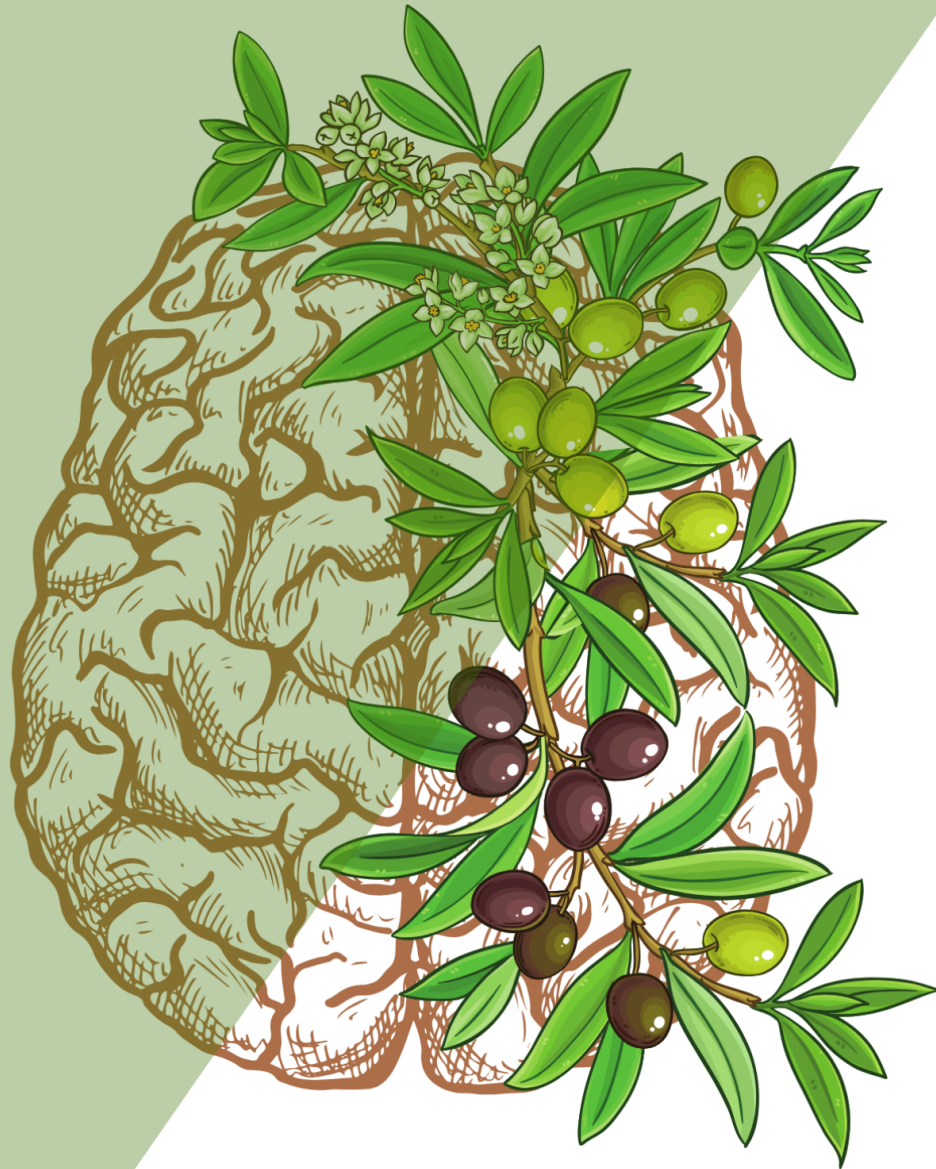


EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA



María del Rocío Toscano Sánchez

TESIS DOCTORAL 2019

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Departamento: Nutrición y salud

Universidad de Sevilla

Departamento: Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología



EFFECTO PROTECTOR DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA



INSTITUTO DE LA GRASA
Departamento de Alimentación y Salud



FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e
Inmunología

Memoria presentada por Dña. María del Rocío Toscano Sánchez para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Dr. SERGIO MONTSERRAT DE LA PAZ, Profesor del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla

Dra. MARÍA DEL CARMEN MILLÁN LINARES, Responsable de la Unidad de Biología Celular del Instituto de la Grasa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**EFFECTO PROTECTOR DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA**” realizada por Dña. María del Rocío Toscano Sánchez para optar al grado de Doctor, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

V.º B.º

Los Directores

Dr. Sergio Montserrat de la Paz Dra. M^a del Carmen Millán Linares

Dr. VÍCTOR SÁNCHEZ MARGALET, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla, CERTIFICA que Dña. María del Rocío Toscano Sánchez cumple los requisitos académicos (R.D. 99/2011) para optar al grado de Doctor.

V.º B.º

El Tutor

Dr. Víctor Sánchez Margalet

A mi familia

*“Lo que eres es lo que has sido,
lo que serás es lo que haces a partir de ahora”*

Buda

ÍNDICE

CAPÍTULO 01 *Introducción general y objetivos*

Aceite de oliva	15
Hiperlipemia postprandial	28
Aceite de oliva y enfermedades inmunoinflamatorias	30
Microglía	33
Objetivos	40

CAPÍTULO 02 *Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote M1/M2 microglia polarization in a fatty acid- dependent manner*

Resumen	49
Abstract	50
Introduction	51
Materials and methods	52
Results	63
Discussion	72
Conclusion	74

CAPÍTULO 03 *Unsaponifiable and phenolic fractions from virgin olive oil prevent neuroinflammation skewing microglia polarization toward M2 phenotype*

Resumen	83
Abstract	84
Introduction	85
Materials and methods	86
Results	96
Discussion	106
Conclusion	109

CAPÍTULO 04 **Discusión general y conclusiones**

Discusión general	115
Conclusiones	121
Lista de abreviaturas	127
Currículum Vitae	133
Agradecimientos	143

CAPÍTULO 01

Introducción
general
y
objetivos



ACEITE DE OLIVA

Generalidades

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.) se originó hace más de 6000 años en Oriente Medio. En la actualidad, el olivo es uno de los cultivos más importantes a nivel socioeconómico en los países de la cuenca mediterránea, especialmente en Grecia, Italia y España, siendo nuestro país el mayor productor de aceite de oliva virgen del mundo, generando aproximadamente el 40% del total de la producción mundial en 2018 (≈ 1260100 toneladas, **Figura 1**).

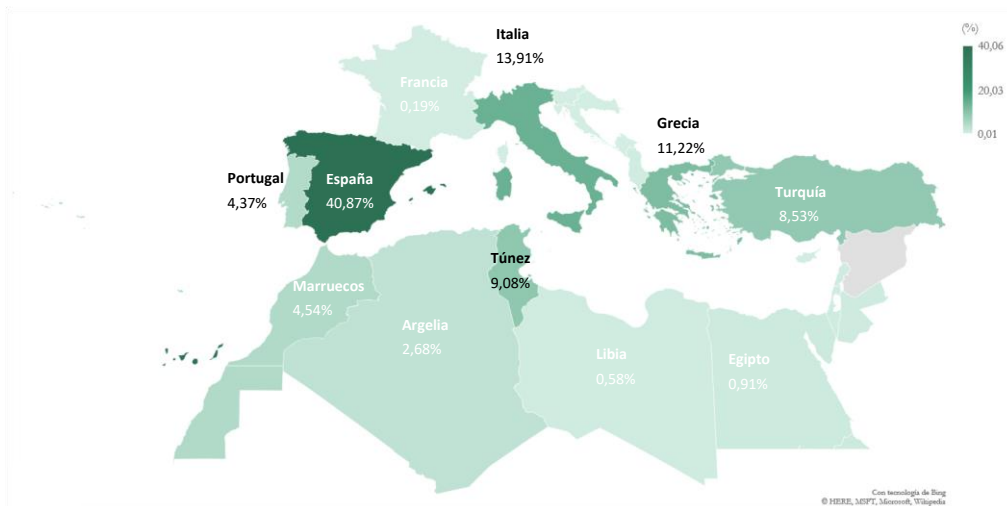


Figura 1. Principales productores de aceite de oliva del mundo. El gráfico muestra el % de aceite de oliva producido por cada país respecto a la producción mundial. Los datos han sido obtenidos de las bases de datos del Consejo Oleícola Internacional (COI), correspondientes a la producción del 2017/2018. <http://www.internationaloliveoil.org>

El aceite de oliva virgen tiene especial relevancia por ser la fuente fundamental de grasa de la Dieta Mediterránea, declarada por la UNESCO Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad en 2013.

Esta dieta está asociada con la longevidad de las poblaciones de su entorno, y con una mejora significativa en el estado de salud de sus consumidores, reduciendo la mortalidad producida por diversas enfermedades crónicas [1].

De acuerdo con el Reglamento de Ejecución (UE) no. 29/2012 de 13/01/2012, los aceites de oliva vírgenes son considerados el zumo natural que se ha obtenido del mesocarpo de la drupa del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), obtenidos exclusivamente a partir de aceitunas frescas y sanas por procedimientos físicos en condiciones de baja temperatura (<27 °C). Durante su elaboración no hay contacto en ningún momento con productos químicos o disolventes orgánicos. El aceite de oliva es la única grasa comestible que puede consumirse como un producto natural crudo sin necesidad de ser refinado, ni añadir conservantes ni aditivos. Ésta es la razón por la cual, la composición del aceite de oliva virgen no se ve alterada, conservando todas sus propiedades nutricionales, sus cualidades organolépticas y sus efectos beneficiosos para la salud [2].

El aceite de oliva virgen extra es un aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada como ácido oleico, no es más de 0,8 gramo por cada 100 gramos y cuyas características organolépticas (sabor y color) son excelentes [3]. Los niveles de ácidos grasos en el aceite de oliva virgen varían durante las diferentes etapas de maduración de la aceituna, la variedad y las condiciones de crecimiento. Es comúnmente aceptado que las áreas más frías darán aceites con mayor contenido en ácidos grasos monoinsaturado [4].

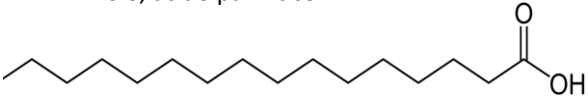
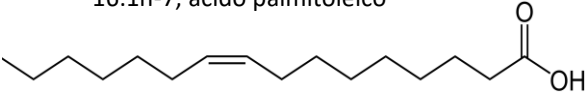
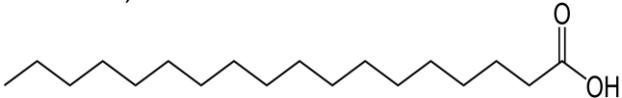
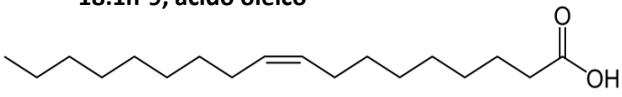
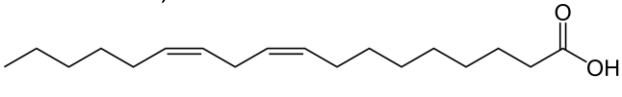
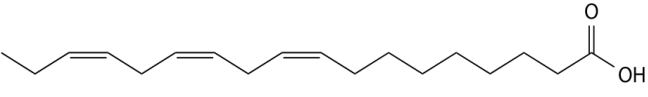
La composición del aceite de oliva virgen incluye compuestos minoritarios (fracción insaponificable y fracción fenólica) que podría oscilar entre el 1 y el 3% del aceite [5]. Son estos compuestos minoritarios (aldehídos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, cetonas,

furanos, y otros) los que le proporcionan al aceite sus características organolépticas propias, aun estando en tan pequeña concentración. Cabe destacar en estas fracciones la presencia de importantes compuestos bioactivos.

Composición del aceite de oliva

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos que suelen presentar una cadena alifática larga. Se pueden clasificar según su estructura química y las propiedades que éstas les confieren en: ácidos grasos saturados (SFAs), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los ácidos grasos saturados no contienen dobles enlaces u otros grupos funcionales a lo largo de la cadena, que está completamente saturada con átomos de hidrógeno. Los principales SFAs de la dieta son el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0), que se componen de 16 y 18 átomos de carbono, respectivamente. Los MUFAs contienen un par de átomos de carbono unidos por un doble enlace *cis*. El ácido oleico (18:1n-9), contiene 18 átomos de carbono con un doble enlace en el noveno carbono desde el extremo metilo de la molécula de ácido graso. Este ácido graso es el principal MUFA en la dieta y representa entre el 55 y el 85% del total de ácidos grasos en el aceite de oliva virgen (**Tabla 1**). En los PUFAs destacan dos familias de compuestos, la n-3 y la n-6, estos dos grupos presentan 2 o más dobles enlaces *cis*, con el primer doble enlace ubicado entre el átomo de carbono 3 y 4 o entre el átomo de carbono 6 y 7, respectivamente, del extremo metilo de la molécula de ácido graso. Estas familias no pueden ser sintetizadas por el cuerpo humano (los dobles enlaces pueden ser introducidos en todas las posiciones de la cadena, con la excepción de las posiciones n-3 y n-6) y, por lo tanto, deben obtenerse de la dieta; como el ácido α -linolénico (18:3n-3) y ácido linoleico (18:2n-6) o sus derivados de cadena larga. Entre los PUFAs destacan por su importancia a nivel metabólico, el ácido

Tabla 1. Estructura química y gama de ácidos grasos principales en el aceite de oliva virgen.

Ácidos Grasos	Porcentaje (%)
16:0, ácido palmítico 	7.5-20.0
16:1n-7, ácido palmitoleico 	0.3-3.5
18:0, ácido esteárico 	0.5-5.0
18:1n-9, ácido oléico 	55.0-83.0
18:2n-6, ácido linoléico 	3.5-21.0
18:3n-3, ácido α-linolénico 	≤ 1.0
MUFAs, ácidos grasos monoinsaturados	55-85
SFAs, ácidos grasos saturados	8-25
PUFAs, ácidos grasos poliinsaturados	3-22

^a Consejo Internacional de Aceite de Oliva [6]

eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), y el ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6) y el ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) [6]. Las concentraciones de SFAs (palmítico + esteárico) y PUFAs (ácido α -linolénico + linoleico) en el aceite de oliva virgen oscilan, respectivamente, entre el 8 y el 25% y entre el 3 y el 22% del total de ácidos grasos.

El ácido oleico es el componente principal del aceite de oliva virgen (\approx 83% de ácido oleico en la posición *sn*-2 de los triacilgliceroles, TGs) y también se encuentra en el aceite de cacahuete (\approx 59%) y aceite de canola (\approx 37%). El ácido oleico es un componente clave de los TGs y los lípidos de la membrana celular [7]. Es importante destacar que el ácido oleico es el ácido graso más común en la naturaleza, así como en nuestra dieta. De manera general, proporciona una cantidad de calorías igual o mayor que la cantidad proporcionada por la combinación de los SFAs y los PUFAs. Se han recomendado restricciones estrictas sobre el consumo de SFAs (<10% del total diario de calorías en personas sanas; y menos del 7% para personas de alto riesgo) y el consumo de PUFAs (<10%). Por el contrario, el ácido oleico puede proporcionar hasta un 20-25% del total de calorías diarias.

La fracción insaponificable del aceite de oliva virgen contiene compuestos altamente bioactivos (>200 constituyentes) (**Tabla 2**). A pesar de su amplia variedad e importancia nutricional, esta fracción solo representa el 3% de la composición total del aceite de oliva virgen (alcanzando concentraciones individuales tan pequeñas como ppm) [8]. Esta fracción es fundamental ya que es la responsable de las características específicas del aceite de oliva virgen, como su estabilidad oxidativa y sus características organolépticas, así como de su color [9].

Tabla 2. Compuestos minoritarios en el aceite de oliva [6].

Compuestos minoritarios	Concentración (mg/kg aceite)
Escualeno	1000-8000
β -caroteno y luteína	4-10
Esteroles	1,000-2,500
Compuestos triterpénicos	100-350
Fenoles	50-1000
Tocoferoles y tocotrienoles	100-350

Entre los diferentes compuestos presentes en dicha fracción minoritaria del aceite de oliva virgen (**Figuras 2-4**), los más abundantes son los hidrocarburos; destacando entre ellos por su contenido el escualeno y en cantidades más pequeñas, los carotenoides como el β -caroteno y la luteína. Otros compuestos minoritarios a resaltar del aceite de oliva virgen serían los fitoesteroles, como el β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, y el campesterol; compuestos triterpénicos en forma de dialcoholes (eritrodol y uvaol) o ácidos como el ácido oleanólico y ácido maslínico.

Por último, cabe destacar la fracción fenólica, su importancia se debe, de la misma manera que en la fracción insaponificable, a la presencia de multitud de componentes bioactivos, siendo su mayor diferencia con los anteriores que estos son solubles en agua. Los principales grupos de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen son secoiridoides, como los derivados éster del ácido elenólico en su forma aglicona o glicosilada con hidroxitirosol (oleuropeína) o tirosol (ligustrósido); fenoles simples, en forma de alcoholes como tirosol e hidroxitirosol o ácidos como el ácido *p*-cumárico, *o*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, gálico, gentísico, ácido siríngico, vanílico, protocatechuico y *p*-hidroxibenzóico); el grupo de los hidroxisocromanos formados por la reacción entre el hidroxitirosol y benzaldehído o vainillina; flavonoides como la luteolina, apigenina y

quercetina; y los lignanos (+)-pinoresinol, 1-(+)-acetoxipinoresinol y 1-(+)-hidroxipinoresinol. Los fenoles lipofílicos incluyen tocoferoles (α -, β -, γ -, y δ -tocoferoles) y tocotrienoles (α -, β -, γ -, y δ -tocotrienoles), siendo el α -tocoferol el componente predominante en el aceite de oliva virgen. Es importante tener en cuenta que solo el aceite de oliva virgen contiene estos compuestos, ya que la mayoría de ellos desaparecen durante los procesos de refinado [6,9].

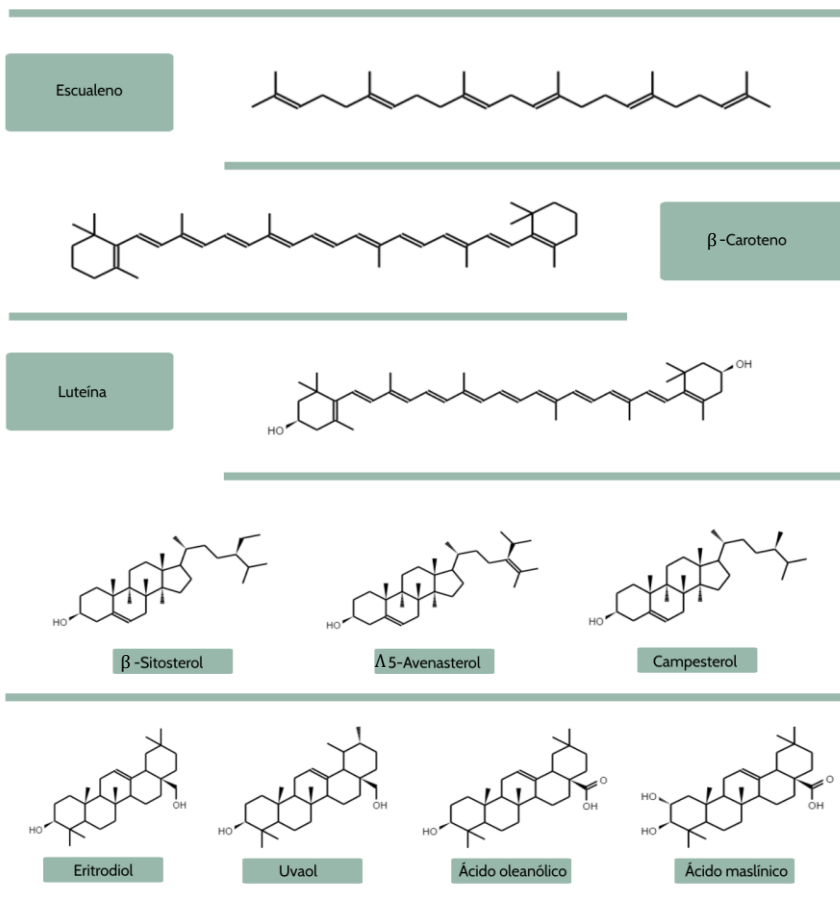


Figura 2. Estructura química de escualeno, carotenoides, esteroides, alcoholes triterpénicos, y ácidos triterpénicos del aceite de oliva virgen.

Introducción general y objetivos

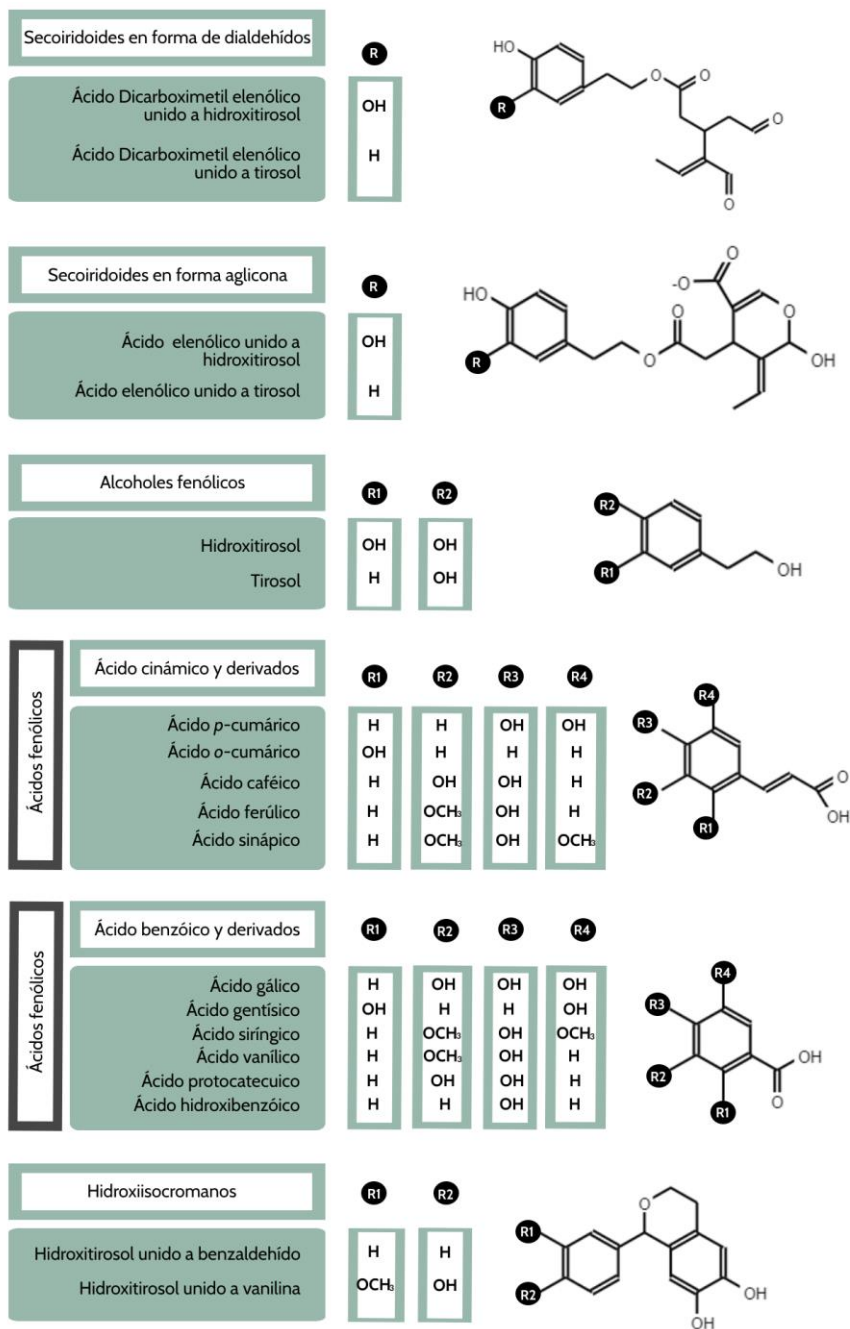


Figura 3. Estructura química de secoiridoides, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos e hidroxiisocromanos del aceite de oliva virgen.

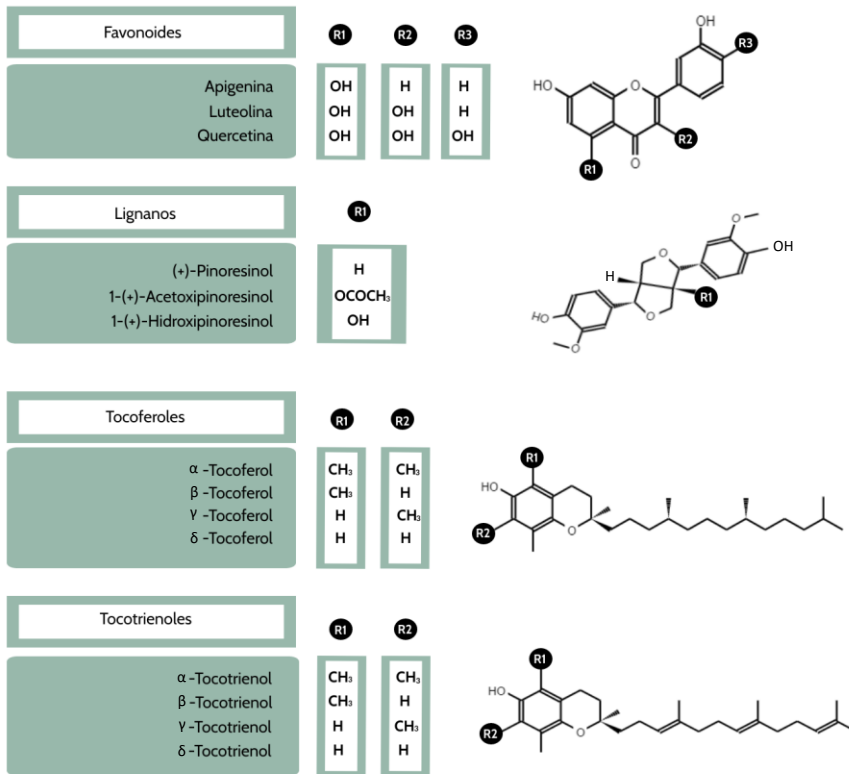


Figura 4. Estructura química de flavonoides, lignanos, tocoferoles y tocotrienoles del aceite de oliva virgen

Digestión de los triglicéridos del aceite de oliva y absorción del ácido oleico y otros ácidos grasos.

En general, el primer evento en la transformación del aceite insoluble en lípidos solubles y absorbibles es la formación de una emulsión inicial (quimo) por masticación en la boca. En este proceso ocurre la dispersión de TGs. El área de superficie de los TGs se incrementa, lo que beneficia su emulsión (formación de gotas lipídicas) en el estómago. Durante el proceso gástrico inicial, los TGs parcialmente emulsionados son atacados por las lipasas linguales y gástricas [10].

La actividad de la lipasa gástrica no contribuye a la hidrólisis de los fosfolípidos y los ésteres de colesterol, siendo funcional en el rango de pH de 3 a 6. En el estómago, esta enzima hidroliza solo del 10 al 30% de los TGs ingeridos debido a un proceso de inhibición inducido por los ácidos grasos libres de cadena larga que se generan en el proceso, que en su mayoría se encuentran protonados a pH gástrico. Esto explica la limitada lipólisis de los TGs en condiciones gástricas con respecto a la hidrólisis completa de los TGs producida por la lipasa pancreática en el duodeno [11,12].

Durante la lipólisis gástrica, los ácidos grasos libres tienen mayor afinidad por la superficie que por el núcleo de las gotitas de lípidos emulsionados [13]. Existe una fusión considerable entre ellas, probablemente debido a la presencia de ácidos grasos libres, monoacilgliceroles (MGs) y diacilgliceroles (DGs) que se sabe que son fusogénicos. Este cambio en la composición lipídica de la superficie de la gota durante la lipólisis podría modificar la tensión interfacial o la tensión superficial y como consecuencia podría interferir con la unión y la actividad de la lipasa gástrica [14]. La acumulación de ácidos grasos libres en la superficie de la gota conduce a una inhibición de la lipólisis por la lipasa gástrica. El mecanismo por el cual esto sucede se atribuye a la formación de grupos en la superficie de las gotitas de lípidos. El aislamiento de estos grupos ha permitido saber que son partículas de aproximadamente 200 nm compuestas principalmente de ácidos grasos libres (aproximadamente 74%), así como fosfolípidos (16%), MGs (5%), DG (4%), colesterol libre (1%), TGs (<1%) y lipasa gástrica. En el intestino, el tamaño más pequeño de las gotitas de lípidos aumenta proporcionalmente a la superficie de los lípidos expuesta a la lipasa pancreática [15]. Los ácidos grasos liberados de la lipólisis gástrica inicial y los aminoácidos y péptidos formados por la actividad proteolítica gástrica estimulan receptores específicos en las células epiteliales intestinales para secretar colecistoquinina. Estimula la

contracción de la vesícula biliar y aporta sales biliares al duodeno. Las gotitas de grasa cubiertas con sales biliares no son accesibles para la lipasa pancreática, pero la enzima co-lipasa permite que la molécula de lipasa pancreática se una a la interfase acuosa de lípidos y facilita la estabilización de los TGs emulsionados.

La lipasa pancreática escinde las posiciones *sn-1* y *sn-3* de los TGs obteniéndose *sn-2* MG y ácidos grasos libres [16]. En el aceite de oliva, hasta el 83% del total de las posiciones *sn-2* en los TGs están ocupadas por ácido oleico, lo que significa que el aceite de oliva actúa como proveedor de esqueletos de hidrocarburos ricos en ácido oleico y ácido oleico libre para la síntesis celular de TGs y fosfolípidos [17]. La absorción de moléculas lipídicas, como las *sn-2* MG y el ácido oleico, tiene lugar a lo largo de las células epiteliales del intestino delgado, principalmente en el yeyuno proximal, pero también en partes que son más distales. Las células epiteliales del intestino delgado muestran una membrana apical con un borde en cepillo formado por multitud de microvellosidades, que tienen un ancho de aproximadamente 100 nm y son mucho menores (5-20 nm) los espacios entre ellos.

Los metabolitos lipídicos generados a lo largo de la digestión del aceite de oliva son más polares que los TGs de origen, pero aún tienen una solubilidad limitada en el ambiente acuoso de la luz intestinal. Las micelas y las submicelas son los principales vehículos para aproximar con éxito las *sn-2* MG-2 y los ácidos grasos libres a la membrana de las microvellosidades. Allí, el microclima ácido (pH 5.3-6) promueve tanto la disociación micelar como la protonación de los ácidos grasos, facilitando la difusión pasiva de los ácidos grasos libres a través de la membrana celular [18]. Los enterocitos también pueden captar ácidos grasos libres a través de procesos dependientes de energía y mediados por portadores. Se conoce la existencia de dos isotipos (I y L) de proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs), que

difieren en su especificidad de unión. I-FABP se une fuertemente a ácidos grasos libres, mientras que L-FABP se une preferentemente a *sn*-2 MG [19]. Estos portadores desempeñan un papel importante a bajas concentraciones (probablemente para asegurar una absorción suficiente de nutrientes lipídicos), mientras que la difusión pasiva predomina a altas concentraciones. Otras proteínas, incluyendo GP330 (megalina), CD36, SR-BI, y la caveolina pueden unir lípidos y metabolitos relacionados [20].

Las diferencias en la tasa de absorción se han descrito como una función de la longitud de la cadena y del número y lugar de los dobles enlaces [21]. Los ácidos grasos de cadena corta (2-4 átomos de carbono) y los de cadena media (6-12 átomos de carbono) se absorben más rápidamente que los de más de 14 átomos de carbono, ya que no necesitan solubilización micelar, solo se unen a la albúmina y se transportan directamente al hígado por la vena porta [22].

Ensamblaje de lipoproteínas intestinales con triglicéridos procedentes de la ingesta de aceite de oliva

En el enterocito, los ácidos grasos libres (principalmente ácido oleico) procedentes de la absorción y junto a los procedentes del metabolismo endógeno, se utilizan para la síntesis de los TGs. Este proceso se inicia con la activación por parte de los ácidos grasos libres a su forma correspondiente acil-CoA. En esta forma, se transfieren secuencialmente a *sn*-2 MGs por medio de MG y DG aciltransferasas. Estas enzimas forman un complejo llamado "triglicérido sintetasa" [23], y la vía favorece la reactivación estereoespecífica en la posición *sn*-1. Esto contribuye al 80% de la resíntesis de TGs intestinal en el estado postprandial. El acil-CoA también se puede transferir al α -glicerofosfato (derivado del metabolismo de la glucosa) por la vía del

ácido fosfatídico, que representa el 20% restante [21]. La composición de estos nuevos TGs es similar a la composición de los TGs del aceite de oliva [24]. Estos TGs son recubiertos en el retículo endoplasmático rugoso y liso con colesterol, fosfolípidos y una molécula de apolipoproteína (apo) B48 en una etapa dependiente de la proteína de transferencia microsomal de TGs (MTP) [25], y se procesan en el aparato de Golgi antes de ser liberados como quilomicrones (CM) por el enterocito a través de exocitosis. Este proceso se produce a través de la membrana basolateral de los enterocitos y los CM entran en los capilares linfáticos de las microvellosidades intestinales que drenan en los canales linfáticos, alcanzando la circulación sistémica a través del conducto torácico [26]. El cuerpo también puede secretar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Si bien los CM son de origen intestinal y se forman después de la ingestión de comidas grasas, las VLDL son las principales lipoproteínas secretadas por el hígado durante el ayuno [21]. Tanto los CM como los VLDL se consideran lipoproteínas ricas en TGs (TRLs).

HIPERLIPEMIA POSTPRANDIAL

Generalidades

La hiperlipemia postprandial es un fenómeno fisiológico normal y transitorio que se produce en respuesta a la ingesta de una comida grasa. Los lípidos de la dieta se absorben como se describió anteriormente y las TRLs secretadas por el intestino tienen la función de estabilizar los lípidos absorbidos de la dieta para ser transportados en el ambiente acuoso del plasma, proporcionando posteriormente energía a células con receptores exógenos de ácidos grasos (por ejemplo, el receptor apoB48 (apoB48R), el receptor de LDL (LDLR) y el receptor de LDL asociado a proteínas) o mecanismos no dependientes de receptores, además de encontrarse implicadas en numerosas vías metabólicas [27]. En personas sanas, los niveles de TGs en plasma generalmente alcanzan un máximo de 3 a 4 h después de una ingesta y tienden a regresar a un estado basal transcurridas entre 6 y 8h (**Figura 5**). Sin embargo, la hiperlipemia postprandial puede volverse patológica cuando la magnitud y la duración de la respuesta de las TRLs se exagera, lo que produce la acumulación de TRLs postprandiales y sus remanentes en la circulación sanguínea [28]. En esos casos, el pico hiperlipémico postprandial puede ser de dos a tres veces más alto y prolongado, manteniéndose incluso hasta 10-12 h después de la ingestión de grasa [29].

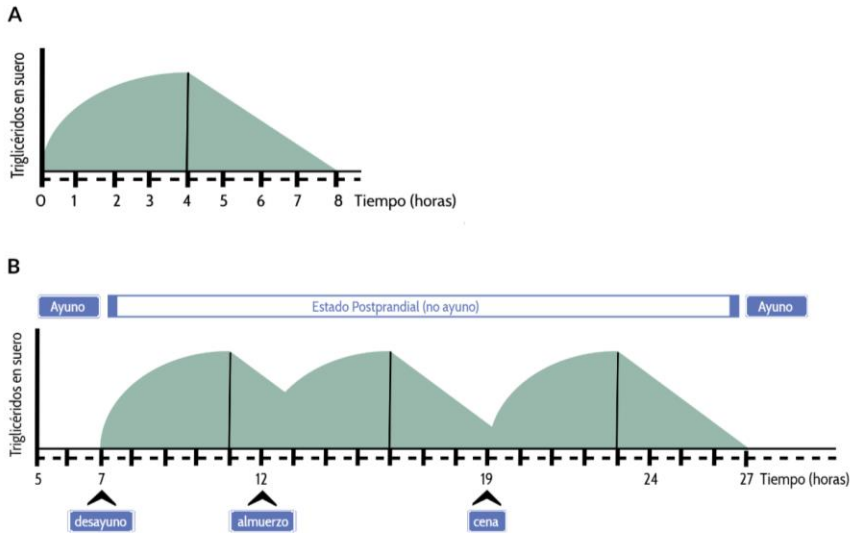


Figura 5. Niveles séricos de TG tras la ingesta de una comida rica en grasa. (A) Los niveles séricos de TG alcanzan un pico a las 3-4 h y lentamente vuelven a niveles basales a las 6-8 h tras la ingesta de una comida rica en grasa. (B) La mayor parte del día vivimos en un periodo postprandial (no en ayunas) al comer al menos 3 veces al día una comida con grasa.

ACEITE DE OLIVA Y ENFERMEDADES INMUNOINFLAMATORIAS

Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado el efecto relevante de la dieta en la prevención de enfermedades crónicas. Hoy en día, está claro que una dieta poco saludable, entre otros hábitos adversos en el estilo de vida, es uno de los factores principales más importantes que contribuyen al aumento de las enfermedades inmunoinflamatorias en las poblaciones de los países desarrollados y en desarrollo. La incidencia de afecciones inmunoinflamatorias en los países occidentales ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, debido a los cambios en la dieta que implican un aumento de la ingesta calórica y modificaciones en las cantidades relativas de los componentes de la dieta, incluyendo ingesta reducida de nutrientes básicos a cambio de nutrientes más refinados y ultraprocesados. Por el contrario, varios estudios epidemiológicos y observacionales han resaltado que los regímenes alimentarios tradicionales, como la dieta mediterránea y asiática, están asociados con una menor incidencia de ciertas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, la inflamación crónica y el sistema inmune [30].

En este contexto, una amplia variedad de estudios han demostrado los efectos beneficiosos de los ácidos grasos del aceite de oliva, especialmente por su contenido en ácido oleico, en la modulación de la respuesta inmune, lo que sugiere que el consumo de aceite de oliva puede ser útil para el manejo de la activación crónica del sistema inmune. En un ensayo clínico realizado en hombres de mediana edad, una dieta rica en MUFAs disminuyó significativamente la cantidad de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de dos meses en comparación con un grupo de control con dieta normal [31].

De manera similar, en un ensayo clínico aleatorizado de dos años, una dieta mediterránea rica en aceite de oliva virgen extra disminuyó los niveles séricos de interleucina (IL)-18, IL-7 e IL-6 [32]. En línea con lo demostrados por otros investigadores, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la suplementación dietética con aceite de oliva refinado rico en MUFAs (principalmente ácido oleico) o aceite de oliva refinado rico en MUFAs y PUFAs disminuye la expresión génica de marcadores fenotípicos M1 proinflamatorios, así como un aumento de los marcadores fenotípicos M2 antiinflamatorios en macrófagos derivados de médula ósea de ratones con síndrome metabólico. Ambas dietas disminuyeron los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1 β , IL-6 y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) [33]. De la misma manera, la administración oral de ácido oleico disminuyó la producción de IL-1 β e IL-6 en macrófagos peritoneales residentes aislados de ratas [34]. En neutrófilos, una dieta rica en aceite de oliva virgen disminuyó los niveles de prostaglandina E2 (PGE₂) en ratas y el tratamiento *in vitro* con ácido oleico disminuyó la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno ERK 1/2 y p38 después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS) [35,36].

A pesar de que los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva se han atribuido tradicionalmente al alto contenido de MUFAs presente en su fracción mayor, hoy en día, está claro que el aceite de oliva también contiene múltiples componentes menores con propiedades biológicas interesantes que actúan a través de diferentes vías inflamatorias que modulan las células del sistema inmunitario.

Las fracciones presentes en el aceite de oliva virgen, la fracción fenólica y la fracción insaponificable, ejercieron efectos antiinflamatorios y antioxidantes en macrófagos peritoneales estimulados con LPS en ratones, disminuyendo la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como

reduciendo la expresión de iNOS y ciclooxigenasa-2 (COX-2) a través de MAPKs y el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) [37,5]. Otros componentes minoritarios aislados del aceite de oliva virgen también han exhibido interesantes efectos antiinflamatorios en las células inmunes. El hidroxitirosol (HTyr) ejerció propiedades antiinflamatorias en células endoteliales humanas y redujo la metaloproteínasa (MMP)-9 y COX-2 en monocitos humanos activados a través de la inhibición de la proteína quinasa C, PKC-α y PKC-β [38,39]. Además, tanto el HTyr como la oleuropeína inhibieron la activación de los mastocitos inducida por las vías inmunes [40]. Del mismo modo, el escualeno moduló la respuesta inflamatoria inducida en macrófagos murinos, monocitos y neutrófilos humanos, reduciendo enzimas y citoquinas proinflamatorias a través de las vías NF-κB y MAPK y disminuyendo la sobreexpresión del receptor TLR-4 y MMP-1, -3 y -9 [41].

Por lo tanto, estos resultados proporcionan una evidencia preliminar de que el aceite de oliva y sus componentes pueden tener potenciales propiedades positivas sobre la modulación de los procesos inmunoinflamatorios. Sobre esta base, se ha investigado en gran medida en modelos *in vitro* e *in vivo* para examinar sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. En consecuencia, en la actualidad, la tendencia hacia el uso de compuestos naturales y la dieta, debido a los efectos secundarios más bajos en comparación con la farmacoterapia clásica, ha dado lugar al consumo de compuestos obtenidos del aceite de oliva y aceite de oliva *per se* como una terapia alternativa para la prevención y el manejo de diferentes enfermedades neuroinmunoinflamatorias tales como esclerosis o enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer, en las que las células inmunes del sistema nervioso central (SNC) se encuentran activadas [30].

MICROGLIA

Generalidades

El tejido nervioso del cerebro y la médula espinal está hecho de una intrincada red de diferentes tipos de células, de las cuales las células neurales están representadas por neuronas y neuroglía, siendo estas últimas de origen ectodérmico, neuroepitelial (astroglía, oligodendroglía y NG-2 glía), o de origen mesodérmico (microglía). Las células microgliales SNC son células procedentes de macrófagos fetales que emigran desde el saco vitelino al tubo neuronal en las primeras etapas del desarrollo embrionario [42,43]. Estos precursores de macrófagos se someten posteriormente a la metamorfosis más prominente, lo que los convierte en microglía vigilante que es fundamentalmente diferente de sus antepasados en cuanto a morfología y función. De hecho, la apariencia morfológica de la microglía del SNC maduro no se parece a los macrófagos; más bien, las células microgliales sanas se parecen a las neuronas (**Figura 6**). Del mismo modo, la fisiología microglial se altera a medida que las células microgliales aprenden a expresar receptores para neurotransmisores y neuromoduladores [44,45], lo que les permite percibir su entorno neuroquímico. Este complemento de receptores "neurales" se coexpresa con los receptores "inmunes" característicos del linaje macrófago mielóide, que hace que las células de la microglía, posiblemente, sean las células más "receptivas" del tejido nervioso.

La microglía fue bien definida por Pío del Río Hortega en 1919 en una serie de documentos recientemente traducidos y anotados [46]. En el siglo siguiente a su descubrimiento y denominación, se ha realizado un trabajo significativo en un esfuerzo por descubrir las funciones realizadas por estas células pequeñas y misteriosas.

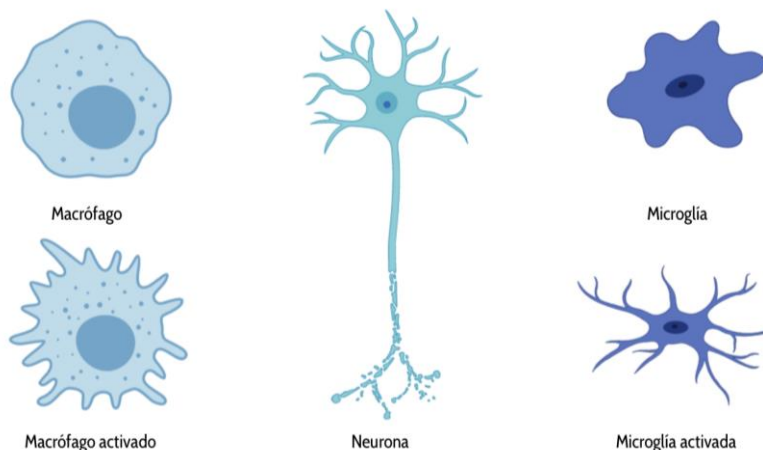


Figura 6. Diferencias morfológicas entre los diferentes tipos celulares presentes en el SNC.

Su denominación se debe a que son significativamente más pequeñas que otras células no neuronales, de hecho, el área de su soma generalmente es inferior a $50 \mu\text{m}^2$ [47]. Hay una serie de fenotipos microgliales que difieren en la morfología ramificada y vigilante que normalmente se encuentra durante las condiciones de estado estacionario [48].

La "activación" o "hiperreactividad" microglial ahora se considera como una terminología desactualizada ya que se sabe que las microglías constituyen una población celular heterogénea que sufre cambios altamente adaptativos tanto en la morfología como en la función, dependiendo del contexto de salud o enfermedad [49,50].

Activación de la microglía

Durante décadas, la activación microglial se ha considerado como una transformación estereotipada de microglías ramificadas "en reposo", en condiciones fisiológicas, en macrófagos ameboides

completamente inmunocompetentes tras la ruptura de la homeostasis del SNC o en condiciones patológicas. Ahora sabemos que la activación microglial no es un proceso de todo o nada; es progresivo y al menos parcialmente reversible; depende del contexto patológico, la naturaleza y la fuerza de los estímulos, y los entornos en los que aparecen estos estímulos. Las respuestas microgliales a la alteración del SNC implican dos principios de señalización: uno se basa en la aparición de factores que generalmente están ausentes, o en baja concentración, o en diferentes configuraciones en condiciones fisiológicas como pueden ser: estructuras microbianas, como el LPS, citocinas como IL-1 β , TNF- α o INF- γ , componentes intracelulares liberados por células dañadas, o agregados de proteínas o componentes sanguíneos; el segundo se basa en la desaparición de las señales constitutivamente presentes en condiciones fisiológicas que contribuyen a mantener el estado de vigilancia de la microglía. Estas señales que mantienen la homeostasis del SNC son quimiocinas como IL-4 o IL-13, la fractalquina, o las glicoproteínas CD200 [51,52].

Las células microgliales también están dotadas de un gran repertorio de receptores para neurotransmisores y neuromoduladores que pueden afectar sus respuestas a los estímulos patológicos [53]. Por lo tanto, la microglía en cualquier contexto patológico dado estará expuesta a un conjunto específico de señales y mediadores difusibles que determinarán un fenotipo microglial específico. Diferentes fenotipos significan diferentes funciones y, de hecho, la microglía reactiva puede expresar diferentes propiedades funcionales importantes. Por ejemplo, se demostró que la estimulación diferencial de las células microgliales por diferentes citocinas o agentes exógenos dio como resultado la adquisición de fenotipos distintos que ofrecen neuroprotección o neurotoxicidad [54].

De manera análoga a las nomenclaturas Th1 y Th2 de los linfocitos T [55] y en un intento de clasificar estos estados reactivos, el concepto de polarización de macrófagos M1 / M2 se aplicó a microglía [56,57]. Se definieron dos estados microgliales principales: se propuso que la microglía M1 activada clásicamente tuviera propiedades citotóxicas; Por el contrario, la microglía activada por M2 mostró un fenotipo de activación alternativo y supuestamente participa en la reparación y regeneración tisular (**Figura 7**).

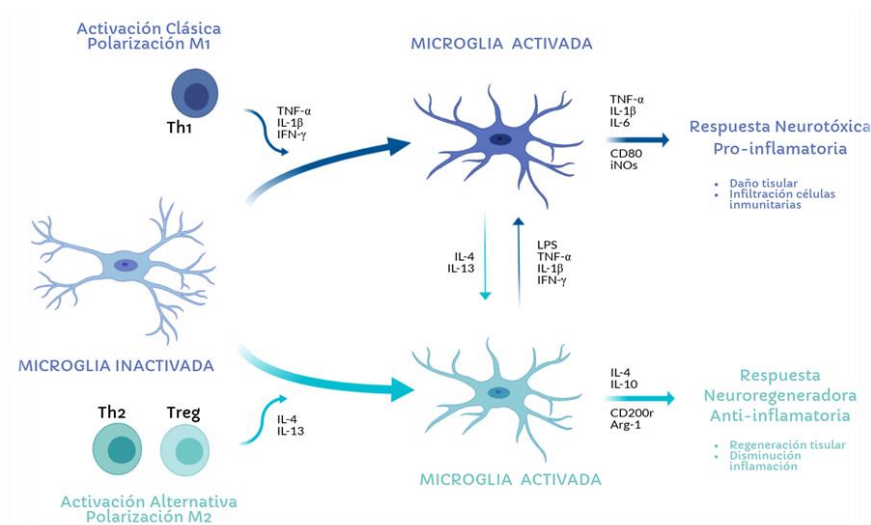


Figura 7. Representación de la plasticidad de las células microgliales por medio de las dos posibles vías de activación, mediadores y receptores implicados en el proceso y fenotipo funcional obtenido.

Plasticidad de la microglía y neuroinflamación

Durante décadas, el cerebro ha sido visto como un sitio inmune privilegiado, donde la inflamación se provoca a través de procesos infecciosos o debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica con la infiltración concomitante de células inmunes periféricas [58].

Hoy en día, es ampliamente aceptado que la infección sistémica, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas pueden desencadenar una respuesta inmune alterada en el SNC [59–61], que posteriormente puede conducir a una neuroinflamación sostenida. En este sentido, la microglía, contribuye activamente al daño neuronal en el curso de la neuroinflamación, durante la cual la sobreactivación y la desregulación funcional de la microglía tiene consecuencias neurotóxicas desastrosas y progresivas [62]. Ahora hay consenso sobre la ocurrencia de renovación dinámica de microglía en el cerebro, y que su fenotipo puede cambiar dependiendo del contexto [63,64].

Como primera línea de defensa, la activación de la microglía anticipa reacciones de cualquier otro tipo de células en el SNC. Son capaces de responder a casi cualquier cambio en la homeostasis cerebral, desde cambios sutiles en el equilibrio de iones hasta alteraciones en la integridad estructural del cerebro [65]. Para examinar continuamente su entorno neuronal y mantener la homeostasis de los tejidos y la integridad neuronal, la superficie de la célula microglial ha sido equipada con un repertorio de numerosos transportadores, canales y receptores [66].

Las enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple se caracterizan por la degeneración neuronal en regiones específicas del SNC, que comparten mecanismos fisiopatológicos comunes, incluida la neuroinflamación [67,68]. Los mediadores inflamatorios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-2, NO y NF- κ B, contribuyen a la neurodegeneración y al daño de la mielina en estas enfermedades neurodegenerativas. La microglía y los macrófagos activados producen estos mediadores inflamatorios, orquestando la neuroinflamación y la neurodegeneración. La neuroinflamación es inicialmente una

respuesta protectora en el cerebro, sin embargo, las respuestas inflamatorias no controladas son perjudiciales ya que inducen la liberación de altos niveles de factores neurotóxicos como ROS y TNF- α , y bloquean la regeneración neuronal [68].

Por lo tanto, demostrar una polarización funcional microglial podría descubrir nuevas perspectivas para comprender la forma en que la inflamación local del SNC puede promover la neurodegeneración. En la enfermedad del Alzheimer, la inflamación se considera una patología que ocurre en respuesta a la acumulación de β -amiloide. La activación clásica M1 de la microglía se considera el mecanismo de defensa inicial en el Alzheimer y se caracteriza por la liberación de citocinas proinflamatorias. Por el contrario, la activación alternativa M2 se asocia con angiogénesis, neurogénesis, efectos antiinflamatorios y la degradación de los depósitos de β -amiloide. Por lo tanto, la modulación de la activación microglial hacia el fenotipo M2 se ha propuesto como una nueva estrategia terapéutica para pacientes con Alzheimer [69]. De hecho, Latta *et al.* (2015) [70] mostraron que un fenotipo M2 mejorado, inducido por la sobreexpresión de IL-4 o el tratamiento con IL-4 exógena, disminuyó la deposición de β -amiloide tanto *in vitro* como en un modelo animal. De manera similar, se ha demostrado que la polarización inducida a microglía M1 por IFN- γ aumenta la carga amiloide en un modelo animal de Alzheimer [71].

La neuroinflamación mediada por microglía también es un sello distintivo de la enfermedad de Parkinson. En los cerebros de pacientes con Parkinson, la microglía ejerce efectos neurotóxicos y neuroprotectores dependiendo del microambiente circundante. La activación microglial persistente por neuronas dañadas y el depósito de α -sinucleína es generalmente perjudicial. La microglía reactiva libera una variedad de ROS, como el NO y el anión superóxido y las citocinas proinflamatorias, que exacerban los déficits motores en el

Parkinson. Por lo tanto, se han propuesto muchos agentes antiinflamatorios como agentes terapéuticos prometedores para dicha enfermedad. De hecho, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y la minociclina se han utilizado en estudios clínicos para pacientes con Parkinson [72].

La activación microglial también se ha estudiado ampliamente en pacientes con esclerosis múltiple y en el modelo experimental de ratón con encefalomiелitis autoinmune. En esta condición patológica, la microglía libera moléculas neurotóxicas y neurotróficas, citocinas pro y antiinflamatorias, que desempeñan papeles beneficiosos y perjudiciales durante las etapas de desmielinización y recuperación [73] Miron *et al.* (2013) [74] examinaron si los fenotipos M2 contribuyen a la respuesta regenerativa en el SNC. Se ha observado que la polarización M2 de la microglía preservó la homeostasis de la mielina después de una lesión de la sustancia blanca en una lesión cerebral traumática o modelos de desmielinización inducida por cuprizona [75,76]. Por lo tanto, mejorar los efectos neuroprotectores modulando la plasticidad de la microglía hacia un fenotipo M2 puede ser un enfoque terapéutico prometedor.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar el posible papel modulador del aceite de oliva sobre la plasticidad de las células de microglía. Para ello, varias aproximaciones fueron realizadas para estudiar los beneficios derivados de la ingesta del aceite de oliva en comparación con otras grasas de la dieta, así como la bioactividad de la fracción fenólica e insaponificable presentes en el aceite de oliva virgen.

Objetivos específicos

1. Determinar el papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos postprandiales, aisladas de sujetos sanos tras la ingesta de una comida rica en ácidos grasos saturados, aceite de oliva refinado o aceite de oliva refinado más ácidos grasos poliinsaturados omega-3, sobre la plasticidad de la microglía utilizando la línea celular BV2.
2. Determinar el papel de la fracción fenólica y de la fracción insaponificable aisladas aceite de oliva virgen sobre la plasticidad de la microglía utilizando la línea celular BV2.
3. Determinar el efecto de dietas enriquecidas en ácidos grasos saturados, aceite de oliva refinado, aceite de oliva virgen o aceite de oliva refinado más ácidos grasos poliinsaturados omega-3, sobre el estado neuroinflamatorio y plasticidad microglial en cerebro de ratones alimentados con las diferentes dietas.

REFERENCIAS

- [1] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, *et al.* Virgin olive oil and Hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* **2016**, 14(4):323-9.
- [2] Ochando-Pulido JM, Martinez-Ferez A. On the recent use of membrane technology for olive mil wastewater purification. *Membranes* **2015**, 5: 513-531.
- [3] Bermudez B, Lopez S, Ortega A, *et al.* Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des.* **2011**, 17: 831–843.
- [4] Mansour AB, Gargouri B, Flaminio G, *et al.* Effect of agricultural sites on differentiation between Chemlali and Neb Jmel olive oils. *J Oleo Sci.* **2015**, 64: 381-392.
- [5] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, *et al.* Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chem.* **2014**, 147: 117-123.
- [6] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, *et al.* Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *BBA-Biomembranes* **2014**, 1838: 1638-1656.
- [7] Hodson L, Fielding BA. Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res.* **2013**, 52: 15-42.
- [8] De la Lastra CA. An up-date of olive oil and bioactive constituents in health: molecular mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des.* **2011**, 17: 752-753.
- [9] Frankel E, Bakhouch A, Lozano-Sanchez J, *et al.* Literatura review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *J Agric Food Chem.* **2013**, 61: 5179-5188.
- [10] Tomasik PJ, Wedrychowicz A, Rogatko I, *et al.* Gastric lipase secretion in children with gastritis. *Nutrients* **2013**, 5: 2924-2932.
- [11] Johnson K, Ross L, Miller R, *et al.* Pancreatic lipase-related protein 2 digests fats in human milk and formula in concert with gastric lipase and carboxyl ester lipase. *Pediatr Res.* **2013**, 74: 127-132.
- [12] Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, *et al.* Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem.* **2002**, 277: 28070-28079.

- [13] Gross DA, Silver DL. Cytosolic lipid droplets: from mechanisms of fat storage to disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **2014**, 49: 304-326.
- [14] Gargouri Y, Pieroni G, Ferrato F, *et al.* Human gastric lipase. A kinetic study with dicaprin monolayers. *Eur J Biochem.* **1987**, 169: 125-129.
- [15] Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2009**, 296: E1183-E1194.
- [16] Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* **2013**, 27: 459-484.
- [17] Abia R, Perona JS, Pacheco YM, *et al.* Postprandial triacylglycerols from dietary virgin olive oil are selectively cleared in humans. *J Nutr.* **1999**, 129: 2184-2192.
- [18] Murota K, Storch J. Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *J Nutr.* **2005**, 135: 1626-1630.
- [19] Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, *et al.* Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2011**, 300: G803-G814.
- [20] Rohrl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion. *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1831: 1626-1633.
- [21] Mu H, Hoy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* **2004**, 43: 105-133.
- [22] Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short chain fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* **2014**, 14: 277-288.
- [23] Wilfling F, Wang H, Haas JT, *et al.* Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from ER to lipid droplets. *Dev Cell.* **2013**, 24: 384-399.
- [24] Bysted A, Holmer G, Lund P, *et al.* Effect of dietary fatty acids on the postprandial fatty acid composition of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr.* **2005**, 59: 24-34.
- [25] Giammanco A, Cefalu AB, Noto D, *et al.* The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol.* **2015**, 6: 61.

- [26] Bermudez B, Pacheco YM, Lopez S, *et al.* Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites* **2004**, 55: 1-10.
- [27] Varela LM, Ortega-Gomez A, Lopez S, *et al.* The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/macrophage cells. *J Nutr Biochem.* **2013**, 24: 2031-2039.
- [28] Chan DC, Pang J, Romic G, *et al.* Postprandial hypertriglyceridemia and cardiovascular disease: Current and future therapies. *Curr Atheroscler Rep.* **2013**, 15: 309-317.
- [29] Hubler MJ, Kennedy A. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J Nutr Biochem.* **2016**, 34: 1–7.
- [30] Aparicio-Soto M, Sanchez-Hidalgo M, Rosillo MA, *et al.* Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct.* **2016**, 7: 4492-4505.
- [31] Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, *et al.* Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr.* **1998**, 67: 129–135.
- [32] Esposito K, Marfella R, Ciotola M, *et al.* Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *J Am Med Assoc.* **2004**, 292: 1440–1446.
- [33] Montserrat-de la Paz S, Naranjo MC, Lopez S, *et al.* Niacin and olive oil promote skewing to the M2 phenotype in bone marrow- derived macrophages of mice with metabolic syndrome. *Food Funct.* **2016**, 7: 2233–2238.
- [34] Magdalon J, Vinolo MA, Rodrigues HG, *et al.* Oral administration of oleic or linoleic acids modulates the production of inflammatory mediators by rat macrophages. *Lipids.* **2012**, 47: 803–812.
- [35] de La Puerta Vázquez R, Martínez-Domínguez E, Sánchez Perona J, *et al.* Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism.* **2004**, 53: 59–65.
- [36] Reyes-Quiroz ME, Alba G, Saenz J, *et al.* Oleic acid modulates mRNA expression of liver X receptor (LXR) and its target genes ABCA1 and SREBP1c in human neutrophils. *Eur J Nutr.* **2014**, 53: 1707–1717.

- [37] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, *et al.* Extra virgin olive oil polyphenolic extracts downregulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing NF kappa B and MAPK signalling pathways. *Food Funct.* **2014**, 5: 1270–1277.
- [38] Lopez S, Montserrat-de la Paz S, Lucas R, *et al.* Effect of metabolites of hydroxytyrosol on protection against oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J Funct Foods.* **2017**, 29: 238-247.
- [39] Scoditti E, Nestola A, Massaro M, *et al.* Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis.* **2014**, 232: 17–24.
- [40] Persia FA, Mariani ML, Fogal TH, *et al.* Hydroxytyrosol and oleuropein of olive oil inhibit mast cell degranulation induced by immune and non-immune pathways. *Phytomedicine.* **2014**, 21: 1400–1405.
- [41] Cardeno A, Aparicio-Soto M, Montserrat de la Paz S, *et al.* Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *J Funct Foods.* **2015**, 14: 779–790.
- [42] Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* **2010**, 330: 841–845.
- [43] Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2015**, 7: a020537.
- [44] Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, *et al.* Physiology of microglia. *Physiol Rev.* **2011**, 91: 461–553.
- [45] Brawek B, Garaschuk O. Microglial calcium signaling in the adult, aged and diseased brain. *Cell Calcium.* **2013**, 53: 159–169.
- [46] Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, *et al.* The “Big-Bang” for modern glial biology: translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia.* **2016**, 64: 1801–1840.
- [47] Jinno S, Fleischer F, Eckel S *et al.* Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia.* **2007**, 55: 1334–1347.

- [48] Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **2013**, 39: 3–18.
- [49] Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime*. **2014**, 6:13.
- [50] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. **2016**, 353: 777–783.
- [51] Biber K, Neumann H, Inoue K, *et al*. Neuronal ‘On’ and ‘Off’ signals control microglia. *Trends Neurosci*. **2007**, 30(11):596–602.
- [52] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. **2007**, 10(11):1387–1394.
- [53] Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M *et al*. Physiology of microglia. *Physiol*. **2011**, Rev 91(2):461–553.
- [54] Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, *et al*. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci*. **2005**, 29(3): 381–393.
- [55] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, *et al*. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. **2000**, 164(12): 6166–6173.
- [56] Kreider T, Anthony RM, Urban JF Jr, *et al*. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*. **2007**, 19(4): 448–453.
- [57] Martinez FO, Sica A, Mantovani A *et al*. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. **2008**, 13: 453–461.
- [58] Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*. **2014**, 14: 463–477.
- [59] Gyoneva S, Davalos D, Biswas D, *et al*. Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. *Glia*. **2014**, 62: 1345–1360.
- [60] Venegas C, Kumar S, Franklin BS, *et al*. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer’s disease. *Nature*. **2017**, 552: 355–361.

- [61] Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. **2013**, 61: 71–90.
- [62] Block ML, Zecca L, Hong J. Microgliamediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. **2007**, 8: 57–69.
- [63] Baron R, AA B, Nemirovsky A, *et al*. Accelerated microglial pathology is associated with A β plaques in mouse models of Alzheimer’s disease. *Aging Cell*. **2014** 13 :1–12.
- [64] Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, *et al*. Microglial brain region—dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci*. **2016** 19: 504–516
- [65] Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. **1996**, 2236: 471–474.
- [66] Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, *et al*. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*. **2013**, 16: 1896–1905.
- [67] Heppner FL, Ransohoff RM, and Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. **2015**, 16: 358–372.
- [68] Chen WW, Zhang X, and Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. **2016**, 13: 3391–3396.
- [69] Song GJ and Suk K. Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. **2017**, 9: 139.
- [70] Latta CH, Sudduth TL, Weekman EM, *et al*. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid-beta using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation*. **2015**, 12: 41.
- [71] Weekman EM, Sudduth TL, Abner EL, *et al*. Transition from an M1 to a mixed neuroinflammatory phenotype increases amyloid deposition in APP/PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation*. **2014**, 11: 127.
- [72] Gao HM, and Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol*. **2008**, 29: 357–365.

[73] Correale J. The role of microglial activation in disease progression. *Mult Scler.* **2014**, 20: 1288–1295.

[74] Miron VE, Boyd A, Zhao JW, *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* **2013**, 16: 1211–1218.

[75] Chen S, Zhang H, Pu H, *et al.* n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep.* **2014**, 4: 7458.

[76] Wang G, Shi Y, Jiang X, *et al.* HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3beta/PTEN/Akt axis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2015**, 112: 2853–2858.

CAPÍTULO 02

Postprandial
triglyceride-rich
lipoproteins promote
M1/M2 microglia
polarization in a fatty
acid-dependent
manner

Toscano R, Millan-Linares MC,
Lemus-Conejo A, Claro C,
Sanchez-Margalet V,
Montserrat-de la Paz S.

Journal of Nutritional Biochemistry

Accepted, in press



RESUMEN

Un posible enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias se podría basar en la inhibición del fenotipo de la microglía M1 mientras se estimula el fenotipo M2. Nuestra hipótesis es que el tipo de ácidos graso (FA) de la dieta en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) postprandiales humanas podría modular la plasticidad de la microglía. Para ello, aislamos las TRL en el pico hipertriglicéridémico postprandial de muestras de sangre de voluntarios sanos tras la ingesta de una comida rica en FAs saturados (SFAs), FAs monoinsaturados (MUFAs) o MUFAs más FAs poliinsaturados de cadena larga omega-3 (PUFAs). Observamos que las TRL-MUFAs potencian la polarización hacia microglía M2, mientras que las TRL-SFAs hacen que la microglía sea polarizada a un fenotipo M1. Además, en comparación con los SFAs de la dieta, los MUFAs produjeron un perfil proinflamatorio menor en el cerebro de los ratones alimentados con una dieta rica en grasa. Nuestro estudio subraya el papel de las TRL postprandiales como una entidad metabólica en la regulación de la plasticidad de la microglía y ofrece una comprensión de los mecanismos por los cuales los FAs de la dieta juegan un papel en la respuesta inmune innata en el sistema nervioso central. Estos interesantes hallazgos abren nuevas oportunidades para desarrollar estrategias nutracéuticas con el aceite de oliva como la fuente principal de MUFAs, especialmente el ácido oleico, para prevenir el desarrollo y la progresión de enfermedades relacionadas con la neuroinflamación.

ABSTRACT

Inhibiting M1 microglia phenotype while stimulating the M2 microglia has been suggested as a potential therapeutic approach for the treatment of neuroinflammatory diseases. Our hypothesis is that the type of dietary fatty acids (FAs) into human postprandial triglyceride-rich lipoproteins (TRLs) could modulate the plasticity of microglia. We isolated TRLs at the postprandial hypertriglyceridemic peak from blood samples of healthy volunteers after the ingestion of a meal rich in saturated FAs (SFAs), monounsaturated FAs (MUFAs) or MUFAs plus omega-3 long-chain polyunsaturated FAs (PUFAs). We observed that postprandial TRL-MUFAs enhance M2 microglia polarization, whereas postprandial TRL-SFAs made polarized microglia prone to an M1 phenotype. In addition, in contrast to dietary SFAs, dietary MUFAs primed for a reduced pro-inflammatory profile in the brain of mice fed with the different FA-enriched diets. Our study underlines a role of postprandial TRLs as a metabolic entity in regulating the plasticity of microglia and brings an understanding of the mechanisms by which dietary FAs are environmental factors fostering the innate immune responsiveness. These exciting findings open opportunities for developing nutraceutical strategies with olive oil as the principal source of MUFAs, notably oleic acid, to prevent development and progression of neuroinflammation-related diseases.

INTRODUCTION

Postprandial state is a normal and transient physiological phenomenon that occurs in response to the ingestion of a fatty meal [1]. Dietary fatty acids (FAs) are absorbed by the enterocytes via passive diffusion and transported in the form of postprandial triglyceride (TG)-rich lipoproteins (TRLs) [2]. Postprandial TRLs consist of lipoproteins derived from the intestine containing apolipoprotein B48 (ApoB48) (chylomicron) and VLDL derived from the liver containing ApoB100, and their remnants [3]. In blood, postprandial chylomicrons and ApoB48 receptor (ApoB48R) may be also indirectly involved in the development of atherosclerosis by activating leukocytes in the circulation [4]. The postprandial TRL/ApoB48R axis regulates lipid accumulation in myeloid lineage [5-8]. Circulating human monocytes accumulate postprandial lipids while increasing ApoB48R and CD11b transcriptional activities [9] suggesting that immune cell activation may be the result of binding and uptake of TRLs via the ApoB48R.

Microglia are the major cellular elements with immune function inside the central nervous system (CNS). Microglia-mediated neuroinflammation is considered to play an important role in the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases [10]. Similar to periphery macrophages, it is well known that microglia can alter their phenotypes and functions in response to micro-environmental disturbances. Depending on the predominance of secreted factors, microglia have been characterized to express the classical activation phenotype (M1, pro-inflammatory) or the alternative activation phenotype (M2, anti-inflammatory) [11]. The M1 state causes the release of proinflammatory cytokines with increased expression of CD80 and iNOS. The M2 state with expression of the anti-inflammatory cytokines as well as CD200R and

arginase-1 (Arg1) [12,13].

Alterations in microglia M1/M2 polarization have been associated with neurodegenerative diseases [14,15]. Neuropathologies triggered by metabolic syndrome, which includes diabetes and obesity, often result from increased permeability of the blood-brain-barrier (BBB), rising the entry of toxins, immune cells, pathogens and molecules, as lipoproteins, into the brain [16]. The evidence of microglia polarization in neuroinflammation-related diseases models led to the idea that, compared with merely suppressing microglia activation, the inhibition of M1 microglia polarization along with promoting M2 microglia polarization may be a viable treatment strategy for the treatment of inflammation-related diseases [17,18]. However, the effect of postprandial lipoproteins on lipid accumulation in microglia is scarcely known. In this study, we investigated the potential role of TRLs in regulating microglia polarization and sought to clarify whether dietary FAs are involved in this process.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and design

This study was conducted according to Good Clinical Practice Guidelines and in line with the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. Informed consent for the study was obtained. All animal protocols received appropriate institutional approval (Animal Care and Use Committee of the University of Seville) and were performed according to the official rules formulated in the Spanish law on the care and use of experimental animals (UE Directive of 2010: 2010/63/UE; RD 53/2013).

Human postprandial study and TRL isolation

Six volunteers aged 25 to 35 years, non-smokers, with no medical history of disease known, abnormality of hematological or biochemical parameters were recruited in Clinical Biochemistry Unit at the University Hospital Virgen Macarena (UHVM, Seville). After an overnight fasting period of 12 h, all of them were given, over three different occasions, an oral fat emulsion containing cow's milk cream (meal rich in SFAs), refined olive oil (meal rich in MUFAs) or refined olive plus a dose of omega-3 long-chain PUFAs, which consisted of 920 mg of eicosapentaenoic acid (EPA) and 760 mg of docosahexaenoic acid (DHA, meal rich in PUFAs). They also consumed the same test meal without fat as a control meal. Oral fat emulsions were prepared according to the method described by our Patent WO/2014/191597. They consisted of water, sucrose, fat (50 g/m² body surface area), emulsifier, and flavoring. At fasting (0 min) and at the postprandial hypertriglyceridemic peak, i.e. 2-3 h following the ingestion of the oral fat emulsion, venous blood was collected into K3EDTA-containing Vacutainer tubes (Becton Dickinson, NJ, USA). TRLs were isolated, pooled, and dialyzed against cold PBS [19]. TRLs were then immediately stored at -80 °C. Lipid oxidizability of postprandial TRL was checked (TBARS level) during isolation and storage, but oxidation of lipids was not detected. TRLs were tested for lipopolysaccharide (LPS) contamination using the Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantification kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain). LPS contamination was always <0.2 EU/mL. TG concentration in postprandial TRLs was determined by colorimetric assay kit TG GPO-POD (Bioscience Medical, Madrid, Spain).

Fat and TRL fatty acid composition

The FA composition of cow's milk cream, refined olive oil, and refined olive oil plus omega-3 long-chain PUFAs was determined, in triplicate from the same lot, by the method described in EEC/796/2002 [20] using a gas chromatography system (HP-5890, Hewlett-Packard) equipped with flame ionization detector and a SP-2380 capillary column (Supelco, 30 m × 0.32 mm) packed with cyanopropylsiloxane (0.25 μm) (**Table 1**). The initial column temperature was 165 °C, which was held for 10 min, then programmed from 165 °C to 200 °C at 1.5 °C/min. Injector and detector temperature were 250 °C, with the carrier gas H₂.

For FA composition in postprandial TRLs (named TRL-SFAs from cow's milk cream, TRL-MUFAs from refined olive oil, and TRL-PUFAs from refined olive oil plus omega-3 long-chain PUFAs), aliquots of 100 μL were lyophilized [21]. A solution composed of methanol: toluene: dimethoxypropane: sulphuric acid (16.5:5:1:1) and heptane was added on the lyophilized residue. After shaking and incubating the mixture at 80 °C for 1 h, the upper phase was transferred to another vial and dried with a stream of N₂ gas. The resulting extract was dissolved in heptane and the FA methyl esters were analyzed into a gas chromatography system as described above (**Table 2**).

BV2 microglial cell culture

The immortalised murine microglial cell line BV2 was purchased from the Instituto de la Grasa (Seville, Spain). Cells were routinely cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S).

Table 1. Fatty acid composition of dietary fats

Fatty acid	Cow's milk cream	Olive oil	Olive oil + omega-3 LCPUFAs
	g/100 g of fatty acid		
4:0, butyric	0.83 ± 0.16	-	-
6:0, caproic	0.25 ± 0.02	-	-
8:0, caprylic	0.61 ± 0.07	-	-
10:0, capric	2.47 ± 0.13	-	-
12:0, lauric	3.09 ± 0.42	-	-
14:0, myristic	10.9 ± 0.91	-	-
16:0, palmitic	35.50 ± 0.82	20.44 ± 0.89	20.48 ± 0.64
16:1(ω-7), palmitoleic	3.60 ± 0.32	0.97 ± 0.17	0.82 ± 0.12
18:0, stearic	11.54 ± 0.75	5.70 ± 0.11	4.49 ± 0.36
18:1(ω-9), oleic	25.33 ± 0.71	61.90 ± 1.23	61.51 ± 0.97
18:2(ω-6), linoleic	4.27 ± 0.82	7.97 ± 0.65	8.04 ± 0.53
18:3(ω-3), α-linolenic	0.39 ± 0.05	1.04 ± 0.13	0.94 ± 0.03
20:5(ω-3), eicosapentaenoic	-	-	0.92 ± 0.09
22:6(ω-3), docosahexaenoic	-	-	0.72 ± 0.10
Others	0.96 ± 0.42	2.05 ± 1.08	2.01 ± 0.88

Data are expressed as mean ± SD (*n* = 3)

Table 2. Fatty acid composition of postprandial TRLs.

Fatty acid	TRL-SFAs	TRL-MUFAs	TRL-PUFAs
	g/100 g of fatty acid		
4:0, butyric	0.26 ± 0.03	-	-
6:0, caproic	0.19 ± 0.02	-	-
8:0, caprylic	0.38 ± 0.14	-	-
10:0, capric	1.62 ± 0.52	-	-
12:0, lauric	3.52 ± 1.01	-	-
14:0, myristic	8.76 ± 1.63	-	-
16:0, palmitic	38.10 ± 1.87	11.2 ± 1.52	11.98 ± 1.21
16:1(n-7), palmitoleic	1.03 ± 0.10	0.79 ± 0.21	1.42 ± 0.61
18:0, stearic	18.8 ± 1.32	5.71 ± 0.73	5.54 ± 0.78
18:1(n-9), oleic	20.7 ± 1.76	67.2 ± 2.97	61.3 ± 3,87
18:2(n-6), linoleic	4.04 ± 0.98	8.95 ± 1.32	9,06 ± 1.03
18:3(n-3), α -linolenic	1.96 ± 0.57	3.29 ± 0.74	3.03 ± 0.98
20:4(n-4), arachidonic	0.49 ± 0.09	1.18 ± 0.37	1.79 ± 0.42
20:5(n-3), eicosapentaenoic	-	0.78 ± 0.19	2.82 ± 0.29
22:6(n-3), docosahexaenoic	-	0.70 ± 0.28	2.63 ± 0.14
Others	0.51 ± 0.13	0.34 ± 0.07	0.56 ± 0.07

Data are expressed as mean ± SD, $n = 18$.

Culture conditions were 5 % CO₂ at 37 °C. Subcultures were made every 3 days using 0.25% trypsin-EDTA. To maintain cells in an undifferentiated state, they were passaged before obtaining confluence. Only BV2 microglial cells at culture passages 5 to 10 were used for the experiments. Before the treatment, BV2 microglial cells were seed at a density of 5x10⁵ cells/mL in 12-well plates for 24 h in high glucose DMEM supplemented with 1 % heat-inactivated FBS and 1 % P/S.

Cell viability assay (MTT)

BV2 microglial cells were seeded at a density of 10⁴ cells/well in 96 well plates and incubated with TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-MUFAs+omega-3 PUFAs at different concentrations (50, 100, and 200 µg TG/mL) during 24 h (postprandial TRLs up to 200 µg TGs/mL added to the culture medium for 24 h did not induce cytotoxicity, data not shown).

M1/M2 microglia polarization

For M1 or M2 polarization, BV2 microglia cells were exposed to LPS (100 ng/mL) and IFN γ (20 ng/mL) or to IL-4 (20 ng/mL), respectively, for additional 24 h. To assess the effect of dietary fatty acids on microglia polarization, BV2 microglial cells were exposed to TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-MUFAs+omega-3 PUFAs at 100 µg TG/mL during 24 h.

RNA isolation and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted by using Trisure Reagent (Bioline), as instructed by the manufacturer. A₂₆₀/A₂₈₀ ratio in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, Spain) was

used to determinate RNA quality. Momentarily, RNA (1 µg) was subjected to reverse transcription (iScript, Bio-Rad, Madrid, Spain). An amount of 10 ng of the resulting cDNA was used as a template for real-time PCR amplifications. The mRNA levels for specific genes were determined in a CFX96 system (Bio-Rad). For each PCR reaction, cDNA template was added to Brilliant SYBR green QPCR Supermix (Bio-Rad) containing the primer pairs for either gene or for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) as housekeeping genes (**Table 3**). All amplification reactions were performed in triplicate and average threshold cycle (Ct) numbers of the triplicates were used to calculate the relative mRNA expression of candidate genes. The magnitude of change of mRNA expression for candidate genes was calculated by using the standard $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method. All data were normalized to endogenous reference (GAPDH and HPRT) gene content and expressed as percentage of controls.

Triglyceride and cytokine quantification

Cellular lipids were extracted using hexane/isopropanol (3:2, v/v). The supernatant was obtained after centrifugation at $500 \times g$ for 5 min. The TG content was measured using the assay kits GPO/PAP (Axiom Diagnostics, Burstadt and Worms, Germany). To determine the protein content, cells were sonicated in RIPA buffer, and the lysate was measured using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), following the indications of the manufacturer (Diaclone, Besancon, France). The cytokine concentrations were expressed in pg per mL, as calculated from the calibration curves from serial dilution of human recombinant standards in each assay.

Table 3. Sequences of RT-qPCR primers for gene expression analysis.

Target	No. GenBank	Direction	Sequence (5'→3')
GAPDH	NM_001289726	Forward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
		Reverse	ACACATTGGGGGTAGGAACA
HPRT	NM_013556.2	Forward	TATGTCCCCGTTGACTGAT
		Reverse	TGCTCGAGATGTCATGAAGG
APOB48R	AF_141336.1	Forward	GAAGCAGGCAAGGAACAGAC
		Reverse	CAAGGCACTACAGCCTCCTC
CD80	NM_009855.2	Forward	GGGAAAGTGTACGCCCTGTA
		Reverse	GCTACTTCTGTGCCACCAT
iNOS	NM_010927	Forward	CACCTTGGAGTTACCCAGT
		Reverse	ACCACTCGTACTGGGATGC
CD200R	NM_021325.3	Forward	GTTGCCCTCCTATCGCATT
		Reverse	TGGAAATCCCATCAGGTGT
ARG1	NM_007482	Forward	GTGAAGAACCACGGTCTGT
		Reverse	CTGGTTGTCAGGGGAGTGT
TNF- α	NM_001278601	Forward	AGCCCCAGTCTGTATCCTT
		Reverse	CTCCCTTGCAGAACTCAGG
IL-1 β	NM_008361	Forward	GCCATCCTCTGTGACTCAT
		Reverse	AGGCCACAGGTATTTTGGC
IL-6	NM_031168	Forward	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA
		Reverse	TCCACGATTCCAGAGAAC

Animals and diets

C57BL/6J (The Jackson Laboratory) were maintained in light/dark- (12 h light/12 h dark), temperature- (22 ± 1 °C) and humidity- (50%–60% relative humidity) controlled room, fed with standard chow diet (low fat diet (LFD), SAFE A04-10 Panlab) ad libitum and had free access to drinking water at the animal facilities of the School of Medicine (University of Seville). Male animals at the age of 10-12 weeks were divided in 4 experimental groups (n = 10/group). Mice were fed LFD (3% energy as fat from soybean oil, A04-10) or high-fat diets (HFDs) based on the above A04-10 diet with additional 21% energy as fat from milk cream (HFD-SFAs), olive oil

(HFD-MUFAs) or olive oil (20% energy) plus EPA + DHA (1% energy, HFD-PUFAs) for 8 weeks. Diets and drinking water were refreshed every week. The FA composition of the diets was determined via lipid extraction, saponification and capillary gas chromatography (**Table 4**). All diets, which had low cholesterol (0.01%), were prepared by Panlab and presented as pellets to the animals. At the end of the experiments, animals were sacrificed at the beginning of the light cycle and after 10 h of food deprivation, brain tissue was then removed for further analysis.

Immunostaining of microglial cells by FACS

Brain tissue samples were collected after 8 weeks of diet. Brains were placed in PBS and mechanically for 30 min at 37 °C. The cell suspension was filtered through a 70 µm filter. Microglia membrane expression of CD45 (PE-Cy7 anti-mouse CD45, BD), CD11b (PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD11b, BD), F4/80 (APC anti-mouse APC, Miltenyi), CD80 (FITC anti-mouse FITC, Miltenyi), and CD200R (PE anti-mouse CD200R, Miltenyi) on brain tissue was assessed by flow cytometry. The brain cell suspension was incubated with antibodies at room temperature, in the dark, for 15 minutes. Fluorescence intensity was measured by FACSCanto II (BD) and calibrating using FACSCanto II analyser software (BD). Mean fluorescence intensity (MFI) of 10^4 counted cells was measured in each sample. Leukocytes were gated as side scatter (SSC)-CD45⁺ cells. Total microglial cells were gated as CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ cells. In microglial cells, M1 and M2 phenotypes were gated as CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD80⁺CD200R⁻ and CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD80⁻CD200R⁺ cells, respectively. Expression levels were presented as MFI corrected for non-specific binding of isotype control antibodies.

Table 4. Composition of the animal diets.

	LFD	HFD-SFAs	HFD-MUFAs	HFD-PUFAs
Soybean oil (g/kg)	30	30	30	30
Milk cream (g/kg)	—	210	—	—
Olive oil (g/kg)	—	—	210	200
EPA + DHA (g/kg)	—	—	—	10
Casein (g/kg)	150	120	120	120
Corn starch (g/kg)	450	350	350	350
Sugars (g/kg)	45	35	35	35
Cellulose (g/kg)	35	30	30	30
Mineral mix (g/kg)	30	30	30	30
Vitamin mix (g/kg)	8	7	7	7
% Kcal fats	7	47	47	47
% Kcal carbohydrates	74	42	42	42
% Kcal proteins	19	11	11	11
Total Kcal/g	3.2	4.4	4.4	4.4
% capric (C10:0)	—	2.5	—	—
% lauric (C12:0)	—	3.1	—	—
% myristic(C14:0)	—	10.9	—	—
% palmitic(C16:0)	21.3	33.1	20.5	20.5
% palmitoleic (C16:1)	0.5	3.2	0.9	0.8
% stearic (C18:0)	2.2	10.2	5.3	4.2
% oleic (C18:1)	17.4	23.8	56.8	56.4
% linoleic (C18:2)	54.2	9.6	13.1	13.1
% α -linolenic (C18:3)	4.3	0.8	1.4	1.3
% EPA (C20:5)	—	—	—	0.9
% DHA (C22:6)	—	—	—	0.7
% SFAs	23.5	59.8	25.8	24.7
% MUFAs	17.9	27.0	57.7	57.2
% PUFAs	58.5	10.4	14.5	16.0

Statistical analysis

All values are expressed as arithmetic means \pm standard deviations (SD). Data were evaluated with Graph Pad Prism Version 5.01 software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), following Tukey multiple comparisons test as post hoc test. Pearson r value was used to analyse the statistical significance of correlation test. *P* values less than 0,05 were considered statistically significant.

RESULTS

TRLs induce lipid accumulation and ApoB48R transcriptional activity in BV2 microglial cells

In healthy subjects, the supply of high-fat meals containing dietary fats enriched in SFAs, MUFAs, or PUFAs induces an increase in plasma TG, in the form of TRLs, reaching maximum values 2 or 3 h after feeding (postprandial hypertriglyceridemic peak). *In vitro* experiments showed that TRL-SFAs induced higher increase in ApoB48R mRNA expression (**Fig. 1A**) and TG accumulation (**Fig. 1B**), than fasting (Control, untreated cells), TRL-MUFAs, and TRL-PUFAs in BV2 microglial cells, suggesting that dietary FAs present in TRLs intervene in the transcriptional activity of ApoB48R.

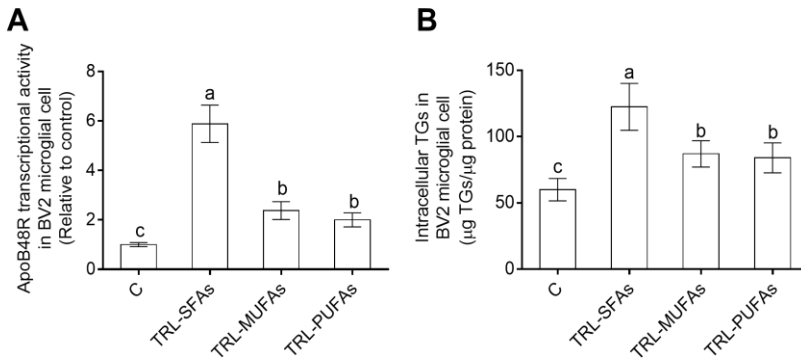


Figure 1. (A) *In vitro* apoB48R mRNA expression and (B) intracellular TGs accumulation induced in BV2 microglial cells after stimulation with TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs at 100 μg of TGs/mL for 24 h. Control means non-treated cells. Values are presented as means \pm SD (n = 6) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

In addition, intracellular TG correlated with the expression of ApoB48R mRNA in BV2 microglial cells (R^2 0.998, $p = 0.0111$, **Fig. 2**).

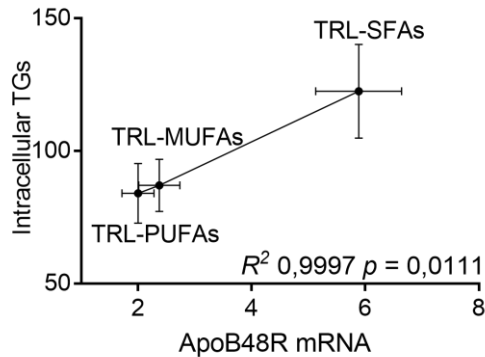


Figure 2. Correlation between apoB48R mRNA and intracellular TGs in BV2 microglial cells after stimulation with TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs at 100 μ g of TGs/mL for 24h. Values are presented as means \pm SD ($n = 6$) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Postprandial TRL-SFAs favors a M1 whereas TRL-MUFAs a M2 activation status in BV2 microglial cells

In gaining deeper insight into the role of postprandial TRLs on microglia plasticity, we observed that postprandial TRL-SFAs particularly promoted the transcriptional activity of M1 microglia gene markers (CD80 and iNOS) in BV2 microglial cells (**Fig. 3A** and **3B**, respectively). In contrast, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs not only reduced the mRNA levels of CD80 and iNOS genes, compared to TRL-SFAs, but also promoted the transcriptional activity of M2 microglia gene markers (CD200R and Arg-1) in BV2 microglial cells (**Fig. 3C** and **3D**, respectively).

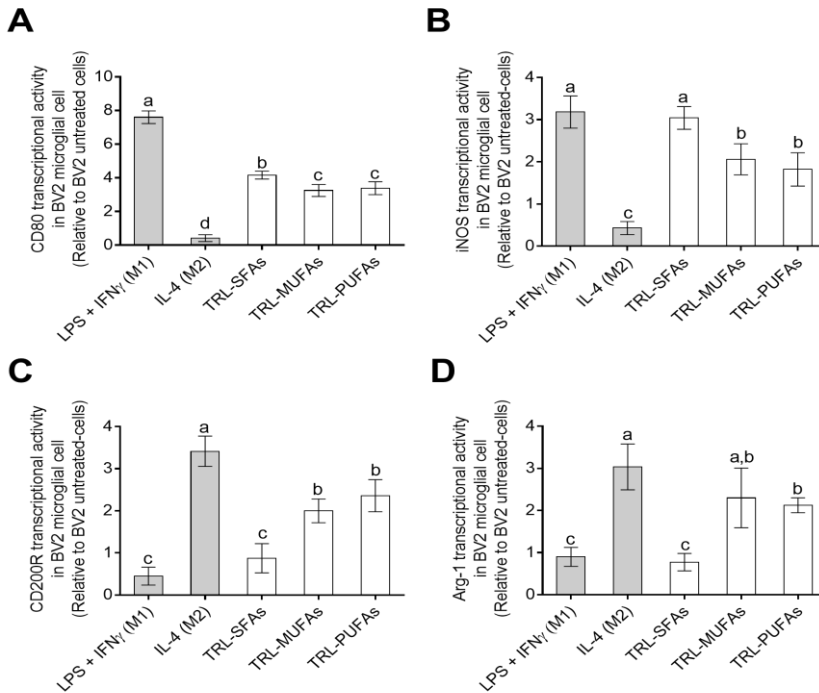


Figure 3. In vitro expression of M1 and M2 microglia gene markers in BV2 microglial cells after stimulation with TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs at 100 μg /mL for 24 h. M1 gene markers: (A) CD80 and (B) iNOS, (C) CD200R and (D) Arg-1. BV2 microglial cells were incubated with LPS plus IFN γ (M1 control) or IL-4 (M2 control). Values are presented as means \pm SD (n = 6) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

Postprandial TRLs modulate cytokine gene expression and secretion in BV2 microglial cells

To further explore the possible role of postprandial TRLs on microglia activation status, gene expression and secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were analyzed (Fig. 4). All the postprandial TRLs promoted the gene expression (Fig. 4A, 4C, and 4E) and release (Fig. 4B, 4D, and 5F) of these cytokines into the culture media. However, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs had significantly lower pro-inflammatory effects than TRL-SFAs in gene expression and secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in BV2 microglial cells.

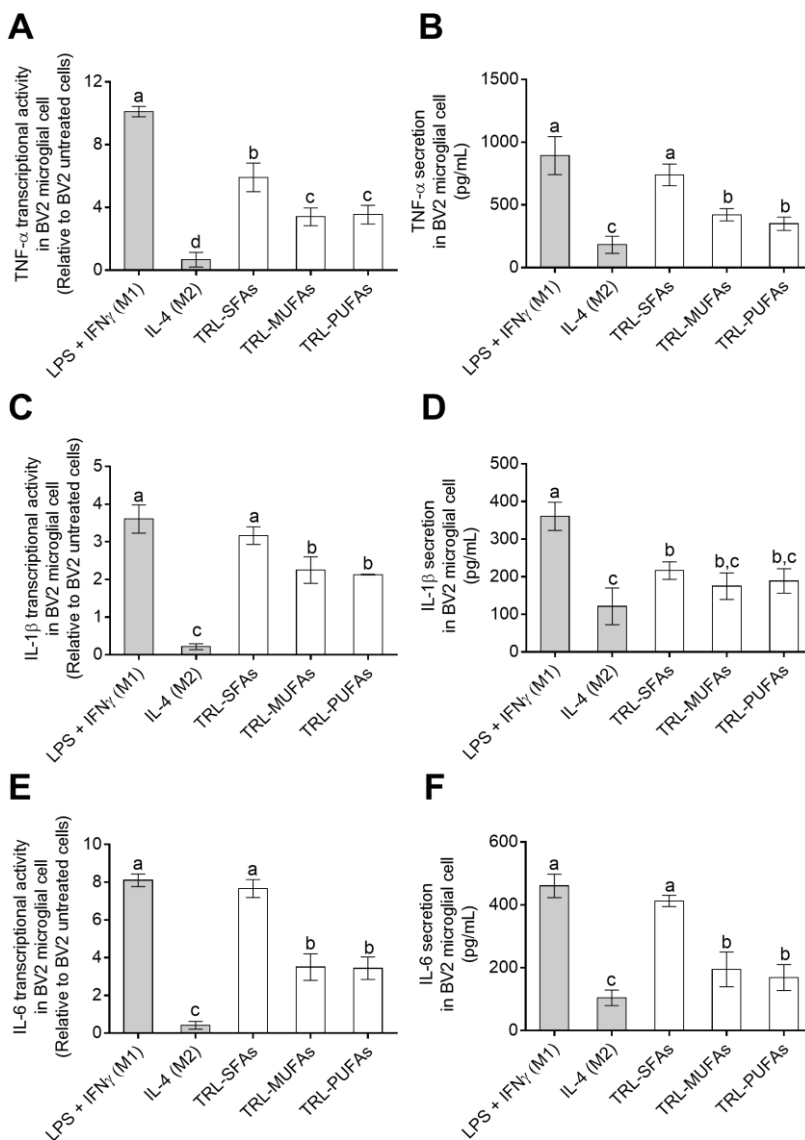


Figure 4. In vitro expression and secretion of proinflammatory cytokines in BV2 microglial cells after stimulation with TRL-SFAs, TRL-MUFAs and TRL-PUFAs at 100 μ g of TGs/mL for 24 h. (A) TNF- α mRNA expression and (B) cytokine secretion, (C) IL-1 β mRNA expression and (D) cytokine secretion, and (E) IL-6 mRNA expression and (F) cytokine secretion. BV2 microglial cells were incubated with LPS plus IFN γ (M1 control) or IL-4 (M2 control). Values are presented as means \pm SD (n = 6) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

Hypertriglyceridemic diets induces lipid accumulation and ApoB48R transcriptional activity in brain tissue of mice fed HFDs

In mice, the supply of HFDs enriched in SFAs, MUFAs, or PUFAs induced an increase in body weight gain (**Fig. 5**) and plasma TG reaching dyslipidemic values 8 weeks after feeding. Results shown in **Figure 6A** correspond to serum TG values obtained from each experimental animal. TGs decreased after the HFD-MUFAs and HFD-PUFAs but did not reach statistical significance compared with the HFD-SFAs. Brain tissue isolated after 8 weeks of HFDs showed increased TG accumulation (**Fig. 6B**) and ApoB48R mRNA expression (**Fig. 6C**), compared to brain tissue isolated after 8 weeks of LFD. Brain tissue isolated after the HFD-MUFAs and HFD-PUFAs showed lower TG accumulation and ApoB48R transcriptional activity compared with the ones obtained after the HFD-SFAs. In addition, brain TG accumulation correlated with the expression of brain apoB48R mRNA (R^2 0.999, $p = 0.0004$, **Fig. 6D**).

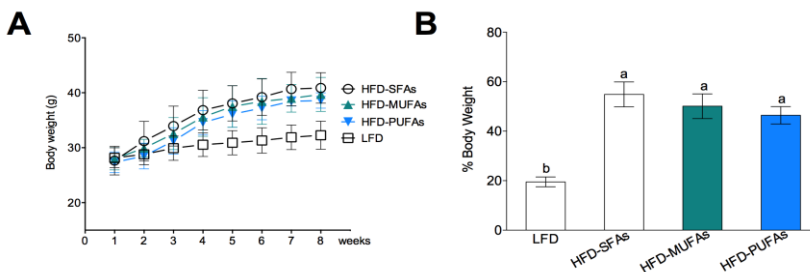


Figure 5. (A) Body weight monitored over time on each diet and (B) body weight gain of C57BL/6J mice fed on LFD, HFD-SFAs, HFD-MUFAs, and HFD-PUFAs for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

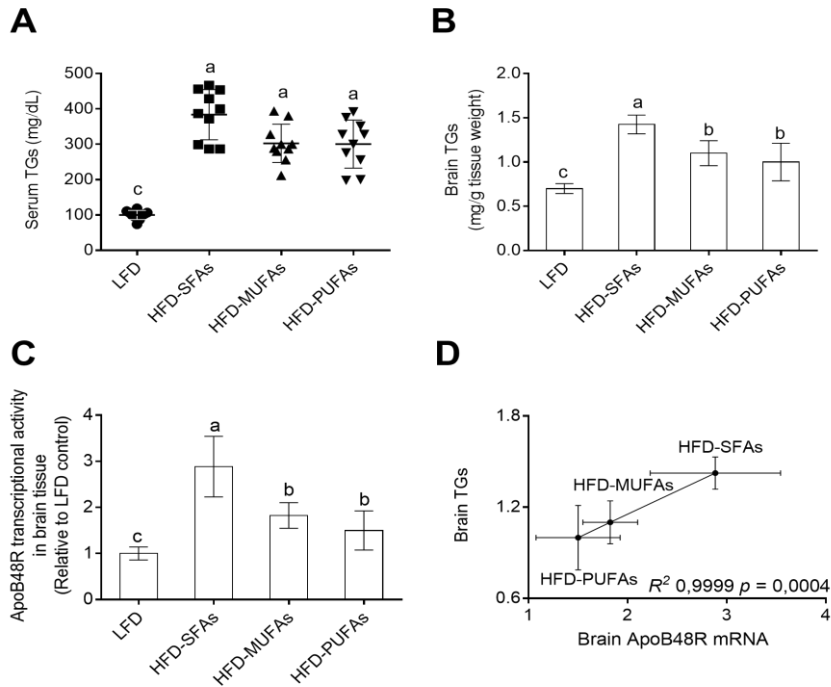


Figure 6. (A) Serum TG levels (mg/dL) and (B) TG content (mg/g tissue weight) and (C) ApoB48R mRNA expression in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on LFD, HFD-SFAs, HFD-MUFAs, and HFD-PUFAs for 8 weeks. (D) Correlation between apoB48R mRNA and TGs content in brain tissue of these mice. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Hypertriglyceridemic diets modulate M1/M2 microglia subsets in brain tissue of mice fed HFDs

As shown in **Figure 7**, total microglial cells (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺) were analyzed in leukocytes (CD45⁺) from brain tissue of mice fed with LFD and HFDs (**Fig. 7A**). Total microglial cell population was significantly increased in brain tissue of mice fed with HFD-SFAs compared to those fed with LFD or those fed with HFD-

MUFAs and HFD-PUFAs (**Fig. 7B**). In addition, HFDs showed an increase in CD80 (M1 phenotype) protein levels and a decrease in CD200R (M2 phenotype) protein levels compared to the LFD, HFD-MUFAs, and HFD-PUFAs (**Fig. 7C** and **Fig. 7D**, respectively). Fully consistent, brain tissue of mice on HFD-SFAs had higher mRNA levels of the M1 marker CD80 and that of mice on HFD-MUFAs and HFD-PUFAs had higher mRNA levels of the M2 markers CD200R (**Fig. 7E**).

SFA-enriched hypertriglyceridemic diet promotes neuroinflammation in mice fed HFDs

To explore immune-related events that follow microglia activation, we analyzed the local inflammation in brain tissue of mice fed with LFD and HFDs (**Fig. 8**). Brain tissue gene expression levels of pro-inflammatory TNF- α (**Fig. 8A**), IL-1 β (**Fig. 8C**), and IL-6 (**Fig. 8E**), and the secretion of these cytokines into brain tissue homogenates (**Fig. 8B**, **8D**, and **8F**, respectively) were higher with HFDs but these levels were significantly less pronounced with HFD-MUFAs and HFD-PUFAs than with HFD-SFAs.

Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote M1/M2 microglia polarization in a fatty acid-dependent manner

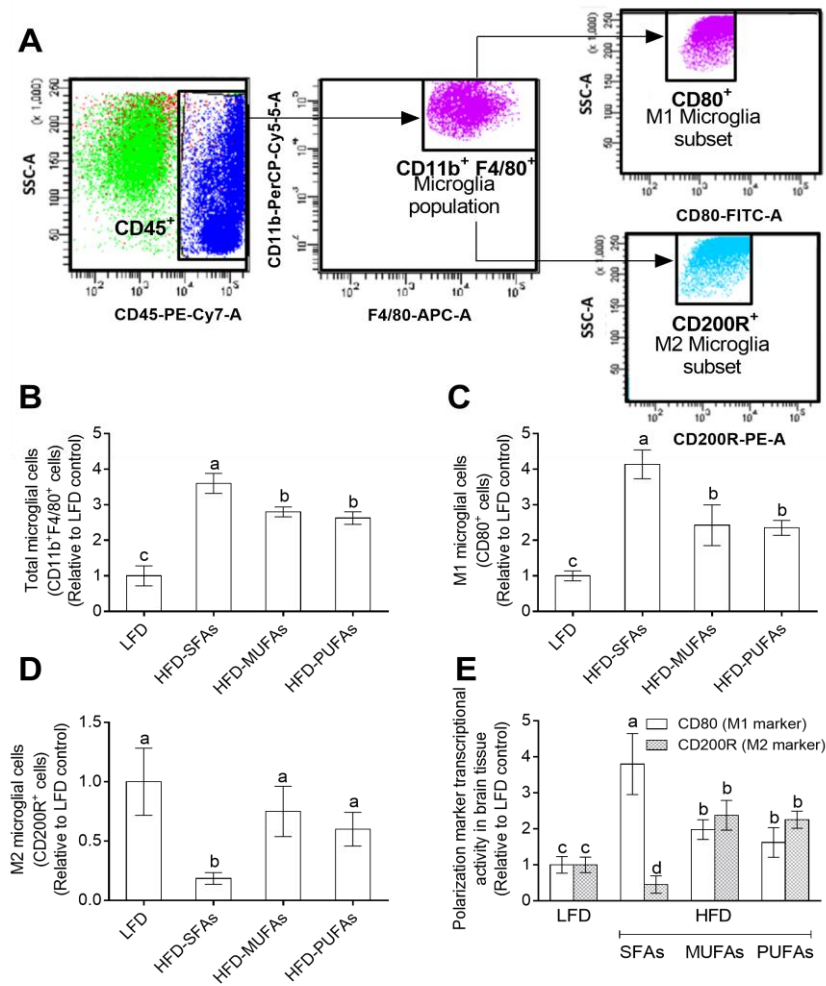


Figure 7. (A) Representative dot plots of gating strategy for identification of microglia population showing successive exclusion on bivariate plots (CD45 vs SSC). Remaining population was further selected for CD11b and F4/80 bipositive cells (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ cells). Representative SSC vs CD80 and SSC vs CD200R dot plots of microglia subsets [CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD80⁺CD200R⁻ M1 microglia (pink) and CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD80⁻CD200R⁺ M2 microglia (blue)]. (B) FACS analysis of total microglia subsets by means of (C) CD80 (M1 microglia subset) and (D) CD200R (M2 microglia subset) surface marker expression (relative values) in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on LFD, HFD-SFAs, HFD-MUFAs, and HFD-PUFAs for 8 weeks. (E) CD80 and CD200E mRNA expression in the brain tissue of these mice. Values are presented as means \pm SD (n = 10 mice/group) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

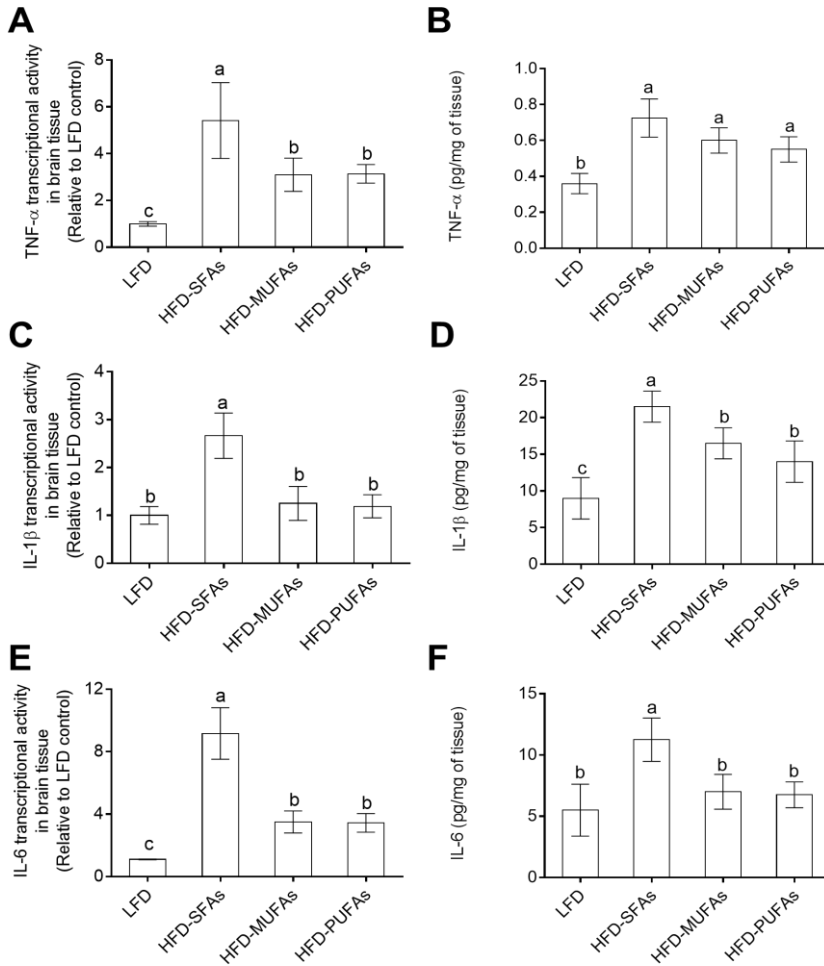


Figure 8. (A) TNF- α mRNA expression and (B) cytokine concentration, (C) IL-1 β mRNA expression and (D) cytokine concentration, and (E) IL-6 mRNA expression and (F) cytokine concentration in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on LFD, HFD-SFAs, HFD-MUFAs, and HFD-PUFAs for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD (n = 10 mice/group) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

DISCUSSION

There is growing preclinical and clinical evidence that hypertriglyceridemia is not only a serious risk factor in the development of cardiovascular diseases, but it is linked to neurodegeneration and neuroinflammation [22]. Postprandial TRLs induce an increase in permeability for lipoproteins and other molecules and structural alterations at the BBB. Lipolysis products generated from TRLs damage endothelial barrier function: perturb the expression of junctional proteins, induce apoptotic cell death *in vitro* in human aortic endothelial cells [23] and transiently elevate BBB permeability *in vivo* in mice [24]. Indeed, in our study we have shown that TRL treatment induced microglia activation through ApoB48R upregulation in a FA-dependent manner.

Postprandial TRLs mainly consist of ApoB48-containing chylomicrons which are synthesized immediately after the ingestion of a high-fat meal and its FA composition strongly resembles the FA composition of the fat ingested [25]. There is increasing evidence to indicate that the biological function of TRLs is dependent to a large extent on its FA composition. Thus, MUFAs and PUFAs in TRLs are largely beneficial postprandially, while SFAs are potentially detrimental to health [26,27]. We extended this knowledge and demonstrated that the TRLs, isolated from postprandial hypertriglyceridemic state induced in healthy subjects after the acute ingestion of high-TG meals, regulate the ApoB48R transcriptional activity and intracellular TG accumulation in BV2 microglial cells. In our study, dietary MUFA oleic acid and omega-3 PUFAs attenuated ApoB48R gene expression while causing a decrease in intracellular TG accumulation compared to SFA palmitic acid. In line with earlier publications in human monocytes [5,9] and neutrophils [3], *in vitro* experiments showed that the type of dietary

FA in postprandial TRL regulated these effects.

FAs are bioactive signaling molecules that also play integral structural and bioenergetic roles in cells. Exogenous FAs cross the BBB to interact with cellular receptor on microglia, and therefore can directly modulate neuroinflammation by acting as extrinsic signaling factor [28]. In the present paper we have determined that acute activation of inflammation in BV2 microglial cells by treatment with TRLs result in an increase in the relative proinflammatory M1 microglia subset. In recent studies, transcriptome (480 genes) and proteome analyses after stimulation with LPS indicated a reaction pattern of BV2 with many similarities to that of primary microglia. Thus, BV2 cells appear to be a valid substitute for primary microglia in many experimental settings [29]. Microglial polarization depends on different microenvironment and signals that promote specific phenotypes. Classical M1-activated microglia secrete proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and, alternatively, M2-activated microglia is able to repair small damage, have an anti-inflammatory phenotype, contributing to trophic support of neurons, possess the ability to degrade toxic aggregates and increase the neuroprotective functions thanks to anti-inflammatory interleukin production [30]. Many researchers have found immunomodulatory compounds presents in food, for example lutein highly present in parsley, was able to reduce LPS-induced neuroinflammation in BV2 microglial cells, by significantly inhibiting iNOS [17], another example is fucosterol, a phytosterol contained in brown seaweed, that inhibits the production of nitric oxide and the expression of iNOS [31]. While effects of dietary FAs on inflammation and polarization in the periphery are well studied, fewer reports have investigated effects of FAs in the CNS on neuroinflammation and microglial cells that are the major immunological mediators of this process [32]. In our study, we find that dietary MUFAs and PUFAs can

change microglial activation status ratio regard to dietary SFAs. That means that M1 markers (CD80 and iNOS) and proinflammatory cytokine mRNA levels and secretion are decreased in BV2 microglial cells, meanwhile M2 markers (CD200R and Arg-1) are enlarged when they are exposed at TRL-MUFAs and TRLs-PUFAs. SFAs, like palmitate, play an important role in activating early inflammatory pathways. SFAs interact with toll-like receptor 4 (TLR4) and activate myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), which leads to activation of NF- κ B. This pathway is linked to inhibition of anorexic hormones insulin and leptin, partially through increased expression of NF- κ B-induced expression of suppressor of cytokine signaling [16]. To the best of our knowledge, however, this is the first time that the effect of postprandial TRLs with different FA composition on BV2 microglial cells has been reported.

Clinical and epidemiological evidence suggests that lifestyle factors, especially nutrition, may be crucial in controlling neuropathologies [33]. An excessive or prolonged neuroinflammatory response to acute dietary FAs, in an HFD, insults may have the unintended consequence of generating bystander neuronal cell death. Similarly, the presence of a chronic, low-grade neuroinflammatory condition, such as obesity and metabolic syndrome, may also cause eventual bystander cell death with cumulative and serious consequences over time [34]. Consumption of a diet rich in SFA, may chronically activate neuroinflammatory responses of microglia. For a deeper understanding of the influence that HFDs enriched in olive oil or saturated fat exert on neuroinflammation during obesity and metabolic syndrome in mice, we analyzed the number of microglial cells (CD11b and F4/80 positive cells) found increased in brain of mice on HFD-SFAs. As lower is the cellularity and thereby the activation of M1 microglia subset, the lower is the inflammatory state and the better is the brain health

status in mice on HFD-MUFAs and HFD-PUFAs. This is crucial to avoid the advance of neuroinflammation and neurodegeneration under sustained conditions of obesity and metabolic syndrome. Herein, we found that, in contrast to the HFD-SFAs, olive oil-based HFDs had a dramatic lower influence on microglial cells positive to CD80, which is a marker for M1 microglial activation. This also concurs with a decrease in the gene expression of CD80. Still, olive oil-based HFDs promoted the relative abundance of microglial cells positive to CD200R and with upregulated of gene expression, a marker that resemble M2 activation. By concordant polarization patterns, lower transcriptional activities and secretion of pro-inflammatory cytokines in brain of mice fed with olive oil-based HFDs were found. The effects of postprandial TRL and HFDs rich in MUFAs, either containing or not EPA and DHA, did not differ significantly. A recent study has shown that the neuroprotective effects of diets containing olive oil and DHA/EPA in a mouse model of cerebral ischemia [32]. Our study pointing to a prevention of neuroinflammation and thereby the safeguard of brain homeostasis when, the predominant dietary fat, during HFD-induced obesity and metabolic syndrome, is olive oil.

CONCLUSION

Postprandial hypertriglyceridemia promotes a microenvironment in the brain that disrupts the normal biology and function of microglial cells. The continuous presence of TRLs in the circulation may be considered a critical factor that could contribute to disease susceptibility in many neurological disorders. Importantly, our data emphasize the benefits of dietary fats rich in MUFA oleic acid (olive oil) and omega-3 PUFAs (fish oils) as nutritional strategies for reduction of TG accumulation, activation, and inflammation of microglia cells to prevent neuroinflammatory and neurodegenerative diseases.

Conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors thank Cell Biology Unit of Instituto de la Grasa for its assistance during the fulfilment of this work. SMP acknowledges financial support from “V Own Research Plan” (University of Seville).

REFERENCES

- [1] Montserrat-de la Paz S, Rodriguez D, Cardelo MP, *et al.* The effects of exogenous fatty acids and niacin on human monocyte-macrophage plasticity. *Mol Nutr Food Res.* **2017**, 61: 1600824.
- [2] Montserrat-de la Paz S, Bermudez B, Cardelo MP, *et al.* Olive oil and postprandial hyperlipidemia: implications for atherosclerosis and metabolic syndrome. *Food Funct.* **2016**, 7: 4734-44.
- [3] Ortega-Gomez A, Varela LM, Lopez S, *et al.* Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote lipid accumulation and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in human circulating and murine bone marrow neutrophils in a fatty acid-dependent manner. *Mol Nutr Food Res.* **2017**, 61: 1600879.
- [4] de Vries MA, Klop B, Alipour A, *et al.* In vivo evidence for chylomicrons as mediators of postprandial inflammation. *Atherosclerosis.* **2015**, 243: 540–5.
- [5] Varela LM, Ortega-Gomez A, Lopez S, *et al.* The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/ macrophage cells. *J Nutr Biochem.* **2013**, 24: 2031–9.
- [6] Montserrat-de la Paz S, Bermudez B, Lopez S, *et al.* Exogenous fatty acids and niacin on acute prostaglandin D2 production in human myeloid cells. *J Nutr Biochem.* **2017**, 39: 22-31.
- [7] Naranjo MC, Garcia I, Bermudez B, *et al.* Acute effects of dietary fatty acids on osteoclastogenesis via RANKL/RANK/OPG system. *Mol Nutr Food Res.* **2016**, 60: 2505-13.
- [8] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, *et al.* A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge. *J Nutr Biochem.* **2018**, 57: 45-55.
- [9] Varela LM, Ortega A, Bermudez B, *et al.* A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes. *Am J Clin Nutr.* **2011**, 93:918–25.
- [10] Yang X, Xu S, Qian Y, *et al.* Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 α in conditions of neuroinflammatory injury. *Brain Behav Immun.* **2017**, 64: 162-72.

- [11] Bottcher C, Schlickeiser S, Sneebaer MAM, *et al.* Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci.* **2019**, 22: 78-90.
- [12] Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 242.
- [13] Sousa C, Golebiewska A, Poovathingal SK, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO rep.* **2018**, 9: e46171.
- [14] Banks WA, Farr SA, Salameh TS, *et al.* Triglycerides cross the blood–brain barrier and induce central leptin and insulin receptor resistance. *Int J Obesity.* **2018**, 42: 391-7.
- [15] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* **2017**, 35: 441–68.
- [16] Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci.* **2018**, 12: 930.
- [17] Wu W, Li Y, Wu Y, *et al.* Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- κ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Mol Nutr Food Res.* **2015**, 59: 1663-73
- [18] Olajide OA, Kumar A, Velagapudi R, *et al.* Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS-activated rat primary microglia. *Mol Nutr Food Res.* **2014**, 58: 1843-51.
- [19] Montserrat-de la Paz S, Naranjo MC, Bermudez B, *et al.* Postprandial dietary fatty acids exert divergent inflammatory response in retinal-pigmented epithelium cells. *Food Funct.* **2016**, 7: 1345-53.
- [20] EEC. Comision regulation (EEC) no. 796/02 of 6 May 2002 amending regulation EEC2568/91 on the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methodology analysis. *Official Journal of the European Community.* **2002**, L1 28, 8-28.
- [21] Montserrat-de la Paz S, Lopez S, Bermudez B, *et al.* Effects of immediate-release niacin and dietary fatty acids on acute insulin and lipid status in individuals with metabolic syndrome. *J Sci Food Agric.* **2018**, 98: 2194-2200.

- [22] Hoyk Z, Toth ME, Lenart N, *et al.* Cerebrovascular pathology in hypertriglyceridemic APOB-100 transgenic mice. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 380.
- [23] Eiselein L, Wilson DW, Lame MW, *et al.* Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007**, 292: H2745-53.
- [24] Lee LL, Aung HH, Wilson WD, *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins lipolysis products increase blood-brain barrier transfer coefficient and induce astrocyte lipid droplets and cell stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2017**, 312: C500-16.
- [25] Naranjo MC, Bermudez B, Garcia I, *et al.* Dietary fatty acids on aortic root calcification in mice with metabolic syndrome. *Food Funct.* **2017**, 8: 1468-74.
- [26] Varela LM, Bermudez B, Ortega-Gomez A, *et al.* Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote invasion of human coronary artery smooth muscle cells in a fatty-acid manner through PI3k-Rac1-JNK signaling. *Mol Nutr Food Res.* **2014**, 58: 1349-64.
- [27] Bermudez B, Lopez S, Pacheco YM, *et al.* Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. *Cardiovasc Res.* **2008**, 79: 294-303.
- [28] Button EB, Mitchell AS, Domingos MM, *et al.* Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. *Lipids.* **2014**, 49: 305-16.
- [29] Henn A, Lund S, Hedtjarn M, *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* **2009**, 26: 83-94.
- [30] Papa S, Caron I, Rossi F, *et al.* Modulators of microglia: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* **2016**, 6: 427-33.
- [31] Jung HA, Jin SE, Ahn BR, *et al.* Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* **2013**, 59: 199-206.
- [32] Gonzalez-Gobernado R, Ayuso MI, Sansone L, *et al.* Neuroprotective Effects of Diets Containing Olive Oil and DHA/EPA in a Mouse Model of Cerebral Ischemia. *Nutrients.* **2019**, 11: 1109.

Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote M1/M2 microglia polarization in a fatty acid-dependent manner

[33] Pasinetti GM, Eberstein JA. Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. **2008**, 106: 1503-14.

[34] Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, *et al*. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. **2009**, 4: 47.

CAPÍTULO 03

Unsaponifiable and
phenolic fractions from
virgin olive oil prevent
neuroinflammation
skewing microglia
polarization toward M2
phenotype

Toscano R, Millan-Linares MC,
Naranjo MC, Lemus-conejo A, Claro C,
Montserrat-de la Paz S.

Journal of Functional Foods

2019, 62, 103543.



RESUMEN

Un posible enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias se podría basar en la inhibición del fenotipo de la microglía M1 mientras se estimula el fenotipo M2. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos neuroprotectores de compuestos menores encontrados en la fracción insaponificable (UF) y en la fracción fenólica (PF) del aceite de oliva virgen (VOO) en células microgliales BV2 y en el cerebro de ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasas (HFD) a través de RT-qPCR, ELISA y técnicas de citometría de flujo. Observamos que la UF y la PF potencian la polarización de la microglía hacia un fenotipo M2, mientras que la microglía estimulada con LPS es propensa al fenotipo M1. Además, en comparación con los SFAs de la dieta, el VOO produjo un perfil proinflamatorio menor en el cerebro de los ratones. Estos interesantes hallazgos revelan un papel potencialmente beneficioso de los compuestos menores de VOO en la regulación de la plasticidad de la microglía. Abriéndose nuevas oportunidades para desarrollar estrategias nutraceuticas con el aceite de oliva como fuente principal de grasa y otros compuestos bioactivos para prevenir el desarrollo y la progresión de enfermedades relacionadas con la neuroinflamación.

ABSTRACT

Inhibiting M1 microglia phenotype while stimulating M2 microglia phenotype has been suggested as potential therapeutic approach for the treatment of neuroinflammation-related diseases. Our aim was to evaluate the anti-neuroinflammatory effects of minor compounds found in unsaponifiable fraction (UF) and in phenolic fraction (PF) of virgin olive oil (VOO) in BV2 microglial cells and in brain of mice with high-fat diet (HFD)-induced obesity by RT-qPCR, ELISA and flow cytometry techniques. We observed that UF and PF enhance M2 microglia polarization, whereas LPS polarized microglia prone to M1 phenotype. In addition, in contrast to dietary SFAs, dietary VOO primed for a reduced pro-inflammatory profile in the brain of mice. These findings unveil a potential beneficial role for minor compounds of VOO in regulating the plasticity of microglia. These exciting findings open opportunities for developing nutraceutical strategies with olive oil as principal source of fat to prevent development and progression of neuroinflammation-related diseases.

INTRODUCTION

The consumption of virgin olive oil (VOO) appears to be a main determinant of the health benefits of Mediterranean diet [1]. Besides high levels of monounsaturated fatty acids (MUFAs), VOO contains a minor, but yet significant, amount of bioactive constituents, such as phenolic and unsaponifiable compounds [2]. Studies have demonstrated that the phenolic and unsaponifiable fractions (PF and UF, respectively) from VOO positively influences oxidative stress and inflammation by modulating the expression of several genes involved in these processes [3,4]. Neuroinflammation is considered to play an important role in the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases [5]. Microglia are the major cellular elements with immune function inside the central nervous system (CNS). Similar to periphery macrophages, it is well known that microglia can alter their phenotypes and functions in response to micro-environmental disturbances. Depending on the predominance of secreted factors, microglia have been characterized to express the classical activation phenotype (M1, pro-inflammatory) or the alternative activation phenotype (M2, anti-inflammatory) [6]. The M1 state causes the release of proinflammatory cytokines with increased expression of CD80 and iNOS. The M2 state with expression of the anti-inflammatory cytokines as well as CD200R and arginase-1 (Arg1) [7-10]

The evidence of microglia polarization in neuroinflammation-related diseases models led to the idea that, compared with merely suppressing microglia activation, the inhibition of M1 microglia polarization along with promoting M2 microglia polarization may be a viable treatment strategy for the treatment of inflammation-related diseases [11,12]. However, the effect of minor compounds presents in VOO, particularly unsaponifiable compounds, on microglia activation is scarcely known. In this study, we investigated

the potential role of UF and PF in regulating microglia polarization and neuroinflammation.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and design

This study was conducted according to Good Clinical Practice Guidelines and in line with the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. Informed consent for the study was obtained. All animal protocols received appropriate institutional approval (Animal Care and Use Committee of the University of Seville) and were performed according to the official rules formulated in the Spanish law on the care and use of experimental animals (UE Directive of 2010: 2010/63/UE; RD 53/2013).

Preparation of UF and squalene from VOO

VOO of Picual variety was used as a matrix for UF extraction. UF was isolated following conventional procedures, as described IUPAC 2401 [13,14]. In brief, 5 g of VOO was saponified at 80 °C by refluxing with 50 ml of 2 N potassium hydroxide solution in ethanol (Panreac, Barcelona, Spain), boiling gently until the solution became clear, and then for additional 20 min. Heating was stopped by addition of 50 mL distillate water through the top of the condenser and the solution was swirled. After cooling to 30-35 °C, the solution was rinsed several times with water and UF was extracted with diethyl ether (Panreac) used as solvent for evaporation by distillation on a rotary evaporator (B-480 model, Büchi Labortechnik, Essen Germany) at 30 °C under vacuum. Extracted material was dried in oven at 103 ± 2 °C for 15 min. Sample yields were between 1.3% and 1.4%. Quantitative analysis of UF aliphatic alcohols, sterols, and

triterpenic dialcohols was performed according to European Regulation EEC/2568/91 for olive oil. Unsaponifiable matter was extracted as mentioned above and fractioned by thin layer chromatography on a silica gel plate (Kieselgel 60 F254, Merck, Germany) with a mixture of hexane and ethylether (65:35 v/v). Aliphatic alcohols, sterols, and triterpenic dialcohols were identified by their retention factor. The triterpenic dialcohols, erythrodiol and uvaol, recovered from the plate were transformed into trimethylsilyl ethers by adding 200 μ L of a mixture of 9:3:1 v/v/v of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane and analysed by gas chromatography (GC) using an HP 5890 series II gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a 30 m, 0.32 mm i.d., Tracsil TRB-5 (95% dimethylpolysiloxane, 5% diphenyl, film thickness 0.25 μ m) capillary column (Teknokroma, Barcelona, Spain). The chromatographic conditions were as follows: injector 300 $^{\circ}$ C, isothermal column 275 $^{\circ}$ C, and detector 300 $^{\circ}$ C. The split ratio was 1:50 and the hydrogen flow rate of 1.0 ml/min, 130 Kpa. The chromatographic conditions for alcohol determinations were the same as those mentioned above for sterols and triterpene diols, except that oven temperature was 215 $^{\circ}$ C (5 min) and then 3 $^{\circ}$ C/min increased to 290 $^{\circ}$ C, and held for 2 min.

The quantifications were based on the peak areas identified by their relative retention time. The quantification of tocopherols was based on the comparison of the peak areas with those of an external standard curve of R-tocopherol and identified by HPLC [15]. The test sample was prepared as a solution to 10% by weight in hexane (Panreac) and analysed in an HPLC system (Hewlett–Packard, Minnesota, US 1050) equipped with a fluorescence detector (Shimadzu RF-535) using an excitation wavelength set at 290 nm, an emission wavelength at 330 nm, and an HPLC analytical column silica (250 mm x 4 mm i.d. x 5 μ m) (Merck, Superspher Si60) at a temperature of 30 $^{\circ}$ C. A flow rate of 1 mL/min, 400 bar was used.

Total concentrations were calculated as the sum of individual concentrations. Results were expressed as mg/100 mg UF (**Table 1**).

Table 1. Main composition of UF from VOO

Component	mg/Kg (ppm)
Squalene	5681
Total sterols	1289
Campesterol	40.7
β -sitosterol	7.8
Δ 5-Avenasterol	69.7
Total methylsterols	69.8
Total triterpenic alcohols	568
Total aliphatic alcohols	163
C24	40.8
C26	71.9
α -tocopherol	87

The quantification of squalene (SQ) was based on the comparison of the peak areas with those of an external standard curve and identified by GC. VOO (0.5 g) with 1 mL internal SQ standard (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (5 mg/mL) were weighed and mixed; then, 2 mL of heptane and 400 mL of methanolic solution of potassium hydroxide 2 N were added and the mix was shaken vigorously. When the upper solution became clear, 1 μ L was injected into a GC. GC analysis of SQ content was performed using an HP5890 (Hewlett-Packard) gas chromatograph fitted with a flame ionization detection system and a split injection system (split ratio 1:50). Separations were carried out on a fused silica capillary column SPB-5 (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-95% methylsilicone, with a thickness of 0.25 μ m (Supelco). The operating conditions were as follows: injector temperature, 280 $^{\circ}$ C; detector temperature, 300 $^{\circ}$ C;

oven programming temperatures, initial 240 °C for 6 min and then rising at 5 °C/min to 280 °C. A hydrogen flow rate of 1 mL/min, 130 Kpa was used. Total concentration was calculated as the sum of individual concentrations.

Preparation of PF and hydroxytyrosol (HTyr) from VOO

PF was obtained using the method described by Vazquez-Roncero et al [16] with some modifications. An amount of 50g of VOO was extracted with 125 mL of methanol:water (80:20, v/v). The resultant was mixed with a vortex at 5000 g for 1 min and then sonicated for 15 min. After decantation, the methanolic phase was concentrated in vacuum under a stream of nitrogen at a temperature lower than 35 °C until it reached a syrupy consistency. PF was lyophilized and stored at –80 °C until its use. Quantitative and qualitative analysis of PF was performed according to the COI/T20/29. The method is based on direct extraction of the phenolic minor polar compounds by means of a methanol solution and subsequent quantification by HPLC. After direct extraction, an aliquot of the supernatant phase was taken, filtered, and injected into a HPLC system equipped with C18 reverse-phase column (25 cm x 4.6 mm), type Spherisorb ODS-2 (5 mm) and a spectrophotometric UV detector at 280 nm. The content of phenols was expressed in mg of tyrosol per kg of oil and was calculated by measuring the areas of the related chromatographic peaks. The composition of the isolated PF is detailed in **Table 2**. To *in vitro* treatments, both HTyr and SQ were purchased by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

BV2 microglial cell culture

BV2 microglial cells were purchased from the Instituto de la Grasa (Seville, Spain). Cells were routinely cultured in high glucose

Table 2. Main composition of PF from VOO using COI/T20/29doc.

Component	μM Phenol (50 μg PF/mL)
Hydroxytyrosol	41.07
Tyrosol	43.09
Vanillic acid	5.09
p-Coumaric acid	3.42
Decarboxymethyl oleuropein aglycone (dialdehyde)	10.27
Tyrosyl acetate	4.97
Decarboxymethyl ligstroside aglycone (dialdehyde)	11.33
Pinoresinol	6.21
Cinnamic acid	6.89
Acetoxy-pinoresinol	6.22
Oleuropein aglycone, aldehyde form	39.18
Ligstroside aglycone, dialdehyde form	26.20
Luteolin	4.18
Apigenin	0.88

(4500 mg/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, #L0104, Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). Culture conditions were 5 % CO₂ at 37 °C. Subcultures were made every 3 days using 0.25% trypsin-EDTA. To maintain cells in an undifferentiated state, they were passaged before obtaining confluence. Only BV2 microglial cells at culture passages 5 to 10 were used for the experiments. Before the treatment, BV2 microglial cells were seed at a density of 5x10⁵ cells/mL in 12-well plates for 24 h in high glucose DMEM supplemented with 1 % heat-inactivated FBS and 1 % P/S.

M1/M2 microglia polarization

For M1 or M2 polarization, BV2 microglia cells were exposed to LPS (100 ng/mL) and IFN γ (20 ng/mL) or to IL-4 (20 ng/mL), respectively, for additional 24 h. To assess the effect of minor compounds from VOO on microglia polarization, BV2 microglial cells were incubated with LPS (100 ng/mL) and IFN γ (20 ng/mL) in the absence or presence of UF and PF from VOO at 25 and 50 μ g/mL, SQ at 50 μ M, or HTyr at 41 μ M for 24 h.

Cell viability assay (MTT)

BV2 microglial cells were seeded at a density of 10^4 cells/well in 96 well plates and incubated with UF and PF up to 100 μ g/mL, and SQ and HTyr up to 100 μ M for 24 h. Afterward, the MTT solution (Sigma) was incubated in the well until a purple precipitate was visible. MTT-formazan crystals were solubilized with DMSO (Sigma), and after 10-20 min in dark at room temperature, were measured with a microplate reader at 570 nm corrected to 650 nm. Cell survival was expressed as the percentage of absorbance compared with that obtained in control, non-treated cells (any minor compound or fraction added to the culture medium for 24 h did not induce cytotoxicity, data not shown).

RNA isolation and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted by using Trisure Reagent (Bioline), as instructed by the manufacturer. A_{260}/A_{280} ratio in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, Spain) was used to determinate RNA quality. Momentarily, RNA (1 μ g) was subjected to reverse transcription (iScript, Bio-Rad, Madrid, Spain). An amount of 10 ng of the resulting cDNA was used as a template for real-time PCR amplifications. The mRNA levels for specific genes were

determined in a CFX96 system (Bio-Rad). For each PCR reaction, cDNA template was added to Brilliant SYBR green QPCR Supermix (Bio-Rad) containing the primer pairs for either gene or for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) as housekeeping genes (**Table 3**). All amplification reactions were performed in triplicate and average threshold cycle (Ct) numbers of the triplicates were used to calculate the relative mRNA expression of candidate genes. The magnitude of change of mRNA expression for candidate genes was calculated by using the standard $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method. All data were normalized to endogenous reference (GAPDH and HPRT) gene content and expressed as percentage of controls.

Table 3. Sequences of RT-qPCR primers for gene expression analysis

Target	No. GenBank	Direction	Sequence (5'→3')
GAPDH	NM_001289726	Forward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
		Reverse	ACACATTGGGGGTAGGAACA
HPRT	NM_013556.2	Forward	TATGTCCCCCGTTGACTGAT
		Reverse	TGCTCGAGATGCATGAAGG
CD80	NM_009855.2	Forward	GGGAAAGTGTACGCCCTGTA
		Reverse	GCTACTTCTGTGCCACCAT
iNOS	NM_010927	Forward	CACCTTGGAGTTCACCCAGT
		Reverse	ACCACTCGTACTTGGGATGC
CD200R	NM_021325.3	Forward	GTTGCCCTCTATCGCATT
		Reverse	TGGAAATCCCATCAGGTGT
ARG1	NM_007482	Forward	GTGAAGAACCACGGTCTGT
		Reverse	CTGGTTGTGAGGGGAGTGTT
TNF- α	NM_001278601	Forward	AGCCCCAGTCTGTATCCTT
		Reverse	CTCCCTTTCGAGAACTCAGG
IL-1 β	NM_008361	Forward	GCCATCCTCTGTGACTCAT
		Reverse	AGGCCACAGGTATTTTTCG
IL-6	NM_031168	Forward	AGTTGCCTTCTGGGACTGA
		Reverse	TCCACGATTCCAGAGAAC

Measurement of cytokine release

The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), following the indications of the manufacturer (Diacclone, Besancon, France). The cytokine concentrations were expressed in ng or pg per mL, as calculated from the calibration curves from serial dilution of human recombinant standards in each assay.

Animals and diets

C57BL/6J (The Jackson Laboratory) were maintained in light/dark- (12 h light/12 h dark), temperature- (22 ± 1 °C) and humidity- (50%-60% relative humidity) controlled room, fed with standard chow diet (CD, SAFE A04-10 Panlab) ad libitum and had free access to drinking water at the animal facilities of the School of Medicine (University of Seville). Male animals at the age of 10-12 weeks were divided in 4 experimental groups (n = 10/group). As shown in **Table 4**, mice were fed chow diet (3% energy as fat from soybean oil, A04-10) or high-fat diets (HFDs) based on the above A04-10 diet with additional 21% energy as fat from milk cream (HFD-saturated fatty acids, SFAs), refined olive oil (ROO, HFD-ROO) or VOO (HFD-VOO) for 8 weeks (**Table 5**).

Table 4. Macronutrients composition of diets.

Macronutrients	CD	HFD-SFAs	HFD-ROO	HFD-VOO
Fat (%)	3	24	24	24
Carbohydrate (%)	77.5	56.5	56.5	56.5
Protein (%)	19.5	19.5	19.5	19.5

Values are expressed as the percentage of energy derived from fat, carbohydrate or protein. Chow diet (CD), high-fat diet rich in saturated fatty acids (HFD-SFAs), high-fat diet rich in refined olive oil (HFD-ROO), and high-fat diet rich in virgin olive oil (HFD-VOO).

Table 5. Fatty acid composition of dietary fats for corresponding HFD.

	HFD-SFAs	HFD-ROO	HFD-VOO
Fatty acid	g/100 g of fatty acid ± SD		
4:0, butyric	0.83 ± 0.09	-	-
6:0, caproic	0.25 ± 0.01	-	-
8:0, caprylic	0.61 ± 0.04	-	-
10:0, capric	2.47 ± 0.08	-	-
12:0, lauric	3.09 ± 0.24	-	-
14:0, myristic	10.87 ± 0.53	-	-
16:0, palmitic	35.54 ± 0.47	20.42 ± 0.51	20.21 ± 0.43
16:1(n-7), palmitoleic	3.60 ± 0.18	0.97 ± 0.10	1.04 ± 0.09
18:0, stearic	11.49 ± 0.43	5.70 ± 0.06	5.91 ± 0.12
18:1(n-9), oleic	25.33 ± 0.41	61.96 ± 0.71	60.86 ± 0.93
18:2(n-6), linoleic	4.27 ± 0.47	7.97 ± 0.38	7.90 ± 0.42
18:3(n-3), α-linolenic	0.39 ± 0.03	1.04 ± 0.08	1.24 ± 0.06
Others	0.96 ± 0.24	2.05 ± 0.62	2.93 ± 0.75
Total-SFAs	63.46 ± 1.07 ^a	26.11 ± 0.59 ^b	26.12 ± 0.53 ^b
Total-MUFAs	28.93 ± 1.48 ^b	62.83 ± 0.78 ^a	61.90 ± 0.91 ^a
Total-PUFAs	4.66 ± 0.46 ^b	9.01 ± 0.42 ^a	9.14 ± 0.38 ^a

The values are expressed as the mean ± SD (n = 3). An ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was performed. Different superscript letters (a-c) denote that mean values in a row with different letters are significantly different (p < 0.05). High-fat diet rich in saturated fatty acids (HFD-SFAs), high-fat diet rich in refined olive oil (HFD-ROO), and high-fat diet rich in virgin olive oil (HFD-VOO).

Body weight was recorded weekly. Diets and drinking water were refreshed every week. All diets, which had low cholesterol (0.01%), were prepared by Panlab and presented as pellets to the animals. At the end of the experiments, animals were sacrificed at the beginning

of the light cycle and after 10 h of food deprivation, brain tissue was then removed, and frozen at -80 °C for further analysis.

Immunostaining Analysis by FACS

Brain tissue samples were collected after 8 weeks of diet. Microglia membrane expression of CD45 (PE-Cy7 anti-mouse CD45, BD), CD11b (PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD11b, BD), F4/80 (APC anti-mouse APC, Miltenyi), CD80 (FITC anti-mouse FITC, Miltenyi), and CD200R (PE anti-mouse CD200R, Miltenyi) on brain tissue was assessed by flow cytometry. According to the manufacturer's instructions, the tissue was homogenate and cells were incubated with antibodies at room temperature, in the dark, for 15 minutes. Fluorescence intensity was measured by FACSCanto II (BD) and calibrating using FACSCanto II analyser software (BD). Mean fluorescence intensity (MFI) of 10^4 counted cells was measured in each sample. Myeloid cells were gated as side scatter (SSC)-CD45⁺ cells. Microglial cells, in myeloid cells, were gated as CD11b⁺F4/80⁺ cells. In microglial cells, M1 and M2 phenotypes were gated as CD80⁺ and CD200R⁺ cells, respectively. Expression levels were presented as MFI corrected for non-specific binding of isotype control antibodies.

Statistical analysis

All values are expressed as arithmetic means \pm standard deviations (SD). Data were evaluated with Graph Pad Prism Version 5.01 software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), following Tukey multiple comparisons test as post hoc test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

UF, SQ, PF, and HTyr favor a M2 activation status in BV-2 microglial cells

To study the role of minor compounds from VOO on microglia plasticity, we observed that LPS particularly promoted the transcriptional activity of M1 microglia gene markers (CD80 and iNOS) in BV2 microglial cells (**Fig. 1A** and **1B**, respectively). In contrast, UF, SQ, PF, and HTyr not only reduced the mRNA levels of CD80 and iNOS genes, compared to LPS, but also promoted the transcriptional activity of M2 microglia gene markers (CD200R and Arg-1) in BV2 microglial cells (**Fig. 2A** and **Fig. 2B**, respectively).

Minor compounds from VOO modulate cytokine gene expression and secretion in BV2 microglial cells

To further explore the possible role of minor compounds on microglia activation status, gene expression and secretion of TNF- α (**Fig. 3**), IL-1 β (**Fig. 4**), and IL-6 (**Fig. 5**) were analyzed. We observed that LPS-induced release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) and expression of genes encoding these cytokines were diminished by UF, SQ, PF, and HTyr in LPS-treated BV2 microglial cells. In the case of UF and PF, these effects were dose-dependent.

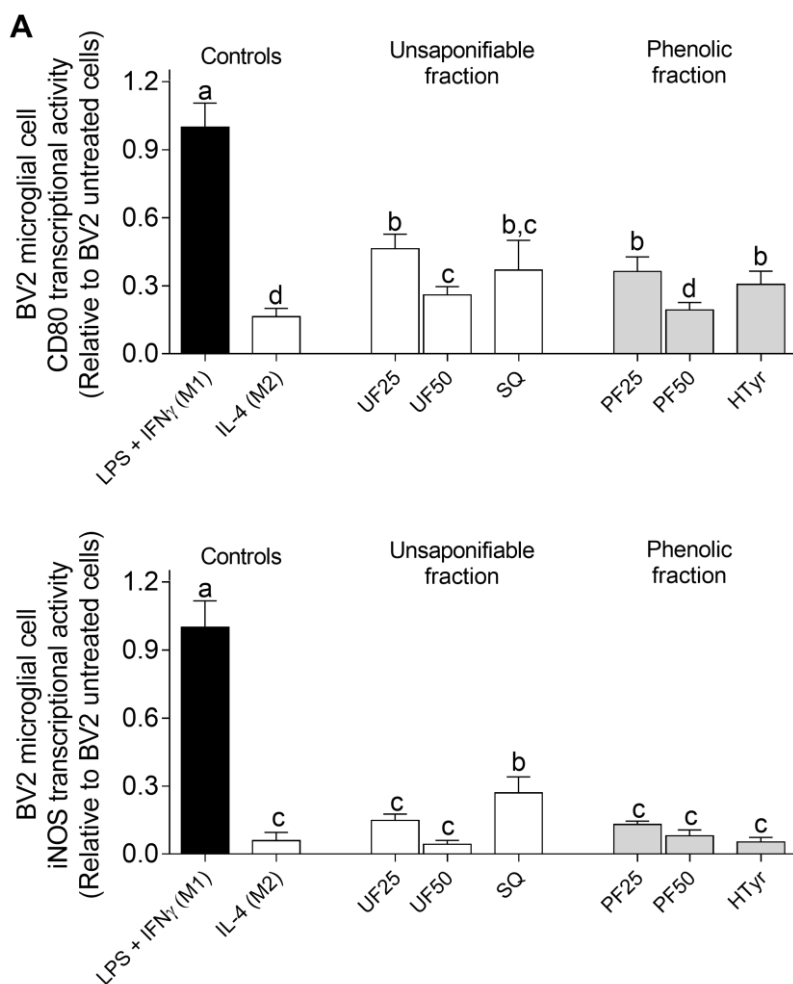


Figure 1. Expression of M1 microglia gene markers in BV2 microglial cells. Cells were treated with LPS+IFN γ (M1 microglia) or IL-4 (M2 microglia) in the absence or presence of UF (at 25 and 50 μ g/ml), SQ (at 50 μ M), PF (at 25 and 50 μ g/ml) or HTYr (at 41 μ M) for 24 h. M1 gene markers: (A) CD80 and (B) iNOS. Values are presented as means \pm SD ($n = 6$) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

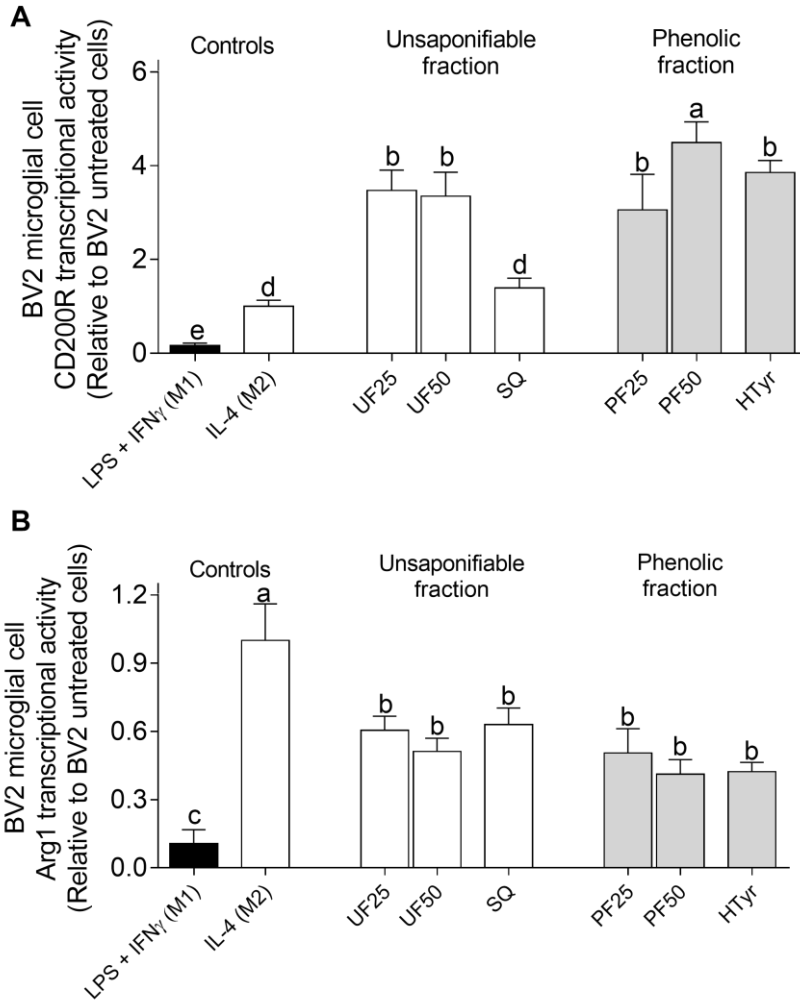


Figure 2. Expression M2 microglia gene markers in BV2 microglial cells. Cells were treated with LPS+IFN γ (M1 microglia) or IL-4 (M2 microglia) in the absence or presence of UF (at 25 and 50 μ g/ml), SQ (at 50 μ M), PF (at 25 and 50 μ g/ml) or HTYr (at 41 μ M) for 24 h. M2 gene markers: (A) CD200R and (B) Arg-1. Values are presented as means \pm SD (n = 6) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

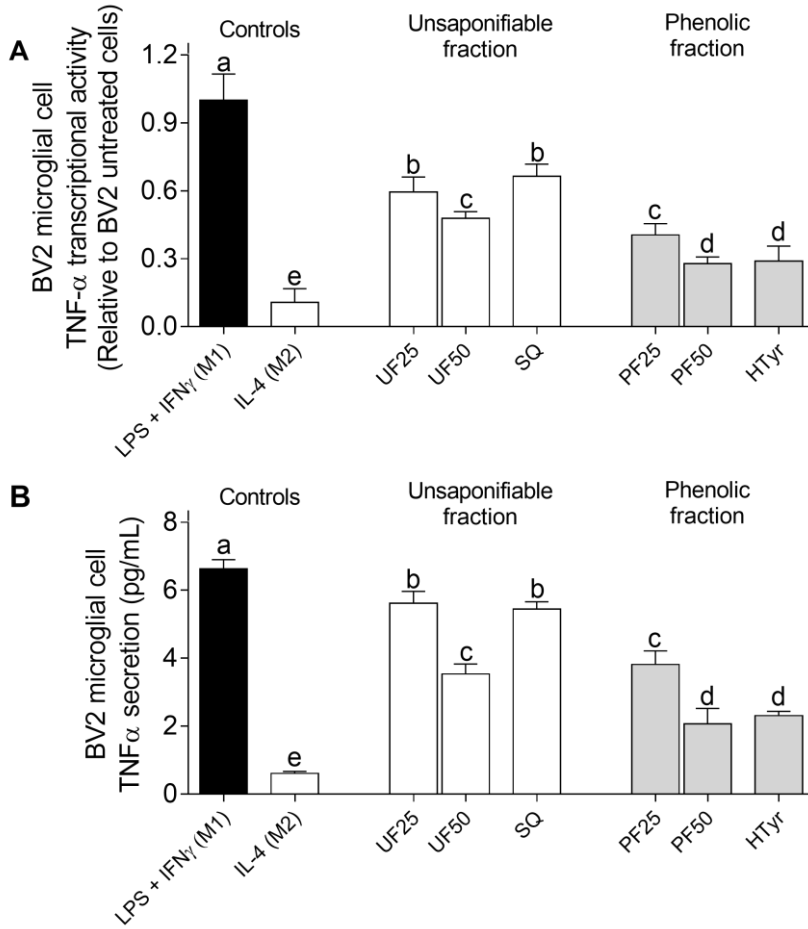


Figure 3. Expression and secretion of proinflammatory cytokines in BV2 microglial cells. Cells were treated with LPS+IFN γ (M1 microglia) or IL-4 (M2 microglia) in the absence or presence of UF (at 25 and 50 μ g/ml), SQ (at 50 μ M), PF (at 25 and 50 μ g/ml) or HTyr (at 41 μ M) for 24 h. **(A)** TNF- α mRNA expression and **(B)** cytokine secretion. Values are presented as means \pm SD ($n = 6$) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

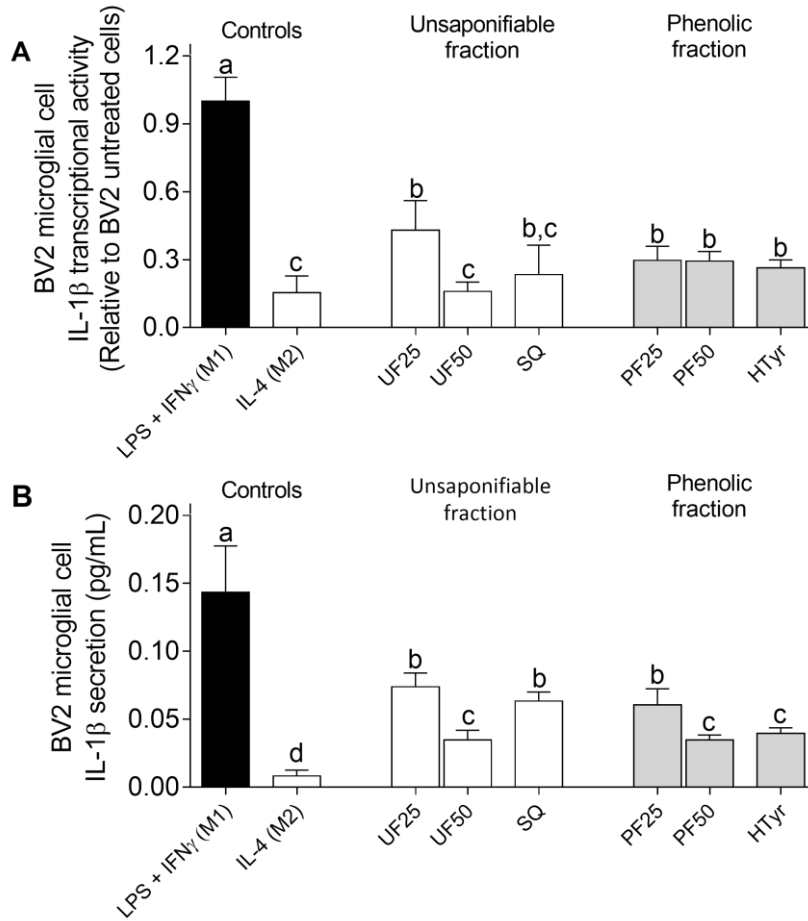


Figure 4. Expression and secretion of proinflammatory cytokines in BV2 microglial cells. Cells were treated with LPS+IFN γ (M1 microglia) or IL-4 (M2 microglia) in the absence or presence of UF (at 25 and 50 μ g/ml), SQ (at 50 μ M), PF (at 25 and 50 μ g/ml) or HTyr (at 41 μ M) for 24 h. **(A)** IL-1 β mRNA expression and **(B)** cytokine secretion. Values are presented as means \pm SD (n = 6) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

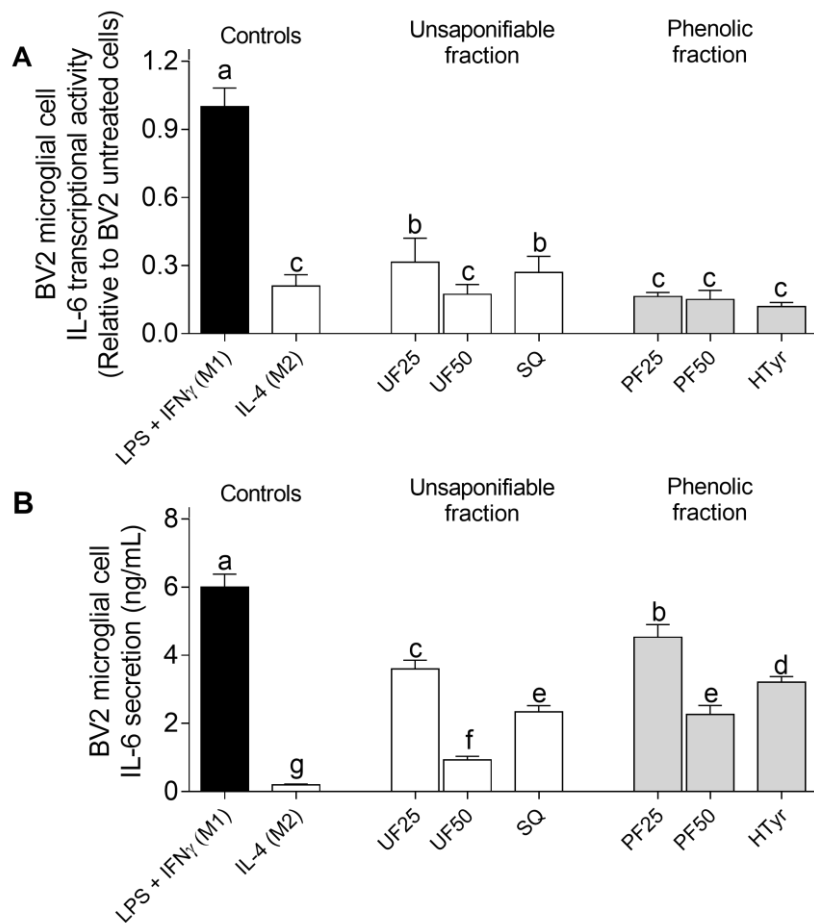


Figure 5. Expression and secretion of proinflammatory cytokines in BV2 microglial cells. Cells were treated with LPS+IFN γ (M1 microglia) or IL-4 (M2 microglia) in the absence or presence of UF (at 25 and 50 μ g/ml), SQ (at 50 μ M), PF (at 25 and 50 μ g/ml) or HTyr (at 41 μ M) for 24 h. **(A)** IL-6 mRNA expression and **(B)** cytokine secretion. Values are presented as means \pm SD ($n = 6$) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Minor compounds from VOO modulate M1/M2 microglia subsets in brain tissue of obese mice

In mice, the supply of HFDs enriched in SFAs, ROO, or VOO induced an increase in body weight gain (**Figure 6**). As shown in **Figure 7**, microglial cells (CD11b⁺F4/80⁺) were analyzed in myeloid lineage (CD45⁺) from brain tissue of mice fed with chow diet and HFDs. Total microglial cell population was significantly increased in brain tissue of mice fed with HFD-SFAs compared to those fed with chow diet or those fed with HFD-ROO and HFD-VOO (**Fig. 7A**). In addition, HFD-SFAs showed an increase in CD80 (M1 phenotype) protein levels and a decrease in CD200R (M2 phenotype) protein levels compared to the chow diet, HFD-ROO, and HFD-VOO (**Fig. 7B** and **Fig. 7C**, respectively). Fully consistent, brain tissue of mice on HFD-ROO had higher mRNA levels of the M1 marker CD80 and that of mice on HFD-VOO and HFD-VOO had higher mRNA levels of the M2 markers CD200R (**Fig. 8**).

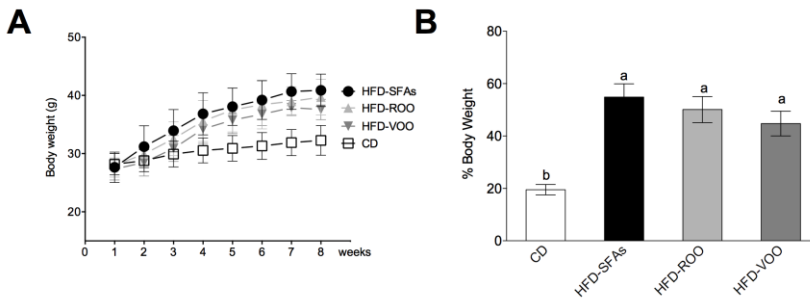


Figure 6. (A) Body weight monitored over time on each diet and (B) body weight gain of C57BL/6J mice fed on CD, HFD-SFAs, HFD-ROO, and HFD-VOO for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

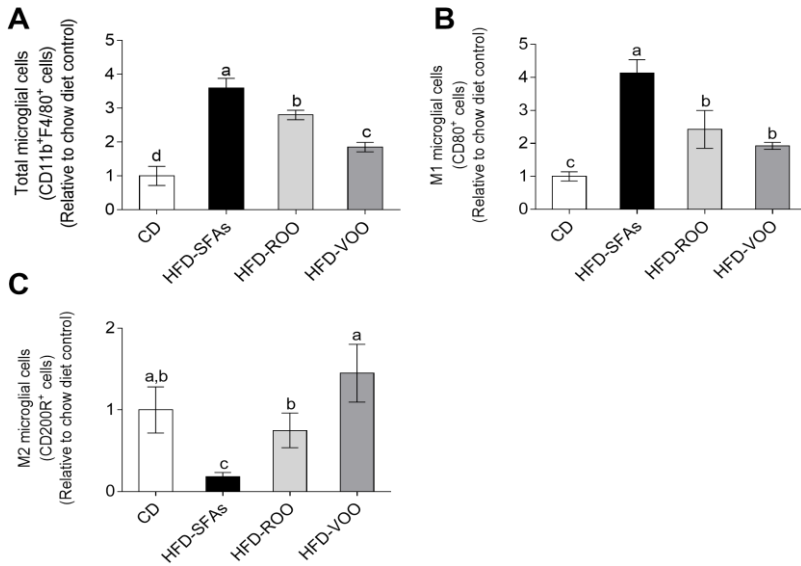


Figure 7. (A) FACS analysis of total microglia subsets by means of (B) CD80 (M1 microglia subset) and (C) CD200R (M2 microglia subset) surface marker expression (relative values) in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on a CD, HFD-SFAs, HFD-ROO, and HFD-VOO for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

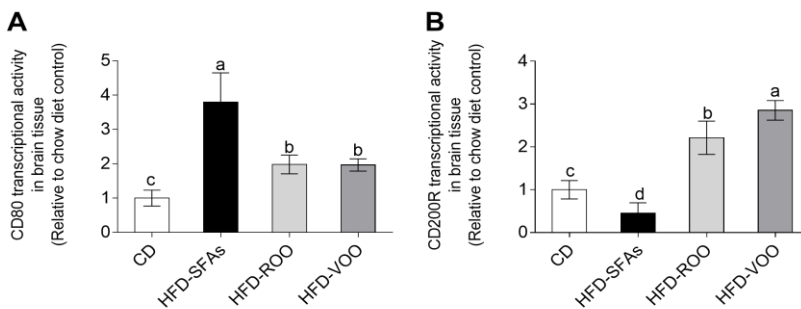


Figure 8. (A) CD80 and (B) CD200R mRNA expression in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on a CD, HFD-SFAs, HFD-ROO, and HFD-VOO for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

VOO-enriched diet promotes neuroprotection in obese mice

To explore immune-related events that follow microglia activation, we analyzed the local inflammation in brain tissue of mice fed with chow diet and HFDs (**Fig. 9** and **Fig. 10**). Brain tissue gene expression levels of pro-inflammatory TNF- α (**Fig. 9A**), IL-1 β (**Fig. 9C**), and IL-6 (**Fig. 10A**), and the secretion of these cytokines into brain tissue homogenates (**Fig. 9B, 9D, and 10B**, respectively) were higher with HFDs but these levels were significantly less pronounced with HFD-VOO than with HFD-SFAs and with HFD-ROO.

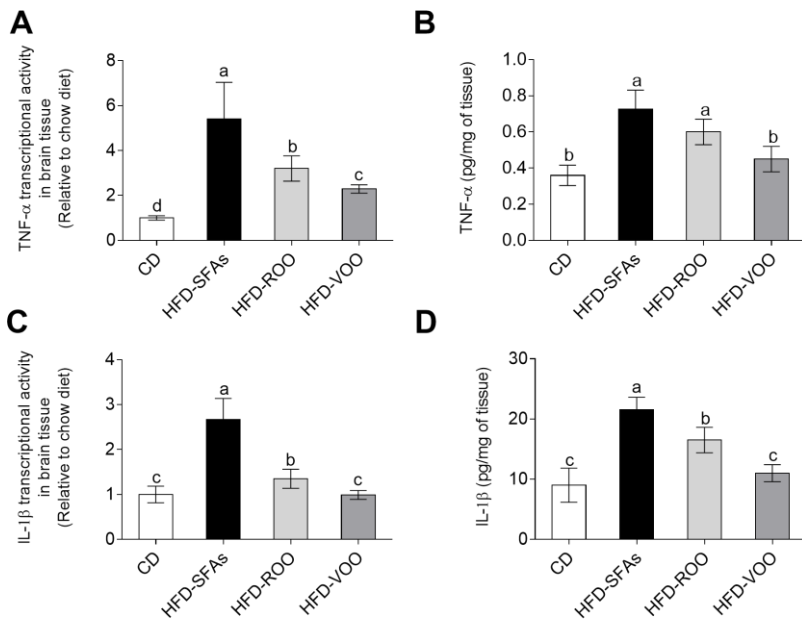


Fig. 9. (A) TNF- α mRNA expression and (B) cytokine concentration, (C) IL-1 β mRNA expression and (D) cytokine concentration, and in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on a CD, HFD-SFAs, HFD-ROO, and HFD-VOO for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD (n = 10 mice/group) and those marked with different letters are significantly different (P < 0.05).

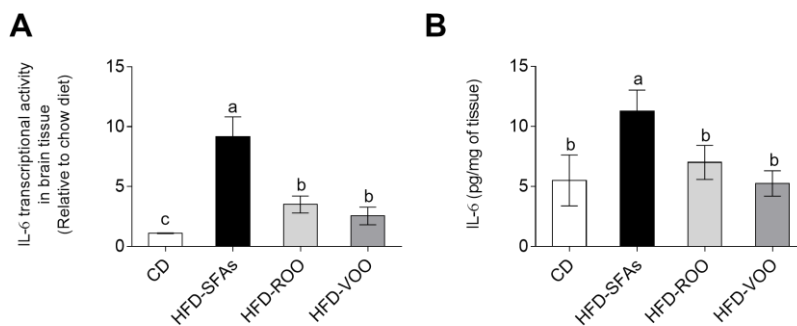


Fig. 10. (A) IL-6 mRNA expression and (B) cytokine concentration in the brain tissue of C57BL/6J mice fed on a CD, HFD-SFAs, HFD-ROO, and HFD-VOO for 8 weeks. Values are presented as means \pm SD ($n = 10$ mice/group) and those marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Herein, we elucidate for first time the underlying mechanisms by which UF and PF from VOO attenuates neuroinflammation development by regulating microglia macrophage plasticity.

Pharmacological treatments for neurodegenerative diseases currently available have the potential to delay the progression or even reduce the symptoms at a certain level. In this context and due to the limited efficacy of pharmacological treatment and the multifactorial nature of these disorders, a multifaceted approach seems appropriate. Diet interventions are a promising approach to prevent and delay the onset and progression [17].

The potential of Mediterranean Diet in preventing neurodegenerative disorders has been mainly related with its high content in plant foods: fruits and vegetables and virgin olive oil, sources of a wide of bioactive compounds [18-20]. Bioactive compounds comprise a heterogeneous group of thousands of molecules present mainly in plant foods and also known as phytochemicals. The composition of VOO includes minor compounds (UF and PF) that could range from 1-3% of the oil. The constituents of minor compounds are present in low concentrations, but they are responsible for their flavor, nutritional and biological properties of VOO (aldehydes, alcohols, esters, hydrocarbons, ketones, furans, and others) [1].

In the present paper we have determined that acute activation of inflammation in BV2 microglial cells by treatment with LPS and IFN γ result in an increase in the relative proinflammatory M1 microglia subset. Microglial polarization depends on different microenvironment and signals that promote specific phenotypes.

Classical M1-activated microglia secrete proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and, alternatively, M2-activated microglia is able to repair small damage, have an anti-inflammatory phenotype, contributing to trophic support of neurons, possess the ability to degrade toxic aggregates and increase the neuroprotective functions thanks to anti-inflammatory interleukin production [21]. Many researchers have found immunomodulatory compounds presents in food, for example lutein highly present in parsley, was able to reduce LPS-induced neuroinflammation in BV2 microglial cells, by significantly inhibiting iNOS [11], another example is fucosterol, a phytosterol contained in brown seaweed, that inhibits the production of nitric oxide and the expression of iNOS [22]. While effects of minor compounds from VOO on inflammation and polarization in the periphery are well studied, any reports have investigated effects of UF and PF on neuroinflammation and microglial cells that are the major immunological mediators of this process in the CNS. In our study, we find that dietary UF, SQ, PF, and HTyr can change microglial activation status ratio regard to LPS+IFN γ . That means that M1 markers (CD80 and iNOS) and proinflammatory cytokine mRNA levels and secretion are decreased in BV2 microglial cells, meanwhile M2 markers (CD200R and Arg-1) are enlarged when they are exposed at minor compound from VOO.

An excessive or prolonged neuroinflammatory response to HFD, insults may have the unintended consequence of generating bystander neuronal cell death. Similarly, the presence of a chronic, low-grade neuroinflammatory condition, such as obesity and metabolic syndrome, may also cause eventual bystander cell death with cumulative and serious consequences over time [23]. Consumption of a diet rich in SFAs, may chronically activate neuroinflammatory responses of microglia. For a deeper understanding of the influence that dietary VOO exerts on neuroinflammation during obesity and metabolic syndrome in mice,

we analyzed the number of microglial cells (CD11b and F4/80 positive cells) found increased in brain of mice on different HFDs. As lower is the cellularity and thereby the activation of M1 microglia subset, the lower is the inflammatory state and the better is the brain health status in mice on HFD-VOO. This is crucial to avoid the advance of neuroinflammation and neurodegeneration under sustained conditions of obesity and metabolic syndrome. Herein, we found that, in contrast to the HFD-SFAs, olive oil-based HFDs had a dramatic lower influence on microglial cells positive to CD80, which is a marker for M1 microglial activation. This also concurs with a decrease in the gene expression of CD80. Still, olive oil-based HFDs promoted the relative abundance of microglial cells positive to CD200R and with upregulated of gene expression, a marker that resemble M2 activation. By concordant polarization patterns, lower transcriptional activities and secretion of pro-inflammatory cytokines in brain of mice fed with olive oil-based HFDs were found.

CONCLUSION

Our study further pointing to a low neuroinflammation and thereby the safeguard of brain homeostasis when, the predominant dietary fat during HFD-induced obesity and metabolic syndrome is VOO. Importantly, our data emphasize the benefits of dietary minor compounds from VOO as nutritional strategies for reduction of activation and inflammation of microglia cells to prevent neuroinflammatory and neurodegenerative diseases.

Conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors thank Cell Biology Unit of Instituto de la Grasa for its assistance during the fulfilment of this work. SMP acknowledges financial support from “V Own Research Plan” (University of Seville).

REFERENCES

- [1] Montserrat-de la Paz S, Bermudez B, Cardelo MP, *et al.* Olive oil and postprandial hyperlipidemia: implications for atherosclerosis and metabolic syndrome. *Food Funct.* **2016**, 7: 4734-4744.
- [2] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, *et al.* Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *BBA-Biomembranes.* **2014**, 1838: 1638-1656.
- [3] Aparicio-Soto M, Montserrat-de la Paz S, Sanchez-Hidalgo M, *et al.* Virgin olive oil and its phenol fraction modulate monocyte/macrophage functionality: a potential therapeutic strategy in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Br J Nutr.* **2018**, 120: 681-692.
- [4] Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, *et al.* Unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in LPS-activated murine macrophages. *Food Chem.* **2014**, 147: 117-123.
- [5] Yang X, Xu S, Qian Y, *et al.* Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 α in conditions of neuroinflammatory injury. *Brain Behav.* **2017**, 64: 162-172.
- [6] Bottcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, *et al.* Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci.* **2019**, 22: 78-90.
- [7] Sousa C, Golebiewska A, Poovathingal SK, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO Reports.* **2018**, 19: e46171.
- [8] Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 242.
- [9] Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* **2016**, 53: 1181-1194.
- [10] Xu Y, Xu Y, Wang Y, *et al.* Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization via CaMKK β -dependent AMPK activation. *Brain Behav.* **2015**, 50: 298-313.
- [11] Wu W, Li Y, Wu Y, *et al.* Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- κ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Mol Nut Food Res.* **2015**, 59: 1663-1673.

- [12] Olajide OA, Kumar A, Velagapudi R, *et al.* Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS - activated rat primary microglia. *Mol Nutr Food Res.* **2014**, 58: 1843-1851.
- [13] Montserrat-de la Paz S, Marin-Aguilar F, Garcia-Gimenez MD, *et al.* Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. *J Agric Food Chem.* **2014**, 62: 1105-1110.
- [14] Paquot. Determination of the unsaponifiable matter. Method 2401. IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th ed., Revised and Enlarged. *Oxford.* **1992**, Blackwell.
- [15] Montserrat-de la Paz S, Fernandez-Arche MA, Angel-Martin M, *et al.* Phytochemical characterization of potential nutraceutical ingredients from Evening Primrose oil (*Oenothera biennis* L.). *Phytochem Lett.* **2014**, 8: 158-162.
- [16] Vazquez-Roncero A, Janer del Valle MI, Janer del Valle C. Determination of total phenols in olive oil. *Grasas y Aceites.* **2009**, 24: 350-355.
- [17] Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, De Pablos RM, *et al.* Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 373.
- [18] Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, *et al.* Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *I J Mol Sci.* **2017**, 18: E2230.
- [19] Dominguez-Perles R, Auñón D, Ferreres F, *et al.* Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism. *Food Funct.* **2017**, 8: 4570-4581.
- [20] Lopez S, Montserrat-de la Paz S, Lucas R, *et al.* Effect of metabolites of hydroxytyrosol on protection against oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J Funct Foods.* **2017**, 29: 238-247.
- [21] Papa S, Caron I, Rossi F, *et al.* Modulators of microglia: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* **2016**, 26: 427-433.
- [22] Jung HA, Jin SE, Ahn BR, *et al.* Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* **2013**, 59: 199-206.
- [23] Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, *et al.* Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* **2009**, 4: 47.

Unsaponifiable and phenolic fractions from virgin olive oil prevent neuroinflammation skewing microglia polarization toward M2 phenotype

CAPÍTULO 04

Discusión General

y

Conclusiones



DISCUSIÓN GENERAL

Los tratamientos farmacológicos para las enfermedades neurodegenerativas actualmente disponibles tienen un limitado potencial para retrasar la progresión o reducir los síntomas de estas enfermedades. En este contexto y debido a la escasa eficacia del tratamiento farmacológico y la naturaleza multifactorial de estos trastornos, un enfoque multidisciplinar parece apropiado para su prevención y/o tratamiento. Las intervenciones dietéticas son un enfoque prometedor para prevenir y retrasar el inicio y la progresión de dichas enfermedades [1].

El potencial de la dieta mediterránea para prevenir los trastornos neurodegenerativos se ha relacionado principalmente con su alto contenido en alimentos vegetales: frutas y verduras y aceite de oliva virgen, fuentes de una amplia gama de compuestos bioactivos [2-4]. Los compuestos bioactivos comprenden un grupo heterogéneo de miles de moléculas presentes principalmente en alimentos vegetales y también conocidos como fitoquímicos. La composición del aceite de oliva virgen incluye ácido oleico principalmente y compuestos menores, presentes en su fracción fenólica y fracción insaponificable. Dichos compuestos (aldehídos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, cetonas, furanos y otros) están presentes en bajas concentraciones, pero son responsables del sabor, propiedades nutricionales y biológicas del aceite de oliva virgen [5].

La evidencia clínica y epidemiológica sugiere que los factores del estilo de vida, especialmente la nutrición, pueden ser cruciales para controlar las neuropatologías [6]. De la misma manera, existe una creciente evidencia preclínica y clínica de que la hipertrigliceridemia no solo es un factor de riesgo grave en el

desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sino que está relacionada con la neurodegeneración y la neuroinflamación [7]. Las TRLs postprandiales inducen un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y alteraciones estructurales de esta. Los productos de lipólisis generados a partir de las TRLs postprandiales dañan la función de barrera endotelial, perturban la expresión de proteínas de unión, inducen la muerte celular apoptótica *in vitro* en células endoteliales aórticas humanas [8] e *in vivo* elevan transitoriamente la permeabilidad de la BHE en ratones [9]. De hecho, en nuestro estudio hemos demostrado que el tratamiento con TRLs indujo la activación de la microglía a través de la regulación positiva de ApoB48R de una manera dependiente de FAs.

Las TRLs posprandiales consisten principalmente en quilomicrones que contienen ApoB48 que se sintetizan inmediatamente después de la ingestión de una comida rica en grasas, siendo su composición en FAs similar a la composición en FAs de la grasa ingerida [10]. Cada vez hay más pruebas que indican que la función biológica de las TRLs depende en gran medida de su composición en FAs. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado ampliamente que los MUFAs y los PUFAs en las TRLs postprandiales son en gran medida beneficiosos en el pico postprandial, mientras que los SFAs son potencialmente perjudiciales para la salud [11,12]. Ampliamos este conocimiento y demostramos que las TRLs, aisladas del estado de hipertrigliceridemia postprandial inducida en sujetos sanos después de la ingestión aguda de comidas ricas en TGs, regulan la actividad transcripcional de ApoB48R y la acumulación intracelular de TGs en células microgliales BV2. En nuestro estudio, el ácido oleico y los PUFAs omega-3 atenuaron la expresión del gen ApoB48R al tiempo que causaron una disminución en la acumulación intracelular de TGs en comparación con los SFAs. Esta regulación está en línea con

publicaciones anteriores en monocitos humanos [13-17] y neutrófilos [18], en las cuales los experimentos *in vitro* mostraron que el tipo de FAs de la dieta en las TRLs postprandiales regulaba estos efectos.

Los FAs son moléculas de señalización bioactivas que también desempeñan funciones estructurales y bioenergéticas integrales en las células. Los FAs exógenos cruzan BHE para interactuar con el receptor celular en la microglía y, por lo tanto, pueden modular directamente la neuroinflamación actuando como factor de señalización extrínseco [19]. En el presente trabajo, hemos determinado la activación inflamatoria aguda en las células microgliales BV2 mediante la incubación con TRLs postprandiales. Como resultado se produjo un aumento en el subconjunto de microglía proinflamatoria M1. En estudios recientes, los análisis del transcriptoma (480 genes) y el proteoma después de la estimulación con LPS indicaron un patrón de reacción de BV2 con muchas similitudes con el de la microglía primaria. Por lo tanto, las células BV2 parecen ser un sustituto válido para la microglía primaria en muchos entornos experimentales [20]. La polarización microglial depende de diferentes microambientes y señales que promueven fenotipos específicos. La microglía clásica M1 es activada por citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y, alternativamente, la microglía M2 tiene un fenotipo antiinflamatorio, lo que contribuye al soporte trófico de neuronas, poseen la capacidad de degradar los agregados tóxicos y aumentar las funciones neuroprotectoras gracias a la producción de interleucinas antiinflamatorias [21]. Muchos investigadores han encontrado que los compuestos inmunomoduladores presentes en los alimentos, por ejemplo, la luteína altamente presente en el perejil, pudieron reducir la neuroinflamación inducida por LPS en las células microgliales BV2, al inhibir significativamente iNOS [22]. Otro ejemplo es el fucosterol, un fitosterol contenido en algas pardas, que inhiben la producción de

óxido nítrico y la expresión de iNOS [23]. Si bien los efectos de la dieta sobre la inflamación sistémica y la polarización de macrófagos periféricos están bien estudiados, son escasas las investigaciones sobre los efectos de los FAs en el SNC, la neuroinflamación y las células microgliales que son los principales mediadores inmunológicos de este proceso [24]. En nuestro estudio, encontramos que los MUFAs y PUFAs en la dieta pueden cambiar la relación del estado de activación microglial con respecto a los SFAs de la dieta. Eso significa que los marcadores M1 (CD80 e iNOS) y los niveles de secreción de citocina proinflamatoria disminuyen en las células microgliales BV2, mientras que los marcadores M2 (CD200R y Arg-1) aumentan cuando se exponen a TRL-MUFA y TRL-PUFA. Los SFAs, como el ácido palmítico, juegan un papel importante en la activación de las vías inflamatorias tempranas. Los SFAs interactúan con el receptor TLR4 y activan el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), lo que conduce a la activación de NF- κ B. Esta vía está vinculada a la inhibición de las hormonas anoréxicas insulina y leptina, en parte a través del aumento de la expresión inducida por NF- κ B del supresor de la señalización de citocinas [25]. Sin embargo, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se ha informado el efecto de las TRLs postprandiales con diferente composición en FAs en las células microgliales BV2.

Por otra parte, en este estudio dilucidamos por primera vez los mecanismos subyacentes por los cuales la fracción fenólica y la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen atenúan el desarrollo de la neuroinflamación mediante la regulación de la plasticidad de la microglía.

Si bien los efectos de compuestos menores del aceite de oliva virgen sobre la inflamación sistémica y la polarización de macrófagos periféricos están bien estudiados, no se ha investigado los efectos de la fracción fenólica y la fracción insaponificable sobre

la neuroinflamación y las células microgliales, las principales mediadoras inmunológicas de este proceso en el SNC. En nuestro estudio, encontramos que la fracción insaponificable, el escualeno, la fracción fenólica y el HTyr pueden cambiar la relación del estado de activación microglial con respecto al LPS + IFN γ . Eso significa que los marcadores M1 (CD80 e iNOS) y los niveles de secreción de citocina proinflamatoria disminuyen en las células microgliales BV2, mientras que los marcadores M2 (CD200R y Arg-1) se ven aumentados cuando se exponen a un compuesto menor del aceite de oliva virgen.

Una respuesta neuroinflamatoria excesiva o prolongada a los FAs de la dieta, en una HFD, puede tener como consecuencia involuntaria la generación de muerte celular neuronal. Del mismo modo, la presencia de una enfermedad neuroinflamatoria crónica de bajo grado, como la obesidad y el síndrome metabólico, también puede causar la muerte celular con consecuencias acumulativas y graves en el tiempo [26]. El consumo de una dieta rica en SFAs, puede activar crónicamente las respuestas neuroinflamatorias de la microglía. Para una comprensión más profunda de la influencia que las HFDs enriquecidas en aceite de oliva o grasas saturadas ejercen sobre la neuroinflamación durante la obesidad y el síndrome metabólico en ratones, analizamos el número de células microgliales (células positivas CD11b y F4 / 80) que se encuentran incrementadas en el cerebro de los ratones alimentados con HFD-SFA. Cuanto más baja es la población celular M1 y, por lo tanto, la activación del subconjunto de microglía M1, más bajo es el estado inflamatorio y mejor es el estado de salud del cerebro. Esto sucede en ratones alimentados con HFD-MUFAs y HFD-PUFAs. Esto es crucial para evitar el avance de la neuroinflamación y la neurodegeneración en condiciones sostenidas de obesidad y síndrome metabólico. Aquí, encontramos que, en contraste con los HFD-SFAs, los ratones expuestos a una HFD a base de aceite de oliva tuvieron una

activación menor en las células microgliales positivas para CD80, que es un marcador para la activación microglial M1. Esto también coincide con una disminución en la expresión génica de CD80. Además, la HFD a base de aceite de oliva promovieron la abundancia relativa de células microgliales positivas para CD200R y con regulación positiva de la expresión génica, un marcador que se asemeja a la activación de M2. Mediante patrones de polarización concordantes, se encontraron actividades transcripcionales más bajas y secreción de citocinas proinflamatorias menores en el cerebro de ratones alimentados con HFD a base de aceite de oliva. Los efectos de la HFD y TRLs postprandiales ricas en MUFAs, que contienen o no EPA y DHA, no difirieron diferencias significativas. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado los efectos neuroprotectores de las dietas que contienen aceite de oliva y DHA/EPA en un modelo de isquemia cerebral en ratones [24]. Nuestro estudio apunta a una prevención de la neuroinflamación y, por lo tanto, al mantenimiento de la homeostasis cerebral cuando, la grasa de la dieta predominante es el aceite de oliva.

CONCLUSIONES

1.- La hipertrigliceridemia postprandial favorece el acúmulo intracelular de triglicéridos en células microgliales, regulando positivamente la expresión génica del receptor ApoB48R. Esta acumulación es menor en presencia de lipoproteínas postprandiales ricas en ácido oleico en comparación con lipoproteínas postprandiales ricas en ácidos grasos saturados.

2.- Las lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas tras la ingesta de una comida rica en grasa saturada favorecen la polarización de células microgliales hacia un fenotipo proinflamatorio M1. De forma opuesta, Las lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas tras la ingesta de una comida rica en aceite de oliva favorecen la polarización de células microgliales hacia un fenotipo neuroprotector M2.

3.- Las fracciones minoritarias del aceite de oliva virgen, la fracción fenólica y la fracción insaponificable y sus principales componentes escualeno e hidroxitirosol promueven la polarización de células microgliales hacia un fenotipo antiinflamatorio y neuroprotector M2.

4.- Una dieta rica en ácidos grasos saturados favorece la aparición de neuroinflamación asociada a obesidad en ratón, promoviendo la plasticidad microglial hacia el fenotipo M1. Una dieta rica en aceite de oliva virgen previene la neuroinflamación en el cerebro de ratones con obesidad, favoreciendo la polarización de la microglía hacia el fenotipo M2.

Con todo ello, estas conclusiones sugieren que la hipertrigliceridemia postprandial promueve un microambiente en el cerebro que interrumpe la biología normal y la función de las células microgliales. La presencia continua de lipoproteínas ricas en triglicéridos en la circulación puede considerarse un factor crítico que podría contribuir a la aparición de trastornos neurológicos. Es importante destacar que nuestros datos enfatizan los beneficios de las grasas dietéticas ricas en ácido oleico (aceite de oliva y aceite de oliva virgen) como estrategias nutricionales para la reducción de la acumulación intracelular de triglicéridos, la activación y la inflamación de las células de microglía para prevenir enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas.

REFERENCES

- [1] Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, De Pablos RM, *et al.* Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 373.
- [2] Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, *et al.* Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *I J Mol Sci.* **2017**, 18: E2230.
- [3] Dominguez-Perles R, Auñon D, Ferreres F, *et al.* Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism. *Food Funct.* **2017**, 8: 4570-4581.
- [4] Lopez S, Montserrat-de la Paz S, Lucas R, *et al.* Effect of metabolites of hydroxytyrosol on protection against oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J Funct Foods.* **2017**, 29: 238-247.
- [5] Montserrat-de la Paz S, Bermudez B, Cardelo MP, *et al.* Olive oil and postprandial hyperlipidemia: implications for atherosclerosis and metabolic syndrome. *Food Funct.* **2016**, 7: 4734-4744.
- [6] Pasinetti GM, Eberstein JA. Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **2008**, 106: 1503-14.
- [7] Hoyk Z, Toth ME, Lenart N, *et al.* Cerebrovascular pathology in hypertriglyceridemic APOB-100 transgenic mice. *Front Cell Neurosci.* **2018**, 12: 380.
- [8] Eiselein L, Wilson DW, Lame MW, *et al.* Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007**, 292: H2745-53.
- [9] Lee LL, Aung HH, Wilson WD, *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins lipolysis products increase blood-brain barrier transfer coefficient and induce astrocyte lipid droplets and cell stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2017**, 312: C500-16.
- [10] Naranjo MC, Bermudez B, Garcia I, *et al.* Dietary fatty acids on aortic root calcification in mice with metabolic syndrome. *Food Funct.* **2017**, 8: 1468-74.
- [11] Varela LM, Bermudez B, Ortega-Gomez A, *et al.* Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote invasion of human coronary artery smooth muscle cells in a fatty-acid manner through PI3k-Rac1-JNK signaling. *Mol Nutr Food Res.* **2014**, 58: 1349-64.

- [12] Bermudez B, Lopez S, Pacheco YM, *et al.* Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. *Cardiovasc Res.* **2008**, 79: 294–303.
- [13] Varela LM, Ortega-Gomez A, Lopez S, *et al.* The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/ macrophage cells. *J Nutr Biochem.* **2013**, 24: 2031–9.
- [14] Montserrat-de la Paz S, Bermudez B, Lopez S, *et al.* Exogenous fatty acids and niacin on acute prostaglandin D2 production in human myeloid cells. *J Nutr Biochem.* **2017**, 39: 22-31.
- [15] Naranjo MC, Garcia I, Bermudez B, *et al.* Acute effects of dietary fatty acids on osteoclastogenesis via RANKL/RANK/OPG system. *Mol Nutr Food Res.* **2016**, 60: 2505-13.
- [16] Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, *et al.* A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge. *J Nutr Biochem.* **2018**, 57: 45-55.
- [17] Varela LM, Ortega A, Bermudez B, *et al.* A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes. *Am J Clin Nutr.* **2011**, 93:918–25.
- [18] Ortega-Gomez A, Varela LM, Lopez S, *et al.* Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote lipid accumulation and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in human circulating and murine bone marrow neutrophils in a fatty acid-dependent manner. *Mol Nutr Food Res.* **2017**, 61: 1600879.
- [19] Button EB, Mitchell AS, Domingos MM, *et al.* Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. *Lipids.* **2014**, 49: 305-16.
- [20] Henn A, Lund S, Hedtjarn M, *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* **2009**, 26: 83-94.
- [21] Papa S, Caron I, Rossi F, *et al.* Modulators of microglia: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* **2016**, 6: 427-33.
- [22] Wu W, Li Y, Wu Y, *et al.* Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- κ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Mol Nutr Food Res.* **2015**, 59: 1663-73

[23] Jung HA, Jin SE, Ahn BR, *et al.* Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* **2013**, 59: 199-206.

[24] Gonzalez-Gobernado R, Ayuso MI, Sansone L, *et al.* Neuroprotective Effects of Diets Containing Olive Oil and DHA/EPA in a Mouse Model of Cerebral Ischemia. *Nutrients.* **2019**, 11: 1109.

[25] Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci.* **2018**, 12: 930.

[26] Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, *et al.* Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* **2009**, 4: 47.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABBREVIATURAS

Abreviatura	Significado inglés	Significado español
AA	Arachidonic acid	Ácido araquidónico
APO	Apolipoprotein	Apolipoproteína
ARG	Arginase	Arginasa
BBB	Blood-Brain Barrier	Barrera hematoencefálica
CE	Cholesteryl ester	Éster de colesterol
CD	Cluster of differentiation	Cluster de diferenciación
CM	Chylomicron	Quilomicrón
CNS	Central nervous system	Sistema nervioso central
COX	Cyclooxygenase	Ciclooxigenasa
DG	Diacylglycerol	Diacilglicerol
DHA	Docosahexaenoic acid	Ácido docosahexaenoico
EPA	Eicosapentaenoic acid	Ácido eicosapentaenoico
FA	Fatty acid	Ácido graso
FABP	Fatty acid binding protein	Proteína de unión a ácidos grasos
FBS	Fetal bovine serum	Suero fetal bovino
FFA	Free fatty acid	Ácido graso libre
HDL	High-density lipoprotein	Lipoproteína de alta densidad
HFD	High fat diet	Dieta rica en grasa
HTYR	Hydroxytyrosol	Hidroxitirosol
ICAM	Intercellular adhesion molecule	Molécula de adhesión intracelular
IFN	Interferon	Interferón
IL	Interleukin	Interleucina
INOS	Inducible nitric oxide synthase	Óxido nítrico sintasa inducible
LDL	Low-density lipoprotein	Lipoproteína de baja densidad

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado inglés	Significado español
LFD	Low fat diet	Dieta baja en grasas
LP(A)	Lipoprotein(a)	Lipoproteína (a)
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacárido
MAPK	Mitogen activated protein kinases	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MCP	Monocyte chemoattractant protein	Proteína quimioatrayente de monocitos
METS	Metabolic syndrome	Síndrome metabólico
MG	Monoacylglycerol	Monoacilglicerol
MMP	Matrix metalloproteinase	Metaloproteinasa de la matriz
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein	Proteína de transferencia de triglicéridos microsomales
MUFA	Monounsaturated fatty acid	Ácido graso monoinsaturado
NF-κB	Nuclear factor κ B	Factor de transcripción nuclear κ B
NO	Nitric oxide	Óxido nítrico
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Célula mononuclear de sangre periférica
PF	Phenolic fraction	Fracción fenólica
PG	Prostaglandin	Prostaglandina
PL	Phospholipid	Fosfolípido
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	Receptor activado por proliferación de peroxisomas
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Ácido graso poliinsaturado
ROO	Refined olive oil	Aceite de oliva refinado
ROS	Reactive oxygen species	Especies reactivas de oxígeno
SFA	Saturated fatty acid	Ácido graso saturado
SQ	Squalene	Escualeno
TG	Triglycerides	Triglicéridos
TLR	Toll-like receptor	Receptor tipo Toll

Abreviatura	Significado inglés	Significado español
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	Factor de necrosis tumoral
<i>TRL</i>	Triglyceride-rich lipoproteins	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
<i>UF</i>	Unsaponifiable fraction	Fracción insaponificable
<i>VLDL</i>	Very-low density lipoproteins	Lipoproteínas de muy baja densidad
<i>VOO</i>	Virgin olive oil	Aceite de oliva virgen

Esta es una lista de las abreviaturas más utilizadas, pero hemos decidido deletrear cada abreviatura la primera vez que se usa en cada capítulo, seguida de la abreviatura entre paréntesis.

CURRICULUM VITAE

MARÍA DEL ROCIO TOSCANO SÁNCHEZ

1. Información Personal

Fecha y lugar de Nacimiento: 6 de mayo de 1987 (Sevilla, España)

2. Titulación

Licenciatura en Farmacia

Universidad de Sevilla - Sevilla, España.

(septiembre 2005 – diciembre 2014)

3. Cursos

3.1 Cursos experto universitario

Protección y Experimentación animal a, b y c en roedores, lagomorfos, peces y anfibios. (66 horas) Centro de formación permanente. Universidad de Sevilla (2018).

3.2 Complementos formativos

Diseño y Análisis de Estudios de Supervivencia. (4 Cr) Máster Universitario en investigación médica: clínica y experimental. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. (2019)

Metodología de la investigación en ciencias médicas. (4 Cr) Máster Universitario en investigación médica: clínica y experimental. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. (2019)

Análisis de datos e interpretación de resultados. (4 Cr) Máster Universitario en investigación médica: clínica y experimental. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. (2019)

3.3 Cursos formación complementaria

ADGD046PO Fundamentos de la calidad en la Industria. (24 horas) ADAMS, Ministerio de Empleo y Seguridad Social (2019)

SSCE002PO Acreditación Docente para teleformación: Formador/a online. (60 horas)
ADAMS, Ministerio de Empleo y Seguridad Social. (2019)

Curso Línea IAVANTE: "Uso apropiado de antimicrobianos: los conceptos clave que no olvidarás desde la farmacia comunitaria" (35 horas) Fundación progreso y salud.
Consejería de salud, Junta de Andalucía. (2018)

Prevención en el Laboratorio Químico. Nivel 1. (2,5 horas). Instituto de Ciencias de la Educación (ICE) Universidad de Sevilla. (2018)

Cursos Cartera de Servicios. Real e Ilustre Colegio Oficial de farmacéuticos de Sevilla.
(2016)

Nutrición en tu farmacia (3,12 créditos)

Dermofarmacia (3,9 créditos)

Mundo infantil (3,08 créditos)

Salud y bienestar (5,87 créditos)

Iniciación a la Formulación Magistral RD 175/2001. (3 créditos). Real e Ilustre Colegio Oficial de farmacéuticos de Sevilla (2016)

4. Otros conocimientos

4.1. Idiomas

Español	Lengua materna
Inglés	B1
Francés	A2

4.2. Áreas de conocimiento.

Áreas: Nutrición, metabolismo, inflamación, neuroinflamación, alimentos funcionales, aceite, hidrolizados proteicos, plantas medicinales.

Biología Molecular y Celular: RT-qPCR, ELISA, Cultivos celulares, Histología, Citometría de flujo.

Modelos animales: Obesidad

Programas estadísticos: Graphpad, SPSS, Statgraphics

5. Experiencia profesional y académica

5.1. Experiencia profesional

Farmacéutica Adjunta

Oficina de Farmacia
Sevilla, España
Enero 2014 – en la actualidad

Investigador predoctoral autorizado

Departamento Alimentación y Salud
Instituto de la Grasa (CSIC)

5.2. Actividad Docente

Bioquímica y Biología molecular Básica (LAB)

Grado en Medicina, Universidad de Sevilla.
15 horas (curso 2018-2019)

Bioquímica y Biología Molecular Humana (LAB)

Grado en Medicina, Universidad de Sevilla.
5,20 Horas (curso 2018-2019)

Bioquímica y Biofísica (LAB) y (PINFOR)

Grado en Podología, Universidad de Sevilla.
11 horas (curso 2018-2019)

6. Actividad científica

6.1. Publicaciones

Capítulos de libro

1. Montserrat-de la Paz S, **Toscano R**, Yust MM, Pedroche J, Millan F, Millan-Linares MC. "Dietary lipids linking postprandial metabolism and metabolic syndrome" (Chapter 1) In: Metabolic Syndrome. Open Access eBooks. **2018**. ISBN: 978-93-87500-34-1
<http://openaccessebooks.com/metabolic-syndrome.html>

Artículos en revistas indexadas

1. Rodriguez-Martin NM, **Toscano R**, Villanueva A, Pedroche J, Millan F, Montserrat-de la Paz S, Millan-Linares MC. “Neuroprotective protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds” Food & Function. **2019**, 10(10):6732-6739. DOI: 10.1039/c9fo01904a
2. Millan-Linares MC, Martin ME, Rodriguez NM, **Toscano R**, Claro C, Bermudez B, Pedroche J, Millan F, Montserrat-de la Paz S. “Nutraceutical extract from dulse (*Palmaria palmata* L.) inhibits primary human neutrophil activation” Marine Drugs. **2019**, 17: 610. DOI:10.3390/md17110610
3. **Toscano R**, Millan-Linares MC, Lemus-Conejo A, Claro C, Sanchez-Margalet V, Montserrat-de la Paz S. “Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote M1/M2 microglia polarization in a fatty acid-dependent manner”. The Journal of Nutritional Biochemistry. **2019**
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.108248
4. Mahanna M, Millan-Linares MC, Grao-Cruces E, Claro C, **Toscano R**, Rodriguez-Martin NM, Naranjo MC, Montserrat-de la Paz S. “Resveratrol-enriched grape seed oil (*Vitis vinifera* L.) protects from white fat dysfunction in obese mice” Journal of Functional Foods. **2019**, 62: 103546.
5. **Toscano R**, Millan-Linares MC, Naranjo MC, Lemus-Conejo A, Claro C, Montserrat-de la Paz S. “Unsaponifiable and phenolic fractions from virgin olive oil prevent neuroinflammation skewing microglia polarization toward M2 phenotype”, Journal of Functional Foods **2019**, 62: 103543.
6. Millan-Linares MC, **Toscano R**, Lemus-Conejo A, Yust MM, Pedroche J, Millan F, Montserrat-de la Paz S. “GPETAFLR, a biopeptide from *Lupinus angustifolius* L., protects against oxidative and inflammatory damage in retinal-pigmented epithelium cells” Journal of Food Biochemistry. **2019**, 00:e12995.
7. Martin M, Millan-Linares MC, Naranjo MC, **Toscano R**, Abia R, Muriana JGF, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S. “Minor compounds from virgin olive oil attenuate LPS-induced inflammation via visfatin-related gene modulation on primary human monocytes”. Journal of Food Biochemistry. **2019**, 43:e12941.

8. Montserrat-de la Paz S, Lemus-Conejo A, **Toscano R**, Yust MM, Pedroche J, Millan F, Millan-Linares MC. "GPETAFLR, an octapeptide isolated from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate, promotes the skewing to M2 phenotype in human primary monocytes" *Food & Function*. **2019**, 10:3303-3311.

6.3. Aportaciones a Congresos

1. "Neuroprotective Effects of Gly-Pro-Glu-Thr-Ala-Phe-Leu-Arg, a Peptide Isolate from *Lupinus angustifolius* L. Portein Hydrolysate". IRC International Research Conference. Paris, Francia **2019** (Presentación Oral)

2. "Evaluation of wheat gluten protein hydrolysates on inflammation and oxidative stress in primary human monocytes" 39TH Spanish Society of Pharmacology Meeting. Las Palmas de Gran Canarias, España **2019** (Póster)

3. "Minor compounds from virgin olive oil promote m2 microglia polarization and neuroprotection". 39TH Spanish Society of Pharmacology Meeting. Las Palmas de Gran Canarias, España **2019** (Póster)

4. "Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) peptide ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis in mice". 39TH Spanish Society of Pharmacology Meeting. Las Palmas de Gran Canarias, España **2019** (Póster)

5. "Characterization and evaluation of HEMP protein hydrolysates on neuroprotection". 39TH Spanish Society of Pharmacology Meeting. Las Palmas de Gran Canarias, España **2019** (Comunicación Oral)

6. "Unsaponifiable and phenolic fractions from virgin olive oil prevent neuroinflammation skewing microglia polarization toward M2 phenotype". XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Málaga, España. **2019** (Comunicación oral)

7. "Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) peptide prevents non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice". XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Málaga, España. **2019** (Comunicación oral)

8. "Anti-neuroinflammatory properties of HEMP (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates". XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Málaga, España. **2019** (Comunicación oral)

9. "Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of wheat protein hydrolysates in human primary monocytes". XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Málaga, España. **2019** (Comunicación oral)
10. "Neuroprotective effect of phenolic compounds from ultrasound-treated apples". III Jornadas Internacionales en Investigación e Innovación en Ciencias de la Salud "Resultados en salud, impacto y políticas". Sevilla, España. **2019** (Póster)
11. "Neuroprotective properties of HEMP protein hydrolysates". III Jornadas Internacionales en Investigación e Innovación en Ciencias de la Salud "Resultados en salud, impacto y políticas". Sevilla, España. **2019** (Póster)
12. "GPETAFLR, a peptide from protein hydrolysate of *Lupinus angustifolius* L. has neuroprotective effects in BV-2 microglial cells and mouse brain tissue". III Jornadas Internacionales en Investigación e Innovación en Ciencias de la Salud "Resultados en salud, impacto y políticas". Sevilla, España. **2019** (Póster)
13. "Postprandial dietary fatty acids regulate microglia M1/M2 polarization. Implications in neuroinflammation". 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). Kyoto, Japón **2018** (Póster).
14. "Neuroprotective effect of oleic acid on microglia polarization". X Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Granada, España. **2018** (Comunicación Oral)
15. "Olive oil preserves intestinal barrier function and intraepithelial lymphocytes in high-fat diet-induced obese mice". XXXVIII Meeting Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela, España. **2018** (Póster)
16. "Postprandial and long-term effects of dietary fatty acids on microglia M1/M2 polarization". XXXVIII Meeting Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela, España. **2018** (Póster)

7. Premios

Premio a la mejor comunicación, Primer accésit. *“Neuroprotective properties of HEMP protein hydrolysates”*. III Jornadas Internacionales en Investigación e Innovación en Ciencias de la Salud “Resultados en salud, impacto y políticas”. Sevilla, España. **2019** (Póster)

