, Wass JA, Holly JM. Cytokines modulate the sensitivity of human fibroblasts to stimulation with insulin-like growth factor-I (IGF-I) by altering endogenous IGF-binding protein production. *J Endocrinol.* 1993;137:151-9.

241. Ando T, Hatsushika K, Wako M, Ohba T, Koyama K, Ohnuma Y, et al. Orally administered TGF-β is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:916-23.

242. Pollack PF, Goda T, Colony PC, Edmond J, Thornburg W, Korc M, et al. Effects of enterally fed epidermal growth factor on the small and large intestine of the suckling rat. *Regul Pept.* 1987;17:121-32.

243. Camporez JP, Asrih M, Zhang D, Kahn M, Samuel VT, Jurczak MJ, et al. Hepatic insulin resistance and increased hepatic glucose production in mice lacking Fgf21. *J Endocrinol.* 2015;226:207-17.

244. Opleta K, O'Loughlin EV, Shaffer EA, Hayden J, Hollenberg M, Gall DG. Effect of epidermal growth factor on growth and postnatal development of the rabbit liver. *Am J Physiol*. 1987;253:G622-6.

245. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the immune response by TGF-β: from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9.

246. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, et al. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol*. 2007;149:535-42.

247. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol*. 1996;26:1217-21.

248. Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D, Bugeon L, Anegon I, Menoret S, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol*. 1994;24:1627-31.

249. Penttila I. Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatr Res.* 2006;59:650-5.

250. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998;282:2258-61.

251. Kubo T, Morita H, Sugita K, Akdis CA. Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases. In: O'Hehir RE, Holgate ST, Sheikh A, editors. Middleton's Allergy Essentials: *Elsevier*; 2017. p. 1-27.

252. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine.* 2015;75:25-37.

253. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes*. J Immunol.* 1986;137:3855-60.

254. Grases-Pintó B, Abril-Gil M, Rodríguez-Lagunas MJ, Castell M, Pérez-Cano FJ, Franch À. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br J Nutr.* 2018;119:486 95.

255. Weitkamp JH, Rosen MJ, Zhao Z, Koyama T, Geem D, Denning TL, et al. Small intestinal intraepithelial TCRγδ+ T lymphocytes are present in the premature intestine but selectively reduced in surgical necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99042.

256. Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, et al. Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest.* 2008;118:281-93.

257. Schön MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol.* 1999;162:6641-9.

258. Suzuki R, Nakao A, Kanamaru Y, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Localization of intestinal intraepithelial T lymphocytes involves regulation of alphaEbeta7 expression by transforming growth factor-beta. *Int Immunol.* 2002;14:339-45.

259. Shibahara T, Si-Tahar M, Shaw SK, Madara JL. Adhesion molecules expressed on homing lymphocytes in model intestinal epithelia. *Gastroenterology.* 2000;118:289 98.

260. Ohtsuka Y, Sanderson IR. Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response. *Curr Opin Gastroenterol.* 2000;16:541-5.

261. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child.* 1984;59:236-41.

262. Rouwet EV, Heineman E, Buurman WA, ter Riet G, Ramsay G, Blanco CE. Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period. *Pediatr Res.* 2002;51:64-70.

263. Kerr CA, Grice DM, Tran CD, Bauer DC, Li D, Hendry P, et al. Early life events influence whole-of-life metabolic health via gut microflora and gut permeability. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41:326-40.

264. Cummins AG, Steele TW, LaBrooy JT, Shearman DJ. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut.* 1988;29:1672-9.

265. Thompson FM, Mayrhofer G, Cummins AG. Dependence of epithelial growth of the small intestine on T-cell activation during weaning in the rat. *Gastroenterology.* 1996;111:37-44.

266. Nguyen M, Leuridan E, Zhang T, De Wit D, Willems F, Van Damme P, et al. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. *PLoS One*. 2010;5:e10407.

267. Arévalo Sureda E, Weström B, Pierzynowski SG, Prykhodko O. Maturation of the intestinal epithelial barrier in neonatal rats coincides with decreased FcRn expression, replacement of vacuolated enterocytes and changed Blimp-1 expression. *PLoS One*. 2016;11:e0164775.

268. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-25.

269. Muncan V, Heijmans J, Krasinski SD, Büller NV, Wildenberg ME, Meisner S, et al. Blimp1 regulates the transition of neonatal to adult intestinal epithelium. *Nat Commun.* 2011;2:452.

270. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, et al. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:G156-64.

271. Marín-Gallén S, Pérez-Cano FJ, Castell M, Castellote C, Franch A. Intestinal intraepithelial NK and NKT cell ontogeny in Lewis rats. *Dev Comp Immunol*. 2008;32:1405-8.

272. Kalliomäki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24:739-52.

273. Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, Wynn TA, Moskowitz NH, Cheever AW, et al. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med.* 1996;184:1295-304.

274. Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:480-7.

275. Samak G, Aggarwal S, Rao RK. ERK is involved in EGF-mediated protection of tight junctions, but not adherens junctions, in acetaldehyde-treated Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301:G50-9.

276. Gribar SC, Sodhi CP, Richardson WM, Anand RJ, Gittes GK, Branca MF, et al. Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis*. J Immunol.* 2009;182:636-46.

277. McElroy SJ, Prince LS, Weitkamp JH, Reese J, Slaughter JC, Polk DB. Tumor necrosis factor receptor 1-dependent depletion of mucus in immature small intestine: a potential role in neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301:G656-66.

278. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5:24-32.

279. García-Hernández V, Flores-Maldonado C, Rincon-Heredia R, Verdejo-Torres O, Bonilla-Delgado J, Meneses-Morales I, et al. EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells*. J Cell Physiol.* 2015;230:105-15.

280. Kim KH, Lee MS. FGF21 as a stress hormone: the roles of FGF21 in stress adaptation and the treatment of metabolic diseases. *Diabetes Metab J.* 2014;38:245-51.

281. Li SM, Yu YH, Li L, Wang WF, Li DS. Treatment of CIA mice with FGF21 down-regulates TH17-IL-17 axis. *Inflammation.* 2016;39:309-19.

282. Rigo-Adrover MD, Franch À, Castell M, Pérez-Cano FJ. Preclinical immunomodulation *by the probiotic Bifidobacterium breve M-16V in early life. PLoS One*. 2016;11:e0166082.

283. Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, et al. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol.* 2007;179:4808-20.

284. Thiessen SE, Vanhorebeek I, Derese I, Gunst J, Van den Berghe G. FGF21 response to critical illness: effect of blood glucose control and relation with cellular stress and survival. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:E1319-27.

285. Hoffbrand AV. Folate deficiency in premature infants. *Arch Dis Child*. 1970;45:441-4.

286. Grases-Pintó B, Torres-Castro P, Abril-Gil M, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ, et al. A preterm rat model for immunonutritional studies. *Nutrients.* 2019;11:999.

287. Widness JA. Pathophysiology of Anemia During the Neonatal Period, Including Anemia of Prematurity. *Neoreviews.* 2008;9:e520.

288. Strauss RG. Anaemia of prematurity: pathophysiology and treatment. *Blood Rev.* 2010;24:221-5.

289. Piryani SO, Kam AYF, Kliassov EG, Chen BJ, Spector NL, Chute JP, et al. Epidermal growth factor and granulocyte colony stimulating factor signaling are synergistic for hematopoietic regeneration. *Stem Cells.* 2018;36:252-64.

290. Doan PL, Himburg HA, Helms K, Russell JL, Fixsen E, Quarmyne M, et al. Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury. *Nat Med.* 2013;19:295-304.

291. Alkan Ozdemir S, Ozer EA, Kose S, Ilhan O, Ozturk C, Sutcuoglu S. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:972-6.

292. Sprockett D, Fukami T, Relman DA. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15:197-205.

293. Duijts L, Bakker-Jonges LE, Labout JA, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers EA, et al. Fetal growth influences lymphocyte subset counts at birth: the Generation R Study. *Neonatology.* 2009;95:149-56.

294. Birchenough GM, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015;8:712-9.

295. Rodewald R, Kraehenbuhl JP. Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol*. 1984;99(1 Pt 2):159s-64s.

296. Xu S, Wang D, Zhang P, Lin Y, Fang Z, Che L, et al. Oral administration of Lactococcus lactis-expressed recombinant porcine epidermal growth factor stimulates the development and promotes the health of small intestines in early-weaned piglets. *J Appl Microbiol.* 2015;119:225-35.

297. Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:825-31.

298. Bergmann H, Rodríguez JM, Salminen S, Szajewska H. Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *Br J Nutr.* 2014;112:1119-28.



ANEXOS

ARTÍCULO

"A preterm rat model for immunonutritional studies"

Blanca Grases-Pintó, Paulina Torres-Castro, Mar Abril-Gil, Margarida Castell, María J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano, Àngels Franch

Nutrients **(2019) 11 (5): 999**

(doi: 10.3390/nu11050999)

Índice de impacto (2018): 4,171
Categoría: 16/86 (Q1) en *NUTRITION & DIETETICS*

Los resultados del presente artículo han sido presentados en la siguiente comunicación:

- *Immune system development in a rat model of prematurity for immunonutrition studies*. Grases-Pintó, B; Torres-Castro, P; Abril-Gil, M; Rodríguez-Lagunas, M.J; Pérez-Cano, F.J; Franch, A. XI ISIN London Conference on Immunonutrition (Londres), septiembre 2018.

RESUMEN

Objetivo: Desarrollar y caracterizar un modelo de prematuridad en rata lactante y establecer biomarcadores indicativos de maduración de la inmunidad innata y adaptativa afectados por la prematuridad.

Material y métodos: Las ratas prematuras se obtuvieron mediante la práctica de una cesárea, previa a la previsión del parto natural. A lo largo del estudio (10 días) se registró el peso corporal. Pera evaluar la funcionalidad de la barrera del epitelio intestinal, se determinó la permeabilidad *in vivo* a dextranos y se realizó un estudio histomorfométrico centrado en las vellosidades y células goblet. Además, se analizó el hemograma, se determinó la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos y la concentración de inmunoglobulinas (Ig) plasmáticas.

Resultados: Las ratas prematuras mostraron una menor concentración de eritrocitos y plaquetas y un recuento superior de leucocitos, en comparación a los animales nacidos a término. Aunque no se observaron cambios en la capacidad fagocítica de los granulocitos, los monocitos de ratas prematuras mostraron una actividad fagocítica inferior. Por otro lado, se observaron concentraciones plasmáticas de IgG y IgM inferiores en ratas prematuras, comparadas con las nacidas a término; sin modificaciones en la IgA. Finalmente, el estudio intestinal reveló una menor permeabilidad al dextrano y una disminución del tamaño de células goblet en ratas nacidas en condiciones de prematuridad.

Conclusión: Se ha conseguido desarrollar y caracterizar un modelo de prematuridad en rata, que presenta biomarcadores del sistema inmunitario diferenciales, el cuál puede ser útil para estudios de inmunonutrición destinados a potenciar la maduración del sistema inmunitario.

nutrients

MDPI

Article

A Preterm Rat Model for Immunonutritional Studies

Blanca Grases-Pintó [1,2], Paulina Torres-Castro [1,2], Mar Abril-Gil [1,2], Margarida Castell [1,2], María J. Rodríguez-Lagunas [1,2], Francisco J. Pérez-Cano [1,2,*] and Àngels Franch [1,2]

[1] Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; blancagrases@ub.edu (B.G.-P.); mtorreca29@alumnes.ub.edu (P.T.-C.); mariadelmar.abril@ub.edu (M.A.-G.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); mjrodriguez@ub.edu (M.J.R.-L.); angelsfranch@ub.edu (À.F.)

[2] Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA·UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

* Correspondence: franciscoperez@ub.edu; Tel.: +34-93-402-45-05

Received: 5 March 2019; Accepted: 29 April 2019; Published: 1 May 2019



Abstract: Neonates are born with an immature immune system, which develops during the first stages of life. This early immaturity is more acute in preterm newborns. The aim of the present study was to set up a preterm rat model, in which representative biomarkers of innate and adaptive immunity maturation that could be promoted by certain dietary interventions are established. Throughout the study, the body weight was registered. To evaluate the functionality of the intestinal epithelial barrier, in vivo permeability to dextrans was measured and a histomorphometric study was performed. Furthermore, the blood cell count, phagocytic activity of blood leukocytes and plasmatic immunoglobulins (Ig) were determined. Preterm rats showed lower erythrocyte and platelet concentration but a higher count of leukocytes than the term rats. Although there were no changes in the granulocytes' ability to phagocytize, preterm monocytes had lower phagocytic activity. Moreover, lower plasma IgG and IgM concentrations were detected in preterm rats compared to full-term rats, without affecting IgA. Finally, the intestinal study revealed lower permeability in preterm rats and reduced goblet cell size. Here, we characterized a premature rat model, with differential immune system biomarkers, as a useful tool for immunonutritional studies aimed at boosting the development of the immune system.

Keywords: prematurity; suckling rat; intestinal permeability; phagocytosis; plasmatic immunoglobulin; adaptive immunity; innate immunity

1. Introduction

The length of human pregnancy is about 37–44 weeks [1] and when the neonate is born before the 37th week of gestation the newborn is considered premature [2]. There is a wide variety of factors involved in preterm birth, such as the age of the mother, the use of assisted reproductive technologies or multiple gestations, among others [3]. Generally, a premature birth is associated with the newborn's low weight, fragile skin [4], lower neurodevelopment [5], lungs not fully developed with an absence or insufficient production of surfactant [6], immature stomach with lower acidity [4], and higher intestinal permeability with a low microbiota diversity [7]. These deficiencies make the preterm neonate more susceptible to infections and a higher rate of mortality and morbidity in later life [8].

The higher predisposition to suffering infections is due to the immaturity of their immune system, in both innate and adaptive immunity, and in the inadequate communication between these two systems [9,10]. In reference to innate immunity, preterm neonates have a lower count of neutrophils and monocytes and a lower cytokine production compared to term infants [11,12]. The defense mechanism against viral infections through the cytotoxic activity of the natural killer (NK) cells is also reduced in preterm compared to full-term neonates [11]. Furthermore, prematurity also affects

the adaptive immunity: these infants have leukopenia, and lymphopenia [12]. The reduced count of lymphocytes is accompanied by a decrease in the secretion of cytokines [13] and immunoglobulins (Ig) [2]. In addition, this immaturity not only affects the systemic immune system, but also intestinal immunity. Premature infants show increased intestinal permeability and decreased levels of secretory IgA and mucus, making newborns susceptible to intestinal diseases such as infections or necrotizing enterocolitis (NEC) [14,15].

Animal models are essential to further understand the mechanisms involved in these processes and to generate new advances in this area. In this context, studies using preterm animal models could be useful to increase our knowledge of the state of prematurity, and to explore new insights in the field of nutritional interventions in preterm neonates in order to counteract immunodeficiencies. To date, there are few preterm models in rodents, and most of these are only focused on the impact of prematurity on brain [16] or lung development [17] or NEC [18,19], but none study immune system maturation, which is especially affected in prematurity. To our knowledge, the only premature animal model studying immunity was performed in pigs [20]. However, when studying the immune system in early life experimental approaches, it is highly valuable to provide models in species in which there is a remarkable immunological immaturity at birth, as in rodents [21]. For example, the supplementation with a particular strain of bifidobacteria has shown to have a preventive effect on the experimental rat model of NEC [19]; however, its impact on immune system development in a preterm animal remains unknown.

Therefore, the aim of the present work was to establish a preterm rat model to determine biomarkers of innate and adaptive immunity affected by prematurity. Specifically, we focused on studying the blood cell count, phagocytic function of blood leukocytes, plasmatic Ig pattern, intestinal permeability and histomorphometry of the small intestine.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The study was performed with six pregnant Wistar rats from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France), specifically, with two dams at 13 days of gestation (G13), two at G14 and two at G15. Animals were individually housed in cages and monitored daily. The animals were housed under controlled temperature and humidity conditions, in a 12:12 h light:dark cycle and were fed with chow and water *ad libitum* in the Faculty of Pharmacy and Food Science animal facilities (University of Barcelona).

All the experimental procedures were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (CEEA/UB ref. 148/18).

2.2. Experimental Design

We disposed of three types of pregnant dams (2 dams/each), depending on their gestational stage: G13, G14 and G15. The G14 pregnant dams were allowed to deliver naturally, at day 22 of gestation, and their litters used to the term group. The G13 pregnant dams were subjected to a caesarean section at day 21 of gestation—just one day before normal delivery—and their litters made up the preterm group. As this surgery was not compatible with the mother's survival, the preterm pups were given to the surrogate dams (G15), who had delivered naturally two days before the caesarean surgery of the G13 dams. This fact is highly important to ensure that they have enough milk in their breasts to breastfeed preterm pups.

Litters were culled to 10 pups per lactating dam and they had free access to the nipples and rat diet during the 10 days of the study. Each group was made up of 40% male and 60% female pups. Suckling rats were weighed daily and the handling was done in the same time range to avoid the influence of biological rhythms. On the last day of the study, body length (nose–anus) was measured, and the

body mass index (BMI), calculated as body weight/length^2 (g/cm^2), and the Lee index, calculated as $^3\sqrt{}$weight/length × 1000 ($^3\sqrt{}$g/cm), were determined.

2.3. Caesarean Intervention

To obtain premature pups, a caesarean section, which was performed at G21, was required. The procedure was based on the methodology described by Appleby and Towner [22] with some modifications. Dams, partially anesthetized, were immediately sacrificed by cervical dislocation. Immediately, the offspring were extracted one by one by hysterectomy. Thereafter, they were randomly distributed among the two surrogate mothers' cages, which had previously been separated from their own offspring. It should be mentioned that, in this study, the viability of preterm rats was 100% and they were not rejected by the surrogate dam.

2.4. Sample Collection and Processing

At day 10, each litter was divided into two: five pups were used to perform a histomorphometric study and permeability assay in the small intestine and the other five were used to analyze the blood cell count, the plasmatic Ig concentration and the phagocytic activity of leukocytes. Animals were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany) in order to be exsanguinated. Then, the small intestine was collected, weighed, and measured. To perform the histomorphometric study, the intestine was washed with PBS (phosphate buffer saline, pH 7.2; 154 mM sodium chloride (NaCl), 3.99 mM sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) and 16 mM disodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)) and 1 cm sections were cut from the distal jejunum, placed in cassettes and fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h. Blood samples were collected in heparin/lithium tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Part of the whole blood was obtained to study the phagocytic activity and the blood cell count. The remaining blood was centrifuged to obtain plasma for Ig quantification. To determine the composition of the cellular elements of the blood, an automated hematological analyzer (Spincell 3, Spinreact, Barcelona, Spain) was used.

2.5. Immunoglobulin Quantification

At the end of the study, plasmatic IgG, IgM and IgA concentrations were quantified using a rat IgG, IgM and IgA ELISA quantification set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), as performed in previous studies [23]. Absorbance was quantified using a microplate photometer (LabSystem Multiskan, LabX, Midland, CA, USA) and data were interpolated into standard curves using ASCENT version 2.6 software (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). The lower limits of detection were as follows: 1 ng/mL for IgG; 1.95 ng/mL for IgM; and 1.95 ng/mL for IgA.

2.6. Phagocytic Function of Blood Leukocytes

Phagocytosis was measured with the commercial kit Phagotest® (Glycotope, Biotechnology, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, heparinized blood was incubated with opsonized fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled *Escherichia coli* for 10 min at 37 °C. A control tube remained on ice. After 10 min, phagocytosis was stopped by placing the tubes into the ice. Then, non-phagocytized bacteria were eliminated with the addition of the quenching solution. After washing and centrifuging (250× *g*, 5 min, 4 °C), cells were resuspended and incubated in a solution for lysis of erythrocytes and fixation of the leukocytes (20 min, room temperature). Finally, after an additional centrifugation and wash, the staining of the leukocyte DNA was carried out with a propidium iodide solution.

Analyses were performed using a Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). All samples were assessed by FlowJo, version 10 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Monocyte and granulocyte populations were gated according to their forward-scatter and side-scatter characteristics (FSC/SSC).

Then, their green fluorescence histogram (FITC) was analyzed. The phagocytic activity was expressed as percentage of fluorescent cells (monocytes or granulocytes) in the particular population studied. The mean fluorescence intensity indicative of the extent of phagocyte efficiency was also quantified.

2.7. Intestinal Permeability Assay

The evaluation of the intestinal epithelial barrier functionality was performed by an *in vivo* permeability assay to dextrans. Specifically, 4 kDa-dextran conjugated to FITC (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in PBS at a dose of 500 mg/kg were orally administered to rats using low-capacity syringes (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Switzerland) adapted to oral 23-gauge gavage tubes (ASICO, Westmont, IL, USA), as previously described [23]. A reference sample pool obtained by animals given an equivalent volume of PBS was used to rule out autofluorescent background in each tissue sample itself.

The offspring were separated from their respective mothers 1 h before the administration, to allow gastric emptying and to avoid the interference of milk components with the dextran solution. Four hours after the administration, the animals were euthanized (ketamine (90 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg)), plasma was obtained, diluted, and the fluorescence emission was analyzed by triplicate at an excitation wavelength of 490 nm, in the Modulus™ Microplate spectrophotometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA).

2.8. Intestinal Histomorphometric Study

Fixed intestinal tissues were dehydrated by a growing gradient of ethanol, paraffin-embedded and cut into 5 µm sections using a microtome (RM2135, Leica, Wetzlar, Germany) at the CCiT-UB. Then, samples were mounted on Superfrost™ Ultra Plus slides (Thermo Fisher Scientific), as previously described [24]. The samples were deparaffinized and rehydrated by periodic acid-Schiff (PAS) staining. Briefly, intestinal tissues were stained in a 0.5% periodic acid (Sigma-Aldrich) solution for 5 min and washed in distilled water. Afterwards, sections were immersed in Schiff's reagent (Sigma-Aldrich) for 7 min, washed in running tap water and counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 1 min and again washed in running tap water. Finally, the slides were mounted with coverslips using ProLong™ Gold Antifade Mountant (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The observation of the intestinal architecture was accomplished using a bright-field microscope at 100X and 400X (Olympus BX41, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan). All the morphometric measurements were processed with the Image J. software (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The morphometric analysis was focused on intestinal villi, 6–10 villi per animal and $n = 5$ animals/group were evaluated. Specifically, the villi height, width, area and epithelium perimeter of the villi were measured. The villi height was measured from the base of the villi (junction of the villi to crypts) to the top of the villi. Moreover, the villi width was calculated at the middle of the villi. The epithelial perimeter of the villi was evaluated by measuring the outer layer of the villi. Goblet cells are expressed as PAS-positive. The number of goblet cells per villi were counted manually and their area was also measured. Statistical analysis was performed with the average values of each animal.

2.9. Statistical Analysis

Results are shown as means ± SEM. The software package SPSS 22.0 (PASW Statistics, SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The Shapiro–Wilk and Levene's tests were applied to assess normal distribution and variance equality, respectively. When they coexisted, the parametric Student's t-test to compare the means between both experimental groups was carried out. To evaluate the correlation between body weight and Ig concentrations, Pearson's coefficient (ρ) was applied. Differences between groups were considered statistically significant for p values < 0.05.

3. Results

3.1. Effect of Prematurity on Body Weight and Other Morphometric Variables

Throughout the study, as expected, the weight of rats that were born in preterm conditions was lower than that of the term pups ($p < 0.05$, Figure 1A), indicating an important effect of the length of gestation period on body weight. This decrease has an impact on the BMI at day 10 ($p < 0.01$ vs. term group, Figure 1B). No differences were observed in the Lee index at the same day (Figure 1C).

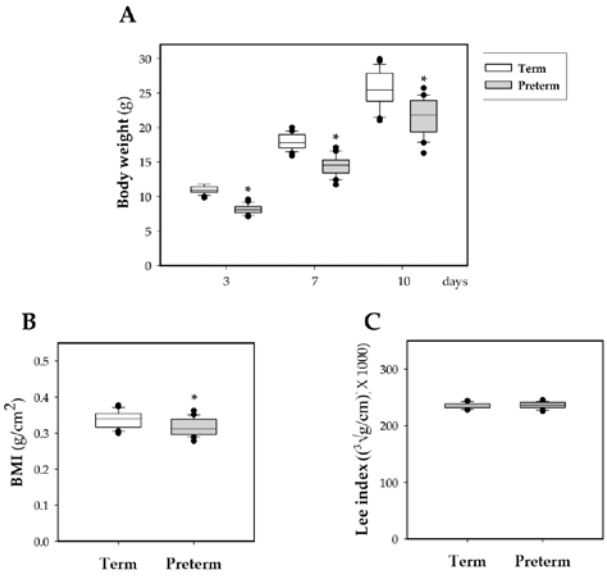


Figure 1. Box plot of the influence of prematurity on body weight and morphometric variables. Rat body weight along the study (**A**), BMI (**B**) and Lee index (**C**) at day 10 of life in both experimental groups. Line indicates the median, box shows the interquartile range (IQR) and the whiskers are 1.5 × IQR ($n = 20$ pups per group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

Furthermore, to study in more depth the influence of prematurity on body weight variables, the weight of the spleen, thymus, liver, small and large intestines on day 10 was measured (Table 1).

Table 1. Absolute and relative weight of spleen, thymus, liver, small and large intestines, and length and relative length of small and large intestines from term and preterm groups at day 10.

	Term		Preterm	
	Weight (g)	**Relative Weight (%)**	**Weight (g)**	**Relative Weight (%)**
Spleen	0.14 ± 0.00	0.55 ± 0.01	0.12 ± 0.01 *	0.58 ± 0.03
Thymus	0.09 ± 0.00	0.34 ± 0.02	0.07 ± 0.00 *	0.33 ± 0.02
Liver	0.73 ± 0.03	2.82 ± 0.08	0.67 ± 0.03 *	3.08 ± 0.09
Small intestine	0.84 ± 0.03	3.29 ± 0.08	0.77 ± 0.03 *	3.51 ± 0.08
Large intestine	0.16 ± 0.01	0.63 ± 0.03	0.12 ± 0.01 *	0.57 ± 0.03
	Length (cm)	**Relative Length (%)**	**Length (cm)**	**Relative Length (%)**
Small intestine	41.04 ± 0.87	1.62 ± 0.03	37.20 ± 0.91 *	1.72 ± 0.05
Large intestine	6.88 ± 0.22	0.27 ± 0.01	6.19 ± 0.16 *	0.29 ± 0.01

The results are expressed as a mean ± S.E.M. ($n = 20$). Relative length percentage is expressed as cm of intestine per 100 g of animal body weight. Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

Preterm rats showed lower absolute weight in all these tissues than term ones ($p < 0.05$); however, the relative weights between the studied groups were similar (Table 1). Moreover, the length of both intestines was also measured on this day and the results showed that premature rats also had shorter intestines ($p < 0.05$ vs. term group, Table 1).

3.2. *Effect of Prematurity on Blood Cell Count*

At the end of the study, the preterm group showed a lower count of erythrocytes and platelets, but a higher count of leukocytes in comparison to the term group ($p < 0.05$, Table 2). Although there was no difference on the hematocrit (HCT) and the mean corpuscular hemoglobin (MCH), a tendency to decrease hemoglobin (Hb) concentration was observed in premature rats ($p < 0.08$ vs. term group). In addition, premature erythrocytes showed a slight macrocytosis through mean corpuscular volume (MCV), which was significantly higher than that in term rats ($p < 0.05$, Table 2).

Table 2. Blood cell count from both groups: term and preterm at day 10 of suckling period.

	Term	Preterm
Leukocytes ($\times 10^9$/L)	2.18 ± 0.20	4.57 ± 0.79 *
Erythrocytes ($\times 10^{12}$/L)	3.23 ± 0.08	2.83 ± 0.12 *
Hb (g/L)	77.58 ± 1.84	72.56 ± 1.89
HCT (%)	27.16 ± 0.79	25.01 ± 1.16
MCV (fL)	84.28 ± 1.30	88.42 ± 0.60 *
MCH (pg)	24.03 ± 0.42	25.82 ± 0.78
Platelets ($\times 10^9$/L)	529.18 ± 33.41	408.38 ± 56.36 *

The results are expressed as a mean ± S.E.M. ($n = 10$). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

Regarding the differential leukocyte count (Figure 2A,B), a tendency to decrease lymphocyte and increase granulocyte percentage in preterm animals was observed ($p < 0.09$ and $p < 0.07$ vs. term group, respectively), with no differences in monocyte percentage (Figure 2A). In absolute values, there was an increase in the count of lymphocytes, monocytes and granulocytes ($p < 0.05$, Figure 2B).

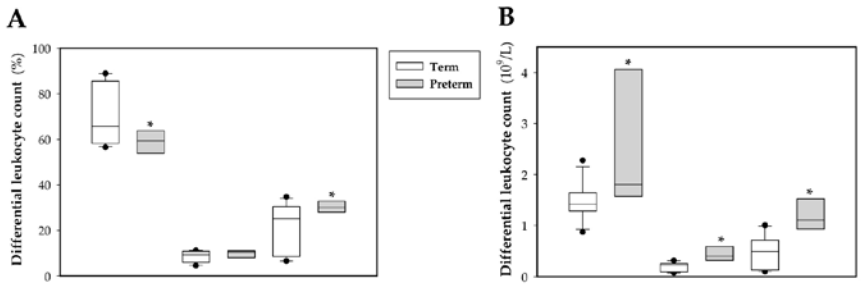


Figure 2. Box plot of differential leukocyte count in percentage (**A**) and in absolute values (**B**) at the end of the study (day 10) in both experimental groups. Line indicates the median, box shows the interquartile range (IQR) and the whiskers are 1.5 × IQR ($n = 10$ pups per group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

3.3. *Effect of Prematurity on Plasma Ig Concentrations*

To assess the impact of prematurity on the antibody levels in the systemic compartment, total Ig and IgG, IgM, and IgA isotypes were quantified in plasma samples at day 10 of life (Figure 3). Preterm rats had lower concentrations of total Ig compared to term ones ($p < 0.01$, Figure 3A). This change was mainly due to a reduction in IgG concentration ($p < 0.01$, Figure 3B), but IgM isotype was also decreased ($p < 0.01$, Figure 3C). No changes in IgA levels were observed (Figure 3D).

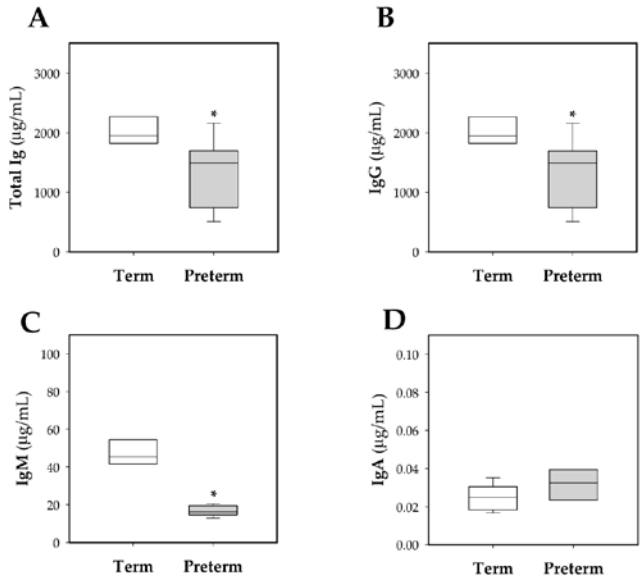


Figure 3. Box plot of plasmatic Ig concentrations at day 10 of life in both experimental groups. Total Ig (**A**), IgG (**B**), IgM (**C**), IgA (**D**). Line indicates the median, box shows the interquartile range (IQR) and the whiskers are 1.5 × IQR (n = 10 pups per group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

Considering all the pups in the study, there was a positive correlation between the concentration of total Ig, IgG and IgM, and body weight ($\rho = 0.74$, $p < 0.001$ at total Ig; $\rho = 0.73$, $p < 0.001$ at IgG; $\rho = 0.73$, $p < 0.001$ at IgM). Looking at this in the preterm group, there was a positive correlation between total Ig, IgG and IgA, and body weight ($\rho = 0.71$, $p < 0.05$ at total Ig; $\rho = 0.70$, $p < 0.05$ at IgG; $\rho = 0.72$, $p < 0.05$ at IgA), whereas in the term group this correlation was not observed.

3.4. *Effect of Prematurity on Phagocytic Function of Blood Leukocytes*

Regarding monocyte phagocytic activity, this was around 70% in the term group and 60% in the preterm group, being lower in the latter ($p < 0.05$, Figure 4A). In contrast, the granulocyte population had a phagocytic activity higher than 90% without significant differences between either experimental groups (Figure 4B).

The phagocytic efficiency of these leukocytes was also quantified (Figure 4C,D).The obtained results showed a higher phagocytic efficiency of the granulocyte population in comparison to the monocytes in both groups ($p < 0.05$); however, no statistical differences were found in the preterm group compared to the term group, either in granulocytes or in monocytes (Figure 4B,D).

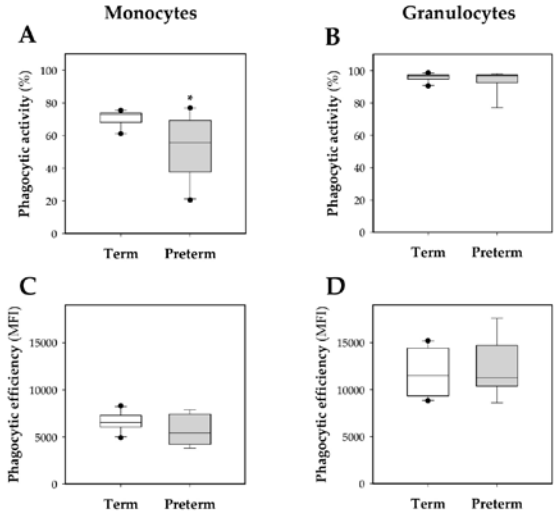


Figure 4. Box plot of phagocytic function of blood leukocytes. Phagocytic activity and efficiency in monocytes (**A**,**C**) and granulocytes (**B**,**D**). Line indicates the median, box shows the interquartile range (IQR) and the whiskers are 1.5 × IQR (n = 10 pups per group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

3.5. Effect of Prematurity on Intestinal Barrier Function

To study the intestinal epithelial barrier functionality, an *in vivo* permeability assay was performed to determine the paracellular transport of the 4 kDa-dextran labeled with FITC. Premature animals showed lower dextran-FITC signal in plasma than full-term ones, indicating lower permeability of the intestinal epithelium in preterm animals at 10 days old ($p < 0.05$, Figure 5).

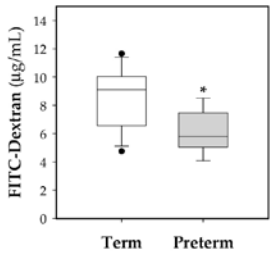


Figure 5. Box plot of intestinal permeability to 4 kDa-FITC-dextran in both experimental groups. Line indicates the median, box shows the interquartile range (IQR) and the whiskers are 1.5 × IQR (n = 10 pups per group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

3.6. Effect of Prematurity on Histomorphometric Characteristics of the Small Intestine

The morphology of the distal jejunum was studied, focusing on intestinal villi and goblet cell characteristics on day 10 of life. Table 3 shows the studied variables: villi width, villi height, villi area, villi perimeter, number of goblet cells per villi and goblet cell area. Histological differences due to prematurity were not found in any of the studied villi variables compared to the term group. With respect to goblet cells, although there was no difference in the number of these cells present in the villi, interestingly, preterm goblet cells had a smaller area than those found in term animals ($p < 0.01$, Table 3, Figure 6).

Table 3. Histomorphometric variables of small intestine: villi width, height, area, perimeter and the number of goblet/villi and their cellular area from term and preterm groups at day 10 of suckling period.

	Term	Preterm
Villi width (μm)	128.21 ± 15.91	173.54 ± 22.26
Villi height (μm)	602.03 ± 92.70	765.77 ± 136.41
Villi area (μm^2)	75319.14 ± 22354.29	131378.51 ± 36991.03
Villi perimeter (μm)	1328.82 ± 191.19	1679.68 ± 278.57
Goblet cells/villi	6.79 ± 1.33	4.99 ± 0.44
Goblet cell area (μm^2)	379.96 ± 26.72	239.08 ± 22.13 *

The results are expressed as a mean ± S.E.M. ($n = 5$). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. term group.

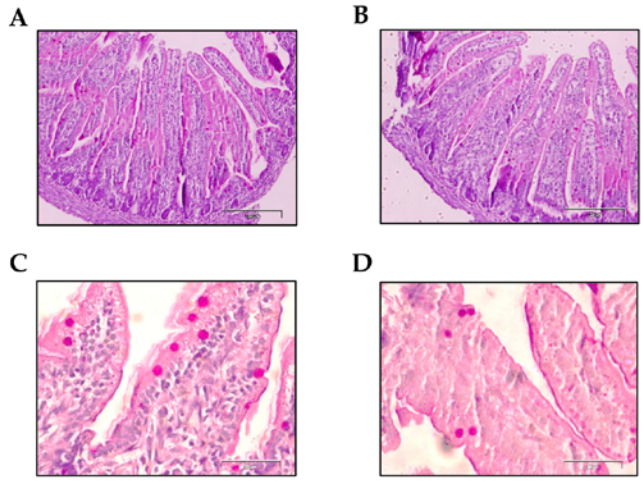


Figure 6. Representative images of histological sections of the jejunum with PAS staining. Term group (**A**,**C**) and preterm group (**B**,**D**). Goblet cells with densely stained granules can be observed along the length of the villi (**C**,**D**). Scale bar = 100 μm for 100× and 50 μm for 400×. Magnification = 100× (**A**,**B**) and 400× (**C**,**D**).

4. Discussion

The suckling rat born at term has been widely used as a model for immunonutrition studies in early life [21]. The effect of several dietary components on promoting the immature immune system development such as whey proteins [25], probiotics [26], adipokines [23,27], growth factors [28] or highly active immunomodulatory fatty acids such as conjugated linoleic acid (CLA) [29], have been studied. In addition, this rodent model has also been used in immunonutritional studies aiming to evaluate the protective action of prebiotics and probiotics during an acute intestinal infective process [24,30]. However, the impact of certain nutrients on the undeveloped response of the immune system in premature neonates has not been assessed, mainly due to the lack of optimal models to perform this kind of intervention.

The present study provides the set-up of a preterm rat model with the characterization of the immune state in the middle of the suckling period (day 10) with the purpose of establishing specific biomarkers of innate and adaptive immunity. For that, some variables have been assessed: blood cell count, plasmatic Ig, phagocytic function of blood leukocytes, intestinal permeability and intestinal morphometry. Nguyen et al. have established the development of the systemic immunity in a preterm pig model [20]. However, to the best of our knowledge, this is the first time that the effect of prematurity

on the systemic and intestinal immune system in rat has been assessed. All these studies in preterm rats were compared with suckling rats born at term.

It has been described that the length of the gestation period of rat is 19–22 days, whereas for pigs and humans it is 115 days and 280 days, respectively [31]. In this sense, it is estimated that in terms of translational relationship between age of rats and humans, 14 rat days are equivalent to 1 human year [32]. Thus, whereas the lymphoid architecture is formed prenatally in humans, it appears mostly postnatally in rats. Due to this, the development of the immune system in rats is delayed compared with humans, although both develop via similar schemes [21]. In addition, although the known differences between human and rodent immune responses, the uniform genetic background and the similarity to humans in terms of genetic and biochemical pathways led to an increasing interest in the suckling rat model as an approximation for immunonutritional studies. This is also the case in the context of early life and prematurity, where the short length periods of gestation and suckling in rats facilitate the nutritional intervention and in addition, as mentioned before, obtain a more immature pup than in larger species [21].

Although this work focuses on the study of the immune system, we also considered it necessary to evaluate some growth and body variables. Specifically, the body weight of the preterm group on day 3 of life was lower than that of those born at term, and this difference remained during the 10 days of study. Moreover, on day 10 of life, a lower BMI and organ weight were observed without affecting the relative weight or the Lee index. These results revealed the repercussions of prematurity during the first days of life. This feature found here in premature rodents is consistent with that previously found in humans. In fact, human preterm newborns also showed lower weight at birth [33]. In addition, at two years of age the incapacity to achieve similar weight values and BMI as those of term infants has been described [34]. Thus, the low weight of preterm rats observed in our study was not only similar to humans but also in line with other animal models, such as pigs [20].

Regarding the blood cell count, it was observed that prematurity causes an increase in the leukocyte count and a decrease in that of erythrocytes and platelets. Human studies focused on that point have evidenced that platelets showed an immature state not only in terms of a depletion of their count [35] but also in their functionality [27], thus, making preterm neonates more prone to hemorrhaging [36]. Focusing on erythrocytes, the mean corpuscular volume (MCV) was significantly higher in preterm rats and tended to decrease hemoglobin concentration in blood in comparison to the term group. These results taken together suggest a state of macrocytic anemia, and are in line with the study by Hoffbrand [37], which showed increased MCV due to a folic acid deficiency in preterm infants between 4 and 8 weeks old. This deficiency could be attributed to the fact that the preterm newborns require higher amounts of folic acid than those provided through diet intake and therefore leads to a depletion of their reserves.

Besides changes in erythrocytes, the blood immune cell count was also modified due to prematurity. In this sense, it has been suggested that some features found in term rats due to its short gestation period, such as the intestinal barrier or the immune system immaturity at birth with respect to humans, can resemble those of infants born prematurely [21,31]. Thus, the present model aimed to show variables with even more immature immune levels. In fact, our results showed that the total blood leukocyte count in premature rats was much higher than those in the animals born at term. This result disagrees with previous studies in pigs and humans, which evidenced lower numbers of leukocytes in preterm compared to term newborns [12,20]. In our study, the preterm group's differential leukocyte count showed an increase in the count of the three main populations (lymphocytes, monocytes and granulocytes). However, it has been described that preterm human babies had a lower number and percentage of granulocytes, monocytes and lymphocytes [2,11]. The results obtained in our model could be associated with a pro-inflammatory state interpreted as a defense mechanism against a highly hostile and aggressive environment for a premature newborn with a poorly developed immune system.

In this study, similar to what has been reported in humans, the preterm group had a lower Ig concentration compared to those born at term [2]. Moreover, the preterm group showed a positive

correlation between the weight of the pups and total Ig, IgG, and IgA. In line with our results, it has been described that in human serum, the Ig concentration correlates directly with the gestational age and the weight of the baby at the time of birth [38]. In the case of IgG, low plasma levels found in the preterm group could be attributed to a deficient transplacental transfer of maternal IgG to the fetus, because it was interrupted after premature birth, knowing that the majority of maternal IgG is acquired during the last gestation period in humans and rodents [39,40]. However, in comparison with humans, who have a low postnatal transfer, rodents have an important postnatal transmission of IgG acquired from maternal breastmilk; thus, premature rats were able to improve this deficiency during the suckling period [40]. Regarding IgM, this Ig isotype does not cross the placenta in humans and rodents and, therefore, the IgM of the newborn comes basically from the endogenous synthesis [41,42]. The lower concentration of IgM found in premature rats could reflect the immaturity of B lymphocytes, both in their absolute cell count and their deficiency in Ig synthesis, compared to those born at term, as described previously in humans [2]. In relation to IgA, in humans it has been described that this isotype, as for IgM, does not substantially cross the placenta [43], but the intestinal balance of microbiota colonization of the newborn is essential for the stimulation of its production [44]. In addition, in human plasma, cells that produce IgA are absent at the intestinal level until the second month of life [45], and it has also been described that in rats the number of IgA- and IgM-secreting cells from intestinal lamina propria during the first 10 days is practically absent, and the number of IgA-secreting cells at the end of suckling period is far away from that of adults [21]. These facts explain the low plasmatic IgA concentration found in 10-day-old animals in both studied groups.

With regard to phagocytic activity, the percentage of granulocytes of 10-day-old animals was not modified in conditions of prematurity. On the other hand, compared to the term group, premature rats showed a lower percentage of monocytes exerting phagocytosis, which showed once again the immature status of the immune system in prematurity. These results, suggesting higher susceptibility to infections, are in line with other studies that report a lower phagocytic activity in monocytes in human infants or pigs that were born early in gestation [20,46]. Moreover, this could be related to the increase in the blood monocyte count, observed in this study, as a mechanism to compensate for this lack of phagocytic activity. In relation to the phagocytic efficiency of granulocytes, this was higher than that of monocytes, but did not differ between term and preterm groups, as previously described in humans [46,47]. Thus, this result is also in line with the translational potential of this preterm rat model to what happens in humans. In both rats and humans, this fact indicates that the phagocytic efficiency of leukocytes in relation to pathogenic bacteria is not affected by prematurity.

In previous studies it has been shown that the intestinal barrier in rat is immature at the time of birth [48,49], and overall, in preterm humans as in other preterm animals, it has also been described that the intestinal epithelium has an increased permeability [14,43,50–52]. It is also known that this status of immaturity of the intestinal barrier is, in part, responsible for most cases of NEC in premature infants [53,54]. On this basis, in our study the effect of prematurity on the intestinal barrier was evaluated not only at the functional level, studying the permeability to 4-kDa-dextran, but also at the histomorphometric level, focusing on the study of the intestinal villi and goblet cells. Unexpectedly, in our work, a lower concentration of 4kDa-FITC-dextran in plasma was observed in conditions of prematurity, which indicates a lower permeability of the intestinal epithelium to this molecule in premature rats. However, in previous studies it has been observed that there is a rapid maturation of the intestinal barrier during the first days of life, positively influenced by feeding with breast milk, in both term [55] and preterm babies [56,57], thus reducing the incidence of NEC [58,59].

In addition, no differences between the groups were observed in the morphometric variables studied in the villi. However, goblet cells, responsible for the mucus layer found in the lumen of the intestine, were smaller due to prematurity. According to Clark et al. the smaller size and density of the goblet cells of the intestinal epithelium could reflect the condition of immaturity that would lead to lower mucus production at the intestinal barrier level [60]. This result was in line with other studies where the immaturity of these goblet cells is also described as being responsible for the deficient

mucus layer [61]. Moreover, in those infants that suffer enterocolitis, immature goblet cells were also observed [53]. Again, this model resembles the conditions in preterm babies.

This work has some experimental limitations, mainly due to the reduced number of dams and litters in each group. It was designed as a first approach considering the minimum use of animals following ethical standards; however, further nutritional studies should be conducted with a greater number of dams. Moreover, although we studied some variables related to the immune system, there are more immune variables to evaluate in a preterm model, such as the expression and localization of intestinal tight junctions, phenotype characterization of lymphocytes from different compartments (intestinal and systemic), functionality of lymphocytes (proliferation activity and the secretion of cytokines), activity of NK cells, intestinal microbiota, among others. Another limitation of the study was the mode of delivery: Term rats were born by vaginal delivery, whereas preterm rats were born by caesarean section, and this could be another variable influencing the difference between groups. This approach was required in order to obtain premature pups in a controlled manner without using inductor agents that could influence the final outcome. For future studies, one possibility in order to avoid the C-section and the influence of anesthesia, a caesarean could be performed in all groups, as performed by Stelloh et al. in mice [62]. In addition, it has to be taken into account that, in this model, preterm pups are being nourished with term milk. It is well known that there are remarkable differences between term and preterm milk such as higher levels of proteins, fat, and free amino acids, but there is a lower concentration of lactose in preterm milk [33]. In terms of immune factors, preterm milk is enriched in neutrophils, lactoferrin, cytokines (IL 6, IL-10, TNF-α), secretory IgA and growth factors [33,63]. This differential composition expressly stimulates the immature immune system of the preterm baby. Overall, this compensation through the dam's milk has not been possible in this model, favoring a better separation of the results in the term and preterm variables studied.

There are several types of bioactive agents capable of stimulating the innate and acquired immunity of newborns and infants, such as some prebiotics, probiotics and symbiotics that lead to have a role in infection and allergy prevention [64–66]. However, few immunonutritional works have been performed so far in preterm neonates; the literature is scarce or even absent in terms of immunomaturation and they are just focused on NEC without considering immune variables. To date, some agents, for example, some *Bifidobacterium* strains and lactoferrin, have been demonstrated to significantly reduce the incidence of NEC and sepsis in preterm infants, but their impact on the premature immune system has not been evaluated [67,68]. Thus, the present model facilitates the study at preclinical level of the impact of bioactive agents able to promote the immune system development as a first step for future clinical interventions. The above interventions with immunonutrients target directly the pup after birth; however, the nutritional intervention to promote the maturation of the immune system of the preterm neonate can also be performed on gestating or lactating rats, as in previous studies in term rats [29].

In summary, our findings confirm the delayed development of innate and adaptive immunity in preterm rats compared with term ones. The premature rat model presented in this work is another step towards a better understanding of the immature immune system in premature conditions. In addition, we have described, for the first time, biomarkers of innate and adaptive immunity that could be useful in future studies to explore new ways to modulate this delayed immunity in preterm newborns, as well as being a useful tool in immunonutritional interventions.

Author Contributions: The authors' contributions were as follows: conceptualization, À.F., M.C., M.J.R.-L. and F.J.P.-C.; methodology, B.G.-P., P.T.-C. and M.A.-G.; writing—original draft preparation, B.G.-P., F.J.P.-C., and À.F.; writing—review and editing, B.G.-P., P.T.-C., M.A.-G., M.C., M.J.R.-L., F.J.P.-C., and À.F. All authors have read and approved the final version of the manuscript for publication.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2013-48459-P). BG-P holds a fellowship from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2014-068134). PT-C holds a fellowship from the National Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT-DMPF-2015-1666-CO).

Acknowledgments: The authors would like to thank Lidia Marín-Morote, Clara Duran, Caterina Mascaró and Elisa Alòs for their help with the laboratory work. We also thank the Biochemistry Section of the Faculty of Pharmacy and Food Science from the University of Barcelona for the use of Modulus™ Microplate spectrophotometer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rich-Edwards, J.W.; Klungsoyr, K.; Wilcox, A.J.; Skjaerven, R. Duration of pregnancy, even at term, predicts long-term risk of coronary heart disease and stroke mortality in women: A population-based study. *Am. J. Obs. Gynecol.* **2015**, *15*, 518.e1–518.e8. [CrossRef] [PubMed]
2. Melville, J.M.; Moss, T.J. The immune consequences of preterm birth. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 79. [CrossRef] [PubMed]
3. Frey, H.A.; Klebanoff, M.A. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *21*, 68–73. [CrossRef]
4. Lewis, E.D.; Richard, C.; Larsen, B.M.; Field, C.J. The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 23–47. [CrossRef]
5. Chang, E. Preterm birth and the role of neuroprotection. *BMJ* **2015**, *350*, g6661. [CrossRef]
6. Rubarth, L.B.; Quinn, J. Respiratory development and respiratory distress syndrome. *Neonatal Netw.* **2015**, *34*, 231–238. [CrossRef]
7. Gritz, E.C.; Bhandari, V. The human neonatal gut microbiome: A brief review. *Front. Pediatr.* **2015**, *3*, 17.
8. Lawn, J.E.; Kerber, K.; Enweronu-Laryea, C.; Cousens, S. 3.6 Million neonatal deaths-what is progressing and what is not? *Semin. Perinatol.* **2010**, *34*, 371–386. [CrossRef]
9. Strunk, T.; Currie, A.; Richmond, P.; Simmer, K.; Burgner, D. Innate immunity in human newborn infants: Prematurity means more than immaturity. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2011**, *24*, 25–31. [CrossRef]
10. Adams-Chapman, I. Long-term impact of infection on the preterm neonate. *Semin. Perinatol.* **2012**, *36*, 462–470. [CrossRef]
11. Gasparoni, A.; Ciardelli, L.; Avanzini, A.; Castellazzi, A.M.; Carini, R.; Rondini, G.; Chirico, G. Age-related changes in intracellular Th1/Th2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol. Neonate* **2003**, *84*, 297–303. [CrossRef]
12. Correa-Rocha, R.; Pérez, A.; Lorente, R.; Ferrando-Martínez, S.; Leal, M.; Gurbindo, D.; Muñoz-Fernández, M.Á. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatr. Res.* **2012**, *71*, 590–597. [CrossRef]
13. Currie, A.J.; Curtis, S.; Strunk, T.; Riley, K.; Liyanage, K.; Prescott, S.; Doherty, D.; Simmer, K.; Richmond, P.; Burgner, D. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 1588–1596. [CrossRef]
14. Neu, J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 629S–634S. [CrossRef]
15. Chin, A.M.; Hill, D.R.; Aurora, M.; Spence, J.R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *66*, 81–93. [CrossRef]
16. Barkhuizen, M.; Van de Berg, W.D.; De Vente, J.; Blanco, C.E.; Gavilanes, A.W.; Steinbusch, H.W. Nitric oxide production in the striatum and cerebellum of a rat model of preterm global perinatal asphyxia. *Neurotox. Res.* **2017**, *31*, 400–409. [CrossRef]
17. Remesal, A.; De Luca, D.; San Feliciano, L.; Isidoro-Garcia, M.; Minucci, A.; Pocino, K.; Casas, J.; Fabrias, G.; Capoluongo, E.D.; de la Cruz, D.L. Effect of prenatal steroidal inhibition of sPLA2 in a rat model of preterm lung. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2016**, *36*, 31–36. [CrossRef]
18. Corsini, I.; Polvani, S.; Tarocchi, M.; Tempesti, S.; Marroncini, G.; Generoso, M.; Bresci, C.; Gozzini, E.; Bianconi, T.; Galli, A.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist pioglitazone reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal preterm rat model. *Pediatr. Res.* **2017**, *81*, 364–368. [CrossRef]
19. Satoh, T.; Izumi, H.; Iwabuchi, N.; Odamaki, T.; Namba, K.; Abe, F.; Xiao, J.Z. Bifidobacterium breve prevents necrotising enterocolitis by suppressing inflammatory responses in a preterm rat model. *Benef. Microbes* **2016**, *7*, 75–82. [CrossRef]

20. Nguyen, D.N.; Jiang, P.; Frøkiær, H.; Heegaard, P.M.; Thymann, T.; Sangild, P.T. Delayed development of systemic immunity in preterm pigs as a model for preterm infants. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36816. [CrossRef]
21. Pérez-Cano, F.J.; Franch, À.; Castellote, C.; Castell, M. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 537310. [CrossRef] [PubMed]
22. Appleby, C.J.; Towner, R.A. Magnetic resonance imaging of pulmonary damage in the term and premature rat neonate exposed to hyperoxia. *Pediatr. Res.* **2001**, *50*, 502–507. [CrossRef] [PubMed]
23. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 486–495. [CrossRef] [PubMed]
24. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Supplementation with 2′-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 372. [CrossRef] [PubMed]
25. Pérez-Cano, F.J.; Marín-Gallén, S.; Castell, M.; Rodríguez-Palmero, M.; Rivero, M.; Franch, À.; Castellote, C. Bovine whey protein concentrate supplementation modulates maturation of immune system in suckling rats. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98 Suppl 1*, S80–S84. [CrossRef]
26. Rigo-Adrover, M.M.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preclinical immunomodulation by the probiotic *Bifidobacterium breve* M-16V in early life. *PLoS One* **2016**, *11*, e0166082. [CrossRef]
27. Grases-Pintó, B.; Abril-Gil, M.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. Enhancement of immune maturation in suckling rats by leptin and adiponectin supplementation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1786. [CrossRef]
28. Torres-Castro, P.; Abril-Gil, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J.; Franch, À. TGF-β2, EGF, and FGF21 growth factors present in breast milk promote mesenteric lymph node lymphocytes maturation in suckling rats. *Nutrients* **2018**, *10*, 1171. [CrossRef]
29. Ramírez-Santana, C.; Pérez-Cano, F.J.; Castellote, C.; Castell, M.; Rivero, M.; Rodríguez-Palmero, M.; Franch, À. Higher immunoglobulin production in conjugated linoleic acid-supplemented rats during gestation and suckling. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 858–868. [CrossRef]
30. Rigo-Adrover, M.M.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preventive effect of a synbiotic combination of galacto- and fructooligosaccharides mixture with *Bifidobacterium breve* M-16V in a model of multiple rotavirus infections. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1318. [CrossRef]
31. Puiman, P.; Stoll, B. Animal models to study neonatal nutrition in humans. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2008**, *11*, 601–606. [CrossRef] [PubMed]
32. Sengupta, P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int. J. Prev. Med.* **2013**, *4*, 624–630. [PubMed]
33. Underwood, M.A. Human milk for the premature infant. *Pediatr. Clin. North Am.* **2013**, *60*, 189–207. [CrossRef]
34. Migraine, A.; Nicklaus, S.; Parnet, P.; Lange, C.; Monnery-Patris, S.; Des Robert, C.; Darmaun, D.; Flamant, C.; Amarger, V.; Rozé, J.C. Effect of preterm birth and birth weight on eating behavior at 2 years of age. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *97*, 1270–1277. [CrossRef]
35. Andres, O.; Schulze, H.; Speer, C.P. Platelets in neonates: Central mediators in haemostasis, antimicrobial defence and inflammation. *Thromb. Haemost.* **2015**, *113*, 3–12.
36. Cowman, J.; Quinn, N.; Geoghegan, S.; Müllers, S.; Oglesby, I.; Byrne, B.; Somers, M.; Ralph, A.; Voisin, B.; Ricco, A.J.; et al. Dynamic platelet function on von Willebrand factor is different in preterm neonates and full-term neonates: Changes in neonatal platelet function. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14*, 2027–2035. [CrossRef]
37. Hoffbrand, A.V. Folate deficiency in premature infants. *Arch. Dis. Child.* **1970**, *45*, 441–444. [CrossRef]
38. Alkan Ozdemir, S.; Ozer, E.A.; Kose, S.; Ilhan, O.; Ozturk, C.; Sutcuoglu, S. Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *29*, 972–976. [CrossRef]
39. Palmeira, P.; Quinello, C.; Silveira-Lessa, A.L.; Zago, C.A.; Carneiro-Sampaio, M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 985646. [CrossRef]
40. Wang, Y.; Jiang, X.; He, J.; Diraviyam, T.; Zhang, X. Quantitative investigation on correlation between IgG and FcRn during gestation and lactating periods in rat. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2016**, *75*, 81–85. [CrossRef]

41. Desesso, J.M.; Williams, A.L.; Ahuja, A.; Bowman, C.J.; Hurtt, M.E. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. *Crit. Rev. Toxicol.* **2012**, *42*, 185–210. [CrossRef] [PubMed]
42. Borghesi, J.; Mario, L.C.; Rodrigues, M.N.; Favaron, P.O.; Miglino, M.A. Immunoglobulin transport during gestation in domestic animals and humans — A Review. *Open J. Anim. Sci.* **2014**, *4*, 323–336. [CrossRef]
43. Collins, A.; Weitkamp, J.H.; Wynn, J.L. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2018**, *103*, F391–F394. [CrossRef]
44. Mirpuri, J.; Raetz, M.; Sturge, C.R.; Wilhelm, C.L.; Benson, A.; Savani, R.C.; Hooper, L.V.; Yarovinsky, F. Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. *Gut Microbes.* **2014**, *5*, 28–39. [CrossRef]
45. Gustafson, C.E.; Higbee, D.; Yeckes, A.R.; Wilson, C.C.; De Zoeten, E.F.; Jedlicka, P.; Janoff, E.N. Limited expression of APRIL and its receptors prior to intestinal IgA plasma cell development during human infancy. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 467–477. [CrossRef]
46. Prosser, A.; Hibbert, J.; Strunk, T.; Kok, C.H.; Simmer, K.; Richmond, P.; Burgner, D.; Currie, A. Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. *Pediatr. Res.* **2013**, *74*, 503–510. [CrossRef] [PubMed]
47. de Jong, E.; Strunk, T.; Burgner, D.; Lavoie, P.M.; Currie, A. The phenotype and function of preterm infant monocytes: Implications for susceptibility to infection. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 645–656. [CrossRef]
48. Walthall, K.; Cappon, G.D.; Hurtt, M.E.; Zoetis, T. Postnatal development of the gastrointestinal system: A species comparison. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **2005**, *74*, 132–156. [CrossRef] [PubMed]
49. Patel, R.M.; Myers, L.S.; Kurundkar, A.R.; Maheshwari, A.; Nusrat, A.; Lin, P.W. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 626–635. [CrossRef] [PubMed]
50. van Elburg, R.M.; Fetter, W.P.; Bunkers, C.M.; Heymans, H.S. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2003**, *88*, F52–F55. [CrossRef] [PubMed]
51. Weaver, L.T.; Laker, M.F.; Nelson, R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch. Dis. Child.* **1984**, *59*, 236–241. [CrossRef]
52. Sangild, P.T.; Thymann, T.; Schmidt, M.; Stoll, B.; Burrin, D.G.; Buddington, R.K. Invited review: The preterm pig as a model in pediatric gastroenterology. *J. Anim. Sci.* **2013**, *91*, 4713–4729. [CrossRef] [PubMed]
53. Anand, R.J.; Leaphart, C.L.; Mollen, K.P.; Hackam, D.J. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* **2007**, *27*, 124–133. [CrossRef] [PubMed]
54. Bergmann, K.R.; Liu, S.X.; Tian, R.; Kushnir, A.; Turner, J.R.; Li, H.L.; Chou, P.M.; Weber, C.R.; De Plaen, I.G. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 1596–1606. [CrossRef]
55. Le Huërou-Luron, I.; Blat, S.; Boudry, G. Breast- v. formula-feeding: Impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 23–36. [CrossRef]
56. Taylor, S.N.; Basile, L.A.; Ebeling, M.; Wagner, C.L. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeed Med.* **2009**, *4*, 11–15. [CrossRef] [PubMed]
57. Saleem, B.; Okogbule-Wonodi, A.C.; Fasano, A.; Magder, L.S.; Ravel, J.; Kapoor, S.; Viscardi, R.M. Intestinal barrier maturation in very low birthweight infants: Relationship to feeding and antibiotic exposure. *J. Pediatr.* **2017**, *183*, 31.e1–36.e1. [CrossRef] [PubMed]
58. Colaizy, T.T.; Bartick, M.C.; Jegier, B.J.; Green, B.D.; Reinhold, A.G.; Schaefer, A.J.; Bogen, D.L.; Schwarz, E.B.; Stuebe, A.M.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Impact of optimized breastfeeding on the costs of necrotizing enterocolitis in extremely low birthweight infants. *J. Pediatr.* **2016**, *175*, 100–105.e2. [CrossRef] [PubMed]
59. Sullivan, S.; Schanler, R.J.; Kim, J.H.; Patel, A.L.; Trawöger, R.; Kiechl-Kohlendorfer, U.; Chan, G.M.; Blanco, C.L.; Abrams, S.; Cotten, C.M.; et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J. Pediatr.* **2010**, *156*, 562–567. [CrossRef]
60. Clark, J.A.; Doelle, S.M.; Halpern, M.D.; Saunders, T.A.; Holubec, H.; Dvorak, K.; Boitano, S.A.; Dvorak, B. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: Protective effect of EGF treatment. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2006**, *291*, G938–G949. [CrossRef]

61. Hackam, D.J.; Upperman, J.S.; Grishin, A.; Ford, H.R. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin. Pediatr. Surg.* **2005**, *14*, 49–57. [CrossRef] [PubMed]
62. Stelloh, C.; Allen, K.P.; Mattson, D.L.; Lerch-Gaggl, A.; Reddy, S.; El-Meanawy, A. Prematurity in mice leads to reduction in nephron number, hypertension, and proteinuria. *Transl. Res.* **2012**, *159*, 80–89. [CrossRef]
63. Castellote, C.; Casillas, R.; Ramírez-Santana, C.; Pérez-Cano, F.J.; Castell, M.; Moretones, M.G.; López-Sabater, M.C.; Franch, A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J. Nutr.* **2011**, 1181–1187. [CrossRef]
64. Amaral, M.A.; Guedes, G.H.B.F.; Epifanio, M.; Wagner, M.B.; Jones, M.H.; Mattiello, R. Network meta-analysis of probiotics to prevent respiratory infections in children and adolescents. *Pediatr. Pulmonol.* **2017**, *52*, 833–843. [CrossRef]
65. Wang, H.T.; Anvari, S.; Anagnostou, K. The role of probiotics in preventing allergic disease. *Children* **2019**, *6*, 24. [CrossRef]
66. Nauta, A.J.; Ben Amor, K.; Knol, J.; Garssen, J.; van der Beek, E.M. Relevance of pre- and postnatal nutrition to development and interplay between the microbiota and metabolic and immune systems. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 586S–593S. [CrossRef]
67. Hagen, P.C.; Skelley, J.W. Efficacy of *Bifidobacterium* species in prevention of necrotizing enterocolitis in very-low birth weight infants. A systematic review. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* **2019**, *24*, 10–15. [CrossRef] [PubMed]
68. Sherman, M.P.; Miller, M.M.; Sherman, J.; Niklas, V. Lactoferrin and necrotizing enterocolitis. *Curr. Opin. Pediatr.* **2014**, *26*, 146–150. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CAPÍTULO DE LIBRO

"Actividad inmunomoduladora de concentrados proteicos de suero lácteo en las primeras etapas de vida"

Francisco J. Pérez-Cano, María J. Rodríguez-Lagunas, Blanca Grases-Pintó, Paulina Torres-Castro, Margarida Castell, Àngels Franch

INMUNONUTRICIÓN Y ESTILO DE VIDA, **editorial Panamericana**

(en prensa)

RESUMEN

Los concentrados proteicos de suero lácteo o *whey protein concentrate* (WPC) contienen elevadas concentraciones de proteínas como, por ejemplo, inmunoglobulinas y lactoferrina. Las proteínas de suero lácteo se encuentran en diferentes formas (concentrado, aislado o hidrolizado). Todos ellos presentan una amplia variedad de propiedades fisiológicas, debido a la presencia de las mismas proteínas y/o de los péptidos bioactivos generados. En este capítulo, se revisan diversos estudios preclínicos en modelos animales y clínicos donde se muestra el efecto de la intervención nutricional con WPC sobre el desarrollo del sistema inmunitario intestinal y sistémico, durante las primeras etapas de vida, como por ejemplo sobre las subpoblaciones linfocíticas y la respuesta humoral. También se presenta la función inmunomoduradora del WPC en procesos infecciosos gastrointestinales como la infección por rotavirus, enfermedad muy común durante las primeras etapas de vida.



Actividad inmunomoduladora de concentrados proteicos de suero lácteo en las primeras etapas de vida

10

Francisco J. Pérez-Cano, María José Rodríguez-Lagunas, Blanca Grases-Pintó, Paulina Torres-Castro, Margarida Castell y Àngels Franch*

RESUMEN

Durante la vida posnatal, gracias a los estímulos de la dieta y a la microbiota intestinal se consigue la maduración progresiva del sistema inmunitario. En esta etapa, la inmunonutrición puede ser una buena estrategia para incrementar los sistemas de protección del lactante. Uno de los grupos de alimentación que mayor interés ha despertado en los últimos años es el de los lácteos, ya que los avances tecnológicos permiten hoy en día disponer de nuevos concentrados proteicos de suero lácteo (WPC), ricos en proteínas con acción defensiva, como inmunoglobulinas o lactoferrina. En este capítulo se describen los estudios de suplementación efectuados con WPC en modelos animales de sistema inmunitario en desarrollo y en humanos. Se ha demostrado la acción de los WPC sobre la funcionalidad y composición del tejido linfoide intestinal y sistémico en proceso de maduración. Asimismo, la administración de WPC durante las primeras etapas de vida ayuda a prevenir y controlar diferentes procesos infecciosos, ya que es capaz de generar una acción directa y de modulación de la respuesta inmunitaria sistémica y de las mucosas dirigida contra el patógeno.

PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

Distribución de las proteínas de leche materna

Desde el nacimiento, la leche materna vehicula una estrecha relación nutricional madre-neonato, ya que le aporta todos los macro y micronutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento óptimo durante un período de tiempo concreto.[1] Además, con la leche materna continúa la transferencia de inmunocompetencia al neonato, iniciada ya durante la gestación, con el fin de compensar la inmadurez del sistema inmunitario del recién nacido y proporcionarle protección frente a agentes patógenos.[2] Esta actividad procede de componentes bioactivos, muchos de ellos de naturaleza proteica, presentes en los diferentes compartimentos lácteos. En este sentido, las proteínas de la leche pueden clasificarse según su localización en proteínas y péptidos de bajo peso molecular presentes en suero lácteo, caseína formando micelas y proteínas que forman parte de la membrana de los glóbulos grasos[1] (v. Fig. 10.1).

En general, las proteínas de la leche humana se pueden clasificar en tres grupos: caseínas, proteínas del suero y mucinas. Las caseínas y las proteínas del suero constituyen la mayor parte del total de proteínas y su proporción/composición varía a lo largo de la lactancia. Sólo un pequeño porcentaje corresponde a las mucinas y su composición prácticamente no varía a lo largo de la lactancia. La función principal de las proteínas de la leche es aportar al recién nacido

(*) Corresponding: franciscoperezf@ub.edu

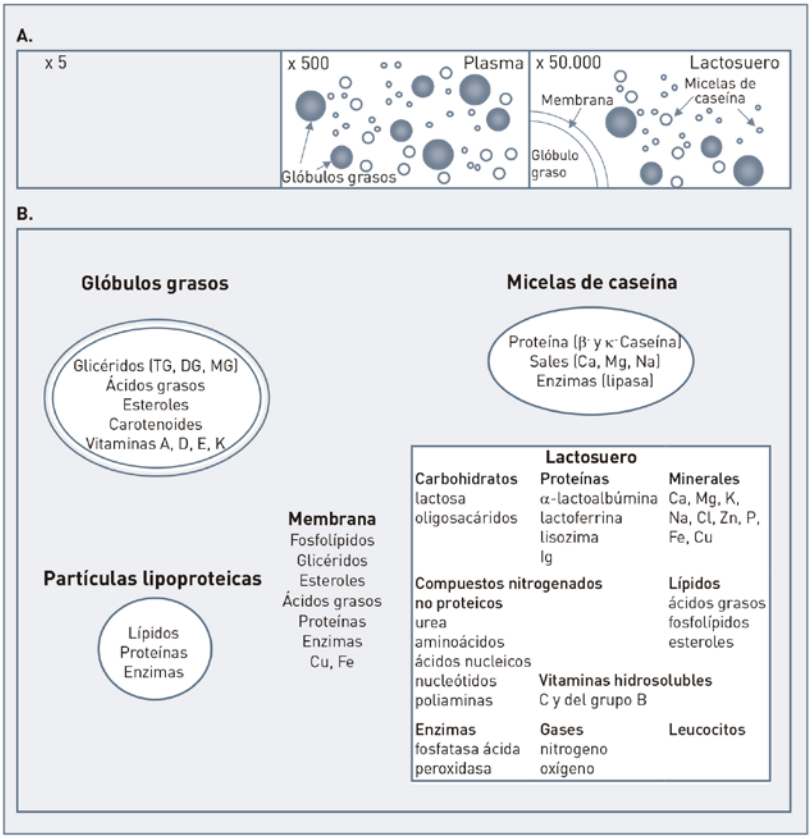


Figura 10.1. A) Esquema representativo de la observación microscópica de la leche a diferentes aumentos. B) Distribución de los componentes lácteos en los distintos compartimentos[3]

los aminoácidos esenciales. Sin embargo, tienen muchas otras actividades fisiológicas que contribuyen a su salud en muchos sentidos.

Actualmente, gran parte de la investigación se centra en los efectos de las proteínas de suero lácteo o *whey proteins* (WP) y péptidos derivados de las mismas, los cuales poseen efectos sobre la inmunidad y un papel protector potencial frente a algunos trastornos inmunológicos.

Tipos de proteínas presentes en el suero lácteo

Las WP están presentes en la leche materna de todas las especies de mamíferos y son componentes esenciales para la maduración fisiológica del recién nacido. Por una parte, estimulan su sistema inmunitario y, por otra, proporcionan protección pasiva, especialmente, en el tracto gastrointesti-

nal, durante los primeros días de vida, el período más crítico para el recién nacido.[4] Hoy día se sabe que muchas de estas proteínas se transforman en el tracto digestivo, dando péptidos de menor tamaño, que son los auténticos responsables de la acción biológica de las WP.[5]

En cualquier caso, la composición de las WP presentes en leche humana difiere de la que se encuentra en la leche bovina, principal fuente de obtención de éstas (Tabla 10.1). No sólo existen diferencias en su proporción, sino también en el efecto de las WP en las diferentes especies. La acción y la potencia del efecto de las WP humanas es diferente a las del suero bovino. Normalmente, el efecto de las proteínas humanas es mayor, aunque en la mayoría de los casos, el efecto de las proteínas de origen bovino se conserva.

Las WP de origen bovino incluyen diversos tipos de proteínas en diferente proporción, como la β-lactoglobulina (50-55 %) y la α-lactoalbúmina (20-25 %), con propiedades sobre sistema inmunitario, inmunoglobulinas (Ig, 10-15 %), que pueden unir y neutralizar a los agentes patógenos en el tracto gastrointestinal, proteínas bactericidas, como lactoferrina (1-2 %),[6] lactoperoxidasa (0,5 %), albúmina sérica bovina (5-10 %), glucomacropéptido (10-15 %) y otras en menor proporción, como lisozima, factores de crecimiento, citoquinas que promueven la defensa inmunológica y la función de barrera intestinal, además de aminoácidos libres y hormonas (v. Tabla 10.1).[7-9]

La β-lactoglobulina es la proteína más abundante en el suero lácteo bovino, pero la leche humana carece de ésta. Es una fuente esencial de aminoácidos ramificados y transporta pequeñas moléculas hidrofóbicas bioactivas, como el retinol. La α-lactoalbúmina está formada por una gran variedad de aminoácidos, entre los que también se encuentran los de tipo esencial y ramificado. Es una proteína capaz de modular diversas funciones del sistema inmunitario. Las Ig representan alrededor del 10 % de las proteínas presentes en suero lácteo y, aunque se pueden hallar las diferentes clases existentes (IgA, IgD,

Tabla 10.1. Contenido de los componentes bioactivos de las fracciones de suero lácteo y caseínas en leche bovina y humana. La proporción de WP se muestra como porcentaje respecto al total de WP y el de cada una de las caseínas respecto al total de caseínas en esta fracción. La proporción entre WP y caseínas en leche humana es una aproximación basada en el proceso fisiológico de lactancia, siendo esta relación superior en los primeros días (~80:20) y más reducida posteriormente (~50:50) *(Modificado de 10)*

			Leche bovina		Leche humana
Proteínas del suero (WP)	β-lactoglobulina	20 %	52 %	60 %	0 %
	α-lactoalbúmina		17 %		36 %
	Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM)		10 %		17 %
	Albúmina sérica		5 %		6 %
	Lactoferrina		1,5 %		25 %
	Lisozima		< 0,1 %		6 %
	Lactoperoxidasa		0,5 %		< 0,1 %
	Glucomacropéptido		12 %		ND
	Polipéptidos ricos en prolina		< 0,1 %		ND
	Otras proteínas y péptidos		2 %		10 %
Caseínas	β-caseína	80 %	36 %	40 %	68 %
	κ-caseína		14 %		20 %
	αs1-caseína		40 %		12 %
	αs2-caseína		10 %		0 %

IgE, IgG, IgM), la más frecuente en leche es la IgA. La lactoferrina es una glucoproteína captadora de hierro formada por una única cadena polipeptídica con dos lugares de unión al hierro. La concentración de lactoferrina en leche humana es de 2 mg/mL (leche madura) y de 7 mg/mL (calostro). Estos valores son inferiores en el caso de la leche de vaca, donde la concentración de lactoferrina es de 0,5 mg/mL en leche madura y de 1,5 mg/mL en calostro. Las WP también incluyen diversos tipos de enzimas de tipo hidrolasa, transferasa, proteasa, lipasa, etc. y, entre ellas, debe destacarse la lactoperoxidasa. Esta enzima cataliza entre otras reacciones la reducción del peróxido de hidrógeno. El glucomacropéptido se genera durante el procesado de la leche en la fabricación de quesos. Es rico en aminoácidos ramificados, pero no en aminoácidos aromáticos. Finalmente, la albúmina sérica bovina (BSA) también está representada en el conjunto de WP y es una proteína de gran calidad, ya que es fuente de un gran número de aminoácidos esenciales.

Fracciones y concentrados de proteínas de suero lácteo

El suero lácteo, subproducto habitual derivado de la fabricación de quesos, contiene lípidos, lactosa, vitaminas y minerales y, el conjunto de todas las proteínas de la leche presentes en él o en el suero lácteo es un 20 % del total.[11] Las WP, por su riqueza funcional, nutricional y por sus propiedades galénicas, como solubilidad, capacidad espumante y emulsionante, entre otras, han suscitado gran interés comercial y se han desarrollado diversas tecnologías de procesado para optimizar su obtención. Así, hoy día se pueden hallar fracciones con mayor o menor contenido en WP, como suero lácteo en polvo (11-14,5 % de contenido proteico), fracciones específicas de suero lácteo, concentrado de suero lácteo (*whey protein concentrate*, WPC, 34-82 %) y proteínas de suero lácteo aisladas (*whey protein isolate*, 90-92 %).[11, 12]

En los últimos años, la calidad de estos productos se ha incrementado drásticamente tras la incorporación de nuevas metodologías de obtención, como técnicas de filtración y ultrafiltración, ósmosis inversa y de intercambio iónico.[13] Por otra parte, la composición de los WPC varía en función del material de partida,[14] pudiendo ser sueros lácteos derivados de calostro bovino, de la fabricación de queso o de la fabricación de mantequilla (mazada). Como ejemplo, los WPC derivados de calostro bovino tienen gran riqueza proteica y los concentrados obtenidos a partir de la mazada son ricos en compuestos de la membrana de los glóbulos grasos, como los fosfolípidos y gangliósidos.

Así, las WP y los WPC pueden ser de utilidad en la elaboración de fórmulas infantiles para que sean un alimento complementario o alternativo a la leche materna, es decir, con una composición lo más similar posible. En este sentido, la adición de determinadas fracciones de WP y WPC a fórmulas infantiles permite mejorar la calidad y cantidad proteica de la leche bovina utilizada como material de partida en su elaboración.[11]

Péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas

La degradación de proteínas de leche genera una gran variedad de fragmentos o péptidos bioactivos, que pueden desempeñar diversas funciones biológicas que pueden ser diferentes a las de la proteína de la que derivan. Estos péptidos pueden formarse y aparecer en el suero lácteo debido a la acción de las propias proteasas presentes en la leche y obtenerse mediante técnicas de fermentación o digestión aplicadas en los procesos de fabricación de los diferentes alimentos lácteos.

En los últimos años se han descrito gran cantidad de estos péptidos en leche humana y derivados lácteos y, a modo de ejemplo, pueden hallarse en esta base de datos de reciente creación: *Milk Bioactive Peptide Database* (MBPDB: http://mbpdb.nws.oregonstate.edu/). La base de datos agrupa hasta 944 péptidos bioactivos de 10 especies diferentes, puesto que la composición proteica de cada tipo de leche tampoco es idéntica, siendo las dos más frecuentes la de vaca y la humana, con una representación del 76 y 11 %, respectivamente. Estos péptidos no tienen por qué provenir exclusivamente de proteínas presentes en el suero lácteo y, de hecho, la mayoría proceden de las caseínas, que se encuentran formando micelas en la leche.[15,16]

Estos péptidos ejercen diversas funciones, ya que pueden actuar como antimicrobianos, inhibidores de enzimas, antioxidantes, antiinflamatorios, moduladores de la respuesta inmunitaria e incluso

acción prebiótica y opioide, entre otras.[17] A modo de ejemplo, los péptidos antimicrobianos suelen interaccionar con la membrana del patógeno y alterar su permeabilidad. Algunos de estos péptidos derivan de la lactoferrina, proteína que también ejerce esta acción. Las acciones antiinflamatorias de los 10 fragmentos activos descritos hasta el momento, y que derivan de la β-lactoglobulina o de la α-lactoalbúmina, parecen deberse a su capacidad para inhibir el factor nuclear κB (NF-κB).[15,16]

Funciones y aplicaciones de las proteínas de suero lácteo

Las WP, en cualquiera de sus formas (concentrada, aislada o hidrolizada) ostentan diversas propiedades fisiológicas, debido a la presencia de las proteínas anteriormente citadas y/o de los péptidos bioactivos generados. Debido a la actividad funcional de estas proteínas, los productos derivados de WP se utilizan como ingredientes en productos farmacéuticos, nutracéuticos y alimentarios e, incluso, en cosméticos.[11] De hecho, en modelos experimentales y en ensayos clínicos se ha demostrado que varios derivados de WP y algunos componentes aislados tienen capacidad protectora frente a numerosas alteraciones fisiológicas,[8,11] aparte de la capacidad inmunomoduladora y antiinfecciosa, que serán tratadas de forma extensa en otros apartados de este capítulo.

En primer lugar, diversos componentes del suero lácteo han demostrado su actividad antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotectora que le confiere a los WPC un interés especial en las numerosas alteraciones que cursan con estrés oxidativo/inflamación como pueden ser neumonía, diabetes, cáncer, aterosclerosis, y otras disfunciones asociadas a la edad o a procesos degenerativos.[18] Estos componentes reducen el daño del ADN y las especies reactivas de oxígeno e incrementan la síntesis de glutatión, de especial relevancia, por ejemplo, en la fibrosis quística.

Por otra parte, y en relación también a las acciones anteriores, algunos estudios han demostrado los beneficios que pueden aportar las WP a pacientes con **cáncer**. La modulación de la actividad caspasa y sus efectos macro y microscópicos sobre los tumores mejoran la calidad de vida de los pacientes.

Otra de las funciones de las WP es la cardioprotectora o hipotensiva; algunos estudios demostraron su capacidad para reducir el riesgo cardiovascular. Aunque se desconocen los mecanismos exactos de esta capacidad, parece que realizan una función importante los péptidos bioactivos, los que tienen actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y los que se forman en la etapa post-absortiva.[8]

Los componentes del suero lácteo también aportan beneficios en el ámbito gastrointestinal. Por una parte, la capacidad quelante de algunas WP y péptidos permite mejorar la absorción de minerales, como el calcio. Por otra parte, ciertos péptidos bioactivos, entre ellos, los derivados de lactoferrina, como la lactoferricina H y B, han demostrado su acción prebiótica, promoviendo el crecimiento selectivo de algunas especies de bifidobacterias.[17] Asimismo, se elaboran formulaciones con WP como sistema de liberación de ciertos probióticos (lactobacilos, bifidobacterias y *Saccharomyces bolulardii*), es decir, la tasa de supervivencia de estas cepas se incrementa al pasar el tracto gastrointestinal (por las condiciones enzimáticas y de pH de éste).[18]

La utilidad de los WPC en el manejo de la obesidad se encuentra en fase de estudio. El hecho de que para el control de exceso de peso se utilicen dietas hiperproteicas y bajas en carbohidratos hace que estos productos tenga interés, precisamente, por su riqueza en componentes proteicos. También es importante la implicación de algunos de sus componentes en la modulación de la saciedad a través de las hormonas anoréxicas (GLP-1, colecistocinina o leptina) y anorexigénicas (grelina). En relación a esta última función también se encuentra la acción antidiabética de los WPC, ya que se ha demostrado que en individuos sanos pueden reducir la concentración de glucosa en sangre, mantener la masa muscular y modular la liberación de las hormonas anteriormente citadas. Su ingesta antes de las comidas disminuye la glucemia dependiente e independiente de insulina.[18]

La elevada proporción de aminoácidos ramificados en las WP, entre otras propiedades, hace que este tipo de productos sean atractivos para las personas que realizan ejercicio físico continuado y necesitan aumentar la masa muscular. Se ha constatado la recuperación de las propiedades funcionales del músculo tras la ingesta de estos compuestos.

Para finalizar el compendio de funciones saludables adscritas a las WP, debe comentarse su

utilidad en el manejo de la fenilcetonuria gracias al glucomacropéptido, su papel como protectores solares debido a ciertos péptidos y su prometedora, pero aún no consolidada acción, sobre la osteoporosis o las alteraciones periodontales, entre otras.[18]

ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

Actividad inmunomoduladora de los concentrados proteicos de suero lácteo

En la literatura existen referencias relativas a los efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario de determinadas WP y WPC.[19] Existen estudios que demuestran el potencial inmunomodulador de los WPC *in vitro*, modificando la síntesis de ciertas *citoquinas*, pero también en modelos experimentales y en estudios de intervención (ensayos clínicos) en situaciones de disfunción inmunitaria, como la dermatitis atópica o la psoriasis.[10] Hay numerosas investigaciones sobre la acción inmunomoduladora de ciertas WP, como la lactoferrina, que se considera como la proteína más polivalente encontrada en los vertebrados. Así, la lactoferrina, independientemente de su actividad antimicrobiana (que se tratará en otro apartado del capítulo), puede ejercer acciones inmunomoduladoras tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa. Así, promueve la diferenciación de linfocitos T y el cambio de isotipo hacia IgA en los linfocitos B, modula la secreción de numerosas *citoquinas*, regula el reclutamiento y migración de leucocitos mediante la modificación de la expresión de moléculas de adhesión y la producción de *quimioquinas*, potencia ciertas actividades líticas y fagocíticas de la respuesta innata e influye en el crecimiento de numerosos tipos de células, entre ellas, las del sistema inmunitario.[20]

Efecto beneficioso de las proteínas de suero lácteo sobre el desarrollo del sistema inmunitario del lactante

A pesar de la existencia de evidencias en la edad adulta, la información sobre la influencia de las WP en la maduración del sistema inmunitario sistémico y de las mucosas en las primeras etapas de vida es escasa.

Desarrollo del sistema inmunitario durante la lactancia

Aunque la estructura del sistema inmunitario en el recién nacido a término está prácticamente desarrollada, existen evidencias sobre su inmadurez y su falta de respuesta adecuada a estímulos ambientales.[21] Durante los primeros años de vida se produce la maduración del sistema inmunitario, no sólo de órganos linfoides sistémicos, sino también de los asociados a mucosas y, entre ellas, a la mucosa intestinal, que, en conjunto, recibe el nombre de tejido linfoide asociado al intestino o GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). El GALT comprende el mayor número de células inmunocompetentes del organismo y es la primera estructura inmunitaria que establece contacto con las proteínas de la dieta; por tanto, es muy interesante conocer la interacción entre las WP y el GALT en desarrollo, durante la lactancia. Para acceder a dicho compartimento es necesario emplear modelos adecuados, como animales lactantes de experimentación. Los estudios realizados en ratas lactantes han permitido establecer el patrón de maduración del sistema inmunitario sistémico, en bazo[22] y en las mucosas. En este último, concretamente, en el GALT, se han caracterizado las poblaciones de linfocitos efectores del compartimento intraepitelial (IEL) y de la *lámina propia* (LPL) del intestino delgado.[23-25] Esta caracterización ha permitido establecer posibles marcadores inmunológicos de maduración (cambios en la composición y fenotipo linfocitario, y capacidad secretora de Ig, entre otros), que constituyen una herramienta muy útil para evaluar el efecto inmunomodulador de determinados ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos -entre ellos, las WP-, sobre la inmunidad sistémica y de las mucosas en desarrollo durante el período de lactancia.

Efecto de los nuevos concentrados proteicos de suero lácteo sobre el sistema inmunitario posnatal en estudios preclínicos

Se ha estudiado el efecto de la suplementación con WPC o lactoferrina sobre la funcionalidad y fenotipo madurativo del tejido linfoide intestinal y sistémico en modelos experimentales de lactantes en rata[26] y cerdo,[27] entre otros.

A título de ejemplo, en el modelo de rata lactante, el suplemento de WPC se administró diariamente, durante todo el período de lactancia, en dosis de 0,2 g/kg/día. Los WPC utilizados contenían: proteínas (75-90 %), carbohidratos (18-20 %), lípidos (< 1 %), lactoferrina (0,92 %), IgG (35-45 %), IgA (2,5-5 %), IgM (3-5 %) y proporciones elevadas de componentes bioactivos como factores de crecimiento, hormonas, vitaminas y aminoácidos, entre otros. Los resultados se compararon con los obtenidos en un grupo referencia (REF) y en un grupo suplementado con fórmula infantil estándar (SIF, 3 g/kg/día).[26] De los resultados obtenidos se observó que a lo largo de la lactancia y en todos los grupos se produjo un incremento fisiológico en la proporción de IEL y LPL de linfocitos T, tanto CD8 como CD4, así como de linfocitos B de la lámina propia (LP). El suplemento con WPC en animales lactantes aumentó la proporción de células NKR-P1A+, marcador de células *natural killer* (NK) de rata, al inicio del período de lactancia, tanto en el compartimento intraepitelial (IE) como en la LP (Fig. 10.2 A y B). Además, el incremento inducido por WPC en la proporción de células NK a edad temprana se acompañó de un menor porcentaje de células NK CD8+ en la LP al final de la lactancia. Este fenotipo es indicativo de un estado inmaduro y es diferente al del animal adulto, que más frecuentemente es CD8-, por tanto, los WPC inducen la maduración precoz de este tipo celular (Fig. 10.2 C).

La respuesta inmunitaria innata debida a las células NK constituye la primera línea de defensa del GALT. Estas células NK se encuentran en una proporción relativamente elevada en

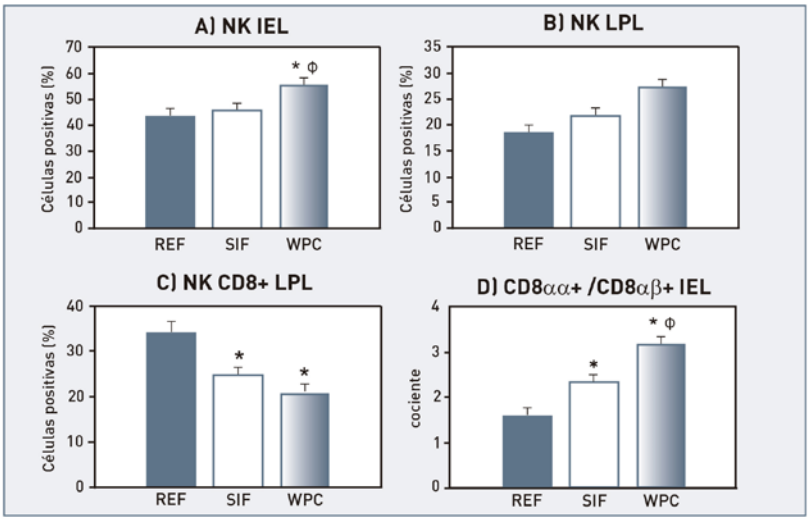


Figura 10.2. Efecto del suplemento diario con un concentrado proteico de suero lácteo (WPC, 0,2 g/kg/día, desde el nacimiento) sobre IEL y LPL de intestino delgado de rata lactante. Los resultados se comparan con los obtenidos en un grupo referencia (REF, que recibió agua mineral) y con un grupo suplementado con fórmula infantil estándar (SIF, 3 g/kg/día). **A)** Porcentaje de células NK en IEL a los 4 días de vida. **B)** Porcentaje de células NK en LPL a los 4 días de vida. **C)** Porcentaje de células CD8+ (marcador negativo de maduración) en células NK de LP a los 21 días de vida. **D)** Cociente entre IEL CD8αα+ y CD8αβ + a los 21 días de vida. *p < 0,05 respecto al grupo REF. ϕ p < 0,05 respecto al grupo SIF.[26]

los compartimentos IE y LP de roedores durante los primeros días de vida y disminuyen con la edad.[23-26,28] Los resultados hallados en los animales suplementados con WPC[26] demostraron que los compuestos bioactivos presentes en el concentrado proteico potencian la inmunidad innata en las mucosas durante la edad temprana y concuerdan con otros estudios semejantes. Así, se ha descrito un aumento en la actividad de células NK en bazo de ratones adultos alimentados con calostro[29] y un incremento en la proporción de células NK circulantes en sangre de rata y en intestino de ratón tras la administración de lactoferrina.[30,31] Además, la lactoferrina puede modular la maduración, diferenciación y proliferación linfocitaria.[32,33] Estos estudios indican que el efecto producido por los WPC puede ser parcialmente inducido por el contenido elevado en lactoferrina presente en este producto lácteo (9,2 mg/g de WPC seco). Por otra parte, se ha demostrado en determinadas fracciones de WP un efecto potenciador de la actividad de neutrófilos humanos, otra población leucocitaria clave en el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata.[34,35]

Los IEL CD8αα+ son una población linfocitaria intestinal seleccionada de forma no convencional, que se desarrolla en el microambiente intestinal y expresa esta isoforma particular de correceptor CD8,[36] mientras que los IEL CD8αβ+ presentan el fenotipo característico extramucoso. En estas subpoblaciones y en el compartimento IE se estableció el efecto de la suplementación con WPC sobre el cociente CD8αα+/CD8αβ+. Así, en los animales lactantes suplementados se produjo un incremento en dicho cociente, que se manifestó a la semana del nacimiento y, sobre todo, en el momento del destete (v. Fig. 10.2 D). Estos datos sugieren que los WPC potencian la respuesta inmunitaria específica de mucosas mediada por los IEL CD8αα+ intestinales y concuerda con el incremento en células CD8αα+ intestinales que se observa tras la administración de lactoferrina en ratón.[31]

Por otra parte, los linfocitos B de la LP intestinal de rata son una subpoblación predominante durante la lactancia. Este estudio evaluó también su capacidad funcional para secretar IgG, IgM e IgA de forma espontánea y bajo la influencia del suplemento con WPC.[26] A pesar de que la literatura científica atribuye un efecto inmunopotenciador a las WP sobre la producción de anticuerpos frente a un antígeno específico,[37] en ningún caso se detectaron células secretoras de IgA ni de IgG en la LP durante la lactancia, siendo el número de células productoras de IgM (50-115/10^6 células de LP) el día del destete similar en todos los grupos, suplementados o no.[26] Asimismo, el suplemento con WPC durante la lactancia no modificó significativamente el número de células circulantes secretoras de Ig ni la concentración sérica de IgG, IgM e IgA, es decir, la respuesta inmunitaria humoral.

De forma global, el estudio llevado a cabo en el modelo de rata lactante sugiere que los WPC pueden potenciar la presencia y maduración de subpoblaciones celulares implicadas en la respuesta innata y en la respuesta inmunitaria característica de mucosas en edades tempranas, respuesta que implica el desarrollo de linfocitos en el ámbito intestinal (IEL CD8αα+) y células efectoras de la respuesta inmunitaria innata, como células NK, en los compartimentos IE y LP. El grado de maduración de las diversas subpoblaciones inmunitarias de las mucosas podría contribuir, en gran medida, a los efectos beneficiosos de WP en la resistencia frente a infecciones gastrointestinales.[29,31,38]

En relación a otros modelos preclínicos ampliamente estudiados, como el cerdo, también existen suficientes evidencias del papel de las WP y de la lactoferrina en el desarrollo del sistema inmunitario.[27] Por una parte, la suplementación con lactoferrina bovina y derivados de calostro en cerdos recién nacidos produjo un incremento en la concentración sérica de IgG y de la producción *ex vivo* de *citoquinas*, como *interleuquina* (IL) IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF)α o interferón (IFN)γ. Sin embargo, no se observaron cambios en las poblaciones de linfocitos T, NK o B ni en estructuras del sistema inmunitario sistémico, como sangre o bazo, ni en las localizadas en la mucosa, como ganglios linfáticos mesentéricos o placas de Peyer.[39] Sin embargo, otros estudios con un diseño similar, demostraron la potenciación por parte de la lactoferrina bovina en la proporción y actividad de los linfocitos NK en diversos compartimentos, concentración sérica de IgG e IgA, y en la pro-

ducción de *citoquinas*, como IL-10 o IL-12.[40,41] En general, se considera que la lactoferrina bovina se tolera bien por los cerdos lactantes, retiene su bioactividad en el intestino e incluso ejerce efectos inmunomoduladores en la periferia.

Efecto de las proteínas de suero lácteo sobre el sistema inmunitario del lactante

Los pocos estudios que han evaluado la influencia de las WP en la respuesta inmunitaria de lactantes se han centrado en la lactoferrina como componente clave y en su impacto en procesos infecciosos.[42] Los estudios de intervención con lactoferrina llevados a cabo en nacidos a término, aunque frecuentemente con bajo peso al nacer, han demostrado un claro efecto en la reducción de ciertos procesos infecciosos e inflamatorios, como por ejemplo, la enterocolitis necrotizante (NEC). En función de la información actual, se puede concluir que los suplementos con lactoferrina, en dosis superiores a 100 mg/día, parecen ser efectivos en procesos infecciosos en recién nacidos. En niños de hasta un año se ha observado reducción de la morbilidad en alteraciones respiratorias y gastrointestinales con dosis comprendidas entre 0,5-1 g. En general, la lactoferrina bovina ejerce la misma actividad biológica que la humana. Sin embargo, aún queda por establecer la correcta duración de las intervenciones, su posible interacción con otros componentes de la leche materna y sus efectos a largo plazo.[42]

ACCIÓN ANTIINFECCIOSA DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

Algunas proteínas y péptidos presentes en la leche poseen actividad antiviral, antibacteriana, antiparasitaria y antifúngica.[43] Es frecuente que un mismo componente del suero lácteo presente una o más de las acciones citadas anteriormente.[44]

De nuevo, el efecto antiinfeccioso de lactoferrina ha sido demostrado por numerosas evidencias científicas. Esta proteína tiene una gran capacidad antimicrobiana debido a su acción quelante del hierro necesario para los patógenos o a través de la alteración que produce en la membrana de éstos, al tratarse de una molécula cargada positivamente, es decir, que presenta acción bacteriostática y bactericida. En este sentido, la hidrólisis de la lactoferrina con pepsina ha permitido conocer mejor la potente acción bactericida de la región N-terminal -distinta de la región de unión a Fe contra bacterias grampositivas y gramnegativas.[17] En concreto, estos péptidos se llaman lactoferricina H y B y tienen mayor potencia antimicrobiana que la molécula precursora. En cualquier caso, existen otros componentes con acción antibacteriana, como los péptidos antimicrobianos activos derivados de la α-lactoalbúmina, contra bacterias grampositivas, que contienen uniones disulfuro críticas para su actividad.[17]

Estas acciones son muy notables en la prevención y el tratamiento de las infecciones habituales y nosocomiales durante el período posnatal. Concretamente, en estas últimas, y, sobre todo, en prematuros, que son especialmente vulnerables, se está focalizando más el estudio de componentes antiinfecciosos de la leche materna, como la lactoferrina. Existen estudios que demuestran la actividad de la lactoferrina en la reducción de casos de colonización por *Giardia* o *Candida* en lactantes.[42] Muchos modelos de infección bacteriana en animales han permitido observar el potencial *in vivo* de la lactoferrina, por ejemplo, en casos de endotoxinemia, sepsis, infecciones respiratorias bacterianas y otros procesos infecciosos de las mucosas.[45] En este sentido, aunque su función protectora en casos de sepsis es evidente, los ensayos clínicos que están en curso serán fundamentales para su futura implementación en las guías prácticas de intervención.[46]

Actividad antiviral de las proteínas de suero lácteo

Existen numerosas WP y otros componentes presentes en suero lácteo, como péptidos bioactivos, que han demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo* su elevada actividad antiviral. Entre ellos destacan la lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y α-lactoalbúmina, pero también se encuentran mucinas lácteas, tenascina y péptidos bioactivos, entre otros. Los mecanismos de acción de algunos de estos componentes son diversos y comprenden desde la inhibición del crecimiento del virus, la reducción o la inhibición

de su entrada en la célula diana, la supresión de la replicación o la infección, hasta la inhibición del efecto citopático.[44,47]

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los WP y los componentes de los WPC pueden controlar muchos procesos infecciosos virales o, al menos, ejercer actividad antiviral o reducir la morbilidad y mortalidad.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es inhibido en estudios *in vitro*, por diferentes componentes de la leche humana, por ejemplo, inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (SLPI), mucinas purificadas de suero lácteo, proteína de matriz extracelular tenascina-C, β-lactoglobulina, lactoferrina y sus péptidos bioactivos, y lisozima, entre otros. Si se analizan el citomegalovirus (CMV) y el virus de herpes simple (HSV), también diversas WP han demostrado efectividad en ensayos *in vitro*, siendo lactoferrina y lactoferricina las que han demostrado en algunos casos efectos antiinfecciosos en animales de experimentación. Algunos péptidos de suero lácteo y lactoferrina humana también modulan la infección del virus de la hepatitis B (HBV) en líneas celulares de hepatocitos. Por otra parte, la lactoferrina de origen humano, bovino y de camello también bloquea la entrada del virus de la hepatitis C (HCV) a células diana en cultivo, siendo la de camello la más efectiva. Y a pesar de no estar tan estudiado, varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que algunas WP (lactoferrina bovina y lactoperoxidasa) ejercen su acción anti-vírica frente a adenovirus (lactoferrina inhibe la replicación viral, pero no lo hacen otras WP), hantavirus, alfavirus, virus respiratorio sincitial, papilomavirus, echovirus, poliovirus, enterovirus e incluso el virus influenza tipo A (H5N1 y H1N1).[44,47]

Las evidencias del efecto de las WP en animales de experimentación y en humanos sobre procesos infecciosos de origen vírico son menos abundantes, aunque se pueden encontrar estudios que demuestran como intervenciones con lactoferrina provocan la reducción de la incidencia de resfriado común, tanto en ratones como en voluntarios adultos sanos.[47] Y en referencia a población infantil, también se encuentra una menor incidencia de episodios infecciosos del tracto respiratorio inferior en aquellos niños que reciben formula infantil suplementada con lactoferrina.[42]

Además de todas las acciones anteriormente citadas, las WP también son efectivas en procesos infecciosos gastrointestinales, como se detalla en el apartado siguiente.

Efecto de los WPC en diarrea vírica infantil

Se ha sugerido en diversos estudios que los WPC o fracciones específicas de WP pueden ser útiles en el tratamiento de una amplia variedad de alteraciones gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la NEC, la diarrea infecciosa u otras infecciones gastrointestinales causadas por bacterias o virus.[48-50] En niños de edad inferior a dos años, los rotavirus (RV) del grupo A son los principales patógenos causantes de diarrea con gastroenteritis grave y deshidratación,[51] periodo en el que se consumen fórmulas infantiles derivadas de leche bovina. Por este motivo merecen especial atención aquellos estudios dirigidos a evaluar la acción preventiva de los WPC, y otros productos ricos en WP, sobre la diarrea infantil, para lo cual existen modelos experimentales de diarrea moderada inducida por infección con RV en ratón[52] y en rata lactante.[53]

WPC y gastroenteritis vírica experimental

Existen evidencias preclínicas sobre el efecto protector frente a rotavirus de diversos componentes del suero lácteo. Por una parte, diversas WP y WPC han demostrado su efecto *in vitro*.[54] Por otra parte, se ha demostrado el efecto preventivo de WPC derivados de animales inmunizados de forma específica frente al RV, es decir, productos con elevado contenido de anticuerpos anti-rotavirus, que frecuentemente se obtienen de la secreción láctea de los primeros días o calostro. Concretamente, se denominan calostros bovinos hiperinmunes anti-rotavirus (*Hyperimmune bovine collostrum*, HBC). Estos productos han demostrado, debido al efecto bloqueante de los anticuerpos específicos que impide la entrada del virus a las células diana, su efecto en la prevención y la mejora de las manifestaciones asociadas, como la gravedad de la diarrea o su duración, tanto en animales de experimentación como en ensayos en humanos.[54]

Cabe destacar la amplia utilización de estos calostros o Ig de origen bovino, procedentes de animales específicamente inmunizados, para conferir inmunidad pasiva no sólo contra patógenos como RV sino también frente a *Escherichia coli* que también causa diarrea en niños.[55,56]

Ahora bien, aparte de los WPC con elevada concentración de anticuerpos específicos anti-rotavirus, otros WPC convencionales han demostrado su efectividad preclínica. A modo de ejemplo, en el modelo de rata lactante se estudió el efecto protector de WPC frente a la infección por RV, evaluando el proceso diarreico y la función inmunitaria sistémica e intestinal.[53,57] En este estudio también se valoró la administración conjunta de WPC (0,3 g/kg/día) y lactoferrina (LF) (0,1 g/kg/día) (WPC+LF) y ello de forma comparativa al suplemento con fórmula infantil estándar (SIF) o vehículo (agua mineral). Los suplementos se administraron por vía oral desde el tercer día de vida y durante todo el período de lactancia.[57]

La valoración clínica de la infección vírica se evaluó 6 h después de la inoculación y, posteriormente, diariamente, los días 1-14 post-inoculación (DPI) mediante la puntuación de las heces de 1 a 4 (índice diarreico, ID), en función del aspecto y consistencia de las mismas.[53] La mayoría de animales inoculados desarrollaron diarrea (ID ≥ 2) durante el período 1-8 DPI, alcanzando en todos los grupos los valores de incidencia máxima entre los días 2-4 DPI y 6-7 DPI. La incidencia diarreica en los grupos suplementados con WPC y WPC+LF fue inferior a la del grupo inoculado no suplementado (Fig. 10.3 A).

En los dos grupos que recibieron WPC también se observó una reducción en la duración del proceso diarreico (3,6 días frente a 4,5 días en el grupo no suplementado). Además, la suplementación diaria con WPC y WPC+LF moduló la gravedad de la infección, observándose una forma de patología más leve que en el grupo

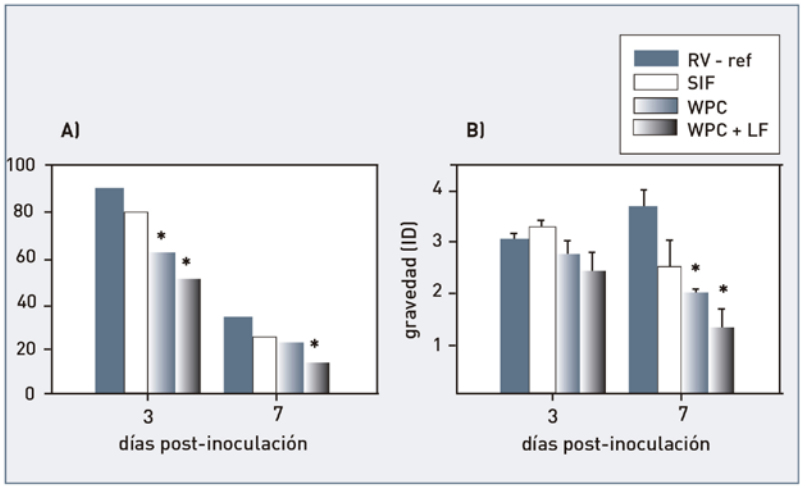


Figura 10.3. Efecto del suplemento diario con un concentrado proteico de suero lácteo administrado solo (WPC, 0,3 g/kg/día) o con lactoferrina (WPC+LF, 0,3 g/kg/día + 0,1 g/kg/día) sobre (**A**) incidencia (%) y (**B**) gravedad de la diarrea (índice diarreico, ID) en un modelo de gastroenteritis inducido por RV en rata lactante, a los 3 y 7 días de la inoculación. Los resultados se comparan con los obtenidos en un grupo inoculado no suplementado (RV-ref) y en un grupo suplementado con fórmula infantil estándar (SIF, 3 g/kg/día). * $p < 0,05$ respecto al grupo RV.[57]

no suplementado (v. Fig. 10.3 B). La valoración global del ID durante todo el proceso (área bajo la curva) permitió constatar una reducción en la gravedad de aproximadamente el 40 % en los grupos suplementados con WPC.

Los resultados de este estudio[57] demuestran que los componentes de los WPC mejoran el curso clínico de la diarrea infecciosa por RV y concuerdan con los datos de Wolber y cols.,[58] quienes observaron una reducción en las manifestaciones de enfermedad inducida por RV en ratones lactantes, y con Bojsen y cols.,[59] que describen efectos similares en un modelo de infección en ratones adultos.

Si bien se ha descrito que el suero lácteo contiene componentes con actividad inmunomoduladora y antimicrobiana,[8,60] los mecanismos exactos por los cuales los WPC pueden mejorar las alteraciones gastrointestinales no están claramente definidos. Los efectos beneficiosos frente a patógenos se pueden atribuir a la actividad biológica específica de proteínas presentes en los WPC, como lactoferrina,[61] o a la elevada concentración de Ig que contienen estos preparados, como sucedía con los calostros hiperinmunes anti-rotavirus mencionados anteriormente.[9,62] En este sentido, Bojsen y cols.[59] demostraron que el suero bovino comercial contiene una mezcla de anticuerpos neutralizantes de RV, mecanismo por el cual, los WPC podrían modular la diarrea inducida por RV.

Con el fin de establecer la acción inmunomoduladora de los WPC durante la infección con RV se han evaluado diversos biomarcadores inmunológicos del proceso infeccioso en ratas lactantes. Concretamente, se estudiaron el fenotipo de linfocitos intestinales, la respuesta inmunitaria humoral y la capacidad proliferativa específica.[57] Así, en el modelo de gastroenteritis en ratas lactantes, los suplementos dietéticos con WPC y con WPC+LF controlan algunos de los desequilibrios linfocitarios inducidos por la infección con RV en el epitelio intestinal. En concreto, ambos suplementos evitaron el incremento en la subpoblación de IEL T CD8αα+ y la disminución de de IEL NK CD8- inducidos por RV. Estos resultados concuerdan con los de estudios previos[26] y sugieren que el efecto potenciador que poseen los WPC sobre la maduración de células NK contribuiría de forma eficiente en la lucha contra la infección viral, al promover la eliminación de RV. De esta manera, se origina un proceso inflamatorio gastroentérico menor y se reduce la sintomatología asociada. Como indicador de la respuesta inmunitaria humoral sistémica, se determinó la concentración sérica de anticuerpos anti-RV al final del estudio, la cual fue inferior en los grupos suplementados con WPC y WPC+LF, en relación al grupo no suplementado. Estos resultados sugieren que se reduce la entrada del virus con la consiguiente reducción de la sensibilización sistémica, lo cual se habría generado por una respuesta inmunitaria innata más potente y el bloqueo específico del virus en las mucosas.

En relación a la respuesta inmunitaria celular sistémica específica *in vitro*, los esplenocitos procedentes de ratas suplementadas con WPC y WPC+LF exhibieron una menor respuesta proliferativa frente a RV, que se acompañó de menor secreción de IFNγ, todo ello con respecto al grupo no suplementado. Estos resultados concuerdan con Cross y cols.,[63] que demostraron que un derivado de WPC puede inhibir la proliferación de linfocitos B y T en respuesta a la estimulación mitogénica. No obstante, no siempre se han justificado estos efectos inmunorreguladores de los WPC sobre la proliferación linfocitaria y otras funciones inmunitarias,[64] posiblemente, por diferencias en el proceso de fabricación y, por lo tanto, en la composición de los WPC.

El efecto modulador de los WPC puede deberse, parcialmente, a mayor eliminación vírica generada por la respuesta inmunitaria innata (células NK), que limitaría el acceso del virus en los grupos WPC y WPC+LF, con la consiguiente reducción de la sensibilización linfocitaria frente al mismo.

WP y diarreas víricas en humanos

También se han publicado algunas evidencias del efecto clínico de la suplementación con lactoferrina bovina sobre la infección por rotavirus y norovirus en niños, observándose una mejoría en la gravedad del cuadro sintomatológico y en la duración del proceso y la incidencia del mismo.[47]

CONCLUSIONES

Desde el momento de su nacimiento, el niño se enfrenta a un gran número de antígenos de la dieta y de la microbiota, y debe desarrollar tolerancia a sus propios componentes; por ello existe una respuesta inmunitaria regulada. Como ejemplo, los propios componentes bioactivos de la leche materna son tolerogénicos, antiinflamatorios y reguladores de la respuesta inmunitaria del lactante. De forma general, las proteínas y péptidos bioactivos del suero lácteo colaboran en la acción defensiva frente a patógenos, a la vez que promueven el propio desarrollo del sistema inmunitario del lactante. Por este motivo, los suplementos de estos componentes son de interés para reforzar la respuesta inmunitaria frente a procesos infecciosos. Así, en estudios preclínicos y clínicos se ha demostrado que la administración de componentes aislados de WP, de productos derivados de WP o de WPC pueden modificar el curso de la gastroenteritis inducida por RV. Debe tenerse en cuenta la importancia de la presencia de estos componentes en las fórmulas infantiles destinadas a lactantes, con el fin de garantizar al máximo la función protectora proporcionada por la leche materna.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS

1. Picciano MF. Human milk: Nutritional aspects of a dynamic food. Biol Neonate. 1998;74:84-93.
2. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. J Nutr. 2005;135:1-4.
3. Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS. Composición de la leche. En: Alais C, eds. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Barcelona: Reverté editores; 2001: 3-9.
4. Kelleher SL, Lönnerdal B. Immunological activities associated with milk. Adv Nutr Res. 2001;10: 39-65.
5. Madureira AR, Tavares T, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. J Dairy Sci. 2010:93:437-455.
6. Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie. 2009;91:19-29.
7. Gill HS, Doull F, Rutherfurd KJ, Cross ML. Immunoregulatory peptides in bovine milk. Br J Nutr. 2000;84:S111-S117.
8. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. Altern Med Rev. 2004;9:136-156.
9. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. Therapy. 2006;3:69-78.
10. Artym J, Zimecki M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. Postepy Hig Med Dosw. 2013;67:800-816.
11. Yalçin AS. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. Curr Pharm Des. 2006;12:1637-1643.
12. Evans J, Zulewska J, Newbold M, Drake MA, Barbano DM. Comparison of composition, sensory, and volatile components of thirty-four percent whey protein and milk serum protein concentrates. J Dairy Sci. 2009;92:4773-4791.
13. Onwulata CI, Konstance RP, Tomasula PM. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. J Dairy Sci. 2004;87:749-756.
14. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. Pediatr Clin North Am. 2001;48:53-67.
15. Nielsen SD, Beverly RL, Qu Y, Dallas DC. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. Food Chem. 2017;232:673-682.
16. Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;1-15.
17. Wada Y, Lönnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins-mechanisms of action. J Nutr Biochem. 2014;25:503-514.
18. Patel S. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. J Food Sci Technol. 2015;52:6847-6858.
19. Lönnerdal B. Infant formula and infant nutrition: Bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. Am J Clin Nutr. 2014;99:712S-717S.
20. Legrand D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. J Pediatr. 2016;173:S10-S15.
21. Walker WA. Development of the intestinal mucosal barrier. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002;34:S33-S39.
22. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, González-Castro A, Franch A, Castell M. Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. Dev Comp Immunol. 2007;31:1264–1277.
23. Pérez-Cano FJ, Castellote C, González-Castro A, Pelegrí C, Castell M, Franch A. Developmental changes in intraepithelial T lymphocytes and NK cells in the small intestine of neonatal rats. Pediatr. Res. 2005;58:885-891.
24. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, Franch A, Castell M. Neonatal immunoglobulin secretion and lymphocyte phenotype in rat small intestine lamina propria. Pediatr Res. 2005;58:164-169.

25. Marín-Gallén S, Pérez-Cano FJ, Castell M, Castellote C, Franch A. Intestinal intraepithelial NK and NKT cell ontogeny in Lewis rats. Dev Comp Immunol. 2008;32:1405-1408.
26. Pérez-Cano FJ, Marín-Gallén S, Castell M, Rodríguez-Palmero M, Rivero M, Franch A, Castellote C. Bovine whey protein concentrate supplementation modulates maturation of immune system in suckling rats. Br J Nutr. 2007;98:S80-S84.
27. Donovan SM. The role of lactoferrin in gastrointestinal and immune development and function: a preclinical perspective. J Pediatr. 2016;173:S16-S28.
28. Todd DJ, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP, Bortell R. An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN-γ and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. J Immunol. 1999;167:3600-3609.
29. Xu LB, Chen L, Gao W, Du KH. Bovine immune colostrum against 17 strains of diarrhea bacteria and *in vitro* and *in vivo* effects of its specific IgG. Vaccine. 2006;24:2131-2140.
30. Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Ligo M, Baba-Toriyama H, Moore MA, y cols. Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. Cancer Lett. 1997;121:211-216.
31. Wang WP, Ligo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. Jpn J Cancer Res. 2000;91:1022-1027.
32. Lönnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009;12:293-297.
33. Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. Biometals. 2010;23:365-376.
34. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. J Nutr. 2009;139:386-393.
35. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1Ra through a NF-kappaB- and MAPK-dependent mechanism. J Nutr. 2010;140:382-391.
36. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. Nat Immunol. 2001;2:997-1003.
37. Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. J Dairy Res. 1995;62:359-368.
38. Florén CH, Chinenye S, Elfstrand L, Hagman C, Ihse I. ColoPlus, a new product based on bovine colostrum, alleviates HIV-associated diarrhoea. Scand J Gastroenterol. 2006;41:682-686.
39. Comstock SS, Reznikov EA, Contractor N, Donovan SM. Dietary bovine lactoferrin alters mucosal and systemic immune cell responses in neonatal piglets. J Nutr. 2014;144:525-532.
40. Liu KY, Comstock SS, Shunk JM, Monaco MH, Donovan SM. Natural killer cell populations and cytotoxic activity in pigs fed mother's milk, formula, or formula supplemented with bovine lactoferrin. Pediatr Res. 2013;74:402-407.
41. Li Q, Hu W, Zhao J, Wang J, Dai Y, Zhao Y, Meng Q, Li N. Supplementation transgenic cow's milk containing recombinant human lactoferrin enhances systematic and intestinal immune responses in piglets. Mol Biol Rep. 2014;41:2119-2128.
42. Manzoni P. Clinical benefits of lactoferrin for infants and children. J Pediatr. 2016;173:S43-S52.
43. Liu B, Newburg DS. Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. Breastfeed Med. 2013;8:354-362.
44. Ng TB, Cheung RC, Wong JH, Wang Y, Ip DT, Wan DC, Xia J. Antiviral activities of whey proteins. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99:6997-7008.
45. Drago-Serrano ME, Campos-Rodríguez R, Carrero JC, de la Garza M. Lactoferrin: Balancing ups and downs of inflammation due to microbial infections. Int J Mol Sci. 2017 18:501.
46. Ramasethu J. Prevention and treatment of neonatal nosocomial infections. Matern Heal Neonatol Perinatol. 2017;3:5.
47. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. J Infect Chemother. 2014;20:666-671.
48. Playford RJ, Macdonald CE, Johnson WS. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. Am J Clin Nutr. 2000;72:5-14.
49. Pan Y, Lee A, Wan J, Cocentry MJ, Michalski WP, Shiell B, Roginski H. Antiviral properties of milk proteins and peptides. Int Dairy J. 2006;16:1252-1261.
50. Ochoa TJ, Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. Biochimie. 2009;91:30-34.
51. Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Rotavirus gastroenteritis. Adv Ther. 2005;476-487.
52. Ciarlet M, Conner ME, Finegold MJ, Estes MK. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. J Virol. 2002;76:41-57.
53. Pérez-Cano FJ, Castell M, Castellote C, Franch A. Characterization of clinical and immune response in a rotavirus diarrhea model in suckling Lewis rats. Pediatr Res. 2007;6:658-663.
54. Rigo-Adrover M, Franch A, Castell M, Castellote C, Pérez-Cano FJ. Whey protein is beneficial for rotavirus- induced diarrhoea in preclinical studies. In: Handbook of dietary and nutritional aspects of bootle feeding. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2014.
55. Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Bovine milk antibodies for health. Br J Nutr. 2000;84:S135-S146.

56. Tawfeek HI, Najim NH, Al-Mashikni S. Efficacy of an infant formula containing anti-*Escherichia coli* colostral antibodies from hyperimmunized cows in preventing diarrhea in infants and children: a field trial. Int J Infect Dis. 2003;7:120-128.
57. Pérez-Cano FJ, Marín-Gallén S, Castell M, Rodríguez-Palmero M, Rivero M, Castellote C, Franch A. Supplementing suckling rats with whey protein concentrate modulates the immune response and ameliorates rat rotavirus-induced diarrhea. J Nutr. 2008;138:2392-2398.
58. Wolber FM, Brommfield AM, Fray L, Cross ML, Dey D. Supplemental dietary whey protein concentrate reduces rotavirus-induced disease symptoms in suckling mice. J Nutr. 2005;135:1470-1474.
59. Bojsen A, Buesa J, Montava R, Kvistgaard AS, Kongsbak MB, Petersen TE, Heegaard CW, Rasmussen JT. Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections *in vitro* and *in vivo*. J Dairy Sci. 2007;90:66-74
60. van Hooijdonk A, Kussendrager KD, Steijns JM. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. Br J Nutr. 2000;84:S127-S134.
61. Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. Cell Mol Life Sci. 2005;62:2576-2587.
62. De Witt JN. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. J Dairy Sci. 1998;81:597-608.
63. Cross M, Gill HS. Modulation of immune function by a modified bovine whey protein concentrate. Immunol Cell Biol. 1999;77:345-350.
64. Wong CW, Seow HF, Husband AJ, Regester GO, Watson DL. Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. Vet Immunol Pathol. 1997;56:85-96.