



## Antocianos: su potencial en la prevención de enfermedades neurodegenerativas

FIGURA 1. Mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). Foto: B. Vanaclocha.

Ana López  
M<sup>a</sup> Emilia Carretero  
Teresa Ortega

---

Departamento de Farmacología  
Universidad Complutense de Madrid

Dirección de contacto:

Teresa Ortega

Departamento de Farmacología  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid  
Plaza de Ramón y Cajal s/n  
28040-Madrid  
email: tortega@ucm.es

### Resumen

Los antocianos son compuestos polifenólicos, de origen vegetal, ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en plantas medicinales como en alimentos, responsables de los colores rojizos, azulados y violáceos de diferentes frutos, hojas, raíces o bulbos.

Numerosos estudios científicos han constatado sus propiedades saludables, principalmente relacionadas con sus actividades antiinflamatorias y antioxidantes. En base a ello han sido propuestos como candidatos para la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En este artículo se revisan los últimos conocimientos científicos publicados sobre sus efectos beneficiosos sobre las funciones del SNC. Es interesante señalar que dichos estudios parecen confirmar, tanto en animales como en el hombre, su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, cuestionada hasta hace poco.

### Palabras clave

Antocianos, antocianósidos, antocianinas, enfermedades neurodegenerativas, farmacocinética.

## Antocianinas: potencialidades para a prevenção de doenças neurodegenerativas

### Resumo

As antocianinas são compostos polifenólicos de origem vegetal, amplamente distribuídas na natureza, tanto em plantas medicinais como em alimentos, responsáveis pelas cores vermelha, azul e violácea de diversos frutos, folhas, raízes ou bulbos.

Numerosos estudos científicos evidenciaram as suas propriedades benéficas para a saúde, principalmente relacionadas com as suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Nesta base, foram propostos como candidatos para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Neste artigo fez-se a revisão dos mais recentes conhecimentos científicos publicados sobre os efeitos benéficos sobre as funções do SNC. É interessante assinalar que estes estudos parecem confirmar, tanto em animais como no homem, a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, questionada até recentemente.

### Palavras-chave

Antocianinas, antocianósidos, doenças neurodegenerativas, farmacocinética.

## Anthocyanins: potential for the prevention of neurodegenerative diseases

### Abstract

Anthocyanins are polyphenolic compounds widely distributed in nature, found both in food and in medicinal plants. They are responsible for the red-blue colors of different fruits, leaves, roots or bulbs.

Many scientific studies have confirmed its healthy properties, mainly related to their anti-inflammatory and antioxidant activities. For these reasons, they could be proposed as agents for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

In the present paper, the latest scientific knowledge on the effects of these compounds on central nervous system functions has been reviewed. Despite what was thought until recently, several studies, both in animal and in humans, seem to confirm their ability to pass the blood-brain barrier.

### Keywords

Anthocyanins, anthocyanosides, neurodegenerative diseases, pharmacokinetics

## Introducción

El aumento de la esperanza de vida en la población nos hace pensar que, en unos años, se producirá una expansión de la población envejecida y por tanto, se incrementará la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Parkinson y la de Alzheimer. Aunque todavía no se conocen exactamente las causas de estas enfermedades, se postula que el declive neuronal asociado a las enfermedades neurodegenerativas podría estar desencadenado por múltiples factores, como la neuroinflamación, excitotoxicidad glutamínérgica, aumento en la concentración de hierro y/o depleción de los antioxidantes endógenos<sup>(1)</sup>. Así pues, parece de sumo interés la búsqueda de remedios capaces de revertir algunos de los factores citados.

Los antocianos son compuestos fenólicos de origen vegetal biosintetizados a través del metabolismo del ácido síquico. Su estructura es consecuencia de la elongación del fenilpropano con tres unidades de acetilCoA, estructura común de todos los compuestos flavonoidicos. En las plantas se encuentran en forma de heterósidos (antocianósidos o an-

tocianinas). Al ser sus geninas (antocianidinas) derivadas del catión 2-fenilbenzopirilio (ión flavilio), algunos autores les otorgan categoría propia, fuera del grupo de los flavonoides.

Como consecuencia de su carácter polifenólico y de sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, los antocianos podrían proponerse como candidatos potenciales para la prevención y tratamiento de la neurodegeneración. Sin embargo, aunque existen estudios científicos *in vitro* que evidencian sus efectos neuroprotectores sobre células y tejidos<sup>(2, 3)</sup>, hasta hace relativamente poco tiempo no se había evidenciado su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, así como su cinética de distribución en los tejidos cerebrales, por lo que se cuestionaba su eficacia en la prevención de los procesos del envejecimiento cerebral<sup>(4)</sup>.

En este artículo se revisarán los últimos conocimientos científicos publicados sobre los efectos de estos compuestos, ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en plantas medicinales como en alimentos, sobre las funciones del SNC. Se incluirán preferentemente los es-

tudios en los que se utilizan antocianinas o antocianidinas aisladas, pues aunque existen numerosas investigaciones realizadas con diferentes extractos o zumos de plantas, presumiblemente ricos en estos compuestos, no es posible atribuirles una acción farmacológica concreta al ser mezclas complejas, por lo general muy ricas en otros compuestos con actividades similares.

### Características químicas de los antocianos

Los antocianos son pigmentos que se encuentran en diferentes concentraciones en casi todas las angiospermas, excepto en algunas familias del orden Caryophyllales. Son sustancias coloreadas que proporcionan coloración roja, azul, malva, rosa, púrpura o violeta a la mayor parte de frutos y flores. También pueden encontrarse ocasionalmente en brácteas (Bromeliáceas), hojas (*Coleus* spp.), peciolo (rapóntico), raíces (rábanos) o bulbos (cebolla roja). Sus funciones fisiológicas en los vegetales podrían estar relacionadas con un mecanismo de defensa para protegerse de la luz ultravioleta (hojas) o con la atracción de insectos polinizadores en el caso de las flores.

Son inestables en medio neutro y alcalino, en presencia de oxígeno, a temperaturas elevadas y tras su exposición a luz UV. En forma de heterósidos son solubles en agua y en alcoholes, no así la mayoría de sus geninas. En disolución, se encuentran en equilibrio cuatro formas: catión flavilio, base quinoidal, base hemiacetal y chalcona. La cantidad de cada una de estas formas en equilibrio depende del pH y de la estructura de la antocianidina. En la naturaleza, las antocianidinas a pH <2 se presentan en forma de catión flavilio, característica única de estos compuestos que determina su absorción, metabolismo, biodisponibilidad y por tanto su acción biológica.

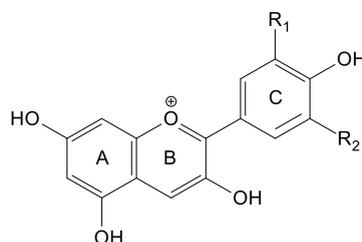
Las antocianidinas, por lo general, establecen una unión heterosídica mediante el hidroxilo dispuesto sobre el C-3 del anillo C (FIGURA 2). No obstante, en casos especiales, dicha unión se realiza sobre los hidroxilos situados en C-5 o C-7 del anillo A. También se han observado glicosidaciones en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B. Los azúcares mas frecuentes son glucosa, ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa, en forma de mono u oligosacáridos, principalmente di- y trisacáridos. Estos azúcares pueden estar también acilados con un gran rango de ácidos aromáticos o alifáticos, aunque lo mas frecuente es la acilación por ácidos cinámicos. La gran variabilidad de sustituyentes puede dar lugar a más de 600 antocianinas naturales diferentes cuyos pesos moleculares pueden variar entre 400 y 1.200 (6).

Las antocianidinas más abundantes en la naturaleza son cianidina, pelargonidina, malvidina, delfinidina, peonidina y petunidina (FIGURA 2). Se ha comprobado que la coloración depende del tipo de sustituyentes incluidos en el anillo B. El color es más intenso a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo libres, disminuyendo cuando éstos se encuentran metilados (6).

Estos compuestos fenólicos son susceptibles de oxidarse dando lugar a un radical fenoxi, estabilizado por la posibilidad de resonancia, lo que le confiere propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres, así como de protección a los tejidos frente a la peroxidación lipídica (6).

### Actividades farmacológicas

Son numerosas las actividades farmacológicas atribuidas a los antocianos, sin embargo, hasta finales del siglo XX, sus principales indicaciones terapéuticas se limitaban al tratamiento de síntomas ligados a la fragilidad capilar-venosa, ya que disminuyen la permeabilidad de los capilares y aumentan su resistencia. También, algunos extractos con alto contenido en antocianos, se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades beneficiosas en el mantenimiento de la visión (7).



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cianidina	OH	H
Pelargonidina	H	H
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OH	OCH <sub>3</sub>

FIGURA 2. Estructura de las principales antocianidinas.

Actualmente en España, los antocianos aislados no se incluyen en ningún tipo de medicamento. Lo que sí se emplean son plantas medicinales y extractos obtenidos de ellas que tienen en su composición estos compuestos. Es el caso por ejemplo del arándano (*Vaccinium myrtillus* L.), cuyos frutos maduros y frescos, que según la Real Farmacopea Española deben contener como mínimo un 0, 3% de antocianinas expresadas en cianidina-3-glucósido, se utilizan para la obtención de extractos ricos en antocianósidos indicados en insuficiencia venosa, hemorroides, varices, flebitis y fragilidad capilar. También con un contenido abundante de antocianósidos se encuentran los brotes y frutos de grosellero negro (*Ribes nigrum* L.), indicados en problemas asociados con la insuficiencia venosa<sup>(6)</sup>. Tanto a los frutos de *Vaccinium myrtillus* L. como a los de *Ribes nigrum* L. se les atribuyen tradicionalmente efectos beneficiosos para el tratamiento de alteraciones oculares como retinitis pigmentaria, retinopatías sean o no de origen diabético, miopía y glaucoma. Tras la realización de diferentes estudios experimentales y ensayos clínicos en humanos, se podría decir que los antocianósidos de ambas especies reducen la fatiga ocular, mejoran la adaptación a la oscuridad y la visión nocturna, restauran la agudeza visual tras la exposición a luz intensa y mejoran el flujo sanguíneo en la retina en casos de glaucoma<sup>(6, 9, 10)</sup>.

En la actualidad, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) solo ha aprobado el uso tradicional de la hoja de grosellero negro (*Ribes nigrum*), ricas en flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, para el tratamiento de dolores articulares leves y para favorecer el flujo urinario en alteraciones urinarias también leves<sup>(11)</sup>. Por el contrario, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)<sup>(12)</sup> no ha admitido la alegación de salud relacionada con la mejora de la adaptación visual a la oscuridad para los antocianinas de *Ribes nigrum* (delfinidina-3-rutinósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido), debido a una insuficiente constatación científica de sus efectos en el hombre.

Además del grosellero negro, la EMA<sup>(13)</sup> ha aprobado el uso bien establecido del extracto seco de la hoja de vid (*Vitis vinifera* L.) por vía oral, para el tratamiento de la insuficiencia venosa caracterizada por la presencia de venas varicosas, dolor, cansancio, picor, hinchazón, sensación de pesadez y tensión y calambres en las pantorrillas. También ha aprobado el uso tradicional por vía oral o en aplicación tópica para aliviar los síntomas relacionados con alteraciones menores de la circulación venosa, mejorar la sensación

de picor y quemazón debidas a hemorroides, y para mejorar la fragilidad capilar cutánea.

Según diferentes autores, una gran parte de las actividades farmacológicas descritas hasta el momento para los antocianósidos podrían estar relacionadas con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias<sup>(14-16)</sup>.

### Actividad neuroprotectora

Como ya se ha comentado, la neurodegeneración parece estar provocada por eventos multifactoriales que incluyen, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neuroinflamación, los incrementos en hierro y/o el agotamiento de antioxidantes endógenos. Un estado de estrés oxidativo causa en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis<sup>(1)</sup>. Estos eventos hacen totalmente vulnerable al sistema nervioso central (SNC) y conllevan un inevitable deterioro funcional.

Todos los tejidos del organismo sufren daño oxidativo, pero el cerebro es especialmente sensible a este daño debido a una serie de circunstancias:

- Su alto consumo de oxígeno (elevado consumo de ATP por las neuronas).
- Gran consumo de glutamato como neurotransmisor. Cuando el neurotransmisor glutamato se encuentra en alta concentración en el cerebro, puede provocar la muerte celular por excitotoxicidad. Este proceso está mediado por receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que son capaces de permitir un aumento en la afluencia de iones calcio, dando lugar a un proceso neurodegenerativo en las neuronas con hiperactivación de la fosfolipasa  $A_2$ , de la actividad de la calpaína y de la actividad óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Como consecuencia de todo ello, se produce un incremento en la liberación de óxido nítrico (NO), peroxidación de ácidos grasos y un aumento de la proteólisis.
- Además, este aumento del glutamato y la activación de receptores NMDA implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediada por NADPH-oxidasa<sup>(17)</sup>. Los ROS liberados actúan sobre diferentes proteíncinas activadas por mitógenos (MAPKs), favoreciendo la apoptosis e induciendo inflamación<sup>(18)</sup>.
- Muchos de los neurotransmisores son moléculas autooxidables.

- Las defensas antioxidantes en el cerebro son más bien modestas.
- El hierro almacenado en diferentes áreas cerebrales, aunque en concentración elevada, se encuentra en forma de ferritina lo cual limita su capacidad para catalizar el daño oxidativo.
- Las membranas cerebrales contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que son moléculas extremadamente sensibles a la oxidación. Su peroxidación inicia un deterioro acumulativo de sus funciones: disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y aumento de la permeabilidad de la membrana para diferentes iones, entre los que destaca el  $\text{Ca}^{2+}$ . Como ya se ha comentado, el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por periodos prolongados de tiempo activa proteasas, lipasas, endonucleasas y especialmente la nNOS, responsable de sintetizar el NO, molécula importante para el progreso del estrés oxidativo que causa degeneración neuronal.
- Algunas de las células que constituyen la microglía son células tipo macrófagos, capaces de producir  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en algunos casos NO. Cuando se activan tienen la capacidad además de segregar citocinas proinflamatorias.
- Finalmente los ROS reaccionan con intermediarios del ciclo del citocromo P450 de ciertas regiones cerebrales, generando peróxido de hidrógeno y anión superóxido<sup>(19)</sup>.

Por tanto, los procesos inflamatorios también desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que la activación de las células gliales (astrocitos y microglía) conduce a la liberación prolongada de citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y prostaglandinas), que pueden contribuir a la activación progresiva de la apoptosis y provocar la muerte de las neuronas. Su liberación desencadena una cascada de eventos moleculares en la propia glía y también en las neuronas, activando la respuesta inflamatoria así como los mecanismos para la producción de ROS.

Sin embargo, los mecanismos no son sencillos, ya que por ejemplo la IL-1 $\beta$ , agente proinflamatorio que induce la expresión de iNOS y la producción de NO mediada por la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y por el factor nuclear *kappa*-B (NF- $\kappa$ B), puede tanto contribuir como limitar la neurotoxicidad<sup>(1)</sup>. Hay que tener en cuenta que el NF- $\kappa$ B responde a la señalización de la

proteína p-38 y por tanto a la inducción del iNOS, lo cual sugiere que existe una interacción entre vías de señalización, factores de transcripción y producción de citocinas en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central<sup>(20)</sup>.

Estudios realizados en cultivos celulares de astrocitos y microglía estimulados por lipopolisacáridos (LPS), indican que algunos polifenoles como quercetina, catequina y galato de epigallocatequina (EGCG) son capaces de bloquear la respuesta inflamatoria al inhibir la iNOS y la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), inhibiendo la producción de NO, la liberación de citocinas proinflamatorias y la generación de ROS. Parece ser que los flavonoides podrían manifestar estos efectos a través de la modulación directa de las vías de señalización de las cinasas dependientes de proteínas y de lípidos. Así por ejemplo, se ha comprobado que inhiben las cascadas de señalización de las MAPKs como la proteína p38 y las ERK 1 y 2, las cuales regulan, en células gliales estimuladas, la expresión de iNOS y de TNF $\alpha$ <sup>(21)</sup>.

También se han realizado algunos estudios sobre los efectos neuroprotectores de los antocianos tanto *in vivo* como *in vitro*, no obstante, como ya se ha comentado, en la mayoría de las investigaciones, se han empleado extractos de composición química compleja, siendo muy escasos los trabajos en los que se utilizan antocianos aislados. En cuanto a los efectos inducidos en el hombre, solamente se han publicado algunos trabajos de investigación clínica en los que se han empleado extractos de frutos, zumos o plantas medicinales ricos en estos compuestos.

Se comentan a continuación los más relevantes.

Ensayos *in vitro*:

En un estudio realizado con células de neuroblastoma humano se ha evaluado el efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno de una mezcla de antocianinas aisladas y purificadas de la testa de semillas de soja (*Glycine max* (L.) Merr., cv Cheongja)<sup>(22)</sup>. Se evaluó además el posible efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo de los ácidos siálicos libres celulares liberados por glicoproteínas o gangliósidos, así como la posible relación entre los efectos de éstos y las antocianinas. Los resultados demostraron que la mezcla de antocianinas (delfinidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido y petunidina 3-O-glucósido) es capaz de disminuir el daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno de una forma concentración dependiente, así como disminuir la generación intracelular de radicales libres. Para identificar su

mecanismo de acción antioxidante, se midieron los niveles de expresión de las cinasas ASK1-JNK y p38 que, como ya se ha comentado, participan en la vía de señalización de las MAPKs y regulan la muerte celular por apoptosis. Las antocianinas fueron capaces de inhibir la fosforilación inducida por peróxido de hidrógeno de las diferentes MAPKs, impidiendo la muerte celular por apoptosis. Se comprobó además que estimulaban la expresión de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO1) y la posibilidad de reclutar ácidos siálicos libres en las células neuronales por activación de la Neu-1 sialidasa.

También se ha estudiado la actividad neuroprotectora de varios extractos de frutos consumidos en alimentación (naranja, plátano y fresas), sobre cultivos de células neuronales PC<sub>12</sub>. Se comprobó que los extractos que contenían una mayor concentración de fenoles totales y antocianinas, principalmente cianidina-3-glucósido, correspondientes a las fresas, presentaban una mayor eficacia antioxidante e inhibidora de la apoptosis celular inducida por estrés oxidativo<sup>(23)</sup>.

En otro estudio realizado sobre células BV<sub>2</sub> de microglía de ratón, se observó que las antocianinas aisladas de la testa de semillas de soja negra (*Glycine max* (L.) Merr.), eran capaces de inhibir significativamente la inflamación inducida por LPS, mediante la disminución de la sobreexpresión de iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Además, se evidenció su capacidad para inhibir la translocación nuclear del NF $\kappa$ B, a través de la disminución de la degradación del inhibidor del NF $\kappa$ B, así como la fosforilación extracelular de cinasas<sup>(24)</sup>.

Recientemente, en un estudio realizado en un modelo de Parkinson con cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas de rata, se observó que extractos ricos en antocianinas y proantocianidinas ejercían un mayor efecto neuroprotector, frente a la toxicidad inducida por rotenona, que extractos con mayor concentración en otros tipos de polifenoles. Se emplearon en el estudio extractos enriquecidos en antocianinas, proantocianidinas y ácidos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* L., *Morus alba* L., *Ocimum basilicum* L., *Prunus domestica* L., *Ribes nigrum* L., *Vaccinium corymbosum* L. y *Vitis vinifera* L. Los extractos de *Vaccinium corymbosum* L. y *Vitis vinifera* L. produjeron una mejoría en la disfunción mitocondrial, vía cadena de transporte electrónico. También se observó que el extracto de *Vaccinium corymbosum* L., con antocianidinas y proantocianidinas, era capaz de evitar el proceso neuroinflamatorio asociado a la activación microglial en la línea celular BV<sub>2</sub> de microglía de ratón<sup>(25)</sup>.

### Ensayos experimentales *in vivo*

En estudios realizados en ratones se ha observado que el consumo de arándanos, ricos en antocianos, tiene un efecto positivo sobre la memoria tanto a corto como a largo plazo, después de ocho semanas de administración. También parece ser eficaz para revertir el déficit en la funcionalidad motora relacionada con el envejecimiento y la memoria espacial<sup>(26)</sup>. Estos beneficios sobre la memoria podrían estar más relacionados con un incremento en la fosforilación de las cinasas extracelulares reguladas por señales ERK-1 y 2, que con una interacción con calcio-calmodulina-cinasas (CaMKII y CaMKIV) o con proteincinasa A (FIGURA 3)<sup>(27)</sup>.

También se ha evaluado la capacidad de las antocianinas para modular la actividad y expresión de enzimas antioxidantes en animales. En un estudio realizado con 32 ratas Wistar macho, alimentadas con antocianinas obtenidas de un extracto de mora (*Rubus fruticosus* L.), se determinaron las actividades glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, los niveles de glutatión y la peroxidación lipídica en tejido cerebral. Se observó que, en comparación con el grupo control, la peroxidación lipídica en tejido cerebral disminuía en un 34% y los niveles de glutatión se incrementaban significativamente (1,6 veces más) en el grupo de ratas tratado con el extracto de antocianinas. En cuanto a la actividad sobre los sistemas enzimáticos antioxidantes, se observó un ligero incremento en la actividad superóxido dismutasa total y un incremento de la actividad glutatión peroxidasa. Por el contrario, la actividad catalasa no se vio afectada<sup>(28)</sup>.

En otro estudio realizado con 6 ratones de 7 días de vida a los que se indujo un cuadro neurotóxico con etanol, la administración intraperitoneal de cianidina-3-glucósido purificada (99%) mejoró significativamente el cuadro tóxico. Esto parece ser consecuencia de un efecto inhibidor de la activación de la caspasa-3 mediada por etanol, del cuadro neurodegenerativo provocado por este agente tóxico y de la activación microglial en el cortex cerebral de los animales tratados. En este estudio se comprobó que la cianidina-3-glucósido es capaz de inhibir la actividad de la glucógeno sintasacinasasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), mediador potencial de la neurotoxicidad inducida por etanol, mediante un mecanismo que implica un incremento en la fosforilación de un residuo de serina 9 y una disminución en la fosforilación de tirosina 216. Se observó además que disminuye la liberación del malondialdehído originado como consecuencia de la peroxidación lipídica inducida por etanol<sup>(29)</sup>.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la administración de etanol induce un incremento drástico en la expresión de la proteína p47-phox, que actúa como reguladora de la actividad de uno de los enzimas que participan la liberación de ROS en el cerebro, la NADPH oxidasa (FIGURA 3), la disminución en la expresión de p47-phox, observada tras la administración de cianidina-3-glucósido, podría ser uno de los mecanismos implicados en la protección de las antocianidinas en el daño cerebral oxidativo inducido por este agente neurotóxico<sup>(29)</sup>.

En diferentes estudios realizados en ratones viejos, se ha observado que el consumo de frutos de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) que contienen antocianósidos, entre otros compuestos fenólicos, disminuye la progresión de enfermedades neurodegenerativas así como la pérdida de la funcionalidad de los tejidos neuronales, modulando además las respuestas inflamatorias<sup>(30)</sup>.

**Ensayos clínicos**

En cuanto a los ensayos realizados en el hombre, los resultados no son del todo concluyentes. En un estudio doble

ciego, controlado con placebo, con voluntarios sanos mayores de 50 años alimentados con zumo de arándano rojo durante seis semanas, se observó que no había una correlación entre el consumo de dicho zumo y una mejoría en la función neuropsicológica. Sin embargo, sí que se observó una mejoría de las funciones memorísticas<sup>(30)</sup>.

En otro ensayo clínico aleatorizado, cruzado, realizado con 12 sujetos sanos no fumadores, se observó que la administración de diferentes zumos ricos en antocianidinas no induce ningún cambio a nivel del sistema de defensa antioxidante en plasma, si bien la muestra no se considera suficientemente representativa<sup>(31)</sup>.

Los ensayos clínicos mas relevantes relacionados con las propiedades neuroprotectoras de las antocianidinas, realizados en los últimos 12 años, quedan reflejados en la TABLA 1.

Existen otros ensayos clínicos en los que se analizan los beneficios de las antocianinas para otras enfermedades (cardiovasculares, cáncer, hiperlipidemia) o se evalúan sus procesos de absorción y metabolización en el hombre<sup>(29, 32, 33)</sup>.

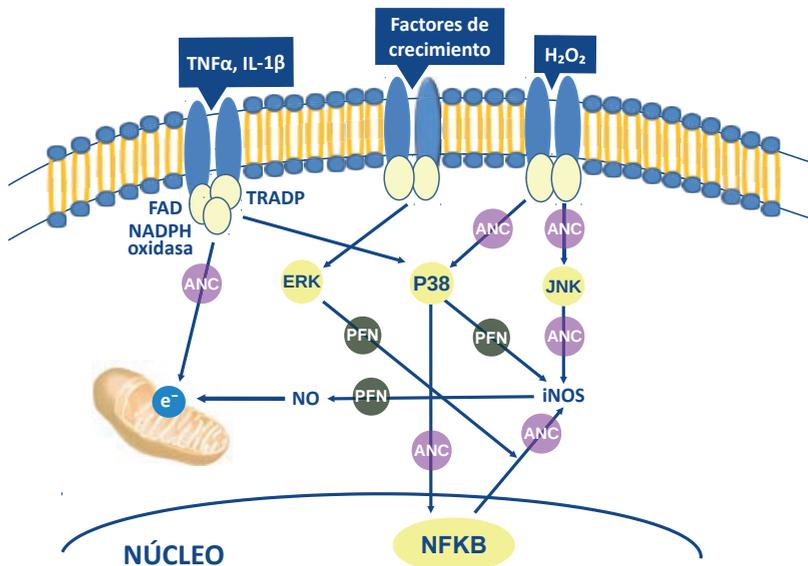


FIGURA 3. Mecanismos de acción implicados en los efectos de las antocianinas sobre la neurodegeneración provocada por estrés oxidativo-inflamación. En un estado de estrés o daño celular, las células gliales se activan liberando al medio citocinas proinflamatorias (ILβ, TNFα), especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y factores de crecimiento, que actúan sobre las neuronas dañándolas a largo plazo. ANC (antocianinas), PFN (polifenoles), e<sup>-</sup> (cadena de electrones mitocondrial), P38, JNK, ERK (MAPK, proteincinasas).

Autor (referencia)	Nº pacientes (edad)	Tipo estudio (duración)	Preparado	Resultados
Engelhart <i>et al.</i> <sup>(34)</sup>	5395 adultos (> 55 años)	Poblacional de cohortes (6 años)	Dieta rica en antioxidantes (espinacas, arándano rojo, etc.)	Disminución de la incidencia de enfermedad de Alzheimer
Pappas <i>et al.</i> <sup>(30)</sup>	Adultos (>50 años)	Doble ciego, controlado con placebo (2 semanas)	Zumo de arándano rojo	Mejoría en funciones memorísticas
Krikorian <i>et al.</i> <sup>(35)</sup>	16 ancianos (76, 2 ± 5, 2)	Controlado con placebo (12 semanas)	Zumo de arándano	Mejoría en la memoria
Gao <i>et al.</i> <sup>(36)</sup>	367 mujeres (30-45 años) 438 hombres (40-75 años)	Poblacional de cohortes (6 años, mujeres; 4 años, hombres)	Dieta rica en subclases de flavonoides (antocianinas)	Disminuye el riesgo de Parkinson en hombres, pero no en mujeres
Ellinger <i>et al.</i> <sup>(31)</sup>	Adultos (18-50 años, no fumadores)	Ensayo cruzado aleatorizado y controlado	400 mL zumo (44% azai; 12% camu-camu; 44% mora)	Estabiliza el balance pro/antioxidante

TABLA 1. Ensayos clínicos publicados sobre la eficacia de los antocianos sobre afecciones del SNC. Azai: frutos de *Euterpe oleracea* (Arecáceas), camu-camu: frutos de *Myrciaria dubia* (Mirtáceas).

### Otras actividades

Son numerosos los estudios dedicados a la comprobación de la actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos, actividad que parece estar relacionada, como ya se ha comentado, con las propiedades neuroprotectoras, anticancerosas y antiinflamatorias evidenciadas para estos compuestos <sup>(37, 38)</sup>.

A nivel cardiovascular, parece confirmado que el consumo de frutos ricos en antocianidinas disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular asociada a la edad <sup>(6)</sup>. Este efecto cardioprotector está relacionado posiblemente, entre otros factores, con una actividad protectora del daño endotelial inducido por TNF- $\alpha$  e implicado en el proceso inflamatorio aterosclerótico <sup>(39)</sup>. En estudios realizados con células endoteliales vasculares de aorta bovina y arteria hepática de rata, se observó que la cianidina es capaz de bloquear la acción del TNF- $\alpha$  y por tanto la apoptosis celular en estas células, a través de diferentes mecanismos como la activación de proteínasas (Akt) y la expresión de enzimas [óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y tioredoxina] <sup>(40)</sup>.

La delfinidina, como ocurre con otros compuestos fenólicos, también es capaz de inhibir la apoptosis de células endoteliales mediante el incremento de la expresión de eNOS a través de la activación de la proteínasas activada por mitógeno 1 y 2 (MEK 1/2) y además, prevenir el

proceso inflamatorio mediante la inhibición de mediadores de la inflamación <sup>(41)</sup>. Esta antocianidina inhibe además la agregación plaquetaria <sup>(9)</sup>.

Por otra parte, diferentes estudios científicos han puesto de manifiesto que las antocianinas tienen actividad anti-diabética por su capacidad protectora de las células  $\beta$  pancreáticas <sup>(42)</sup>, normalizadora de niveles de glucosa plasmática e incrementadora de la sensibilidad de la insulina en los tejidos periféricos, evitando una gluconeogénesis excesiva <sup>(6)</sup>.

En cuanto a la obesidad, se ha comprobado que las antocianinas inhiben la acumulación de grasa corporal, probablemente a través de un efecto inhibitorio de la síntesis lipídica en el hígado y en el tejido adiposo blanco <sup>(6, 22)</sup>.

### Estudios farmacocinéticos

Aunque la actividad antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora de los antocianos (antocianinas y antocianidinas) ha sido confirmada en diferentes tipos de células y tejidos, antes de poder recomendar su utilización para la salud humana, es importante comprobar si estas moléculas o sus metabolitos activos son absorbidos en el aparato digestivo y una vez absorbidos, si pueden acceder a los tejidos cerebrales traspasando la barrera hematoencefálica.

Hasta hace pocos años se pensaba que los antocianos, tanto en sus formas heterosídicas como en forma de geni-

nas, no se absorbían cuando eran ingeridos por medio de la dieta. Posteriormente y como ya se ha comentado en este artículo, se ha verificado dicha absorción tanto en animales como en el hombre. Las antocianinas son polifenoles que se absorben intactos, detectándose en plasma en la misma forma en la que aparecen en los vegetales (heterósidos), si bien la cantidad absorbida es relativamente baja<sup>(43)</sup>.

Efectivamente, estudios realizados en humanos con extractos y zumos de distintos tipos de bayas coloreadas ricas en antocianos han puesto de manifiesto que, tras su administración oral las formas heterosídicas, pueden detectarse en plasma, siendo posteriormente excretadas a través de la orina. Aunque esta absorción es rápida, el porcentaje de compuestos absorbido es bajo y depende del tipo de antocianina. En general, se ha observado que las antocianinas cuya genina es la cianidina se absorben más, siendo mayor la absorción cuanto mayor es la glicosidación de la genina<sup>(5)</sup>.

Las antocianinas glicosiladas se absorben rápidamente en el estómago, siendo posteriormente excretadas a través de la bilis de forma intacta o como metabolitos resultantes de sulfoconjugación y glucuronización. Por ejemplo, se ha comprobado que la cianidina-3-glucósido se metaboliza mediante metilación y conjugación con ácido glucurónico<sup>(44-46)</sup>.

En un estudio realizado en ratas anestesiadas, se observó que tras la administración por perfusión en el yeyuno e íleon de dos extractos de mora y arándano enriquecidos con cianidina-3-glucósido, un 19% de la cantidad perfundida se absorbía intacta, detectando posteriormente en orina una pequeña concentración de la misma así como de sus metabolitos<sup>(47)</sup>.

En el caso de la delfinidina-3-rutinósido, la administración por vía oral e intravenosa en ratas originó un incremento rápido en la concentración plasmática, hasta conseguir un máximo de absorción a los 30 minutos de su ingestión. A los 120 minutos se detectó en plasma la presencia de un metabolito metilado (4'-O-metil-delfinidina-3-rutinósido). Los parámetros farmacocinéticos estimados para esta antocianina fueron:  $T_{m\acute{a}x} = 26,3$  min y  $C_{m\acute{a}x} = 0,285 \pm 0,071$   $\mu$ mol, siendo la biodisponibilidad de la delfinidina-3-rutinósido de un 0,49% por vía oral y 18,14% por vía intravenosa. Este compuesto se excreta mayoritariamente por orina y su derivado metilado a través de la bilis. De los resultados de esta investigación se deduce que el 99,5% de la antocianina ingerida vía oral no se absorbe a nivel



FIGURA 4. *Hibiscus sabdariffa*. Foto: S. Cañigueral.

digestivo y se elimina en heces. No obstante, según indican los autores del trabajo, esta absorción puede verse modificada si la ingestión se realiza en ausencia de otros alimentos y si la motilidad intestinal es reducida<sup>(48)</sup>.

Parece pues que el aclaramiento de antocianidinas es rápido, de hecho, después de 6 horas, prácticamente no se detectan cantidades de estas moléculas en sangre. El porcentaje de excreción, aunque variable en función de la cantidad ingerida, parece ser inferior al 0,1%. No obstante, ese porcentaje también puede variar según la estructura química de la antocianina, generalmente en función del tipo de azúcar que lleve unido a la genina (glucosa, arabinosa, galactosa, rutinosa)<sup>(49)</sup>.

En un estudio reciente se ha confirmado que 6 horas después de la ingestión por vía oral de zumo de naranja sanguina rica en cianidina 3-glucósido, una pequeña parte de este compuesto se puede detectar en plasma y heces. Sin embargo, a las dos horas de la ingestión, lo que se encuentra en plasma son cantidades elevadas de un posible metabolito, el ácido protocatéuico (correspondiendo

aproximadamente a un 72% de la cantidad de cianidina 3-glucósido ingerida). Dicho metabolito procede probablemente de la desglucosidación en el intestino delgado de la antocianina (mediante  $\beta$ -glicosidas) y posterior transformación en el lumen intestinal o en sangre en el ácido fenólico. Parece descartado que el ácido protocatéquico detectado en plasma pueda ser derivado de la degradación microbiana intestinal de la antocianidina y su posterior absorción en el colon<sup>(30)</sup>. Apoyando esta teoría, Dreiseitel *et al.*,<sup>(50)</sup> confirman la absorción mayoritaria de antocianinas a nivel del intestino delgado, señalando como mayor zona de absorción el yeyuno.

En cuanto al mecanismo implicado en la absorción a nivel del tracto gastrointestinal, parece probable la intervención de uno o varios transportadores de mayor o menor especificidad, como son el gluco-transportador sodio dependiente SGLT1, que transporta glucósidos a través del intestino delgado<sup>(50, 51)</sup> o la proteína de alta afinidad bilitranslocasa, localizada en las células endoteliales de la mucosa gástrica<sup>(52)</sup>. En un estudio realizado por Talavera *et al.*<sup>(53)</sup> se ha confirmado que las antocianinas sin metabolizar se absorben en el estómago a través de la bilitranslocasa, mientras que a nivel del yeyuno se encuentran las formas metiladas y glucuronidadas, así como los glucósidos de éstas, aunque en menor concentración ya que a pH fisiológico son inestables. En estudios posteriores con ratas tratadas mediante perfusión intestinal con antocianinas de mora, se identificaron en plasma estas formas metiladas y glucuronidadas.

Estudios realizados en humanos, en los cuales se administró zumo de uva roja y vino tinto, se observó que la biodisponibilidad de las antocianinas era baja, por lo que los autores propusieron la búsqueda de otras fuentes de antocianinas que aumenten la biodisponibilidad de éstas<sup>(54)</sup>. No obstante Manach *et al.*<sup>(55)</sup> indican que en esa valoración se podrían haber ignorado las concentraciones de algunos metabolitos importantes, o que los métodos utilizados para dicho análisis no fueron suficientemente optimizados, teniendo en cuenta las diversas estructuras químicas que adoptan las antocianinas en equilibrio a diferentes pH. En la mayor parte de los estudios, los análisis se han realizado utilizando técnicas de espectrometría UV, ya que las antocianinas en medio ácido se transforman en cationes flavilio coloreados, sin embargo es posible que algunas estructuras existan a pH neutro y no se conviertan en catión flavilio, o que se establezcan combinaciones con componentes del plasma u orina<sup>(56)</sup>.

En relación a la accesibilidad de estos compuestos al SNC, estudios realizados con animales de experimentación (cerdo y rata) han confirmado la distribución inespecífica de polifenoles en diferentes regiones cerebrales, si bien las concentraciones detectadas se sitúan por debajo de 1 nmol/g de tejido. Ensayos efectuados *in vitro* mediante modelos de paso por barrera hematoencefálica, han demostrado que la permeabilidad de los polifenoles depende, como es lógico, del grado de lipofilia de los compuestos, de su interacción con los transportadores de difusión y de su estereoquímica<sup>(14)</sup>.

Los primeros ensayos *in vivo* se refieren a ratas alimentadas con extractos de frutos de arándano, observando que pasados 30 minutos de su administración oral ya se pueden identificar, tanto los antocianósidos como las formas metiladas (producto de su metabolismo hepático) en los cerebros de los animales tratados<sup>(53)</sup>. Por ejemplo, la concentración de la cianidina-3-glucósido en cerebro, principalmente distribuida en áreas relacionadas con la memoria y aprendizaje, superó incluso la concentración obtenida en plasma, lo cual indica una buena biodisponibilidad de estos compuestos a nivel del SNC. En varias regiones del cerebro, incluido el cerebelo, cortex, hipocampo y cuerpo estriado de ratas adultas alimentadas durante diez semanas con una dieta que contenía un 2% de arándanos, se identificaron, además de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-arabinósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido, malvidina-3-arabinósido, peonidina-3-arabinósido y delfinidina-3-galactósido.

Se ha comprobado además que las antocianinas de la uva alcanzan el cerebro solo unos minutos después de su absorción en el estómago<sup>(4, 5)</sup>.

En un estudio realizado con ratas macho anestesiadas a las que se administró vía intragástrica antocianinas aisladas de *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon), se detectaron cantidades significativas en el cerebro, diez minutos después de su administración, lo que no es lógico, ya que el cerebro es impermeable a más del 98% de moléculas polares pequeñas del flujo sanguíneo. La explicación dada por los autores a este hecho es que la anestesia administrada a las ratas podría haber alterado la barrera hematoencefálica, aunque existen evidencias de que la anestesia *per se* no altera la integridad de dicha barrera, a no ser que se añadan a la anestesia otros tratamientos como soluciones osmóticas, soluciones salinas hipo- o hipertérmicas o cambios en el pH del fluido cerebroespinal<sup>(57)</sup>.

Posteriormente, en un estudio realizado con cerdos macho de 32-41 días de vida, alimentados durante 8 semanas con una dieta suplementada con un extracto de *Vaccinium corymbosum* L. (2%), se identificaron en tejido cerebral diferentes antocianinas, las mayoritarias, malvidin-3-galactósido, peonidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido. El hecho de que las dos últimas no se encuentren en concentración elevada en el extracto administrado sugiere la existencia de procesos metabólicos antes de acceder al tejido cerebral o en el propio cerebro. En concreto petunidina-3-glucósido podría ser un producto de la metabolización (metilación) de delphinidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, de cianidina-3-glucósido. En tejido cerebral también se identificaron antocianinas conjugadas con ácido glucurónico, principalmente delphinidina y metabolitos originados por metilación de cianidina<sup>(58)</sup>.

En algunos estudios realizados en ratas para evaluar el efecto neuroprotector de los constituyentes de un extracto de moras, se observó que el paso de las antocianinas existentes en el extracto a través de la barrera hematoencefálica, se podría realizar a través de un transportador parecido a la bilitranslocasa<sup>(59)</sup>.

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica depende de los transportadores de difusión que se localizan en la superficie de las células endoteliales<sup>(3)</sup>. El transportador *ATP-binding cassette* (ABC) es una proteína transmembrana que pertenece a una superfamilia de transportadores de difusión, encargados de la translocación de varios sustratos a través de diferentes membranas biológicas, como por ejemplo la distribución y eliminación de drogas en el SNC, absorción intestinal y excreción hepatobiliar<sup>(55)</sup>. Entre ellos se encuentran la proteína MDR-1 (glicoproteína de resistencia a múltiples drogas) y la BCRP (proteína de resistencia al cáncer de mama), ambas ampliamente distribuidas en órganos importantes de absorción (intestino delgado) y de distribución (placenta y barrera hematoencefálica). En un trabajo realizado por Dreiseitel *et al.*<sup>(47)</sup> se demostró una afinidad de moderada a alta de las antocianinas (cianidina 3-5-diglucósido, cianidina 3-galactósido, cianidina 3-glucósido, cianidina 3-rutinósido, delphinidina 3-glucósido, malvidina 3-glucósido, malvidina 3-galactósido, malvidina 3, 5-diglucósido, pelargonidina 3, 5-diglucósido y peonidina 3-glucósido) y antocianidinas (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina y petunidina) por el transportador BCRP y en cambio una afinidad moderada a baja por el transportador MDR1.

## Conclusiones

Las antocianinas y antocianidinas son un grupo de compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas que presentan una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria a nivel de diferentes tipos de células y tejidos.

Estudios recientes sobre los procesos de absorción y metabolización revelan su capacidad para acceder al sistema nervioso central, tanto en forma intacta como transformadas en sus metabolitos. Por ello, ha de contemplarse su importante potencial en la prevención de aquellos procesos en los cuales el sistema de defensa antioxidante del organismo se ve comprometido o en los que intervienen los procesos inflamatorios, como son las enfermedades neurodegenerativas, si bien sería necesaria la realización de más ensayos clínicos para confirmar estos beneficios.

## Referencias bibliográficas

1. Von Bernhardt RM. La neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Boletín escuela de medicina. U. C. Pontificia Universidad Católica de Chile 2007, 32 (1): 143-154.
2. Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mechanisms of Ageing and Development* 2000, 116 (2-3): 141-153.
3. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology Medicine* 2004, 37 (11): 1683-1693.
4. Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience* 2005, 8 (12): 111-120.
5. Prior RL, Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research* 2006, 40 (10): 1014-1028.
6. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition Food Research* 2012, 59: 159-170.
7. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Edición. Ed. Acribia 2001; pp. 351-363.
8. CGCOF (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos). Catálogo de Plantas Medicinales, 2011; pp. 201-202.
9. Shim SH, Kim JM, Choi CY, Kim CY, Park KH. Ginkgo biloba extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *Journal of Medicinal Food* 2012, 15 (9): 818-823.

10. Vanaclocha B, Cañigueral S. (Eds). *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*, 4ª edición. Barcelona: Masson, 2003. URL: <http://www.fitoterapia.net/vademecum/vademecum.php>; Acceso (3/2/2014).
11. EMA-HMPC. Community herbal monograph on *Ribes nigrum* L., folium. London: EMA. Doc. Ref.: EMA/HMPC/142986/2009. Adopted: 6-5-2010. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_gb/document\\_library/herbal\\_-\\_community\\_herbal\\_monograph/2010/07/oc500094130.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/herbal_-_community_herbal_monograph/2010/07/oc500094130.pdf) [acceso 23-10-2014].
12. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to anthocyanins from *Ribes nigrum* L. and improvement of visual adaptation to the dark (ID 2750) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011; 9 (6): 2204. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/2204.pdf>. [acceso 23-10-2014].
13. EMA-HMPC. Community herbal monograph on *Vitis vinifera* L., folium. London: EMA. Doc. Ref.: EMA/HMPC/16635/2009. Adopted: 15-7-2010. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2011/01/WC500100391.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/01/WC500100391.pdf) [acceso 23-10-2014].
14. Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 9:14273. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/914273>.
15. Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, Williams CM. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology* 2012; 223 (3): 319-330.
16. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico* 2010, 34: 143-154. Disponible en: <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.
17. Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29 (8): 2545-52.
18. Da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CA, Barreiro EJ, Viegas CJ. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 2011, 10 (2): 251-270.
19. Halliwell B. Role of free radical in neurodegenerative diseases. Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging* 2001, 18 (9): 685-716.
20. Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277 (33): 29584-29592.
21. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutrition* 2008, 3 (3-4): 115-126.
22. Kim SM, Chung MJ, Ha TJ, Choi HN, Jang SJ, Kim SO, Chun MH, Do SI, Choo YK, Park YI. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via activation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Science* 2012, 90 (21-22): 874-882.
23. Heo HJ, Lee CY. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC 12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (6): 1984-1989.
24. Jeong JW, Lee WS, Shin SC, Kim GY, Choi BT, Choi YH. Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- $\kappa$ B and Akt/MAPKs signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14 (1): 1502-1515.
25. Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, Wu QL, Simon JE, Lila MA, Rochet JC. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Research* 2014 Feb 3. pii: S0006-8993 (14)00114-0. doi: 10.1016.
26. Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, Whiteman M, Spencer JP. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radical Biological Medicine* 2008, 45 (3): 295-305.
27. Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, Geracitano L, Bassols Raseira MC, Henriques AT, Ramirez MR. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacology and Biochemistry Behavioral* 2006, 84 (2): 229-223.
28. Hassimotto NM, Lajolo FM. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011, 91 (3): 523-531.
29. Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, Ou X, Shi X, Luo J. Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. *Journal of Neuroscience Research* 2011, 89 (10): 1676-1684.
30. Pappas E, Schaich KM. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2009, 49 (9): 741-781.
31. Ellinger S, Gordon A, Kürten M, Jungfer E, Zimmermann BF, Zur B, Ellinger J, Marx F, Stehle P. Bolus consumption of a specifically designed fruit juice rich in anthocyanins and ascorbic acid did not influence markers of antioxidative defense in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60 (45): 11292-11300.
32. Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, Botting NP, Kay CD. Human metabolism and elimination of the

anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13) C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013; 97 (5): 995-1003.

33. Tian Q, Giusti MM, Stoner GD, Schwartz SJ. Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54 (4): 1467-72.

34. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenbergh A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2002; 287 (24): 3223-9.

35. Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58 (7): 3996-4000.

36. Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2012; 78 (15): 1138-45.

37. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Science* 2010, 11 (4): 1321-1342.

38. Wang LS, Hecht SS, Carmella SG, Yu N, Larue B, Henry C, McIntyre C, Rocha C, Lechner JF, Stoner GD. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prevention Research* 2009, 2 (1): 84-93.

39. Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F, Cimino F. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF $\alpha$ -induced endothelial dysfunction: Involvement of nuclear factor-KB signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58 (22): 12048-12054.

40. Xu JW, Ikeda K, Yamori Y. Inhibitory effect of polyphenol cyanidin on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis through multiple signaling pathways in endothelial cells. *Atherosclerosis* 2007, 193 (2): 299-308.

41. Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products* 1999, 62: 294-296.

42. Zhang B, Kang M, Xie Q, Xu B, Sun C, Chen K, Wu Y. Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect  $\beta$  cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2011, 59 (2): 537-545.

43. Wallace TC. Anthocyanidins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition* 2011, 2 (1): 1-7.

44. Talavera S, Felgines C, Texier O, Bensson C, Manach, C, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *Journal of Nutrition* 2003, 133 (12): 4178-4182.

45. Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (20): 7721-7727.

46. Wu X, Pittman HE 3rd, McKay S, Prior RL. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism following berry consumption in the weanling pig. *Journal of Nutrition* 2005, 135 (10): 2417-2424.

47. Talavera S, Felgines C., Texier O, Bensson C, Manach, C, Lamaison JL, y Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition* 2004, 134 (9): 2275-2279.

48. Matsumoto H, Ichiyani T, Iida H, Ito K, Tsuda T, Hirayama M, Konishi T. Ingested delphinidin-3-rutinoside is primarily excreted to urine as the intact form and to bile as the methylated form in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54 (2): 578-582.

49. McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51: 4539-4548.

50. Dreiseitel A, Oosterhuis B, Vukman KV, Schreier P, Oehme A, Locher S, Hajak G, Sand PG. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *British Journal of Pharmacology* 2009, 158 (8): 1942-1950.

51. Walton MC, McGhie TK, Reynolds GW, Hendriks WH. The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54 (13): 4913-4920.

52. Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilirubin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 296 (3): 631-636.

53. Talavera S, Felgines C, Texier O, Bensson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (10): 3902-3908.

54. Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R, Bitsch I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2003, 81 (5): 423-435.

55. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005, 81 (suppl 1): 230S- 242S.

56. Yoshida K, Mori M, Kondo T. Variation of anthocyanins' chemical structures at different pH values. *Natural Products Report* 2009, 26 (7): 884-915.

57. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (18): 7029-7034.

58. Milbury PE, Kalt W. Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58 (7): 3950-6.

59. Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *Journal of Controlled Release* 2002, 78 (1-3): 43-54.