



PAYS Programa en Alimentos y Salud Humana



Desarrollo de modelo celular de neuroinflamación y modulación por bioactivos derivados de alimentos

Mauro Pérez González

Tutor: [Adrián Aicardo](#)

Co-tutor: [Cecilia Chavarria](#)

Programa de Alimentos y Salud Humana (PAyS), Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelAR. Montevideo, Diciembre de 2023.

ÍNDICE

Resumen	4
Abreviaturas	5
1. Introducción	6
1.1 Impacto del envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas: un desafío para la salud pública y la investigación médica	6
1.2 Neuroinflamación	7
1.3 Microglia: células inmunitarias en el sistema nervioso central	10
1.4 Línea celular BV-2 como modelo de neuroinflamación	13
1.5 Relevancia de la alimentación en las enfermedades neurodegenerativas	14
1.6 Influencia de la alimentación en la microbiota intestinal	18
1.7 Rol de compuestos bioactivos derivados de alimentos en el proceso de envejecimiento cerebral	19
1.8 Urolitinas	21
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo general	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Hipótesis de trabajo	28
4. Materiales y métodos	29
4.1 Cultivos de línea celular BV-2	29
4.1.1 Mantenimiento celular	29
4.1.2 Tratamientos celulares	30
4.1.3 Medios condicionados	31
4.2 Evaluación de la viabilidad celular	32
4.2.1 Toxicidad celular evaluada por MTT	32
4.2.2 Citometría de flujo	33
4.2.3 Análisis de morfología celular por microscopía de fluorescencia	34
4.3 Efectos sobre formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	34
4.3.1 Ensayo de Griess	34
4.3.2 Detección de peroxinitrito mediante fluoresceína boronato	35
4.4. Producción de citoquinas proinflamatorias	36
4.4.1 Extracción de ARN de células BV-2 activadas	36
4.4.2 Retrotranscripción y PCR en tiempo real (q-PCR)	37
4.4.3 Western Blot	38
5. Resultados y discusión	40
5.1.1 Puesta a punto del modelo de activación	40
5.1.2 Evolución temporal de la producción de peroxinitrito a partir de la oxidación de FI-B en células BV-2 activadas	43
5.1.3 Cambio en la morfología celular y expresión de citoquinas proinflamatorias	44
5.2 Efectos de las urolitinas en células BV-2 en condiciones basales	47
5.2.1 Viabilidad de células BV-2 después de la exposición a diferentes concentraciones de urolitinas	47
5.1.2 Ensayo de Griess en células BV-2 tratadas con UA	51
5.3. Efectos de las urolitinas en un contexto inflamatorio	52

5.3.1 Ensayo de Griess en células BV-2 activadas y tratamiento con urolitina A	52
5.3.2 Cambios en la expresión de iNOS inducidos por urolitina A en células BV-2 activadas	53
5.3.3 Modulación de citoquinas proinflamatorias por urolitina A en células BV-2 activadas	55
5.3.4 Efectos de urolitinas sobre células PC12	56
6. Conclusiones y perspectivas	57
7. Bibliografía	59

Agradecimientos

Quiero dedicar un sincero agradecimiento a las personas que han sido fundamentales en mi trayecto académico y personal.

En primer lugar, a mi familia, quienes han sido un pilar constante de apoyo. Su incentivo a mi curiosidad y su aliento incondicional han sido motores esenciales en este camino.

Agradezco a mis amigos por estar siempre presentes, compartiendo risas, desafíos y experiencias inolvidables. Su compañía ha hecho más llevadero los momentos difíciles y ha multiplicado la alegría en los buenos momentos.

A mi novia, le agradezco por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional, los cuales han sido pilares fundamentales para superar obstáculos y seguir adelante.

A mis tutores, Adrian Aicardo y Cecilia Chavarría, merecen un agradecimiento especial. Su dedicación al enseñar, su paciencia y su apoyo constante han sido cruciales en mi formación académica.

Al laboratorio CEINBIO, les agradezco por aceptarme como parte de su equipo. Su disposición para colaborar y su ambiente de trabajo enriquecieron mi experiencia de investigación.

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos de origen multifactorial que llevan a la pérdida neuronal selectiva, representando una problemática de salud intrínseca al proceso de envejecimiento. Este tipo de enfermedades afectan, en diversa medida, la memoria, los pensamientos y las funciones cerebrales, siendo la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson dos de las enfermedades más relevantes a nivel mundial debido al número de personas padecientes y su impacto en los sistemas de salud, lo que repercute en la economía mundial. Adoptar una dieta rica en nutrientes esenciales, como vitaminas, fibra, minerales y ácidos grasos mono y poliinsaturados, no solo promueve la salud general, sino que también ha demostrado ser un factor clave en la prevención de este tipo de enfermedades. De igual forma, los compuestos bioactivos, metabolitos secundarios presentes en reducidas cantidades en los alimentos, poseen funciones que exceden las meramente nutricionales, pudiendo aportar efectos neuroprotectores significativos.

Este proyecto tiene como objetivo el desarrollo y optimización de un modelo celular de neuroinflamación, así como la evaluación de los efectos neuroprotectores de un conjunto de compuestos bioactivos conocidos como urolitinas. La urolitina A demostró mejorar la viabilidad celular al potenciar la actividad de deshidrogenasas y esterasas en condiciones basales. Adicionalmente, se evidenció que este compuesto posee la capacidad de disminuir los niveles de nitrito en células BV-2 en las mismas condiciones. En respuesta a estímulos inflamatorios, la urolitina A, modula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, lo que se traduce en una disminución de los niveles de nitritos, evidenciando la capacidad de este postbiótico para influir en la respuesta inflamatoria. Además, se observa una reducción en los niveles de IL-1 β , respaldando su efecto antiinflamatorio. En el contexto neuroprotector, la urolitina A logró proteger a las células PC12 de la muerte inducida por medios condicionados derivados de células BV-2 activadas.

Palabras clave: neuroinflamación, neurodegeneración, compuestos bioactivos, urolitinas, microglía.

Abreviaturas

Enfermedad de Parkinson (EP)
Enfermedad de Alzheimer (EA)
Organización Mundial de la Salud (OMS)
Elagitaninos (ET)
Ácido elágico (AE)
Urolitina A (UA)
Urolitina B (UB)
Urolitina C (UC)
Urolitina D (UD)
Interleuquina-1beta (IL-1 β)
Interleuquina-6 (IL-6)
Óxido nítrico (\bullet NO)
Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)
Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS)
Superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD)
Especies reactivas del oxígeno (ROS)
Especies reactivas del nitrógeno (RNS)
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Oxígeno (O_2)
Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
Suero bovino fetal (SBF)
Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Nitrito (NO_2^-)
Sonda de boronato de fluoresceína (FI-B)

1. Introducción

1.1 Impacto del envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas: un desafío para la salud pública y la investigación médica

El envejecimiento es un proceso natural que afecta a todos los seres vivos, desencadenando transformaciones progresivas en el organismo a medida que transcurre el tiempo. A lo largo de este proceso, se produce una disminución en la capacidad del cuerpo para reparar y reemplazar células dañadas, lo que resulta en la acumulación de productos de desecho y daño celular (Hung et al., 2010). En los seres humanos, se ha observado que la tasa de división celular y metabolismo disminuye gradualmente después de los 25 años de edad, habiendo alcanzado su punto máximo en esta etapa de la vida. Como consecuencia de este proceso, se generan productos metabólicos y daños celulares que se acumulan en el organismo y desencadenan la manifestación gradual de patologías asociadas con el envejecimiento (Hung et al., 2010). Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos influenciados por diversos factores, como la edad, la predisposición genética y los factores ambientales. Dichas enfermedades se caracterizan por una pérdida neuronal selectiva, constituyendo un problema de salud asociado al envejecimiento (Hung et al., 2010; Love et al., 2008). Entre ellas, se destacan la enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), además de otras patologías como la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Lin & Beal, 2006). El aumento en la incidencia y prevalencia de estas enfermedades ha creado una carga creciente y significativa en los pacientes, sus familias y el sistema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cantidad de personas mayores de 60 años está en constante aumento y se proyecta que para el año 2050 puede alcanzar los 2100 millones, casi dos veces más que en 2015. A su vez, se estima que la cantidad de individuos de 80 años o más aumentará tres veces para el año 2050 en comparación con el 2020, pudiendo llegar a la cifra de 426 millones (Kontis et al., 2017; Partridge et al., 2018; Prince et al., 2015). Debido a esta mejora en la esperanza de vida, se espera un aumento en los próximos años de personas con demencia, los cuales actualmente alcanzan la

cifra de 47,5 millones de personas (Kontis et al., 2017; Partridge et al., 2018; Prince et al., 2015). Estas enfermedades no solo impactan en la calidad de vida de los pacientes, sino que también requieren atención médica y social constante, lo que a su vez genera un gran impacto en la economía y el sistema de atención sanitaria en general (Duggan et al., 2020). Únicamente en Canadá, la tasa neta anual vinculada a pacientes con demencia es aproximadamente 3900 millones de dólares (Ostbye & Crosse, 1994), mientras que en un estudio llevado a cabo en Europa se calculó que el costo total vinculado a trastornos mentales y neurológicos fue de 798000 millones de euros (Olesen et al., 2012).

A pesar de la extensa investigación llevada a cabo durante varias décadas, las enfermedades neurodegenerativas todavía no tienen una cura efectiva. Los esfuerzos de investigación no han logrado encontrar una estrategia eficaz que pueda tratar o prevenir estas enfermedades lo que es una limitación importante para el campo de la neurología. Los tratamientos disponibles actualmente se enfocan en aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida, la movilidad de los pacientes y reducir el dolor, en lugar de abordar las causas subyacentes de las enfermedades (Prince et al., 2015; Smith et al., 2012; Zigmond et al., 2022).

1.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación se refiere a una respuesta inflamatoria que ocurre en el cerebro y la médula espinal, como resultado de diversos factores patológicos, incluyendo infecciones, traumas e isquemia. Esta respuesta inflamatoria es mediada por la producción de distintos mediadores, incluyendo citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas son proteínas secretadas por diversos tipos de células. Las mismas desempeñan un papel fundamental en la comunicación celular y la modulación de la respuesta inmune (Walsh et al., 2014).

Desde el punto de vista estructural, las citoquinas son moléculas de tamaño variable con un peso molecular que oscila entre 8 y 30 kDa, siendo principalmente hidrosolubles. Contrario a las hormonas, las citoquinas no se encuentran almacenadas en forma preformada. En lugar de eso, ejercen su acción principalmente mediante mecanismos paracrinós, actuando en células cercanas.

Además, pueden tener un efecto autocrino al influir en las propias células que las producen (De Oliveira et al., 2011, 2011). Las citoquinas se pueden clasificar en dos categorías: proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citoquinas proinflamatorias se encuentran las interleuquinas (IL) 1, 2, 6, 7 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En contraste, las citoquinas antiinflamatorias, como la IL-4, IL-10, IL-13 y el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β), actúan para regular y contrarrestar la inflamación, ayudando a mantener un equilibrio adecuado en la respuesta inmune (Becher et al., 2017; De Oliveira et al., 2011; Konsman, 2022).

Aunque las células del SNC que secretan estas moléculas mantienen niveles bajos de citoquinas proinflamatorias en condiciones normales, situaciones como infecciones, lesiones y trastornos autoinmunes provocan un notable aumento en la producción local de estas moléculas (Rothwell & Hopkins, 1995). Estos eventos inflamatorios se asocian con enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple (EM), la EA y accidentes cerebrovasculares. La regulación precisa de las citoquinas en el SNC desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune y en la progresión de estas enfermedades (Rothwell & Hopkins, 1995; Steinman, 2008).

Además de las citoquinas, en el contexto neuroinflamatorio también se producen ciertas quimioquinas, moléculas pequeñas y especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células implicadas en este proceso son principalmente la microglía y los astrocitos, células residentes en el SNC. Sin embargo, también participan células endoteliales y células inmunitarias procedentes de la periferia (Figura 1) (DiSabato et al., 2016).

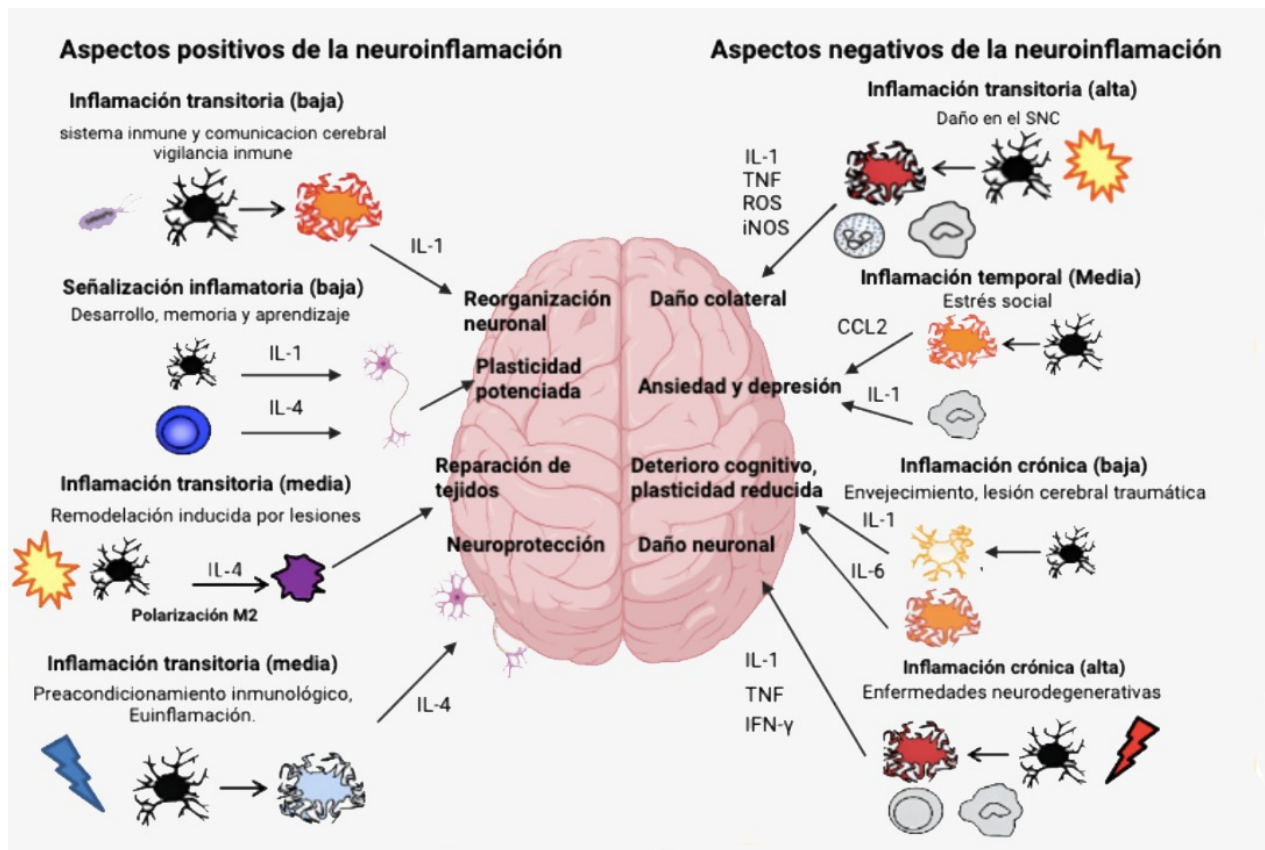


Figura 1. Doble cara de la neuroinflamación: desencadenantes y efectos en el entorno neuronal. Figura extraída y modificada de DiSabato et al. (2016).

Como se ilustra en la Figura 1, la intensidad y la duración de la inflamación son factores determinantes para establecer si las señales inmunitarias resultan beneficiosas o perjudiciales para el SNC. La neuroinflamación puede tener diversas consecuencias, tanto positivas como negativas. Por un lado, puede desencadenar respuestas inmunológicas y fisiológicas necesarias para la defensa y reparación del tejido cerebral, pero, en ciertos contextos, la neuroinflamación puede llevar a disfunción sináptica, muerte neuronal y alteraciones en la neurogénesis (DiSabato et al., 2016). La inflamación crónica e incontrolada se caracteriza por una mayor producción de citoquinas proinflamatorias (e.g. IL-1 y TNF), ROS y otros marcadores de respuesta inflamatoria. Estos marcadores son evidentes después de un traumatismo en el SNC y se acompañan de un importante reclutamiento y tráfico de macrófagos y neutrófilos periféricos al sitio de la lesión (DiSabato et al., 2016). A su vez, diversos estudios respaldan que citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β y el TNF- α , tienen la capacidad de inducir la pérdida sináptica y la muerte neuronal

(Brabers & Nottet, 2006; Cavanagh et al., 2011; DiSabato et al., 2016; Ferguson et al., 2008; Rizzo et al., 2018). Es crucial destacar que la neuroinflamación crónica se considera un factor esencial en el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas, como se ha evidenciado en investigaciones previas (Hong et al., 2016; Micheau & Tschopp, 2003). Además, el sistema del complemento puede colaborar en la pérdida inapropiada de terminales sinápticas y desencadenar una eliminación inapropiada de sinapsis (Kanmogne & Klein, 2021).

En conclusión, la neuroinflamación representa una respuesta inflamatoria crónica del SNC mediada por diversas sustancias, incluyendo citoquinas como la IL-1 β , IL-6, IL-18 y el TNF- α . Esta respuesta conlleva consecuencias tanto beneficiosas como perjudiciales, donde su intensidad y duración están influenciadas por la naturaleza de los estímulos desencadenantes. Por ende, profundizar en la comprensión de los mecanismos y las vías de regulación de los fenómenos de neuroinflamación en el SNC, permitirá una evaluación más precisa de la conexión entre las noxas cerebrales y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (DiSabato et al., 2016).

1.3 Microglia: células inmunitarias en el sistema nervioso central

La microglia son células inmunes residentes del SNC. Tienen su origen en el saco vitelino, derivando de células progenitoras eritropoyéticas. Posteriormente, se desplazan hacia el cerebro, distribuyéndose ampliamente por todo el tejido cerebral. Constituyen aproximadamente del 5 al 10% de todas las células presentes en el SNC adulto, mostrando una mayor densidad en la sustancia blanca en comparación con la sustancia gris (Ginhoux et al., 2013; Zhang & Jiang, 2015). La microglía desempeña un papel crucial en la respuesta inicial de defensa contra patógenos y ante el daño celular o tisular. Además de su función en el entorno neuronal, donde actúa como una especie de "vigilante" del sistema nervioso, estas células participan de manera activa en su desarrollo y mantenimiento (Ginhoux et al., 2013; Lehnardt, 2010). Cuando el cerebro sufre lesiones o enfermedades, la microglía en estado de reposo se polariza y experimenta cambios tanto en su morfología como en su funcionamiento, proceso que a menudo se describe como activación microglial.

como interleuquinas y quimioquinas que participan en la comunicación celular y en la regulación de las respuestas inflamatorias y neuroprotectoras (Graeber, 2010). Sin embargo, de manera similar a lo que ocurre con la activación crónica del sistema inmune, la activación prolongada de la microglía puede tener consecuencias perjudiciales para las neuronas. Se ha observado que la liberación constante de moléculas potencialmente citotóxicas por parte de la microglia, principalmente del tipo M1, puede causar daño neuronal (Jha et al., 2016; Song & Suk, 2017). Esta activación persistente y generalizada desencadena y mantiene un estado proinflamatorio en el sistema nervioso, contribuyendo así a la neurodegeneración. Este proceso está mediado por la liberación de diversas moléculas, incluyendo especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno, así como varias quimioquinas y citoquinas, entre ellas, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-10 y TNF- α (Figura 3) (Cheng et al., 2021; Hughes, 2012; Song & Suk, 2017).

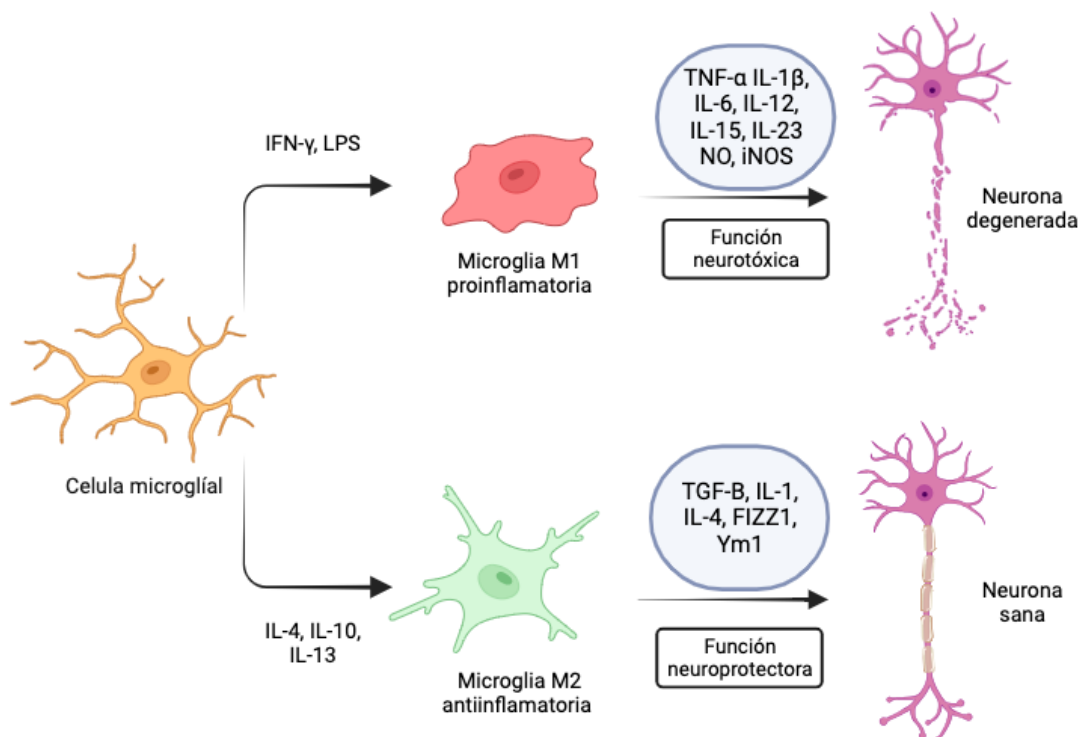


Figura 3. Diferenciación de células microgliales en distintos fenotipos. Figura adaptada de Darwish et al, (2023).

Es importante destacar que existen mediadores específicos involucrados en la respuesta inflamatoria y la activación del sistema inmunológico. En este contexto,

la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) emerge como un componente crucial en la respuesta inflamatoria. Esta enzima, activada específicamente en condiciones inflamatorias, desempeña un papel fundamental en la generación de óxido nítrico (\bullet NO) a partir de L-arginina (Cinelli et al., 2020). Su expresión, desencadenada por estímulos inflamatorios como la presencia de citoquinas proinflamatorias y lipopolisacárido (LPS), revela una conexión directa entre la activación inmunológica y la producción de \bullet NO. Dicha enzima ha sido identificada en diversos tipos celulares, tales como células del sistema inmunológico, por ejemplo, macrófagos y monocitos, así como células del sistema nervioso, incluyendo neuronas y células gliales como astrocitos y microglía (D'Acquisto et al., 1998; Feinstein et al., 1999; Kim et al., 1998; Kong et al., 1996; Rao, 2000). También se ha observado su expresión en células del músculo esquelético, células renales, células epiteliales y otras, evidenciando su presencia en una variedad de contextos celulares, particularmente en situaciones de inflamación e inmunorregulación (D'Acquisto et al., 1998; Feinstein et al., 1999; Kim et al., 1998; Kong et al., 1996; Rao, 2000). Si bien la iNOS desempeña un papel esencial en algunos mecanismos fisiológicos (e.g. defensa contra patógenos), su sobreexpresión o falta de regulación están asociadas con diversas enfermedades, entre ellas, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Haas et al., 2002; Koppula et al., 2012; Vannini et al., 2015). Esta interacción entre la polarización de la microglía y la participación de mediadores como la iNOS subraya la complejidad de las respuestas inflamatorias en el sistema nervioso, lo cual tiene implicaciones significativas en la salud neuronal y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

1.4 Línea celular BV-2 como modelo de neuroinflamación

Las células BV-2 son una valiosa línea celular de microglía murina inmortalizada que ha sido ampliamente utilizada en la investigación (Y. Qin et al., 2021). Estas células exhiben características funcionales similares a la microglía primaria, lo que las convierte en un sistema experimental valioso para investigar los mecanismos subyacentes de la neuroinflamación (Y. Qin et al., 2021; Wu et al., 2006). Dentro del ámbito de los estudios de neurodegeneración, se ha observado que las células BV-2, al igual que las microglía primarias, exhiben una expresión

funcional de la enzima NADPH oxidasa 2. Esta enzima desempeña un papel crucial en el daño neuronal inducido por la activación de la microglía, destacando aún más la relevancia de la línea celular BV-2 como modelo experimental para investigar los mecanismos subyacentes de la neuroinflamación (Wu et al., 2006). El estudio de Henn et al. (2009) reveló un hallazgo que establece un nexo entre las células BV-2 y la microglía primaria. Se observó que el 90% de los genes inducidos por el LPS en células BV-2 también estaban presentes en la microglía primaria, generando un patrón similar de inflamación (Henn et al., 2009). En este contexto, es importante considerar el entorno inflamatorio y las interacciones con otras células del sistema inmunológico al investigar la función y la respuesta de la microglía en las enfermedades neurodegenerativas. En tal sentido, resulta relevante mencionar que las células BV-2 han demostrado la capacidad de desencadenar una respuesta inflamatoria en astrocitos al ser estimuladas con LPS. Este hallazgo guarda relación con el papel de la microglía primaria en la promoción de un fenotipo inflamatorio en astrocitos en condiciones *in vivo*, lo que respalda aún más la validez de las células BV-2 como un modelo experimental relevante para investigar los mecanismos involucrados en la neuroinflamación (Falsig et al., 2006; Henn et al., 2009; Timmerman et al., 2018).

1.5 Relevancia de la alimentación en las enfermedades neurodegenerativas

Estudios previos han demostrado que ciertos hábitos de vida pueden estar asociados con un enlentecimiento del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Se ha observado que adoptar una dieta saludable, realizar actividad física regularmente, evitar fumar, reducir el consumo de alcohol y mantener un índice de masa corporal saludable puede contribuir significativamente a postergar el proceso de envejecimiento cerebral entre 2 a 5,8 años (Dumas, 2017; Everitt et al., 2006; Pan et al., 2023).

A su vez, se ha establecido una correlación entre la adhesión a un estilo de vida más saludable y una disminución en el nivel de marcadores estructurales

cerebrales relacionados con la neurodegeneración en individuos de mediana y mayor edad (Pan et al., 2023).

Un patrón de alimentación paradigmático de esta correlación positiva es el que sigue los principios de la dieta mediterránea, destacada por su elevado consumo de vegetales, frutas, leguminosas, pan y otros cereales con bajo refinamiento, frutos secos y semillas, así como un alto consumo de aceite de oliva. Por otra parte, presenta un bajo consumo de carnes rojas, siendo los pescados grasos la fuente principal de proteína. Los alimentos que integran este patrón alimenticio son ricos en componentes bioactivos, vitaminas, minerales y fibra (Hernández et al., 2018; Tosti et al., 2018).

Este tipo de alimentación ha sido respaldada por diversos estudios que abarcan poblaciones tanto europeas como estadounidenses, demostrando su impacto positivo en la salud cardiovascular. A su vez, la evidencia confirma que una mayor adherencia a este patrón alimenticio se asocia sistemáticamente con una reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y una mejora en la longevidad (Buckland et al., 2009; de Lorgeril et al., 1994, 1999; Knoops et al., 2004; Martínez-González et al., 2011; Trichopoulou et al., 2003). Además, se ha observado una asociación inversa entre la adherencia a la dieta mediterránea y el riesgo de obesidad (Beunza et al., 2010; Panagiotakos et al., 2006; Schröder et al., 2004).

Sumado a eso, adoptar una dieta mediterránea se vincula con la prevención de diversos tipos de cánceres, mostrando que podría reducir aproximadamente el 25% de los cánceres colorrectales, entre el 15% y el 20% de los cánceres de mama, y del 10% al 15% de los tumores de próstata, endometrio y páncreas (Trichopoulou et al., 2000). Asimismo, la dieta mediterránea se asocia con mejoras cognitivas y un menor riesgo de demencia. Se postula que estos beneficios están relacionados con componentes específicos de la dieta, como los ácidos grasos omega-3 y compuestos bioactivos, que pueden inhibir la neuroinflamación asociada con enfermedades neurodegenerativas. La amplitud de estos beneficios posiciona a la dieta mediterránea como un enfoque integral para la promoción de la salud en diversos aspectos (Berding et al., 2021; Loughrey et al., 2017).

La dieta DASH, cuyas siglas corresponden a "Dietary Approaches to Stop Hypertension" (Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión), ha emergido como un enfoque integral para reducir la presión arterial y promover la salud cardiovascular (Hinderliter et al., 2011). En contraste con la tradicional atención

centrada en nutrientes específicos, la dieta DASH se enfoca en patrones alimenticios saludables que han demostrado beneficios para disminuir la presión arterial. Este enfoque dietético se caracteriza por su énfasis en la inclusión de frutas, verduras, productos lácteos bajos en grasa, cereales integrales, aves, pescado y nueces. Simultáneamente, busca minimizar el consumo de carnes rojas y bebidas azucaradas (Hinderliter et al., 2011). Aunque no se identifica un nutriente específico clave para reducir la presión arterial, la dieta DASH destaca por ser rica en potasio, magnesio, calcio y fibra, mientras mantiene bajos niveles de grasas saturadas. Su impacto positivo se ha observado en diversos grupos de población, independientemente de la edad, el género o el nivel de actividad física, consolidándose como una opción accesible y efectiva para quienes buscan mejorar su salud cardiovascular y disminuir la presión arterial (Svetkey et al., 1999).

La dieta MIND, acrónimo de Mediterranean-DASH Diet Intervention for Neurodegenerative Delay, representa una fusión de los patrones alimenticios mediterráneo y DASH, con ajustes específicos respaldados por evidencias científicas para favorecer la salud cognitiva y reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (Barnes et al., 2023; Devranis et al., 2023; Koch & Jensen, 2016; Morris, Tangney, Wang, Sacks, Barnes, et al., 2015; Morris, Tangney, Wang, Sacks, Bennett, et al., 2015). Este enfoque dietético pone énfasis en el aumento de alimentos vegetales, en particular hortalizas de hojas verdes, bayas, cereales integrales, pescado, aceite de oliva y vino, mientras limita el consumo de alimentos de origen animal y aquellos ricos en grasas saturadas (Kang et al., 2005; Kheirouri & Alizadeh, 2022; Morris, Tangney, Wang, Sacks, Bennett, et al., 2015). En el estudio transversal de Salari-Moghaddam et al. (2019) sobre la dieta MIND, se exploró la asociación entre la adherencia a esta dieta y los trastornos psicológicos. Se encontró que una mayor adherencia a la dieta MIND se asocia significativamente con menores probabilidades de depresión y angustia psicológica. Sin embargo, esta relación se observó solamente en mujeres (Salari-Moghaddam et al., 2019).

En el estudio de Berendsen et al. (2018) que contó con la participación de 16.058 mujeres mayores, encontraron una asociación lineal entre la adherencia a la dieta MIND y mayores puntuaciones de memoria verbal. Sin embargo, esta relación no se observó en términos de una mejora en la cognición global (Berendsen et al., 2018). Por otra parte, en el estudio de Cherian et al. (2019) que incluyó a 106

adultos mayores, se demostró que una mayor adherencia a la dieta MIND se vincula con una ralentización en la tasa de deterioro cognitivo global, así como con mejoras en la memoria semántica y la velocidad de percepción (Cherian et al., 2019).

De igual manera, en el estudio prospectivo de Munoz-Garcia et al. (2019) realizado con 806 adultos mayores sin deterioro cognitivo inicial encontraron que una mayor adherencia a la dieta MIND se asocia con mejoras en la función cognitiva después de 6 años de seguimiento (Munoz-Garcia et al., 2019).

La dieta paleo, conocida también como la dieta de la Edad de Piedra, se fundamenta en el consumo de alimentos que eran comunes durante el Paleolítico, entre 2,5 y 0,01 millones de años antes del presente (Jönsson et al., 2009). La dieta paleo abarca una amplia gama de alimentos, como frutas, verduras, carne, pescado, nueces y huevos, mientras que excluye cereales, legumbres, productos lácteos, azúcar, sal y alimentos procesados (Blomquist et al., 2018; Manousou et al., 2018; Otten et al., 2019). Además, estudios han indicado que la dieta paleo tiende a ser más saciante por caloría en comparación con la dieta mediterránea (Jönsson et al., 2010; Lindeberg et al., 2007).

A su vez, la adherencia a esta dieta demostró reducir los niveles de triacilglicerol, la presión arterial diastólica, así como el peso, el IMC y la circunferencia de cintura en comparación con una dieta diseñada para la diabetes, centrada en una mayor ingesta de verduras, frutas, tubérculos, fibra dietética, pan integral y otros productos de cereales integrales (Jönsson et al., 2009).

Aunque existen diversas dietas, todas comparten un denominador común, promover una alimentación equilibrada y basada en alimentos naturales. Los productos naturales, como los compuestos bioactivos presentes en ciertos alimentos de origen vegetal, han demostrado tener la capacidad de modular la polarización de la microglía hacia los fenotipos M1 y M2, lo que puede ser beneficioso en el tratamiento y la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Capiralla et al., 2012; X. Jin et al., 2019). La investigación en el campo de la nutrición respalda la idea de que la elección consciente de alimentos puede tener un impacto significativo en la salud a largo plazo. Estas estrategias alimenticias van más allá de la simple restricción calórica o la eliminación de grupos alimenticios, centrándose en la calidad nutricional para promover la salud y prevenir diversas condiciones médicas.

1.6 Influencia de la alimentación en la microbiota intestinal

La interconexión entre la microbiota y el cerebro es un campo de estudio que revela la complejidad de la comunicación entre estos dos sistemas aparentemente separados. Diversas vías, como el sistema inmunológico, el metabolismo del triptófano, el nervio vago y el sistema nervioso entérico, participan en este diálogo. En este sentido, metabolitos microbianos, entre los que se incluyen ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos de cadena ramificada y peptidoglicanos, desempeñan un papel clave y pueden modificar diversos aspectos de la salud y el bienestar de los individuos (Cryan et al., 2019). Conforme avanzamos en el proceso de envejecimiento, se evidencia una disminución significativa en la diversidad microbiana, sugiriendo que el impacto de los microorganismos en nuestro organismo es dinámico y puede experimentar transformaciones notables con el tiempo (Cryan et al., 2019). En tal sentido, se ha demostrado que llevar una alimentación variada, rica en vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos mono y poliinsaturados, tiene la capacidad de regular la proliferación de ciertas bacterias en la microbiota intestinal afectando directamente el cerebro y el comportamiento (Sanchez-Morate et al., 2020; Turnbaugh et al., 2008). Este patrón alimenticio fomenta el aumento de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, al mismo tiempo que disminuye la proliferación de patógenos, contribuyendo así a una microbiota más diversa y asociada con una mejor salud en individuos de edad avanzada (Sanchez-Morate et al., 2020).

Por otro lado, se ha observado que mantener una dieta alta en ácidos grasos saturados genera un aumento en la proliferación de *Firmicutes* y *Proteobacterias*, al mismo tiempo que disminuye la presencia de *Bacteroides* en la microbiota intestinal. Este desequilibrio en la composición bacteriana se ha relacionado con condiciones de salud adversas, como la obesidad, arteriosclerosis, hipertensión arterial y otras patologías (Sanchez-Morate et al., 2020).

En el estudio de Servick, K. (2018) se observó la presencia de bacterias en los vasos sanguíneos cerebrales a través de micrografías de cerebros humanos (Servick, K, 2018). Estas bacterias, junto con las toxinas provenientes del intestino, podrían comprometer la integridad de la barrera hematoencefálica, lo que a su vez

podría contribuir al inicio temprano de procesos inflamatorios al estimular las células microgliales (Kowalski & Mulak, 2019; Pistollato et al., 2018).

En resumen, la alimentación desempeña un papel destacado en la interacción entre la microbiota y el cerebro, influenciando no solo la salud intestinal sino también la función cerebral y el comportamiento (Marlow et al., 2013; Mitsou et al., 2017). Adoptar una dieta variada y equilibrada, rica en nutrientes esenciales, se presenta como una estrategia crucial para mantener la diversidad microbiana y promover una microbiota beneficiosa a lo largo del envejecimiento (Cryan et al., 2019).

1.7 Rol de compuestos bioactivos derivados de alimentos en el proceso de envejecimiento cerebral

Los compuestos bioactivos, son metabolitos secundarios presentes en reducidas cantidades en los alimentos que poseen funciones que exceden las meramente nutricionales, pudiendo aportar significativos beneficios a la salud (Barabási et al., 2020; Teodoro, 2019). Los polifenoles son una variedad de compuestos bioactivos que contienen anillos fenólicos en su estructura. Estos se dividen en cuatro subclases, cada una exhibiendo una estructura química única que define sus propiedades bioactivas y su distribución en distintos alimentos de origen vegetal. Estas subclases son: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Todos ellos tienen propiedades bioactivas las cuales han sido investigadas por sus posibles efectos beneficiosos para la salud (Pandey & Rizvi, 2009). La evidencia acumulada indica que incorporar alimentos con alto contenido de polifenoles, tales como frutas, verduras y cereales integrales, puede disminuir el riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica y otros trastornos degenerativos. Además, se ha comprobado que el consumo de dietas ricas en estos compuestos puede mejorar ciertas funciones cognitivas en adultos mayores, en particular en lo que se refiere al aprendizaje de nuevas actividades y la memoria (Milner, 1994; Scalbert et al., 2005; Witte et al., 2014).

Se ha demostrado que los compuestos presentes en los extractos de té verde y blanco poseen la capacidad de inhibir la acetilcolinesterasa, sugiriendo así su potencial en el tratamiento de trastornos asociados con el envejecimiento, como la EA. Además, estos polifenoles mostraron cierta protección en neuronas corticales primarias de ratas, ofreciendo defensa contra la citotoxicidad inducida por la proteína beta-amiloide ($A\beta$) (Okello et al., 2012; X.-Y. Qin et al., 2012).

De igual forma, el resveratrol, un polifenol que se encuentra en abundancia en las uvas, ha demostrado inhibir la formación de fibrillas del péptido $A\beta$ y actuar contra la neurotoxicidad inducida por $A\beta$, la cual se logra mediante la inhibición de la iNOS (Feng et al., 2009; T.-C. Huang et al., 2011). Además, estudios en cultivos celulares han demostrado que el resveratrol aparte de modular los ARNm de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de TNF- α relacionados a procesos inflamatorios, confiere neuroprotección al activar la proteína SIRT1. Esta proteína, perteneciente a la familia de las sirtuinas, ha sido asociada con diversos procesos celulares, incluida la regulación del envejecimiento y la respuesta a situaciones de estrés. En base a esto, el resveratrol podría desempeñar un papel importante en la protección neuronal y potencialmente contribuir a la prevención de trastornos neurodegenerativos (Ho et al., 2010; F. Jin et al., 2008; Shindler et al., 2010). Se ha demostrado que el pterostilbeno, un derivado del resveratrol, puede influir en la regulación de la expresión del receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR- α), una familia de proteínas que actúan como factores de transcripción en el núcleo celular. En este contexto, el pterostilbeno ha demostrado tener un efecto significativo al ejercer una regulación negativa y normalizar la expresión de PPAR- α disminuyendo la neuroinflamación (Chang et al., 2012).

La flavanona liquiritigenina presente en la planta de regaliz, ha demostrado mejorar la memoria en ratones Tg2576 utilizados para estudios de EA. Este beneficio se atribuye a su capacidad para atenuar la astrocitosis y reducir la expresión de Notch-2, un factor que puede contribuir al declive neuronal (Liu et al., 2011).

Por otro lado, la isoflavona de soja demostró tener propiedades prometedoras al revertir el deterioro de la memoria en ratas. Este efecto beneficioso se atribuye a la capacidad de la isoflavona para reducir la expresión de NF κ B, un factor de transcripción implicado en procesos inflamatorios y degenerativos (Ding et al., 2011).

A su vez, las flavonas, como crisina, apigenina y luteolina, han demostrado regular positivamente importantes factores de transcripción de la vía ERK/Nrf2, una red de señalización intracelular, que desempeña un papel crucial en la respuesta celular al estrés oxidativo. Entre estos factores se encuentran la enzima glutamato cisteína ligasa (GCLC), y la subunidad modificadora de glutamato-cisteína ligasa (GCLM). Esta regulación positiva ejercida por las flavonas contribuye a combatir el estrés oxidativo (C.-S. Huang et al., 2013).

Estos son solo algunos ejemplos de los numerosos compuestos bioactivos presentes en los alimentos. Desde polifenoles y flavonoides hasta carotenoides, esta diversidad de sustancias naturales han demostrado su capacidad para actuar en diversos procesos celulares.

1.8 Urolitinas

Los elagitaninos (ET) son compuestos complejos que contienen uno o más restos de ácido hexahidroxidifénico (HHDP) esterificados a un poliol, como la glucosa. Este ácido, a su vez, puede experimentar una lactonización espontánea, formando ácido elágico (AE) como producto final (Al-Harbi et al., 2021). El AE es un compuesto presente en diversas frutas, como las frutillas, frambuesas, granadas, arándanos y nueces, así como en algunas verduras y legumbres. Su estructura química se indica en la Figura 4 (Arts & Hollman, 2005; Heber, 2008; N. P. Seeram et al., 2004; N. P. Seeram, 2008).

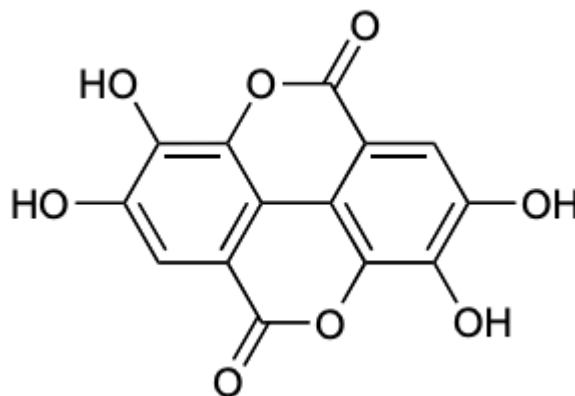


Figura 4. Ácido elágico, producido a partir de la hidrólisis de los elagitaninos. Figura extraída y modificada de Espín et al. (2013).

La estructura química de los ET produce un impacto significativo en su actividad biológica y reactividad química. Su complejidad estructural y tendencia a la hidrólisis son factores críticos que afectan su impacto en la salud (Klimczak & Król, 2010). Se ha evidenciado que tanto el AE como los ET no solo poseen la capacidad de mejorar la función celular en diversos órganos y sistemas del cuerpo, sino que también pueden ejercer un impacto beneficioso en la salud en general (Heber, 2008; Larrosa, García-Conesa, et al., 2010; Scalbert et al., 2005; D. H. Seeram Risa N. Schulman, Navindra P., 2006).

Varios estudios en modelos animales han demostrado que el AE y los ET pueden tener efectos antioxidantes debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilo en posición *orto* lo que les confiere la capacidad para donar átomos de hidrógeno y estabilizar electrones desapareados (Gil et al., 2000; Nicoli et al., 1999). Además, se ha observado que estos compuestos pueden modular positivamente la expresión de enzimas antioxidantes, proporcionando así una defensa adicional contra el estrés oxidativo en sistemas biológicos (Balsano & Alisi, 2009; Kähkönen et al., 2012; Vattem & Shetty, 2005; Wojciechowska & Kujawska, 2023). Por otra parte, se ha observado que estos compuestos poseen efectos antiinflamatorios, lo que podría ayudar a prevenir enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (BenSaad et al., 2017; Javaid et al., 2021; Karlsson et al., 2010; Kwok et al., 2023; Larrosa, González-Sarrías, et al., 2010; N. P. Seeram et al., 2007; Whitley et al., 2003).

Además de sus probables efectos directos antes mencionados, el AE puede ser metabolizado por algunas bacterias intestinales dando lugar a compuestos secundarios conocidos como urolitinas, derivados de la dibenzopiran-6-ona (Cerdá et al., 2005). Contrariamente a los ET, las urolitinas tienen la capacidad de ser absorbidas. Además se ha demostrado que estos compuestos bioactivos tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, propiedad que ha despertado el interés en investigar los efectos de estas moléculas a nivel del SNC (Gasperotti et al., 2015; Yuan et al., 2016).

El proceso metabólico de los ET hacia las urolitinas comienza tras la ingesta de alimentos ricos en ET. Estos compuestos experimentan la hidrólisis en el

estómago, convirtiéndose en AE. Posteriormente, la microbiota intestinal inicia el proceso de descarboxilación y deshidroxilación del AE, generando distintos tipos de urolitinas. Entre ellas, destacan la urolitina A (UA), urolitina B (UB), urolitina C (UC) y urolitina D (UD), las cuales varían en la posición y cantidad de grupos hidroxilo (-OH) presentes en sus estructuras (Figura 5) (Espín et al., 2013; García-Villalba et al., 2019; Zhao et al., 2015).

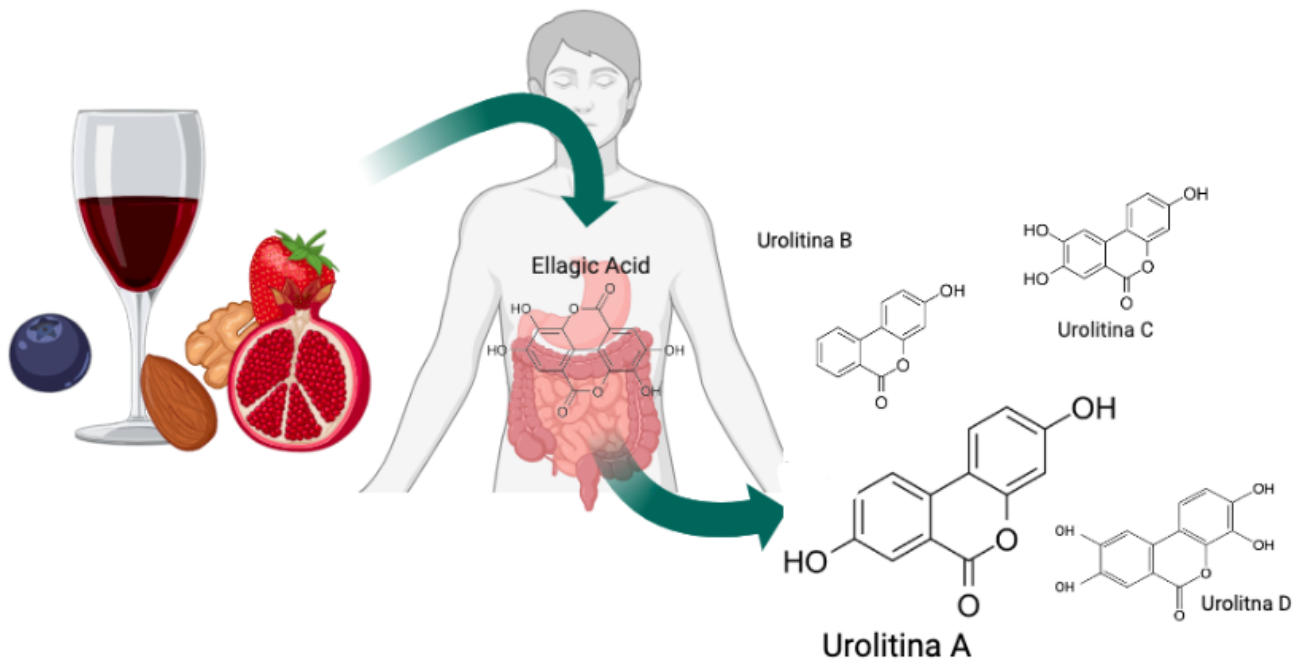


Figura 5. Esquema de la metabolización del ácido elálgico y estructura de los diferentes tipos de urolitinas. Diseñada en *BioRender*.

La conversión de los ET y el AE en urolitinas depende de la microbiota intestinal de cada persona, siendo la UA el principal metabolito encontrado en la orina. Sin embargo, se han observado casos en los que también se excretan otros metabolitos como la UB e isourolitina A (IUA). La presencia de diferentes urolitinas en la orina sugiere variabilidad en la capacidad de metabolización entre individuos destacando la importancia de la microbiota intestinal en este proceso (Tomás-Barberán et al., 2014; V. Selma et al., 2014).

La serie de descarboxilaciones que da lugar a los diferentes tipos de urolitina comienza con la formación de la urolitina M-5, un metabolito que surge tras la apertura y descarboxilación de uno de los anillos lactona del ácido elálgico. Tras esta etapa inicial, se desencadena un proceso metabólico complejo que conduce a

la generación de diversos derivados. De la urolitina M-5 se originan isómeros de tetrahidroxi-urolitina, entre los cuales se destacan la urolitina D y la urolitina M-6, mediante la eliminación de un grupo hidroxilo de distintas posiciones. Posteriormente, se inicia la fase de formación de trihidroxiurolitinas, representadas por la urolitina C y la urolitina M-7, tras la eliminación de un segundo hidroxilo. Este proceso continúa con la producción de dihidroxiurolitinas, entre las cuales se incluyen la urolitina A e isourolitina A, que resultan de la eliminación de un tercer hidroxilo. Por último, la iso-urolitina A da origen a la urolitina B, que se caracteriza por tener un solo grupo hidroxilo (Espín et al., 2013). Este proceso se esquematiza en la Figura 6.

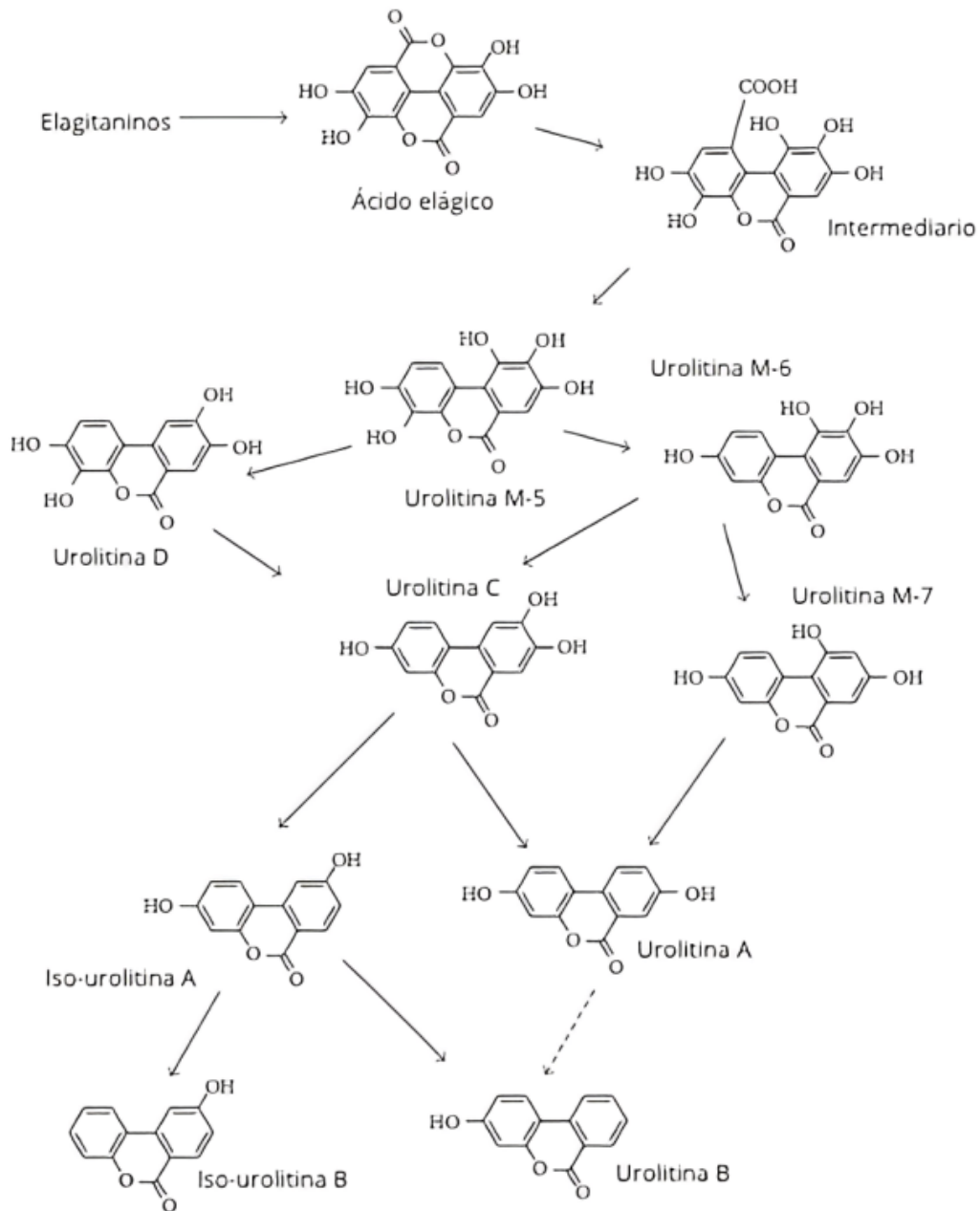


Figura 6. Proceso metabólico de los elagitaninos y el ácido elálgico en urolitinas. Imagen modificada de Espín et al. (2013).

La investigación sobre las urolitinas ha despertado un gran interés debido a sus prometedoras propiedades. Estos compuestos, una vez absorbidos, tienen la capacidad de llegar a diferentes partes del cuerpo, donde desempeñan diversas funciones biológicas. Entre estas funciones, destacan su potencial como agentes antiobesidad, antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos (Abdulrahman et al., 2020; Piwowarski et al., 2017; Zhao et al., 2015).

Se ha planteado la posibilidad de clasificar a las urolitinas como postbióticos, siguiendo la definición debatida recientemente por la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP). En este contexto, un postbiótico se define como una preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confiere un beneficio para la salud del huésped. Este término se ajusta adecuadamente a sustancias derivadas después de que los microorganismos ya no están vivos, es decir, inanimadas, muertas o inactivadas. Los microbios que conforman un postbiótico pueden ser células inanimadas, células intactas o fragmentos estructurales de microorganismos. En el caso de las urolitinas, una vez generadas por la microbiota intestinal a partir de ET, podrían considerarse postbióticos al proporcionar beneficios para la salud, como se ha observado en alguno de los estudios mencionados a continuación (Salminen et al., 2021; Vinderola et al., 2022; Yelin et al., 2019).

En el estudio de Abdulrahman et al. (2020) se indagó sobre los efectos de la UA y UB en un modelo de obesidad en ratas con una dieta alta en grasas. Se encontró que, tanto UA como UB, lograron reducir el peso corporal y el tejido adiposo visceral, además de disminuir la expresión de genes relacionados con la lipogénesis, como SREBP1c y LXR α . Por su parte, se observó un aumento en la expresión de PPAR α , provocando una mayor oxidación de ácidos grasos, lo que sugiere su potencial para combatir la obesidad (Abdulrahman et al., 2020).

En estudios *in vitro*, se ha comprobado que los efectos antitumorales de las urolitinas se deben a su capacidad de inhibir la proliferación celular. Estos experimentos demuestran que las urolitinas bloquean la progresión del ciclo celular y promueven la apoptosis en células tumorales. Además, se ha observado que estos componentes modifican moléculas de señalización clave, como p53 y cMYC, las cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular (Cho., 2015; Lv et al., 2019).

A su vez, se ha observado que estos compuestos bioactivos presentan efectos antiinflamatorios importantes al reducir la expresión de mediadores que intervienen en la regulación de la inflamación, tales como el TNF- α , MCP-1 y diversas interleuquinas, como la IL-1 β , IL-6, IL-8, entre otras (Boakye et al., 2018; Cásedas et al., 2020).

En el estudio de Ryu et al. (2016) se logró caracterizar biológicamente los efectos de las urolitinas utilizando el organismo modelo *C. elegans*. Se evidenció que una dieta enriquecida con distintas urolitinas a lo largo de la vida prolonga significativamente la supervivencia de *C. elegans* en comparación con el grupo control. El aumento en la longevidad fue de 45,4% con UA, 36,6% con UB, 36,0% con UC y 19,0% con UD, y esto fue atribuido al incremento de la mitofagia (Ryu et al., 2016). La mitofagia es un proceso de eliminación selectiva de mitocondrias dañadas la cual se ve comprometida durante el envejecimiento y en enfermedades, como el Parkinson y el Alzheimer (Kerr et al., 2017; Malpartida et al., 2021).

En el modelo de ratón transgénico APP/PS1, la UA logró mejorar el deterioro cognitivo, prevenir la apoptosis neuronal y promover la neurogénesis (Gong et al., 2019). En un modelo que emplea células N2a diferenciadas y cultivos primarios de neuronas, se evidenció una mejora sustancial en la evaluación del déficit neurológico en las células expuestas a la UA. Asimismo, se observó que este compuesto bioactivo ejerció un efecto significativo en la mitigación de la lesión neuronal isquémica (Ahsan et al., 2019).

Estas evidencias resaltan los diversos efectos probados de las urolitinas, subrayando la necesidad de profundizar en el estudio de la neuroprotección, que hasta ahora no ha sido suficientemente explorado.

En el marco de este proyecto, se realizó una investigación con células de microglía de la línea BV-2. El propósito principal fue emplear un modelo celular, que sea fácil de manipular y tenga relevancia para la investigación biomédica. Dicho modelo ha sido previamente utilizado con éxito en investigaciones similares lo que respalda su eficacia y su potencial para obtener resultados significativos (DaSilva et al., 2019; Toney et al., 2021; Xu et al., 2018).

Al utilizar células de microglía, pudimos explorar la respuesta inflamatoria y los cambios asociados en estas células en presencia de compuestos bioactivos, con especial énfasis en las urolitinas. Esto nos permitió avanzar en el conocimiento de cómo las urolitinas pueden modular la respuesta inmunitaria en el sistema nervioso y su potencial como agentes terapéuticos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto consiste en desarrollar y caracterizar un modelo celular que permita estudiar los efectos neuroprotectores de componentes bioactivos provenientes de alimentos, con énfasis en el estudio de urolitinas.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos consisten en:

1. Implementar y caracterizar cultivos de microglía BV-2, estableciendo las condiciones óptimas para su activación.
2. Evaluar los efectos de las urolitinas sobre la línea celular BV-2 en condiciones basales.
3. Estudiar los efectos neuroprotectores de las urolitinas sobre las células BV-2 activadas.

3. Hipótesis de trabajo

La inflamación neuronal es un fenómeno que se manifiesta en los trastornos neurodegenerativos y su causa está vinculada al papel desempeñado por las células microgliales en dicho proceso. Por consiguiente, la propuesta de investigación se centra en la creación y descripción de un modelo de células microgliales. A través de este modelo desarrollado con células microgliales de la línea BV-2, se podrá llevar a cabo una evaluación de los efectos neuroprotectores provenientes de compuestos bioactivos presentes en alimentos naturales, tales como las urolitinas.

Para lograr estos objetivos, inicialmente nos enfocaremos en optimizar las condiciones de crecimiento de los cultivos celulares. Posteriormente, procederemos a evaluar la activación de estas células mediante diversos estímulos. Luego, exploraremos los efectos de las urolitinas en células BV-2 en condiciones basales. Finalmente, evaluaremos la capacidad de las urolitinas para modular la activación de

los cultivos de microglía y reducir el daño neuronal asociado a la producción de mediadores proinflamatorios.

4. Materiales y métodos

4.1 Cultivos de línea celular BV-2

4.1.1 Mantenimiento celular

La línea celular BV-2 (cedida por colaboradores del Instituto Pasteur) fue cultivada en botellas de 75 cm² con 15 mL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF). Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturada. La línea celular se mantuvo mediante cambios de medio realizados cada 24 o 48 horas, y se llevaron a cabo subcultivos una vez que las células alcanzaron la confluencia necesaria.

El proceso de repicado se realizó utilizando tripsina-EDTA, enzima empleada para generar una suspensión a partir de las células adheridas. Inicialmente, se extrajo el medio de cultivo de la botella, seguido de un lavado de las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las células no adheridas y los residuos del medio de cultivo. Posteriormente, se añadió tripsina-EDTA (4 mL para botellas de 75 cm²) y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 10 minutos para facilitar la acción de la tripsina.

Una vez que se logran desprender las células, se detiene la acción de la enzima agregando DMEM 10% SBF. Luego, se toma una porción de la suspensión celular resultante de las botellas y se transfiere a otras botellas de 75 cm² para mantener el cultivo celular. Finalmente, se ajusta el volumen de medio faltante en las botellas hasta alcanzar los 15 mL.

Antes de cada experimento, las células fueron sembradas con la confluencia óptima según la Tabla 1 y posteriormente incubadas a 37°C en DMEM + 10% SBF durante 24 horas.

Tabla 1. Número de células confluentes correspondiente a cada placa de cultivo utilizada.

Placas de cultivo	Nro. de células en confluencia (células/pocillo)
6 pocillos	$1,2 \times 10^6$
24 pocillos	$0,2 \times 10^6$
48 pocillos	$0,08 \times 10^6$

4.1.2 Tratamientos celulares

Una vez que las células son plaqueadas en condiciones óptimas de confluencia (Tabla 1), se les permite adherirse a la placa durante 24 horas. Posteriormente, se lleva a cabo el cambio a un medio de cultivo libre de suero, esperando un tiempo de 4 horas antes de realizar los tratamientos con estímulos activadores. Para estudiar los efectos de las urolitinas en condiciones basales, se sigue un procedimiento similar, pero se reduce el tiempo de espera a 3 horas antes de proceder a los tratamientos con urolitinas.

Además de estos tratamientos, también se llevan a cabo ensayos combinados utilizando estímulos activadores y urolitinas de manera simultánea. En este caso, las células son expuestas a la urolitina a las 3 horas después del cambio al medio de cultivo sin suero, y una hora después, es decir, 4 horas después del cambio de suero, se procede a la aplicación de los estímulos activadores (Figura 7).

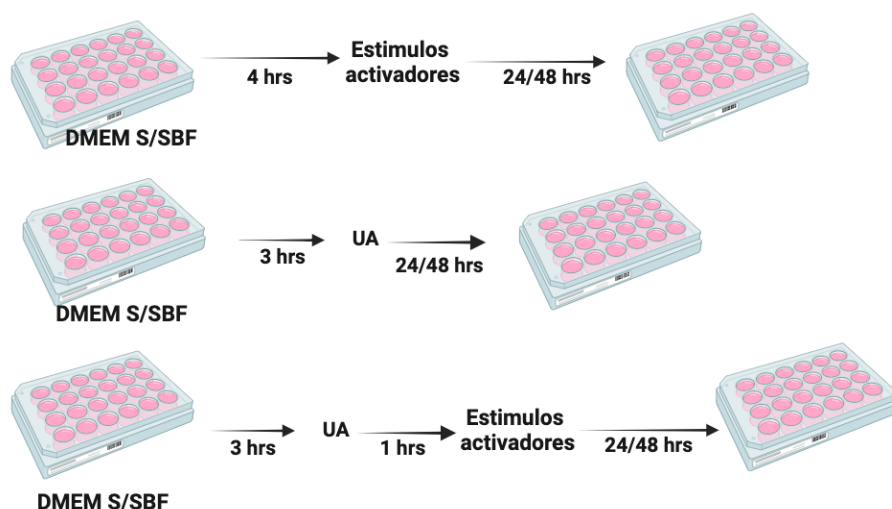


Figura 7. Representación esquemática de tratamientos celulares y activación celular. Diseñada con *BioRender*.

Este enfoque metodológico permitió estudiar la activación celular y evaluar los efectos de las urolitinas en contextos de activación y respuestas inflamatorias en las células BV-2, tanto en combinación con estímulos de activación como en ausencia de estos últimos.

4.1.3 Medios condicionados

Con el objetivo de investigar los efectos de diversos estímulos y tratamientos con UA, se generaron medios condicionados a partir de células BV-2 activadas. Para llevar a cabo la generación de estos medios, las células BV-2 fueron expuestas a diferentes estímulos activadores, induciendo así la secreción de factores específicos como respuesta a condiciones de estrés. Este medio rico en factores secretados fue posteriormente administrado a las células PC12 diferenciadas. Las células PC12 son una línea celular de gran relevancia en la investigación originadas a partir de un feocromocitoma suprarrenal. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse al ser estimuladas por el factor de crecimiento nervioso (100 ng/ml de NGF durante 5 días), lo que provoca que adquieran una morfología semejante a la de las neuronas simpáticas primarias.

Este enfoque nos permitió evaluar el impacto de los factores secretados por las células BV-2, en condiciones de estrés, en las células PC12. La duración de la exposición de las células PC12 a este medio soluble varió en función del experimento, oscilando entre 24 y 48 horas. Asimismo, exploramos la posible influencia de las urolitinas en la respuesta de las células PC12 a estos factores solubles, para esto, primeramente preincubamos las células con urolitinas y posteriormente las expusimos a los medios condicionados.

4.2 Evaluación de la viabilidad celular

4.2.1 Toxicidad celular evaluada por MTT

El ensayo de MTT es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la viabilidad celular en estudios de toxicidad y respuesta celular a diferentes compuestos o tratamientos. Este ensayo se fundamenta en la capacidad de células vivas y metabólicamente activas para reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a su forma insoluble de color púrpura, denominada formazan, generando cristales intracelulares. Es importante señalar que el MTT mide específicamente la actividad de deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H, tanto mitocondriales como citosólicas. Un aumento en la formación de estos cristales se interpreta como un indicador de la actividad de estas enzimas y, por ende, como un marcador de viabilidad celular.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia deseada y fueron tratadas con los diferentes estímulos, se procedió al ensayo de MTT.

En la primera etapa, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, seguido de un lavado de las células con PBS. Posteriormente, se aplicó la solución de MTT/PMS, la cual contiene 5 mg de MTT y 0,22 mg de PMS por mL de dPBS. Se emplearon volúmenes de MTT/PMS ajustados de acuerdo al tamaño de la placa según la Tabla 2. El volumen resultante de MTT/PMS, una vez sembrado en la placa, se disolvió al quinto en dPBS.

Tabla 2. Volúmenes de MTT/PMS y dPBS correspondiente a los diferentes tamaños de placa

Tamaño de la placa	6 pocillos	12 pocillos	24 pocillos	48 pocillos	96 pocillos
MTT/PMS (μ L)	320	160	80	40	20
dPBS (μ L)	1280	640	320	160	80

A continuación, se envuelve la placa de cultivo en papel aluminio para prevenir la oxidación del reactivo, y se coloca en incubación a 37°C. Durante este proceso, se observa la formación gradual de cristales mediante un microscopio

óptico durante aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción de los cristales de MTT mediante la utilización de dimetilsulfóxido (DMSO) en combinación con buffer de Sorensen, volúmenes utilizados en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes de buffer de Sorensen y DMSO correspondiente a los diferentes tamaños de placa

Tamaño de la placa	6 pocillos	12 pocillos	24 pocillos	48 pocillos	96 pocillos
Buffer de Sorensen (µL)	400	200	100	50	25
DMSO (µL)	3200	1600	800	400	200

Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda específica, típicamente a 590 nm, utilizando un lector de placas UV-visible.

4.2.2 Citometría de flujo

Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo utilizando la sonda de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), la cual, al ser internalizada por las células, es convertida por esterasas intracelulares en un compuesto fluorescente. Este proceso permite marcar de manera eficiente las células vivas, proporcionando información detallada sobre su viabilidad y actividad metabólica (Guilini et al., 2015). Luego de la exposición a los estímulos y/o tratamientos según el apartado 4.1.2, las células fueron incubadas a 37 °C con 10 µM de la sonda disuelta en dPBS durante 30 minutos, utilizando un volumen suficiente para cubrir completamente la superficie de los pocillos. Este tiempo de incubación permitió que la sonda ingrese completamente a las células. Posteriormente, se retiró el dPBS con la sonda y se procedió al desprendimiento de las células mediante el uso de tripsina.

Las células marcadas con la sonda CFDA fueron sometidas a análisis de citometría de flujo utilizando el Citómetro de flujo FACS Calibur system de BD Biosciences. La medición de la sonda CFDA se llevó a cabo con una longitud de

onda de excitación de 492 nm, y la emisión de fluorescencia se midió a 512 nm. Los datos generados por el citómetro fueron procesados utilizando el software *CellQuest Pro*. Este programa facilitó la evaluación cuantitativa de la fluorescencia, permitiendo una medida precisa de la viabilidad celular y proporcionando información detallada sobre la respuesta de las células a los diferentes estímulos y tratamientos.

4.2.3 Análisis de morfología celular por microscopía de fluorescencia

Se procedió a examinar los cambios morfológicos de las células BV-2 activadas y expuestas a diferentes concentraciones de UA mediante microscopía de fluorescencia. Luego del tratamiento, las células fueron incubadas a 37 °C con una solución de 10 µM de CFDA disuelta en dPBS, replicando el procedimiento llevado a cabo en el análisis de citometría de flujo de la sección 4.2.2. La fase de incubación facilitó la penetración efectiva de la sonda en las células. Posteriormente, se capturaron ocho imágenes en cada pocillo para registrar los efectos morfológicos inducidos por los tratamientos.

4.3 Efectos sobre formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

4.3.1 Ensayo de Griess

El ensayo de Griess es una técnica ampliamente empleada para determinar la concentración de nitritos en muestras biológicas. Su fundamento radica en la identificación de NO_2^- en medios acuosos, lo que indirectamente se relaciona con la producción de $\bullet\text{NO}$ (Bredt & Snyder, 1994; Dawson & Dawson, 1995; Guevara et al., 1998). Este ensayo se basa en la reacción de los NO_2^- existentes en la muestra con reactivos específicos, tales como el ácido sulfanílico y la naftiletildiamina. Como resultado de esta reacción, se forma un complejo coloreado cuya absorbancia medida a 540 nm está directamente relacionada con la cantidad de nitrito presente en la muestra (Figura 8) (Dawson & Dawson, 1995; Guevara et al., 1998). Después de tratar las células según el apartado 4.1.2 y dejarlas reposar durante 48 horas, los medios condicionados que contenían factores solubles se transfirieron a tubos

Eppendorf previamente etiquetados. Posteriormente, se llevó a cabo el ensayo de Griess de la siguiente manera: se tomaron 400 μl de cada medio condicionado de los diferentes Eppendorf y se agregaron 100 μl de ácido sulfanílico (1% sulfanilamida en 30% HCl), 100 μl de naftiletilendiamina (0,1% Naftiletilendamina en 60% HCl) y 100 μl de agua destilada en una nueva placa de cultivo. Para establecer una referencia de concentración, paralelamente se construyó una curva estándar utilizando una solución patrón de NO_2^- diluida en DMEM sin SBF.

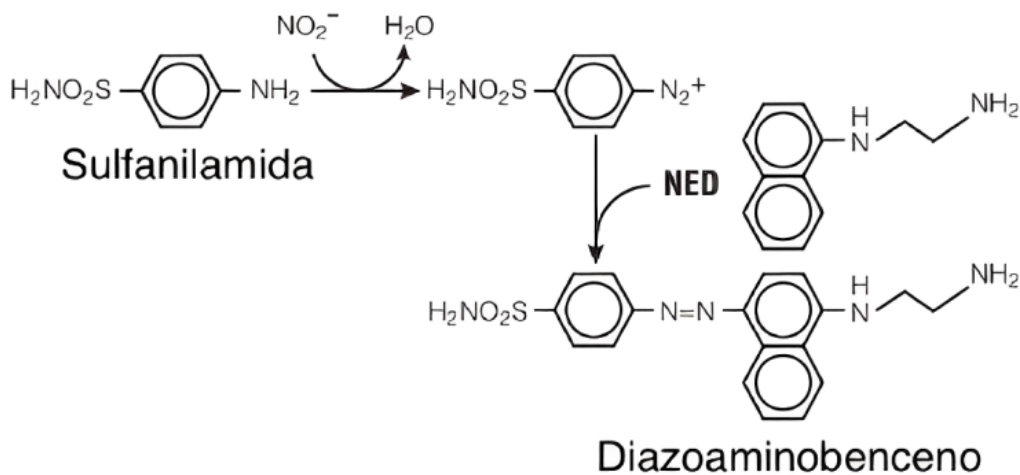


Figura 8. Reacciones químicas involucradas en la medición de NO_2^- , utilizando el sistema de reactivos de Griess.

4.3.2 Detección de peroxinitrito mediante fluoresceína boronato

Para medir la concentración de peroxinitrito (ONOO^-) en las células BV-2, se empleó la sonda de boronato de fluoresceína (FI-B), una sonda de fluorescencia altamente sensible para la detección de ONOO^- . La sonda FI-B reacciona más rápidamente con ONOO^- que con otros peróxidos lo que permite la detección selectiva de esta especie reactiva. La reacción entre el ONOO^- y FI-B induce la liberación de fluoresceína resultando en un cambio en el espectro de emisión con respecto a la FI-B. Entonces, esta reacción puede ser seguida mediante la detección de la fluorescencia emitida por fluoresceína (i.e. $\lambda_{\text{ex}}=492 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=515 \text{ nm}$).

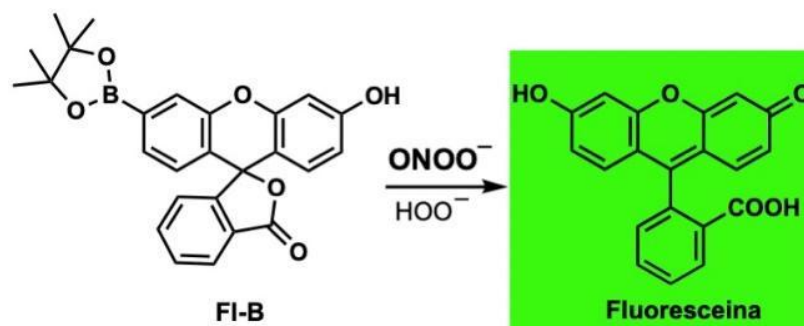


Figura 9. Cambio en la fluorescencia de FI-B tras la interacción con peroxinitrito.

Una vez alcanzada la confluencia, las células se trataron con LPS (1 µg/ml) e IFN- γ (0,1 µg/ml) para estimular la producción de ONOO⁻. Este tratamiento se llevó a cabo durante diferentes intervalos de tiempo: 0, 3, 5 y 24 horas. Al finalizar cada periodo de tratamiento, se procedió a la incubación con la sonda FI-B (50 µM) durante un período constante de 10 minutos a 37°C. De esta manera, se evaluó la producción de ONOO⁻ en distintos momentos después de la exposición a los estímulos. En determinados pocillos de la placa, se añadieron inhibidores específicos como controles para evaluar la fuente de las especies reactivas detectadas con FI-B. Se incluyó L-NAME (10 mM) como inhibidor de las NOS y DPI (10mM) como inhibidor de NADPH oxidasas. Además de los inhibidores, se utilizó L-Arg (0,39 mM) en el medio de cultivo que sirvió como sustrato para la síntesis de NO. El seguimiento de la oxidación de FI-B se llevó a cabo utilizando un lector de placas de fluorescencia.

4.4. Producción de citoquinas proinflamatorias

4.4.1 Extracción de ARN de células BV-2 activadas

Se llevó a cabo la extracción de ARN utilizando el reactivo Trizol siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen).

El proceso de extracción de ARN comenzó con la adición de 400 µL de Trizol para lisar las células y homogeneizar la muestra. Posteriormente, se agregó cloroformo y se dejó que el homogeneizado se separara en tres fases distintas: una fase superior, acuosa transparente que contiene el ARN de interés, una fase intermedia y una fase inferior, orgánica de color rojo que contiene ADN y proteínas.

Luego, se extrajo el ARN de la fase acuosa y se precipitó con 0,2 mL de isopropanol, asegurando su recuperación. Se procedió a una purificación adicional en donde el precipitado de ARN se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12,000g a 4°C durante 10 minutos. Esto resultó en un pellet blanco que contenía el ARN de interés. El sobrenadante fue retirado con micropipeta y se realizó un lavado del sedimento de ARN con 0,4 ml de etanol al 75%, asegurándose de resuspender completamente. Posteriormente, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 12,000g a 4°C para recolectar el pellet de ARN. El sedimento de ARN se secó al aire durante 5 a 10 minutos para eliminar cualquier residuo de etanol. Finalmente, el ARN de alta calidad se resuspendió en un volumen apropiado de agua libre de ribonucleasas (RNasas).

Antes de proceder con la retrotranscripción, se realizó una evaluación de la calidad del ARN mediante la determinación de la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm (relación 260/280). Esta relación es un indicador importante de la pureza del ARN ya que permite verificar la presencia de contaminantes que podrían afectar los resultados de los análisis subsiguientes.

Después de la extracción de ARN, se llevó a cabo un tratamiento con DNasas para eliminar posibles contaminantes de ADN que pudieran estar presentes en la muestra de ARN. Para llevar a cabo este tratamiento, se diluyó 1 µg de ARN en 5 µl de agua. Luego, se preparó el mix en un tubo separado, que constaba de 3 µl de agua, 1 µl del buffer de reacción de DNasa y 0,4 µl de DNasa. Posteriormente, se agregaron 4,4 µl de esta mezcla al tubo que contenía el ARN diluido y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregó 1 µl de EDTA (25 mM) a cada tubo y se calentó a 65°C durante 10 minutos para inactivar la DNasa y detener la reacción.

4.4.2 Retrotranscripción y PCR en tiempo real (q-PCR)

Para llevar a cabo la retrotranscripción de ARN a ADNc, se preparó una mezcla de retrotranscripción en un tubo de reacción estéril. Este mix incluyó los siguientes componentes: 1 µl de cebador Random hexamer (200 ng), 1 µl de dNTPs (10 mM), 4 µl de buffer 5x, 2 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de DNasa Out (40 unidades/ml)

para evitar la contaminación de ADN residual, y 1 µl de M.MLV RT (200 unidades), que es la enzima de retrotranscripción. La incubación de la mezcla se llevó a cabo durante 10 minutos a 25°C, seguida de 50 minutos a 37°C y finalmente 15 minutos a 20°C.

Para realizar la q-PCR, se diluyó la muestra de ADNc 1/5 en un volumen de 60 µl de agua. La mezcla 1x se preparó con los siguientes componentes y concentraciones: 2,2 µl de agua, 0,9 µl de primers, 5 µl de la mezcla Sybr Green Qiagen y 1 µl de ADNc. Las condiciones de la PCR se programaron de la siguiente manera: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una etapa de apareamiento a 60°C durante 1 minuto. La secuencia de los primers se puede observar en la Tabla 4.

Después de la amplificación, se realizó una curva de desnaturalización para analizar la especificidad de la PCR. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el Software *Step One v2.3*.

Tabla 4. Lista de primers de ratón utilizados en la q-PCR.

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
β-actin	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG
IL-1β	TGCTGATGTACCAGTTGGGG	CTCCATGAGCTTTGTACAAG
IL-6	GCCCTTCAGGAACAGCTATG	CAGAATTGCCATTGCACAAC

4.4.3 Western Blot

Una vez alcanzada la confluencia, las células se activaron con LPS 8 µM y se las incubó durante 24 horas. En algunos pocillos, se utilizó una concentración de 20 µM de UA junto con los estímulos activadores. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular bajo condiciones estériles utilizando un tampón de lisis celular RIPPA. A continuación, se procedió a cuantificar la concentración de proteínas en las muestras, seguido de un calentamiento de 5 minutos antes de sembrarlas en el gel.

Se preparó una muestra con 20-40 µg de proteínas por pocillo las cuales se cargaron en el gel de poliacrilamida 10%. La electroforesis se estableció al máximo

de voltaje y a 27 mA. Luego, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa durante 24 horas a 80mA.

Al día siguiente, se retiró la membrana, se reveló con Ponceau y luego se enjuagó con agua destilada. A continuación, se bloqueó con una solución de leche durante 1 hora con el propósito de reducir el ruido de fondo y minimizar los falsos positivos. Esta solución de leche se preparó utilizando PBS 1X con un 5% de leche en polvo. Luego de la transferencia, la membrana se incubó durante al menos una hora con anticuerpos primarios específicos para la iNOS (anti-rabbit) y la MnSOD2 (anti-mouse). Como control de la carga de proteína, se empleó un anticuerpo dirigido contra la β -tubulina. Se llevaron a cabo varios lavados con PBS-Tween al 0,1%. Posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario específico para la región FC de cada anticuerpo primario de las proteínas de interés. Tanto para la iNOS como para la MnSOD2, se utilizó un anticuerpo secundario con emisión en verde (680 nm). Para la β -tubulina se utilizó un anticuerpo secundario con emisión en rojo (800 nm). Por último, se realizaron cinco lavados adicionales con PBS-Tween 0,1%. Las mediciones se realizaron utilizando las longitudes de onda de los anticuerpos secundarios y se visualizan utilizando el Odyssey-LICOR.

5. Resultados y discusión

Para comprender el potencial de las urolitinas como agentes neuroprotectores y su capacidad para contrarrestar el daño celular en condiciones neuroinflamatorias, hemos estructurado nuestros hallazgos en tres secciones clave. En primer lugar, nos enfocamos en caracterizar el modelo de activación celular, explorando los cambios y respuestas celulares bajo condiciones de estrés específicas. En segundo lugar, exploramos los efectos de las urolitinas en células BV-2 en condiciones basales, donde examinamos cómo las urolitinas influyen en la viabilidad y la producción de nitrito en condiciones no inflamatorias. Finalmente, evaluamos los efectos de las urolitinas en células BV-2 activadas, investigando su potencial impacto en este contexto específico.

5.1.1 Puesta a punto del modelo de activación

Para poner a punto el modelo de activación celular de las células BV-2, llevamos a cabo una serie de experimentos utilizando enfoques variados. Inicialmente, realizamos experimentos utilizando células cultivadas en medio con un 10% de SBF y placas en confluencia. En esta etapa inicial, nos centramos en explorar la activación celular mediante la aplicación de diferentes concentraciones de LPS, tomadas de la literatura (Choi & Park, 2012; Lee et al., 2012; Wang-sheng et al., 2017; Wojciechowska & Kujawska, 2023; Xu et al., 2018). Para poder tener algún indicio de la activación celular, se realizó un ensayo de Griess, en el cual, las células fueron expuestas a concentraciones de LPS en el rango de 0,0001 mg/ml a 0,1 mg/ml durante 24 y 48 horas (Figura 10).

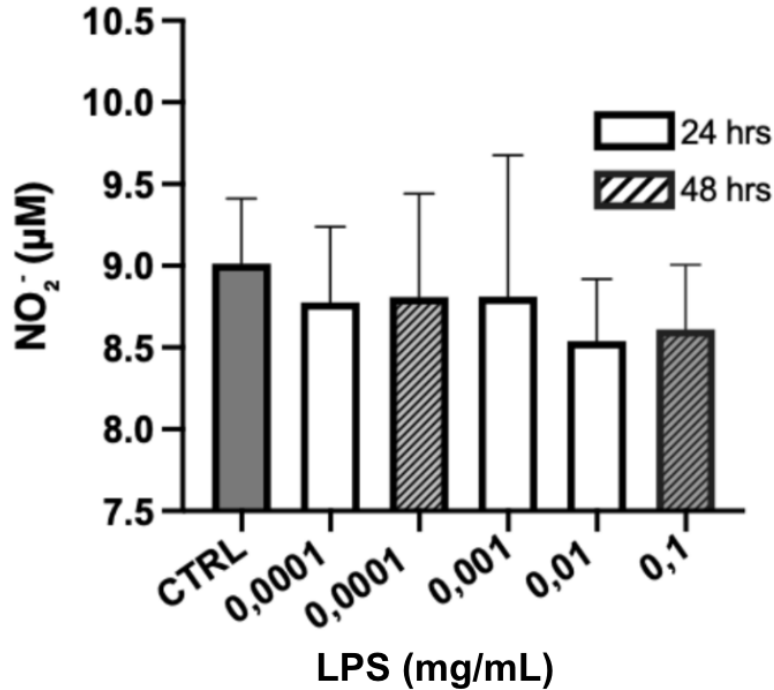


Figura 10. Determinación de los niveles de NO₂⁻ mediante el ensayo de Griess en células BV-2, tras exposición a concentraciones de LPS que abarcaron desde 0,0001 mg/ml hasta 0,1 mg/ml, durante diferentes intervalos de tiempo (24 y 48 horas).

No obstante, los resultados no mostraron un incremento significativo en la concentración de NO₂⁻, lo cual motivó a la realización de ensayos adicionales. En esta instancia, optamos por emplear una combinación de LPS e IFN- γ , añadiendo también L-arginina, dado que es el sustrato principal de la iNOS (Figura 11). La adición de L-arginina fue considerada, ya que la ausencia de este sustrato podría estar afectando la producción de nitrito que estábamos observando.

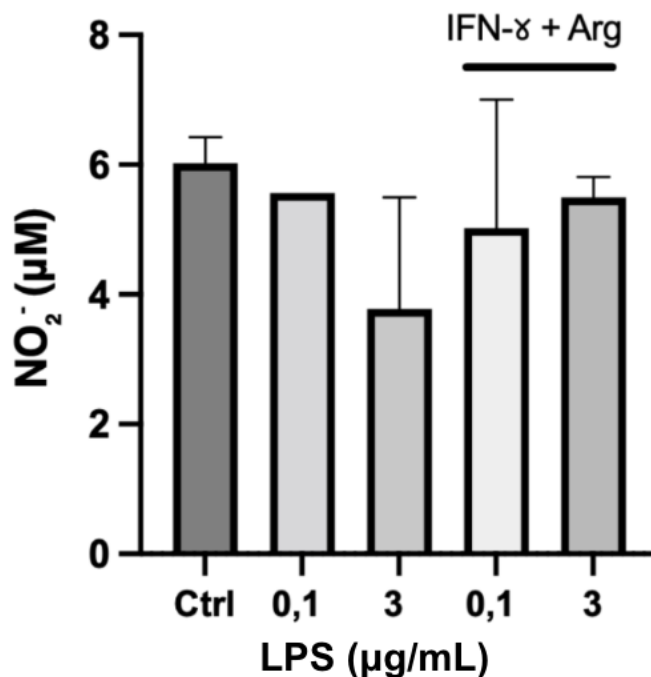


Figura 11. Ensayo de Griess en células BV-2 expuestas diversos estímulos durante 48 horas, incluyendo LPS a concentraciones de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así como IFN- γ a 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-arginina (1 mM).

Ante la ausencia de hallazgos significativos, se decidió repetir los ensayos prescindiendo del SBF en el medio de cultivo. El objetivo fue intentar evitar posibles interferencias por parte de los componentes del SBF (e.g. proteínas de transporte, factores de crecimiento, nutrientes, etc.) en la activación mediada por LPS.

En esta nueva fase de experimentación, se llevó a cabo un ensayo de Griess con células expuestas a concentraciones de LPS de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pero en ausencia de SBF (Figura 12).

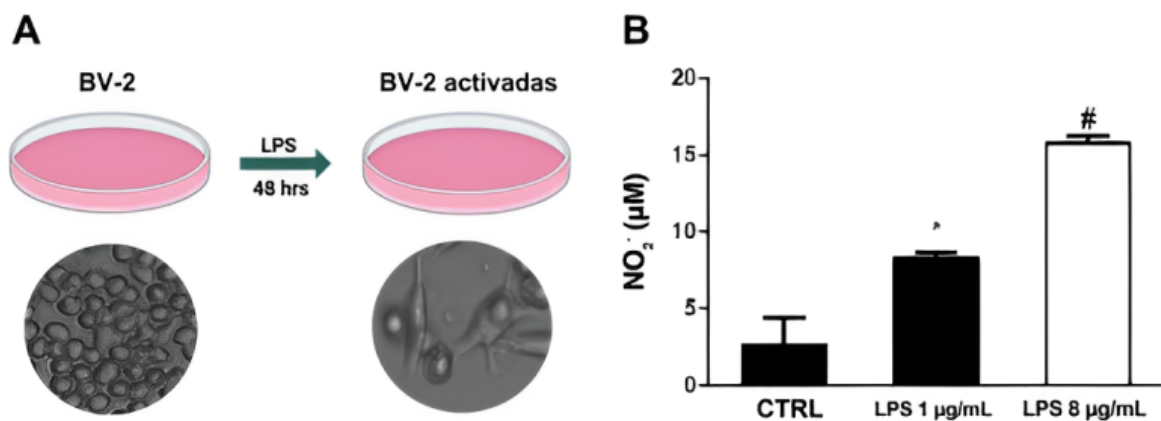


Figura 12. A. Activación de células BV-2 expuestas a LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y LPS 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 horas. **B.** Determinación de los niveles de NO_2^- a diferentes concentraciones de LPS (ensayo Griess). Los datos se expresan como medias de cuatro repeticiones, $\pm\text{SD}$, ANOVA unidireccional, * $p < 0,01$, # $p < 0,001$.

Sorprendentemente, estos ensayos revelaron un aumento significativo de NO_2^- en comparación con el grupo control, evidenciando una respuesta celular frente a estas concentraciones específicas de LPS (Figura 12B). Asimismo, al examinar las células mediante microscopía de campo claro, se detectó un cambio morfológico distintivo (Figura 12A). La transición hacia una morfología más ramificada y un aumento en el área superficial sugieren adaptaciones fenotípicas en respuesta a la exposición al LPS (Sheng et al., 2011).

5.1.2 Evolución temporal de la producción de peroxinitrito a partir de la oxidación de FI-B en células BV-2 activadas

Basándonos en los resultados obtenidos bajo las nuevas condiciones, donde activamos las células BV-2 con LPS, decidimos explorar a fondo la respuesta celular. Con este fin, empleamos la sonda boronato de fluoresceína para medir la producción de peroxinitrito en células BV-2 en diferentes intervalos de tiempo, sometiéndolas a una doble estimulación con LPS e IFN- γ (Figura 13).

El tiempo de observación comprendió un rango diverso de intervalos de estimulación, incluyendo 0, 3, 5 y 24 horas. Este enfoque nos permitió estudiar la producción de peroxinitrito a lo largo del ensayo.

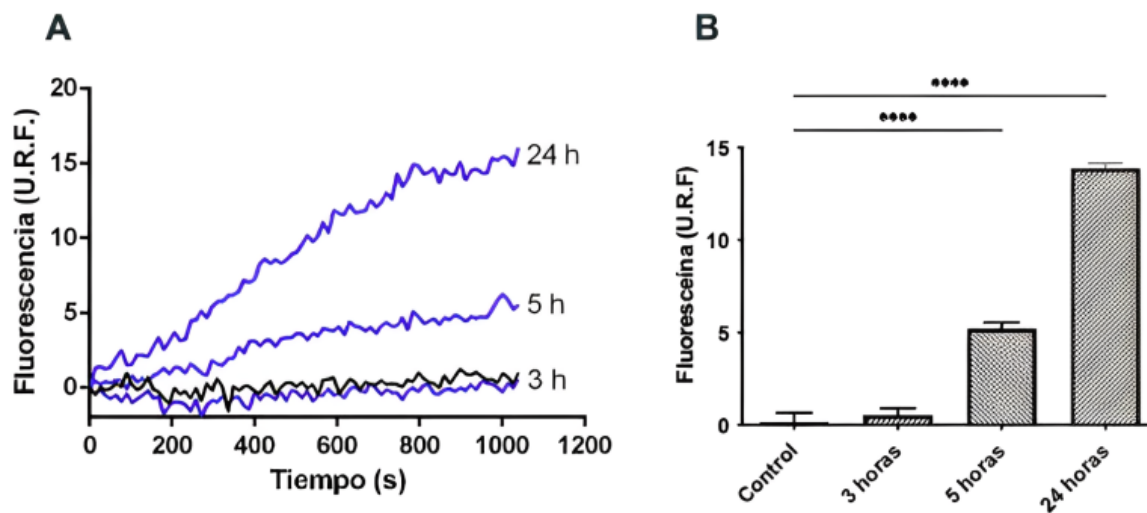


Figura 13. Oxidación de la sonda FI-B en células BV-2 estimuladas con LPS (1 µg/mL) e IFN- γ (0.1 µg/mL) a lo largo del tiempo. **A.** Curso temporal de oxidación de FI-B . **B.** Magnitud de la oxidación de FI-B en las células a diferentes tiempos. Los datos se expresan como medias de cuatro repeticiones, \pm SD, ANOVA unidireccional, **** $p < 0,0001$.

Los resultados revelaron un aumento progresivo en la producción de peroxinitrito a medida que aumenta el tiempo de exposición a los estímulos activadores. En particular, a las 5 horas de estimulación, se evidenció un incremento en los niveles de oxidantes que interactúan con la sonda FI-B. Este aumento en la producción de peroxinitrito a las 5 horas se respaldó con un p-valor bajo ($p < 0.0001$) en comparación con el control. Al llegar a las 24 horas de estimulación, se registraron los niveles más altos de oxidantes que reaccionan con la sonda FI-B,

manteniendo la significancia estadística ($p < 0.0001$) en relación con el control.

Estos hallazgos destacan la importancia del tiempo de estimulación en la producción de peroxinitrito.

5.1.3 Cambio en la morfología celular y expresión de citoquinas proinflamatorias

Después de examinar la producción de especies reactivas en diferentes periodos de exposición a diversos desencadenantes, nos enfocamos en investigar la activación de las células BV-2 frente a distintos estímulos. Además de los que ya habíamos utilizado, como LPS e IFN- γ , sumamos otros factores adicionales, como ATP, la proteína α -sinucleína (α -syn), e IL-1 β . La elección del ATP como estímulo se basó en su función como patrón molecular asociado a daño (DAMP) (Di Virgilio et al., 2020). En este contexto, buscamos evaluar cómo las células responden a señales que indican situaciones de estrés o daño celular. Por otro lado, la incorporación de α -syn se fundamentó en su relación con patologías neurodegenerativas, buscando analizar la respuesta de las células BV-2 ante estímulos vinculados a procesos neurodegenerativos y explorar posibles conexiones con respuestas inflamatorias (Goedert, 2001).

La observación de la activación celular se llevó a cabo 24 horas después de la exposición, centrándonos en cómo variaba la morfología celular al examinarlas con el microscopio de campo claro. Los resultados, representados en la Figura 14, destacaron que los estímulos más efectivos para inducir cambios morfológicos hacia un fenotipo proinflamatorio, fueron el ATP, el LPS y la combinación de LPS con IFN- γ .

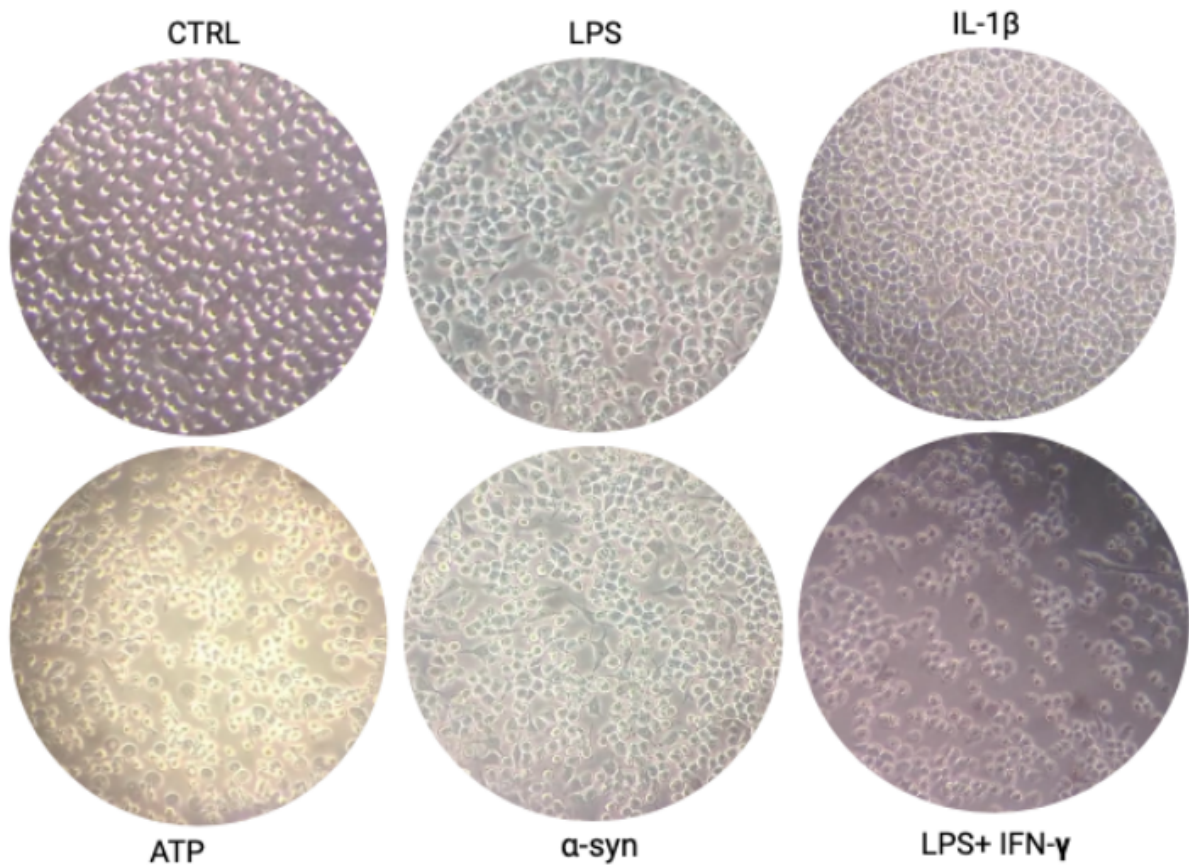


Figura 14. Impacto de los diferentes estímulos en la morfología celular (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IFN- γ 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ATP 3 mM, IL-1 β 50 mg/mL, α -syn 0,02 mg/mL).

Basándonos en estas observaciones morfológicas, realizamos una q-PCR para analizar la expresión de citoquinas proinflamatorias, específicamente IL-1 β y IL-6, conocidas por su relación con contextos inflamatorios (Figura 15). Para esto, se seleccionó una combinación específica de los estímulos que previamente demostraron generar mayores resultados en el cambio morfológico.

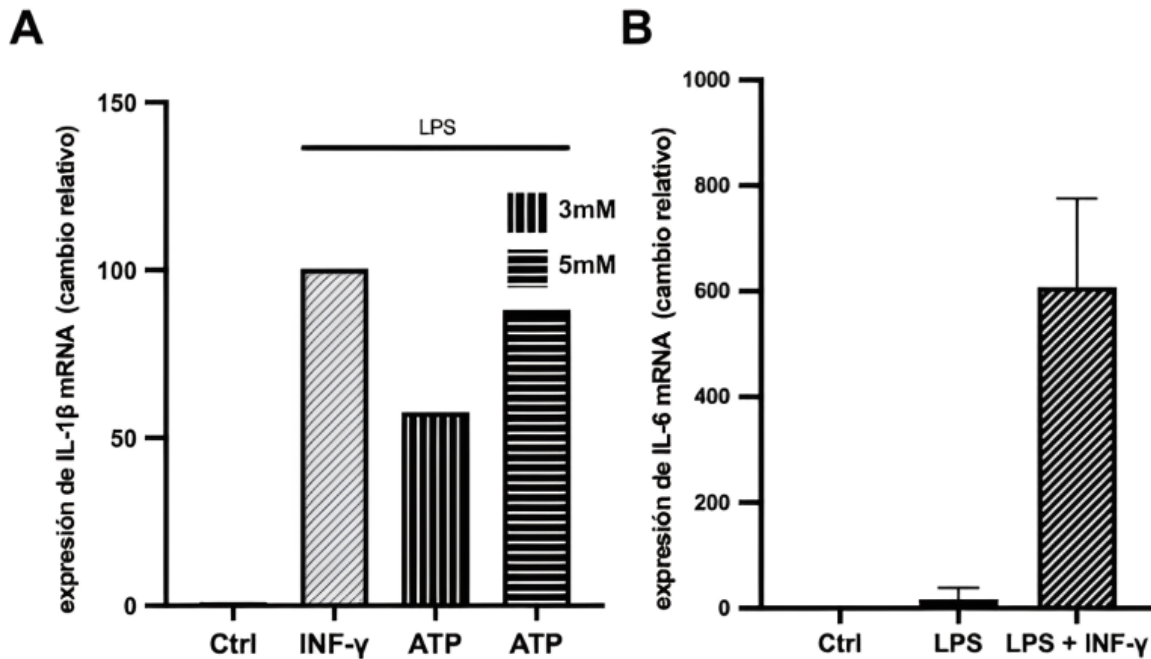


Figura 15. Expresión de ARNm de IL-1 β y de IL-6 mediante q-PCR en células BV-2. **A.** Se evaluó el cambio relativo en la expresión del ARNm de IL-1 β , normalizado respecto al ARNm de la actina, en células BV-2 sometidas a distintos estímulos, LPS 1 μ g/ml junto con: INF- γ 0,1 μ g/ml, ATP 3 mM o 5 mM. **B.** Se evaluó el cambio relativo en la expresión del ARNm de IL-6, normalizado respecto al ARNm de la actina, en células BV-2 expuestas a diversos estímulos, incluidos LPS 1 μ g/ml e LPS 1 μ g/ml + INF- γ 0,1 μ g/ml.

A partir de los resultados obtenidos en el experimento, se evidenció un incremento significativo en la expresión de los ARNm para todos los estímulos en comparación con el grupo de control. No obstante, es importante destacar que, al analizar los diferentes tratamientos, se observó que la combinación de LPS 1 μ g/ml junto con IFN- γ 0,1 μ g/ml logró generar los aumentos más notables para las dos citoquinas evaluadas. Este hallazgo sugiere que existe una respuesta sinérgica entre el LPS y el IFN- γ en la modulación de la expresión génica de estas citoquinas proinflamatorias en las células BV-2. Esta interacción específica resalta la importancia de considerar tanto los estímulos individuales como sus combinaciones al interpretar los resultados obtenidos.

En resumen, a lo largo de este estudio, exploramos la activación de las células BV-2 mediante diferentes enfoques experimentales, probando condiciones con y sin suero y variando los tiempos de exposición a diferentes estímulos. En conclusión, encontramos que la condición de exposición a LPS más INF- γ fue la que

resultó en una mayor activación de los cultivos de microglía por lo que será la utilizada en estudios posteriores.

5.2 Efectos de las urolitinas en células BV-2 en condiciones basales

5.2.1 Viabilidad de células BV-2 después de la exposición a diferentes concentraciones de urolitinas

Después de lograr la activación de las células, nos enfocamos en investigar cómo las urolitinas afectan a las células BV-2 en su estado basal. Para abordar esta cuestión, iniciamos evaluando su impacto en la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Con este fin, después de sembrar las células, las expusimos a diversas concentraciones de UA, UC y UD, en el intervalo de 5 a 50 μM , manteniendo esta exposición durante 24 horas (Figura 16).

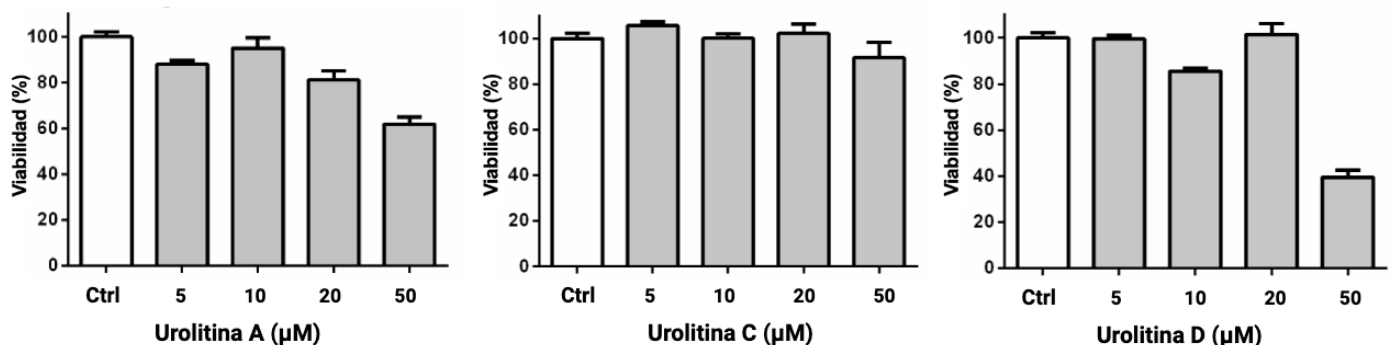


Figura 16. Ensayo MTT para evaluar el efecto de las urolitinas A, C y D sobre la viabilidad de células BV-2 en estado basal.

Al observar cierta citotoxicidad, especialmente a concentraciones elevadas, se procuró investigar los efectos de estos componentes bioactivos a concentraciones más bajas. Para esto, se seleccionó exclusivamente la UA debido a que es la que reporta mayores beneficios. Además, al igual que la UB, la UA es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo tanto, nos centraremos en la UA para el resto de nuestro trabajo. Una vez determinada la elección de la UA, se procedió a replicar el experimento de MTT en células BV-2 en estado basal, exponiéndolas a dicha urolitina. Este ensayo se realizó tanto para exposiciones de 24 como de 48 horas,

posibilitando así una evaluación más minuciosa de los efectos en la viabilidad celular a lo largo del tiempo (Figura 17).

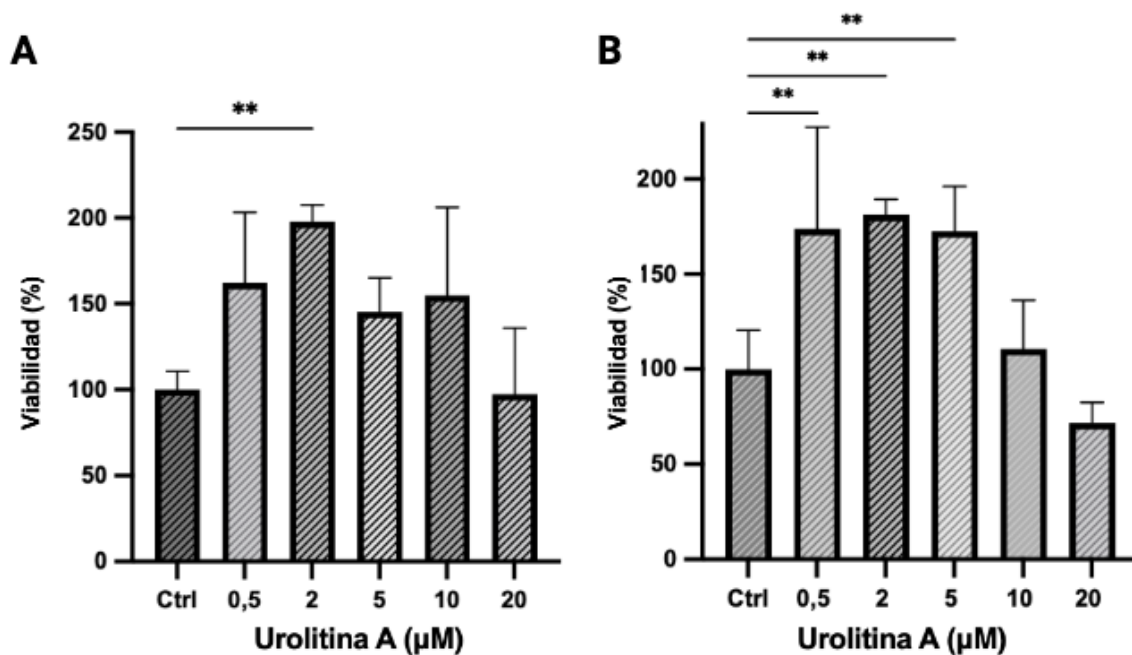


Figura 17. Viabilidad de células BV-2 después de la exposición a diferentes concentraciones de UA, evaluada mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como porcentaje sobre las células de control. **A.** Resultados correspondientes a una exposición de 24 horas. **B.** Resultados correspondientes a una exposición de 48 horas. Los datos se expresan como medias de cuatro repeticiones, \pm SD, ANOVA unidireccional, ** $p < 0,01$.

Inicialmente, teníamos la expectativa de que las concentraciones de UA no afectarían negativamente la viabilidad celular, similar a lo que ocurrió en el primer experimento realizado. Sin embargo, al incubar las células durante 24 y 48 horas con concentraciones de UA que oscilaban entre 0,5 y 20 μ M, observamos que no solo la UA no redujo la viabilidad celular, sino que logró mejorarla significativamente. Si bien se observaron mejoras en el rango de 0,5 a 10 μ M, la concentración de 2 μ M de este compuesto demostró ser la más efectiva, tanto para la exposición de 24 horas como la de 48 horas, en comparación con las células no tratadas. Estos resultados muestran una alta significancia estadística, con un p-valor menor a 0,01 al comparar el grupo de control con la concentración de 2 μ M durante 24 horas y entre el grupo de control y las concentraciones de 0,5 μ M, 2 μ M y 5 μ M durante 48 horas. Esto respalda de manera clara la mejora en la actividad de las deshidrogenasas

observada. Además, se observó que la concentración de 20 μM parece tener un impacto negativo en esta actividad, aunque este resultado no alcanzó significancia estadística.

Es importante destacar que el ensayo de MTT, aunque comúnmente utilizado como indicador de viabilidad, se basa en la actividad de deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H, incluyendo enzimas mitocondriales. Por lo tanto, un aumento en la actividad de estas enzimas podría sugerir una mejora en la función mitocondrial. A su vez, como fue presentado en la introducción, la UA induce mecanismos de mitofagia, por los cuales mitocondrias disfuncionantes podrían ser eliminadas dejando disponible una población de mitocondrias más eficientes y por lo tanto con mayor capacidad de reducir al MTT.

Para complementar estos resultados, se llevó a cabo un análisis de viabilidad bajo las mismas condiciones mediante la técnica de citometría de flujo (Figura 18). Las células fueron marcadas con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), un indicador que evalúa la integridad de la membrana celular y la actividad de las esterasas que hidrolizan el compuesto para producir fluoresceína.

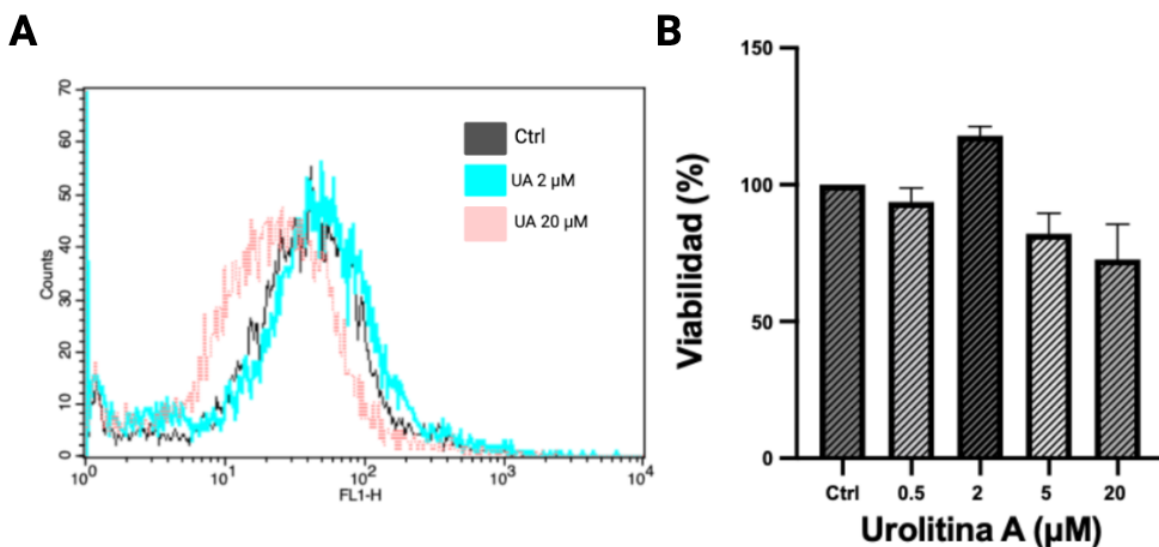


Figura 18. Análisis de viabilidad celular por citometría de flujo utilizando diacetato de carboxifluoresceína en células BV-2 después de la exposición a diferentes concentraciones de UA. **A.** Histograma de fluorescencia para el control, UA 2 μM y 20 μM . **B.** Análisis de los resultados de fluorescencia tras el tratamiento con las distintas concentraciones de UA.

Al examinar los resultados, se puede observar que la concentración de 2 μM de UA generó una intensidad de fluorescencia mayor en comparación con las células de control. Este aumento en la intensidad (Figura 18), indicaría una mejora en la integridad de la membrana plasmática y en la actividad de las esterasas intracelulares. No obstante, la concentración de 20 μM exhibió una disminución en la intensidad de fluorescencia, insinuando una posible alteración en la integridad de la membrana o en la actividad de las esterasas intracelulares. Estos resultados son consistentes con las observaciones del ensayo de MTT (Figura 17).

Después de analizar los efectos de la UA mediante ensayos de MTT y citometría de flujo, quisimos explorar si esta mejora en la viabilidad generaba cambios morfológicos como los vistos previamente ante estímulos activadores. Para este propósito, se utilizó microscopía de fluorescencia con la sonda CFDA (Figura 19). Las condiciones de tratamiento son similares a las empleadas en los experimentos previos, asegurando consistencia en las evaluaciones de viabilidad.

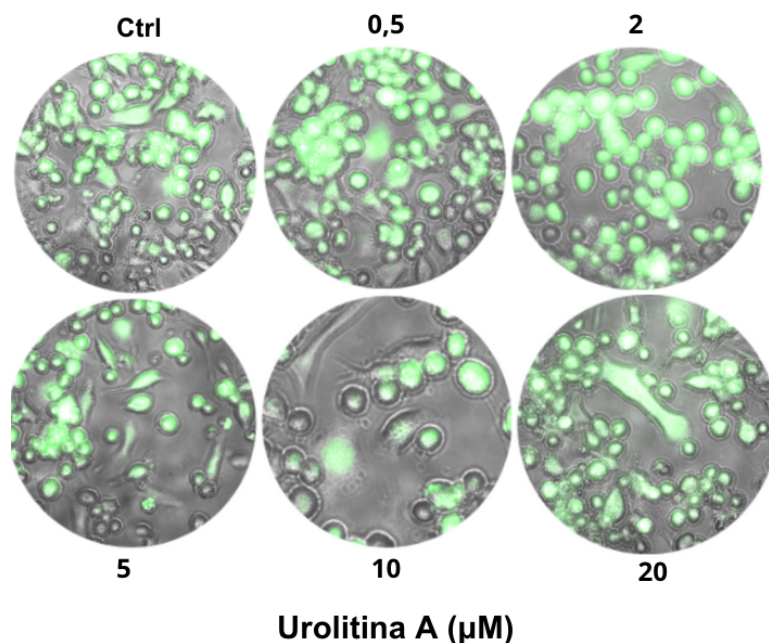


Figura 19. Evaluación de la morfología celular mediante microscopía de fluorescencia con sonda CFDA. **A.** Imágenes de campo claro y fluorescencia de los diferentes tratamientos con UA procesadas empleando el software *ImageJ*.

A partir de la Figura 19, podemos observar que a bajas concentraciones de UA (0,5 a 2 μM), las células mantuvieron una morfología principalmente circular, similar al grupo de control. A su vez, a 2 μM , el número de células con morfología

activada parecía ser incluso menor que en el grupo de control, donde algunas células presentaban estas características de activación. Por otro lado, a partir de 5 μM , se evidenció un aumento en el número de células con morfología activada, siendo la concentración de 20 μM , la que presentó un incremento significativo en el número de células con un patrón similar al de las células activadas por estímulos, como se muestra en la Figura 14.

5.1.2 Ensayo de Griess en células BV-2 tratadas con UA

Después de observar el impacto positivo de la UA en la actividad celular, evidenciado en ensayos como el MTT y la citometría de flujo, nos enfocamos en investigar si este compuesto bioactivo también podría estar relacionado con cambios en las concentraciones de nitrito. Para investigar esta posibilidad, se llevó a cabo un ensayo de Griess en el que evaluamos la producción de nitrito en células BV-2 en ausencia de estímulos activadores (Figura 20). Dado los resultados prometedores en los ensayos previos, decidimos utilizar las mismas concentraciones de UA manteniendo el tiempo de exposición en 48 horas.

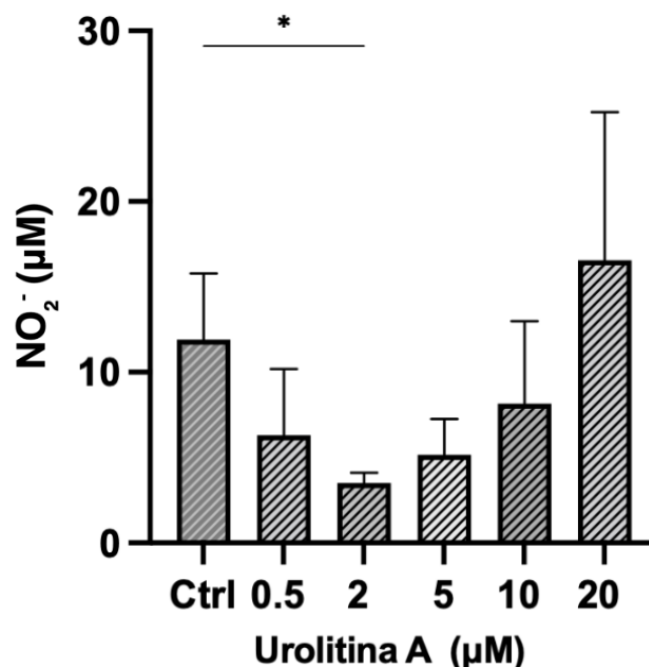


Figura 20. Determinación de los niveles de nitrito a diferentes concentraciones de UA (ensayo Griess a las 48 hrs de estimulación). Los datos se expresan como medias de cuatro repeticiones, $\pm\text{SD}$, ANOVA unidireccional, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A partir de la gráfica, podemos observar un patrón interesante en forma de campana invertida, observando una reducción en la producción de nitrito a concentraciones más bajas. El punto mínimo se identificó a 2 μM de UA, respaldado por valores de p-valor inferiores a 0,05 en comparación con el control. Sin embargo, a concentraciones más elevadas, la producción de nitrito empezó a incrementarse, superando finalmente los niveles del control a 20 μM de UA. Para futuros experimentos, se seleccionó la concentración de 2 μM de UA debido a los resultados prometedores obtenidos en ambos estudios.

5.3. Efectos de las urolitinas en un contexto inflamatorio

5.3.1 Ensayo de Griess en células BV-2 activadas y tratamiento con urolitina A

Aunque los resultados previos fueron prometedores al mostrar que la UA reduce los niveles de nitrito en condiciones celulares basales, nuestro enfoque se dirigió hacia la exploración de su influencia en un contexto más desafiante y representativo de condiciones inflamatorias, similares a las que se presentan en los trastornos neurodegenerativos. En situaciones inflamatorias, las células experimentan niveles elevados de estrés, desencadenando una respuesta inmunitaria proinflamatoria que aumenta la producción de moléculas como el nitrito. El experimento con la sonda FI-B, como se detalla en la sección 5.1.2, nos permitió determinar los tiempos óptimos de producción de radicales, estableciendo así una base sólida en la evaluación de la capacidad de la UA para reducir los niveles de peroxinitrito en un entorno inflamatorio. En este sentido, para medir los niveles de nitrito mediante un ensayo de griess, sometimos a las células a concentraciones de LPS de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante un período de 48 horas, para acumular todo el nitrito producido en ese intervalo de tiempo (Figura 21). A su vez, realizamos tratamientos con UA a una concentración de 2 μM , ya que fue la concentración más eficaz para reducir los niveles de nitrito en células basales (Figura 20).

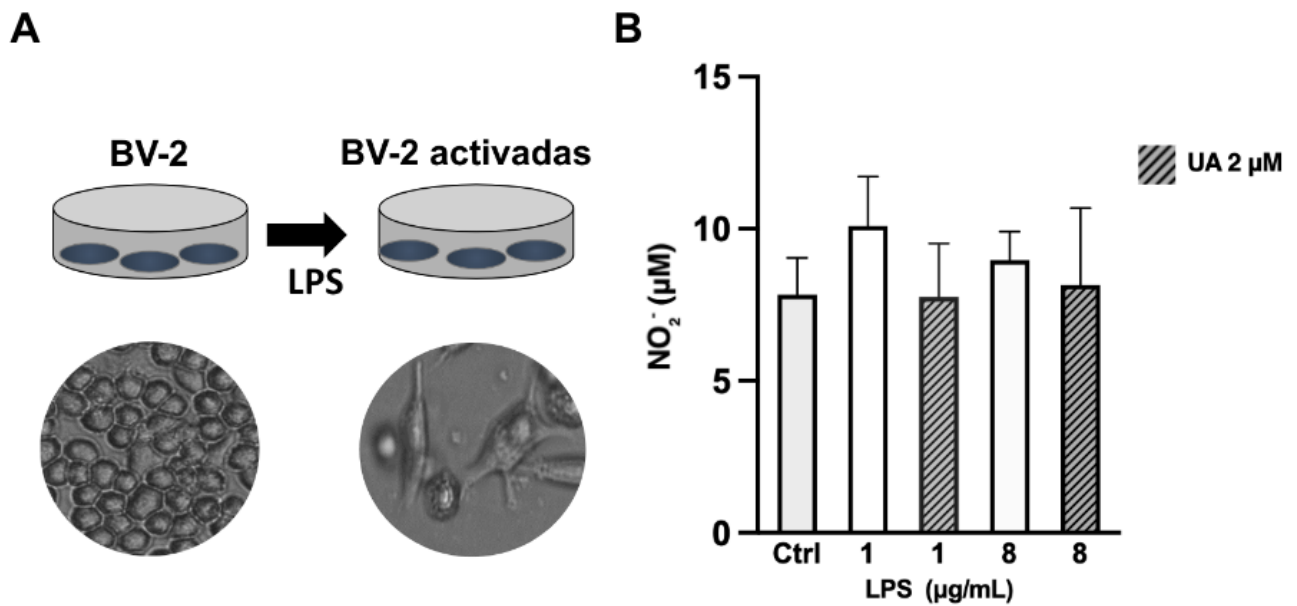


Figura 21. A. Activación de células BV-2 inducidas por LPS 1 μg/mL y 8 μg/mL y pretratamiento con UA durante 48 horas. **B.** Producción de nitrito en células BV-2 sometidas a LPS 1 μg/mL, LPS 8 μg/mL y preincubación con UA 2 μM.

Primeramente podemos observar que ambas concentraciones de LPS lograron inducir un leve aumento en la concentración de NO₂⁻. Sin embargo, el tratamiento con UA mostró una tendencia a la disminución de los niveles de nitrito, acercándolos a valores similares a los basales. De igual forma, es importante mencionar que no se observó significancia estadística en estos resultados. Esto podría deberse al hecho de que los estímulos activadores no generaron cambios drásticos en la producción de NO₂⁻ en este tipo de células, lo que subraya la complejidad de la respuesta celular en contextos inflamatorios. A pesar de la ausencia de significancia estadística, los resultados mostrarían una tendencia de la UA para modular la respuesta inflamatoria en un entorno biológico desafiante.

5.3.2 Cambios en la expresión de iNOS inducidos por urolitina A en células BV-2 activadas

Con el propósito de investigar si la reducción previamente observada en los niveles de nitrito tras tratamiento con UA, tal como se evidenció en el ensayo de

griess (Figura 21), podría atribuirse a una inhibición de la iNOS, realizamos un ensayo de western blot. En este caso, las células fueron expuestas a una concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ de LPS y tratamiento con 20 μM de UA durante 24 horas. Luego, evaluamos la presencia de iNOS y MnSOD por western blot, utilizando β -tubulina como control de carga (Figura 22).

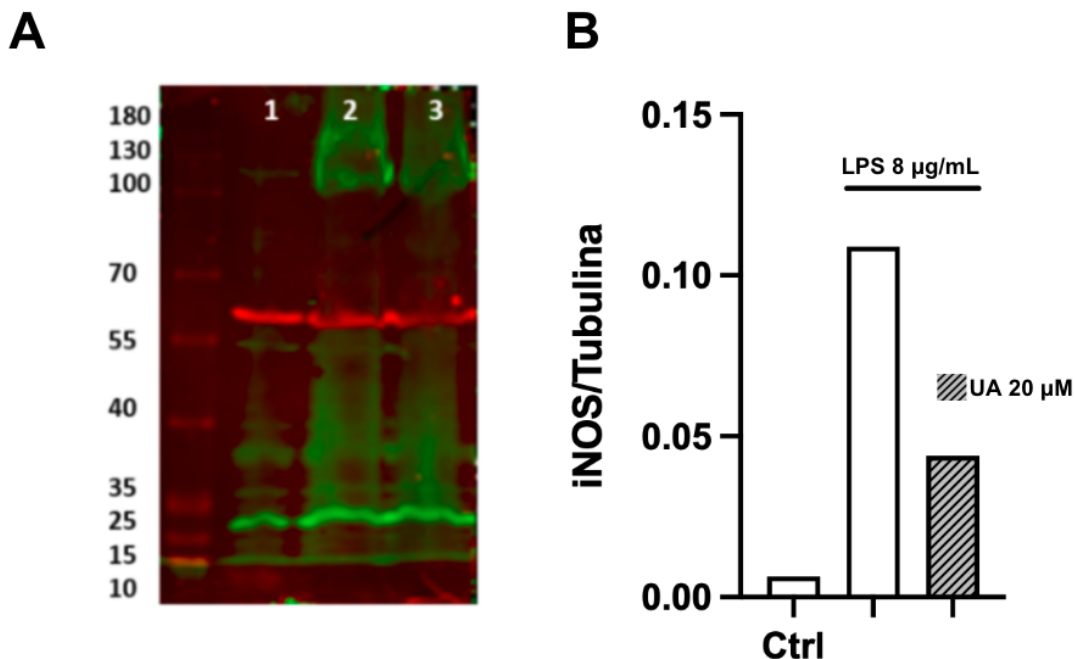


Figura 22.A. Western Blot de lisado celular de células BV-2 tras tratamiento con LPS y UA. En rojo anti tubulina (55kDa), en verde iNOS (131kDa) y anti MnSOD (21 kDa). MW, 1 Control. 2 LPS 8 $\mu\text{g/mL}$. 3 LPS 8 $\mu\text{g/mL}$ + UA 20 μM . **B.** Análisis de densitometría de las bandas de western blot cuantificadas a partir de las relaciones iNOS/Tubulina para los diferentes carriles.

Por un lado, no se observaron cambios significativos en la expresión de MnSOD bajo este estímulo activador. La naturaleza del ensayo, que proporcionó un único valor por carril representando la relación de iNOS y MnSOD con la proteína de referencia, limitó la posibilidad de realizar análisis estadísticos tradicionales como ANOVA. A pesar de esta limitación, los resultados sugieren una posible disminución en la expresión de la iNOS en las células tratadas con UA en comparación con aquellas estimuladas únicamente con LPS. Esta observación es coherente con la reducción de los niveles de nitrito en el ensayo de griess y respalda el potencial de la UA como regulador de la respuesta inflamatoria y la producción de óxido nítrico en un contexto celular activado por LPS.

5.3.3 Modulación de citoquinas proinflamatorias por urolitina A en células BV-2 activadas

Tras confirmar la capacidad de la UA para reducir la expresión de la iNOS, surgió la idea de explorar su impacto en la regulación de citoquinas proinflamatorias. Para lograr esto, realizamos una q-PCR implementando una combinación de LPS e IFN- γ como estímulos activadores. Además, implementamos tratamientos con UA y UC, utilizando concentraciones de 2 μ M y 20 μ M (Figura 23).

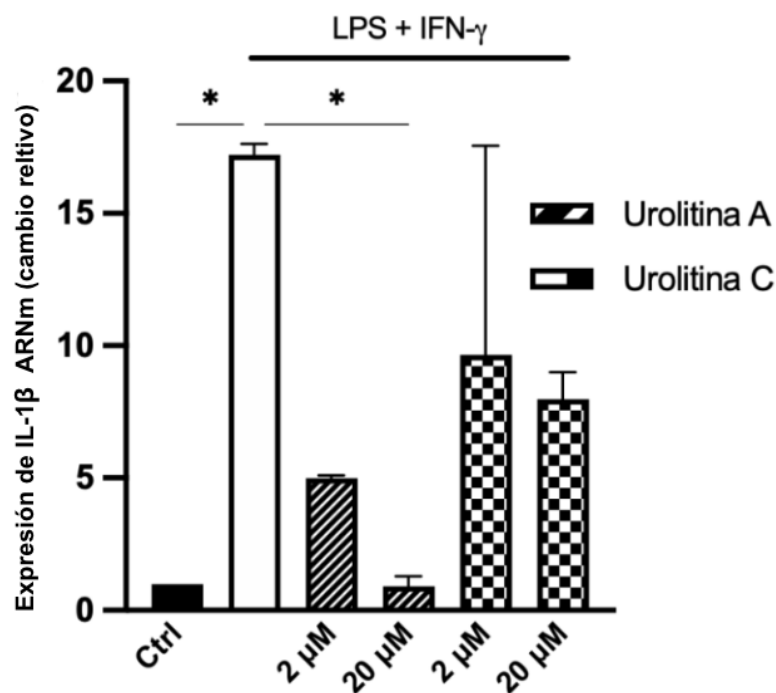


Figura 23. Expresión de ARNm de IL-1 β mediante q-PCR en células BV-2. Se evaluó el cambio relativo en la expresión del ARNm de IL-1 β , normalizado respecto al ARNm de la actina, en células BV-2 expuestas a 1 μ g/ml de LPS + 0,1 μ g/ml de INF- γ y preincubadas con UA o UC. Los datos se expresan como medias de dos experimentos, \pm SD, ANOVA unidireccional, * $p < 0,05$.

A partir de los resultados obtenidos, podemos observar que el estímulo activador utilizado logró aumentar considerablemente la expresión de IL-1 β , con un p-valor inferior a 0,05 con respecto al control. Sin embargo, los pretratamientos con UA, tanto a 2 μ M como a 20 μ M, mostraron una reducción significativa en los niveles de expresión de esta citoquina proinflamatoria, con p-valores menores a 0,05. Además, se destaca que la concentración de 20 μ M de UA generó una mayor reducción en la expresión de esta citoquina en comparación con la concentración de 2 μ M. Si bien la UC mostró una tendencia a reducir los niveles de expresión, no

alcanzó significancia estadística en ninguna de las concentraciones evaluadas. Estos resultados, junto con la disminución en la expresión de la iNOS, sugieren un efecto modulador de la UA en condiciones inflamatorias, lo que podría indicar un potencial beneficio en un contexto terapéutico. No obstante, se requiere una mayor investigación para confirmar y comprender completamente el alcance de estos efectos.

5.3.4 Efectos de urolitinas sobre células PC12

Luego de confirmar que la UA mejoró la viabilidad de las células BV-2 al favorecer tanto la integridad de la membrana como la actividad de esterasas celulares (Figura 18), así como la actividad deshidrogenasa (Figura 17), generamos medios condicionados de células BV-2. En este experimento, preincubamos las células PC12 con diversas urolitinas a una concentración de 20 μ M, seleccionada con base en ensayos preliminares que demostraron ser la concentración óptima para estas células en particular. Posteriormente, las células PC12 fueron incubadas durante 48 horas con los medios condicionados obtenidos de células BV-2 activadas con LPS 8 μ g/mL. Tras este periodo, llevamos a cabo el ensayo de MTT (Figura 24).

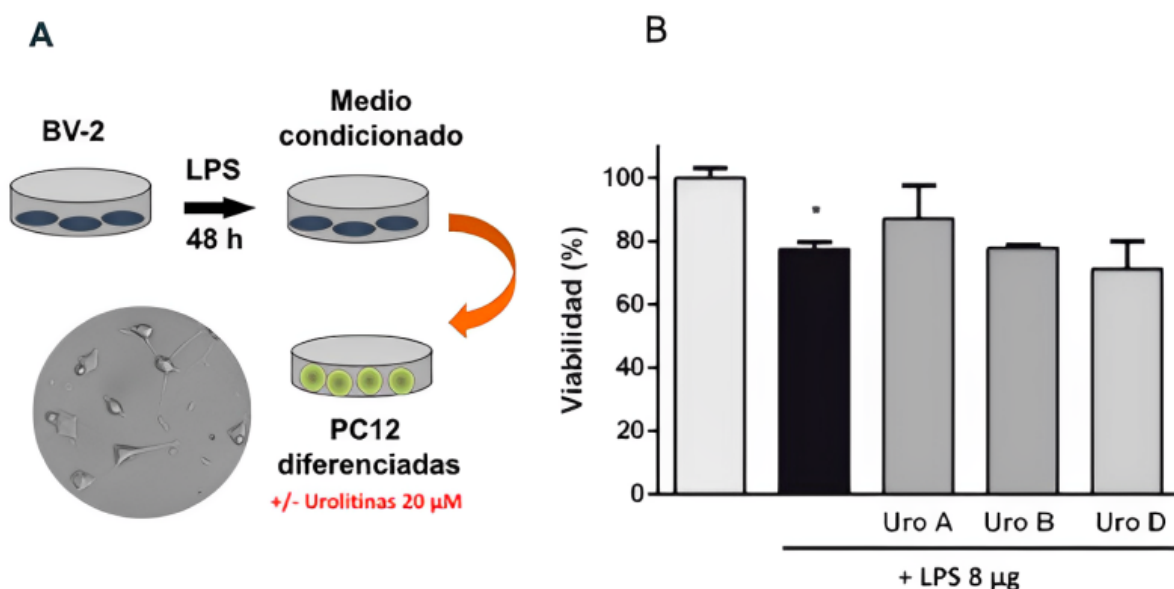


Figura 24. A. Células PC12 expuestas a medios condicionados de células BV-2 activadas (LPS 8 μ g/mL). **B.** Viabilidad de células PC12 preincubadas con UA, UB y UD, expuestas a medios condicionados de BV-2 activadas (ensayo MTT). Los datos se expresan como medias de cuatro

repeticiones, \pm SD, ANOVA unidireccional, * $p < 0,05$.

El análisis de los resultados reveló que las células PC12 expuestas únicamente a medios condicionados de BV-2 activadas, en ausencia de urolitinas, experimentaron una disminución del 23% en la viabilidad celular. Además, se pudo observar que la UA logró ejercer un efecto protector, al contrarrestar el impacto adverso del LPS. Sin embargo, es importante destacar que, aunque la UA pudo atenuar la disminución de viabilidad causada por LPS, no logró restaurar los niveles observados en las células basales, lo que sugiere un efecto protector parcial.

En contraste, las UB y UD, a pesar de su administración en las mismas condiciones, no lograron mejorar la viabilidad frente a los estímulos nocivos del LPS. Esto sugiere que la capacidad de protección celular es específica de la UA en este contexto.

6. Conclusiones y perspectivas

En el marco de esta tesina de grado, hemos logrado implementar de manera exitosa un modelo de cultivo celular que utiliza microglía BV-2, estableciendo así una herramienta valiosa para explorar los efectos de compuestos bioactivos, en particular, las urolitinas.

Se identificaron las condiciones óptimas para la activación de estas células, marcadas por un cambio distintivo hacia una morfología ramificada. Este cambio morfológico estuvo asociado con cambios intracelulares significativos, incluida la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como la generación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de la iNOS. Estas respuestas celulares clave fueron observadas principalmente en respuesta a la exposición al LPS a concentraciones de 1 y 8 $\mu\text{g/ml}$. En algunos casos, se destacó una mayor activación cuando el LPS se combinó estratégicamente con IFN- γ o con ATP, revelando la complejidad de las señales intracelulares disparadas por los diferentes estímulos.

Asimismo, se evidenció que las urolitinas, especialmente la UA, ejerce un efecto beneficioso en las células BV-2 en condiciones basales cuando se exponen a

concentraciones que oscilan entre 0,5 y 10 μM . Este fenómeno se traduce en una mejora significativa de la viabilidad celular, evidenciada mediante el fortalecimiento de la actividad de deshidrogenasas y esterasas, así como el mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Adicionalmente, se evidenció que la UA logró reducir la concentración de nitrito en el mismo rango de concentraciones, sugiriendo de manera destacada su potencial efecto neuroprotector.

Al examinar los efectos de la UA en células activadas, evidenciamos que dicho compuesto bioactivo es capaz de reducir la concentración de nitrito acompañado por una disminución en la expresión de la iNOS. Además, la UA logró reducir significativamente los niveles del ARNm de la IL- β señalando el potencial de este postbiótico para modular respuestas inflamatorias en este contexto celular.

A su vez, durante los tratamientos con medios condicionados de células BV-2, se reveló que la UA ofrece cierta protección contra la muerte celular de las PC12 cuando se enfrentan a estímulos dañinos.

En resumen, este trabajo propone que las urolitinas, en particular la UA, tiene un impacto beneficioso en condiciones basales y puede influir en la respuesta celular en condiciones inflamatorias. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para futuras investigaciones y posibles aplicaciones terapéuticas en el campo de las enfermedades neurodegenerativas y la salud del SNC, ofreciendo una esperanza en la búsqueda de nuevas estrategias de prevención.

Nuestras perspectivas y futuros experimentos, que se llevarán a cabo durante mi maestría, se centran en la investigación de la UA, particularmente en su capacidad para mejorar la función mitocondrial e inducir mitofagia, procesos cruciales afectados en enfermedades neurodegenerativas. A su vez, planeamos expandir nuestra investigación empleando cultivos primarios de neuronas y microglia. Esta transición nos permitirá obtener resultados más representativos de la realidad biológica y una comprensión más exhaustiva de los efectos de la UA en un contexto más complejo.

7. Bibliografía

- Abdulrahman, A. O., Kuerban, A., Alshehri, Z. A., Abdulaal, W. H., Khan, J. A., & Khan, M. I. (2020). Urolithins Attenuate Multiple Symptoms of Obesity in Rats Fed on a High-Fat Diet. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 13, 3337–3348. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S268146>
- Ahsan, A., Zheng, Y.-R., Wu, X.-L., Tang, W.-D., Liu, M.-R., Ma, S.-J., Jiang, L., Hu, W.-W., Zhang, X.-N., & Chen, Z. (2019). Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress in vitro and in vivo. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(9), 976–986. <https://doi.org/10.1111/cns.13136>
- Al-Harbi, S. A., Abdulrahman, A. O., Zamzami, M. A., & Khan, M. I. (2021). Urolithins: The Gut Based Polyphenol Metabolites of Ellagitannins in Cancer Prevention, a Review. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.647582>
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 317S-325S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.317S>
- Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3063–3073. <https://doi.org/10.2174/138161209789058084>
- Barabási, A.-L., Menichetti, G., & Loscalzo, J. (2020). The unmapped chemical complexity of our diet. *Nature Food*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s43016-019-0005-1>
- Barnes, L. L., Dhana, K., Liu, X., Carey, V. J., Ventrelle, J., Johnson, K., Hollings, C. S., Bishop, L., Laranjo, N., Stubbs, B. J., Reilly, X., Agarwal, P., Zhang, S., Grodstein, F., Tangney, C. C., Holland, T. M., Aggarwal, N. T., Arfanakis, K., Morris, M. C., & Sacks, F. M. (2023). Trial of the MIND Diet for Prevention of Cognitive Decline in Older Persons. *New England Journal of Medicine*, 389(7), 602–611. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2302368>
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., & Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>
- Berding, K., Vlckova, K., Marx, W., Schellekens, H., Stanton, C., Clarke, G., Jacka, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2021). Diet and the Microbiota–Gut–Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Advances in Nutrition*, 12(4), 1239–1285. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa181>
- Berendsen, A. M., Kang, J. H., Feskens, E. J. M., de Groot, C. P. G. M., Grodstein, F., & van de Rest, O. (2018). Association of long-term adherence to the mind diet with cognitive function and cognitive decline in American women. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 22(2), 222–229. <https://doi.org/10.1007/s12603-017-0909-0>
- Beunza, J.-J., Toledo, E., Hu, F. B., Bes-Rastrollo, M., Serrano-Martínez, M., Sánchez-Villegas, A., Martínez, J. A., & Martínez-González, M. A. (2010). Adherence to the Mediterranean diet, long-term weight change, and incident overweight or obesity: The

Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(6), 1484–1493. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29764>

Blomquist, C., Chorell, E., Ryberg, M., Mellberg, C., Worrjö, E., Makoveichuk, E., Larsson, C., Lindahl, B., Olivecrona, G., & Olsson, T. (2018). Decreased lipogenesis-promoting factors in adipose tissue in postmenopausal women with overweight on a Paleolithic-type diet. *European Journal of Nutrition*, 57(8), 2877–2886. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1558-0>

Boakye, Y. D., Groyer, L., & Heiss, E. H. (2018). An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.006>

Brabers, N. a. C. H., & Nottet, H. S. L. M. (2006). Role of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in HIV-associated dementia. *European Journal of Clinical Investigation*, 36(7), 447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01657.x>

Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1994). NITRIC OXIDE: A Physiologic Messenger Molecule. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.001135>

Buckland, G., González, C. A., Agudo, A., Vilardell, M., Berenguer, A., Amiano, P., Ardanaz, E., Arriola, L., Barricarte, A., Basterretxea, M., Chirlaque, M. D., Cirera, L., Dorronsoro, M., Egües, N., Huerta, J. M., Larrañaga, N., Marin, P., Martínez, C., Molina, E., ... Moreno-Iribas, C. (2009). Adherence to the Mediterranean Diet and Risk of Coronary Heart Disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 170(12), 1518–1529. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp282>

Capiralla, H., Vingtdoux, V., Zhao, H., Sankowski, R., Al-Abed, Y., Davies, P., & Marambaud, P. (2012). Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *Journal of Neurochemistry*, 120(3), 461–472. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07594.x>

Cásedas, G., Les, F., Choya-Foces, C., Hugo, M., & López, V. (2020). The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/antiox9020177>

Cavanagh, C., Colby-Milley, J., Farso, M., Krantic, S., & Quirion, R. (2011). Early molecular and synaptic dysfunctions in the prodromal stages of Alzheimer's disease: Focus on TNF- α and IL-1 β . *Future Neurology*, 6(6), 757–769. <https://doi.org/10.2217/fnl.11.50>

Cerdá, B., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2005). Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 227–235. <https://doi.org/10.1021/jf049144d>

Chang, J., Rimando, A., Pallas, M., Camins, A., Porquet, D., Reeves, J., Shukitt-Hale, B., Smith, M. A., Joseph, J. A., & Casadesus, G. (2012). Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 2062–2071. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.015>

Cheng, M., Geng, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, R., Xu, H., Liang, J., Xie, J., Zhang, Z., & Tian, X. (2021). δ -Opioid receptor activation ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis by inhibiting the MAPK/caspase-3 pathway in BV2 microglial cells. *Experimental Brain Research*, 239(2), 401–412. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05983-9>

Cherian, L., Wang, Y., Fakuda, K., Leurgans, S., Aggarwal, N., & Morris, M. (2019). Mediterranean-Dash Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) Diet Slows Cognitive Decline After Stroke. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 6(4), 267–273. <https://doi.org/10.14283/jpad.2019.28>

Cho, H., Jung, H., Lee, H., Yi, H. C., Kwak, H., & Hwang, K. T. (2015). Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. *Food & Function*, 6(5), 1675–1683. <https://doi.org/10.1039/C5FO00274E>

Choi, Y. H., & Park, H. Y. (2012). Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-31>

Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., & Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>

Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>

Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

D'Acquisto, F., Sautebin, L., Iuvone, T., Di Rosa, M., & Carnuccio, R. (1998). Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor- κ B activation in J774 macrophages. *FEBS Letters*, 440(1), 76–80. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01407-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01407-0)

Darwish, S. F., Elbadry, A. M. M., Elbokhomy, A. S., Salama, G. A., & Salama, R. M. (2023). The dual face of microglia (M1/M2) as a potential target in the protective effect of nutraceuticals against neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging*, 4, 1231706. <https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1231706>

DaSilva, N. A., Nahar, P. P., Ma, H., Eid, A., Wei, Z., Meschwitz, S., Zawia, N. H., Slitt, A. L., & Seeram, N. P. (2019). Pomegranate ellagitannin-gut microbial-derived metabolites, urolithins, inhibit neuroinflammation in vitro. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 185–195. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1360558>

Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (1995). REVIEW ■: Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *The Neuroscientist*, 1(1), 7–18. <https://doi.org/10.1177/107385849500100103>

de Lorgeril, M., Renaud, S., Salen, P., Monjaud, I., Mamelle, N., Martin, J. L., Guidollet, J., Touboul, P., & Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*, 343(8911), 1454–1459. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92580-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92580-1)

de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.-L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999). Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction. *Circulation*, 99(6), 779–785. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.6.779>

- De Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Cytokines and Pain. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 61(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)
- Devranis, P., Vassilopoulou, E., Tsironis, V., Sotiriadis, P. M., Chourdakis, M., Aivaliotis, M., & Tsolaki, M. (2023). Mediterranean Diet, Ketogenic Diet or MIND Diet for Aging Populations with Cognitive Decline: A Systematic Review. *Life*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/life13010173>
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., & Coutinho-Silva, R. (2020). Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 318(5), C832–C835. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>
- Ding, B. J., Ma, W. W., He, L. L., Zhou, X., Yuan, L. H., Yu, H. L., Feng, J. F., & Xiao, R. (2011). Soybean isoflavone alleviates β -amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor- κ B activity in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(5), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.04.002>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: The devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139(S2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Duggan, M., Torkzaban, B., Ahooyi, T. M., Khalili, K., & Gordon, J. (2020). Age-related neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4), 3131–3141. <https://doi.org/10.1002/jcp.29248>
- Dumas, J. A. (2017). Strategies for Preventing Cognitive Decline in Healthy Older Adults. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 62(11), 754–760. <https://doi.org/10.1177/0706743717720691>
- Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. (2013). Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, e270418. <https://doi.org/10.1155/2013/270418>
- Everitt, A. V., Hilmer, S. N., Brand-Miller, J. C., Jamieson, H. A., Truswell, A. S., Sharma, A. P., Mason, R. S., Morris, B. J., & Le Couteur, D. G. (2006). Dietary Approaches that Delay Age-Related Diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 1(1), 11–31. <https://doi.org/10.2147/ciia.2006.1.1.11>
- Falsig, J., Pörzgen, P., Lund, S., Schrattenholz, A., & Leist, M. (2006). The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 893–907. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03622.x>
- Feinstein, D. L., Reis, D. J., & Regunathan, S. (1999). Inhibition of Astroglial Nitric Oxide Synthase Type 2 Expression by Idazoxan. *Molecular Pharmacology*, 55(2), 304–308. <https://doi.org/10.1124/mol.55.2.304>
- Feng, Y., Wang, X., Yang, S., Wang, Y., Zhang, X., Du, X., Sun, X., Zhao, M., Huang, L., & Liu, R. (2009). Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *NeuroToxicology*, 30(6), 986–995. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.08.013>
- Ferguson, A. R., Christensen, R. N., Gensel, J. C., Miller, B. A., Sun, F., Beattie, E. C.,

Bresnahan, J. C., & Beattie, M. S. (2008). Cell Death after Spinal Cord Injury Is Exacerbated by Rapid TNF α -Induced Trafficking of GluR2-Lacking AMPARs to the Plasma Membrane. *Journal of Neuroscience*, 28(44), 11391–11400. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3708-08.2008>

García-Villalba, R., Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). Identification of Novel Urolithin Metabolites in Human Feces and Urine after the Intake of a Pomegranate Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(40), 11099–11107. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04435>

Gasperotti, M., Passamonti, S., Tramer, F., Masuero, D., Guella, G., Mattivi, F., & Vrhovsek, U. (2015). Fate of Microbial Metabolites of Dietary Polyphenols in Rats: Is the Brain Their Target Destination? *ACS Chemical Neuroscience*, 6(8), 1341–1352. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00051>

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2013.00045>

Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/35081564>

Gong, Z., Huang, J., Xu, B., Ou, Z., Zhang, L., Lin, X., Ye, X., Kong, X., Long, D., Sun, X., He, X., Xu, L., Li, Q., & Xuan, A. (2019). Urolithin A attenuates memory impairment and neuroinflammation in APP/PS1 mice. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1450-3>

Graeber, M. B. (2010). Changing Face of Microglia. *Science*, 330(6005), 783–788. <https://doi.org/10.1126/science.1190929>

Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Gołąbek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M., & Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 274(2), 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6)

Guilini, C., Baehr, C., Schaeffer, E., Gizzi, P., Rufi, F., Haiech, J., Weiss, E., Bonnet, D., & Galzi, J.-L. (2015). New Fluorescein Precursors for Live Bacteria Detection. *Analytical Chemistry*, 87(17), 8858–8866. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02100>

Haas, J., Storch-Hagenlocher, B., Biessmann, A., & Wildemann, B. (2002). Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase: Co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with β -amyloid 1–42 in vitro. *Neuroscience Letters*, 322(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00095-2)

Heber, D. (2008). Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*, 269(2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.043>

Henn, A., Lund, S., Hedtjörn, M., Schrattenholz, A., Pörzgen, P., & Leist, M. (2009). *The Suitability of BV2 Cells as Alternative Model System for Primary Microglia Cultures or for Animal Experiments Examining Brain Inflammation.*

<http://kops.uni-konstanz.de/handle/123456789/1163>

Hernández, J. M., Rentero, M. P. Z., Hernández, J. M., & Rentero, M. P. Z. (2018). Bioactive Compounds Contained in Mediterranean Diet and Their Effects on Neurodegenerative Diseases. In *Current Topics on Superfoods*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74084>

Hinderliter, A. L., Babyak, M. A., Sherwood, A., & Blumenthal, J. A. (2011). The DASH Diet and Insulin Sensitivity. *Current Hypertension Reports*, 13(1), 67–73. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0168-5>

Ho, D. J., Calingasan, N. Y., Wille, E., Dumont, M., & Beal, M. F. (2010). Resveratrol protects against peripheral deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 225(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.05.006>

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>

Huang, C.-S., Lii, C.-K., Lin, A.-H., Yeh, Y.-W., Yao, H.-T., Li, C.-C., Wang, T.-S., & Chen, H.-W. (2013). Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 87(1), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0913-4>

Huang, T.-C., Lu, K.-T., Wo, Y.-Y. P., Wu, Y.-J., & Yang, Y.-L. (2011). Resveratrol Protects Rats from A β -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation. *PLOS ONE*, 6(12), e29102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029102>

Hughes, V. (2012). Microglia: The constant gardeners. *Nature*, 485(7400), Article 7400. <https://doi.org/10.1038/485570a>

Hung, C.-W., Chen, Y.-C., Hsieh, W.-L., Chiou, S.-H., & Kao, C.-L. (2010). Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 9, S36–S46. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.006>

Javaid, N., Shah, M. A., Rasul, A., Chauhdary, Z., Saleem, U., Khan, H., Ahmed, N., Uddin, Md. S., Mathew, B., Behl, T., & Blundell, R. (2021). Neuroprotective Effects of Ellagic Acid in Alzheimer's Disease: Focus on Underlying Molecular Mechanisms of Therapeutic Potential. *Current Pharmaceutical Design*, 27(34), 3591–3601. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201112144006>

Jha, M. K., Lee, W.-H., & Suk, K. (2016). Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochemical Pharmacology*, 103, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.11.003>

Jin, F., Wu, Q., Lu, Y.-F., Gong, Q.-H., & Shi, J.-S. (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *European Journal of Pharmacology*, 600(1), 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.005>

Jin, X., Liu, M.-Y., Zhang, D.-F., Zhong, X., Du, K., Qian, P., Gao, H., & Wei, M.-J. (2019). Natural products as a potential modulator of microglial polarization in neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 145, 104253. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104253>

- Jönsson, T., Granfeldt, Y., Ahrén, B., Branell, U.-C., Pålsson, G., Hansson, A., Söderström, M., & Lindeberg, S. (2009). Beneficial effects of a Paleolithic diet on cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: A randomized cross-over pilot study. *Cardiovascular Diabetology*, 8(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-35>
- Jönsson, T., Granfeldt, Y., Erlanson-Albertsson, C., Ahrén, B., & Lindeberg, S. (2010). A paleolithic diet is more satiating per calorie than a mediterranean-like diet in individuals with ischemic heart disease. *Nutrition & Metabolism*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-85>
- Kähkönen, M., Kylli, P., Ollilainen, V., Salminen, J.-P., & Heinonen, M. (2012). Antioxidant Activity of Isolated Ellagitannins from Red Raspberries and Cloudberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1167–1174. <https://doi.org/10.1021/jf203431g>
- Kang, J. H., Ascherio, A., & Grodstein, F. (2005). Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Annals of Neurology*, 57(5), 713–720. <https://doi.org/10.1002/ana.20476>
- Kanmogne, M., & Klein, R. S. (2021). Neuroprotective versus Neuroinflammatory Roles of Complement: From Development to Disease. *Trends in Neurosciences*, 44(2), 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.003>
- Karlsson, S., Nånberg, E., Fjaeraa, C., & Wijkander, J. (2010). Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. *The British Journal of Nutrition*, 103(8), 1102–1109. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992935>
- Kerr, J. S., Adriaanse, B. A., Greig, N. H., Mattson, M. P., Cader, M. Z., Bohr, V. A., & Fang, E. F. (2017). Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends in Neurosciences*, 40(3), 151–166. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.01.002>
- Kheirouri, S., & Alizadeh, M. (2022). MIND diet and cognitive performance in older adults: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(29), 8059–8077. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1925220>
- Kim, H. M., Lee, E. H., Shin, T. Y., Lee, K. N., & Lee, J. S. (1998). Taraxacum Officinale Restores Inhibition of Nitric Oxide Production by Cadmium in Mouse Peritoneal Macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 20(2), 283–297. <https://doi.org/10.3109/08923979809038545>
- Klimczak, E., & Król, B. (2010). Macro- and microelements in determination of different forms of ellagic acid in by-products from strawberry processing. *Zywnosc.Nauka.Technologia.Jakosc/Food.Science.Technology.Quality*, 17. <https://doi.org/10.15193/zntj/2010/71/081-094>
- Knoops, K. T. B., de Groot, L. C. P. G. M., Kromhout, D., Perrin, A.-E., Moreiras-Varela, O., Menotti, A., & van Staveren, W. A. (2004). Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and WomenThe HALE Project. *JAMA*, 292(12), 1433–1439. <https://doi.org/10.1001/jama.292.12.1433>
- Koch, M., & Jensen, M. K. (2016). Association of the MIND diet with cognition and risk of Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, 27(3), 303. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000304>

- Kong, L.-Y., McMillian, M. K., Maronpot, R., & Hong, J.-S. (1996). Protein tyrosine kinase inhibitors suppress the production of nitric oxide in mixed glia, microglia-enriched or astrocyte-enriched cultures. *Brain Research*, 729(1), 102–109. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00417-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00417-9)
- Konsman, J. P. (2022). Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! *Pharmaceuticals*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ph15020140>
- Kontis, V., Bennett, J. E., Mathers, C. D., Li, G., Foreman, K., & Ezzati, M. (2017). Future life expectancy in 35 industrialised countries: Projections with a Bayesian model ensemble. *The Lancet*, 389(10076), 1323–1335. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32381-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32381-9)
- Koppula, S., Kumar, H., Kim, I. S., & Choi, D.-K. (2012). Reactive Oxygen Species and Inhibitors of Inflammatory Enzymes, NADPH Oxidase, and iNOS in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*, 2012, e823902. <https://doi.org/10.1155/2012/823902>
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(1), 48–60. <https://doi.org/10.5056/jnm18087>
- Kwok, A. L. X., Balasooriya, H., & Ng, K. (2023). Efficacy of ellagic acid and ellagitannins on diabetes mellitus: A meta-analysis of preclinical and clinical trials. *Food Bioscience*, 53, 102573. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102573>
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>
- Larrosa, M., González-Sarriás, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín-Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P., & Espín, J. C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.012>
- Lee, K.-W., Jung, S. Y., Choi, S.-M., & Yang, E. J. (2012). Effects of ginsenoside Re on LPS-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-196>
- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3), 253–263. <https://doi.org/10.1002/glia.20928>
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), Article 7113. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lindeberg, S., Jönsson, T., Granfeldt, Y., Borgstrand, E., Soffman, J., Sjöström, K., & Åhrén, B. (2007). A Palaeolithic diet improves glucose tolerance more than a Mediterranean-like diet in individuals with ischaemic heart disease. *Diabetologia*, 50(9), 1795–1807. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0716-y>
- Liu, R. T., Tang, J. T., Zou, L. B., Fu, J. Y., & Lu, Q. J. (2011). Liquiritigenin attenuates the learning and memory deficits in an amyloid protein precursor transgenic mouse model and the underlying mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 669(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.051>

- Loughrey, D. G., Lavecchia, S., Brennan, S., Lawlor, B. A., & Kelly, M. E. (2017). The Impact of the Mediterranean Diet on the Cognitive Functioning of Healthy Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition*, 8(4), 571–586. <https://doi.org/10.3945/an.117.015495>
- Love, S., Louis, D., & Ellison, D. W. (2008). *Greenfield's Neuropathology, 2-Volume Set, Eighth Edition*. CRC Press.
- Lv, M., Shi, C., Pan, F., Shao, J., Feng, L., Chen, G., Ou, C., Zhang, J., & Fu, W. (2019). Urolithin B suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma through inducing the inactivation of Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 17273–17282. <https://doi.org/10.1002/jcb.28989>
- Malpartida, A. B., Williamson, M., Narendra, D. P., Wade-Martins, R., & Ryan, B. J. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(4), 329–343. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.007>
- Manousou, S., Stål, M., Larsson, C., Mellberg, C., Lindahl, B., Eggertsen, R., Hulthén, L., Olsson, T., Ryberg, M., Sandberg, S., & Nyström, H. F. (2018). A Paleolithic-type diet results in iodine deficiency: A 2-year randomized trial in postmenopausal obese women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2017.134>
- Marlow, G., Ellett, S., Ferguson, I. R., Zhu, S., Karunasinghe, N., Jesuthasan, A. C., Han, D. Y., Fraser, A. G., & Ferguson, L. R. (2013). Transcriptomics to study the effect of a Mediterranean-inspired diet on inflammation in Crohn's disease patients. *Human Genomics*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-7-24>
- Martínez-González, M. A., García-López, M., Bes-Rastrollo, M., Toledo, E., Martínez-Lapiscina, E. H., Delgado-Rodríguez, M., Vazquez, Z., Benito, S., & Beunza, J. J. (2011). Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: A Spanish cohort. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(4), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.10.005>
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, 114(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Milner, J. A. (1994). Reducing the Risk of Cancer. In I. Goldberg (Ed.), *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals* (pp. 39–70). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2073-3_3
- Mitsou, E. K., Kakali, A., Antonopoulou, S., Mountzouris, K. C., Yannakoulia, M., Panagiotakos, D. B., & Kyriacou, A. (2017). Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *British Journal of Nutrition*, 117(12), 1645–1655. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001593>
- Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Barnes, L. L., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet slows cognitive decline with aging. *Alzheimer's & Dementia*, 11(9), 1015–1022. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.04.011>
- Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 11(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.11.009>

- Munoz-Garcia, M. I., Toledo, E., Razquin, C., Dominguez, L. J., Maragarone, D., Martinez-Gonzalez, J., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2019). "A priori" Dietary Patterns and Cognitive Function in the SUN Project. *Neuroepidemiology*, *54*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1159/000502608>
- Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, *10*(3), 94–100. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00023-0)
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Okello, E. J., Leylabi, R., & McDougall, G. J. (2012). Inhibition of acetylcholinesterase by green and white tea and their simulated intestinal metabolites. *Food & Function*, *3*(6), 651–661. <https://doi.org/10.1039/C2FO10174B>
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.-U., Jönsson, B., Group, on behalf of the C. study, & Council, the E. B. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology*, *19*(1), 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03590.x>
- Ostbye, T., & Crosse, E. (1994). Net economic costs of dementia in Canada. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, *151*(10), 1457–1464.
- Otten, J., Ryberg, M., Mellberg, C., Andersson, T., Chorell, E., Lindahl, B., Larsson, C., Holst, J. J., & Olsson, T. (2019). Postprandial levels of GLP-1, GIP and glucagon after 2 years of weight loss with a Paleolithic diet: A randomised controlled trial in healthy obese women. *European Journal of Endocrinology*, *180*(6), 419–429. <https://doi.org/10.1530/EJE-19-0082>
- Pan, Y., Shen, J., Cai, X., Chen, H., Zong, G., Zhu, W., Jing, J., Liu, T., Jin, A., Wang, Y., Meng, X., Yuan, C., & Wang, Y. (2023). Adherence to a healthy lifestyle and brain structural imaging markers. *European Journal of Epidemiology*, *38*(6), 657–668. <https://doi.org/10.1007/s10654-023-00992-8>
- Panagiotakos, D. B., Chrysohoou, C., Pitsavos, C., & Stefanadis, C. (2006). Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: The ATTICA study. *Nutrition*, *22*(5), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.11.004>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Partridge, L., Deelen, J., & Slagboom, P. E. (2018). Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*, *561*(7721), Article 7721. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>
- Pistollato, F., Iglesias, R. C., Ruiz, R., Aparicio, S., Crespo, J., Lopez, L. D., Manna, P. P., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacological Research*, *131*, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.012>
- Piowarski, J. P., Stanisławska, I., Granica, S., Stefańska, J., & Kiss, A. K. (2017). Phase II Conjugates of Urolithins Isolated from Human Urine and Potential Role of β -Glucuronidases

in Their Disposition. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(6), 657–665. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.075200>

Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (n.d.). *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*.

Qin, J., Ma, Z., Chen, X., & Shu, S. (2023). Microglia activation in central nervous system disorders: A review of recent mechanistic investigations and development efforts. *Frontiers in Neurology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2023.1103416>

Qin, X.-Y., Cheng, Y., & Yu, L.-C. (2012). Potential protection of green tea polyphenols against intracellular amyloid beta-induced toxicity on primary cultured prefrontal cortical neurons of rats. *Neuroscience Letters*, 513(2), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.029>

Qin, Y., Qiu, J., Wang, P., Liu, J., Zhao, Y., Jiang, F., & Lou, H. (2021). Impaired autophagy in microglia aggravates dopaminergic neurodegeneration by regulating NLRP3 inflammasome activation in experimental models of Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 91, 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.010>

Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>

Rao, K. M. K. (2000). MOLECULAR MECHANISMS REGULATING iNOS EXPRESSION IN VARIOUS CELL TYPES. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3(1), 27–58. <https://doi.org/10.1080/109374000281131>

Rawlinson, C., Jenkins, S., Thei, L., Dallas, M. L., & Chen, R. (2020). Post-Ischaemic Immunological Response in the Brain: Targeting Microglia in Ischaemic Stroke Therapy. *Brain Sciences*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/brainsci10030159>

Rizzo, F. R., Musella, A., De Vito, F., Fresegna, D., Bullitta, S., Vanni, V., Guadalupi, L., Stampanoni Bassi, M., Buttari, F., Mandolesi, G., Centonze, D., & Gentile, A. (2018). Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plasticity*, 2018, e8430123. <https://doi.org/10.1155/2018/8430123>

Rothwell, N. J., & Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends in Neurosciences*, 18(3), 130–136. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93890-A](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93890-A)

Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-dit-Félix, A. A., Williams, E. G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., Aebischer, P., Sandi, C., Rinsch, C., & Auwerx, J. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nm.4132>

Salari-Moghaddam, A., Keshteli, A. H., Mousavi, S. M., Afshar, H., Esmailzadeh, A., & Adibi, P. (2019). Adherence to the MIND diet and prevalence of psychological disorders in adults. *Journal of Affective Disorders*, 256, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.05.056>

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). Publisher Correction: The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology &*

Hepatology, 18(9), 671. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00481-x>

Sanchez-Morate, E., Gimeno-Mallench, L., Stromsnes, K., Sanz-Ros, J., Román-Domínguez, A., Parejo-Pedrajas, S., Inglés, M., Olaso, G., Gambini, J., & Mas-Bargues, C. (2020). Relationship between Diet, Microbiota, and Healthy Aging. *Biomedicines*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080287>

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>

Schröder, H., Marrugat, J., Vila, J., Covas, M. I., & Elosua, R. (2004). Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3355–3361. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3355>

Seeram, D. H., Risa N. Schulman, Navindra P. (Ed.). (2006). *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420009866>

Seeram, N. P. (2008). Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 630–635. <https://doi.org/10.1021/jf072504n>

Seeram, N. P., Aronson, W. J., Zhang, Y., Henning, S. M., Moro, A., Lee, R., Sartippour, M., Harris, D. M., Rettig, M., Suchard, M. A., Pantuck, A. J., Beldegrun, A., & Heber, D. (2007). Pomegranate Ellagitannin-Derived Metabolites Inhibit Prostate Cancer Growth and Localize to the Mouse Prostate Gland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7732–7737. <https://doi.org/10.1021/jf071303g>

Seeram, N. P., Lee, R., & Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, 348(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.029>

Servick, K. (2018). *Do gut bacteria make a second home in our brains?* <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaw0147>

Sheng, W., Zong, Y., Mohammad, A., Ajit, D., Cui, J., Han, D., Hamilton, J. L., Simonyi, A., Sun, A. Y., Gu, Z., Hong, J.-S., Weisman, G. A., & Sun, G. Y. (2011). Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA2-IIA expression in astrocytes and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-121>

Shindler, K. S., Ventura, E., Dutt, M., Elliott, P., Fitzgerald, D. C., & Rostami, A. (2010). Oral Resveratrol Reduces Neuronal Damage in a Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 30(4), 328–339. <https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e3181f7f833>

Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S. A., & DeLong, M. R. (2012). Parkinson's Disease Therapeutics: New Developments and Challenges Since the Introduction of Levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.212>

Song, G. J., & Suk, K. (2017). Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2017.00139>

Steinman, L. (2008). Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *The*

Journal of Clinical Investigation, 118(11), 3557–3563. <https://doi.org/10.1172/JCI36532>

Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., & Stern, C. D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, 406(6791), Article 6791. <https://doi.org/10.1038/35017617>

Svetkey, L. P., Simons-Morton, D., Vollmer, W. M., Appel, L. J., Conlin, P. R., Ryan, D. H., Ard, J., Kennedy, B. M., & for the DASH Research Group. (1999). Effects of Dietary Patterns on Blood Pressure: Subgroup Analysis of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Randomized Clinical Trial. *Archives of Internal Medicine*, 159(3), 285–293. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.3.285>

Teodoro, A. J. (2019). Bioactive Compounds of Food: Their Role in the Prevention and Treatment of Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, e3765986. <https://doi.org/10.1155/2019/3765986>

Thameem Dheen, S., Kaur, C., & Ling, E.-A. (2007). Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(11), 1189–1197. <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>

Timmerman, R., Burm, S. M., & Bajramovic, J. J. (2018). An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00242>

Tomás-Barberán, F. A., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2014). Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6535–6538. <https://doi.org/10.1021/jf5024615>

Toney, A. M., Albusharif, M., Works, D., Polenz, L., Schlange, S., Chaidez, V., Ramer-Tait, A. E., & Chung, S. (2021). Differential Effects of Whole Red Raspberry Polyphenols and Their Gut Metabolite Urolithin A on Neuroinflammation in BV-2 Microglia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010068>

Tosti, V., Bertozzi, B., & Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *The Journals of Gerontology: Series A*, 73(3), 318–326. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx227>

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., & Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population. *New England Journal of Medicine*, 348(26), 2599–2608. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025039>

Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean Dietary Traditions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9(9), 869–873.

Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 3(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>

Vannini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*, 6, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009>

- Vattem, D. a., & Shetty, K. (2005). Biological Functionality of Ellagic Acid: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 234–266. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x>
- Vinderola, G., Sanders, M. E., & Salminen, S. (2022). The Concept of Postbiotics. *Foods*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>
- V. Selma, M., Beltrán, D., García-Villalba, R., C. Espín, J., & A. Tomás-Barberán, F. (2014). Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food & Function*, 5(8), 1779–1784. <https://doi.org/10.1039/C4FO00092G>
- Walsh, J. G., Muruve, D. A., & Power, C. (2014). Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrn3638>
- Wang-sheng, C., Jie, A., Jian-jun, L., Lan, H., Zeng-bao, X., & Chang-qing, L. (2017). Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. *International Immunopharmacology*, 42, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.11.001>
- Whitley, A. C., Stoner, G. D., Darby, M. V., & Walle, T. (2003). Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid—Extensive binding to protein and DNA. *Biochemical Pharmacology*, 66(6), 907–915. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00413-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00413-1)
- Witte, A. V., Kerti, L., Margulies, D. S., & Flöel, A. (2014). Effects of Resveratrol on Memory Performance, Hippocampal Functional Connectivity, and Glucose Metabolism in Healthy Older Adults. *Journal of Neuroscience*, 34(23), 7862–7870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014>
- Wojciechowska, O., & Kujawska, M. (2023). Urolithin A in Health and Diseases: Prospects for Parkinson's Disease Management. *Antioxidants*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antiox12071479>
- Wu, D.-C., Ré, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12132–12137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603670103>
- Xu, J., Yuan, C., Wang, G., Luo, J., Ma, H., Xu, L., Mu, Y., Li, Y., Seeram, N. P., Huang, X., & Li, L. (2018). Urolithins Attenuate LPS-Induced Neuroinflammation in BV2 Microglia via MAPK, Akt, and NF-κB Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(3), 571–580. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03285>
- Yelin, I., Flett, K. B., Merakou, C., Mehrotra, P., Stam, J., Snesrud, E., Hinkle, M., Lesho, E., McGann, P., McAdam, A. J., Sandora, T. J., Kishony, R., & Priebe, G. P. (2019). Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nature Medicine*, 25(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0626-9>
- Yuan, T., Ma, H., Liu, W., Niesen, D. B., Shah, N., Crews, R., Rose, K. N., Vattem, D. A., & Seeram, N. P. (2016). Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(1), 26–33. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00260>
- Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 243–256. <https://doi.org/10.2147/NDT.S75546>

Zhao, W., Wang, Y., Hao, W., Yang, H., Song, X., Zhao, M., & Peng, S. (2015). Preparative isolation and purification of urolithins from the intestinal metabolites of pomegranate ellagitannins by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, *990*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.024>

Zigmond, M. J., Wiley, C. A., & Chesselet, M.-F. (2022). *Neurobiology of Brain Disorders: Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders*. Academic Press.