
Nutricèutics en malalties neurodegeneratives: la metilhidrocotoïna reverteix la polarització microglial M1 pròpia de la neuroinflamació

Modalitat proposada **RECERCA**

Treball Final de Màster

Màster Universitari de Nutrició i Salut

Autor/a: Séfora Barberà Parada

Tutor/a del TFM: Núria Radó Trilla

Tutor/a extern: Jordi Blanco Pérez

Febrer-Juny 2023



Aquesta obra està subjecta a una llicència de Reconeixement-NoComercial-Compartir (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/deed.ca>)

Índex

Resum	4
Abstract	5
1. Introducció	6
2. Hipòtesi i objectius	12
3. Materials i mètodes	13
4. Resultats	17
5. Discussió	22
6. Conclusions	25
7. Bibliografia	27

Resum

L'impacte de la nutrició i els nutricèutics en la salut s'ha abordat en diversos àmbits, però roman poc explorat per pal·liar trastorns neurodegeneratius. Aquests, s'associen en part a una neuro-inflamació atribuïda a una polarització microglial anormalment sostinguda cap a un estat proinflamatori, conegut com M1. El present estudi pretén avaluar els efectes de la metilhidrocotoïna, un metabòlit aïllat de la Cascara sagrada (*Rhamnus purshiana*), com a protector davant la polarització M1. Estudis previs *in silico* el proposen com agonista de PPAR γ , que desencadena efectes antiinflamatoris.

Per a tal fi, es van emprar cultius de la línia cel·lular microglial BV2 i es va avaluar la citotoxicitat mitjançant assajos MTT amb diferents concentracions de metilhidrocotoïna. Els efectes antiinflamatoris es van estudiar amb cèl·lules estimulades amb LPS durant 24h a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, després d'un pretractament de 2h amb metilhidrocotoïna. Els intermediaris d'inflamació es van determinar per qRT-PCR i *Western Blot*. Els resultats van mostrar que el tractament amb metilhidrocotoïna redueix significativament l'expressió induïda per LPS de marcadors inflamatoris com IL6, MCP1, iNOS i TNF- α , al mateix temps que modula l'activitat de factors de transcripció com NF κ B, regulat en part per l'activació de PPAR γ .

En conclusió, els resultats obtinguts aporten un enfocament important en el desenvolupament de fàrmacs amb efectes reversibles específics de la polarització M1 microglial cronificada. Futures investigacions consideraran l'avaluació dels seus efectes neuroprotectors dilucidant el seu efecte *in vivo*, tot ampliant un àmbit de coneixement que podria augmentar les possibilitats de tractament per al gran espectre de trastorns neurodegeneratius.

Paraules clau: nutricèutic, micròglia, neuroinflamació, PPAR γ , NF κ B

Abstract

The impact of nutrition and nutraceuticals on health has been addressed in numerous fields, but it remains less explored related to the development of neurodegenerative disorders. These diseases are partially associated to a neuroinflammation attributed to an abnormally sustained microglial polarization towards a pro-inflammatory state, known as M1. The present study aims to evaluate the effects of methylhydrocotoin, an isolated metabolite from *Cascara sagrada* (*Rhamnus purshiana*), as a protectant against M1 pro-inflammatory microglia. Previous *in silico* modelling studies have predicted that methylhydrocotoin might work as a PPAR γ transcription factor activator, which triggers anti-inflammatory effects, suggesting a beneficial effect of this compound.

For experimental procedures, BV2 microglial cell line cultures were used and cytotoxicity was assessed through MTT assays with different concentrations of methylhydrocotoin. Anti-inflammatory effects were evaluated with 24h LPS-stimulated cells at 0,5 μ g/mL concentration, after a 2h methylhydrocotoin pre-treatment. Inflammation mediators were studied with qRT-PCR and *Western Blot* methods.

Results showed that methylhydrocotoin treatment significantly reduces LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators as IL6, MCP1, iNOS and TNF- α , while modulating the activity of transcription factors such as NF- κ B, which is involved in inflammatory responses and is regulated through PPAR γ activation.

As concluding remarks, results obtained bring an important approach into drug development with specific reversing effects of chronic microglial M1 polarization. Future research should consider evaluating neuroprotective effects of methylhydrocotoin elucidating its potential effects *in vivo*, expanding a field of knowledge that could increase the treatment possibilities for the big spectra of neurodegenerative disorders.

Key words: nutraceutical, microglia, neuroinflammation, PPAR γ , NF κ B

1. Introducció

El paper de la dieta en les malalties neurodegeneratives

Les malalties neurodegeneratives són un grup d'afeccions del sistema nerviós que cada cop són més presents a la nostra societat. Estan caracteritzades per una pèrdua d'activitat neuronal, causant un declivi progressiu de la funció cognitiva. Les demències, entre les quals destaca l'Alzheimer, han arribat a suposar la setena causa de mort al món i afecten a més de 55 milions de persones. Actualment són de les principals causes de discapacitat i dependència entre la gent gran i repercuteixen directament a les vides d'aquells qui les pateixen i als del seu voltant, sovint els únics que duen la responsabilitat de tenir-ne cura (1). L'estigmatització d'aquest grup de malalties i el fals pensament que només afecten a la població envellida fan que, també amb un raonament equívoc, la societat cregui que són un problema llunyà o secundari i això alça noves barreres en el desenvolupament i investigació de les malalties neurodegeneratives, que sovint tenen un inici molt més prematur del que creiem (1).

D'entre els factors de risc que s'han relacionat amb el desenvolupament d'aquestes patologies, s'han descrit comorbiditats com l'obesitat, la hipertensió o malalties cardiovasculars i d'altres determinants d'estil de vida com el tabaquisme i la baixa activitat física. A més a més, s'ha descrit una possible relació entre una condició nutricional alterada, com la malnutrició, determinades deficiències nutricionals o desregulacions del metabolisme de la glucosa amb una major predisposició a processos neurodegeneratius (2).

Per exemple, la literatura recent ha posat en relleu un ampli ventall d'estudis en què es descriu una associació inversa entre la dieta Mediterrània i la incidència de demències, així com el consum de determinats aliments o begudes, com el peix o el te (2-4). S'atribueix efectes neuroprotectors a la gran presència en la dieta d'àcids grassos mono i poli-insaturats, vitamines i compostos fenòlics, entre d'altres (2-4). Diversos estudis proposen també el paper dels cossos cetònics com a atenuants de la situació de desregulació metabòlica al Sistema Nervios Central (SNC) en situació de neurodegeneració, els quals actuarien amb un cert paper antioxidant per mecanismes encara poc coneguts (5,6). L'estrès oxidatiu present als primers estadis de progrés de les malalties neurodegeneratives, d'altra banda, s'ha associat a un metabolisme de la glucosa alterat en què està implicat el dany mitocondrial i que podria pal·liar-se en un ambient restrictiu en glucosa (5,6), suggerint una correlació existent entre l'alteració del

metabolisme de la glucosa i, consegüentment, de la resistència a la insulina, com a factors de risc de l'avenç d'aquestes patologies (2).

Compostos bioactius de la dieta

Compost bioactiu és el terme pel qual es coneixen a un seguit de substàncies aïllades que presenten una determinada activitat biològica i recentment se'ls ha donat una gran rellevància pel fet que en destaca la possibilitat de treure'n beneficis per a l'ús humà, obrint la porta a diverses finalitats. La procedència dels compostos bioactius pot ser diversa, tot i que hi destaquen les plantes i els fongs, dels quals se n'extreuen i aïllen metabòlits de naturalesa diversa, com els compostos fenòlics, alcaloides, saponines, glicoproteïnes, terpenoides, àcids grassos o polisacàrids, entre altres (7).

El paper dels compostos bioactius en el desenvolupament de fàrmacs i nutricèutics

La dieta és molt rica en aquest tipus de compostos, els quals poden presentar activitats concretes que modulin determinades vies metabòliques implicades en el desenvolupament de malalties i, per tant, es converteixen en un àmbit de recerca molt interessant per al desenvolupament de nous fàrmacs o la formulació de nous suplementos dietaris per al disseny de nutricèutics amb una base científica sòlida. En aquest context, hi ha diferents termes que es fan servir i que causen certa confusió i controvèrsia. El concepte de nutricèutic té diverses definicions que convergeixen en el fet que ha de contribuir a la prevenció o tractament d'una malaltia o desordre, però al mateix temps no es tracta de substàncies sintètiques ni sol estar pensat per ser administrat de manera aïllada (8). Sense anar tan lluny, compostos com la penicil·lina, la quinina pel tractament de la malària o els salicilats pel tractament de febres, són precursors de fàrmacs que tenen el seu origen en l'aïllament de compostos bioactius i la caracterització de la seva funcionalitat (8,9). D'altres compostos, com el resveratrol, la curcumina o l'apigenina, són substàncies amb activitat demostrada com antioxidants o immunomoduladors que no es poden tractar com a fàrmacs, però els quals tenen una activitat de gran interès per a dissenyar noves teràpies combinades (7,10). Molts dels compostos que s'estudien amb aquest objectiu contribueixen a posicionar la nutrició com a eina preventiva però també reguladora de la salut a mans de la recomanació dels experts. Tot i així, s'ha de tenir en compte que les dosis de treball en el disseny de nutricèutics o fàrmacs derivats de compostos naturals no són equivalents a les dosis que es poden trobar a la dieta derivades del consum normal (8,9).

La neuroinflamació: diana d'acció de compostos bioactius

La neuroinflamació forma part del procés natural de regulació del sistema immunitari al SNC, és a dir, en situació d'homeòstasi es tracta de la resposta de les cèl·lules glia residents (microglia i astròcits), cèl·lules endotelials i immunitàries de la perifèria, davant d'un atac o dany a l'organisme. Aquest procés, però, té diferents graus d'afectació. Una resposta fisiològica normal estableix la neuroinflamació com un efector més en el neurodesenvolupament i la capacitat adaptativa i plasticitat del sistema nerviós. En canvi, una situació d'anormalitat i sobreestimulació d'aquest sistema el postulen com un agreujant o promotor de determinades patologies (11).

Malalties neurodegeneratives, neuroinflamació i el paper de la glia

Un creixent ventall d'investigacions recents han establert estretes relacions entre les malalties neurodegeneratives i la presència de neuroinflamació en el seu desenvolupament o agreujament (12–15). Concretament, alguns estudis han relacionat les alteracions mutacionals a nivell de la glia, astròcits o microglia, amb el desenvolupament de demència frontotemporal i s'han desenvolupat mecanismes de detecció en líquid cefalorraquidi de biomarcadors derivats d'aquesta activació anormal de la glia (16). També s'ha focalitzat l'atenció en el paper de la neuroinflamació mediada per les cèl·lules de la microglia en la malaltia d'Alzheimer (AD), la qual contribueix amb el 60-70% dels casos de demència mundials. El descobriment d'elevats marcadors proinflamatoris en els pacients amb AD ha dut a estudiar el paper de les variacions fenotípiques de la microglia en la neuroinflamació present en el transcurs de la patologia (14,15). La principal característica d'aquest estat inflamatori, en aquest cas molt possiblement causat per la interacció amb les proteïnes β -amiloides, és la seva cronicitat en el temps, causada pel que sembla una polarització anormal del fenotip de la microglia cap a un estat proinflamatori M1 (11,14,15,17).

Donada aquesta activació, hi ha una elevada expressió de mediadors proinflamatoris com són IL6 (interleucina-6) , IL-1a (interleucina-1a), TNF (Factor de Necrosi Tumoral) entre d'altres. La resposta inflamatòria de la microglia també s'ha proposat com un amplificador d'altres factors implicats en processos neurodegeneratius, com són l'estrès oxidatiu i l'afavoriment del cúmul de nous agregats proteics, generant un ambient de retroalimentació del dany (14,18). A més a més, afavoreix l'alteració d'altres comunitats cel·lulars com poden ser els astròcits, contribuint al desenvolupament de les anomenades astrogliopaties, que s'han descrit com disfuncions d'aquesta població cel·lular molt relacionades amb una pèrdua de comunicació neuronal (19,20).

Models d'estudi *in vitro* per a l'avaluació de la neuroinflamació

La micròglia és de les comunitats cel·lulars del SNC que estan més estretament relacionades amb la regulació del seu estat inflamatori i, com s'ha esmentat anteriorment, la investigació recent ha definit el seu balanç fenotípic com un denominador comú en la cronificació de la neuroinflamació en les malalties neurodegeneratives, tot i que no s'ha esclarit la seva relació causa-conseqüència (11,14).

La dicotomia clàssicament atribuïda als fenotips de la micròglia (**Figura 1**), que ballarien entre un estat proinflamatori M1 i un antiinflamatori M2, passant per l'estat neutral M0, és un viratge que ve marcat per senyals del seu entorn, principalment causat per citocines i d'altres marcadors supressors o activadors de la seva activitat. El bagatge fenotípic descrit actualment, però, comprèn una varietat d'estats intermedis que acaben definint la resposta (proinflamatòria o antiinflamatòria) com un balanç entre la població de cèl·lules amb un estat de polarització o altre. Una de les línies cel·lulars més emprades per als estudis *in vitro* és la línia cel·lular BV2. Aquesta línia cel·lular respon a l'estímul proinflamatori causat per lipopolisacàrids (LPS) i s'ha utilitzat àmpliament per als estudis de neuroinflamació (21).

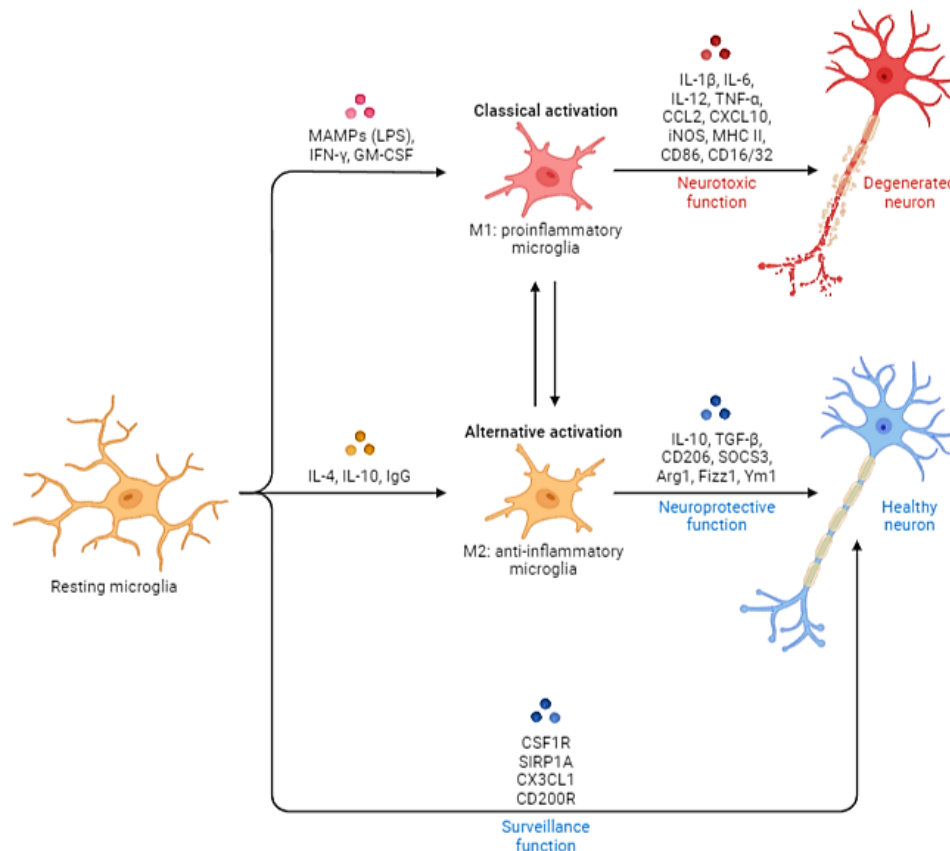


Figura 1. Simplificació de la polarització de la micròglia. Obtingut i editat de BioRender.com.

L'avantatge d'aquest tipus d'experimentació *in vitro* passa per la simplificació en els procediments, l'ampli control de variables i la minimització de les implicacions ètiques, donat l'ús de cèl·lules immortalitzades. Tot i els inconvenients de no representar al cent per cent la realitat d'un entorn fisiològic normal, donada la simplificació de l'ambient i la inexistència d'interaccions amb altres comunitats cel·lulars, un monocultiu pot dur a una comprensió profunda dels mecanismes moleculars implicats en determinades respostes i donar una aproximació inicial de la toxicitat i eficàcia de determinats compostos (21).

Compostos bioactius naturals com a atenuants de la neuroinflamació

Donada la complexitat de l'entramat de factors que estan implicats en el desenvolupament de les malalties neurodegeneratives, la recerca de nous tractaments i nous focus terapèutics és una necessitat de la societat actual. En aquest context, la troballa de substàncies d'origen natural, i que a més a més podríem trobar de forma habitual en la dieta sense haver de modificar-les, amb propietats reguladores de la neuroinflamació seria un gran pas cap al perfeccionament de les teràpies actuals.

Com s'ha comentat anteriorment, gran part d'aquests compostos bioactius són polifenols. D'entre ells, el resveratrol, provinent del raïm i abundant en el vi, presenta activitat antiinflamatòria i antioxidant amb una possible acció en la millora de la funció mitocondrial sota condicions de patologia com la malaltia d'Alzheimer o de Parkinson, caracteritzades per la formació d'agregats proteics(2,4). Així mateix, d'altres compostos presents en la dieta presenten efectes beneficiosos similars, però els mecanismes pels quals actuen no estan clarament definits, fet que redueix la potencialitat del seu ús com a base de fàrmacs dirigits, però sí que reafirma la importància de la dieta en la salut del sistema nerviós i obre portes a nous estudis (2,4).

Arrel de la importància de definir les vies moleculars subjacents als efectes d'aquest tipus de compostos en el SNC, la identificació prèvia de dianes concretes que participen en l'avenç de les malalties neurodegeneratives és un enfocament diferent que permet fer una recerca guiada de compostos. Estudis preliminars de modelatge *in silico* encara per publicar, han permès predir un seguit de molècules reguladores de la inflamació a través de l'activació del factor de transcripció PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ). Aquesta és una de les vies de regulació proposades com a intermediàries en els fenòmens de neuroinflamació presents en les malalties neurodegeneratives, postulant els agonistes de PPAR γ com a atenuants de la inflamació glial (17). Els mecanismes subjacents a aquests efectes tenen a veure amb la regulació de NF κ B (Factor nuclear potenciador de la cadena lleugera kappa de cèl·lules B activades) com a principal factor de transcripció responsable de la síntesi d'intermediaris d'inflamació i

també amb un interès creixent per al tractament d'afeccions del SNC (22). D'entre els agonistes estudiats, la metilhidrocotoïna (**Figura 2**) és un compost de tipus benzofenona que es pot aïllar de la planta Cascara sagrada (*Rhamnus purshiana*) (23), tot i que també s'ha descrit com a metabòlit secundari derivat del tomàquet (24). Aquesta planta ha sigut tradicionalment emprada com a laxatiu natural, donada la presència de determinats compostos anomenats "cascaròsids" (25,26).

Juntament amb altres substàncies, les prediccions apunten a resultats prometedors, motiu pel qual en el present treball es avaluar en profunditat els mecanismes subjacents als efectes predits i estudiar la possibilitat de trobar nous compostos amb efectes atenuants de la neuroinflamació.

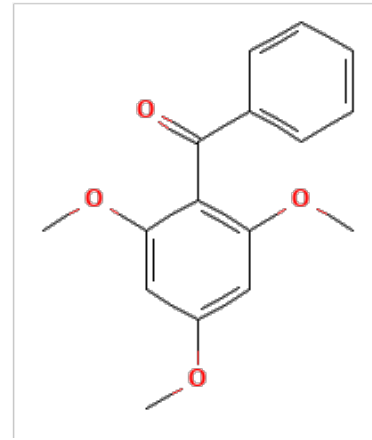


Figura 2. Metilhidrocotoïna. Extret de pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

2. Hipòtesi i objectius

Preguntes d'investigació:

Quina es la capacitat que mostra el compost metilhidrocotoïna de revertir un estat polaritzat de micròglia a M1, induït amb LPS, tenint en compte que...

- ... l'estudi es realitza sobre cultius de cèl·lules de la micròglia BV2;
- ... sota un estímul proinflamatori de LPS;
- ... es comparen els efectes amb un control sense la presència de metilhidrocotoïna;
- ... i que es vol avaluar el seu possible efecte preventiu del procés de neuroinflamació?

Hipòtesi:

L'administració de metilhidrocotoïna pot reduir la resposta proinflamatòria i revertir la polarització microglial M1 induïda per LPS en cèl·lules BV2 mitjançant la disminució de síntesi de marcadors d'inflamació.

Objectiu principal:

Avaluar els efectes de la metilhidrocotoïna, un compost aïllat de la planta *Cascara sagrada* (*Rhamnus purshiana*), com a potencial nutricèutic protector contra la neuroinflamació en un model *in vitro* de cèl·lules de la micròglia.

Objectius específics:

1. Estudiar la citotoxicitat induïda per la metilhidrocotoïna en cultius de cèl·lules microglials BV2 i seleccionar una dosi que no redueixi la viabilitat cel·lular.
2. Estudiar el possible efecte de la metilhidrocotoïna sobre la citotoxicitat causada per LPS.
3. Avaluar el paper protector de la metilhidrocotoïna davant l'estat proinflamatori M1 induït per LPS en un cultiu microglial BV2, mitjançant la determinació dels nivells d'expressió gènica de marcadors proinflammatoris (MCP1, iNOS, IL6 i TNF α) per RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction).
4. Avaluar el paper de la metilhidrocotoïna en la modulació de l'activació del factor de transcripció NF κ B induïda per LPS amb la tècnica *Western Blot*.

3. Materials i mètodes

El present estudi es va desenvolupar en diverses etapes experimentals que van cobrir un temps aproximat d'estudi de 5 mesos. Els diversos processos es detallaran a continuació (**Figura 3**).

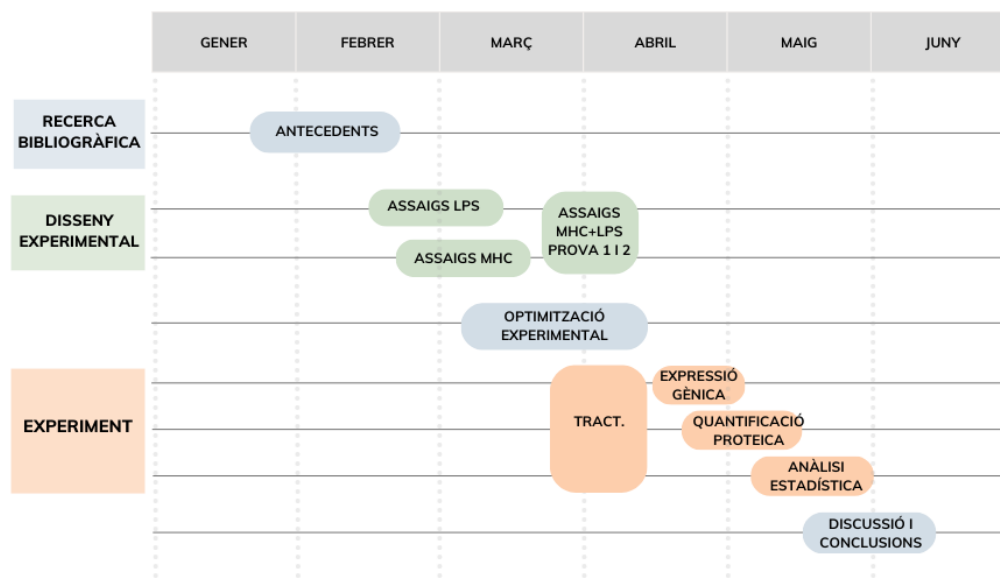


Figura 3. Cronograma de distribució i desenvolupament experimental. Creat amb Canva.com.

Sembra i manteniment del cultiu cel·lular

Per al desenvolupament experimental es van emprar cèl·lules micròglia BV2 d'origen murí C57/BL6 (RRID: CVCL_0182). Les cèl·lules van ser sembrades en medi DMEM1X high glucose (Gibco™, Ref: 21969035) suplementat al 2% d'FBS (Gibco™, Ref: 10082147), a l'1% de L-glutamine (Gibco™, Ref: 25030149) i a l'1% de penicilina-streptomicina (Gibco™, Ref:15140122) i incubades en ambient d'humitat controlada a 37°C al 5% de CO₂. Totes les superfícies de sembrat es van posar a punt amb un tractament previ de recobriment amb Poly-Lysine (Sigma Aldrich, P6282).

Per als experiments (**Figura 4**), les cèl·lules es van sembrar a una densitat de 100.000 cèl·lules/mL, d'acord amb la literatura i resultats previs, en plaques de 24 o 6 pous o plaques individuals de 5mL, segons la determinació a realitzar. Els tractaments pertinents es van iniciar a les 24h de creixement a partir de la sembra. En cada tècnica es prenen de referència pous control amb vehicle (dimetilsulfòxid, DMSO) pel que fa a l'efecte de la metilhidrocotoïna i uns controls sense LPS pel que fa als efectes de l'LPS.

Les condicions estudiades per a cada concentració avaluada són, doncs: CtVH, CtVH+LPS, CS 100 μ M, CS 100 μ M+LPS.

Preparació reactius

La metilhidrocotoïna es va obtenir de Sigma Aldrich (Ref: 5447609) i va ser dissolta en DMSO a una concentració de 50mM (límit de solubilitat en el medi determinat experimentalment) i es va fer servir per a obtenir les concentracions pertinents en els pous, variant la proporció de vehicle (DMSO) per als controls en cada cas. L'LPS es va obtenir del mateix proveïdor (Ref: L4391) i va ser dissolt en Hanks Balanced Salt Solution (Sigma Aldrich, Ref: H9269) a una concentració d'1mg/mL. Ambdós reactius es van emmagatzemar a -20°C.

Assaigs de viabilitat cel·lular MTT

Per a determinar la citotoxicitat del compost es van realitzar assajos d'activitat mitocondrial MTT amb el reactiu Thiazolyl Blue Tetra-zodium Bromide (Sigma Aldrich, Ref: M2128), prèviament dissolt a una concentració de 5mg/mL en PBS estèril (Sigma Aldrich, Ref: P4417). Els assajos de viabilitat es van realitzar en plaques de 24 pous (volum de 800 μ L de medi) en condicions de diverses concentracions de metilhidrocotoïna (400, 200, 100, 50 μ M) i a un temps d'exposició de 24h amb el control pertinent. Es van afegir 40 μ L de reactiu a cada pou a les 22h d'exposició al tractament i es va incubar durant 2h. Completades les 24h es va procedir a retirar el medi i afegir 400 μ L de DMSO i a la lectura d'absorbància a 560nm.

Estimulació amb LPS i tractament amb metilhidrocotoïna

L'avaluació dels efectes antiinflamatoris de la metilhidrocotoïna es va dur a terme amb un procediment de dues hores de preincubació de les cèl·lules amb el compost a la concentració òptima determinada a partir dels assajos de citotoxicitat, és a dir, a una

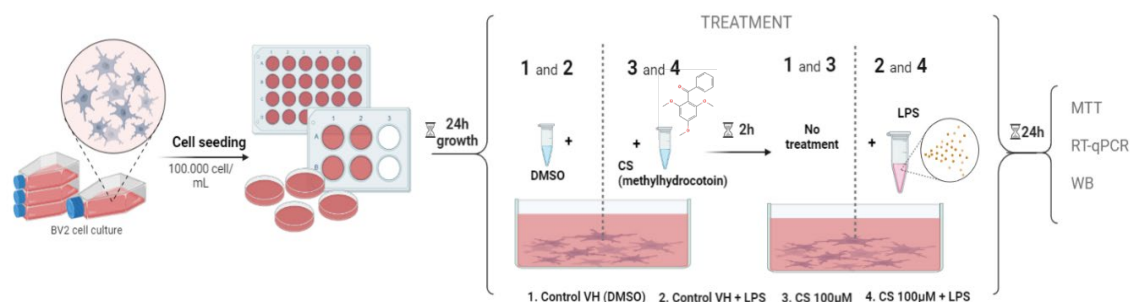


Figura 4. Esquema procedimental. Creat amb Biorender.com.

concentració de 100µM partint d'una dissolució del compost en DMSO de 50mM. Al cap d'aquest temps, es va afegir LPS a una concentració de 0,5µg/mL als pous pertinents, tenint en compte la realització dels controls esmentats anteriorment.

RT-qPCR

Per a l'estudi de l'expressió gènica es van fer servir plaques de 6 pous (2,5mL medi) amb superfície tractada com s'ha esmentat anteriorment. Es va seguir el procés de tractament i es va procedir a la recollida de la mostra a les 24h. Per a la recollida i extracció de l'ARNm es van seguir les instruccions d'acord al kit comercial de SPEEDTOOLS Total RNA Extraction kit (Biotools B&M LABS S.A, Ref: 21.211-4209). La quantificació i determinació de la seva puresa es va determinar amb el Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Per a la seva conversió a cDNA es va fer servir el Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific, Ref: K1642). La RT-qPCR es va realitzar per duplicat de cada mostra fent servir el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kit (ThermoFisher Scientific) i l'aparell Rotor-Gene Q Real-time Q cycler (Qiagen Inc.) fent servir primers específics prèviament emprats en el nostre laboratori (27). Els nivells d'expressió es van analitzar amb el mètode de la $2^{-\Delta\Delta ct}$ per als gens de IL-6, TNF α , MCP1 (Proteïna quimioattractant de monòcits-1) i iNOS (Òxid nítric sintasa induïble) respecte al gen constitutiu de referència GAPDH (Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa) (28).

Western Blot

Per a la identificació i quantificació relativa proteica amb la tècnica de *Western Blot* (equipament de Bio-Rad) es van fer servir plaques individuals de 10mL amb superfície tractada amb Poly-lysine. Transcorregut el període de tractament, es va procedir a la recollida de la mostra en 150µL de RIPA (ThermoFisher, ref: 89900) amb un 1% d'inhibidors de fosfatases (Sigma Aldrich, ref: P5726) i proteases (Sigma Aldrich, ref: P8340). Les mostres van ser centrifugades i se'n va emmagatzemar el sobrenedant, a partir del qual es va fer la quantificació proteica pel mètode de Lowry amb l'ús del Kit Protein Assay DCTM (Bio-Rad, Ref: 5000112). Es va carregar un total de 30ng de proteïna a cada pou d'electroforesi en un gel al 10% d'acrilamida i bis-acrilamida i es va fer la transferència a membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp.) fent servir l'aparell transblot (Bio-Rad), posteriorment bloquejada amb TBS-T al 5% de llet descremada en pols (50mM Tris-HCl, 1.5%NaCl, 0,05% Tween 20 i pH 7.5). Va ser incubada amb anticossos primaris monoclonals (Cell Signalling Technology) anti NF-kB total i forma fosforilada (Pes molecular: 68 KDa) i β -actina (Pes molecular: 43 KDa) i posteriorment

amb anticossos secundaris de conill anti IgG de ratolí amb activitat peroxidasa(Sigma Aldrich, ref: A 2066). Es van revelar els resultats amb l'ImmunStar Chemiluminescence Kit (BioRad) i se'n van obtenir les imatges amb VersaDoc system (BioRad) per obtenir la semiquantificació proteica d'acord a la intensitat de les bandes respecte a la proteïna constitutiva β -actina amb ImageLab.

Anàlisi estadística

Les dades es van analitzar fent servir el programari IBM SPSS Statistics 28.0.0.0. Es van fer les comprovacions pertinents de distribució normal pel test Shapiro-Wilk i d'igualtat de variàncies pel test de Levene i es van fer servir tests paramètrics o no paramètrics d'acord al criteri de normalitat. L'anàlisi estadístic es va efectuar per proves d'ANOVA o Kruskal-Wallis unifactor i seguit de proves *post-hoc* Tuckey o Dunn's test amb un llindar de significança $p < 0.05$. Els resultats es van representar en gràfics de barres que mostren la mitjana i l'error amb el programa GraphPad Prism 8.0.1.

4. Resultats

Assaigs de viabilitat cel·lular per MTT

Citotoxicitat de la metilhidrocotoïna (CS)

Es mostren els resultats de l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT segons diverses concentracions del compost metilhidrocotoïna (**Figura 5**), expressat com CS per les sigles de la planta de la que prové, en què es presenta la mitjana de les rèpliques per cada condició i expressada com el percentatge de viabilitat cel·lular respecte el seu control, que es mostra unificat en un de sol que suposa el 100%.

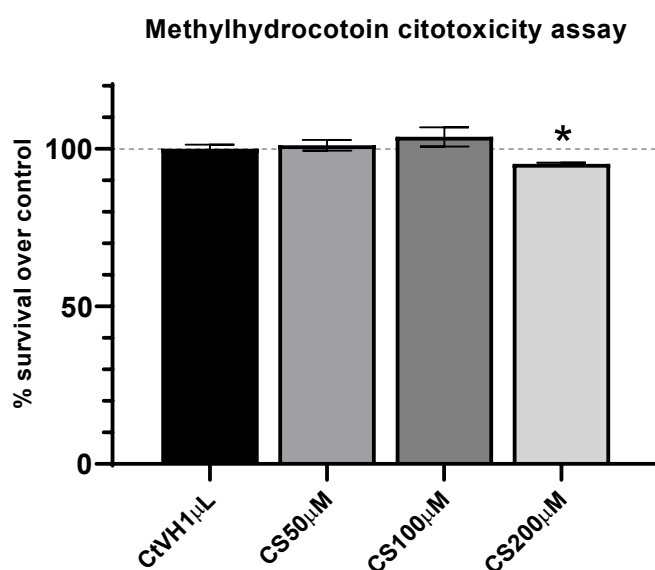


Figura 5. Efectes de la metilhidrocotoïna (CS) en la viabilitat cel·lular a diferents concentracions. Les cèl·lules BV2 sembrades a una densitat de 100.000 cèls/mL van ser tractades després de 24h de creixement amb vehicle (DMSO) o CS a concentracions 50 µM, 100 µM i 200 µM. Es va fer la lectura després de 24h. El gràfic representa el percentatge de supervivència respecte al control de cada condició (varia la proporció de DMSO) per veure només l'efecte de CS. Es mostra la mitjana±SEM per a cada condició avaluada d'almenys quatre rèpliques independents. Es van estudiar les diferències respecte al grup control amb una ANOVA d'un factor i proves post-hoc Tukey. La significança estadística es representa amb * $p < 0.05$.

La comparació dels grups mostra que la viabilitat cel·lular a una concentració de 200µM presenta una disminució estadísticament significativa respecte al seu control vehicle (95.29 ± 3.21 ; $p = 0.0166$), mentre que en la resta no hi ha un canvi significatiu en la supervivència cel·lular. La concentració de 100µM és la més alta de les seleccionades sense efectes de toxicitat.

CS reverteix parcialment la mort cel·lular propiciada per LPS

A continuació, es mostren els resultats de viabilitat cel·lular en l'experiment d'estimulació amb LPS i la seva combinació amb CS (**Figura 6**). El tractament únicament amb LPS causa una disminució significativa de la viabilitat cel·lular respecte el control ($78,70\% \pm 4.15$; $p=0.0001$). A més a més, existeix un efecte atenuant d'aquesta mort cel·lular en la combinació de LPS i CS, ja que en afegir el compost, existeix un augment significatiu de la supervivència respecte a la condició de vehicle i LPS, que recupera valors semblants al control ($99.09\% \pm 6.60$; $p=0.0118$), suggerint una reversió de l'efecte de LPS.

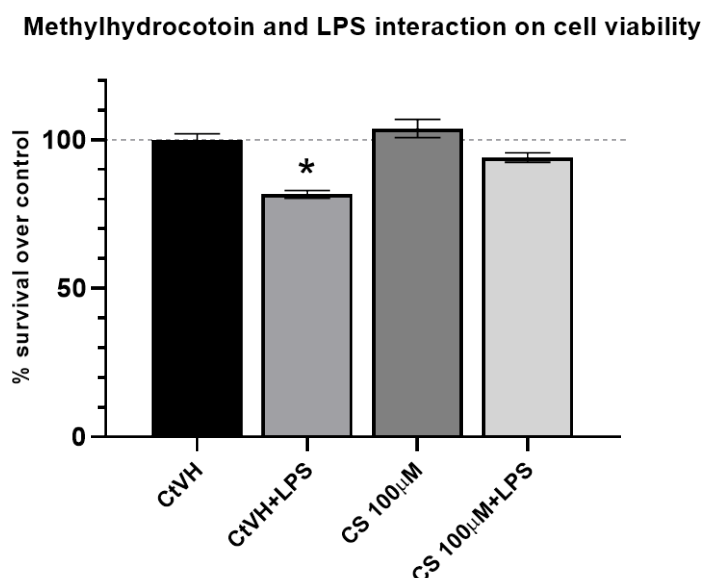


Figura 6. Efectes de la metilhidrocotoïna (CS) i LPS en la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules BV2 sembrades a una densitat de 100.000 cèls/mL van ser tractades després de 24h de creixement amb vehicle (DMSO) o CS a concentració 100 µM. Després de 2h de preincubació, es va afegir LPS a 0.5µg/mL i es va fer la lectura al cap de 24h més. El gràfic representa el percentatge de supervivència respecte al control amb la mitjana±SEM per a cada condició avaluada, d'almenys quatre rèpliques independents. Es van estudiar les diferències respecte al grup control amb una ANOVA d'un factor i proves post-hoc Tukey. La significança estadística es representa amb * $p<0.0005$.

Avaluació de l'expressió gènica de marcadors d'inflamació per RT-qPCR

La metilhidrocotoïna disminueix el marcador MCP1 del fenotip proinflamatori de la micròglia i l'expressió de iNOS

La quantificació relativa de l'ARNm dels marcadors d'inflamació seleccionats MCP1 i iNOS presenta canvis que confirmen l'efectivitat de l'estimulació pro-inflamatòria per LPS (**Figura 7**). El tractament únic amb LPS causa un augment d'expressió significatiu de MCP1 respecte al control (6.00 ± 0.98 ; $p=0.0178$) i un augment d' iNOS que, tot i no ser significatiu, sí que mostra una clara tendència a augmentar (215.29 ± 130.87 ;

$p=0.0677$). El tractament amb CS no genera cap tipus de resposta pel que fa a aquests marcadors, els quals són indicatius d'activitat proinflamatòria propis de la polarització M1 de la micròglia, i a més a més atenua la resposta causada per LPS en gran mesura: en el cas de MCP1, en redueix l'efecte gairebé a la meitat (LPS: 6.00 ± 0.98 vs CS+LPS: 3.21 ± 0.83) i en el cas d'iNOS, la redueix gairebé tres vegades (LPS: 215.29 ± 130.87 vs CS+LPS: 77.34 ± 47.00).

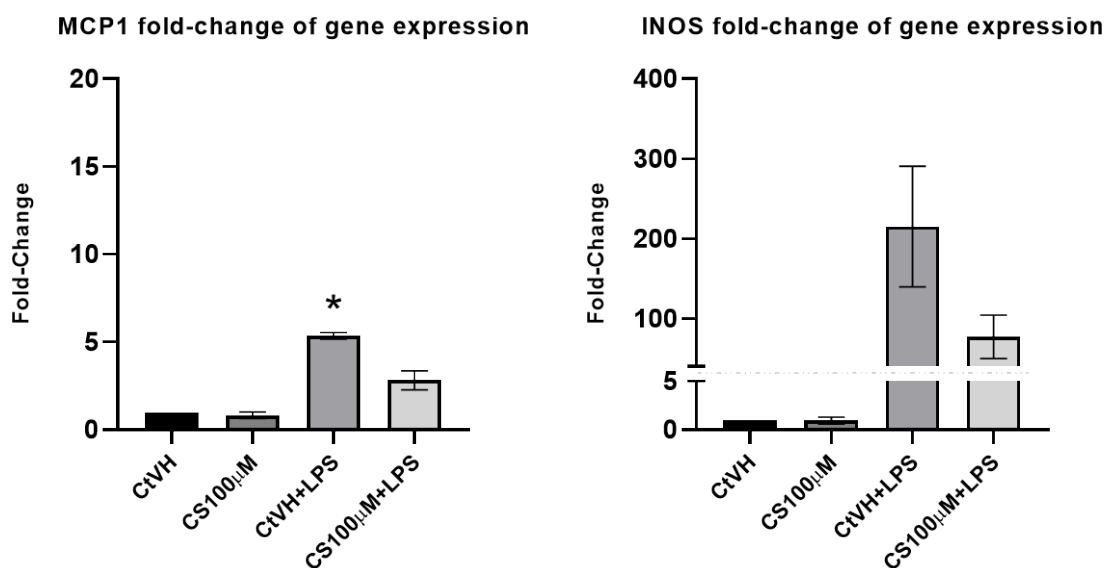


Figura 7. Efectes anti-inflamatoris de la metilhidrocotoïna (CS) en l'expressió gènica de MCP1 i INOS. Les cèl·lules BV2 sembrades a una densitat de 100.000 cèls/mL van ser tractades després de 24h de creixement amb vehicle (DMSO) o CS a concentració 100 µM. Després de 2h de preincubació, es va afegir LPS a 0.5µg/mL i va recollir el lisat cel·lular cal cap de 24h més, del qual es va extreure l'ARNm, va ser retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-qPCR. El gràfic representa l'expressió gènica normalitzada respecte el control (CtVH) que es presenta com a llinzar d'expressió 1 i la mitjana±SEM del fold-change (vegades que canvia) respecte el control per a cada condició avaluada, d'almenys tres rèpliques independents. Es van estudiar les diferències respecte al grup control amb un test Kruskal-Wallis d'un factor i proves post-hoc Dunn's test. La significança estadística es representa amb * $p<0.05$).

La metilhidrocotoïna genera una disminució de les citocines proinflamatòries IL6 i TNFα expressades per la micròglia

Pel que fa a l'expressió de les citocines proinflamatòries estudiades, l'estímul amb LPS genera un augment significatiu dels seus nivells respecte al control tant en IL6 (903.83 ± 553.31 ; $p=0.0186$) com en TNFα (10.90 ± 6.38 ; $p=0.0262$) (**Figura 8**). En aquest cas, el tractament amb CS redueix l'expressió d'IL6 gairebé vuit vegades (LPS: 903.83 ± 553.31 vs CS+LPS: 116.53 ± 118.08) i amb TNFα, el tractament simultani amb CS i LPS no aconsegueix atenuar en gran mesura l'efecte proinflamatori, donant un augment encara significatiu respecte al control (10.90 ± 6.38 ; $p=0.0364$) però amb una certa disminució respecte al tractament únic amb LPS (LPS: 10.90 ± 6.38 vs CS+LPS: 9.15 ± 6.16).

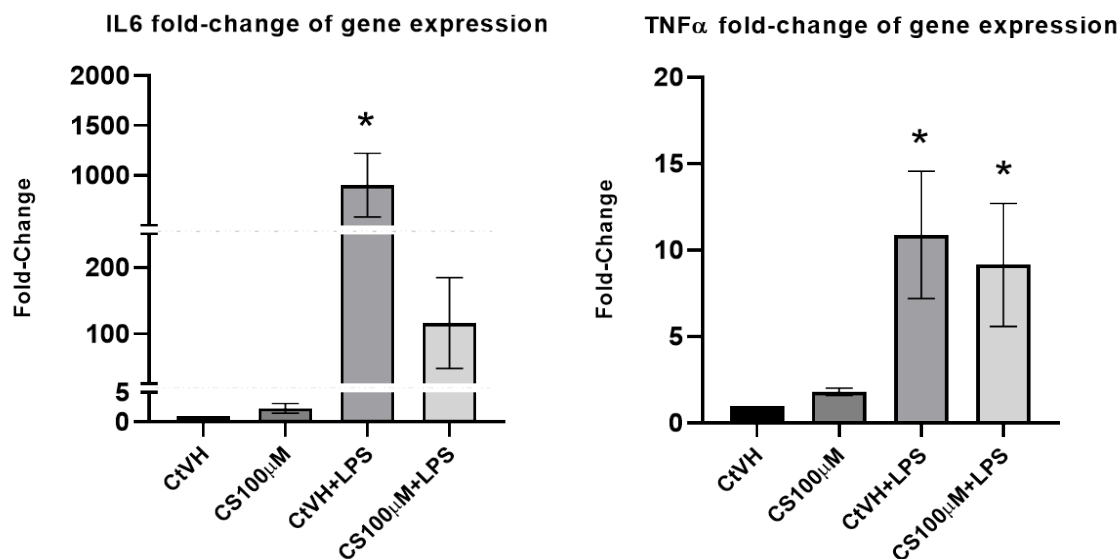


Figura 8. Efectes anti-inflamatoris de la metilhidrocotoïna (CS) en l'expressió gènica de IL6 i TNFα. Les cèl·lules BV2 sembrades a una densitat de 100.000 cèls/mL van ser tractades després de 24h de creixement amb vehicle (DMSO) o CS a concentració 100 µM. Després de 2h de preincubació, es va afegir LPS a 0.5µg/mL i va recollir el lisat cel·lular cal cap de 24h més, del qual es va extreure l'ARNm, va ser retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-qPCR. El gràfic representa l'expressió gènica normalitzada respecte el control (CtVH) que es presenta com a llindar d'expressió 1 i la mitjana±SEM del fold-change (vegades que canvia) respecte el control per a cada condició avaluada, d'almenys tres rèpliques independents. Es van estudiar les diferències respecte al grup control amb un test Kruskal-Wallis d'un factor i proves post-hoc Dunn's test. La significança estadística es representa amb *p<0.05).

Avaluació de l'activitat d'NFκB per *Western Blot*

L'activitat antiinflamatòria de CS ve mediada per la inactivació parcial de NFκB

El següent gràfic representa els resultats de l'anàlisi per *Western Blot* en les diverses condicions experimentals esmentades anteriorment i relatives al control (**Figura 9**) emprats per comprovar la implicació del factor de transcripció NFκB en els canvis observats en les citocines. Es pot observar que NFκB total presenta uns nivells molt semblants en totes les condicions. Pel que fa a la forma fosforilada, la presència de LPS clarament es duplica (2.05 vegades) respecte al control, tot i no arribar a veure diferències significatives. Pel que fa al tractament amb CS i LPS, s'atenua aquest augment causat per LPS, i es troba augmentat només 1.65 vegades respecte al control. Es pretén ampliar l'estudi i completar-lo amb noves dades que podrien millorar-ne la interpretació

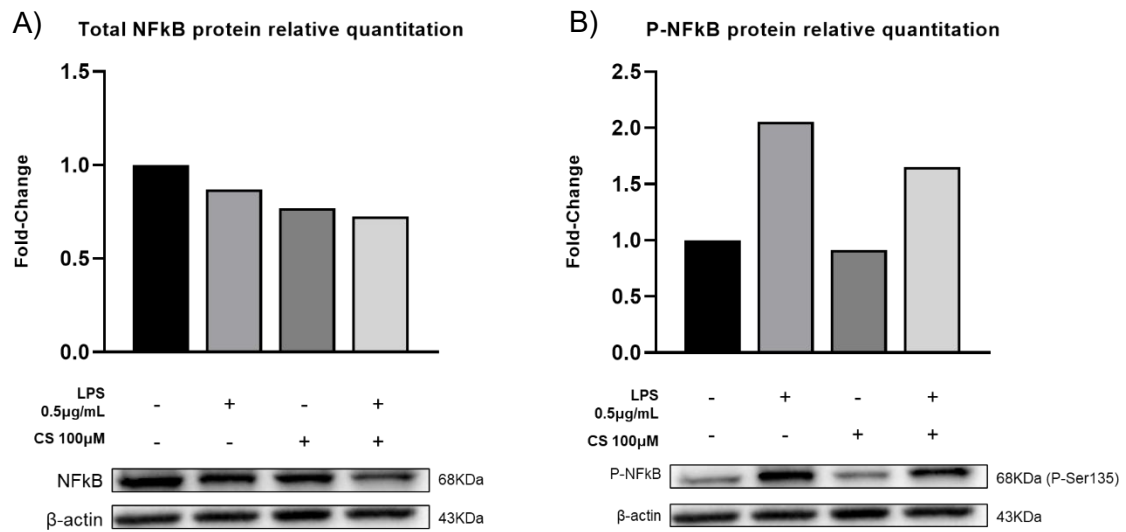


Figura 9. Resultats de la quantificació relativa de NFκB total i la forma activa (P-NFκB) per *Western Blot*. Les cèl·lules BV2 sembrades a una densitat de 100.000 cèls/mL van ser tractades després de 24h de creixement amb vehicle (DMSO) o CS a concentració 100 µM. Després de 2h de preincubació, es va afegir LPS a 0.5µg/mL i va recollir el lisat cel·lular cal cap de 24h més, se'n va extreure i quantificar la proteïna i es va analitzar per *Western Blot*. Els gràfics mostren la quantificació relativa de proteïna normalitzada respecte a la proteïna constitutiva (β-actina) i relativa al control, de NFκB total (A) i la forma fosforilada (B).

5. Discussió

La micròglia és mediadora del procés de neuroinflamació

Els resultats descrits en el present estudi confirmen el paper reactiu de la micròglia davant d'un estímul d'LPS, el qual desencadena l'activació de vies proinflamàtories pròpies de la polarització M1 i dona lloc a un augment pronunciat de mediadors d'inflamació, com IL6 o TNF α . Les vies d'activació de la micròglia per LPS es deuen a la interacció amb TLRs (Toll Like Receptors), receptors immunes sensibles al reconeixement de patògens i molècules alterades, de la mateixa manera que ho pot fer la placa β -amiloide (A β) en l'Alzheimer, a més d'interaccionar amb receptors tipus *scavenger* per a la seva endocitosis (14). NF κ B és el principal factor de transcripció on convergeixen els estímuls proinflamatoris descrits, el qual promou la síntesi de citocines com les esmentades i és una via amb gran interès com a potencial diana per al tractament de malalties neurodegeneratives, donada la seva estreta relació entre la inflamació, l'estrès oxidatiu i la neurodegeneració (15,22).

La literatura apunta que el paper de la micròglia és essencial per al desencadenament del dany propi dels processos neurodegeneratius, en què se suma un estat inflamatori i d'elevat estrès oxidatiu, processos que al mateix temps estan àmpliament relacionats i retroalimentats. Un augment de concentració de factors com iNOS, IL6 o TNF α , associat a una microgliosi (procés reactiu de polarització M1 de la micròglia) forma part d'un ambient en què se suma estrès oxidatiu i elevada neurotoxicitat, desencadenant dany neuronal sobre l'ADN, ruptura de membranes, desmielinització i inducció d'apoptosi (14,15,17).

A més a més, anteriorment, en models *in vitro* de SNC sense micròglia i en estudis *in vivo* amb inhibició glial, s'ha descrit una disminució important de la neurotoxicitat causada per estímuls proinflamatoris com LPS, és a dir que aquesta població cel·lular és un punt d'amplificació de l'ambient neurotòxic necessari per a la progressió de la patologia (15). Aquest model de neurodegeneració per estímul amb LPS s'ha descrit també com un procés semblant al generat amb models MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina) de Parkinson, ja que la seva infusió a la regió supranigral del cervell murí genera mort selectiva de les neurones dopaminèrgiques. La microgliosi descrita és un factor clau en el progrés neurodegeneratiu, així que prendre aquesta població cel·lular com a diana terapèutica és una estratègia amb fonaments (29).

La metilhidrocotoïna disminueix l'activació de NFκB induïda per LPS

La presència de la metilhidrocotoïna a una concentració de 100µM redueix parcialment la forma activa de NFκB i el seu efecte es manifesta més clarament en la disminució dels marcadors proinflamatoris descrits. NFκB és un factor de transcripció heterodimèric que està compost per les subunitats p50 i p65 de la família de les proteïnes Rel. Sense l'acció d'inductors específics, es troba reclutat al citoplasma pel seu inhibidor IκB. Donat l'estímul necessari, IκB és fosforilat i degradat, mentre que NFκB és fosforilat (serina 276) i s'uneix als promotors dels gens de diversos mediadors d'inflamació i estrès oxidatiu. Aquest factor de transcripció regulador de la inflamació és àmpliament expressat en la micròglia i activa la síntesi de citocines proinflamatòries i intermediàries de les espècies reactives d'oxigen (ROS), al mateix temps que en els primers estadis del dany neuronal promou la fagocitosis d'agregats proteics propis de determinades malalties neurodegeneratives (30). Per aquest motiu, se l'ha proposat com un intermediari clau en els processos neurodegeneratius i és una diana de tractament interessant per a les afeccions del SNC (15,22,31).

L'elevat dany neuronal que es veu en el desenvolupament d'aquestes patologies fins i tot pot ser selectiu sobre poblacions neuronals concretes, amb una elevada susceptibilitat de les poblacions dopaminèrgiques i, per tant, relacionades amb el declivi motor, entre d'altres (29). La substància estudiada és capaç de reduir l'activació d'aquesta via al mateix temps que genera un cert efecte protector, ja que atenua la mort cel·lular produïda per l'exposició a LPS. Un sobreestímul d'aquesta via no només pot causar neurotoxicitat, sinó que està relacionada amb l'activació de vies d'apoptosi de la pròpia glia (17).

La metilhidrocotoïna pot atenuar la neuroinflamació per una via regulada per PPARγ

La metilhidrocotoïna actua sobre la via de senyalització desencadenada per LPS i atenua el seu efecte sobre la micròglia. Donada la predicció de la seva interacció amb PPARγ i després de confirmar el seu clar efecte antiinflamatori, els resultats suggereixen que el compost és capaç de revertir la polarització de M1 per aquesta via. PPARγ és un receptor nuclear que dimeritza amb RXR (Receptor Retinoid X) i que presenta vies d'activació dependents i independents de lligand, però la seva regulació és complexa i poc descrita. D'acord amb la literatura, és possible que l'activació de PPARγ en la micròglia per l'acció de la metilhidrocotoïna desencadeni un mecanisme antiinflamatori semblant a l'activat per IL4. En la via d'activació intrínseca es descriu com IL4 incrementa els agents antiinflamatoris i redueix els proinflamatoris a través d'una via que implica STAT6 (Transductor de la senyal i activador de la transcripció 6) i PPARγ (32,33).

PPAR γ , al seu torn, s'ha descrit com un modulador de la inflamació en les malalties del SNC inhibint les vies Jak-Stat activadores de NF κ B, els seus agonistes estan en el punt de mira per al disseny de fàrmacs (30). Sorprenentment, la Pioglitazona, un fàrmac sintètic actualment emprat per al tractament de diabetis mellitus tipus 2 amb efecte sensibilitzant a la insulina, és també agonista de PPAR γ i el seu ús està pensat amb el focus d'atenció en teixit adipós i pancreàtic, on té efecte hipoglucemiant (34), però, a més a més, presenta una activitat reguladora de la neuroinflamació i protectora de la resistència a la insulina al cervell (17,22,33). El paper dels agonistes de PPAR γ és poc conegut i prometedor a la vegada: la seva rellevància en el tractament i control de desregulacions metabòliques al mateix temps que la seva elevada expressió a nivell de SNC i el seu paper antiinflamatori poden significar una nova perspectiva que replantegi la relació entre els diversos agents de la progressió neurodegenerativa, en què hi juga un paper important la inflamació, l'estrès oxidatiu i el metabolisme (14,29,33).

El paper protector de PPAR γ davant la neurotoxicitat mediada per la micròglia també s'ha descrit pels seus efectes atenuants de l'estrès oxidatiu, en què podria conduir a una disminució de l'activitat de NADPH oxidasa, identificada com la principal medidora de l'augment de ROS en l'ambient neurotòxic propi de les malalties neurodegeneratives, i podria contribuir a l'augment d'activitat de vies antioxidants com Nrf2-ARE, (factor nuclear relacionat a eritroide-2- element de resposta a antioxidants) la qual també manté estreta relació amb la inhibició de NF κ B i, per tant, tindria efecte atenuant de la neuroinflamació (15,35). El present estudi i anàlisi de resultats encarrilen una via d'investigació que ha de ser explorada amb més profunditat en les diverses dimensions que impliquen l'avenç neurodegeneratiu, com són la inflamació i l'estrès oxidatiu.

6. Conclusions

La recerca de noves teràpies per a les malalties neurodegeneratives és una necessitat apressant en una societat en què cada vegada són més presents. Les persones vivim més i ens enfrontem a reptes que són relativament nous per a la ciència. Ara per ara, la majoria de tractaments per a les malalties neurodegeneratives se centren en pal·liar-ne la simptomatologia i hi ha poques possibilitats encara de frenar-ne el progrés.

Aquest estudi, junt amb d'altres, confirma el paper reactiu de la micròglia que desencadena l'activació de vies proinflamàtores associades a la polarització M1. Aquesta activació produeix un augment significatiu de mediadors d'inflamació com a través de NFκB. La micròglia juga un paper essencial en el dany neuronal associat als processos neurodegeneratius, ja que contribueix a la neurotoxicitat, l'estrès oxidatiu i altres processos que estan interrelacionats.

A més a més, el present estudi reporta com la metilhidrocotoïna reverteix parcialment la mort cel·lular propiciada per LPS i té efectes antiinflamatoris sobre la micròglia, reflectits en la disminució del marcador MCP1 del fenotip proinflamatori de la micròglia i l'expressió de INOS, així com la disminució de les citokines proinflamàtores IL6 i TNFα. Aquesta activitat antiinflamatòria podria venir mediada per la inactivació parcial de NF-κB, tot i que seran necessaris futurs estudis per acabar de discernir si hi ha altres vies implicades en aquests canvis que acabin d'explicar l'efecte generat.

La metilhidrocotoïna es posiciona com un compost d'origen natural que amb efectes beneficiosos com a agonista del receptor nuclear PPARγ, el qual ja presenta una llarga trajectòria com a focus d'interès per al tractament de malalties metabòliques, entre d'altres. Aquesta descoberta obre noves perspectives en el tractament de les malalties neurodegeneratives, ja que indica la importància de la inflamació, l'estrès oxidatiu i el metabolisme en aquests processos i proveeix de fonts d'obtenció de compostos bioactius relativament accessibles.

Tot i així, tal com passa amb la resta de compostos bioactius que s'estudien per al disseny de nutricèutics, la mera presència de la metilhidrocotoïna en la dosi normal que podria comportar el consum d'aliments que la continguin no seria suficient per a observar els efectes estudiats en les nostres condicions de treball, i seria convenient no perdre de vista la possibilitat de futurs estudis que es preguntin si existeixen beneficis reals d'incloure aliments amb aquest compost en la dieta sobre la prevenció i progressió de malalties neurodegeneratives, com sí que s'ha descrit en altres compostos presents en la dieta.

Conseqüentment, es necessiten futures investigacions per discernir els possibles efectes neuroprotectors de la metilhidrocotoïna i comprendre millor el seu efecte *in vivo*, així com avaluar amb més profunditat altres paràmetres.

7. Bibliografia

1. World Health Organization (WHO). Global Dementia Observatory (GDO) [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/global-dementia-observatory-gdo>
2. Bianchi VE, Herrera PF, Laura R. Effect of nutrition on neurodegenerative diseases. A systematic review. *Nutr Neurosci* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 25];24(10):810–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/sabidi.urv.cat/doi/abs/10.1080/1028415X.2019.1681088>
3. Barbaresko J, Lellmann AW, Schmidt A, Lehmann A, Amini AM, Egert S, et al. Dietary Factors and Neurodegenerative Disorders: An Umbrella Review of Meta-Analyses of Prospective Studies. *Advances in Nutrition* [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2023 May 25];11(5):1161. Available from: [/pmc/articles/PMC7490166/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347490166/)
4. Franco GA, Interdonato L, Cordaro M, Cuzzocrea S, Di Paola R. Bioactive Compounds of the Mediterranean Diet as Nutritional Support to Fight Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8).
5. Jensen NJ, Wodschow HZ, Nilsson M, Rungby J. Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–17.
6. Jiang Z, Yin X, Wang M, Chen T, Wang Y, Gao Z, et al. Effects of Ketogenic Diet on Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis*. 2022;13(4):1146–65.
7. Di Sotto A, Vitalone A, Di Giacomo S. Plant-derived nutraceuticals and immune system modulation: An evidence-based overview. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):1–34.
8. Aronson JK. Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(1):8–19.
9. Kurek M, Benaida-Debbache N, Garofulić IE, Galić K, Avallone S, Voilley A, et al. Antioxidants and Bioactive Compounds in Food: Critical Review of Issues and Prospects†. *Antioxidants*. 2022;11(4):1–23.

10. Lorusso F, Scarano A, Fulle S, Valbonetti L, Mancinelli R, Di Filippo ES. Effectiveness of Apigenin, Resveratrol, and Curcumin as Adjuvant Nutraceuticals for Calvarial Bone Defect Healing: An In Vitro and Histological Study on Rats. *Nutrients*. 2023;15(5).
11. Korhonen PJ, Wallenius J. Neuroinflammation: The devil is in the details. *International Series in Operations Research and Management Science*. 2020;294(Suppl 2):45–61.
12. Stuckey SM, Ong LK, Collins-praino LE, Turner RJ. Neuroinflammation as a key driver of secondary neurodegeneration following stroke? *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
13. Boddupalli CS, Nair S, Belinsky G, Gans J, Teeple E, Nguyen TH, et al. Neuroinflammation in neuronopathic Gaucher disease: Role of microglia and NK cells, biomarkers, and response to substrate reduction therapy. *Elife*. 2022;11:1–4.
14. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2021;17(3):157–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
15. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*. 2005;76(2):77–98.
16. Woollacott IOC, Swift IJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, Knowles K, Bouzigues A, et al. CSF glial markers are elevated in a subset of patients with genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022;9(11):1764–77.
17. Dhapola R, Hota SS, Sarma P, Bhattacharyya A, Medhi B, Reddy DHK. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2021;29(6):1669–81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00889-6>
18. Montalbano M, Majmundar L, Sengupta U, Fung L, Kaye R. Pathological tau signatures and nuclear alterations in neurons, astrocytes and microglia in Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and dementia with Lewy bodies. *Brain Pathology*. 2023;33(1):1–18.

19. Ferrer I. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathology*. 2017;27(5):645–74.
20. Valori CF, Possenti A, Brambilla L, Rossi D. Challenges and Opportunities of Targeting Astrocytes to Halt Neurodegenerative Disorders. *Cells*. 2021;1–23.
21. Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. An overview of in vitro methods to study microglia. Vol. 12, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
22. Seo EJ, Fischer N, Efferth T. Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease. Vol. 129, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2018. p. 262–73.
23. Demarque DP, da Silva RMP, Santos LF, Leopoldino AM, Espreafico EM, Lopes NP. Cytotoxicity of structurally diverse anthranoids and correlation with mechanism of action and side effects. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2018;21(1):347–53.
24. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 77387, 2,4,6-Trimethoxybenzophenone [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 10]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_6-Trimethoxybenzophenone.
25. Santucci NR, Chogle A, Leiby A, Mascarenhas M, Borlack RE, Lee A, et al. Non-pharmacologic approach to pediatric constipation. *Complement Ther Med*. 2021;59:102711.
26. Tyson RM, Shrader EA, Perlman HH. Drugs transmitted through breast milk. Part I: Laxatives. *J Pediatr*. 1937;11(6):824–32.
27. Tomas-hernandez S, Blanco J, Garcia-vallvé S, Pujadas G, Ojeda-montes MJ, Gimeno A, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the grifola frondosa natural compound o-orsellinaldehyde on lps-challenged murine primary glial cells. Roles of nf- κ β and mapk. *Pharmaceutics*. 2021;13(6).
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
29. Subramaniam SR, Federoff HJ. Targeting microglial activation states as a Therapeutic Avenue in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2017;9(JUN):1–18.

30. Bright JJ, Kanakasabai S, Chearwae W, Chakraborty S. PPAR regulation of inflammatory signaling in CNS diseases. *PPAR Res.* 2008;2008.
31. Liu B, Zhang Y, Yang Z, Liu M, Zhang C, Zhao Y, et al. ω -3 DPA Protected Neurons from Neuroinflammation by Balancing Microglia M1/M2 Polarizations through Inhibiting NF- κ B/MAPK p38 Signaling and Activating Neuron-BDNF-PI3K/AKT Pathways. *Mar Drugs* [Internet]. 2021 Oct 20 [cited 2023 Jun 5];19(11):587. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/11/587/htm>
32. Kang R, Gamdzyk M, Luo Y, Tang H, Huang L, Lenahan C, et al. Three Days Delayed Recanalization Improved Neurological Function in pMCAO Rats by Increasing M2 Microglia—Possible Involvement of the IL-4R/STAT6/PPAR γ Pathway. *Transl Stroke Res* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2023 Jun 7];14(2):250–62. Available from: <https://link-springer-com.sabidi.urv.cat/article/10.1007/s12975-022-01032-5>
33. Kumar S, Mehan S, Narula AS. Therapeutic modulation of JAK-STAT, mTOR, and PPAR- γ signaling in neurological dysfunctions. *Journal of Molecular Medicine* 2022 101:1 [Internet]. 2022 Dec 7 [cited 2023 Jun 7];101(1):9–49. Available from: <https://link-springer-com.sabidi.urv.cat/article/10.1007/s00109-022-02272-6>
34. DeFronzo RA, Inzucchi S, Abdul-Ghani M, Nissen SE. Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Jun 13];16(2):133–43. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1479164118825376?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
35. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;157:84–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.003>