

# Investigación de los efectos del consumo moderado de vino en la enfermedad de Alzheimer en modelos de ratones con patología A $\beta$ y Tau

## Investigating the effects of moderate wine consumption on Alzheimer's disease in A $\beta$ - and Tau-pathology mice models

Marta Montero<sup>1</sup>, P. Pérez-Matute<sup>2</sup>, S. Yuste<sup>3,4</sup>, M. Íñiguez<sup>2</sup>, E. Recio-Fernández<sup>2</sup>, M-J. Motilva<sup>3</sup>, G. Leon-Espinosa<sup>5,6,7</sup>, O. Herreras<sup>8</sup>, B. Bartolomé<sup>1</sup>, and M.V. Moreno-Arribas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM) 28049 Madrid, España

<sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiota y Metabolismo, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Unidad asociada de I+D+i del CSIC. 26006 Logroño (La Rioja), España

<sup>3</sup>Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV), CSIC-Universidad de La Rioja-Gobierno de La Rioja, 26007 Logroño (La Rioja), España

<sup>4</sup>Grupo de investigación Antioxidantes, Departamento de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación Agrotecnio, Universidad de Lleida, Av/Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, España

<sup>5</sup>Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España

<sup>6</sup>Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU

<sup>7</sup>Universidad CEU, Urbanización Montepríncipe, 28660, Boadilla del Monte, Madrid, España

<sup>8</sup>Instituto Cajal, CSIC, Av. Doctor Arce 37, 28002, Madrid, España

**Resumen.** La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y tiene una elevada morbilidad y mortalidad. La EA se caracteriza principalmente por la presencia de dos estructuras aberrantes en el cerebro de los pacientes, placas seniles formadas por péptido- $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares cuyo principal componente es la proteína tau fosforilada. Aunque actualmente no se conoce bien la etiopatogenia, cada vez son más los estudios que demuestran un efecto causal del microbioma intestinal sobre la EA y las funciones cognitivas, a través del "eje microbiota intestino-cerebro". Las evidencias científicas sugieren un posible efecto protector de los polifenoles del vino frente a los trastornos neurodegenerativos aunque se desconocen los mecanismos y, hasta el momento, los estudios para evaluar de forma exhaustiva el efecto del vino sobre la etiopatogenia de la EA son muy escasos. El objetivo principal de la línea de investigación que enmarca este trabajo es entender cómo la dieta, y especialmente los polifenoles presentes en los alimentos vegetales, y otros factores del estilo de vida interactúan con el microbioma oral e intestinal, en relación con la salud digestiva y el deterioro cognitivo. Para ello, se está llevando a cabo una aproximación experimental que tiene como finalidad evaluar el posible efecto protector de los polifenoles del vino, mediante la suplementación de la dieta en dos modelos murinos de la EA (patología A $\beta$  y Tau), y, por otro lado, se está profundizando en el estudio de los mecanismos de protección mediante la evaluación de los efectos del ácido protocatéuico sobre la actividad eléctrica del cerebro.

**Abstract.** Alzheimer's disease (AD) is the most common form of age-related dementia with high morbidity and mortality. AD is mainly characterized by the presence of two aberrant structures in the brain of patients, senile plaques formed by peptide- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) and neurofibrillary tangles whose main component is phosphorylated tau protein. Although the etiopathogenesis is currently not well understood, an increasing number of studies demonstrate a causal effect of the gut microbiome on AD and cognitive functions, through the "gut-brain microbiota axis". Scientific evidence suggests a possible protective effect of wine polyphenols against neurodegenerative disorders although the mechanisms are unknown and, so far, studies to evaluate comprehensively the effect of wine on the etiopathogenesis of AD are very scarce. The main objective of the research line that frames this work is to understand how diet, and especially the polyphenols present in plant foods, and other lifestyle factors interact with the oral and intestinal microbiome in relation to digestive health and cognitive impairment. To this end, an experimental approach is being carried out to evaluate the possible protective effect of wine polyphenols through dietary supplementation in two murine models of AD (A $\beta$  and Tau pathology), and, on the other hand, the study of the protective mechanisms is being deepened by evaluating the effects of protocatechuic acid on the electrical activity of the brain.

## 1 Introducción

El cerebro humano contiene cerca de 100.000 millones de neuronas que conectan entre sí a través de sinapsis, permitiendo la comunicación entre diferentes partes del cerebro, y también del cerebro con los músculos y los diferentes órganos del cuerpo [1]. Esta comunicación es vital para el correcto funcionamiento de nuestro cerebro, pero también del organismo, permitiendo realizar funciones básicas como respirar, caminar, pensar y hablar.

Las enfermedades neurodegenerativas provocan la pérdida progresiva e irreparable de neuronas, lo que conlleva alteraciones en las funciones para las que estas neuronas son básicas [2]. Entre las enfermedades neurodegenerativas destaca la enfermedad de Alzheimer (EA), reconocida como la forma más común de demencia y principal causa de dependencia en los adultos mayores, así como la quinta causa de muerte en todo el mundo. El Alzheimer es una enfermedad multifactorial que se ha asociado a varios factores de riesgo, como la edad avanzada, factores genéticos, ambientales y relacionados con el estilo de vida, que aumentan las probabilidades de padecer EA [3-4].

Las alteraciones del estado del microbioma, especialmente el intestinal, se asocian cada vez más con la incidencia de trastornos cognitivos y neuroinflamación en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) [1]. Por tanto, existe un gran interés en la comprensión de cómo la microbiota regula la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro como fundamento de las intervenciones basadas en el microbioma.

La dieta se considera el principal factor modificable de las comunidades microbianas y, entre los componentes de la dieta, las investigaciones actuales sugieren que los compuestos fenólicos o polifenoles de la dieta tienen un alto potencial de modulación del microbioma, así como la fisiología y función cerebral [4-6]. El vino es uno de los componentes más característicos de la dieta mediterránea. En particular, el vino tinto, tanto por su contenido en polifenoles como por la diversidad de estructuras fenólicas, es uno de los alimentos que ha demostrado efectos beneficiosos para la salud. Por otro lado, los patrones de consumo de vino y, específicamente, el consumo regular y moderado de vino frente a otras bebidas alcohólicas, dentro de un estilo de vida saludable, podría contribuir a un envejecimiento con bienestar y calidad de vida. De hecho, son conocidas las acciones neuroprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias de los polifenoles del vino, y, recientemente, se ha sugerido un posible efecto protector del consumo de vino sobre el desarrollo del deterioro cognitivo [6-8]. Sin embargo, no se conoce cómo puede afectar la presencia de etanol, ni los mecanismos que subyacen a los potenciales efectos del consumo moderado de vino en el desarrollo y fisiopatología de la EA.

El objetivo general de nuestras investigaciones actuales es evaluar si el consumo moderado de vino en el contexto de la dieta tiene un efecto protector en las

primeras fases de la EA o del deterioro cognitivo leve, como estrategia para ralentizar o incluso minimizar el deterioro cognitivo. El estudio también pretende evaluar el impacto del consumo de vino sobre la microbiota intestinal y el metabolismo microbiano. Para ello, estamos siguiendo dos aproximaciones: *i*) un enfoque integral del efecto de la alimentación con vino/vino desalcoholizado en dos modelos de ratones "transgénicos" (APP/PS1 y P301S) que desarrollan las dos principales lesiones (placas de  $\beta$ -amiloide y ovillos de tau, respectivamente) responsables de la aparición de la EA en humanos, y *ii*) un enfoque dirigido a la actividad electrofisiológica del hipocampo y el córtex en respuesta a la administración local de metabolitos derivados de los polifenoles del vino.

## 2 Intervención dietética con vino y vino desalcoholizado en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

Se ha realizado un diseño experimental que incluye tanto ratones 'transgénicos' de ambos modelos (APP/PS1 y P301S9) como ratones control (wild-type) en grupos de 24 animales (50% machos y hembras). En concreto los grupos experimentales fueron los siguientes: grupo 1, ratones *wild-type* con una dieta estándar y agua de bebida; grupo 2, transgénicos con una dieta estándar y agua de bebida; grupo 3, transgénicos con una dieta estándar y vino (1 mL/día, equivalente a un consumo diario moderado de 200 mL de vino en humanos); grupo 4, transgénicos con dieta estándar y vino desalcoholizado (1 mL/día, equivalente a una dosis diaria de 200 mL vino en humanos); grupo 5, transgénicos con dieta estándar y vino desalcoholizado (2 mL/día, equivalente a dosis diaria de 400 mL vino en humanos). La comparación entre los grupos 4 y 5 permite realizar un estudio dosis/respuesta, y entre los grupos 3 y 4, establecer el efecto del alcohol.

La suplementación con vino/vino desalcoholizado se ha llevado a cabo en el agua de bebida, controlando el volumen ingerido por los animales, empezando a los 2 meses de edad del animal y durante los 6 meses, para mimetizar un consumo de vino regular y continuado en humanos. El modelo APP/PS1 desarrolla depósitos beta-amiloide en el cerebro entre los 6 -7 meses de edad y el P301S desarrolla ovillos neurofibrilares a partir de los 9 meses de edad, por lo que la suplementación de la dieta con vino pretende llevar a cabo esta intervención con fines preventivos frente a la EA.

El vino se ha elaborado para el estudio en la bodega experimental del ICVV (La Rioja) a partir de las variedades de uva tinta *Tempranillo* y *Graciano*. La composición fenólica del vino se ha caracterizado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC/QqQ-MS/MS) [9]. El vino desalcoholizado se ha obtenido a partir del mismo vino sometido a un proceso de secado, mediante liofilización, y posterior reconstitución hasta el volumen original con agua destilada. En la Tabla 1 se

presenta la concentración media de los diferentes grupos de compuestos fenólicos en el vino y el mismo vino desalcoholizado.

**Tabla 1.** Contenido de polifenoles de los vinos utilizados en el estudio (mg/L).

Polifenoles	Vino mg/L	Vino desalcoholizado mg/L
Antocianos totales	312	266
Acidos hidroxicinámicos	95,0	96.0
Acidos hidroxibenzoicos	25,7	21.4
Fenil-alcoholes	1,6	0.90
Flavanonas	0,11	0.08
Flavonoles	67,7	63.0
Proantocianidinas	53,6	53.7
Estilbenos	31,8	27.9
Lignanós	9,10	7.08
<b>Polifenoles totales</b>	<b>607</b>	<b>535</b>

A partir de los datos de contenido fenólico se ha calculado la dosis diaria y naturaleza de los compuestos fenólicos aportados por el vino, con el objetivo de establecer una asociación entre los compuestos bioactivos ingeridos y los efectos fisiológicos y patológicos que pudieran observarse durante la intervención. En la Tabla 2 se presenta la equivalencia de las cantidades de polifenoles ingeridas diariamente.

**Tabla 2.** Estimación (µg/día) de la dosis diaria de polifenoles ingerida a través del vino y del vino desalcoholizado, respectivamente.

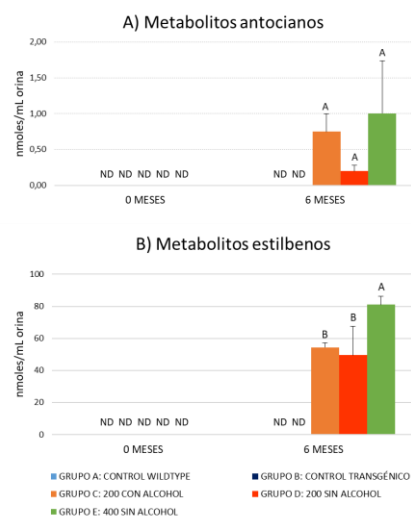
Polifenoles	Vino		Vino desalcoholizado	
	µg/1 mL/día	µg/1 mL/día	µg/1 mL/día	µg/2mL/día
Antocianos totales	312	266	532	
Acidos hidroxicinámicos	95,0	96.0	192	
Acidos hidroxibenzoicos	25,7	21.4	42.8	
Fenil-alcoholes	1,6	0.90	1.80	
Flavanonas	0,11	0.08	0.16	
Flavonoles	67,7	63.0	126	
Proantocianidinas	53,6	53.7	107.4	
Estilbenos	31,8	27.9	55.8	
Lignanós	9,10	7.08	14.16	
<b>Polifenoles totales</b>	<b>607</b>	<b>535</b>	<b>1070</b>	

Para verificar el consumo de vino durante el periodo de suplementación de la dieta con vino, se han tomado muestras de orina al inicio de la suplementación (2 meses) y en el momento del sacrificio (9 meses). Los metabolitos fenólicos se han analizado mediante (UHPLC/QqQ-MS/MS) [10]. Los resultados del estudio de metabolómica dirigida en orina ha mostrado un gran número de metabolitos de Fase I y II, además de derivados de fermentación colónica derivados de los polifenoles ingeridos diariamente a través del vino. De todos ellos se han seleccionado como biomarcadores claros de la ingesta de polifenoles de vino los derivados del metabolismo de antocianos y estilbenos (Figs. 1A y 1B, respectivamente) que no se detectaron en las

muestras recogidas al inicio de la suplementación y en los grupos 1 y 2 (control).

Se han tomado muestras fecales al inicio del experimento, a mitad del mismo (tras 3 meses de suplementación con vino) y al final del periodo experimental. Además, tras 3 meses de suplementación con vino y al finalizar el periodo experimental (tras 6 meses de intervención), se sacrificaron los animales para la recogida de sangre y orina, así como cerebro, intestino, e hígado. Una semana antes del sacrificio se realizaron las pruebas de comportamiento (test de reconocimiento de objetos y/o de miedo condicionado) para valorar la afectación de la memoria a corto y largo plazo.

En las muestras fecales se están llevando a cabo el análisis de la composición de la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen ARNr 16S (MiSeq, 2x 300 pb, *paired-end*). Los ácidos grasos de cadena corta se están analizando mediante GC-MS en muestras de sangre y heces. En las muestras de cerebro recogidas al inicio del experimento y tras los 3 y 6 meses de suplementación con vino/vino desalcoholizado se están llevando a cabo análisis histológicas y moleculares para cuantificar los niveles de placas de beta-amiloide y p-TAU, respectivamente. El análisis conjunto de todos estos resultados, esperamos que contribuya a una evaluación integral de los efectos del consumo de vino y vino desalcoholizado en la incidencia de EA en los dos modelos murinos.

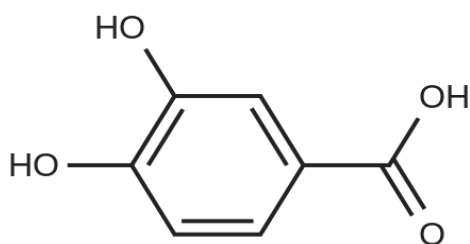


**Figura 1.** Biomarcadores de consumo de vino en base a los metabolitos derivados de antocianos (A) y de estilbenos (B) detectados en muestras de orina de los ratones de los diferentes grupos: antes del tratamiento (0 meses) y después de 6 meses del tratamiento. Los metabolitos de antocianos detectados fueron: cianidina-3-glucosido, delphidina-3-glucosido, malvidina-3-(6"-acetyl)-glucosido, malvidina-3-glucosido, peonidina-3-(6"-acetyl)-glucosido, petunidina-3-glucosido y vitisina. Los metabolitos de estilbenos detectados fueron: cis-resveratrol glucosido, trans-resveratrol, resveratrol glucuronido, resveratrol sulfato, dihydroresveratrol glucuronido y dihydroresveratrol sulfato. Los datos se expresan como valores medios ± SD. Letras diferentes indican diferencias entre grupos (Modelo Lineal General y ANOVA unidireccional, p < 0,05). ND: no detectado.

Por otro lado, y con el fin de evaluar el efecto del consumo de vino en el metaboloma de los animales, se ha analizado el perfil de metabolitos fenólicos presentes en el agua fecal de las heces de ratones control y transgénicos suplementados, con y sin vino desalcoholizado, mediante UPLC-MS [11]. Estos resultados están siendo analizados actualmente, pero los primeros datos muestran que hay un cambio en el metaboloma fecal, tanto para el modelo de taupatía como para el control, tras tres meses de la intervención con vino.

### 3 Estudio del efecto del PCA sobre la actividad eléctrica del cerebro

En este experimento exploramos los efectos sistémicos y directos de los metabolitos fenólicos del vino, como el ácido protocatéuico (PCA) (Fig. 2), en la actividad electrofisiológica del hipocampo y del córtex de ratas sanas, como mecanismo potencial de los polifenoles sobre las redes eléctricas cerebrales implicadas en enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 2.** Estructura química del ácido protocatéuico (PCA, ácido 3,4-dihidroxibenzoico).

Para este estudio electrofisiológico, se han empleado 26 ratas Sprague-Dawley (250-300 gr) de entre 11 y 12 semanas de edad que se alojaron en condiciones higiénicas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura estable (20-22 °C) y comida y bebida ad libitum de acuerdo con la normativa europea vigente (2010/63/UE), el Comité de Ética del CSIC (27/07/2016) y el Área de Protección Animal de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (26/10/2016). De estos 26 animales, 16 fueron utilizados para la realización de los experimentos electrofisiológicos que se detallarán a continuación, y los otros 10 únicamente para llevar a cabo los test conductuales que permitan estudiar su relación con la memoria.

Se realizaron tres tipos de experimentos electrofisiológicos que permitieron conocer el efecto de este ácido sobre los potenciales provocados y espontáneos de la región de CA1 del hipocampo tras la estimulación de la región de CA3, o de la propia región de CA1 de manera antidrómica.

En el primer experimento, el PCA se inyectó de manera intraperitoneal, y se siguió el siguiente protocolo: inicialmente se realizaron 3 minutos de registro sin llevar cabo ninguna inyección (grupo control), posteriormente

se hicieron 30 minutos de registro tras la inyección intraperitoneal de NaCl 0.9% con 1% de DMSO (grupo DMSO), y finalmente se registró durante 40 minutos después de la inyección intraperitoneal de 150 mg/kg de PCA diluido en solución de NaCl 0.9% con 1% de DMSO (grupo PCA) [12].

En los dos siguientes experimentos, la inyección fue intracerebral, y se siguió un protocolo ligeramente distinto. Inicialmente, se registró en la región CA1 sin llevar a cabo ninguna inyección, para obtener los potenciales provocados en condiciones normales (grupo control de ACSF). A continuación, registramos durante 15 minutos el efecto de la inyección de ACSF (Artificial CerebroSpinal fluid) con 1% de DMSO, ya que el PCA se inyectó posteriormente diluido en esta mezcla (este sería el grupo ACSF). Después de esto, se cambió la micropipeta por una rellena de PCA (15mg/kg) solubilizado en ACSF con 1% de DMSO y se movió ligeramente en el eje antero-posterior para inyectar en una región diferente a la que se inyectó el ACSF y así observar claramente los efectos de este PCA. Al igual que en el caso anterior, primero se registró durante 3 minutos sin inyectar ninguna sustancia (grupo control de PCA) y por último se registró durante 40 minutos después de la inyección de una microgota de PCA en la región CA1 (grupo PCA) [12].

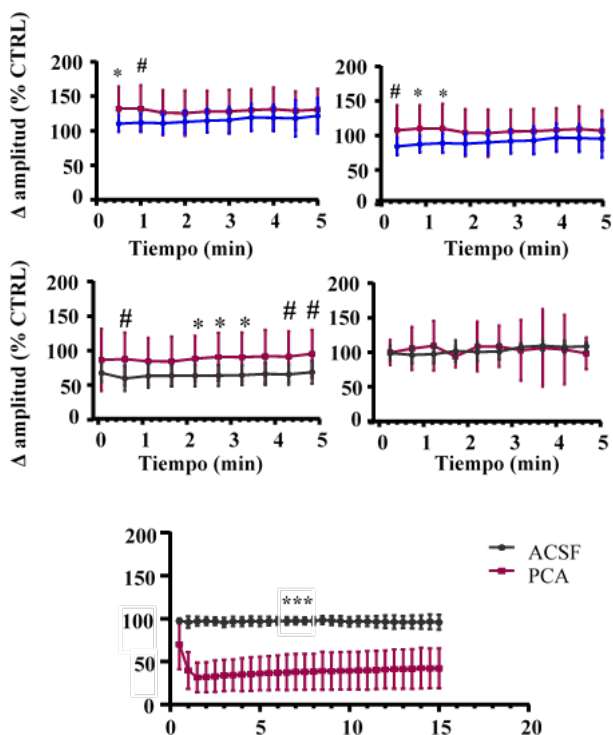
Como principales resultados del primer experimento, la Fig. 3 muestra los efectos tras la administración intraperitoneal de PCA sobre los potenciales provocados que se generan en CA1 al estimular la región de CA3, así como sobre los potenciales espontáneos, generados sin necesidad de que haya una estimulación. En este caso, los resultados muestran que el DMSO no produjo ningún efecto significativo sobre el potencial postsináptico excitatorio (fEPSP) o el potencial sináptico ortodrómico (o-PS). Sin embargo, el PCA aumentó significativamente ambos potenciales (expresados como el % respecto al control 3 minutos después de la inyección) (Fig. 1A y 1B).

Estos hallazgos son compatibles con un aumento de la espiga poblacional en CA1 que sigue al de la respuesta sináptica. Sin embargo, dado que el PCA atraviesa la barrera hematoencefálica, su efecto sobre la excitabilidad del hipocampo puede tener múltiples influencias y llegar a través de diferentes vías. Por tanto, investigamos si el PCA tenía algún efecto directo sobre la actividad electrofisiológica de esta población neuronal. En este caso, los resultados muestran que la microinyección de PCA no afectó significativamente a los o-PS (Fig. 3C) en relación con los valores previos a la inyección, y tampoco variaron los fEPSP (Fig. 3D).

Tras evaluar los efectos de la inyección local de PCA, realizamos un experimento para determinar si estos efectos se debían a una implicación de los canales de sodio [12]. Para ello, evaluamos la respuesta de CA1 mediante la estimulación antidrómica de las proyecciones de esta región.



En este caso, los resultados muestran que el potencial sináptico antidrómico (a-PS) no se vio afectado por la inyección de vehículo, sin embargo, el PCA causó un rápido y fuerte descenso en el a-PS. Este efecto persistió y apenas se había recuperado 40 minutos después de la inyección. La ausencia de efecto sobre la o-PS indica que las neuronas siguen siendo eléctricamente viables tras la administración de PCA y que todavía pueden producir espigas de avance sinápticas (dendrita a soma). Por el contrario, la fuerte reducción de la a-PS sugiere una disfunción de la zona generadora de espigas en la unión axón-soma (Fig. 3E).



**Figura 3.** Efectos de la inyección intraperitoneal de PCA en somas (A) y radiado (B), sobre la respuesta ortodrómica en somas (C) y en radiado (D) y sobre la respuesta antidrómica (E). Los puntos temporales representan la media  $\pm$  s.e.m. de  $n=6$ . Todos los datos están normalizados con respecto a los valores correspondientes previos a la inyección: CTRL ( $n=5 \times 2$ ), ACSF ( $n=5 \times 2$ ), PCA ( $n=5 \times 2$ ).

### 3 Conclusiones y perspectivas

Se ha ejecutado adecuadamente el estudio de los efectos del consumo moderado de vino y vino desalcoholizado en los modelos murinos APP/PS1 y P301S que desarrollan las dos principales lesiones de la EA (placas de  $\beta$ -amiloide y ovillos de tau, respectivamente). Los primeros resultados de biomarcadores fenólicos en orina y heces parecen confirmar la ingesta efectiva de vino por parte de los animales, por lo que es de esperar que se observen efectos en la fisiopatología de la EA derivados de su consumo. En los próximos meses esperamos que el estudio de correlaciones entre el metagenoma intestinal y

el metaboloma en los dos modelos animales contribuya a discernir los efectos del consumo de vino y sus polifenoles sobre los dos principales factores que desencadenan la EA (placas  $\beta$ -amiloide y ovillos Tau) de forma integrada. Por otro lado, hemos constatado que el ácido protocatéquico, metabolito microbiano derivado de los polifenoles del vino, muestra efectos sistémicos y directos en la actividad electrofisiológica del hipocampo y el córtex de ratas sanas, lo que podría considerarse como posible mecanismo de acción de los polifenoles sobre las redes eléctricas cerebrales implicadas en enfermedades neurodegenerativas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (MICIN) a través de la Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033: proyectos PID2019-108851RB-C21 y PID2019-108851RB-C22. Los autores agradecen también a FIVIN la ayuda recibida a proyectos de investigación 2022. Marta Montero agradece la financiación del MICIN (PRE2020-09331). Silvia Yuste posee una ayuda postdoctoral Margarita Salas financiada por la Unión Europea – NextGenerationEU a través del Ministerio de Universidades y la Universitat de Lleida.

### Referencias

1. M. V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé, J. L. Peñalvo, P. Pérez-Matute, M.J. Motilva. *Nutrients* **12**, 10 (2020)
2. Z. Breijyeh, R. Karaman. *Molecules*. **25**, 14 (2020)
3. L. Piccialli, V. Tedeschi, L. Caputo, S. D'errico, R. Ciccone, V. Feo, A. Secondo, A. Pannaccione. *Front. Pharm.* **13**, 11 (2022)
4. M. Yusufov, L. Weyandt, I. Piryatinsky. *J. Neurosci.* **127**, 2 (2017)
5. A. M. McGrattan, B. McGuinness, M. C. McKinley, F. Kee, P. Passmore, J. V. Woodside, C. McEvoy. *Current Nutrition Reports* **8**, 2 (2019)
6. G. C. Román, R. E. Jackson, R. Gadhia, A. N. Román, J. Reis. *Neurologique*. **175**, 10 (2019)
7. G. C. De Paula, J. de Oliveira, D.F. Engel, S. C. Lopes, E. L. G. Moreira, C. P. Figueiredo, R. D. Prediger, A. Fabro de Bem. *Nutr Neurosci.* **24**, 12 (2021)
8. L. Z. Campana, M. P. Nucci, M. Nishiyama, M. Von Zuben, E. Jr. Amaro, P. L. da Luz. *Nutr. Neurosci.* **9**, (2022)
9. C. Royo, Y. Ferradás, J.M. Martínez-Zapater, M.J. Motilva. *Food Chem.* **360**, 130049 (2021)
10. M.J. Motilva, A. Macià, M.P. Romero, L. Rubió, M. Mercader, C. González-Ferrero. *J. Func. Foods* **25**, 80–93 (2016)
11. I. Muñoz-González, A. Jiménez-Girón, P. J. Martín-Álvarez, B. Bartolomé, M. V. Moreno-Arribas, J. Agric. *Food Chem.* **61**, 9470–9479 (2013)
12. M Montero-Atalaya, R. Muñoz-Araiz, J. Makarova, B. Bartolomé, M. V. Moreno-Arribas, O. Herreras, (pendiente de publicación)