

Tesis Doctoral

La exposición juvenil a una dieta rica en grasas como factor de riesgo para enfermedades de Alzheimer: estructuras cerebrales y vías involucradas

Vinuesa, María Ángeles

2018-03-12

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vinuesa, María Ángeles. (2018-03-12). La exposición juvenil a una dieta rica en grasas como factor de riesgo para enfermedades de Alzheimer: estructuras cerebrales y vías involucradas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vinuesa, María Ángeles. "La exposición juvenil a una dieta rica en grasas como factor de riesgo para enfermedades de Alzheimer: estructuras cerebrales y vías involucradas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-03-12.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La exposición juvenil a una dieta rica en grasas como factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Estructuras cerebrales y vías involucradas.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Licenciada María Ángeles Vinuesa

Director de tesis: Dra. Flavia Eugenia Saravia

Director Asistente: Dr. Juan Beauquis

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad de Buenos Aires (UBA).

Buenos Aires, 2018

Siempre me fascinó mirar el cielo. De chica pasaba horas mirando las estrellas. Tenía mil preguntas sobre el Universo y esa extraña pero clara sensación de que por más inmenso y complejo que pareciera, las respuestas estaban ahí. Sólo habría que aprender a preguntar y observar minuciosamente.

Años de formación, de aprendizaje y de vida acompañaron el desarrollo de este doctorado y, por todo, tengo la suerte de necesitar agradecerles a muchas personas.

A Flavia, por abrirme las puertas del laboratorio, enseñarme y apoyarme desde el principio. Porque es una persona que genera oportunidades, promueve el crecimiento, acompaña y hace todo para que cada uno saque lo mejor de sí, y eso no se encuentra fácilmente. A Juan por su apoyo en todo, por las sesiones de *brainstorming*. Junto con Charly, por la ayuda, por estos años de enseñarme y aprender juntos, por las horas de mate, charlas y *cyber*. A los integrantes más nuevos. A Meli por su participación en el proyecto, y junto con Jessi y Amal por hacer el clima del labo aún más lindo.

A nuestras compañeras del grupo Frungieri en el laboratorio del Ibyme (un especial gracias a Euge por su apoyo científico y personal).

A los laboratorios amigos y colaboradores en QB en el IByME por la constante ayuda y los préstamos de equipos y reactivos. Al personal del bioterio y al personal no docente en general, que facilitan el trabajo de todos los días.

A los grupos de Victoria Lux y Roxana Schillaci en IByME y Fernando Brites en FFyB y Hospital de Clínicas. A Gastón Calfa, por su excelente predisposición, dedicación y el apoyo técnico en la inyección del Dil y el análisis de espinas. Por esos días en su laboratorio en IFEC, Universidad Nacional de Córdoba y la discusión de resultados.

A la facu, la FCEyN por ser mi segundo hogar los últimos 12 años, por mi formación y a la Agencia y el CONICET por el financiamiento. A BecAr por la experiencia en Humanitas, Milán. Un aprendizaje enorme, profesional y personal. Una experiencia que me permite valorar aún más el trabajo en nuestro país. Y por personas como Eleonora, que me traje en el *cuore*.

A mis amigos de la Facu, porque sin ellos no habría sido tan divertida y tan linda la carrera que elegimos.

A mis amigos de siempre. Por ser un sostén y escape imprescindibles. Por compartir los logros, las frustraciones, los buenos y los malos momentos.

A Jere, mi amor y compañero. Porque aprendimos que juntos podemos con todo.

A mi familia un párrafo aparte. Porque no podría pedir más de la familia que me tocó. A mis papás, Jorge y Mery que son todo. Por el amor, el ejemplo y la libertad. A mis hermanos Martín, Paula y Pancho. Porque son incondicionales. A mis cuñados y mis hermosos sobrinos. A mis abuelos, que no están hace rato pero tienen que ver con todo. Porque ellos y mis papás me enseñaron que con esfuerzo, pasión y determinación se logra lo que uno quiere.

Gracias a todos.

Resumen	1
Abstract.....	3
Publicaciones.....	5
Abreviaturas	6

INTRODUCCIÓN GENREAL

<i>El sobrepeso y la obesidad como problemas de la salud pública actual.....</i>	9
<i>Desórdenes metabólicos como factores de riesgo para la disfunción cerebral... 11</i>	11
<i>Modelos animales de trastornos metabólicos.....</i>	17
<i>Desórdenes metabólicos y envejecimiento prematuro</i>	18
<i>Hipocampo.....</i>	21
<i>Neurogénesis adulta.....</i>	24
<i>Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo.....</i>	26
<i>Factores que modulan la neurogénesis adulta.....</i>	28
<i>Plasticidad sináptica</i>	29
<i>Espinas dendríticas</i>	30
<i>Los componentes de la unidad neurovascular</i>	32
<i>Comunicación intercelular mediante Vesículas Extracelulares</i>	40
OBJETIVOS	45

RESULTADOS

Capítulo I: La exposición temprana a una dieta alta en grasas promueve alteraciones en el sistema límbico y el fenotipo conductual de ratones C57BL/6J adultos jóvenes

<i>Introducción I</i>	48
<i>Diseño experimental I</i>	50

<i>Resultados I</i>	51
<i>Discusión I</i>	76

Capítulo II: Dinámica de la respuesta inflamatoria por exposición juvenil a una dieta alta en grasas. Cambios tempranos en ratones C57BL/6J.

<i>Introducción II</i>	84
<i>Diseño experimental II</i>	85
<i>Resultados II</i>	86
<i>Discusión II</i>	98

Capítulo III: Interacción entre microglía y neuronas. Alteraciones neuronales mediadas por vesículas extracelulares derivadas de microglía expuesta a palmitato

<i>Introducción III</i>	104
<i>Diseño experimental III</i>	107
<i>Resultados III</i>	109
<i>Discusión III</i>	122

DISCUSIÓN GENERAL

<i>Recapitulación de resultados</i>	128
<i>Relevancia de los resultados obtenidos</i>	133
<i>Perspectivas</i>	135
<i>Reflexión final</i>	136

MATERIALES Y MÉTODOS	139
-----------------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	166
---------------------------	-----

La exposición juvenil a una dieta rica en grasas como factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Estructuras cerebrales y vías involucradas.

La incidencia de los desórdenes metabólicos, incluyendo obesidad, diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico, ha aumentando dramáticamente en las últimas décadas y emerge como un problema relevante para la salud pública de nuestro tiempo. A su vez, constituyen unos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA), cuyo impacto es creciente en sociedades modernas. La resistencia a insulina y la inflamación promueven el daño cognitivo, jugando un papel crucial en el desarrollo de la EA. Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de las vías moleculares y celulares involucradas a nivel del sistema nervioso central. El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar el impacto de una dieta moderadamente alta en grasas (HFD) sobre el sistema límbico en etapas juveniles, donde la fisiología y conectividad cerebral se encuentran en plena maduración, y los posibles mecanismos involucrados.

Para ello, trabajamos con ratones macho C57BL/6J alimentados con HFD o dieta control desde el destete hasta los 2 o 5 meses de vida. La HFD provocó resistencia a insulina, inflamación periférica y central pero no obesidad. En el hipocampo se observó activación glial, disminución de la capacidad neurogénica en el giro dentado y el estudio de espinas dendríticas mostró predominio del tipo inmaduro (tipo III) en detrimento de los otros tipos. Los ratones HFD perdieron la capacidad de construir un nido, mostraron deficiencias cognitivas y alteraciones emotivas, en particular signos asemejables a la ansiedad y la depresión. Con el objetivo de profundizar el estudio de la interacción glía-neurona en el contexto de la disfunción metabólica, nos propusimos estudiar el efecto del ácido graso saturado palmitato (PA), uno de los más representados en la HFD, sobre cultivos primarios de microglía. La exposición a PA

indujo un fenotipo microglial pro-inflamatorio y la liberación de vesículas extracelulares. Aislamos las microvesículas y los exosomas provenientes de ese cultivo y estudiamos su efecto sobre neuronas primarias de ratón. Los exosomas de microglía estimulada con palmitato se asociaron a un predominio de espinas inmaduras, tipo III o finas, en consonancia con los estudios *in vivo*.

Este trabajo de Tesis muestra múltiples alteraciones en parámetros neurológicos como consecuencia de la exposición temprana a una dieta moderadamente elevada en grasas, muchas de las cuales se encuentran presentes en enfermedades tipo EA. A partir del estudio de la dinámica temporal de la respuesta inflamatoria a lo largo de la exposición a la dieta así como de la intervención *in vitro*, puede inferirse que la participación de la microglía y su interacción con las neuronas mediante vesículas extracelulares es fundamental para el desarrollo de la patología neurológica asociada a la disfunción metabólica.

PALABRAS CLAVE:

Dieta hiperlipídica; período juvenil; insulino-resistencia; inflamación; impedimento cognitivo; hipocampo; plasticidad cerebral; microglía; vesículas extracelulares; espinas dendríticas

Juvenile exposure to a high fat diet as a risk factor to neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. Structures and pathways involved.

The incidence of metabolic disorders including obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome has increased drastically in the last decades and represents an important problem to public health. At the same time, they constitute one of the main risk factors for the development of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), which has a growing impact in modern societies. Insulin resistance and inflammation promote cognitive impairment, playing a key role in the development of AD. However, little is known as regards the cellular and molecular pathways involved in the central nervous system. The aim of this Thesis was to study the impact of a moderate HFD in the limbic system during juvenile stages, where brain connectivity and physiology are subject to plain maturation, as well as the possible mechanisms involved.

To this end, C57BL/6J male mice were exposed to a HFD or control diet since weaning and until 2 or 5 months of age. HFD induced insulin resistance together with peripheral and central inflammation, in absence of obesity. In the hippocampus, glial activation was observed in association to a decreased neurogenic capacity in the dentate gyrus and alterations in the structural plasticity of CA1 neurons, with a predominance of immature or thin dendritic spines. HFD mice showed a diminished capacity to build a nest, along with cognitive deficits and emotional alterations related to anxiety and depression. In order to study the role of glia-neuron interaction in the context of a metabolic insult in deep, we assessed the effect the saturated fatty acid palmitate (PA) in murine microglia primary cultures. PA-exposed microglia showed a pro-inflammatory phenotype and released extracellular vesicles to the conditioned media. Isolated microvesicles and exosomes were incubated with primary mouse neurons. In particular, exosomes derived from PA-exposed microglia induced alterations in

dendritic spine morphology, with a predominance of immature thin spines, in consonance with the results obtained in the *in vivo* HFD model.

This Thesis depicts several alterations in neurological parameters as a consequence of an early exposure to a moderately high fat diet, many of which are common to AD-like disorders. As a result of assessing the temporal dynamics of the inflammatory response throughout HFD exposure, together with the outcome of the *in vitro* approach, we can infer that the role of microglia and its interaction with neurons by means of extracellular vesicles is crucial for the development of brain damage associated to metabolic dysfunction.

KEYWORDS:

High fat diet; juvenile period; insulin resistance; inflammation; cognitive impairment; hippocampus; brain plasticity; microglia; extracellular vesicles; dendritic spines.

Gran parte de los resultados presentados en esta Tesis, así como otros resultados que exceden los objetivos de la misma pero se han desarrollado en el contexto del doctorado, han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity

Vinuesa, A; Pomilio, C; Menafrá, M; Bonaventura, MM; Garay, L; Mercogliano, MF; Schillaci, R; Lux Lantos, V; Brites, F; Beauquis, J; Saravia, F. Psychoneuroendocrinology 2016 doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.06.004.

Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: evidence of autophagy involvement in A β internalization.

Pomilio C *,Pavía P*, Gorojod R, **Vinuesa A**, Alaimo A, Galván V, Kotler M, Beauquis J, Saravia F. Hippocampus 2015 doi: 10.1002/hipo.22503.

Alteraciones hipocámpales y cambios cognitivos preceden al depósito de placas amiloides en un modelo de la Enfermedad de Alzheimer.

Beauquis J, **Vinuesa A**, Pomilio C, Pavía P, Saravia F. Revista Medicina 2014 (Volumen 74)

Neuronal and Glial Alterations, Increased Anxiety, and Cognitive Impairment Before Hippocampal Amyloid Deposition in PDAPP Mice, Model of Alzheimer's Disease.

Beauquis J, **Vinuesa A**, Pomilio C, Pavía P, Galván V, Saravia F. Hippocampus 2013 doi: 10.1002/hipo.22219.

Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease.

Beauquis J, Pavía P, Pomilio C, **Vinuesa A**, Roig, P, De Nicola A, Galván V, Saravia F. Experimental Neurology 2013 doi: 10.1016/j.expneurol.2012.09.009.

ADL = *Activities of Daily Living*, actividades de la vida cotidiana.

AIR = Área Inmunoreactiva

BHE = Barrera Hemato-Encefálica

BMI = *Body Mass Index*, índice de masa corporal

BSA = *Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino

CD = *Control Diet*, dieta control

CMV = Cuerpos Multi-Vesiculares

DAMPs = *Damage- Associated Molecular Patterns*, patrones moleculares asociados a daño.

EA = Enfermedad de Alzheimer

EC = *Entorrinal Cortex*, corteza entorrinal

EPM = *Elevated Plus Maze*, laberinto elevado en cruz

ER = *Endoplasmic Reticulum*, retículo endoplásmico

GD = Giro Dentado

HFD = *High Fat Diet*, dieta alta en grasas.

HOMA = *Homeostatic Model Assessment*, modelo homeostático de evaluación de resistencia a insulina

HPA = eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal

IL = Interleuquina

IRS = *Insulin Receptor Substrate*, sustrato del receptor de insulina.

MVs = Microvesículas

NOL = *Novel Object Localization*, localización novedosa de un objeto

OMS = Organización Mundial de la Salud

PA = Palmitato

PAMPs = *Pathogen- Associated Molecular Patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos.

ROS = *Reactive Oxygen Species*, especies reactivas del oxígeno

SFB = Suero Fetal Bovino

SNC = Sistema Nervioso Central

TLR = *Toll Like Receptors*, receptores tipo Toll

TNF α = *Tumor Necrosis Factor α* , factor de necrosis tumoral α

TST = *Tail Suspensión Test*, test de suspensión de la cola

UNV = Unidad Neurovascular

VEs = Vesículas Extracelulares

ZSG = Zona Subgranular

INTRODUCCIÓN GENERAL

El sobrepeso y la obesidad como problemas de la salud pública actual

La especie humana evolucionó en un contexto caracterizado por cambios drásticos en la dieta que incluyeron desde la incorporación de la carne, la cocción, así como los cambios asociados a la domesticación de plantas y animales para su consumo, en consonancia con la disponibilidad de nutrientes, de calorías y los requerimientos de gasto energético, “moldeando” las bases genéticas del control del metabolismo (Luca, Perry, & Di Rienzo, 2010). Podemos decir que las condiciones han cambiado significativamente en un lapso de tiempo sumamente corto si tenemos en cuenta los tiempos de la evolución. A partir del desarrollo de la agricultura y de la ganadería, la alimentación humana, y en general el estilo de vida, han experimentado grandes cambios, especialmente en los últimos 150 años por efecto de la revolución industrial. De acuerdo con algunos autores, estos cambios incluyen un aumento de la ingesta calórica y una disminución del gasto energético, incrementando el consumo de grasas saturadas. Además, en las dietas de la actualidad ha aumentado significativamente la proporción ingerida de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) omega-6 versus los omega-3, así como los ácidos grasos insaturados en *trans*, sumado a una disminución del consumo de carbohidratos complejos y de fibra (Simopoulos, 2006, 2011).

En nuestro tiempo entonces, numerosas sociedades modernas se encuentran ante el paradigma de sobreabundancia de alimentos hipercalóricos disponibles con un mínimo de gasto energético. A su vez, el ejercicio físico se convirtió en una actividad opcional y la vida sedentaria domina los nuevos hábitos de la especie. Estos cambios se asocian a un alto costo de salud y a enfermedades que emergen en nuestra era, coincidiendo con una mayor expectativa de vida (Simopoulos, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a la obesidad en su Clasificación Internacional de Enfermedades en el año 1948, en el momento de la creación del organismo, pero recién en la década del 70 las comunidades médicas expresaron la

necesidad de crear centros de investigación con el objetivo de abordar el impacto de la obesidad en la salud pública (Bray, Davidson, & Drenick, 1972; James & Trayhurn, 1976). En 1997 la OMS reconoció a la obesidad y a los trastornos metabólicos como epidemias globales y durante los últimos 30 años asistimos a un crecimiento sostenido de la prevalencia de estas enfermedades. Se estima entonces que, de mantenerse los actuales indicadores, el 60% de la población adulta del mundo tendrá sobrepeso o será obesa en el 2030. El exceso de peso ocupa el quinto lugar en los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como las cardiovasculares, la diabetes tipo 2 y diversos tipos de cáncer (WHO, 2009).

En forma más reciente, también se reconoce un preocupante aumento de esta epidemia en niños y jóvenes. La obesidad es la enfermedad más común en la actualidad en países desarrollados y en vías de desarrollo en esta franja etaria (Reilly & Wilson, 2006).

Como se verá, los efectos de las enfermedades metabólicas sobre la salud en general y en particular sobre el cerebro han sido estudiados extensamente. Sin embargo, la información sobre las consecuencias que estas enfermedades conllevan cuando se inician en la niñez o en la peri-adolescencia es escasa e incompleta. El cerebro humano experimenta un rápido desarrollo durante los primeros años de vida. El hipocampo y el lóbulo frontal son estructuras responsables de los procesos de aprendizaje y memoria y las funciones cognitivas establecen sus bases en este crítico período vital y gravitan significativamente sobre la vida adulta (Matheson & Eichen, 2018).

Estudiar de qué manera impacta el consumo temprano de una dieta alta en grasas sobre las funciones cognitivas y el procesamiento emocional emerge como un tema biomédico de suma actualidad y relevancia.

Desórdenes metabólicos como factores de riesgo para la disfunción cerebral

Más allá de definirse como un alto índice de masa corporal ($BMI = \text{peso}/\text{altura}^2$ mayor a 30 kg/m^2), la obesidad puede asociarse con un conjunto de alteraciones que constituyen lo que se conoce como síndrome metabólico. Este desorden metabólico puede resultar de la interacción de factores tanto genéticos como ambientales (comportamiento alimentario, nivel de actividad física y componentes tóxicos del ambiente) dando lugar a un contexto de inflamación sistémica de bajo grado pero crónica que afecta a distintos tejidos como el hígado, el tejido adiposo, el muscular así como el sistema nervioso central. En este sentido, el hipotálamo ha sido una de las estructuras del SNC más estudiadas debido a su relevancia en la regulación del metabolismo, el balance energético, la ingesta y el peso corporal. Es así, que la inflamación en el hipotálamo se ha encontrado involucrada tanto en la aparición como en el mantenimiento del fenotipo obeso (Guillemot-Legrís & Muccioli, 2017). Sin embargo, la inflamación asociada a los desórdenes metabólicos se ha reportado en áreas extra-hipotalámicas como el hipocampo, la corteza y la amígdala, fenómeno de gran relevancia a la hora de estudiar los mecanismos de disfunción cognitiva asociados a la obesidad y los desórdenes relacionados. En términos de función cerebral, la obesidad promovería el impedimento cognitivo ya que diversos estudios reportan déficits en el aprendizaje y la memoria en pacientes obesos (Parimisetty et al., 2016; Xu et al., 2011).

La activación del sistema inmune y la inflamación crónica son eventos que relacionan la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo en obesidad con el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular. Este fenómeno no sólo se manifiesta por los niveles de moléculas pro-inflamatorias en circulación sino por la infiltración de macrófagos y otras células del sistema inmune en tejido adiposo, hígado y músculo, entre otros tejidos.

Numerosos reportes indican que la respuesta inmune adopta un perfil pro-inflamatorio acompañado por la producción de citoquinas y adipocinas que afectan las vías de señalización de insulina en los distintos tejidos y, en última instancia, la función pancreática y la secreción de la hormona (Kloting & Bluher, 2014; Muriach, Flores-Bellver, Romero, & Barcia, 2014; Parimisetty et al., 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, resulta evidente que la obesidad se encuentra íntimamente relacionada con el desarrollo de diabetes tipo 2, caracterizada principalmente por una ineficiente señalización de la hormona insulina. La insulina es una hormona peptídica sintetizada principalmente por las células β del páncreas y su función primordial es mantener los niveles homeostáticos de glucemia, promoviendo la entrada de glucosa a los tejidos sensibles a esta hormona tales como el cardíaco, el muscular y el adiposo cuyas células expresan Glut4, transportador de glucosa modulado positivamente por insulina. Además actúa regulando el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, induciendo también la división celular y el crecimiento a través de sus efectos mitogénicos (Wilcox, 2005). La insulina es una hormona anabólica, estimula la lipogénesis, glucogenogénesis y promueve la acumulación de triglicéridos en tejidos periféricos. Como se esquematiza en la **Figura 1**, los mecanismos de acción de la insulina son regulados principalmente por los sustratos del receptor de insulina (IRSs). En condiciones normales, la unión de la hormona a su receptor (IR) promueve un cambio conformacional en el IR que lleva a su auto-fosforilación, mediada por su actividad tirosina quinasa, y el consiguiente reclutamiento de las proteínas IRSs que son a su vez fosforiladas (Cai, 2013; Kido, Nakae, & Accili, 2001). Luego de la interacción con las IRSs, típicamente IRS1 e IRS2, el complejo enzimático PI3K es activado y puede llevar a la activación por fosforilación de Akt. Akt es uno de los componentes más importantes en la vía de señalización de insulina, como efector río arriba de numerosas moléculas involucradas en los distintos procesos regulados por la hormona. La fosforilación en residuos tirosina es requerida

para la activación de IRS1 y sensibilidad a insulina, mientras que su fosforilación en residuos serina inhiben dicha actividad (Nieto-Vazquez, Fernandez-Veledo, de Alvaro, & Lorenzo, 2008; Nieto-Vazquez, Fernandez-Veledo, Kramer, et al., 2008). Entre las moléculas candidato que promueven las fosforilaciones inhibitorias en los sustratos de insulina y en última instancia la inhibición de su señalización se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ROS), las citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6 y quinasas de estrés como JNK, IKK y PKC (Boucher, Kleinridders, & Kahn, 2014; Goktas et al., 2013; Hirosumi, 2002). En el contexto de la obesidad, diabetes tipo 2 y los desórdenes metabólicos asociados, los mecanismos mencionados son reportados en tejidos sensibles a insulina y en dichos contextos el estrés de retículo podría ser uno de los disparadores (Velloso, Folli, & Saad, 2015). El retículo endoplásmico (ER) es un complejo sistema intracelular de membranas donde, en conjunto con el aparato de Golgi, la mayoría de las proteínas de sintetizan, se pliegan y modifican correctamente y son liberadas o dirigidas a su compartimiento correspondiente, en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en casos en los que se produce un aumento desmedido en la síntesis de proteínas y aumenta la presencia de proteínas mal plegadas en ER, se dispara la vía de estrés de retículo (ERS) o respuesta por proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*) que activa las vías de JNK/AP1, IKK, $\text{NF}\kappa\text{B}$ y estrés oxidativo. Esta vía se induce, por ejemplo, en un contexto de sobrecarga de nutrientes o niveles elevados de ácidos grasos libres. En este sentido, Hotamisligil, uno de los primeros autores en poner en relevancia la acción de citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ en respuesta a la sobrecarga de lípidos provenientes de la dieta (Hotamisligil, Shargill, & Spiegelman, 1993), ha propuesto que el ER debería considerarse un sistema esencial en la coordinación de las respuestas metabólicas por su capacidad de controlar las vías catabólicas de varios nutrientes (Hotamisligil, 2010; Kloting & Bluher, 2014; Velloso et al., 2015).

Otro mecanismo probablemente subyacente a la inflamación metabólica es la activación de los receptores tipo Toll (TLRs), responsables de la respuesta inmune innata. Se ha detectado que ácidos grasos saturados de cadena larga son capaces de estimular la transducción de señales de TLR4, que podría desencadenar resistencia a insulina a través de mecanismos similares al estrés de retículo vía JNK, IKK, etc (**Figura 1**). Si bien originalmente se han estudiado las vías de ERS y activación de TLRs como mecanismos independientes en la inflamación asociada a patologías metabólicas (Ozcan et al., 2009), existen evidencias que sugieren una constante interacción o *cross-talk* entre ellas, en la modulación de la respuesta inflamatoria y disfunción metabólica asociada al impedimento en las acciones de la insulina (Belkina & Denis, 2010; Guillemot-Legris & Muccioli, 2017). Adicionalmente, se ha propuesto que en el contexto de obesidad se producen alteraciones en la microbiota intestinal que podrían favorecer un aumento en la permeabilidad de la pared intestinal y, por ende, el incremento de componentes inmunogénicos como LPS en el torrente sanguíneo, fenómeno conocido como endotoxemia, contribuyendo así con el desarrollo de la respuesta inflamatoria y la resistencia a insulina (Carvalho et al., 2012; Peter J. Turnbaugh, 2006).

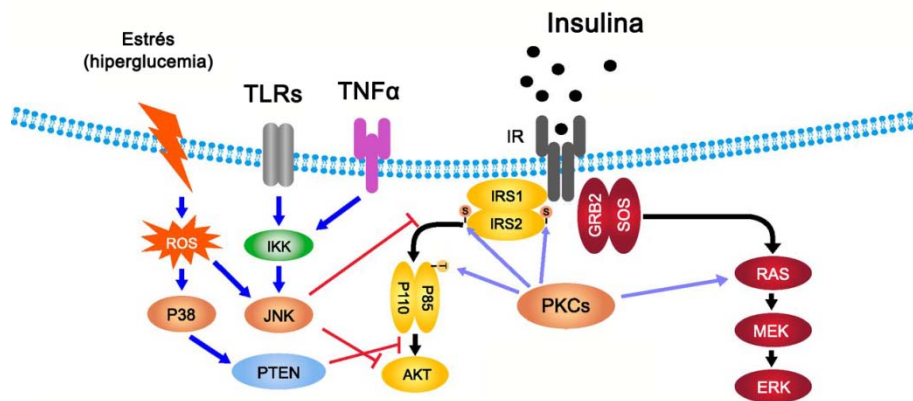


Figura 1. Señalización de insulina y moduladores negativos. La activación del receptor de insulina inicia una cascada de eventos de fosforilación. Un cambio conformacional y autofosforilación del receptor, inducidos por la unión de la hormona, promueve el reclutamiento de los sustratos IRS, activando o bien la vía mitogénica mediante MAPKs o la vía metabólica por activación de PI3K-Akt. La señalización se ve disminuida por la acción de fosfatasa o bien quinasas de estrés como JNK, IKK que promueven fosforilaciones inhibitorias en IR e IRSs en presencia de altos niveles de citoquinas inflamatorias, ácidos grasos libres o glucosa. *Modificado de (King, Park, & Li, 2016).*

Por tanto, la resistencia a la insulina sería un fenómeno en común entre las patologías metabólicas mencionadas y según la función que la señalización de insulina tenga en cada tejido, será la implicancia de este fenómeno en la disfunción de dicho tejido y sus consecuencias. Para abordar el estudio de los efectos que la resistencia a insulina puede tener en el SNC, particularmente como factor de riesgo para el desarrollo de impedimento cognitivo, es fundamental conocer no sólo las consecuencias de la

resistencia a insulina a nivel sistémico sino las funciones de la hormona *per se* en el cerebro.

Hasta fines de los años '70 se consideraba que el cerebro no era un órgano sensible a la insulina. Sin embargo, hoy sabemos que tiene un rol fisiológico muy importante y que alteraciones en su funcionalidad se relacionan con patologías neurodegenerativas como la EA. En 1978, Havrankova fue el primero en reportar la presencia de insulina en el SNC mediante radio-inmunoensayos en extractos de cerebro de rata (Havrankova, Roth, & Brownstein, 1978). Se ha debatido ampliamente, y aún se debate, sobre el origen de dicha insulina. En resumen, se ha detectado la expresión del ARN mensajero de insulina en diferentes áreas del cerebro como el hipotálamo, corteza, en las regiones CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo y en la capa granular del bulbo olfatorio en roedores (Devaskar et al., 1994) y humanos (Young, 1986) así como también se ha detectado el transporte de insulina periférica a través de la barrera hemato-encefálica (BHE) por medio de la trans-citosis mediada por su receptor en las células del endotelio cerebral y este transporte se ve disminuido en pacientes obesos y animales sometidos a dietas altas en grasa (Gray, Aylor, & Barrett, 2017; May, Bedel, Shen, Woods, & Liu, 2016). En el hipotálamo, la señalización a través del receptor de insulina regula el metabolismo, la ingesta, y determina el balance energético (E. B. Lee & Mattson, 2014), mientras que en estructuras extra-hipotalámicas como el hipocampo, de especial interés por su rol en la función cognitiva, los mecanismos de acción de la insulina se asocian a funciones neurotróficas y neuromoduladoras, importantes para el crecimiento y la supervivencia celular tanto en el desarrollo como en la adultez. El receptor de insulina se expresa de modo abundante en neuronas y en menor medida en células gliales (Frolich et al., 1998) y, en conjunto con los factores similares a insulina IGFs (del inglés *insulin-like growth factors*) y sus receptores, regulan la diferenciación neuronal, el crecimiento dendrítico, la activación de precursores neuronales, mecanismos de reparación y la

conectividad sináptica, jugando un papel fundamental en el aprendizaje y la memoria (Blazquez, Velazquez, Hurtado-Carneiro, & Ruiz-Albusac, 2014; Ferrario & Reagan, 2017; O'Brien, Hinder, Callaghan, & Feldman, 2017).

En este sentido, individuos que padecen diabetes con resistencia a insulina presentan atrofia del hipocampo y alteraciones en la conectividad implicada en la función cognitiva, es decir, alteraciones en común entre patologías asociadas a los desórdenes metabólicos así como con envejecimiento y patologías neurodegenerativas, en particular la enfermedad de Alzheimer (EA) (Dey, Hao, Wosiski-Kuhn, & Stranahan, 2017).

El tipo de dieta y el estatus metabólico durante la niñez y adolescencia puede impactar sobre la función cognitiva durante la adultez y precipitar el envejecimiento cerebral. Varios factores pueden contribuir al desorden metabólico en la infancia incluyendo la predisposición genética y epigenética, el aumento de la ingesta calórica, el bajo gasto de energía y la obesidad de los padres. Incluso, la sobrealimentación durante el desarrollo intrauterino debido a la diabetes gestacional o a la obesidad materna son factores que se asocian al alto peso en niños (Mitanez & Chavatte-Palmer, 2018).

Modelos animales de trastornos metabólicos

El estudio de la relación bi-direccional entre el metabolismo celular y la neuroplasticidad ha sido posible, en gran medida, por los numerosos estudios a partir de modelos animales. Es posible generar distintos tipos de modelos de obesidad en animales a partir de la manipulación del ambiente (obesidad inducida por la dieta), por mutaciones espontáneas (ratones ob/ob deficientes en leptina, db/db deficientes en el receptor de leptina, la rata Zucker de actividad deficiente del receptor de leptina) o bien

généticamente modificados (Bruce-Keller, Keller, & Morrison, 2009; A. M. Stranahan, 2015). En particular los modelos genéticos han posibilitado la identificación de genes asociados a la obesidad en humanos y vías asociadas a la regulación del peso corporal y la patogénesis relacionada con síndromes metabólicos. Por su parte, el modelo deficiente de leptina ob/ob muestra una marcada obesidad e hiperfagia así como alteraciones relacionadas con la diabetes tipo 2 y se ha utilizado ampliamente para el estudio del efecto de la obesidad en el cerebro (Gratuze et al., 2017). Sin embargo, muchos de los resultados obtenidos a partir de modelos genéticos o farmacológicos pueden ser cuestionables en relación a los efectos que las mutaciones o drogas puedan tener en interacción con otros mecanismos. En este sentido, los modelos de trastornos metabólicos inducidos por la dieta podrían considerarse más relevantes con respecto a la patología en humanos, especialmente en sociedades occidentales donde los alimentos industrializados e hiper-calóricos son de consumo creciente.

Desórdenes metabólicos y envejecimiento prematuro

En términos demográficos, según datos de la OMS (WHO, 2015b), la población mundial está envejeciendo rápidamente y se espera que la proporción de individuos mayores de 60 años prácticamente se duplique para el año 2050, pasando del 12% en 2015 al 22%. A su vez, la edad es el principal factor de riesgo para la mayor parte de las enfermedades que afectan a los seres humanos como cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Guarente, 2014).

Por otra parte, existe una asociación bi-direccional entre el envejecimiento y los desórdenes metabólicos como la obesidad y sus co-morbilidades asociadas. La edad

es uno de los factores de riesgo para el desarrollo del síndrome metabólico (Carnethon et al., 2004; Hao, Dey, Yu, & Stranahan, 2016) así como la disfunción asociada a los desórdenes metabólicos, en su mayoría causados por hábitos alimentarios nocivos y un estilo de vida sedentario, constituye uno de los principales factores modulables del envejecimiento prematuro (Bruce-Keller et al., 2009). En vistas de esta clara pandemia, estudiar el grado en que la obesidad afecta la función cerebral, así como los mecanismos implicados, podría no sólo redundar en avances significativos a nivel de la salud pública, sino que podría desenmascarar los procesos fisiopatológicos que subyacen al impedimento cognitivo y la demencia (O'Brien et al., 2017).

El envejecimiento cerebral se asocia con una progresiva degradación de las capacidades cognitivas en forma dependiente de la edad cronológica. Existen diversos cambios dependientes de la edad que promueven respuestas biológicas celulares alteradas y conducen a consecuencias neuropatológicas. Entre los procesos celulares más relevantes para el daño neurológico asociado al envejecimiento se encuentran el deterioro en la función mitocondrial, el creciente estrés oxidativo, la acumulación de proteínas tóxicas, disfunción en el proceso autofágico así como un impedimento en importantes cascadas de señalización intracelular claves para la homeostasis celular (Bishop, Lu, & Yankner, 2010). El deterioro asociado al envejecimiento cerebral puede explicarse, en parte, por alteraciones en la plasticidad cerebral. Si bien un gran número de alteraciones neurológicas se han descrito en el contexto del envejecimiento cerebral fisiológico, éstos se manifiestan de una forma considerablemente más profunda o acelerada en desórdenes neurodegenerativos asociados a la edad como son las enfermedades de Alzheimer o Parkinson (Burke & Barnes, 2006).

En el contexto del envejecimiento patológico, la EA tiene una prevalencia muy alta, siendo la principal causa de demencia y formando parte de las diez principales causas

de muerte a nivel mundial (WHO, 2015b). Es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos conductuales. El hipocampo es una de las estructuras primariamente afectadas y, lo por tanto, los fenómenos que dan lugar a la plasticidad hipocampal como la neurogénesis adulta y la conectividad sináptica que se mencionan posteriormente, también lo son (Bellot et al., 2014; Mu & Gage, 2011; Zolezzi, Bastias-Candia, Santos, & Inestrosa, 2014).

Llamativamente, tanto las enfermedades cardiovasculares como los factores de riesgo asociados son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Entre ellos, se reconocen principalmente la diabetes de tipo 2, la obesidad, la hipertensión y el sedentarismo (Mayeux & Stern, 2012). Es interesante destacar que, si bien es algo controversial, algunos autores postulan que la EA podría representar una “Diabetes tipo 3”, ya que las etapas iniciales asociadas al daño cognitivo se ven acompañadas por múltiples alteraciones en la vía de señalización de la insulina en el hipocampo, que llevaría entre otros fenómenos, a un aumento de la actividad de GSK3 β , una de las quinasas principalmente involucradas en la fosforilación de Tau y podría tener un rol en la formación de ovillos neuro-fibrilares (de la Monte & Tong, 2014).

El cerebro se encuentra sometido a una constante demanda del ambiente y requiere de mecanismos dinámicos para ejercer los distintos tipos de respuestas. La plasticidad cerebral representa la capacidad intrínseca del sistema nervioso que le permite responder a un ambiente sumamente cambiante a través de modificaciones funcionales y estructurales. Entre los fenómenos sujetos a tal capacidad de respuesta se distinguen el fortalecimiento, debilitamiento, generación o eliminación de conexiones sinápticas así como la promoción de la neurogénesis (Kelly et al., 2006; Pascual-Leone et al., 2011; Rosenzweig & Barnes, 2003).

Fenotípicamente, estas alteraciones en la plasticidad suelen expresarse con un declive en la función cognitiva en el envejecimiento, en particular en relación a tareas que involucran el hipocampo y estructuras corticales asociadas (Burke et al., 2011). En este sentido, las condiciones asociadas a la obesidad y la diabetes tipo 2, como la inflamación y la resistencia a insulina, promueven una mayor vulnerabilidad en dichas estructuras con una consiguiente mayor susceptibilidad al desarrollo de impedimento cognitivo (Hao et al., 2016).

Hipocampo

El hipocampo es una estructura que forma parte del sistema límbico en el cerebro de mamíferos y tiene un rol clave en el procesamiento de la memoria episódica y en el aprendizaje (Rosenzweig & Barnes, 2003) siendo una de las regiones principalmente afectadas durante el proceso del envejecimiento y de gran vulnerabilidad asociada con distintos desórdenes neurológicos.

Se ubica debajo del lóbulo temporal medio en cada uno de los hemisferios del cerebro. Diversos estudios de lesión selectiva en diferentes áreas del hipocampo han denotado la relevancia de dicha estructura en la conducta y los efectos asociados al aprendizaje y la memoria, como por ejemplo la memoria espacial (Adams, Kusljic, & van den Buuse, 2008; Eichenbaum, Yonelinas, & Ranganath, 2007). Según el autor al que se refiera, la nomenclatura de las estructuras comprendidas en la formación hipocampal puede variar pero, en términos generales, se reconocen las siguientes regiones: el giro dentado (GD), el subículo y el hipocampo propiamente dicho compuesto por las subregiones CA1, CA2 y CA3 que forman el Asta de Amón (Deng, Aimone, & Gage, 2010; Mu & Gage, 2011; Yan et al., 2017). El circuito hipocampal ha sido tradicionalmente caracterizado como un camino excitatorio, tri-sináptico y

unidireccional (**Figura 2**). En este sistema, la mayor parte de la información sensorial llega al hipocampo a través de la corteza entorrinal (EC). Las neuronas de la capa II de dicha corteza poseen axones que proyectan hacia el giro dentado y la región CA3 del hipocampo a través de la región subicular. Estas proyecciones provenientes de la corteza entorrinal conforman el principal *input* del circuito hipocampal y se denomina vía perforante. El siguiente componente en la conexión tri-sináptica es el giro dentado. Las neuronas granulares del giro dentado forman axones que se denominan fibras musgosas e impactan en las dendritas proximales de las neuronas piramidales de CA3, además de contactar a las interneuronas del hilio. Por su parte, las neuronas de CA3 proyectan hacia otros niveles de CA3, como también hacia CA1. Los axones que comunican CA3 con CA1 se denominan fibras colaterales de Schaffer. Por último, las neuronas CA1 proyectan tanto hacia la región subicular como las capas profundas de la EC, que a su vez proyecta eferencias hacia otras regiones corticales que originalmente le dieron input a la corteza entorrinal (Y. Li, Mu, & Gage, 2009; Mu & Gage, 2011). Es decir, la información sensorial que converge desde distintas áreas corticales en la corteza entorrinal, vuelve a dichas regiones luego de ser procesada por el circuito excitatorio hipocampal descrito más arriba.

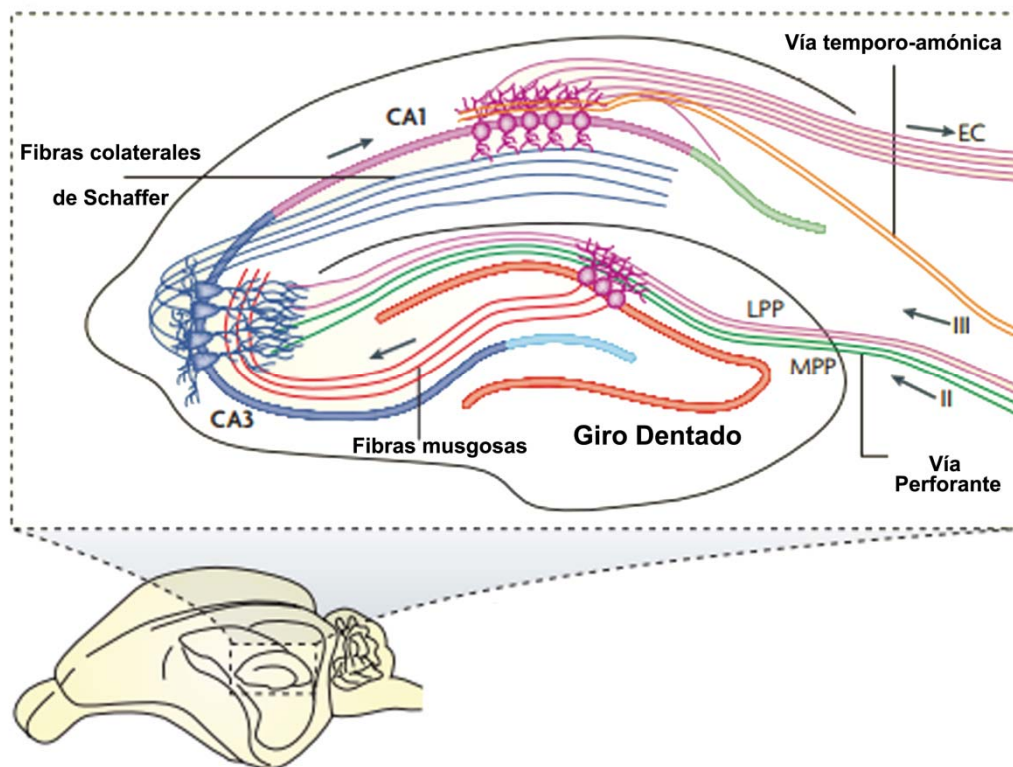


Figura 2. Ilustración de la organización del circuito hipocampal en roedores. En el diagrama se esquematiza la vía excitatoria tri-sináptica (EC–giro dentado–CA3–CA1–EC). Las aferencias de las neuronas EC II hacia el giro dentado y CA3 constituyen la vía perforante (PP), incluyendo el camino perforante lateral (LPP) y el medial (MPP). El GD envía proyecciones hacia CA3 mediante las fibras musgosas y las neuronas CA3 transmiten la información hacia las neuronas CA1 mediante las fibras colaterales de Schaffer. A su vez, estas neuronas reciben input de neuronas EC III a través de la vía temporo-amónica (TA). La información integrada por las neuronas piramidales de CA1 es remitida nuevamente a las capas profundas de EC. *Modificado de (Deng et al., 2010).*

Durante el desarrollo post natal que ocurre durante la infancia y adolescencia, las estructuras cerebrales relacionadas con la regulación del stress, en particular el hipocampo y la amígdala, presentan una mayor vulnerabilidad a los eventos de stress que durante la vida adulta, sobre estructuras ya maduras (Pervanidou & Chrousos,

2012). Es por ello que resulta muy interesante estudiar el impacto de eventos metabólico-inflamatorios durante el periodo peri juvenil y su potencial proyección en la adultez.

Neurogénesis adulta

Como mencionáramos previamente, uno de los mecanismos de plasticidad que ocurren en el hipocampo es la incorporación de nuevas neuronas al circuito hipocámpal, es decir, la neurogénesis adulta. Durante la mayor parte del siglo XX la idea imperante en el campo de la neurociencia era que el cerebro postnatal de vertebrados superiores no tenía la capacidad de generar neuronas nuevas, las neuronas se generarían únicamente durante el desarrollo embrionario. No fue hasta los años 60 que el trabajo de Altman mostró los primeros indicios de que esto sí podía ocurrir, mediante la inyección de timidina tritiada en roedores y gatos (timidina-³H). Encontró a partir de las autoradiografías, que había neuronas positivas en la región basal de la capa de células granulares en el hipocampo, como se muestra en la **Figura 3** (Altman, 1962; Altman & Das, 1965, 1966).

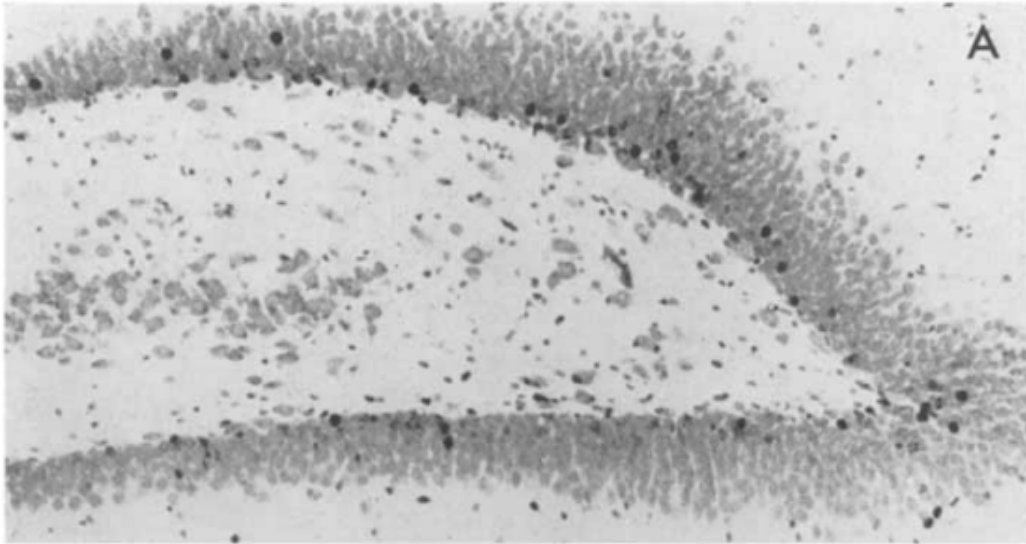


Figura 3. Primeras evidencias de nuevas neuronas en cerebro postnatal. Microfotografía autoradiográfica del giro dentado del hipocampo de rata inyectada con ^3H -timidina a los 10 días de edad y sacrificada a los dos meses post inyección. *Tomada de (Altman & Das, 1965).*

Sin embargo, estos resultados fueron ignorados por el campo de estudio durante 3 décadas en parte debido a dificultades técnicas y también al rechazo en aceptar este nuevo concepto. Se requirieron 30 años de debate e incorporación de nuevas técnicas para que los neurocientíficos aceptaran que el cerebro mamífero postnatal era capaz de generar nuevas neuronas. Mediante la utilización del análogo de timidina Bromodeoxiuridina (BrdU) y de la inmunomarcación de distintos tipos celulares, sumado a la microscopía confocal y el análisis estereológico de las células marcadas, se confirmó la presencia de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo de roedores (G Kempermann, Kuhn, & Gage, 1997; Kuhn, Dickinson-Anson, & Gage, 1996) y humanos (Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013).

Al día de hoy la neurogénesis adulta en el cerebro de mamíferos se ha observado consistentemente en dos regiones definidas: en la zona subventricular del ventrículo lateral (SVZ, del inglés subventricular zone) y en la zona subgranular del giro dentado

del hipocampo (ZSG). Las neuronas que se originan en la zona subventricular migran hacia el bulbo olfatorio a través de la vía migratoria rostral y cumplen su función en la codificación de los olores. Por su parte, las neuronas que se diferencian a partir de precursores neurales en la zona subgranular del giro dentado darán origen a neuronas excitatorias de la capa granular, incorporándose al circuito tri-sináptico hipocampal (Deng et al., 2010).

Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo

Durante el proceso de neurogénesis en la ZSG del hipocampo se originan neuronas granulares nuevas a partir de un conjunto o *pool* de células madre neuronales (NSC, del inglés *neural stem cells*). Este proceso ocurre de un modo finamente regulado, en diversos pasos que involucran la activación, determinación de linaje, proliferación de precursores intermedios, maduración y supervivencia de las nuevas neuronas, así como su integración efectiva en el circuito hipocampal (G. Kempermann, Song, & Gage, 2015). Se estima que se incorporan aproximadamente 700 neuronas nuevas por día en el GD humano (Spalding et al., 2013). Si bien podría pensarse que la población de neuronas nuevas es muy pequeña en relación al número total de neuronas granulares en el giro dentado, el hecho de que se incorporen nuevas neuronas continuamente a lo largo de la vida al circuito hipocampal resulta un fenómeno de gran importancia para la plasticidad estructural y funcional de los circuitos involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje (Marin-Burgin, Mongiat, Pardi, & Schinder, 2012; Marin-Burgin & Schinder, 2012). A su vez, al ser un proceso sumamente regulado por factores intrínsecos y extrínsecos, su modulación adquiere una gran relevancia a la hora de estudiar la función cognitiva asociada en distintos contextos.

Como se ilustra en la **Figura 4**, las células madre neurales, con un fenotipo similar a la glía radial presente en el desarrollo, tienen la capacidad de generar progenitores (células tipo 2a y tipo 2b) que pueden amplificarse y originar neuroblastos (células de tipo 3). Estas células conservan aún la capacidad de proliferar y pueden diferenciarse dando lugar a neuronas granulares del GD (Toda & Gage, 2017). En las primeras etapas de maduración de las neuronas nuevas, el *input* que reciben es gabaérgico. En este contexto GABA tiene un rol regulador de la supervivencia y maduración de las neuronas jóvenes. Recapitulando etapas embrionarias, se comporta como excitatorio hasta que se establecen los contactos sinápticos sobre CA3 y las células adquieren su fenotipo glutamatérgico característico (Esposito et al., 2005; Jagasia et al., 2009). Además de neuronas del GD, las células madre neurales adultas de la ZSG pueden dar origen a una pequeña población de células gliales, en particular de astrocitos (Encinas et al., 2011).

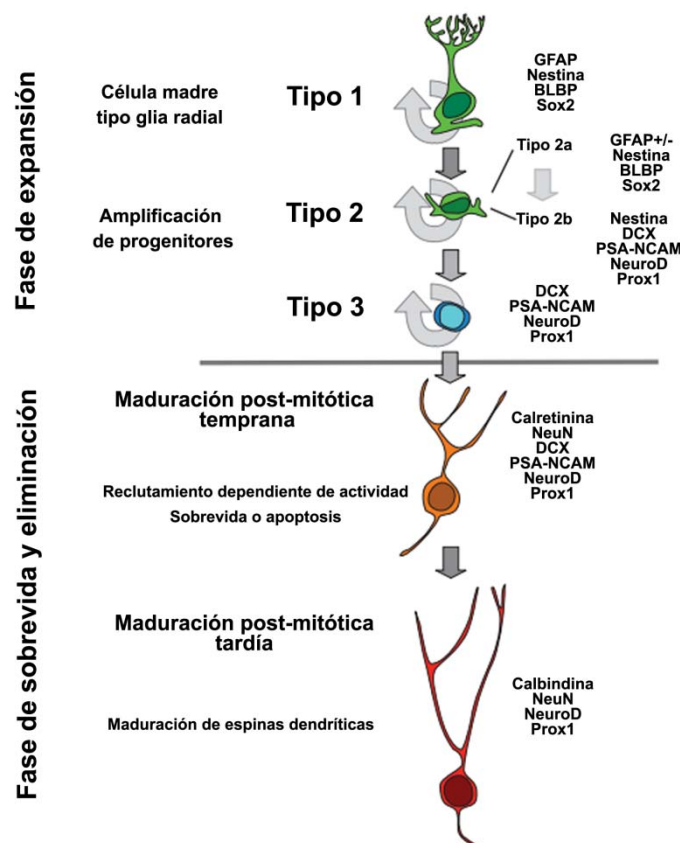


Figura 4. Etapas del proceso de neurogénesis adulta. El proceso puede dividirse en 4 etapas: de células precursoras, de supervivencia temprana, de maduración post-mitótica temprana y tardía. Según la morfología y la expresión de marcadores proteicos pueden distinguirse los distintos estadios a lo largo del proceso. La fase de células precursoras permite expandir el pool de células que potencialmente pueden diferenciarse a nuevas neuronas. La fase de supervivencia temprana determina la salida de la etapa proliferativa y es donde la mayoría de las células son eliminadas dependiendo fuertemente de señales del entorno. Luego, en la etapa post-mitótica se establecen o no conexiones funcionales, se produce el crecimiento de axón y dendritas y la sinaptogénesis. En la etapa de maduración final se produce la regulación fina de la incorporación de las nuevas neuronas al circuito. Se ha estimado que la totalidad del proceso lleva aproximadamente 7 semanas en roedores (Toda & Gage, 2017). *Modificado de (G. Kempermann et al., 2015).*

Factores que modulan la neurogénesis adulta

Existen numerosos factores que pueden modular el proceso de neurogénesis localmente. No sólo aquellos factores intrínsecos como factores de crecimiento o neurotransmisores que pueden ser intercambiados por los distintos componentes celulares del nicho neurogénico, sino también por factores externos o ambientales que forman parte de la experiencia del organismo en un sentido más amplio (Eisinger & Zhao, 2018). Existe una amplia literatura sobre fenómenos que regulan negativamente el proceso neurogénico como pueden ser el aislamiento, el envejecimiento, la obesidad, la diabetes y el estrés (Klempin & Kempermann, 2007; Knöth et al., 2010; Kuhn et al., 1996; A.M. Stranahan et al., 2008; Trinchero et al., 2017) así como otros pueden ejercer una regulación positiva. Entre estos últimos pueden incluirse el enriquecimiento del ambiente, el ejercicio voluntario y la dieta (Toda & Gage, 2017; Vadodaria & Gage, 2014). En su mayoría, los factores moleculares descriptos intervienen tanto en el desarrollo como en la neurogénesis adulta. La integración de

nuevas neuronas al circuito hipocampal dependerá de los distintos factores que modulen la proliferación de precursores en la ZSG, la supervivencia y la correcta diferenciación y maduración neuronal (morfológica y sináptica), gobernada por una multiplicidad de factores interconectando distintos niveles desde el ambiente y el comportamiento hasta la señalización molecular en el nicho neurogénico. Diversas condiciones como el envejecimiento y el estilo de vida incluyendo la dieta y el ejercicio físico, son reguladores cruciales de las distintas etapas de este fenómeno (Trinchero et al., 2017; Valero, Paris, & Sierra, 2016). La identificación de morfógenos y mediadores moleculares podría explicar, potencialmente, los mecanismos por los cuales los precursores neurales adultos pueden responder a fenómenos complejos del ambiente, es decir los eventos que subyacen al grado de plasticidad que otorga la neurogénesis adulta.

Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica cumple un rol fundamental en la función cognitiva. Según el actual dogma de la neurobiología del aprendizaje, la síntesis específica de proteínas es capaz de determinar el establecimiento de un proceso sináptico o de formación de memoria de manera transitoria o persistente en el cerebro. La síntesis de proteínas *de novo* podría o bien fortalecer una conexión sináptica preexistente mediante el remodelado estructural por aumento de receptores, por ejemplo, o bien por la formación de nuevas sinapsis. Se propone que la modulación de la intensidad de las conexiones sinápticas subyace a la dinámica de las redes neuronales involucradas en el almacenamiento de la memoria (Buffington, Huang, & Costa-Mattioli, 2014). Un claro ejemplo de este paradigma está representado por el fenómeno de potenciación duradera o LTP (del inglés *long term potentiation*) como correlato celular del aprendizaje y la memoria. En este fenómeno, la liberación de glutamato como resultado de la estimulación de las terminales pre-sinápticas, induce la señalización

mediante receptores NMDA (N-metil-D aspartato) y el reclutamiento de receptores AMPA (α amino-3-hidroxil-5-metil-4- isoxazolpropionato) en las terminales post-sinápticas y de esta manera aumenta la amplitud de corrientes excitatorias post-sinápticas (Spinelli et al., 2017).

Espinas dendríticas

El funcionamiento del cerebro radica principalmente en la organización de circuitos neuronales en forma de redes sinápticas ampliamente interconectadas. Las espinas dendríticas son protrusiones citoplasmáticas ricas en actina consideradas el locus donde ocurren la gran mayoría de las sinapsis, ya que reciben la mayor parte de las conexiones excitatorias en el sistema nervioso central. Las espinas dendríticas de neuronas hipocampales son estructuras llamativamente plásticas que contienen un gran número de moléculas involucradas en la señalización post-sináptica y por ende en la plasticidad sináptica. Los cambios en la morfología y el tamaño de las espinas dendríticas se relacionan con la intensidad de la conexión sináptica. Teniendo en cuenta que las espinas dendríticas representarían las estructuras de mayor importancia en relación al procesamiento de la información en el SNC, cualquier insulto en las sinapsis puede llevar a alteraciones morfológicas de las espinas y, por consiguiente, a la función cognitiva, como sucede en el envejecimiento y los desórdenes neurodegenerativos (Bellot et al., 2014; Calabrese, Wilson, & Halpain, 2006; A. D. Levy, Omar, & Koleske, 2014). Clásicamente, las espinas dendríticas consisten en una cabeza relativamente esférica unida a la dendrita por un cuello estrecho. Sin embargo, poseen una gran diversidad morfológica, particularmente en neuronas piramidales. Según su morfología y basándose principalmente en las dimensiones de cuello y cabeza, pueden subdividirse en las siguientes categorías (**Figura 5**):

- Tipo I: *stubby* o gruesa y corta, sin una constricción evidente entre la cabeza y la unión a la dendrita.
- Tipo II: *mushroom* o con forma de hongo, con una cabeza grande y un cuello estrecho.
- Tipo III: *thin* o finas y alargadas, con una cabeza pequeña y cuello estrecho.

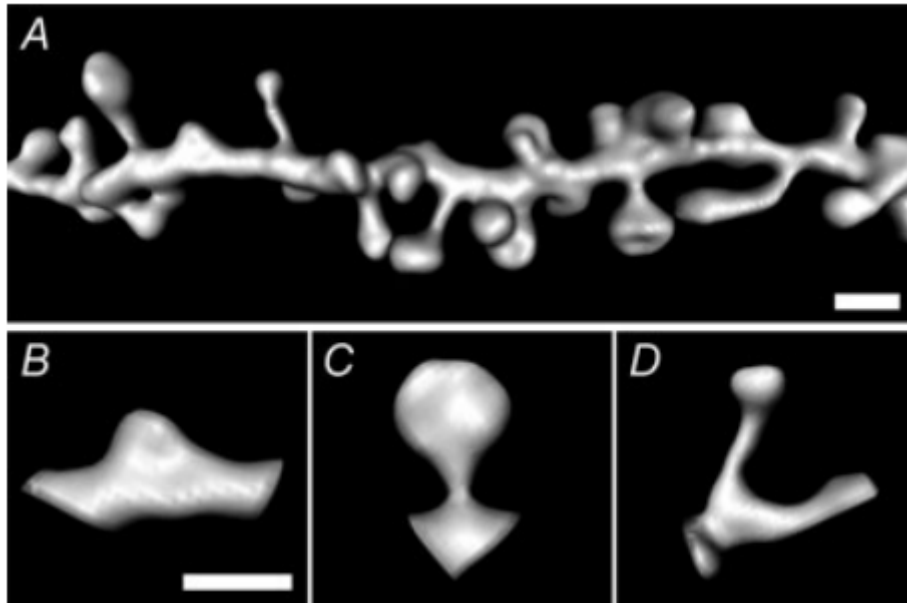


Figura 5. Clasificación de espinas dendríticas según su morfología. (A) Reconstrucción tridimensional de porción dendrítica terciaria de una neurona piramidal CA1 de ratón que expresa la proteína fluorescente GFP. (B-D) Reconstrucciones representativas de espinas de tipo I, II y III respectivamente. Barra de escala= 1μm. *Figura tomada de (McKinney, 2010)*

El tamaño de las espinas correlaciona con la intensidad de las sinapsis. Siendo que las espinas de mayor tamaño contienen mayores áreas post-sinápticas (PSDs) con una mayor densidad de receptores AMPA y se encuentran yuxtapuestos a terminales con mayor disponibilidad de neurotransmisores (Honkura, Matsuzaki, Noguchi, Ellis-Davies, & Kasai, 2008), estas espinas tienen mayor probabilidad de producir corrientes post-sinápticas más intensas y, por ende, tener mayor influencia en la actividad

neuronal (McKinney, 2010). A su vez, la plasticidad estructural se encuentra fuertemente asociada con la edad. En comparación con ratones adultos, los animales jóvenes (en una etapa que podría asimilarse al período adolescente en el humano) poseen una mayor variabilidad en el tamaño de espinas, mayor motilidad (dinamismo) y niveles más altos de formación y eliminación (*turnover*). En el mismo sentido, la pérdida de estabilidad de espinas dendríticas en la adultez es un fenómeno común a los principales desórdenes neurológicos y psiquiátricos que cursan con impedimento cognitivo, déficits en la percepción y en la memoria, como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer (A. D. Levy et al., 2014).

Los componentes de la unidad neurovascular

En la regulación de la homeostasis neuronal y los mecanismos de plasticidad mencionados anteriormente, las células de la vasculatura y de la glía cumplen un rol fundamental, interactuando de distintas maneras, físicamente y a través de señales parácrinas, por factores solubles o vesículas extracelulares (VEs) (Iadecola, 2013; E. Levy, 2017).

Cada componente se encuentra íntima y recíprocamente comunicado, de manera anatómica y funcional, constituyendo la llamada unidad neurovascular (UNV). La UNV comprende múltiples tipos celulares incluyendo células vasculares (endotelio, pericitos), glía (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y neuronas. En la **Figura 6** se esquematiza la UNV al nivel de los capilares cerebrales (Muoio, Persson, & Sendeski, 2014; Nelson, Sweeney, Sagare, & Zlokovic, 2016). Funcionalmente, esta UNV constituye una estructura que regula el flujo sanguíneo cerebral a nivel local, la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, el remodelado neurovascular y la respuesta neuroinmune (Kapasi & Schneider, 2016; Price, Norris, Sompol, & Wilcock,

2017). Las células endoteliales, mediante la presencia de uniones estrechas y transportadores específicos, forman la BHE limitando activamente el intercambio de moléculas entre el cerebro y la periferia, no sólo la entrada de elementos celulares como glóbulos rojos y leucocitos sino también de metabolitos y nutrientes que afectan el funcionamiento neuronal (Zlokovic, 2011). Los pericitos rodean las paredes de los vasos sanguíneos, lo cual permite la regulación de su diámetro y consiguiente flujo sanguíneo (Keaney & Campbell, 2015).

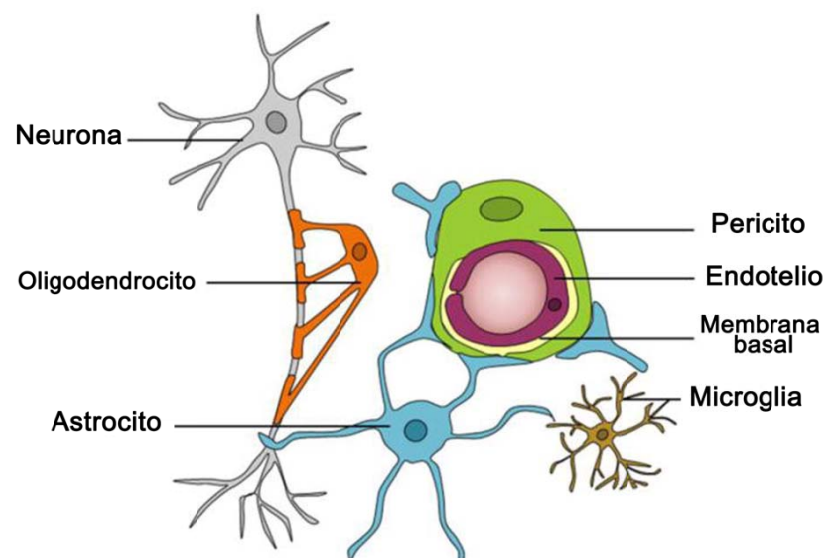


Figura 6. Representación ilustrativa de la UNV. El compartimento vascular está delimitado por astrocitos, pericitos y células endoteliales. Estas últimas se asocian mediante uniones estrechas constituyendo la característica principal de la BHE y la microglía en las cercanías permite el sensado de moléculas de la circulación así como del tejido nervioso. *Modificada de (Nelson et al., 2016).*

Reportes de la literatura asocian el consumo de dietas de tipo occidental (enriquecidas en grasas saturadas e hidratos de carbono) con alteraciones en la plasticidad vascular

y neuronal, constatándose la disfunción de la microvasculatura en diversos modelos de roedores expuestos a dietas HFD (L. R. Freeman & Granholm, 2012; Nelson et al., 2016).

Astroglía

Los astrocitos cumplen un amplio rango de funciones en la homeostasis cerebral. Como se expuso más arriba, forman parte de la UNV constituyendo dominios territoriales en los cuales, a través de sus procesos, contactan por un lado la vasculatura (pies astrocíticos) y por el otro el espacio peri-sináptico de un gran número de sinapsis. El contacto de los procesos astrogliales con el espacio peri-sináptico permite aislar las sinapsis y de esta manera proveer una plataforma física para la especificidad del *input* sináptico, el control local de la homeostasis de iones y neurotransmisores y el soporte metabólico para el mantenimiento de la conectividad sináptica. Los astrocitos están involucrados en la síntesis de neurotransmisores y precursores como glutamato, GABA y adenosina y son los principales responsables de la nutrición neuronal así como de la homeostasis de los iones de potasio extracelular, crítico para la excitabilidad neuronal (Verkhratsky, Rodriguez, & Parpura, 2013). La configuración espacial de los astrocitos permite que una única célula esté en contacto con aproximadamente 160000 sinapsis, teniendo en cuenta todos sus procesos, y todas ellas dependen del soporte metabólico de la misma célula astrogliar (Iadecola & Nedergaard, 2007).

Por otra parte, los astrocitos son capaces de sensor distintos tipos de insultos que le permiten montar un programa de defensa en respuesta al daño denominado astrogliosis. La gliosis reactiva se caracteriza por la proliferación e hipertrofia de los astrocitos, asociada con un aumento de los niveles de la proteína ácida fibrilar glial

(GFAP), componente principal de los filamentos intermedios que forman el citoesqueleto, y participa de la regulación de la respuesta inflamatoria local (Verkhatsky et al., 2013). Dada la relevancia de este tipo celular en la homeostasis neuronal, su disfunción se ve involucrada en el envejecimiento así como en la mayoría de los desórdenes neurodegenerativos y patologías asociadas (Lucke-Wold, Logsdon, Turner, Rosen, & Huber, 2014).

Microglía

Las células de la microglía son las células inmunes residentes en el parénquima cerebral. Fueron caracterizadas a principios del siglo XX por Pío del Río-Hortega (**Figura 7**), distinguiéndolas como células independientes de la “neuroglia” descrita por Virchow a mediados del siglo XIX como tejido conectivo y del “tercer elemento” de Ramón y Cajal, siendo las neuronas el primer elemento y los astrocitos el segundo (Perez-Cerda, Sanchez-Gomez, & Matute, 2015; Tremblay, Lecours, Samson, Sanchez-Zafra, & Sierra, 2015).

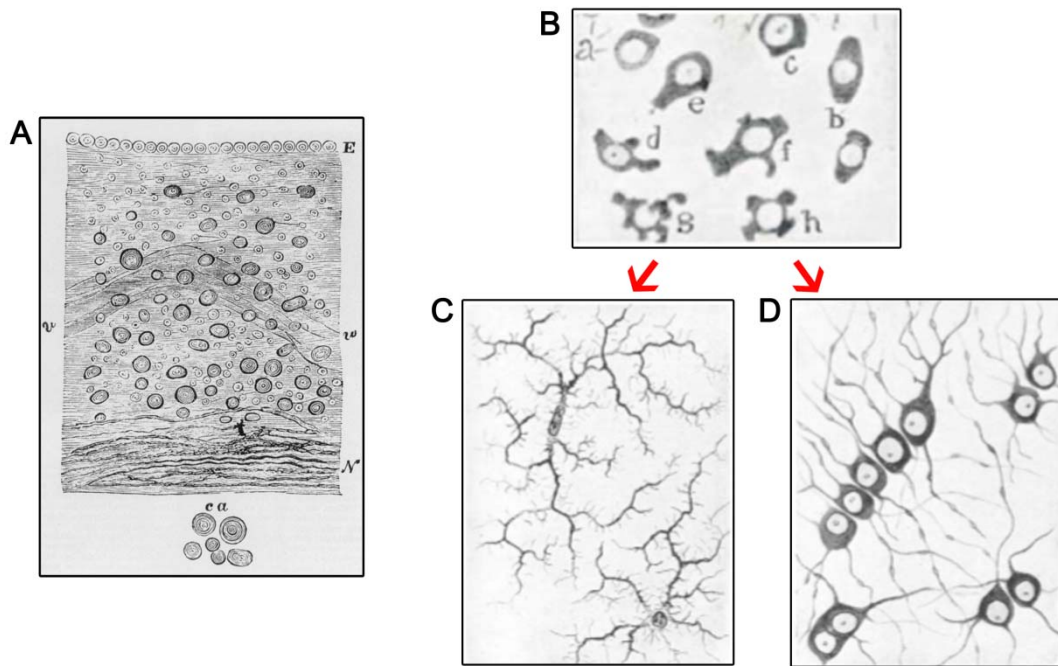


Figura 7. Descubrimiento de la microglía. (A) Ilustración de Rudolph Virchow donde se observan los “núcleos y corpúsculos de tejido conectivo o neuroglia”. (B) Ilustración del denominado “tercer elemento” de Santiago Ramón y Cajal, células que se distinguen de los astrocytos luego de la tinción con oro sublimado. Del Río-Hortega continuó el trabajo de Ramón y Cajal y Achúcarro y mediante la tinción con carbonato de plata y el método Golgi-Hortega distinguió el “tercer elemento” en microglía (C) y oligodendrocitos (D), respectivamente.

En el cerebro murino, progenitores mieloides del saco vitelino colonizan el SNC al día E9.5-10.5 y dan origen a las células de la microglía del parénquima cerebral y macrófagos perivasculares, de las meninges y del plexo coroideo y, una vez establecida, en condiciones fisiológicas, la población se mantiene a lo largo de la vida por proliferación de las células a nivel local y no por células provenientes de la circulación (Friedman et al., 2018; Ransohoff, 2016). Además del orquestado de la respuesta inflamatoria ante un insulto, la microglía cumple funciones cruciales en el correcto funcionamiento del cerebro, tanto en el desarrollo como en el cerebro adulto (Figura 8). En etapas del desarrollo, la microglía promueve el refinamiento de los

circuitos neuronales, el guiado axonal, la supervivencia neuronal mediante la secreción de factores neurotróficos y la muerte programada y remoción de los productos neuronales en consecuencia. Por otra parte, en el cerebro adulto, su funcionalidad permite la optimización de la conectividad de redes neuronales y la producción de factores de crecimiento neuromoduladores relevantes para el proceso de neurogénesis, como BDNF o el factor IGF1 (Kohman, DeYoung, Bhattacharya, Peterson, & Rhodes, 2012). La microglía participa en la modulación de la plasticidad sináptica, el aprendizaje y manteniendo las conexiones apropiadas mediante la poda sináptica (*pruning*) (Wake, Moorhouse, Miyamoto, & Nabekura, 2013). Dos propiedades de las células microgliales que subyacen a su rol en la regulación de la plasticidad neuronal es que tienen la capacidad de detectar la actividad neuronal local y regular la actividad sináptica, mediante la presencia de receptores que permiten evaluar los niveles de ATP o fluctuaciones en los niveles de neurotransmisores, especialmente de glutamato. Como consecuencia de este monitoreo de la actividad neuronal, la microglía puede responder mediante el contacto célula-célula, la liberación de vesículas extracelulares, citoquinas como $TNF\alpha$ o $IL1\beta$, factores tróficos, prostaglandinas o ROS (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011; York, Bernier, & MacVicar, 2017).

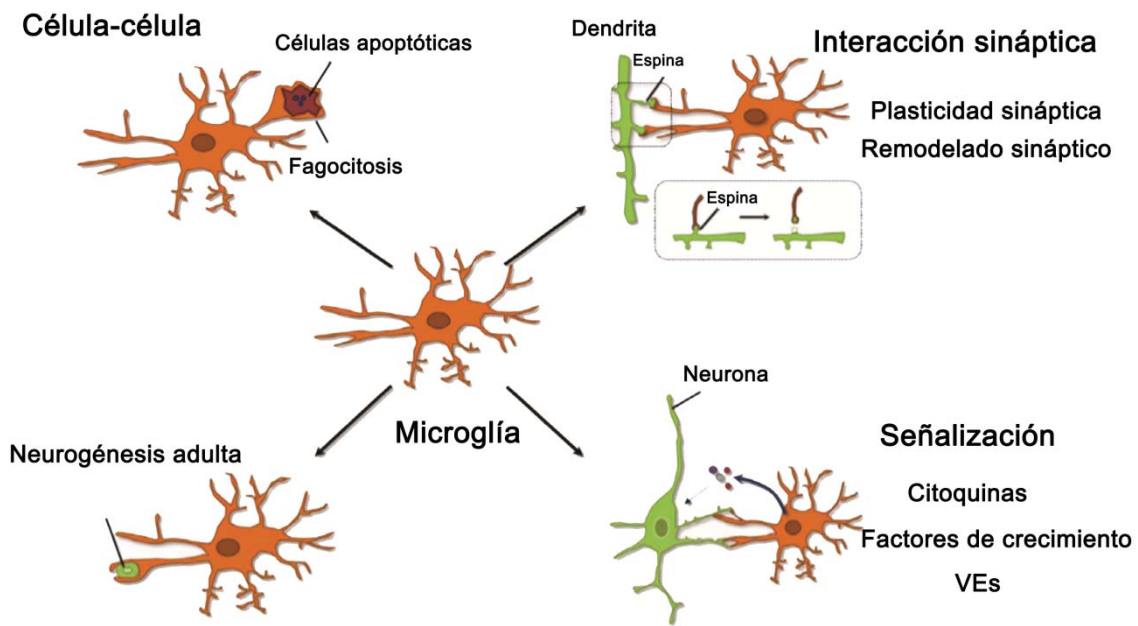


Figura 8. Rol de la microglía en la fisiología de la conectividad neuronal. Esquematzación de distintas funciones de la interacción microglía- neurona en el desarrollo y en el cerebro post-natal. *Modificado de (Kim, Son, & Mook-Jung, 2013).*

La actividad de las células microgliales depende, en última instancia, de la convergencia de señales de su ambiente que pueden promover diferentes estados o programas de funcionalidad en relación a los requerimientos de los distintos compartimientos celulares en un contexto dado. En gran parte, como ocurre en todos los tipos celulares en general, el repertorio de receptores de membrana determina la capacidad de respuesta de la célula a distintos estímulos. La microglía puede sensar la actividad neuronal, la presencia de patógenos o moléculas de daño mediante receptores de neurotransmisores, de glutamato, dopamina, purinérgicos, adrenérgicos, de PAMPs y DAMPs (receptores de patrones asociados a patógenos o moléculas de daño), TLR, receptores de citoquinas, entre otros (Kettenmann et al., 2011; Kim et al., 2013).

Si bien hay cierta controversia en la literatura (Ransohoff, 2016), en términos generales, se distinguen dos perfiles de activación de la microglía posibles en función de determinados marcadores moleculares y morfológicos y la función de las células en consecuencia. Esta nomenclatura se ha tomado a partir de las características de los macrófagos en la periferia y se distinguen dos fenotipos: un perfil de activación clásica, también llamado M1 o pro-inflamatoria, potencialmente neurotóxica y un perfil de activación alternativa, M2 o anti-inflamatoria, potencialmente neuroprotectora. La microglía clásicamente activada o M1 produce ROS, glutamato y citoquinas inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ que perpetúan el cuadro inflamatorio e inducen neurotoxicidad y la microglía M2 produce citoquinas anti-inflamatorias como IL4 , IL10 y $\text{TGF}\beta$ (**Figura 9**). Si bien se ha reportado que la microglía M1 tiene una morfología ameboide con procesos cortos y gruesos y un soma agrandado, mientras que la M2 poseería un fenotipo ramificado, con procesos largos y finos y un soma pequeño, estudios recientes han demostrado que estos parámetros morfológicos no bastarían para tal clasificación sino que deberían tenerse en cuenta otros aspectos como el comportamiento de la célula y los marcadores de superficie además de la morfología (Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2016). Se ha mostrado que el fenotipo M1 se asocia con marcadores de membrana como CD86, MHCII y el fenotipo M2 con marcadores como CD 206, Arginasa1, YM1, entre otros (Chunchai, Chattipakorn, & Chattipakorn, 2017; Tang et al., 2017).

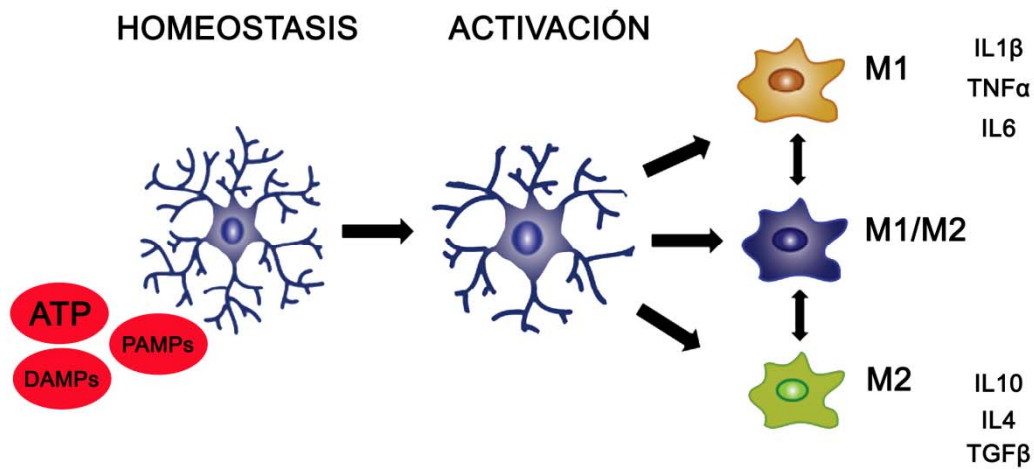


Figura 9. Activación de la microglía en respuesta al daño. En condiciones fisiológicas la microglía suele presentar una morfología ramificada que se modifica ante la activación por un insulto. En este caso, se retraen los procesos y el soma adquiere mayor tamaño, expresando distintos marcadores asociados a la naturaleza de la noxa. La microglía se vuelve reactiva por diferentes estímulos, como consecuencia de la pérdida de inhibición tónica por muerte neuronal, citoquinas, agentes infecciosos o de daño a través de los receptores PAMPs y DAMPs y la liberación de ATP sensada por receptores purinérgicos. Los diferentes estímulos pueden polarizar el fenotipo de activación de la microglía M1, M2 o un fenotipo intermedio M1/M2. *Adaptado de (Pierre et al., 2017).*

Comunicación intercelular mediante Vesículas Extracelulares

Es importante mencionar que todos los componentes celulares del SNC, así como la mayoría de los tipos celulares en general, además de la liberación de señales solubles, como neurotransmisores, citoquinas y factores de crecimiento, entre otras

moléculas, pueden comunicarse enviando señales transportadas por vesículas extracelulares. Se sabe que además de la liberación de vesículas por células especializadas en la secreción de hormonas o neurotransmisores, todas las células tienen la capacidad de liberar vesículas membranosas denominadas vesículas extracelulares y es un proceso altamente conservado desde microorganismos hasta plantas y animales (Deatherage & Cookson, 2012). Inicialmente, se describió la liberación de VEs como un mecanismo de eliminación de compuestos de desecho de la célula (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987). Sin embargo, hoy se sabe que, lejos de ser transportadoras de “residuos celulares”, las VEs representan un mecanismo de gran relevancia en la capacidad de comunicación entre distintas células, tanto en contextos fisiológicos como patológicos. Son partículas de tamaño nanométrico, delimitadas por una membrana, que tienen la capacidad de transportar moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y se liberan al espacio extracelular de manera altamente regulada, pudiendo provocar una respuesta en células receptoras en las proximidades o bien siendo transportadas largas distancias a través de los distintos fluidos. Cada tipo celular, en función del contexto en el que se encuentre, tiene la capacidad de regular finamente la biogénesis y la carga de las vesículas liberadas (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018).

Según la biogénesis y el tamaño de dichas vesículas, pueden clasificarse en distintos tipos. Las vesículas de mayor relevancia en términos de *delivery* de moléculas señalizadoras son las microvesículas (MVs) y los exosomas. Las primeras se originan por evaginación de la membrana plasmática y tienen un diámetro de 100-1000 nm, y los exosomas se originan como vesículas intraluminales en cuerpos multivesiculares (CMV), permitiendo su liberación al fusionarse con la membrana plasmática (**Figura 10**). Típicamente, tienen un diámetro de 30-100 nm. Si bien la generación de MVs y exosomas tiene lugar en distintos compartimientos celulares, los distintos tipos de biogénesis comparten componentes de la maquinaria endocítica y de formación y

transporte vesicular de la célula (Colombo, Raposo, & Thery, 2014). Como se muestra en la **Figura 10**, las maquinarias moleculares requeridas para los distintos pasos que llevan a la formación de las VEs tienen componentes en común, incluyendo el complejo proteico ESCRT (del inglés Endosomal Sorting Complex Required for Transport) y un enriquecimiento en ceramidas (van Niel et al., 2018).

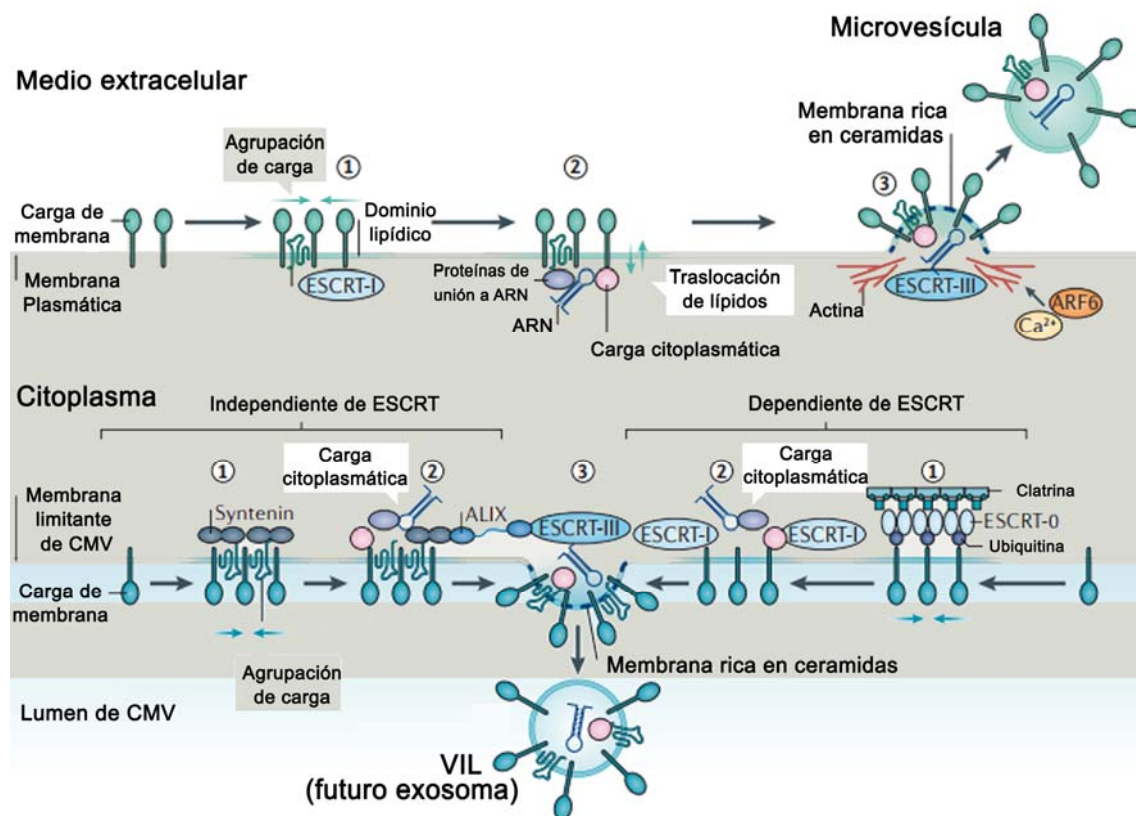


Figura 10. Biogénesis de las vesículas extracelulares. Para la generación de MVs y exosomas se requieren múltiples componentes de la maquinaria endocítica y de *sorting* para las diferentes etapas de la biogénesis. (1) Lípidos y proteínas asociadas a la membrana requeridos se encuentran formando dominios específicos de la membrana plasmática para la liberación de MVs (panel superior) y de la membrana limitante de CMV para la liberación de exosomas (panel inferior). (2) A su vez, estos microdominios participan en el reclutamiento de componentes solubles como proteínas y moléculas de ARN dirigidas a VEs. (3) La formación de dichos dominios en conjunto con los mecanismos que posibilitan la curvatura de la

membrana plasmática luego de la fusión con la porción correspondiente para a las MVs o con la del CMV para permitir la liberación de las vesículas al exterior. Los mecanismos de biogénesis involucran maquinaria endosomal como el complejo de transporte ESCRT pero con distinto grado de participación según el caso. *Modificado de (van Niel et al., 2018).*

Luego de ser liberadas, las VEs interactúan con las células *target* y promueven una diversidad de respuestas que pueden alterar su estado fisiológico o patológico. La comunicación entre células a través de VEs requiere el contacto entre sus membranas, seguido de la activación de receptores de superficie y/o la internalización del contenido de las vesículas o bien su incorporación por pinocitosis, fagocitosis o endocitosis dependiente o no de clatrina, mediada por receptores, entre otros mecanismos. Esta interacción, así como la transferencia de moléculas señalizadoras es un proceso complejo y dependerá en cada caso de las células de origen y destinatarias de las VEs así como de la naturaleza de los componentes que formen las vesículas (Mulcahy, Pink, & Carter, 2014).

En el SNC, este mecanismo se ha constatado en diversos fenómenos como en la modulación de la actividad eléctrica neuronal en comunicación con células gliales, en la respuesta inflamatoria así como en la propagación de daño asociado a patologías neurodegenerativas como EA y la enfermedad de Parkinson (Bahrini, Song, Diez, & Hanayama, 2015; Fruhbeis, Frohlich, Kuo, & Kramer-Albers, 2013; Joshi, Benussi, Furlan, Ghidoni, & Verderio, 2015; Kong et al., 2014).

OBJETIVOS

Objetivo general

Teniendo en cuenta la estrecha relación entre los desórdenes metabólicos y neurodegenerativos, el objetivo general de este trabajo de Tesis es estudiar los efectos neurológicos y conductuales de la exposición **juvenil** a una dieta **moderadamente** alta en grasas, poniendo el foco en estructuras del sistema límbico, el estatus cognitivo y emocional. Se propone, además, estudiar mecanismos específicos involucrados en la interacción entre los compartimientos microglial y neuronal y su relevancia en los fenómenos estudiados.

Objetivos específicos

Para abordar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

In Vivo

- 1- Establecer un modelo de desorden metabólico en ratones C57BL/6J, caracterizando las alteraciones metabólicas inducidas por la exposición temprana a una dieta alta en grasas (HFD).
- 2- Estudiar el impacto de la dieta HFD sobre el SNC, centrándonos en el sistema límbico: parámetros neuronales, gliales, endoteliales y sobre el perfil conductual.
- 3- Evaluar la potencial resistencia a insulina e inflamación a nivel periférico y en el sistema nervioso central.

In Vitro

- 1- Caracterizar las alteraciones inducidas en cultivos primarios de microglía por exposición a niveles elevados del ácido graso saturado palmitato como insulto metabólico, trazando un paralelismo con el modelo in vivo de exposición a la dieta HFD y así estudiar posibles mecanismos que dan lugar al contexto patológico.
- 2- Estudiar la interacción microglía-neurona mediante la liberación de vesículas extracelulares y su rol en la plasticidad estructural de cultivos neuronales de hipocampo.

CAPÍTULO I

**La exposición temprana a una dieta alta en grasas promueve alteraciones
en el sistema límbico y el fenotipo conductual de ratones C57BL/6J
adultos jóvenes**

Introducción I

Como se mencionó en la introducción general, la incidencia de los desórdenes metabólicos asociados con la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico han aumentado dramáticamente en las últimas décadas (WHO, 2015a). El exceso en el consumo de alimentos industrializados con alto contenido graso, sumado al estilo de vida sedentario, está directamente implicado en este fenómeno. Los hábitos alimenticios y la calidad de los productos ingeridos, particularmente durante el período juvenil, pueden tener un impacto en el comportamiento y en el procesamiento tanto emocional como cognitivo en la adultez, siendo de gran relevancia al aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas en humanos y modelos animales (Andersen, 2003; Vendruscolo, Gueye, Darnaudery, Ahmed, & Cador, 2010).

La obesidad y las dietas con elevado contenido en grasas se asocian con dislipidemia y alteraciones en los niveles de colesterol, contribuyendo a un estado inflamatorio y pro-aterogénico mediado, en parte, por un elevado estrés oxidativo (Welty, Alfaddagh, & Elajami, 2016). Los procesos inflamatorios periféricos y cerebrales asociados a la obesidad promueven el desarrollo de alteraciones emocionales y cognitivas (Castanon, Luheshi, & Laye, 2015). Además, niveles elevados de citoquinas inflamatorias pueden contribuir al impedimento en la señalización de insulina, agravando aún más el contexto patológico (Miller & Spencer, 2014).

Como han mostrado diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, uno de los fenómenos presentes en los desórdenes metabólicos es la neuroinflamación. La

activación de células de la astrogliá y de la microgliá en el hipocampo, entre otras áreas cerebrales, además de alteraciones en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal HPA son característicos de modelos espontáneos de diabetes tipo 1 y 2 (Beauquis et al., 2010; Beauquis, Roig, Homo-Delarche, De Nicola, & Saravia, 2006; Beauquis et al., 2008; Biessels, Kappelle, Bravenboer, & Gispen, 1994). Debido a la gran demanda de glucosa y la elevada sensibilidad a insulina, el hipocampo podría participar en el desarrollo de la resistencia a insulina central y por consiguiente, promover el envejecimiento cerebral y enfermedades asociadas a la edad como la enfermedad de Alzheimer (Dineley, Jahrling, & Denner, 2014; Fehm, Kern, & Peters, 2006). Se reconoce a la amígdala y al hipocampo como estructuras cerebrales sensibles al estrés (L.P. Spear, 2000) y que experimentan modificaciones cruciales durante el período adolescente (LeDoux, 2003; Maren, 2005). Por ende, los desórdenes metabólicos que comienzan en el período juvenil pueden interferir en la maduración del sistema límbico e inducir, de esta manera, alteraciones cognitivas y emocionales de largo plazo. Hasta el presente, se cuenta con escasa información acerca de este fenómeno y el objetivo central de esta Tesis es estudiarlo en profundidad.

Teniendo en cuenta los antecedentes citados y con el objetivo de estudiar los efectos neurológicos y conductuales de la exposición juvenil a una dieta moderadamente alta en grasas, en este primer capítulo de tesis abordaremos los siguientes objetivos específicos:

- Establecer un modelo de desorden metabólico en ratones C57BL/6J, caracterizando las alteraciones metabólicas inducidas por la exposición temprana a una dieta HFD.

- Evaluar la potencial resistencia a insulina a nivel periférico y en el sistema nervioso central.
- Estudiar las alteraciones provocadas por la dieta HFD en el SNC: parámetros neuronales, gliales y en el perfil conductual.

Diseño experimental Capítulo I

Para abordar los objetivos correspondientes al primer capítulo de esta tesis, se procedió como se muestra en el esquema experimental de la **Figura 11**. Ratones macho de la cepa C57BL/6J de 1 mes de vida fueron expuestos a la dieta HFD (cuya composición se detalla en la sección de Materiales y Métodos) o bien continuaron con la dieta control de bioterio (CD) hasta los 5 meses, es decir, completando 16 semanas de exposición. Al final del protocolo experimental, se registró el peso corporal, la glucemia y se obtuvieron los tejidos pertinentes para las distintas determinaciones que se muestran en la siguiente sección de Resultados. En el transcurso del último mes de exposición a la dieta se llevaron a cabo los ensayos de conducta.

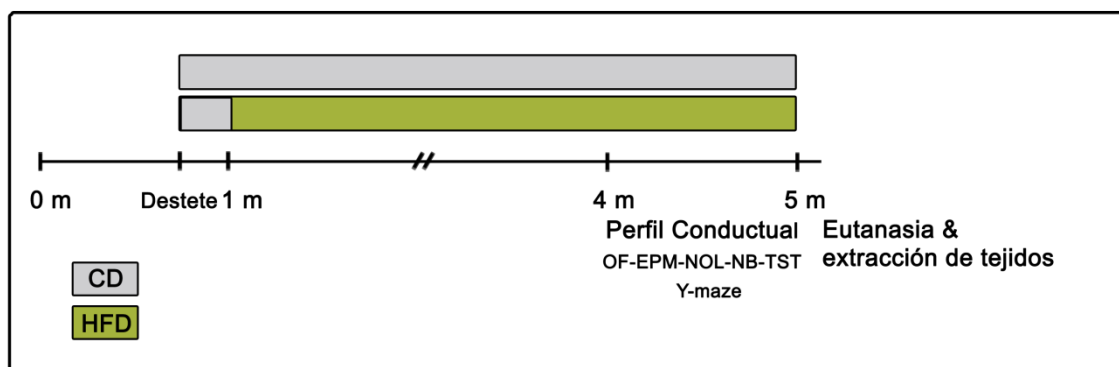


Figura 11. Esquema experimental Capítulo I. La exposición a la dieta hiperlipídica se realiza desde el primer mes de vida y hasta los 5 meses. Durante el último mes de exposición, se

realiza la batería de pruebas conductuales para los animales HFD y sus controles CD y luego se lleva a cabo la eutanasia y la extracción los tejidos pertinentes para todas las determinaciones histológicas y bioquímicas, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Resultados I

Caracterización metabólica del modelo HFD

Con el fin de estudiar el efecto de la disfunción metabólica en el SNC por exposición a una dieta hiperlipídica, el punto de partida de este trabajo requirió el establecimiento del modelo y su caracterización. A continuación se describen las variables analizadas resumidas en la **Tabla 1**. Uno de los datos que más llamaron nuestra atención fue que, si bien los ratones expuestos a la dieta HFD mostraron alteraciones en numerosos parámetros metabólicos, no se encontraron diferencias en el peso corporal luego de las 16 semanas de dieta. Por otro lado, tampoco se encontró un aumento en la glucemia, que sólo mostró una tendencia no significativa en comparación con los ratones expuestos a la dieta control. Para profundizar en el metabolismo de la glucosa a nivel sistémico, si bien el cálculo del coeficiente de resistencia a insulina HOMA no mostró diferencias entre ambos grupos experimentales, tanto la insulina sérica como el contenido pancreático medidos por RIA fueron elevados en el grupo HFD, sin alteraciones en la masa total del páncreas extraído, sugiriendo una potencial resistencia a la insulina. En relación al perfil lipídico, mientras que no se encontraron variaciones en los niveles de triglicéridos en los grupos experimentales, se constató un aumento en los niveles de colesterol total y c-HDL (la lipoproteína más representativa en roedores) (Camus, Chapman, Forgez, & Laplaud, 1983) en el suero de los ratones HFD. Además, la actividad de la enzima proaterogénica LpPLA2 (del inglés

Lipoprotein-associated phospholipase A2) se encontró elevada en los ratones expuestos a la dieta hiperlipídica ($p < 0.01$).

En lo que respecta a los niveles de citoquinas inflamatorias circulantes, los niveles de IL1 β o TNF α no mostraron diferencias entre los grupos experimentales al final del período de exposición a la dieta a los 5 meses de edad.

Parámetro	CD	HFD
Peso final (g)	31.240 $\pm$ 0.46	30.23 $\pm$ 0.40
Glucemia (mg/dl)	142.10 $\pm$ 9.23	150.41 $\pm$ 6.15
Insulina pancreática (ng/mg)	1.32 $\pm$ 0.19	1.74 $\pm$ 0.08 *
Insulinemia (ng/ml)	0.36 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.02 *
HOMA	4.18 $\pm$ 0.41	4.84 $\pm$ 0.52
Peso páncreas (g)	0.16 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
Triglicéridos (mg/dl)	93.75 $\pm$ 9.72	86.50 $\pm$ 4.57
Colesterol (mg/dl)	92.25 $\pm$ 14.45	142.75 $\pm$ 8.14 *
c-HDL (mg/dl)	70.75 $\pm$ 14.07	109.75 $\pm$ 6.09 *
LpPLA2 (μ mol/ml.h)	33.04 $\pm$ 1.19	37.82 $\pm$ 0.95**
TNF α (pg/ml)	39.88 $\pm$ 5.70	38.12 $\pm$ 5.36
IL1b (pg/ml)	198.28 $\pm$ 64.62	247.7 $\pm$ 41.66

Tabla 1. Parámetros metabólicos. Los parámetros séricos y la medición de insulina pancreática fueron determinados luego de 6 horas de ayuno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ cuando se compara con el grupo CD.

Alteraciones a nivel hepático

El hígado es uno de los órganos más importantes en la regulación de la homeostasis de la glucosa y el estudio de parámetros histológicos y fisiológicos permite dar cuenta de las consecuencias metabólicas inducidas por la dieta.

En primer lugar, se realizó una tinción con los colorantes Hematoxilina y Eosina en cortes de hígado incluidos en parafina y ésta mostró indicios de un posible aumento en el contenido lipídico de los hepatocitos de los ratones expuestos a la dieta HFD en relación a los de dieta control (**Figura 12**). Durante el procesamiento de deshidratación del tejido requerido para llevar a cabo esta técnica se produce la extracción o lavado de los lípidos que se evidencia por los espacios perinucleares blancos y éstos se vieron con mayor frecuencia en cortes de animales HFD, denotando una posible mayor acumulación de lípidos en este grupo.

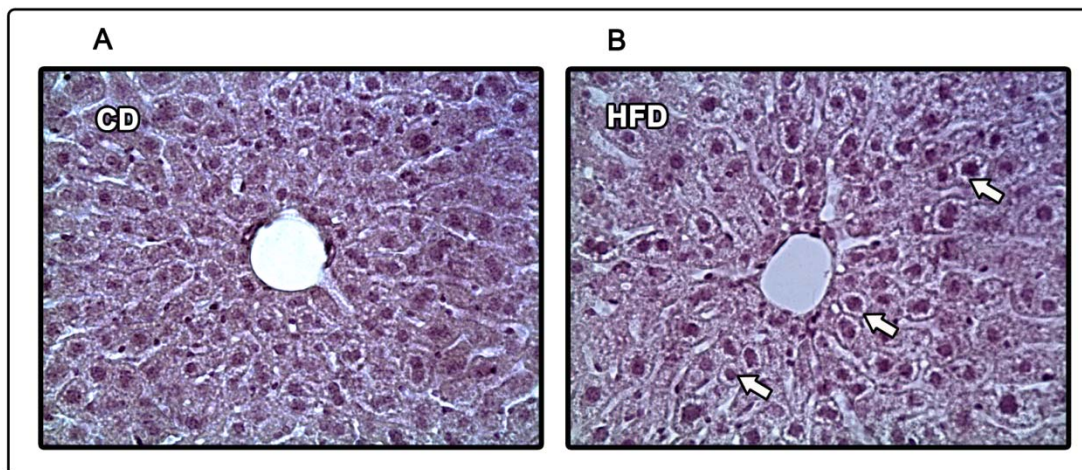


Figura 12. Potencial acumulación de lípidos en hepatocitos de ratones HFD. (A-B) Fotomicrografías representativas de los grupos CD y HFD luego de una tinción de Hematoxilina & Eosina en cortes histológicos de hígados incluidos en parafina. Las flechas blancas evidencian espacios que habrían contenido lípidos.

Luego, nos propusimos profundizar el estudio del efecto de la dieta HFD en el metabolismo y particularmente en relación a la calidad de la respuesta a la hormona insulina. Como resultado de la activación de la vía de señalización de insulina, el receptor de insulina promueve la autofosforilación de sus sustratos IRS1 e IRS2, llevando en última instancia a la activación de Akt, uno de los integradores centrales de la señalización por insulina (Vadas, Burke, Zhang, Berndt, & Williams, 2011). La evaluación de los niveles de fosforilación de Akt es una medida ampliamente aceptada para la determinación de resistencia a insulina. Teniendo en cuenta lo anterior, procedimos a evaluar los niveles hepáticos de fosforilación de Akt en respuesta al estímulo con insulina y encontramos que dichos niveles se encontraban disminuidos en los ratones expuestos a la dieta hiperlipídica en un 40% aproximadamente ($p < 0.01$), mostrando un impedimento en la capacidad de respuesta a la hormona (**Figura 13A**). En línea con este resultado, encontramos un aumento del doble en los niveles de la fosforilación inhibitoria (ser636/639) del sustrato IRS1 ($p < 0.01$; **Figura 13B**).

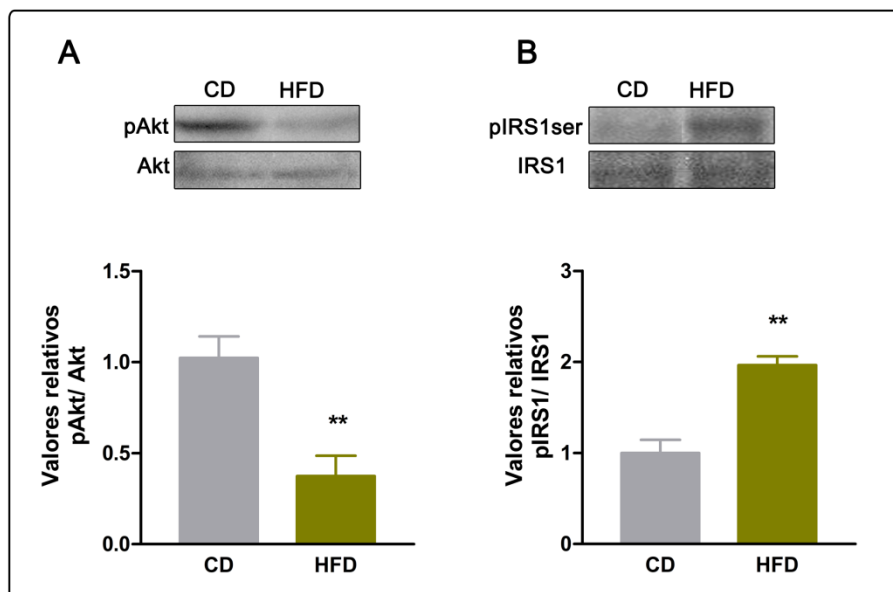


Figura 13. La dieta HFD promueve alteraciones en la vía de señalización de insulina a nivel hepático. (A) Activación de Akt en homogenatos de hígado luego de la estimulación periférica con 5UI/kg de insulina. Panel superior: bandas de una membrana representativa correspondiente a Akt en su forma fosforilada (pAkt) o total (Akt) y en el panel inferior su respectivo análisis de densidad óptica a partir de 4 muestras por grupo. (B) Activación de IRS1 en homogenatos de hígado luego de la estimulación periférica con 5UI/kg de insulina. Panel superior: bandas de una membrana representativa correspondientes a IRS1 en su forma fosforilada (pIRS1ser) o total (IRS1) y en el panel inferior su respectivo análisis de densidad óptica a partir de 4 muestras independientes por grupo.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ cuando se compara con el grupo CD (test de t de Student).

La literatura señala a las citoquinas inflamatorias dentro de las moléculas que participan activamente en la disminución en la capacidad de señalización de insulina (Watanabe, Nagai, & Takatsu, 2013; Wilcox, 2005). Evaluamos los niveles de expresión del ARN mensajero de $\text{TNF}\alpha$ como un signo de inflamación a nivel hepático. Como muestra el gráfico de barras de la **Figura 14**, encontramos mayores niveles de expresión de la citoquina inflamatoria $\text{TNF}\alpha$ mediante la técnica de RTqPCR en homogenatos de hígado (**Figura 14**, $p < 0.05$).

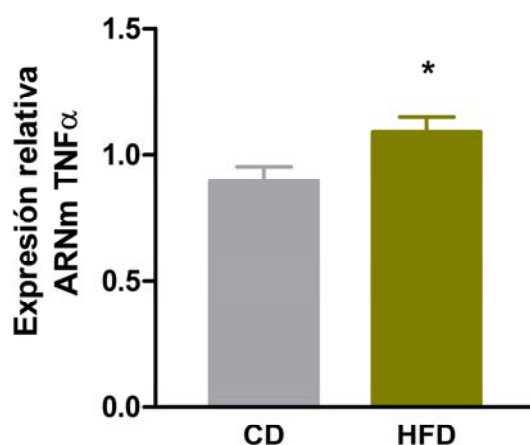


Figura 14. Aumento de los niveles de expresión de ARNm de TNF α en el grupo HFD.

Cuantificación de la expresión relativa del mensajero de la citoquina pro-inflamatoria TNF α evaluada por RT-qPCR a partir de homogenatos de hígado empleando el método de Pfaffl (8 muestras por grupo). * $p < 0.05$ con respecto al grupo control, test de t de Student para dos muestras.

Caracterización del fenotipo conductual asociado al consumo de HFD

Luego de haber obtenido información acerca de las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, nos propusimos evaluar el efecto que dicho contexto metabólico tiene en el espectro conductual. Con el fin de estudiar el efecto de la dieta HFD en el estado cognitivo de los animales, realizamos una serie de pruebas comportamentales relacionadas con la funcionalidad de estructuras cerebrales de gran relevancia como el hipocampo y la amígdala. En primer lugar evaluamos la habilidad de los ratones para construir un nido, un comportamiento que se encuentra altamente conservado en los roedores y está asociado al desarrollo de actividades de la vida cotidiana (ADL, del inglés *activities of daily living*). Para evaluar esta conducta, los ratones fueron alojados de manera individual durante 24 horas y provistos de material para la construcción de nido (**Figura 15A**). Luego de 24 horas evaluamos la presencia de un nido y su posición, así como el grado de utilización del material provisto para la tarea. Como se ilustra en la imagen, la mayoría de los animales expuestos a la dieta control realizan un nido en el extremo opuesto a la posición inicial del material, que coincide con la localización más oscura de la jaula, como se espera. En contraste, los ratones expuestos a la dieta alta en grasas presentaron un impedimento en esta conducta, que se evidenció tanto por la ausencia de un nido propiamente dicho (Test de Chi² $p < 0.05$) así como por el porcentaje de material utilizado (**panel 15B**). En diversos casos, el

material provisto para la construcción de nido se encontró completamente ignorado por los animales HFD, en la misma disposición en que fue puesto inicialmente.

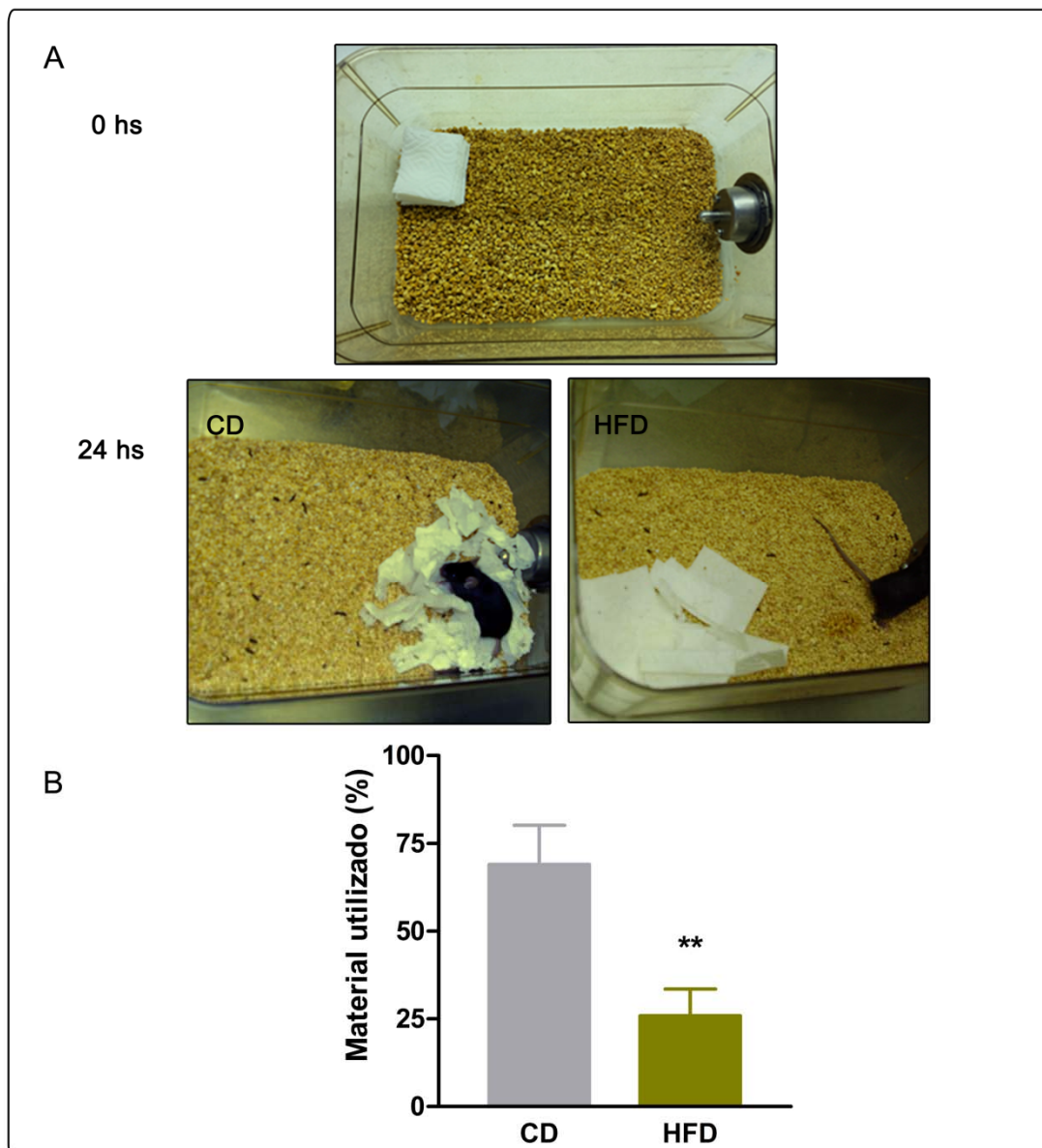


Figura 15. Los animales HFD presentan deficiencias en el desarrollo de actividades asociadas a la vida cotidiana como la construcción de nido. (A) Fotografías representativas del test de construcción de nido. En el panel superior se muestra la configuración inicial del ensayo, la jaula con el material provisto donde los ratones se alojan individualmente, y en el panel inferior se muestran fotografías representativas luego de 24 hs

correspondientes a los grupos CD y HFD. El grupo HFD se asoció con la ausencia de un nido aparente (Test de χ^2 , $p < 0.05$). **(B)** Cuantificación del material utilizado para la tarea, analizado como material roído en una superficie mayor a 1 cm². ** $p < 0.01$ cuando se compara con el grupo CD aplicando el test de t de Student.

Dados los resultados de este último test, indicativos de una alteración conductual general, procedimos a estudiar un tipo de comportamiento dependiente de hipocampo como es la memoria espacial. La memoria espacial de corto plazo fue evaluada mediante el test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto (NOL, del inglés *novel object localization recognition test*). Como se muestra en el esquema de la **Figura 16A**, este test consiste en dos fases de exploración de 10 minutos de duración separadas por un intervalo de 60 minutos. En la fase de adquisición o T1 los objetos idénticos se ubican en una determinada configuración espacial y en la fase de testeo o T2, uno de los objetos es relocalizado. Es importante destacar que en estudios de exploración novedosa, tanto distintas especies de roedores como monos, muestran que los animales exploran en mayor proporción el estímulo que ofrece una novedad y este fenómeno es dependiente de la integridad del hipocampo (Eichenbaum et al., 2007). A partir del gráfico de barras en el mismo panel, puede observarse que el grupo expuesto a la dieta HFD mostró un peor desempeño en el test, ya que el tiempo de exploración del objeto relocalizado no fue diferente de la exploración esperada por azar (50%), sugiriendo un impedimento en el reconocimiento de una dada localización espacial. Es importante destacar que no se encontraron diferencias en la distancia total recorrida para ninguno de los grupos o fases del test (**Tabla 2**), y por otro lado, los ratones tampoco mostraron preferencia por ninguno de los objetos o localizaciones en el T1 ($p = 0.17$ y $p = 0.18$ para la exploración de uno de los objetos idénticos en comparación con la exploración teórica del 50 %, de los grupos CD y HFD respectivamente). De manera similar, en un dispositivo diferente (esquema de la

Figura 16B) se evaluó el número de entradas al brazo novedoso de un laberinto en forma de “Y” y se encontró que los ratones expuestos a la dieta HFD nuevamente no lo exploraban en una mayor proporción a la dada por el azar, mientras que los animales control visitaban más el brazo novedoso, como es de esperar. Se descartaron impedimentos motores dado que la distancia total recorrida no mostró diferencias en ninguno de los casos (**Tabla 2**). En esta oportunidad, como el intervalo entre los ensayos T1 y T2 fue de 4 hs, los resultados obtenidos en el test implicarían una potencial alteración de la memoria espacial de plazo intermedio (**Figura 16B**).

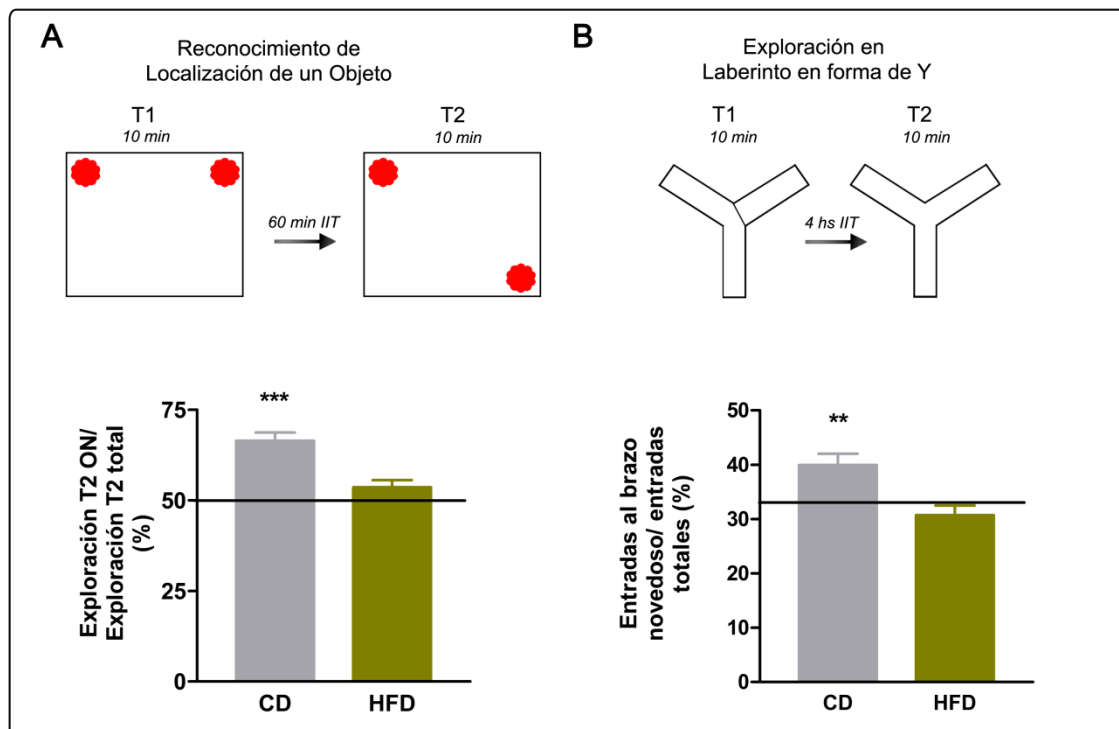


Figura 16. La exposición a la dieta HFD promueve alteraciones en la memoria espacial.

(A) En el panel superior, esquema del Test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. Configuración espacial de las fases T1 y T2, con un intervalo inter-ensayo (IIT) de una hora luego del cual se re-localiza uno de los objetos idénticos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de la exploración del objeto re-localizado o novedoso (ON), expresado como porcentaje de la exploración de ambos objetos en total. *** $p < 0.001$ Test de t

de Student para una muestra, con una media teórica del 50%. **(B)** En el panel superior, esquema del Test de exploración en un laberinto en forma de Y. Configuración espacial de las fases T1 y T2, con un intervalo inter-ensayo de 4 horas luego de las cuales se permite la exploración de un brazo novedoso. En el panel inferior se muestra la cuantificación del número de entradas al brazo novedoso, expresado como porcentaje del número total de entradas a cualquiera de los 3 brazos. ** $p < 0.01$ Test de t de Student para una muestra, con una media teórica del 33.3%.

	CD	HFD	p-valor
NOL			
Distancia total T1 (m)	17.89 ± 3.81	14.18 ± 2.52	0.44
Distancia total T2 (m)	14.40 ± 1.09	13.69 ± 2.88	0.69
Laberinto en Y			
Distancia total T1 (m)	23.68 ± 2.06	25.44 ± 2.21	0.58
Distancia total T2 (m)	4.64 ± 0.97	5.09 ± 0.68	0.71

Tabla 2. Controles de locomoción y exploración en los dispositivos utilizados, expresados en metros (m).

Por otra parte, abordando el espectro emocional de la conducta asociado a la disfunción metabólica inducida, continuamos estudiando el efecto de la dieta mediante la utilización de pruebas validadas para la evaluación de aspectos relacionados con ansiedad y depresión. En particular, para estudiar el componente asociado con ansiedad, realizamos el test de exploración en un laberinto elevado en cruz (EPM, del inglés *elevated plus maze*), donde dos de los brazos se encuentran flanqueados por paredes mientras que los otros dos brazos se encuentran abiertos, como se puede observar en el esquema de la **Figura 17A**. En esta configuración, los ratones

expuestos a la dieta HFD presentaron una exploración disminuida en los brazos abiertos del laberinto (**Figura 17A**, $p < 0.05$), que representan el área más iluminada, expuesta y, por lo tanto, ansiogénica, mientras que el número total de entradas así como el número de entradas a los brazos cerrados no fue diferente entre los grupos ($p = 0.99$ y $p = 0.48$, respectivamente). Este resultado sugiere la existencia de un comportamiento relacionado con la ansiedad como producto de la exposición a la dieta HFD. A su vez, se realizó el Test de Campo Abierto (OF, del inglés *open field*) y no se constataron diferencias en la distancia total recorrida, lo cual permite reforzar el hecho de que las alteraciones mencionadas anteriormente son independientes de la capacidad locomotora de los ratones de ambos grupos. Si bien en este último caso no se encontraron diferencias en la distancia recorrida en el centro de la arena, podemos decir que el OF es un test de menor especificidad en la evaluación de la ansiedad en comparación con el EPM (**Figura 17B**).

Por otra parte, realizamos el test de suspensión de la cola (TST, del inglés *tail suspension test*), un test ampliamente utilizado para validar fármacos antidepresivos donde el tiempo de inmovilidad o *freezing* del ratón está asociado con la desesperanza o un menor esfuerzo por intentar escapar de una situación indeseada. En esta prueba, el grupo HFD mostró un aumento significativo en este parámetro en comparación con el grupo control (**Figura 17C**, $p < 0.05$).

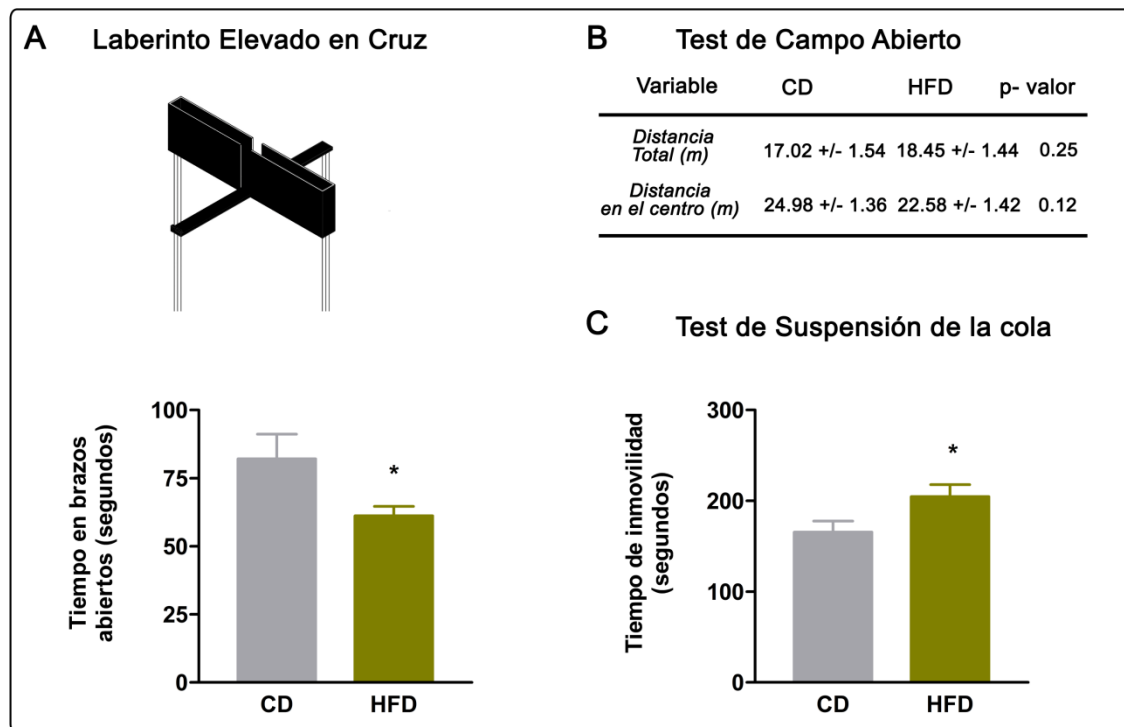


Figura 17. El consumo de una dieta enriquecida en grasas tiene efectos en componentes del procesamiento emocional de la conducta. (A) Panel superior: esquema del laberinto elevado en cruz para evaluar el comportamiento asociado a la ansiedad. Panel inferior: cuantificación del tiempo de exploración de los brazos abiertos (Test de t de Student * $p < 0.05$ con respecto al grupo control). (B) En la tabla se muestra la distancia recorrida tanto en la totalidad como en el centro de la plataforma del campo abierto (Test de t de Student). (C) Gráfico de barras que muestra el tiempo de inmovilidad en el test de suspensión de la cola. Test de t de Student * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

A partir de todos los ensayos conductuales realizados, estamos en condiciones de concluir que las alteraciones observadas no se relacionan con un impedimento motriz o motivación para el desarrollo de los ensayos, ya que la locomoción no se encontró alterada en ninguno de los dispositivos utilizados. Dado que los grupos experimentales no difirieron en cuanto al peso corporal al final de la exposición a la dieta control o a la

HFD, el desempeño en la Prueba de suspensión de la cola tampoco puede asociarse con dificultad de movimiento debido al mayor peso.

Actividad neuronal en la amígdala luego de la exposición a HFD

En lo que respecta a las conductas relacionadas con ansiedad y depresión, exploramos la posible intervención de alteraciones en la actividad de la amígdala, ya que esta estructura ejerce el principal control emocional sobre el comportamiento (Boitard et al., 2015). Para ello, estudiamos la actividad neuronal mediante la inmunohistoquímica para el factor de transcripción c-Fos en la amígdala basolateral. Encontramos un aumento en el número de núcleos c-Fos positivos en el caso de los animales expuestos a la dieta HFD, como se muestra en la **Figura 18**. Esta hiperactivación de la amígdala podría estar asociada con las alteraciones emocionales que se encontraron inducidas por la exposición a la dieta hiperlipídica, mencionadas anteriormente.

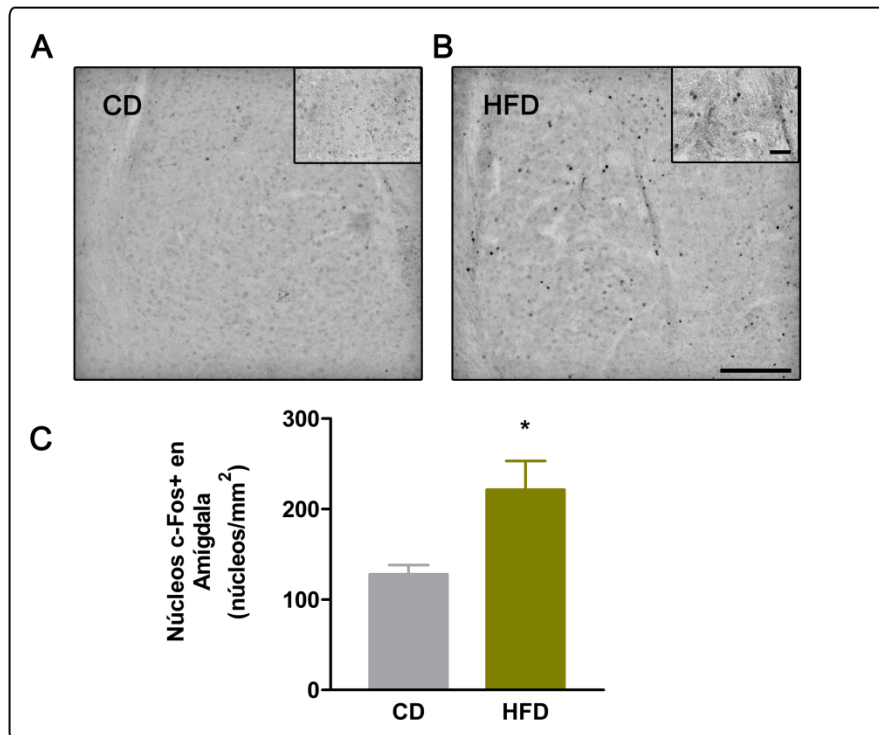


Figura 18. Aumento de la actividad neuronal en amígdala luego de la exposición crónica a la dieta HFD. Inmunohistoquímica para el marcador de actividad neuronal c-Fos en amígdala. En (A) y (B) se muestran fotomicrografías (barra de escala= 200 μ m) con sus respectivos recuadros de mayor magnificación (barra de escala= 50 μ m), representativas de cada grupo, CD y HFD. (C) Cuantificación de los núcleos positivos para c-Fos en amígdala basolateral. Test de t de Student, * $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo CD.

Caracterización de parámetros hipocámpales

Volumen del hipocampo

El hipocampo, como fuera mencionado en la introducción, forma parte del sistema límbico y es una estructura sumamente plástica y sensible a las señales del ambiente. Para comenzar a estudiar distintos parámetros morfológicos y fisiológicos asociados a su funcionalidad, evaluamos el volumen que ocupa la estructura. Para ello, realizamos una inmunohistoquímica para el marcador de neuronas maduras NeuN, el cual nos

permite delimitar el área de la estructura en cortes coronales y así estimar el volumen a partir de 6 cortes representativos de la estructura, el espesor del corte y el total de cortes correspondientes a la estructura hipocampal. En la **Figura 19A** puede observarse una imagen representativa y a partir del gráfico de barras correspondiente a la cuantificación en **(B)** podemos ver que no hay diferencias en el volumen del hipocampo entre los grupos expuestos a la dieta control o HFD.

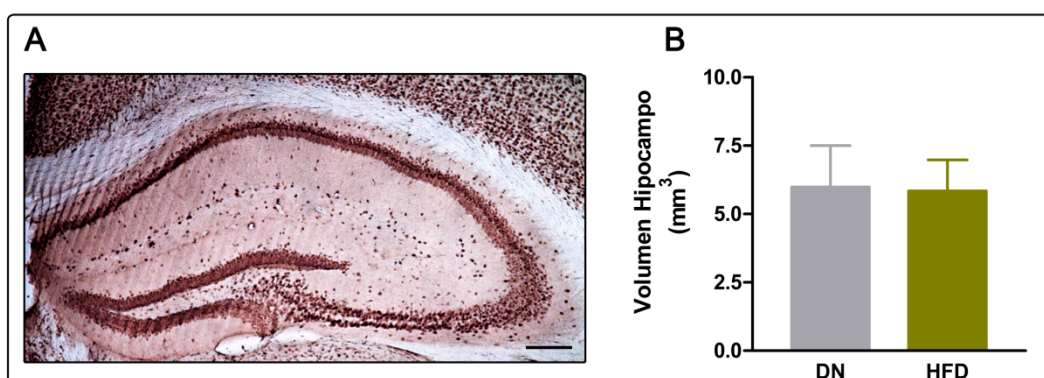


Figura 19. La exposición HFD no altera el volumen del hipocampo. (A) Imagen representativa de la inmunohistoquímica para el marcador neuronal NeuN (barra de escala= 200 μ m). (B) Cuantificación del volumen de la estructura delimitada por las capas de neuronas hipocámpales positivas para NeuN (Test de t de Student, diferencias no significativas).

Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo

Se estudió la capacidad proliferativa en la capa de células granulares del giro dentado mediante una inmunohistoquímica para el marcador Ki67 en cortes de cerebro conteniendo hipocampo. El número total de células Ki67+ disminuyó en un 30% en los ratones expuestos a la dieta HFD en relación con los animales del grupo control, como se muestra en la **Figura 20B**. Esta disminución en la tasa de proliferación se observó

tanto en hipocampo dorsal como ventral (**Figura 20C**, ANOVA 2V $p < 0.05$, efecto significativo de la dieta).

En relación al proceso de diferenciación de células recientemente divididas al linaje neuronal en el giro dentado, se examinó la expresión del marcador de neuronas jóvenes *Doublecortin* (DCX). En este caso, se evidenció una disminución de neuronas DCX+ específicamente en la subregión dorsal del hipocampo de ratones HFD versus CD ($p < 0.05$), en tanto que no se constataron diferencias en el hipocampo ventral (**Figura 20F**).

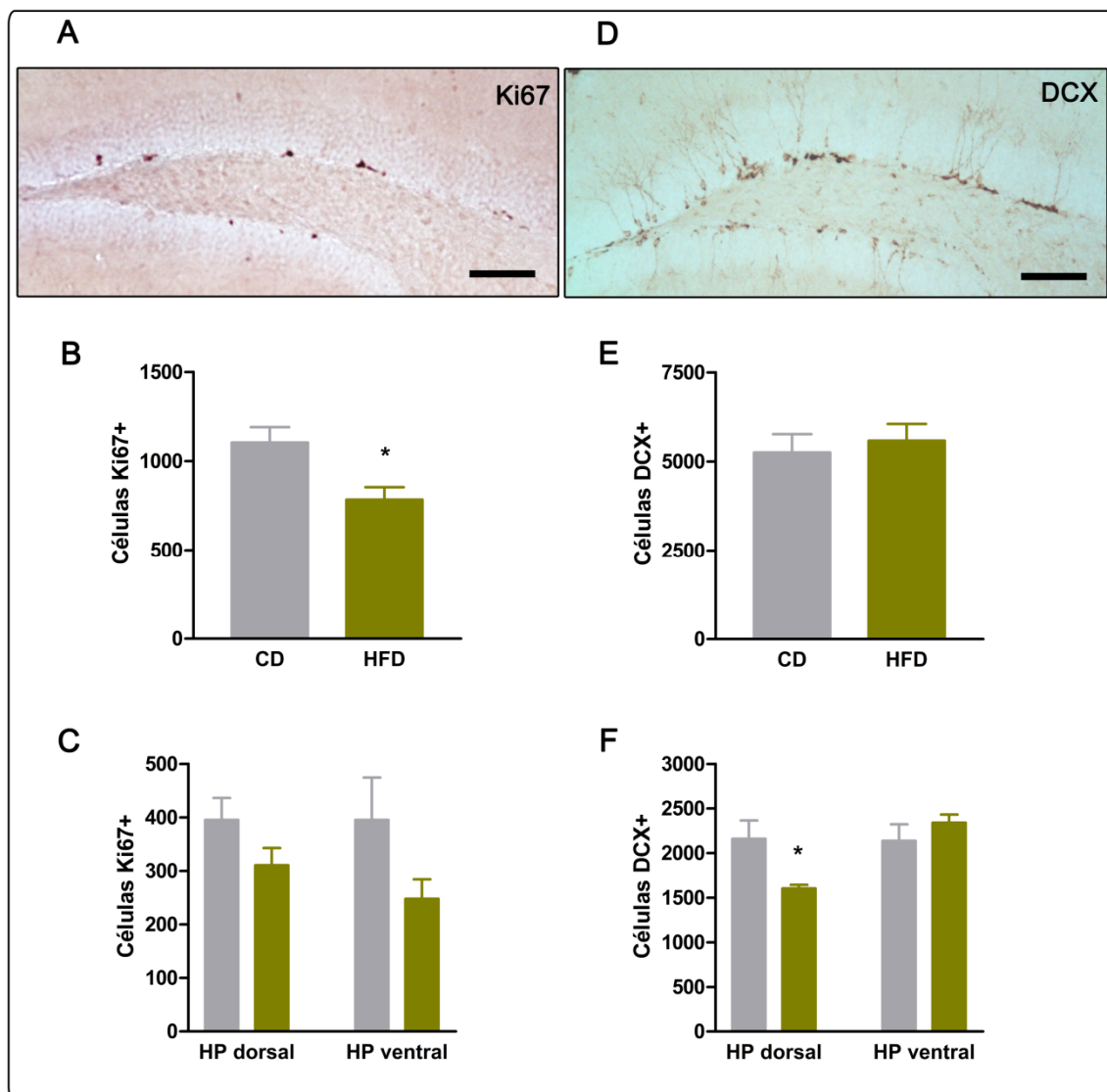


Figura 20. Los ratones expuestos a la dieta HFD presentan una menor capacidad neurogénica. (A) Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para el marcador de proliferación Ki67 (barra de escala= 100 μ m) en hipocampo. (B) Cuantificación de células positivas para Ki67 en la zona subgranular del giro dentado total (Test de t de Student, $*p<0.05$ cuando se compara HFD con CD). (C) Cuantificación de células positivas para Ki67 en la zona subgranular del giro dentado discriminando las regiones dorsal y ventral del hipocampo (pANOVA $2V<0.05$). (D) Imagen representativa de la inmunohistoquímica para el marcador de neuronas jóvenes DCX (barra de escala= 100 μ m). (E) Cuantificación de células positivas para DCX en la zona subgranular del giro dentado total (Test de t de Student), o bien discriminado las regiones dorsal y ventral del hipocampo (F). $*p<0.05$ contraste ortogonal.

Señalización de insulina en el hipocampo

Con el fin de estudiar la capacidad de respuesta a la insulina en el cerebro como resultado de la exposición a la dieta hiperlipídica, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de insulina (5 UI/kg peso corporal), tal como fue descrito para el estudio en el hígado. Los niveles de Akt en su estado fosforilado se encontraron disminuidos en un 37% en el hipocampo de los ratones HFD (**Figura 21A**, $p<0.05$). Concomitantemente, como fuera encontrado en el hígado previamente, los niveles de la fosforilación de IRS1 en serinas 636/639 fueron mayores en los animales expuestos a la dieta HFD (**Figura 21B**, $p<0.05$).

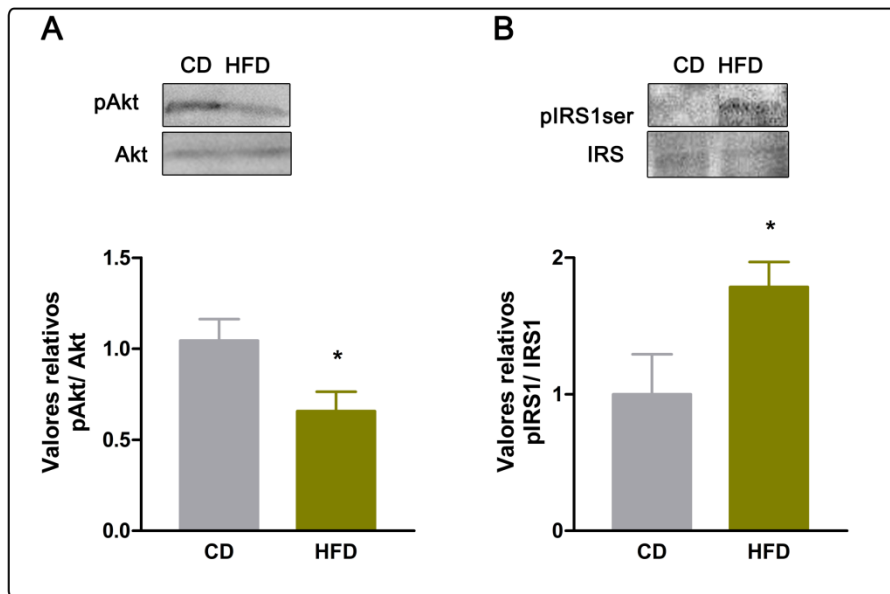


Figura 21. La dieta HFD promueve alteraciones en la vía de señalización de insulina en hipocampo. (A) Activación de Akt en homogenatos de hipocampo luego de la estimulación periférica con 5UI/kg de insulina. Panel superior: bandas de una membrana representativa correspondiente a Akt en su forma fosforilada (pAkt) o total (Akt) y en el panel inferior su respectivo análisis de densidad óptica a partir de 4 muestras por grupo. (B) Activación de IRS1 en homogenatos de hipocampo luego de la estimulación periférica con 5UI/kg de insulina. Panel superior: bandas de una membrana representativa correspondientes a IRS1 en su forma fosforilada (pIRS1ser) o total (IRS1) y en el panel inferior su respectivo análisis de densidad óptica a partir de 4 muestras independientes por grupo. * $p < 0.05$, cuando se compara con el grupo CD (test de t de Student).

Parámetros morfológicos de la vasculatura hipocampal

Posteriormente, llevamos a cabo una primera aproximación hacia el estudio de la vasculatura del hipocampo, elemento clave de la unidad neurovascular, fundamental en la fisiología de la estructura y potencialmente susceptible al daño asociado a la exposición de una dieta hiperlipídica. Para ello, realizamos una tinción con lectina de tomate acoplada a fluoresceína en cortes de cerebro coronales de animales CD y HFD

y analizamos la proporción del área ocupada por vasos (área inmunoreactiva de lectina o AIR), su complejidad y la densidad de alteraciones morfológicas, tanto en la subregión del hilio como en *stratum radiatum*. En la **Figura 22A & E** se muestran reconstrucciones representativas en hilio y *stratum radiatum* respectivamente, a partir de imágenes de distintos planos en el eje z obtenidas con un microscopio confocal. Como puede observarse en la **Figura 22**, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en los parámetros estudiados. Particularmente en el caso de las alteraciones vasculares en *stratum radiatum* podría decirse que hay una tendencia hacia un aumento en la densidad de alteraciones pero no alcanza la significancia estadística.

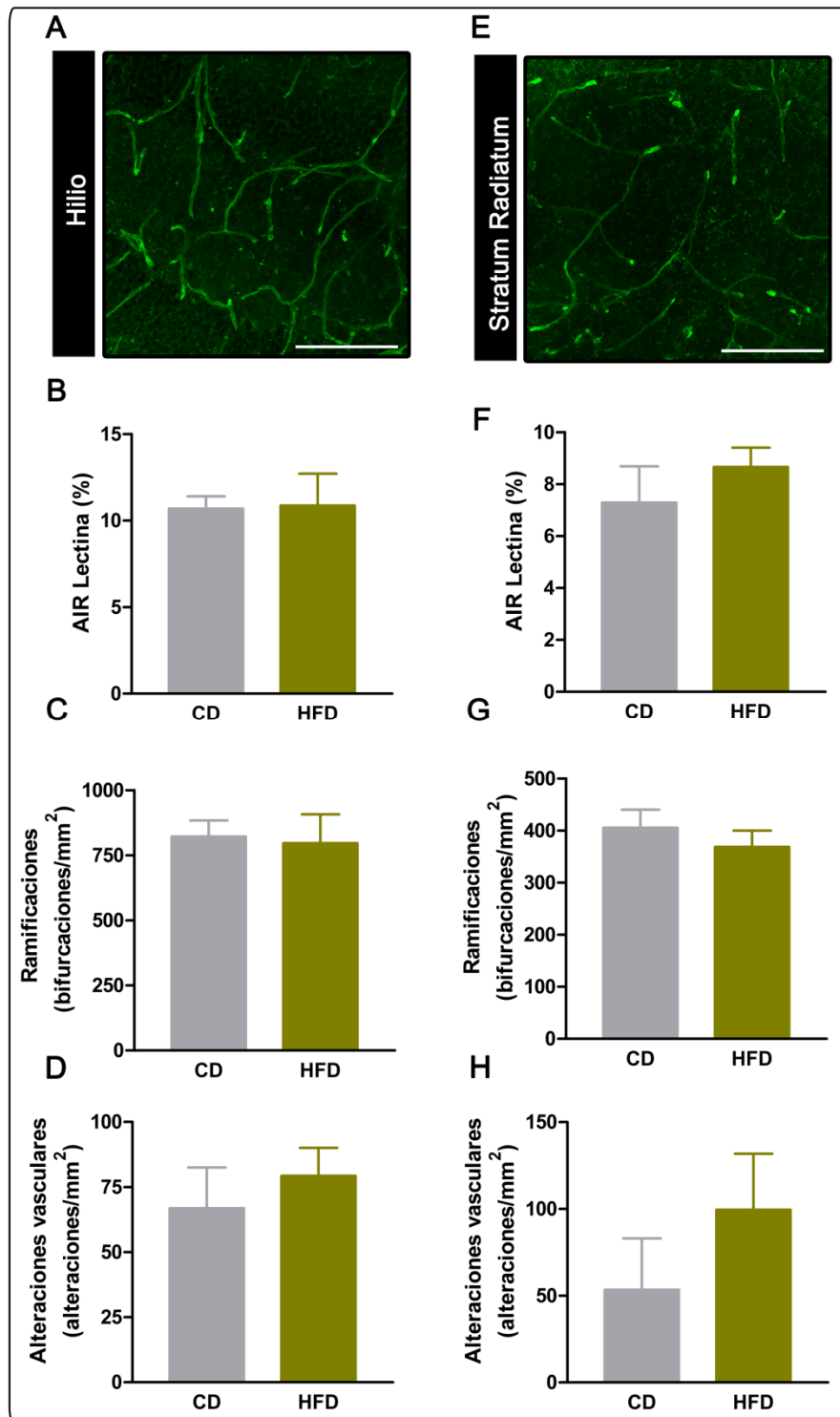


Figura 22. La dieta HFD no induciría alteraciones morfométricas en la vasculatura hipocampal. Tinción de lectina fluorescente. Imágenes representativas de la tinción de lectina en el hilio del giro dentado (A) o bien en la región de *stratum radiatum* (E) del hipocampo luego de la reconstrucción a partir de imágenes de distintos planos en el eje z,

tomadas por microscopía confocal (barra de escala= 50 μm). Cuantificación del AIR de lectina, expresada como porcentaje del área del hilio (**B**) o de *stratum radiatum* (**F**) ocupada por vasos positivos para la señal de lectina. Análisis de la complejidad de la vasculatura en el hilio (**C**) o de *stratum radiatum* (**G**), evaluada como el número de bifurcaciones de los vasos positivos para lectina, por mm^2 . Cuantificación de alteraciones vasculares como angostamientos o repliegues de los vasos sanguíneos por mm^2 de la región analizada, en hilio (**D**) o *stratum radiatum* (**H**). En todos los casos se realizaron tests de t de Student que no arrojaron diferencias significativas.

Astroglía: densidad de astrocitos GFAP positivos y área inmunoreactiva

Como se ha mencionado anteriormente, las células de la astrogliá cumplen un rol primordial en la homeostasis neuronal, y su funcionalidad puede verse afectada ante un insulto. La densidad de células astrocíticas se estudió mediante una inmunofluorescencia para el marcador GFAP. Como puede observarse en la **Figura 23**, no se observaron alteraciones en la densidad de células positivas para GFAP o bien en el área inmunoreactiva para dicho marcador en las dos subregiones estudiadas. A partir de estos resultados, no podemos descartar que la funcionalidad de este tipo celular se encuentre afectada por la exposición a la dieta, pero al menos en nuestro modelo, a los 5 meses de edad, no habría una alteración cuantitativa en la población de astrocitos positivos para GFAP.

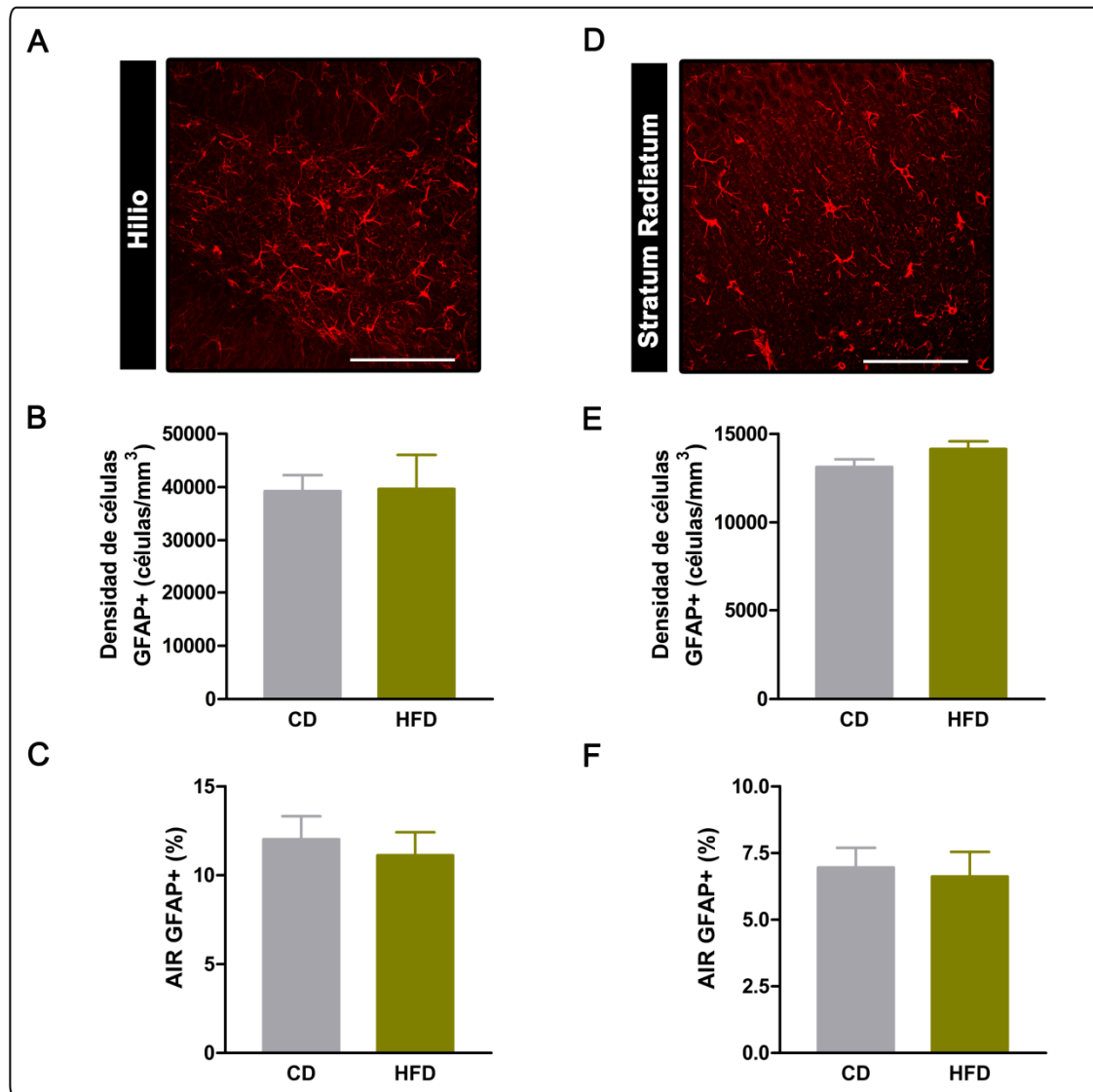


Figura 23. El número de astrocitos positivos para GFAP no se ve alterado luego de la exposición a la dieta HFD. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para el marcador astrocítico GFAP en el hilus (**A**) y en la región de *stratum radiatum* (**D**) del giro dentado del hipocampo luego de la reconstrucción a partir de z-stacks, obtenidos por microscopía confocal (barra de escala= 50 μ m). Cuantificación de la densidad de astrocitos, expresada como número de células positivas para GFAP por unidad de volumen en el hilus (**B**) y en *stratum radiatum* (**E**). Cuantificación del AIR de GFAP en hilus (**C**) y en *stratum radiatum* (**F**), expresada como porcentaje del área ocupada por células positivas para la señal de GFAP. En todos los casos se realizaron tests de t de Student que no arrojaron diferencias significativas.

Respuesta inflamatoria en hipocampo de ratones HFD: rol de la microglía.

El estudio morfológico de la microglía en el hipocampo de ratones CD y HFD fue abordado mediante la inmunohistoquímica para Iba1, marcador específicamente expresado en dicho tipo celular (**Figura 24A**). A partir de resultados obtenidos previamente en el laboratorio, identificando una vulnerabilidad diferencial según la subregión del hipocampo que se analice (Pomilio et al., 2016), la densidad de células positivas para Iba1 fue estudiada en el área del *stratum radiatum* y en el hilio del giro dentado. El número de células Iba1+ mostró un significativo aumento del 40% en la región del hilio en ratones HFD en comparación con el grupo control (**Figura 24B**), mientras que en *stratum radiatum* encontramos una tendencia no significativa al aumento de la densidad (**Figura 24D**).

El tamaño del soma de las células microgliales es un parámetro de respuesta asociado a la activación de dichas células. En ratones HFD se encontró un aumento en el área somática de las células Iba1+, en ambas subregiones del hipocampo, sugiriendo que la microglía se encontraría en un estado de activación en respuesta a la exposición a la dieta ($p<0.05$ y $p<0.001$ para hilio y *stratum radiatum*, respectivamente; **Figura 24C y E**).

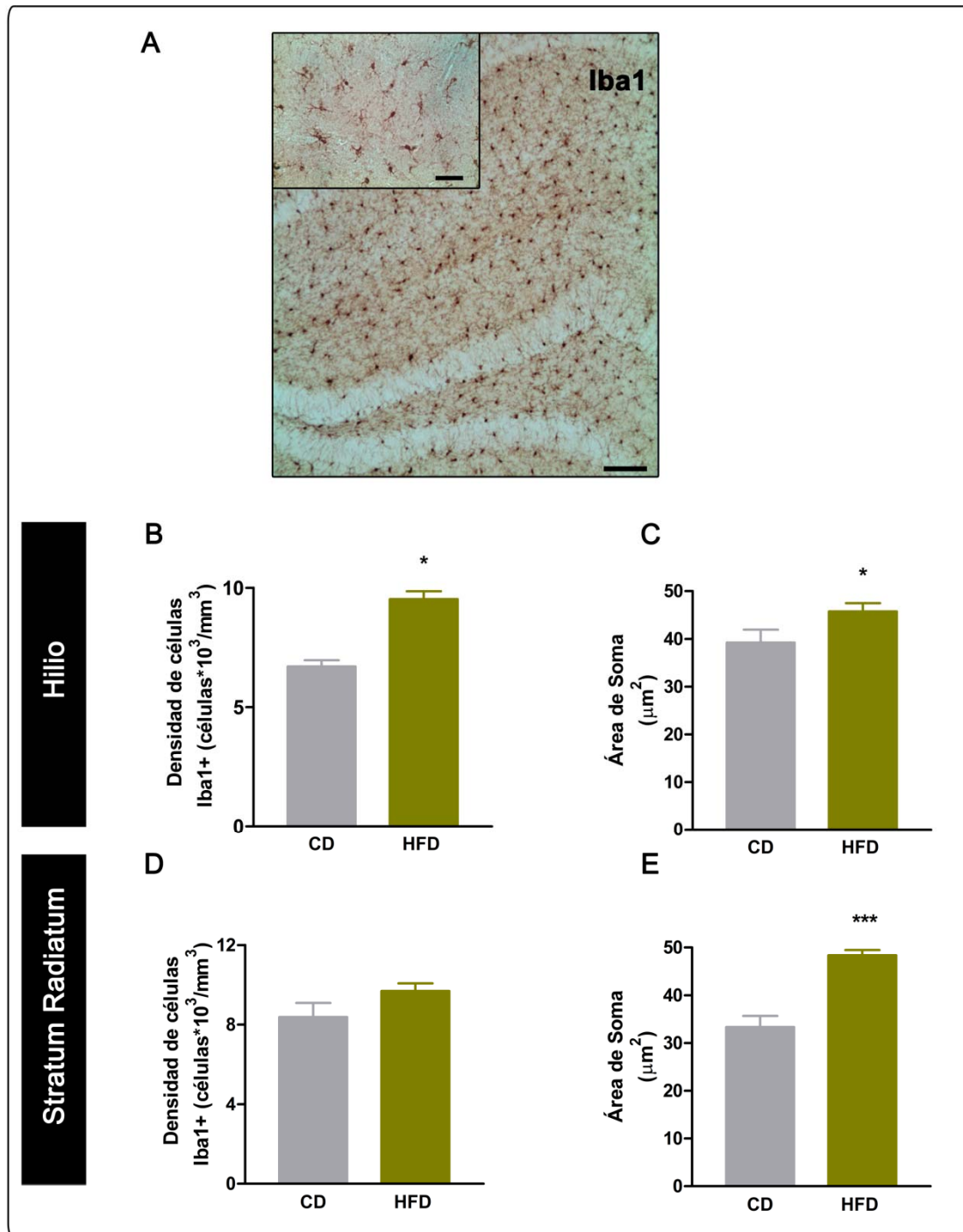


Figura 24. La dieta hiperlipídica promueve un aumento de la reactividad microglial en términos morfométricos. (A) Imagen representativa de la inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba1 (barra de escala= 100 μm) y su respectivo recuadro (barra de escala= 20 μm). **(B)** Cuantificación de la densidad de células microgliales en el hilio, expresada como el número de células positivas para Iba1 por unidad de volumen. Test de t de Student, *p<0.05 en

comparación con grupo CD. **(C)** Cuantificación del área del soma de las células positivas para Iba1 en el hilio del giro dentado del hipocampo, expresada en μm^2 . Test de t de Student, $*p<0.05$ en comparación con grupo CD. **(D)** Cuantificación de la densidad de células microgliales en la región *stratum radiatum*, expresada como el número de células positivas para Iba1 por unidad de volumen. Test de t de Student, no significativo. **(E)** Cuantificación del área del soma de células microgliales en *stratum radiatum*, expresada en μm^2 . Test de t de Student, $*** p<0.001$ cuando se compara HFD con CD.

Para profundizar en el estudio de la respuesta inflamatoria en el hipocampo, realizamos la medición de los niveles de expresión de la citoquina $\text{TNF}\alpha$ (**Figura 25A**) y de la proteína inducible por Interferón γ (IP10, conocida también como CXCL10, **Figura 25B**) por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARN mensajero de estas citoquinas no se encontraron alterados en homogenatos de hipocampo CD o HFD. Además, se evaluaron los niveles proteicos de las citoquinas pro-inflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ por ELISA en homogenatos de hipocampo. Los niveles proteicos de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ no fueron diferentes entre los grupos CD y HFD (**Figura 25C y D**).

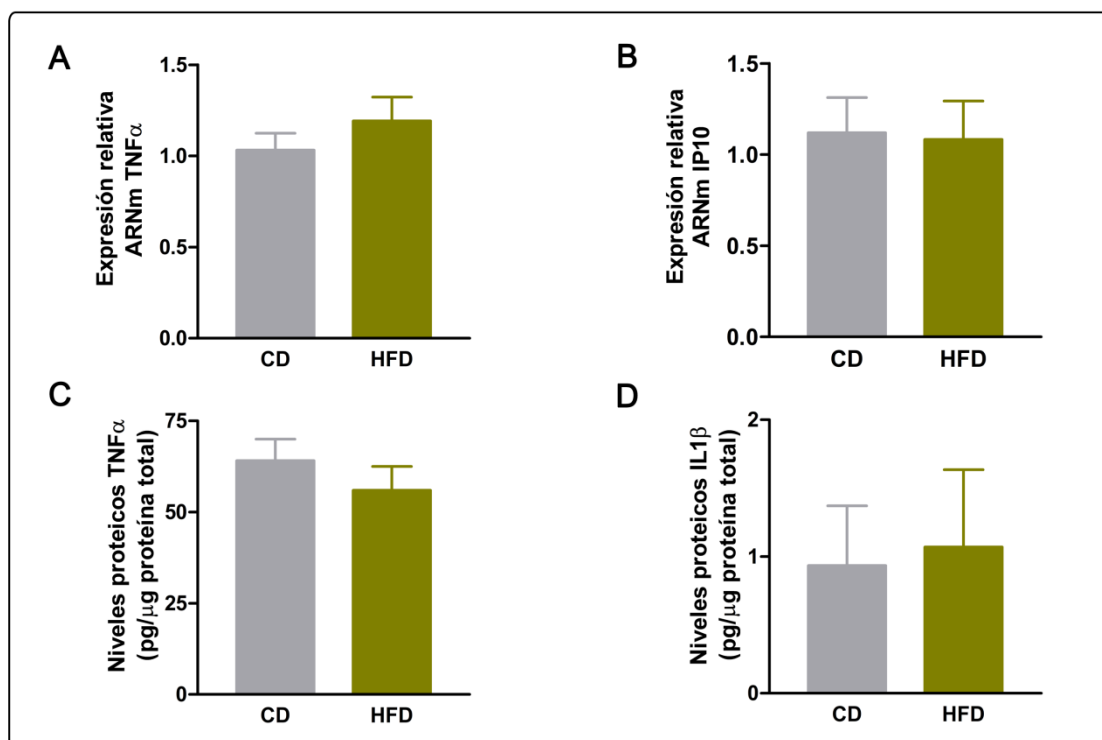


Figura 25. Los niveles de citoquinas inflamatorias no se ven alterados en homogenatos de hipocampo luego de la exposición a la dieta HFD. Expresión de ARNm de TNF α (A) y de IP10 (B) medida por RT-qPCR, relativa a la expresión de ciclofilinaB y normalizada al control CD, cuantificada por el método de Pfaffl. Se utilizaron 8 hemi-hipocampos por grupo. Cuantificación de los niveles proteicos de la citoquina TNF α (C) y de la citoquina IL1 β (D) evaluados mediante el ensayo de ELISA en homogenatos de hipocampo, expresados como pg de citoquina por unidad de masa de proteína total (μ g) en el homogenato, teniendo en cuenta 4 muestras independientes. En todos los casos se realizaron tests de t de Student que no arrojaron diferencias significativas.

Discusión I

Más allá de las evidencias clínicas y epidemiológicas, numerosos grupos de investigación trabajando en neurociencia básica en roedores han abordado el estudio del impacto de las dietas hiperlipídicas en el cerebro, enfatizando la magnitud y

relevancia de dicho fenómeno (Boitard et al., 2012; L.R. Freeman, Haley-Zitlin, Rosenberger, & Granholm, 2014; Sobesky et al., 2014; Vendruscolo et al., 2010). Sin embargo, la gran variabilidad en las cepas utilizadas, la diversidad de dietas administradas y los períodos estudiados de exposición a dichas dietas, hacen que exista una enorme heterogeneidad a la hora de discutir los resultados obtenidos en la literatura.

Este primer capítulo examina los efectos neurológicos del consumo de una dieta moderadamente elevada en grasas en el período juvenil. Este período coincide con eventos biológicos cruciales como el crecimiento corporal, cambios hormonales, maduración del sistema nervioso y establecimiento de circuitos neuronales (L.P. Spear, 2000), determinándolo como una ventana temporal de alta vulnerabilidad a estresores tanto ambientales como endógenos.

La dieta rica en grasas administrada a ratones macho C57BL/6J durante 4 meses fue capaz de inducir hiperinsulinemia, mayor producción de insulina pancreática, dislipidemia, sin impactar en el peso corporal o la glucemia. Además, la dieta HFD mostró indicios de un estado inflamatorio a nivel hepático, contribuyendo con la menor sensibilidad a la insulina en dicho tejido. Esto último, sumado a los niveles elevados de insulina en suero y páncreas, sugieren la presencia de resistencia a insulina periférica en este modelo. Se verificó también una menor capacidad de respuesta a la hormona a nivel del sistema nervioso central, en el hipocampo de ratones HFD. Por otra parte, esta dieta podría promover el desarrollo de un contexto pro-trombótico, evidenciado por el aumento en la actividad de la enzima plasmática LpPLA2, asociada a riesgo cardiovascular (Sofogianni, Alkagiet, & Tziomalos, 2018).

El desempeño en tests relacionados tanto con el estado cognitivo como emocional fue significativamente perturbado luego de la exposición a la dieta. Los ratones HFD mostraron un impedimento en la construcción de nido en comparación con los CD.

Este trabajo ha sido de los primeros en reportar alteraciones en el comportamiento de anidamiento como consecuencia de la exposición a una dieta alta en grasas. La realización de nidos es una conducta altamente conservada tanto en machos como en hembras, en contextos parentales y no parentales y se asocia con la flexibilidad cognitiva, controlada en gran medida por los niveles de motivación (Wesson & Wilson, 2011). Según la bibliografía, ratones que fueron oportunamente lesionados a nivel del hipocampo mostraron impedimento en la construcción de nido, y entre otros comportamientos típicos como excavación y acaparamiento (*burrowing* y *hoarding*), estas conductas son asociadas con dificultades en el desarrollo de actividades de la vida cotidiana o ADL, características de la enfermedad de Alzheimer (R. Deacon, 2012; R. M. Deacon et al., 2015; Filali & Lalonde, 2009). Por ende, nuestros resultados sugieren una disrupción temprana en el comportamiento motivado, indicativa de una disfunción cognitiva asociada a la ejecución de ADL.

La memoria espacial de plazo corto e intermedio también fue alterada como consecuencia de la dieta HFD. Este tipo de memoria depende fuertemente de la integridad del hipocampo y se ha distinguido al hipocampo dorsal y ventral como estructuras funcionalmente diferenciables (Fanselow & Dong, 2010; Moser & Moser, 1998). Mientras que la memoria espacial y contextual se asocian principalmente con el hipocampo dorsal, las lesiones ventrales alteran respuestas relacionadas con el estrés (Henke, 1990). Existen trabajos donde se muestra una fuerte correlación entre lesiones hipocampales (distinguiendo entre dorsal y ventral) y un pobre desempeño en ensayos de memoria espacial (Broadbent, Squire, & Clark, 2004). Nuestros resultados muestran un desempeño defectuoso de los ratones HFD en el NOL y en el test de exploración en el laberinto en forma de Y, sugiriendo cierta deficiencia en la memoria espacial.

La neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo es ciertamente un proceso clave involucrado no sólo en el estado cognitivo, la formación de memoria y la capacidad de aprendizaje, sino también en el estado emocional, los comportamientos asociados al estrés y a la depresión (Boitard et al., 2015; Papazoglou, Jean, Gertler, Taouis, & Vacher, 2015). Encontramos una disminución general en la proliferación celular en el giro dentado de los ratones HFD, que fue evaluada como el número de células positivas para Ki67 a lo largo del hipocampo. La neurogénesis se encontró particularmente afectada en el hipocampo dorsal, con un menor número de neuronas jóvenes positivas para el marcador DCX, lo cual podría explicar en parte la disfunción en la memoria espacial encontrada en ratones expuestos a la dieta HFD. Como se mencionó anteriormente, una disminuida neurogénesis se encuentra asociada con el envejecimiento (Saravia, Beauquis, Pietranera, & De Nicola, 2007), desórdenes neurodegenerativos (Beauquis et al. 2008) y específicamente con algunas condiciones psiquiátricas como la depresión (Tanti & Belzung, 2013).

A su vez, la exposición a la dieta hiperlipídica se asoció a un fenotipo emocional alterado, promoviendo un componente relacionado con ansiedad y depresión. En línea con estos resultados, se encontró una elevada actividad neuronal en la amígdala basolateral. Si bien la amígdala, en estrecha relación con el hipocampo, es un actor destacado en la compleja regulación de la respuesta al estrés y el control emocional de la conducta, sólo recientemente algunos reportes estudian el impacto de desórdenes metabólicos en el período juvenil asociado a la funcionalidad de esta estructura cerebral (Boitard et al., 2015). Los resultados de este trabajo en relación al componente de ansiedad, comportamiento tipo depresivo y la activación de la amígdala enfatizan el involucramiento de la emocionalidad en la disfunción metabólica asociada al consumo HFD durante el período peri adolescente.

Por otra parte, la inflamación representa un importante fenómeno en un abanico de condiciones patológicas. Distintos tipos de citoquinas y quemoquinas tienen una variedad de efectos negativos en la fisiología del cerebro en distintos niveles, afectando la conducta, la neurogénesis, la expresión de factores neurotróficos como BDNF y en la activación de la microglía, entre otros (L.R. Freeman et al., 2014; Russo, Barlati, & Bosetti, 2011). Además, las citoquinas inflamatorias y quinasas de estrés JNK, IKK y PKR juegan un papel clave en el desarrollo de mecanismos de resistencia a la insulina, afectando procesos de gran relevancia que involucran la homeostasis celular, viabilidad y plasticidad sináptica (Bomfim et al., 2012; de la Monte & Tong, 2014). En el sistema nervioso central, la respuesta inflamatoria está principalmente dirigida por las células residentes del sistema inmune, la microglía. La astrogliá también participa, dada su capacidad de responder a distintos tipos de insultos de un modo similar a la microglía, pero el papel de ambos tipos celulares en la promoción de la neuroinflamación puede variar según el contexto patológico y la región del cerebro que se estudie (Guillemot-Legrís & Muccioli, 2017; Gupta, Goel, Shah, & Misra, 2012). A partir de los resultados presentados en este capítulo, si bien no encontramos astrogliosis asociada a un aumento en la densidad de células positivas para GFAP o en el área inmunoreactiva de dicho marcador en dos importantes regiones del hipocampo, no podemos descartar que la astrogliá cumpla un rol en el daño asociado a la disfunción hipocampal. En contraposición a esto, sí se detectó un aumento en la densidad de células microgliales positivas para Iba1, así como un aumento en su área, indicando la reactividad de este tipo celular, al menos en términos morfológicos. Cabe destacar que los niveles de TNF α e IL1 β no se encontraron aumentados en suero o en hipocampo de ratones HFD de 5 meses, como sí lo muestran otros reportes en la literatura (Miller & Spencer, 2014). Este fenómeno resulta muy interesante por diversos motivos e implica la necesidad de estudiar en mayor profundidad la cinética de la respuesta inflamatoria en nuestro modelo. Es importante mencionar que, en

concordancia con estos resultados, Boitard y colaboradores han sugerido la noción de que la producción de citoquinas inducida por la dieta podría estar exacerbada únicamente en presencia de un insulto inmune como puede ser LPS, actuando como un segundo golpe o *hit* y no de manera basal (Boitard et al., 2014). Otra hipótesis que debería ser explorada contempla el hecho de que 4 meses de exposición a la dieta hiperlipídica podría considerarse un largo período y podría existir una dinámica temporal en los niveles de citoquinas. En este contexto, podría ocurrir que exista un pico inicial en un punto temporal anterior al analizado de los niveles de citoquinas inflamatorias, que fuera capaz de inducir daño aún en el caso de su posterior compensación. Por último, no es posible excluir la intervención de la señalización por leptina y sus receptores como es sugerido por el grupo de Del Olmo que estudia el efecto de una dieta rica en grasas en ratones adolescentes (Valladolid-Acebes et al., 2013) o bien de mecanismos alternativos a la inflamación subyacentes a las alteraciones del SNC observadas. Por ejemplo, se sabe que los ácidos grasos libres contribuyen con la toxicidad lipídica en distintos paradigmas asociados a HFD. Se ha estudiado que una única inyección de ácido palmítico puede tener efectos directos sobre el metabolismo de dopamina y serotonina en el hipocampo y la amígdala de ratones, sugiriendo la participación de vías metabotrópicas alternativas a través de los receptores de ácidos grasos e independientemente de la vía inflamatoria canónica mediada por el receptor TLR4 (Moon et al., 2014). Por otra parte, lipoproteínas que han sido encontradas aumentadas por el consumo de dietas grasas así como productos de glicosilación avanzada y lipoproteínas oxidadas podrían actuar directamente sobre receptores TLR o bien sobre sitios alternativos, promoviendo cambios gliales y/o neuronales así como vasculares (Velloso et al., 2015). Si bien nosotros no encontramos alteraciones morfológicas relacionadas con un proceso angiogénico o bien con aberraciones vasculares estructurales en el hipocampo, no

podemos excluir al compartimento vascular de su involucramiento en el desarrollo de la patología asociada al consumo de la dieta HFD.

Fisiológicamente, en un cerebro intacto, la microglía ramificada es esencial en el establecimiento de un nicho neurogénico exitoso, de manera tal de promover la proliferación de precursores neurales, su diferenciación y supervivencia e integración al circuito hipocampal (Santos, Beckman, & Ferreira, 2015). Los resultados de este capítulo muestran una mayor activación microglial en la subregión del hilio del giro dentado, región aledaña al nicho neurogénico, sugiriendo por un lado un fenotipo asociado a una pérdida de función en relación al rol trófico y de soporte de la microglía ramificada en el proceso neurogénico, y por otro lado, un fenotipo asociado a una ganancia de función en relación a los efectos patológicos del perfil pro inflamatorio de la microglía reactiva. Estos resultados estuvieron asociados a una disminuida proliferación en la ZSG, sumada a una menor diferenciación de neuronas jóvenes en el hipocampo dorsal. Es interesante notar que investigaciones emergentes asocian la disfunción microglial con condiciones psiquiátricas y éstas se encuentran a su vez asociadas al desarrollo de desórdenes neurodegenerativos. Un apartamiento de la homeostasis microglial ocurre tanto en patologías neurodegenerativas asociadas al envejecimiento o bien durante procesos inflamatorios como consecuencia de estrés, infecciones o infarto, todos fenómenos que pueden converger en trastornos asociados a la depresión (Yirmiya, Rimmerman, & Reshef, 2015). La activación microglial en el hipocampo podría jugar un rol crítico en la relación entre patologías metabólicas y neurológicas y merece ser investigada en profundidad.

CAPÍTULO II

Dinámica de la respuesta inflamatoria por exposición juvenil a una dieta alta en grasas. Cambios tempranos en ratones C57BL/6J.

Introducción II

Como consecuencia de los resultados obtenidos en la primera parte de esta Tesis, y en consonancia con una gran parte de la bibliografía, podría afirmarse que los fenómenos asociados a la alimentación enriquecida en grasas promueven un conjunto de alteraciones metabólicas con efectos posiblemente directos e indirectos sobre el SNC. En diversos trabajos se ha postulado a la inflamación como uno de los fenómenos involucrados en la promoción o bien la profundización del daño asociado a la disfunción cerebral en contextos de sobrecarga de nutrientes (de la Monte & Tong, 2014; Guillemot-Legris & Muccioli, 2017).

Atendiendo a la hipótesis de que la exposición crónica a la dieta HFD pueda provocar una respuesta inflamatoria temprana que sea soslayada en el transcurso de un período de exposición más prolongado, y dada la relevancia de esta ventana temporal en la plasticidad hipocampal, en el desarrollo y remodelado de los circuitos neuronales en el SNC, los objetivos específicos de este capítulo son:

- Evaluar el efecto de la exposición a la dieta HFD en el estado inflamatorio a nivel periférico y central, en un período acotado de 6 semanas, previo a la adultez.
- Evaluar alteraciones provocadas por la dieta HFD en dicho período en el sistema nervioso central, particularmente asociadas con la conectividad hipocampal.

Diseño experimental II

Para abordar los objetivos propuestos en este segundo capítulo de la Tesis, un grupo de ratones macho de la cepa C57BL/6J fue expuesto o bien a la dieta HFD o bien a la dieta control hasta los dos meses de edad. Como se muestra en el esquema experimental (**Figura 26**), el protocolo comenzó a partir del destete (21 días) y continuó durante 6 semanas. En el transcurso de las últimas dos semanas de exposición se realizaron las evaluaciones conductuales mediante el test de exploración en el laberinto elevado en cruz y el test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. Luego, se evaluó el peso corporal y la glucemia a punto final y se llevó a cabo la eutanasia de los animales con la correspondiente extracción de los tejidos a analizar.

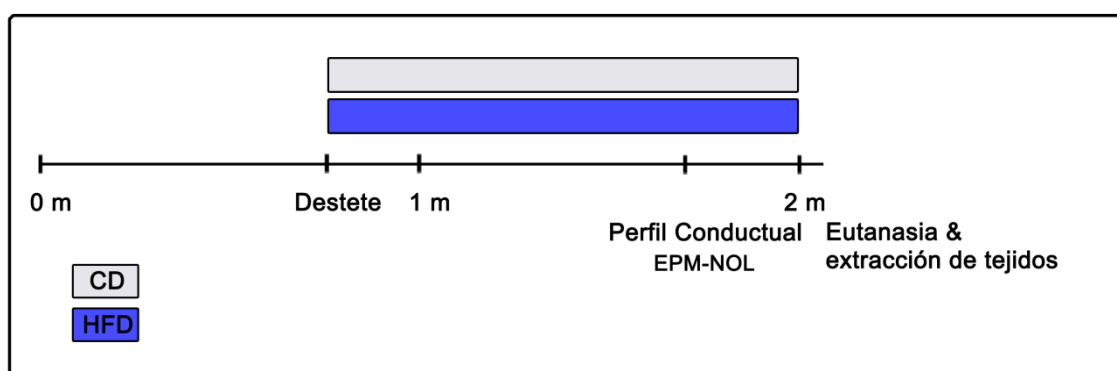


Figura 26. Esquema experimental Capítulo II. La exposición a la dieta hiperlipídica se realizó desde el destete y hasta los 2 meses de vida. Durante las últimas semanas de exposición, se realizaron los tests conductuales para los animales HFD y sus controles CD y luego se llevó a cabo la eutanasia y la extracción los tejidos pertinentes para las determinaciones histológicas y bioquímicas, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Resultados II

En la primera parte de este capítulo se describirán los resultados de algunos parámetros que nos permiten tener una noción del estado metabólico como consecuencia del consumo hiperlipídico a los 2 meses de edad, que se detallan en la **Tabla 3**. De la misma manera que con el protocolo prolongado, luego de ser expuestos durante 6 semanas a la dieta HFD, los animales no mostraron diferencias en el peso corporal. Sin embargo, en este caso sí se detectó un aumento de la glucemia que se vio acompañado de un menor contenido de insulina en el páncreas y una menor masa total de páncreas extraído. Los niveles séricos de la citoquina pro-inflamatoria IL1 β mostraron un marcado aumento al final de este período, a los dos meses de edad (**Tabla 3**, $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo CD).

Parámetro	CD	HFD
Peso final (g)	24.23 $\pm$ 0.52	23.97 $\pm$ 0.44
Glucemia (mg/dl)	177.10 $\pm$ 5.47	196.89 $\pm$ 7.63*
Insulina pancreática (ng/mg)	1.78 $\pm$ 0.14	1.36 $\pm$ 0.05*
Peso páncreas (g)	0.19 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01*
TNF α (pg/ml)	34.64 $\pm$ 2.44	38.96 $\pm$ 7.45
IL1b (pg/ml)	182.06 $\pm$ 84.50	1108.45 $\pm$ 319.64*

Tabla 3. Parámetros séricos y contenido de insulina pancreática. Los parámetros séricos y la determinación de insulina pancreática fueron determinados luego de 6 horas de ayuno. * $p < 0.05$, cuando se compara el grupo HFD con el grupo CD.

Neuroinflamación en el hipocampo

En línea con nuestra hipótesis y habiendo constatado que el contexto metabólico luego de 6 semanas de exposición a la dieta hiperlipídica se asocia con una importante inflamación a nivel sistémico dada por los niveles elevados de la interleuquina 1 β , el paso siguiente consistió en evaluar el estado inflamatorio a nivel del hipocampo. Para ello, en primer lugar, estudiamos los niveles de expresión de las citoquinas TNF α e IL1 β mediante RT-PCR en tiempo real a partir de homogenatos de hipocampo entero.

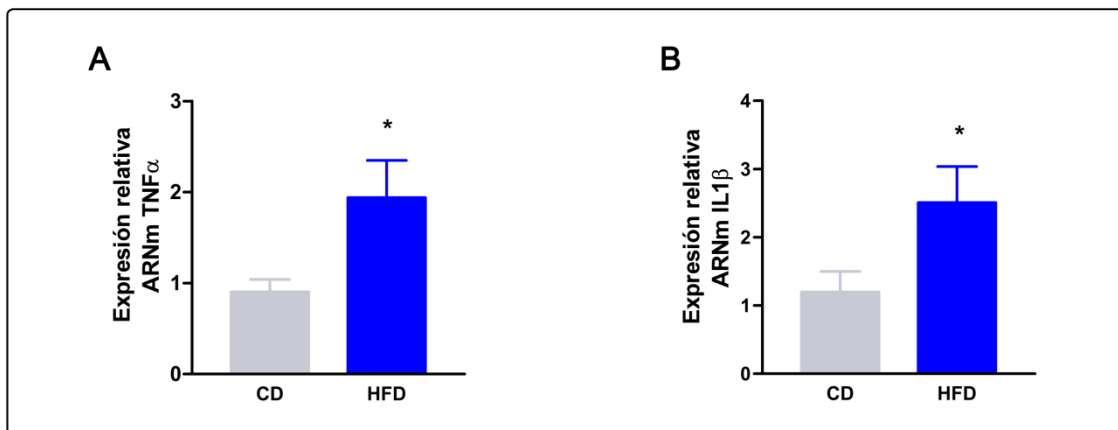


Figura 27. La dieta HFD promueve un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias en el hipocampo. Cuantificación de la expresión relativa del mensajero de la citoquina pro-inflamatoria TNF α (A) o IL1 β (B) evaluada por RT-qPCR a partir de homogenatos de hipocampo y analizada por el método de Pfaffl. Se analizaron 8 muestras por grupo. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control (test de t de Student).

Como se puede observar en la **Figura 27**, se encontró un aumento significativo de aproximadamente el 100-150 % en la expresión del ARN mensajero de ambas citoquinas (TNF α e IL1 β , paneles A y B respectivamente). Por otra parte, se realizó una inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba1 sobre cortes coronales

conteniendo hipocampo y se analizó la densidad de células positivas para dicho marcador y el área del soma celular en la subregión del hilio del giro dentado hipocampal, como una medida de reactividad microglial en términos morfológicos. A los 2 meses, el número de células Iba1+ no varió entre los grupos experimentales como se observa en el gráfico de barras de la **Figura 28C**. Sin embargo, al igual que luego del protocolo HFD prolongado, el área del soma de dichas células se vio aumentado en la región hilar del hipocampo (**Figura 28D**).

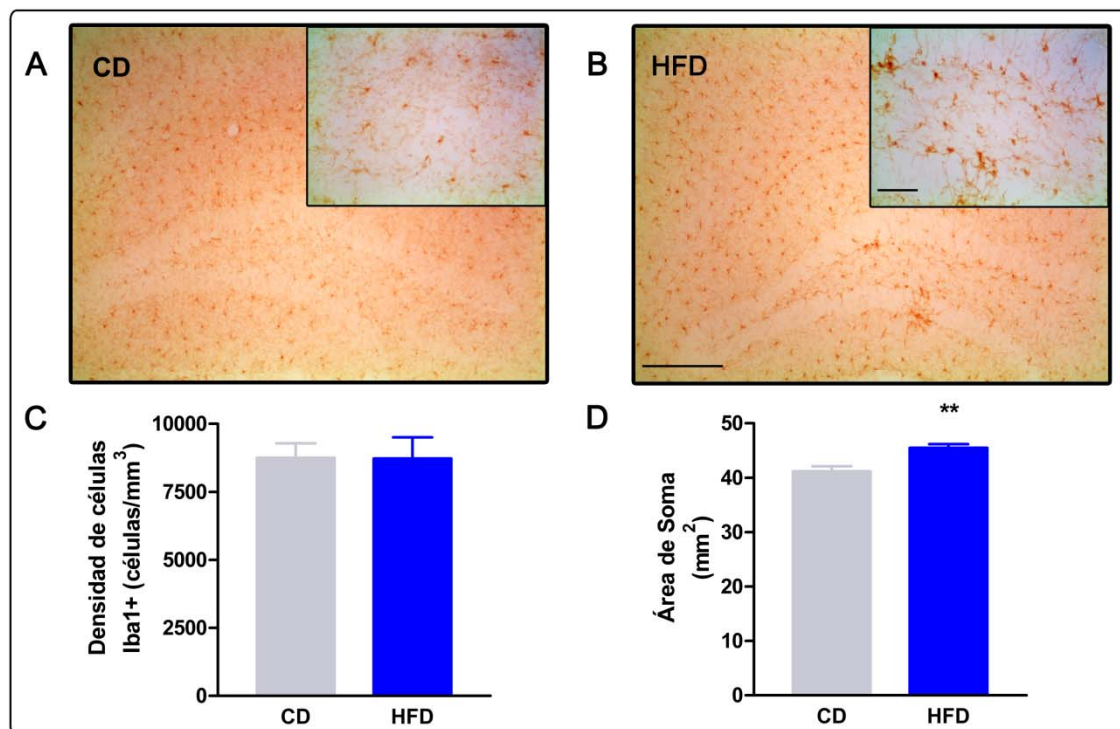


Figura 28. La dieta hiperlipídica promueve un aumento de la reactividad microglial en términos morfológicos. Inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba1. Imágenes representativas de los grupos CD (**A**) y HFD (**B**) (barra de escala= 200 μ m) y sus *insets* (barra de escala= 50 μ m). (**C**) Cuantificación de la densidad de células microgliales en el hilio, expresada como el número de células positivas para Iba1 por unidad de volumen. Test de t de Student, sin significancia estadística. (**D**) Cuantificación del área del soma de las células

positivas para Iba1 en el hilio del giro dentado del hipocampo, expresada en μm^2 . Test de t de Student, $**p<0.01$ cuando se compara HFD con CD.

Capacidad neurogénica en ZSG de ratones expuestos a la dieta HFD

Se evaluó el número de neuronas inmaduras positivas para el marcador DCX en la zona subgranular del giro dentado, como una medida de la capacidad neurogénica y en última instancia como una medida de plasticidad hipocampal. Como se puede observar en la **Figura 29**, a partir de la inmunohistoquímica para DCX, el consumo del alimento hiperlipídico se asoció con una disminución de neuronas jóvenes en la región subgranular del giro dentado.

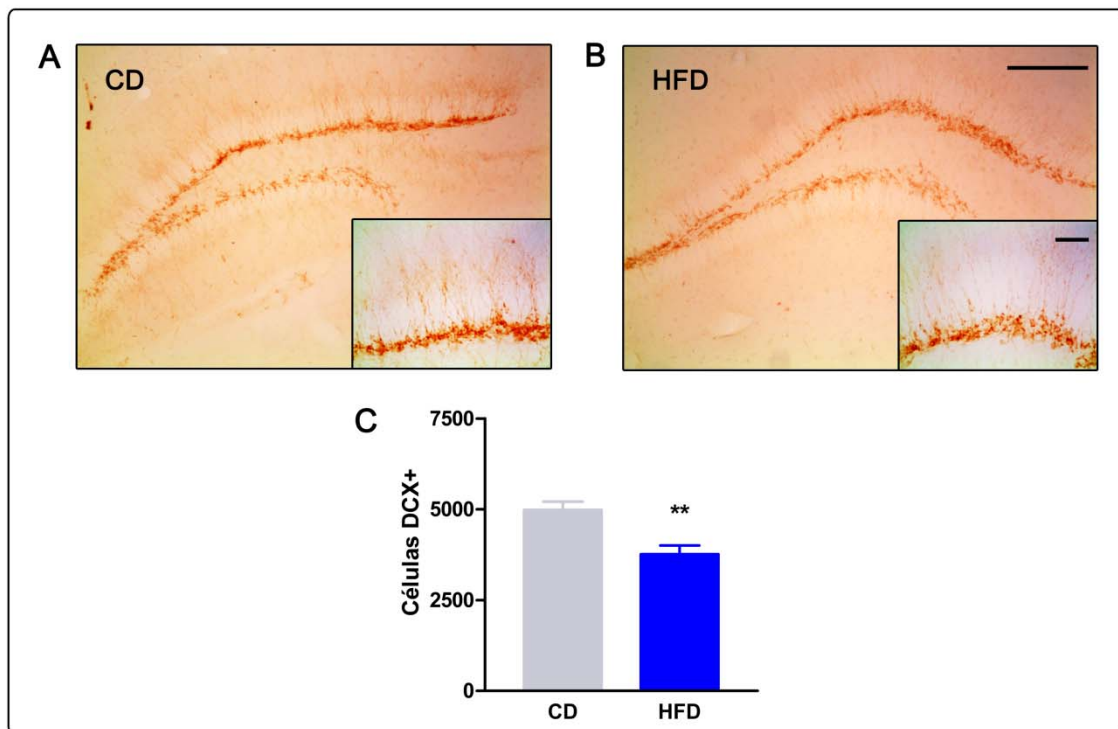


Figura 29. Los ratones expuestos a la dieta HFD presentan una impedida capacidad neurogénica. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para el marcador de

neuronas jóvenes DCX correspondientes al grupo CD (**A**) o HFD (**B**) (barra de escala= 200 μ m), con su respectiva ampliación (barra de escala= 50 μ m). (**C**) Cuantificación de células positivas para DCX en la zona subgranular del giro dentado total (Test de t de Student), ** $p < 0.01$ cuando se comparan los grupos CD y HFD.

Remodelado sináptico en neuronas piramidales de CA1 luego de la exposición a HFD

Con el fin de estudiar el posible efecto de la disfunción metabólica sobre la plasticidad estructural en hipocampo, se analizó la densidad y morfología de las espinas dendríticas mediante una tinción inyectando el fluoróforo Dil en la zona de neuronas piramidales de la región CA1. Como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, secciones coronales de cerebros de animales CD y HFD de 150 μ m fueron inyectadas en distintos sitios de CA1 como se ilustra en la **Figura 30**. Luego de permitir la difusión del colorante por los árboles dendríticos de las neuronas inyectadas durante 24 hs, se montaron adecuadamente las secciones para ser evaluadas por microscopía confocal. A partir de reconstrucciones deconvolucionadas de z-stacks de segmentos dendríticos apicales se analizó la densidad de espinas dendríticas y la morfología de las mismas. La clasificación morfológica de cada espina dendrítica se realizó según las dimensiones de la espina y sus compartimientos, como se detallan a continuación.

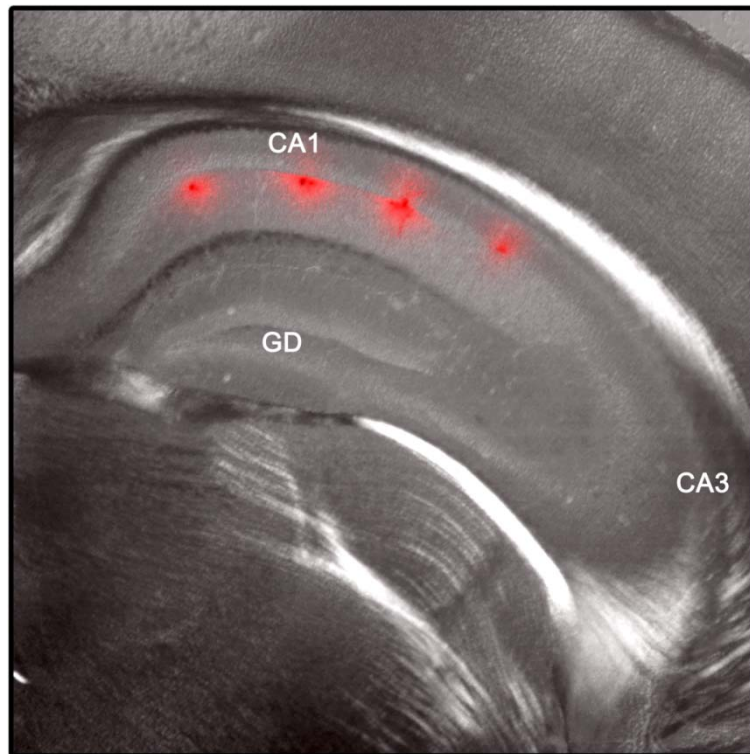


Figura 30. Tinción con el colorante lipofílico Dil (Perclorato de 1, 1'-dioctilo-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina) para el análisis de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo dorsal de animales CD y HFD de 2 meses. Imagen de un corte de hipocampo dorsal en campo claro, acoplada a una imagen de fluorescencia correspondiente a la emisión del colorante. En rojo se detectan los sitios de inyección del colorante.

Siguiendo los criterios de clasificación de diversos autores en la literatura, como se mencionó en la introducción general anteriormente, las espinas se clasificaron como de tipo I o *stubby*, de tipo II o *mushroom* y de tipo III o *finas*. Utilizando el software ImageJ para analizar las imágenes, se tomaron las siguientes medidas tal como se muestra en el esquema de la **Figura 31**: el largo (L) de la espina, desde la base hasta el borde de la cabeza de la espina; el diámetro máximo del cuello (dn) y el diámetro máximo de la cabeza de la espina (dh). Para incluir cada espina en la categoría que le correspondiese, se tuvieron en cuenta las relaciones entre el largo de la espina y el

diámetro del cuello (L/dn) y la relación entre los diámetros de la cabeza y el cuello (dh/dn).

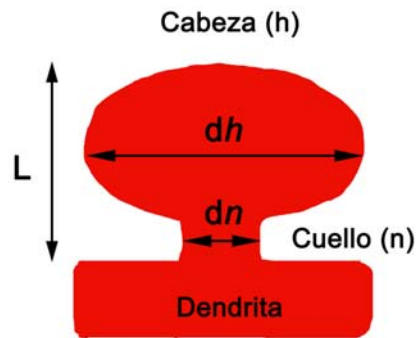


Figura 31. Esquema de una espina dendrítica. Medidas registradas para su clasificación morfológica. L = largo de la espina; dh = diámetro máximo de la cabeza y dn = diámetro máximo del cuello de la espina dendrítica.

Las espinas *stubby* o de tipo I presentan un largo L similar al diámetro del cuello así como el de la cabeza, típicamente menor a $1\ \mu\text{m}$ ($L \approx dn \approx dh \leq 1\ \mu\text{m}$). Las espinas *mushroom* o de tipo II poseen una cabeza considerablemente mayor que el cuello ($dh \gg dn$) y las espinas finas o de tipo III son de mayor longitud, $L > 1\ \mu\text{m}$ y mucho mayor que el diámetro del cuello ($L \gg dn$). En la **Figura 32A** se señalan ejemplos de cada una de las categorías sobre un segmento dendrítico.

En primera instancia se identificaron las dendritas apicales de las neuronas piramidales del area CA1 teñidas con Dil y se tomaron una serie de imágenes en el eje z por microscopía confocal, constituyendo un *z-stack*. Luego, se analizaron las imágenes realizando la deconvolución de los *z-stacks* obtenidos, se cuantificaron las espinas dendríticas por segmento (densidad normalizada a $10\ \mu\text{m}$ de segmento) y se

las categorizó morfológicamente teniendo en cuenta los parámetros mencionados en la **Figura 32**.

Luego de realizar la cuantificación y categorización morfológica de espinas dendríticas correspondientes a dendritas apicales de neuronas piramidales CA1, se graficó el número de espinas correspondiente a cada categoría normalizado a 10 μm de segmento dendrítico. El análisis estadístico de los resultados mostró que en el hipocampo de los ratones expuestos tempranamente a la dieta grasa predominaban las espinas dendríticas de tipo III o finas en tanto que la densidad de las tipo II o *mushroom* se encontró disminuida respecto al grupo control alimentado con la dieta standard de bioterio. La dieta no modificó significativamente la densidad de las espinas de tipo I o *stubby* (**Figura 32 B-D**).

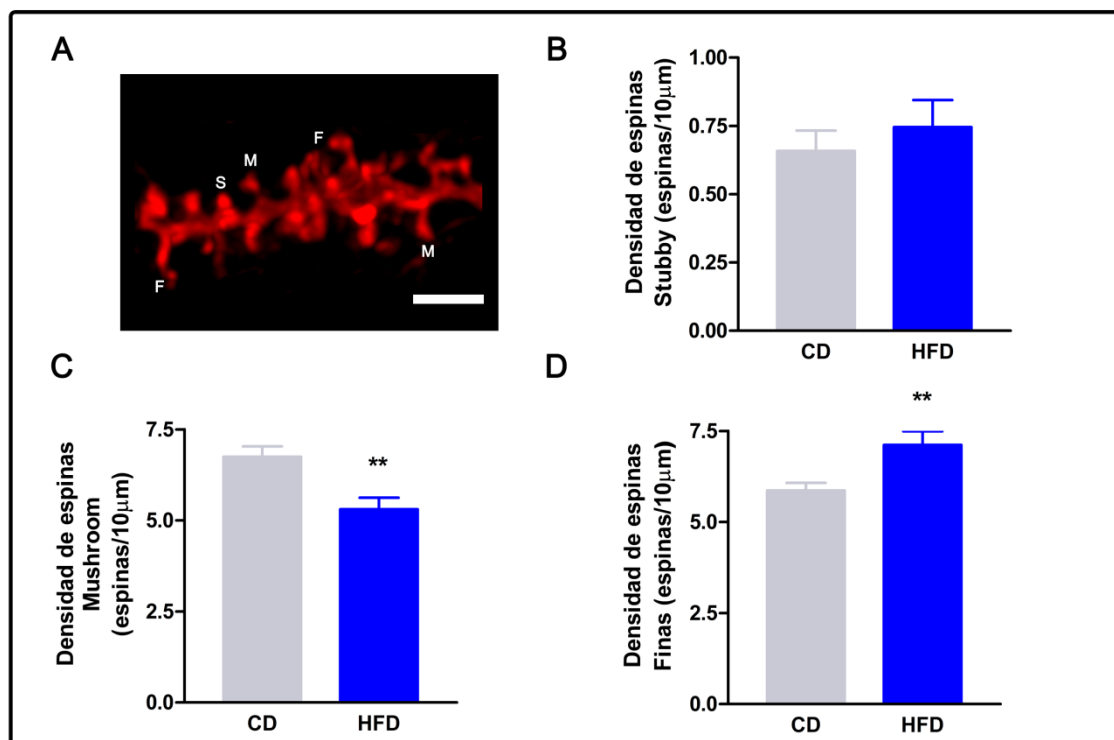


Figura 32. La exposición a la dieta HFD promueve alteraciones en la morfología de espinas dendríticas en el área de CA1 del hipocampo dorsal. (A) Imagen representativa de

un segmento de dendrita teñida con Dil, obtenida a partir de la máxima proyección de un *stack* de distintos planos en el eje z, tomadas por microscopía confocal, (barra de escala= 2µm). Se identifican ejemplos de los distintos tipos de espinas según su morfología: S para las *Stubby* (tipo I, cortas y gruesas); M para las de tipo *Mushroom* (tipo II, en forma de hongo); o F para las finas (tipo III). **(B)** Cuantificación de las espinas de tipo I (*Stubby*), expresada como la densidad de espinas cada 10 µm de segmento dendrítico. Test de t de Student para dos muestras, sin diferencias significativas. **(C)** Cuantificación de las espinas de tipo II (*Mushroom*), expresada como la densidad de espinas cada 10 µm de segmento dendrítico. Test de t de Student para dos muestras, **p<0.01 cuando se compara HFD con CD. **(D)** Cuantificación de las espinas de tipo III (Finas), expresada como la densidad de espinas cada 10 µm de segmento dendrítico. Test de t de Student para dos muestras, **p<0.01 cuando se compara HFD con CD.

Es importante destacar que, interesantemente, la densidad total de espinas dendríticas se mantuvo sin cambios entre los grupos experimentales (**Figura 33C**). Es decir que las alteraciones en las distintas categorías, la disminución de espinas tipo II y aumento de las de tipo III, se dieron de manera tal de que no se produjeran cambios a nivel global.

Teniendo en cuenta que las espinas de mayor tamaño correlacionan con conexiones sinápticas de mayor intensidad y que diversos reportes muestran que las espinas de tipo I y II poseen una mayor densidad de receptores AMPA y proteínas relevantes para la señalización post-sináptica, como se menciona anteriormente en la Introducción, se pueden considerar a este tipo de espinas en conjunto como espinas maduras (Calfa et al., 2012; Chapleau et al., 2009). Como podemos ver en la **Figura 33D**, si analizamos la relación entre espinas maduras e inmaduras en cada grupo experimental, encontramos que la proporción de espinas maduras disminuye en el grupo expuesto a la dieta HFD.

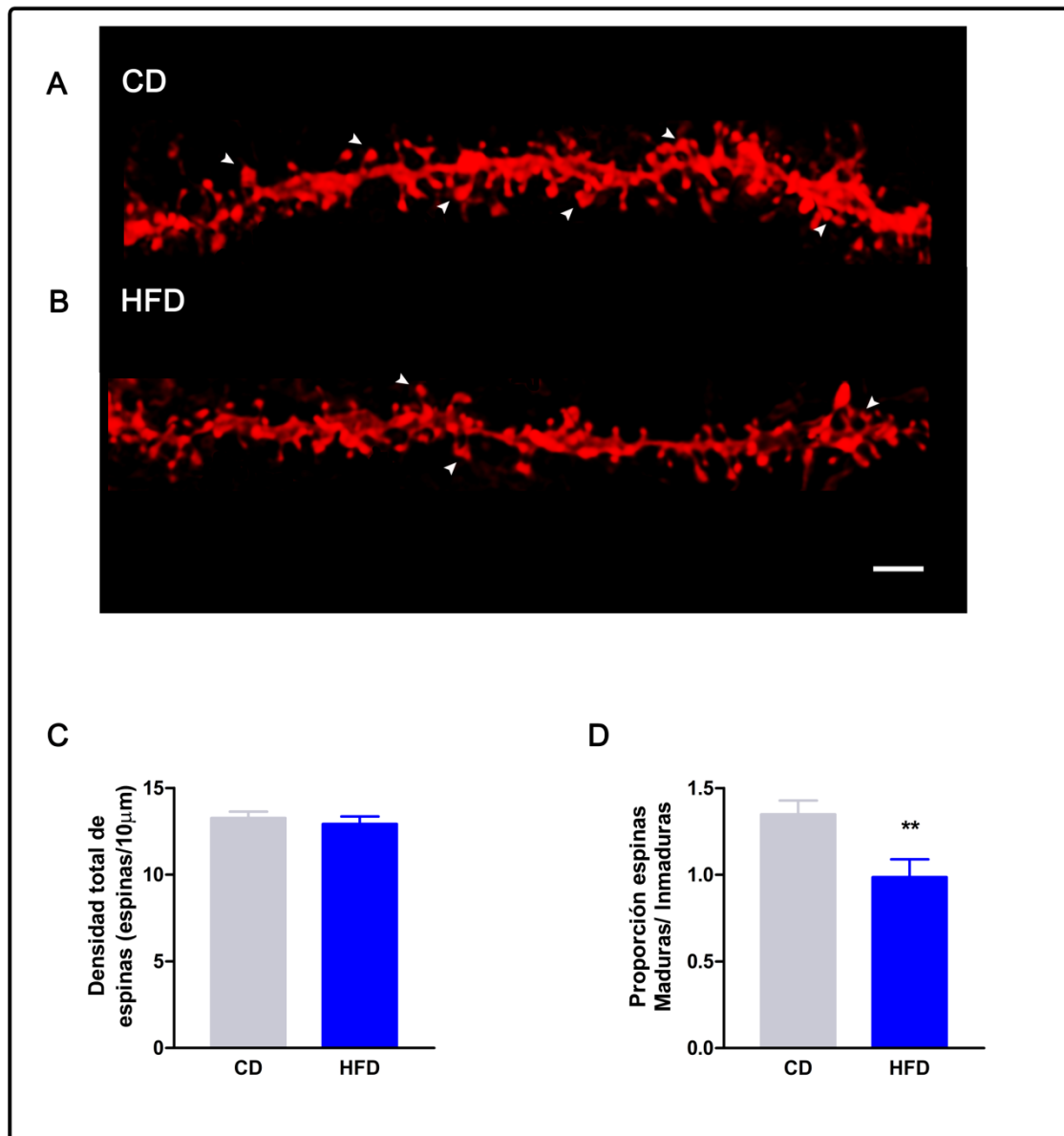


Figura 33. El consumo temprano de dieta alta en grasa altera el fenotipo de las espinas dendríticas en el hipocampo. Imágenes representativas de segmentos dendríticos de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal del grupo CD (**A**) o HFD (**B**) luego de la tinción con Dil. Fueron generadas a partir de la máxima proyección de *z-stacks*, obtenidos por microscopía confocal (barra de escala= 2μm). Las puntas de flecha señalan espinas de tipo II, presentadas con mayor frecuencia en el grupo CD. (**C**) Cuantificación del número total de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo dorsal, expresado como la densidad de espinas cada 10 μm de segmento dendrítico. Test de t de Student para dos muestras, sin diferencias significativas. (**D**) Cálculo de la relación de espinas maduras e

inmaduras, teniendo en cuenta las espinas maduras como el conjunto de las espinas de tipo I y II y las espinas inmaduras como las espinas de tipo III. Test de t de Student para dos muestras, ** $p < 0.01$ cuando se compara HFD con CD.

Componentes del fenotipo conductual asociado a la dieta HFD

En concordancia con las alteraciones en la plasticidad hipocampal en relación a la incorporación de nuevas neuronas granulares al circuito (neurogénesis) así como al remodelado de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1, estudiamos el desempeño de los animales expuestos a la dieta en el test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. De la misma forma que mostramos anteriormente en el Capítulo I, luego de la adaptación correspondiente, los animales CD y HFD fueron sometidos a dos fases de exploración de objetos idénticos según la configuración que se muestra en el esquema de la **Figura 34A**. Luego de analizar el tiempo de exploración del objeto re-localizado en la fase T2 del ensayo (expresado como el porcentaje del tiempo de exploración del objeto de localización novedosa -ON- con respecto al tiempo total de exploración en la fase T2), encontramos que ambos grupos experimentales eran capaces de reconocer la nueva localización cuando comparamos con el azar (**Figura 34B**, test de t para una muestra con una media teórica del 50 %, *** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ para los grupos CD y HFD respectivamente). Sin embargo, cuando analizamos el índice de discriminación de la nueva posición (calculado como la diferencia en el tiempo de exploración del objeto re-localizado y el objeto de posición conocida, en relación al tiempo de exploración total en la fase T2 y expresado en porcentaje), se puede verificar que los animales expuestos a la dieta HFD poseen una menor capacidad de discriminación de la localización novedosa del objeto (**Figura 34C**).

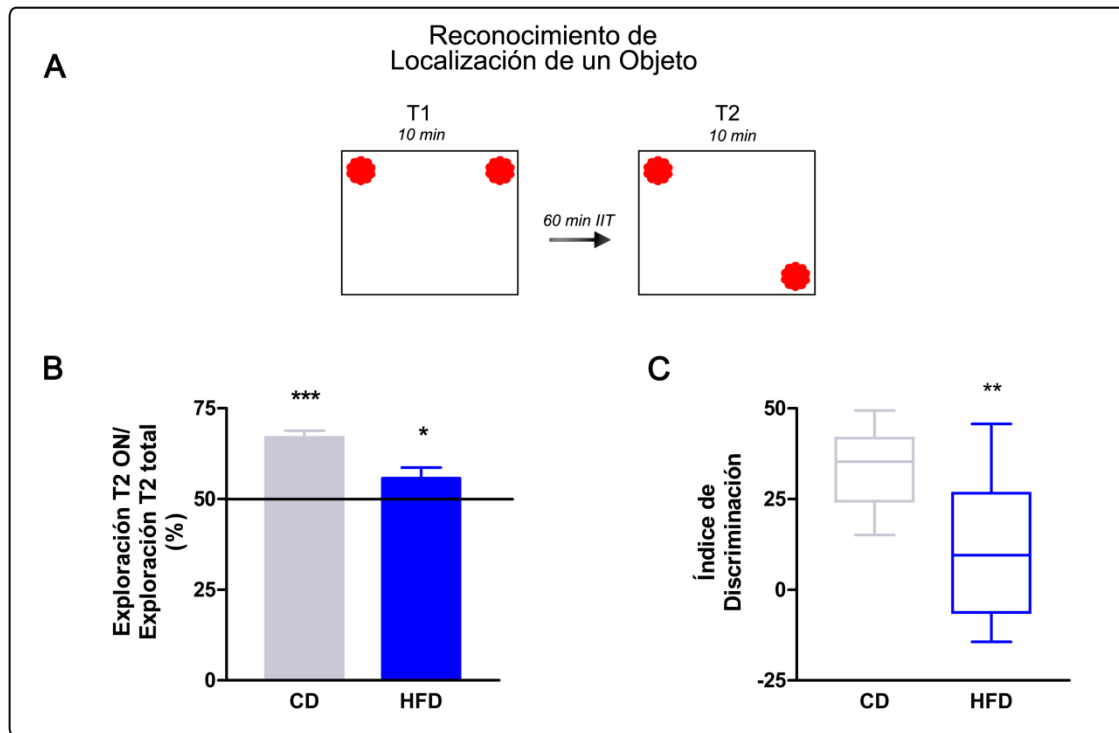


Figura 34. La exposición a la dieta HFD es capaz de promover alteraciones en la memoria espacial tempranamente a los 2 meses. (A) En el panel superior, esquema del Test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. Configuración espacial de las fases T1 y T2, con un intervalo inter-ensayo de una hora luego del cual se re-localiza uno de los objetos idénticos. (B) Cuantificación de la exploración del objeto re-localizado o novedoso (ON), expresado como porcentaje de la exploración de ambos objetos en total. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Test de t de Student para una muestra, con una media teórica del 50%. (C) Análisis del índice de discriminación expresado en porcentaje y calculado como la diferencia en el tiempo de exploración del objeto re-localizado y el objeto de posición conocida, en relación al tiempo de exploración total en la fase T2. ** $p < 0.01$ cuando se compara con el grupo CD, Test de t de Student para dos muestras.

En relación a la conducta relacionada con la ansiedad, realizamos el test de exploración en el laberinto elevado en cruz, tal como fue presentado en el capítulo anterior. En este caso, no encontramos diferencias significativas en la exploración de

los brazos abiertos de la plataforma entre los grupos CD y HFD a los 2 meses (**Figura 35**).

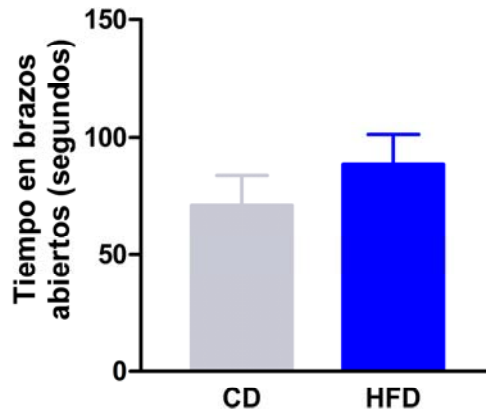


Figura 35. El consumo de una dieta enriquecida en grasas no afecta el desempeño en el Test del laberinto elevado en cruz a los 2 meses. Cuantificación del tiempo de exploración de los brazos abiertos de la plataforma (Test de t de Student, diferencias no significativas).

Discusión

Los resultados de este capítulo muestran que la exposición a una dieta moderadamente alta en grasas circunscripta al período previo a la adultez promueve alteraciones metabólicas asociadas a un estado inflamatorio con efectos de gran relevancia en la plasticidad hipocámpal.

En ausencia de sobrepeso, la dieta HFD indujo un aumento de la glucemia y una leve disminución en el contenido pancreático de insulina que se detectó en paralelo con una menor masa total de páncreas. Con respecto a esto último, existe un gran número de reportes que difieren con respecto a los niveles de insulina como consecuencia de desórdenes metabólicos, encontrando o bien un aumento o bien una disminución de sus niveles (Guillausseau et al., 2008), estableciendo por lo general un contexto de hiperinsulinemia en casos de resistencia a insulina y desórdenes crónicos asociados

(Boitard et al., 2012; H. Lee, Lee, Cho, & Lee, 2013). Las alteraciones de los niveles insulínicos podrían atribuirse a una variedad de eventos, ya sea al número de islotes beta pancreáticos, su síntesis o bien la regulación de la calidad y pulsatilidad de su secreción (Wilcox, 2005). En particular, en nuestro modelo a los 2 meses de edad, no contamos con toda la información necesaria para definir exhaustivamente el fenómeno. En principio deberíamos contar con los valores séricos de insulina en este punto para poder determinar el índice de homeostasis de la glucosa HOMA.

Notablemente, si bien los niveles proteicos de la citoquina $TNF\alpha$ no mostraron diferencias en el suero de animales HFD respecto a los controles, encontramos niveles séricos muy aumentados de la citoquina pro-inflamatoria $IL1\beta$, indicativos de una inflamación sistémica considerable. Por otra parte, dada la implicancia de las consecuencias de la respuesta inflamatoria en la función hipocampal, evaluamos alteraciones características de la inflamación en dicha estructura y encontramos un importante correlato del contexto en la periferia. A nivel morfológico, encontramos un aumento en el área del soma de células de la microglía positivas para el marcador Iba1, indicativo de su aumentada reactividad. Asimismo, a partir de análisis de RT-PCR en tiempo real, encontramos un significativo aumento de la expresión de las citoquinas $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ en extractos de hipocampo. A partir de diversos reportes en la literatura, se infiere que mientras que niveles bajos de citoquinas pueden ser facilitadores del proceso de aprendizaje, altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, en particular de $IL1\beta$, podrían provocar un impedimento de la memoria hipocampo-dependiente en roedores adultos no obesos (Goshen et al., 2007; Hein et al., 2010).

En relación a los mecanismos de plasticidad hipocampal responsables de la flexibilidad a la hora de responder a las exigencias del ambiente, estudiamos el efecto de la exposición a la dieta HFD en el período adolescente-juvenil en la capacidad de incorporar nuevas neuronas al circuito hipocampal así como el remodelado sináptico

en neuronas de la región CA1 del hipocampo. Con respecto a la neurogénesis adulta, encontramos un número disminuido de neuronas jóvenes positivas para DCX en la ZSG del giro dentado, en concordancia con muchos otros reportes de la literatura que se mencionaron anteriormente. Es interesante destacar que este fenómeno lo encontramos alterado en animales HFD a los 5 meses, como mostramos en el capítulo anterior, pero los resultados del presente capítulo confirman que el fenómeno ya se ve afectado tempranamente.

Además, luego de esta temprana y acotada exposición, encontramos alteraciones estructurales en las espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1, sin cambios en la densidad global de espinas por dendrita que se asocian a franca obesidad o diabetes establecida (Calvo-Ochoa, Hernandez-Ortega, Ferrera, Morimoto, & Arias, 2014; Hao et al., 2016). Notablemente, mediante la tinción de los árboles dendríticos con el colorante fluorescente Dil, pudimos observar que luego de la exposición a la dieta HFD, disminuyó la proporción de espinas maduras (*stubby* + *mushroom*) con respecto a las inmaduras (finas). La forma y el tamaño de la espina dendrítica son factores determinantes para su madurez y resultan clave para su funcionalidad. Han mostrado influenciar las propiedades eléctricas y la capacidad de compartimentalización de la espina y los cambios morfológicos se relacionaron con la función sináptica (Noguchi, Matsuzaki, Ellis-Davies, & Kasai, 2005; Yuste & Bonhoeffer, 2001). El citoesqueleto de actina es un elemento estructural fundamental en el desarrollo y la morfología de las espinas dendríticas. Los filamentos de actina son estructuras dinámicas con un extremo positivo (+) por el cual polimeriza más rápidamente que el otro (-). Las subunidades de actina sufren un recambio constante y forman filamentos que interactúan entre sí mediante proteínas de unión, formando estructuras con distinto grado de estabilidad, siendo los más gruesos de mayor estabilidad (**Figura 36**). En función de la tasa de recambio, se pueden distinguir

conjuntos de filamentos dinámicos o estables, con constantes de 1 minuto a 17 minutos, respectivamente (Bellot et al., 2014; Honkura et al., 2008).

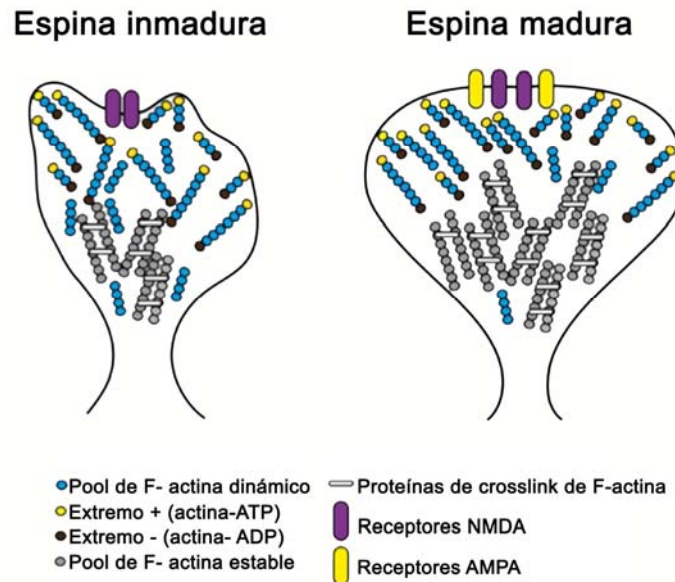


Figura 36. Dinámica del citoesqueleto de actina en el proceso de maduración de las espinas dendríticas. Las espinas con un mayor grado de madurez coinciden con una mayor proporción de receptores AMPA y un mayor tamaño dado por el pool de F-actina estable (círculos grises). A su vez, también poseen una mayor tasa de recambio en el pool dinámico de F-actina (círculos azules) que en las cercanías de la superficie de la cabeza permite una fina regulación de la forma de la espina. *Modificado de (Hlushchenko, Koskinen, & Hotulainen, 2016).*

La conectividad neuronal mediada por la dinámica de espinas dendríticas supone una fina regulación de su estructura y consiguiente funcionalidad. Por ende, la regulación del citoesqueleto de actina y proteínas adaptadoras que permiten su remodelado juegan un papel crucial en el orquestado de las respuestas al medio ambiente, así como a la estabilidad de la información codificada por los circuitos involucrados. Tanto

los factores que regulan este proceso de polimerización-despolimerización de actina, como las propiedades de la membrana que conforman las espinas, constituyen mediadores clave para adaptar la respuesta sináptica a los diferentes estímulos (Holtmaat & Svoboda, 2009; Kasai, Fukuda, Watanabe, Hayashi-Takagi, & Noguchi, 2010). Defectos en la regulación del citoesqueleto que llevan a una plasticidad alterada podrían estar implicados en el desarrollo de desórdenes neurológicos (Hlushchenko et al., 2016).

En consonancia con las alteraciones en la plasticidad hipocampal entendida como una disminución en la capacidad neurogénica y en el remodelado de espinas dendríticas asociado a un impedimento en su madurez o estabilidad, encontramos que los animales HFD tuvieron un peor desempeño en el test hipocampo-dependiente relacionado con la memoria espacial (NOL).

Los datos de este trabajo sugieren la existencia de una dinámica temporal en la respuesta inflamatoria como consecuencia de la dieta hiperlipídica, tanto a nivel sistémico como a nivel central, particularmente en el hipocampo. Estas alteraciones encontradas en etapas tempranas, donde los circuitos neuronales se encuentran en plena maduración y son altamente susceptibles, pueden implicar una modificación de la plasticidad de manera irreversible en la vida adulta.

Los resultados encontrados son de gran relevancia ya que sugieren que la exposición temprana a una dieta rica en grasas provoca impedimento cognitivo y altera la plasticidad hipocampal, favoreciendo el riesgo de desarrollo de enfermedades neurológicas en la adultez.

CAPÍTULO III

Interacción entre microglía y neuronas. Alteraciones neuronales mediadas por vesículas extracelulares derivadas de microglía expuesta a palmitato

Introducción III

Como se ha discutido anteriormente, diversos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado que los desórdenes metabólicos están fuertemente asociados con el desarrollo de patologías neurodegenerativas como la EA, de la misma manera que diversos estudios han reportado efectos beneficiosos de la utilización de terapias para tratar enfermedades metabólicas en la fisiopatología de EA en roedores y monos (Bomfim et al., 2012; Dinarello, 2010). Esta influencia bidireccional entre las patologías metabólicas y neurodegenerativas pone en evidencia la existencia de mecanismos en común. En este sentido, de la misma manera que la disfunción metabólica en los tejidos de la periferia como el hígado, músculo, tejido adiposo y páncreas, sensibles a insulina e involucrados en la regulación de la utilización y acumulación de nutrientes, se ha encontrado siempre asociada a un contexto de inflamación local, el SNC no es una excepción. Es por ello que estudiar la fisiología de las células involucradas en la respuesta inflamatoria y sus consecuencias, es fundamental.

Efecto de los ácidos grasos

Si bien los mecanismos mediante los cuales la obesidad afecta negativamente la función cerebral no se conocen en profundidad, como se ha dicho anteriormente, la inflamación y la resistencia a insulina serían fenómenos clave (Hotamisligil, 2006). Los niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias tienen efectos deletéreos en procesos cognitivos y se han encontrado presentes tanto a nivel sistémico como en áreas del

SNC como corteza e hipocampo en condiciones de obesidad o síndrome metabólico (Gupta et al., 2012). Entre los mecanismos ligados a la obesidad y al consumo de dietas elevadas en grasas, consistentes con el desarrollo de resistencia a insulina e inflamación crónica, se ha reportado que elevadas concentraciones séricas de ácidos grasos tienen un rol importante (Chunchai et al., 2017). En particular, los ácidos grasos saturados de cadena larga como el ácido palmítico o el esteárico tienen efectos tóxicos en diversos tejidos. Se sabe que los ácidos grasos libres son capaces de penetrar la barrera hemato-encefálica e incluso hay reportes que indican que su transporte desde la circulación hacia el cerebro estaría aumentado en casos de exposición a dietas hiperlipídicas y síndrome metabólico (Gupta et al., 2012; Karmi et al., 2010).

El ácido palmítico o palmitato (PA) es uno de los componentes principales de las grasas saturadas ingeridas por la dieta y se ha estudiado ampliamente su efecto como promotor de resistencia a insulina en numerosos tejidos. En estudios *in vitro*, se ha reportado que el PA induce resistencia a insulina en un rango de concentraciones de 250-1000 μ M durante 24 hs en una línea de células endoteliales y en cultivos primarios de miocitos (S. Li et al., 2017). También se ha reportado este efecto en las células intestinales humanas Caco 2- TC7 (Tran et al., 2016), en músculo esquelético murino (Tang et al., 2017), así como también en neuronas hipotalámicas (Mayer & Belsham, 2010) y en células derivadas de neuroblastoma humano (Calvo-Ochoa, Sanchez-Alegria, Gomez-Inclan, Ferrera, & Arias, 2017). Además, se reconocen a los ácidos grasos saturados como moléculas de daño capaces de activar los receptores TLR en adipocitos y macrófagos, tanto *in vitro* como en modelos de exposición a dietas HFD (Ganz & Szabo, 2013).

En relación a los mecanismos implicados tanto en la inducción de la resistencia a insulina como en la respuesta inflamatoria y la propagación del daño asociado al

palmitato, en distintos tejidos sensibles a insulina de la periferia se ha encontrado un rol de la liberación de vesículas extracelulares.

En relación a escenarios de niveles elevados de ácidos grasos saturados, existen diversos reportes sobre el rol de la comunicación mediante VEs entre distintos tipos celulares periféricos en respuesta a un contexto lipotóxico. Se ha reportado que en un contexto de insulino-resistencia, las vesículas exosomales derivadas de células musculares expuestas a palmitato juegan un papel importante en la comunicación con las células β del páncreas (Jalabert et al., 2016). Por otro lado, en la toxicidad ejercida por un exceso de lípidos en el hígado, se ha reportado que la exposición a palmitato promueve la liberación de VEs que inducirían una respuesta inflamatoria como consecuencia de su interacción con macrófagos (Hirsova et al., 2016). La exposición a PA también aumenta la liberación de VEs en adipocitos 3T3-L1 (Durcin et al., 2017). Sin embargo, el rol de las vesículas extracelulares en el SNC en el contexto de la obesidad y la diabetes no se encuentra explorado.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en este capítulo nos proponemos explorar los efectos del daño lipotóxico causado por el ácido palmítico directamente sobre la microglía e indirectamente sobre las neuronas, mediante la interacción entre los dos tipos celulares. En particular, los objetivos específicos de este capítulo son:

- Estudiar el efecto del palmitato sobre la viabilidad y el perfil secretor de cultivos primarios de microglía murina.
- Evaluar la capacidad del palmitato de promover la liberación de vesículas extracelulares microgliales.
- Ensayar el efecto de las vesículas extracelulares derivadas de microglía primaria tratada con palmitato sobre cultivos primarios de neuronas de

hipocampo murino. Estudiar el efecto de las vesículas sobre la plasticidad estructural de espinas dendríticas.

Diseño experimental III

Con el fin de estudiar la interacción microglía-neurona en el contexto de un insulto metabólico, como se muestra en el esquema experimental de la **Figura 37**, expusimos células microgliales provenientes de corteza e hipocampo de ratones neonatos C57BL/6J de 1-3 días de edad a diferentes concentraciones de palmitato (PA) acompañado con BSA libre de ácidos grasos. Luego de exponer las células durante 24 hs a dos concentraciones diferentes de palmitato, una baja de 125 μ M y una moderada a alta de 500 μ M, se analizaron distintos parámetros en relación a la respuesta microglial en comparación con el control correspondiente al vehículo BSA (0 PA). Se obtuvieron las fracciones correspondientes a microvesículas y exosomas a partir de los sobrenadantes de microglía tratada y se expusieron a cultivos de neuronas hipocampales de 14 días in vitro (DIV), previamente transfectadas de manera que expresaran la proteína verde fluorescente GFP, para analizar su efecto en el remodelado de espinas dendríticas (**Figura 37**).

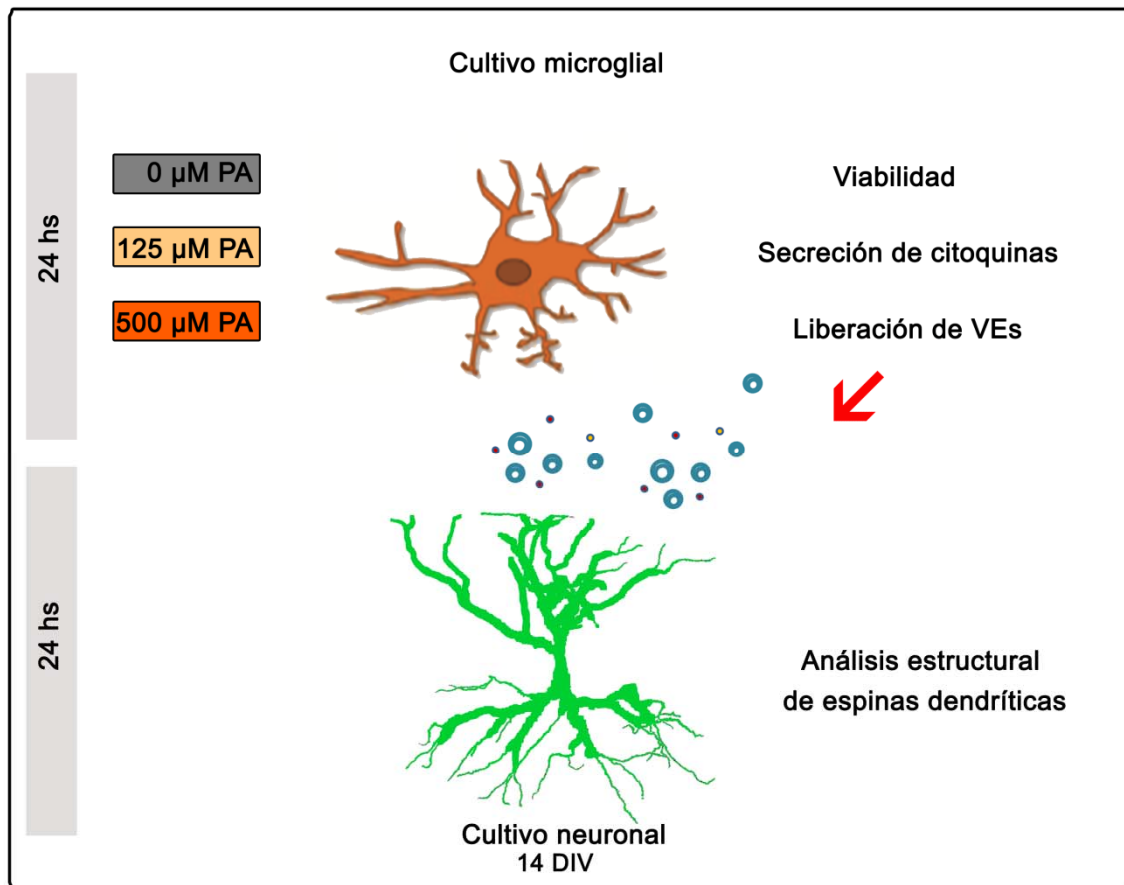


Figura 37. Esquema experimental III. Células microgliales aisladas por agitación a partir de cultivos gliales mixtos de corteza e hipocampo de neonatos P1-3 fueron estimulados durante 24 hs con palmitato (125 μM o 500 μM PA) o vehículo (0 μM PA). A partir de los sobrenadantes correspondientes se aislaron las VEs liberadas y se utilizaron para ensayar su efecto sobre cultivos de neuronas de hipocampo de 14 DIV.

Resultados III

Con el fin de profundizar en el rol de la microglía en el daño asociado a la disfunción metabólica por exposición a niveles elevados de lípidos, en este capítulo realizamos un abordaje *in vitro*, emulando el contexto lipotóxico mediante la exposición a palmitato.

En primer lugar, para validar la preparación del palmitato detallada en la sección de Materiales y Métodos, se utilizó una línea celular de células β pancreáticas de rata (INS1E). En la literatura se encuentra ampliamente reportado el efecto de toxicidad del PA sobre estas células, por lo cual realizamos un ensayo de viabilidad por MTT a partir de una curva de exposición a distintas concentraciones de PA por 24 hs (**Figura 38**) y verificamos el efecto reportado (Martino et al., 2012).

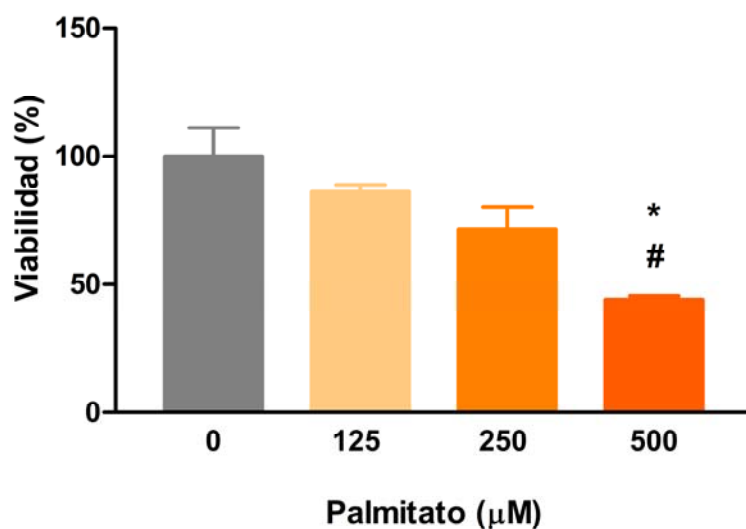


Figura 38. Curva de toxicidad de PA en línea celular pancreática INS1E. En el gráfico de barras se muestra la viabilidad de células INS1E expuestas durante 24 hs a distintas concentraciones de PA, evaluada por el ensayo de MTT. ANOVA de una vía ($p < 0.01$) y $*p < 0.01$ 500 μM PA vs 0 μM PA, $\#p < 0.05$ vs 125 μM PA, contrastes post hoc de Tukey.

Efecto de la exposición de PA sobre cultivos primarios de microglía

De esta manera, una vez validada la preparación del PA en nuestras manos corroborando uno de los efectos reportados del ácido graso, continuamos con los experimentos de exposición de cultivos primarios de microglía murina, utilizando dos concentraciones diferentes de PA, 125 μM y 500 μM . Para comenzar a estudiar el efecto del PA sobre la microglía, en primer lugar realizamos un ensayo de viabilidad celular a partir de una incubación con los colorantes DAPI y ioduro de propidio (PI), luego de la exposición de las células microgliales a PA durante 24 hs. Ambos colorantes se unen al ADN doble cadena, posibilitando la tinción de los núcleos. La diferencia entre ellos, además de sus espectros de excitación y emisión, es que el PI es incapaz de atravesar la membrana celular en el caso de que se encuentre intacta. Sólo teñirá el núcleo cuando las células estén muertas y por ende se haya perdido la integridad de sus membranas, permitiendo la internalización del fluoróforo rojo. Como se puede observar en la **Figura 39**, hay una leve disminución de la viabilidad (aproximadamente del 15%) de las células microgliales como consecuencia de la exposición a la concentración más elevada de PA.

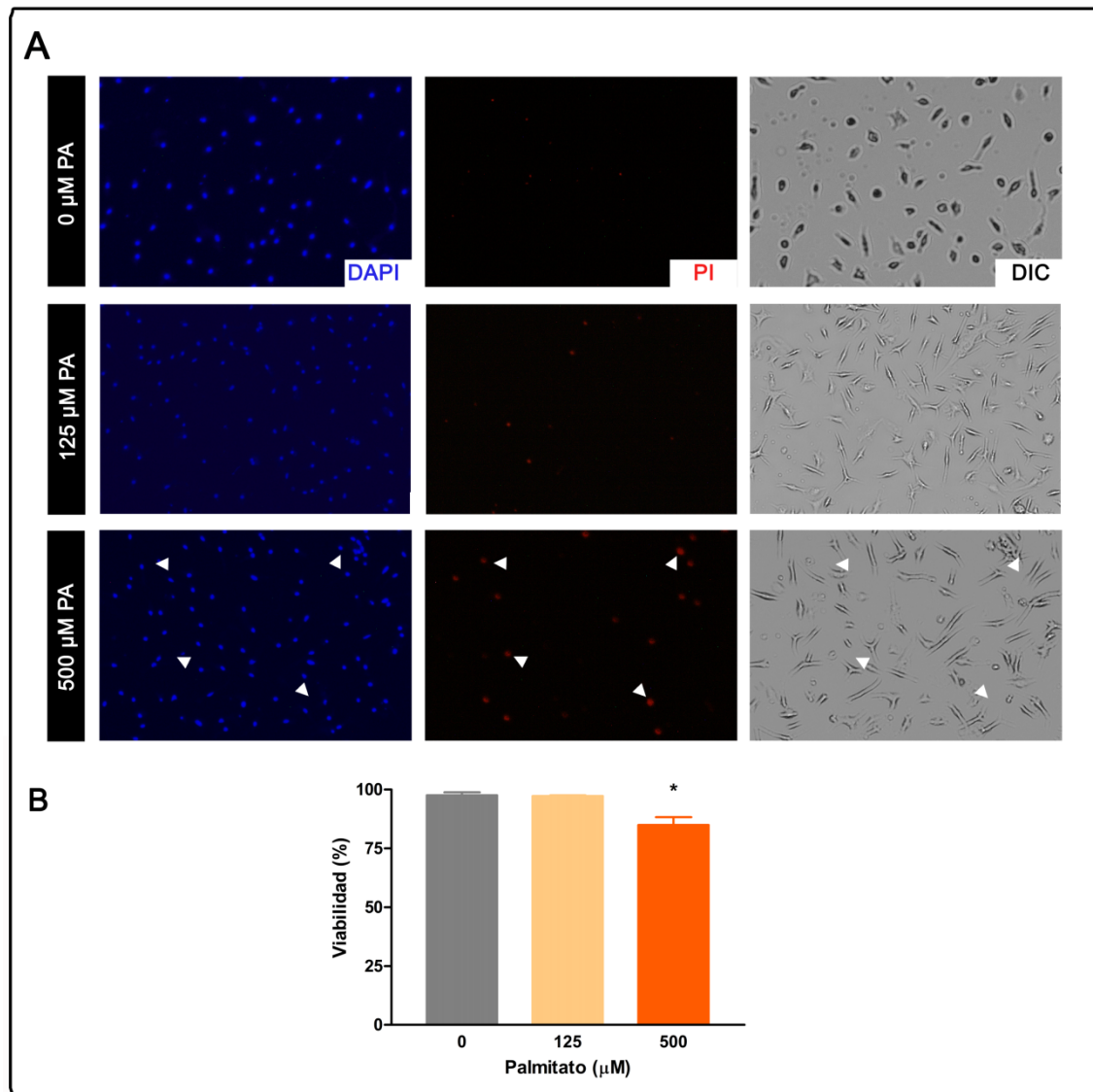


Figura 39. Efecto de PA sobre la viabilidad de células microgliales. (A) Panel de imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia correspondientes a las señales de DAPI, PI con su respectiva imagen en campo claro (DIC) de células microgliales tratadas con 0, 125 y 500 μM PA. Las puntas de flecha señalan células muertas, positivas para PI, en mayor número utilizando en respuesta a la mayor concentración de PA. (B) Cuantificación de la viabilidad celular expresada como el porcentaje de células vivas (proporción inversa de los núcleos positivos para PI). ANOVA 1V ($p < 0.05$) y $*p < 0.05$ 500 μM PA vs 0 μM PA, contraste post hoc de Tukey.

Luego, teniendo en cuenta que niveles elevados de PA se encuentran asociados a una respuesta inflamatoria, tanto en diversos tejidos *in vivo* como *in vitro* en tipos celulares de la periferia y del SNC, evaluamos el efecto de la exposición de las células microgliales a las distintas concentraciones del ácido graso en el perfil de secreción de citoquinas. Para ello, luego de la exposición de 24 hs a palmitato o su control, se tomaron los sobrenadantes para evaluar los niveles proteicos de las citoquinas TNF α , IL1 β e IL4 por la técnica de ELISA (**Figura 40**).

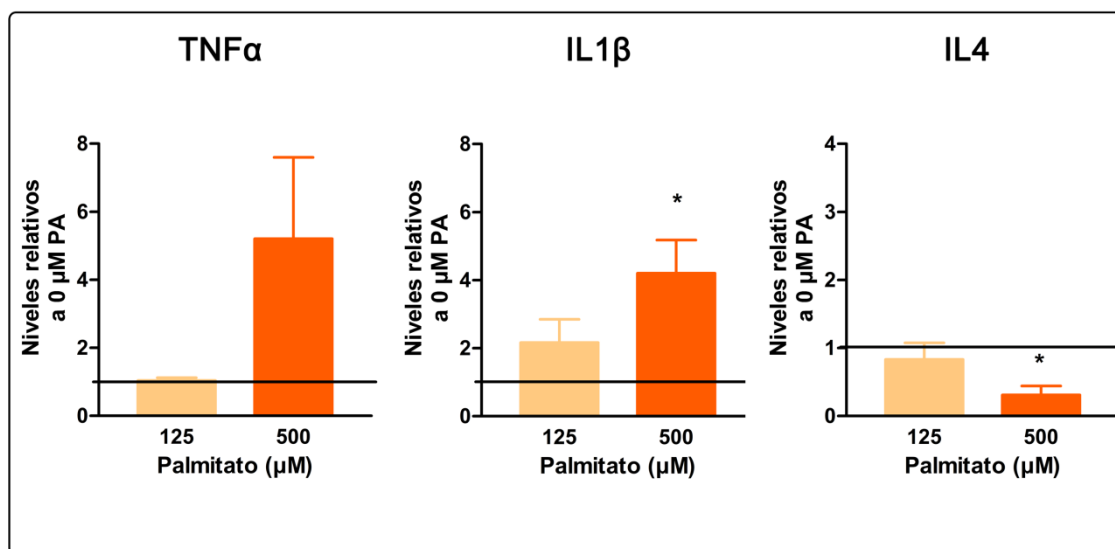


Figura 40. Niveles proteicos de citoquinas en medios condicionados de microglía tratada con palmitato. Se midió por ELISA los niveles de TNF α , IL1 β e IL4 que se muestran en los gráficos de barras de izquierda a derecha, respectivamente, en relación a los niveles obtenidos en el control (valores normalizados a 1). * $p < 0.05$, test de t de Student para una muestra, con una media teórica de 1.

A partir de la **Figura 40**, podemos observar que el tratamiento con 500 μ M de palmitato indujo un aumento en la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL1 β (si bien no es estadísticamente significativo en el caso de TNF α), en

concomitancia con una disminución en la liberación de la citoquina anti- inflamatoria IL4 ($p<0.05$). Según la nomenclatura en referencia a los fenotipos de activación microglial que se han detallado en la introducción, estos resultados indicarían que el palmitato, en las condiciones experimentales empleadas, induce un perfil de activación pro-inflamatorio o del tipo M1.

Aislamiento de vesículas extracelulares provenientes de microglía primaria expuesta a palmitato

Nuestro principal interés radica en la búsqueda de posibles mecanismos asociados al rol de la microglía en un contexto lipotóxico y el efecto en su comunicación con las neuronas. Sabiendo que en distintos tejidos sensibles a insulina en la periferia, los efectos deletéreos y la propagación de daño por exposición a palmitato están mediados, en parte, por la liberación de VEs, nos propusimos aislar las fracciones correspondientes a microvesículas y exosomas a partir de los medios condicionados de microglía tratada con palmitato o BSA, mediante centrifugación diferencial seguida de ultracentrifugación. Como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, es importante destacar que el suero utilizado en el medio de cultivo fue previamente depletado de vesículas mediante su ultracentrifugación durante 18 hs, de modo que la procedencia de las VEs aisladas luego de la estimulación con palmitato fuera únicamente del cultivo microglial. Luego de estimular las células de la microglía con las distintas concentraciones de palmitato y su respectivo control, se realizaron los pasos de centrifugación para eliminar restos celulares y cuerpos apoptóticos primero y como resultado de la centrifugación de los medios resultantes a 15000g durante 60 minutos se obtuvo la fracción correspondiente a microvesículas (**Figura 41**). Posteriormente, se procedió a la ultracentrifugación de los sobrenadantes a 110000g durante 90 minutos y se obtuvo la fracción exosomal (**Figura 42**). Para abordar la caracterización

de las vesículas obtenidas, se realizó una tinción con acetato de uranilo para su visualización al microscopio electrónico de transmisión, lo que permitió corroborar la morfología y el tamaño que definen cada categoría o subpoblación de vesículas extracelulares. Por otra parte, se realizó una cuantificación del contenido proteico total de cada fracción mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA), diseñado para detectar bajos niveles de proteína (micro BCA). Con respecto a esto último, tanto para las MVs como para los exosomas, no se encontraron diferencias en la cantidad de proteína total (**Figuras 41 y 42E**), si bien en este último caso parecería haber un leve aumento en la cantidad de proteína correspondiente a la fracción exosomal de las células tratadas con 500 μ M de PA (**Figura 42E**). Como se puede observar en las figuras correspondientes a la caracterización por microscopía electrónica, las vesículas obtenidas poseen la morfología característica y los diámetros reportados, de manera homogénea. A partir de la determinación del diámetro de las vesículas identificadas por TEM, se obtuvo un promedio alrededor de los 230-260 nm de diámetro para el caso de las MVs (**Figura 41D**) y de 55-70 nm para el caso de la fracción exosomal (**Figura 42D**), sin diferencias entre los grupos experimentales en cada caso.

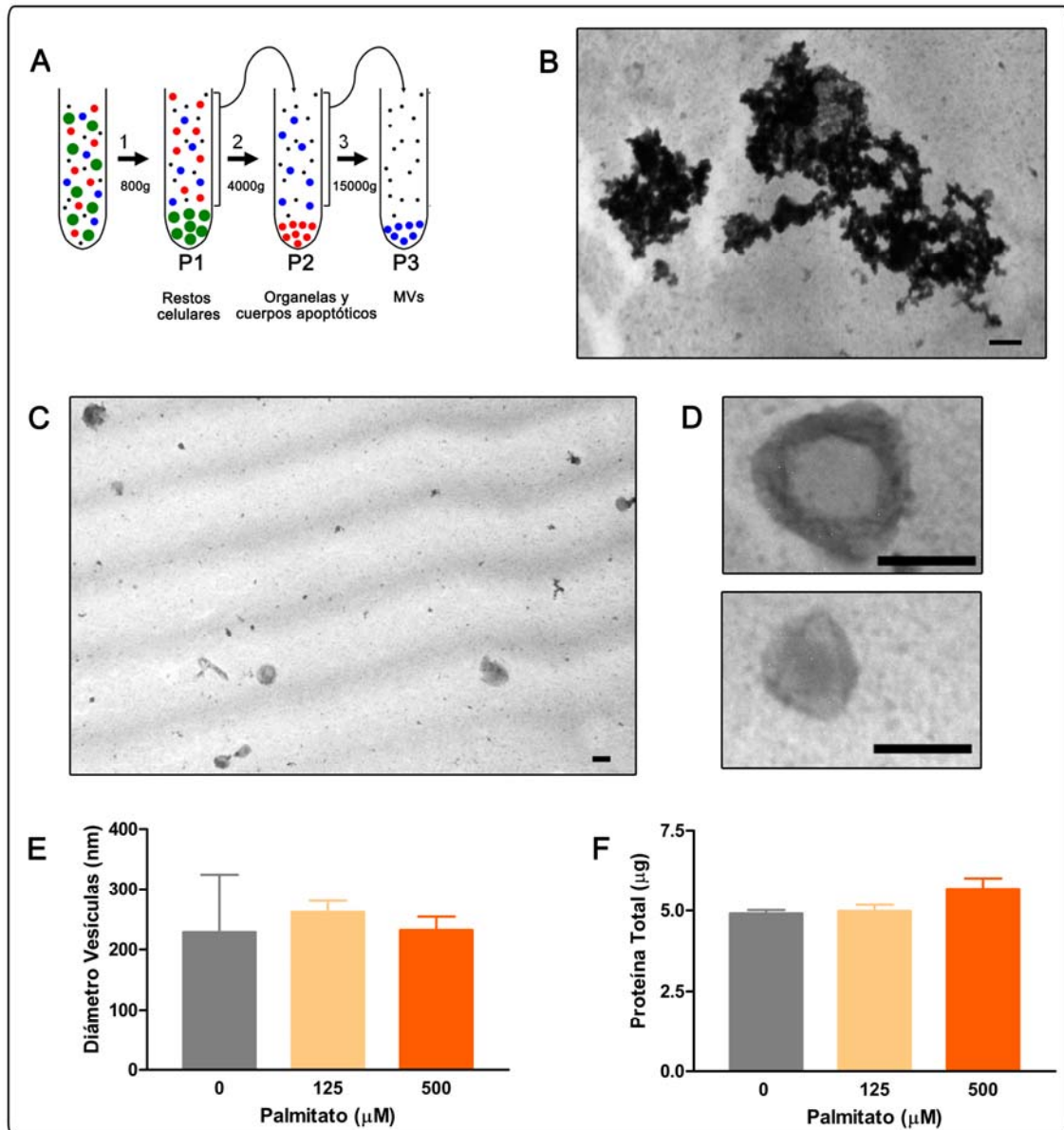


Figura 41. Caracterización de microvesículas derivadas de cultivos microgliales tratados con PA. (A) Esquema del protocolo de aislamiento de microvesículas por centrifugación diferencial. (B-D) Imágenes representativas de la preparación de MVs aisladas por centrifugación a 15000g, teñidas con acetato de uranilo, visualizadas por microscopía electrónica de transmisión. Todas las barras de escala representan una longitud de 200 nm. (E) Análisis del diámetro de las MVs aisladas. ANOVA 1V, sin diferencias significativas. (F) Cuantificación por micro BCA de los niveles de proteína total correspondiente a la extracción de MVs a partir de 2 millones de células microgliales. ANOVA 1V, sin diferencias significativas.

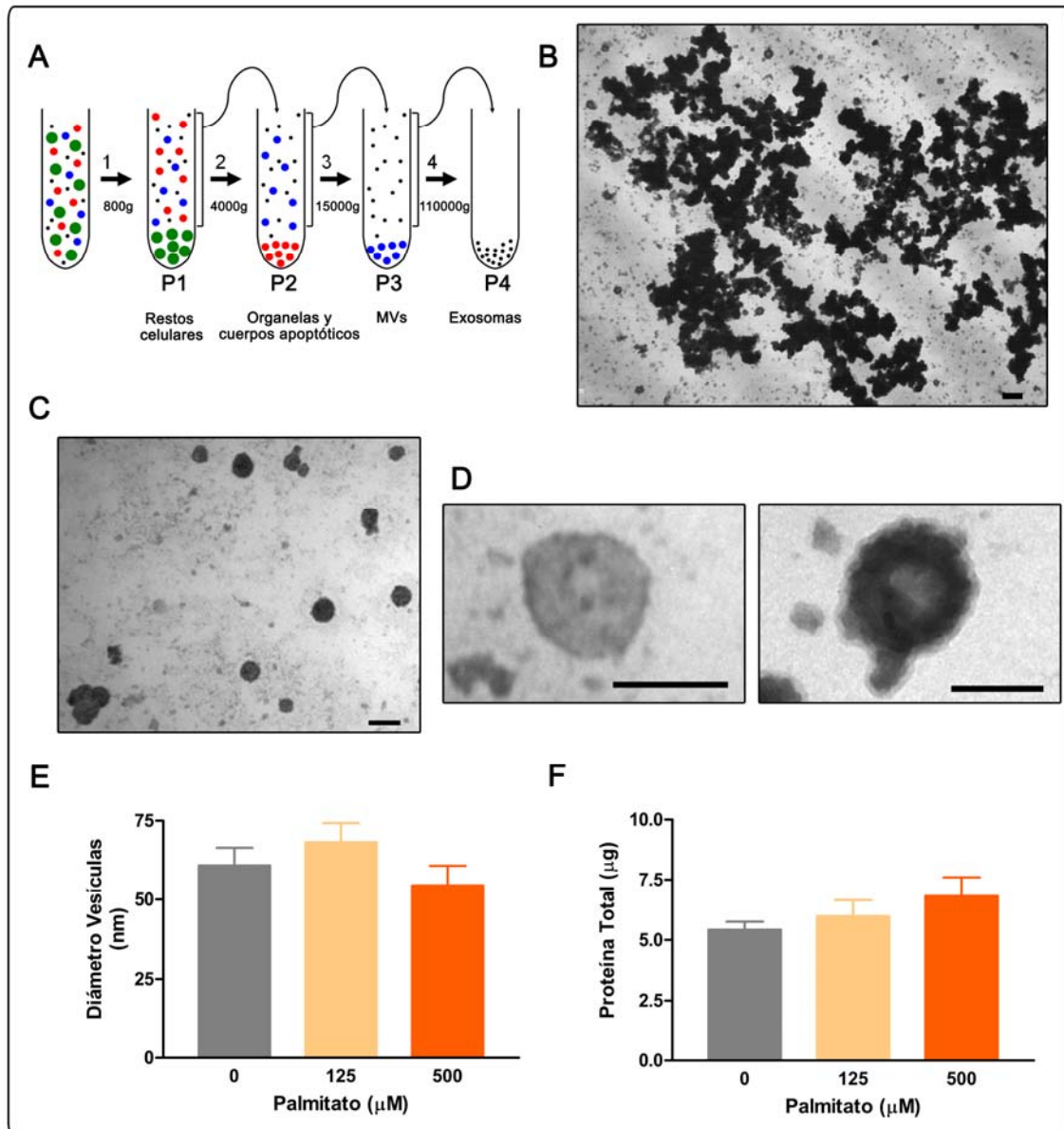


Figura 42. Caracterización de vesículas exosomales derivadas de cultivos microgliales tratados con PA. (A) Esquema del protocolo de aislamiento de exosomas centrifugación diferencial seguida de ultracentrifugación. (B-D) Imágenes representativas de la preparación de exosomas aislados por ultracentrifugación a 110000g, teñidos con acetato de uranilo, visualizados por microscopía electrónica de transmisión. Barras de escala en (B) representan una longitud de 200 nm, en (C) y el panel izquierdo de (D) de 100 nm y en el panel derecho de (D) de 50nm. (E) Análisis del diámetro de los exosomas aislados. ANOVA 1V, sin diferencias significativas. (F) Cuantificación por micro BCA de los niveles de proteína total correspondiente

a la extracción de vesículas exosomales a partir de 2 millones de células microgliales. ANOVA 1V, sin diferencias significativas.

Efecto de MVs y exosomas derivados de microglía tratada con palmitato sobre la plasticidad estructural de neuronas hipocampales

En función de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, observamos que la exposición a una dieta hiperlipídica induce alteraciones en el remodelado de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo de ratones jóvenes en asociación con una respuesta inflamatoria local, además de sistémica. A partir de estos resultados nos planteamos profundizar el estudio de la interacción microglía- neurona y decidimos evaluar la dinámica estructural de las espinas dendríticas de cultivos primarios de hipocampo en respuesta a las VEs liberadas por cultivos primarios de microglía expuesta a palmitato. Para ello, se utilizaron cultivos de neuronas de hipocampo de 14 DIV de ratón que fueron previamente transfectadas en el día DIV 12 con el fin de que expresaran la proteína GFP y así permitir el análisis de espinas dendríticas (**Figura 43**).

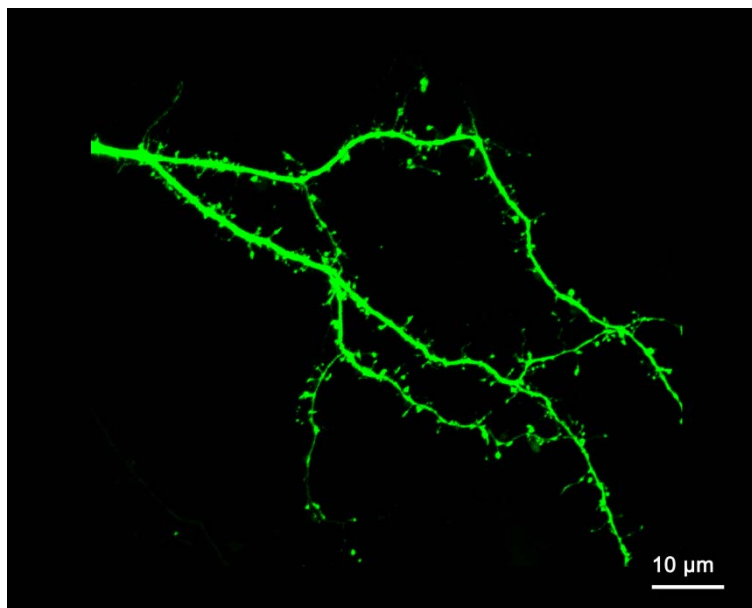


Figura 43. Reconstrucción representativa del árbol dendrítico de una neurona hipocámpica control que expresa la proteína GFP. Imagen obtenida mediante el procesamiento de un z-stack tomado por microscopía confocal.

Luego de realizar el protocolo de aislamiento de VEs a partir de los medios condicionados de microglía tratada con 125 μ MPA, 500 μ MPA o vehículo y obtener las fracciones correspondientes a MVs y vesículas exosomales, éstas se adicionaron a los cultivos neuronales durante 24 hs. Posteriormente, las neuronas cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron debidamente fijadas y montadas en portaobjetos como se detalla en Materiales y Métodos, y procesadas utilizando un microscopio confocal para obtener *z-stacks* de porciones del árbol dendrítico de distintas neuronas. A partir de las imágenes obtenidas, se realizaron reconstrucciones utilizando el software Image J y se analizó la densidad de espinas dendríticas y su morfología como se explicó anteriormente, normalizando el número de espinas de cada subtipo por segmento dendrítico de 10 μ m. En la **Figura 44** se muestran los resultados obtenidos para las neuronas tratadas con las microvesículas derivadas de microglía tratada. Como se puede observar a partir de los distintos gráficos de barras, el análisis

estadístico de la densidad de espinas dendríticas totales (**44A**) o bien de tipo *mushroom* (**44B**) o maduras teniendo en cuenta las de tipo I en conjunto con las tipo II (**44C**), o bien las finas o de tipo III (**44D**) no arrojó diferencias significativas.

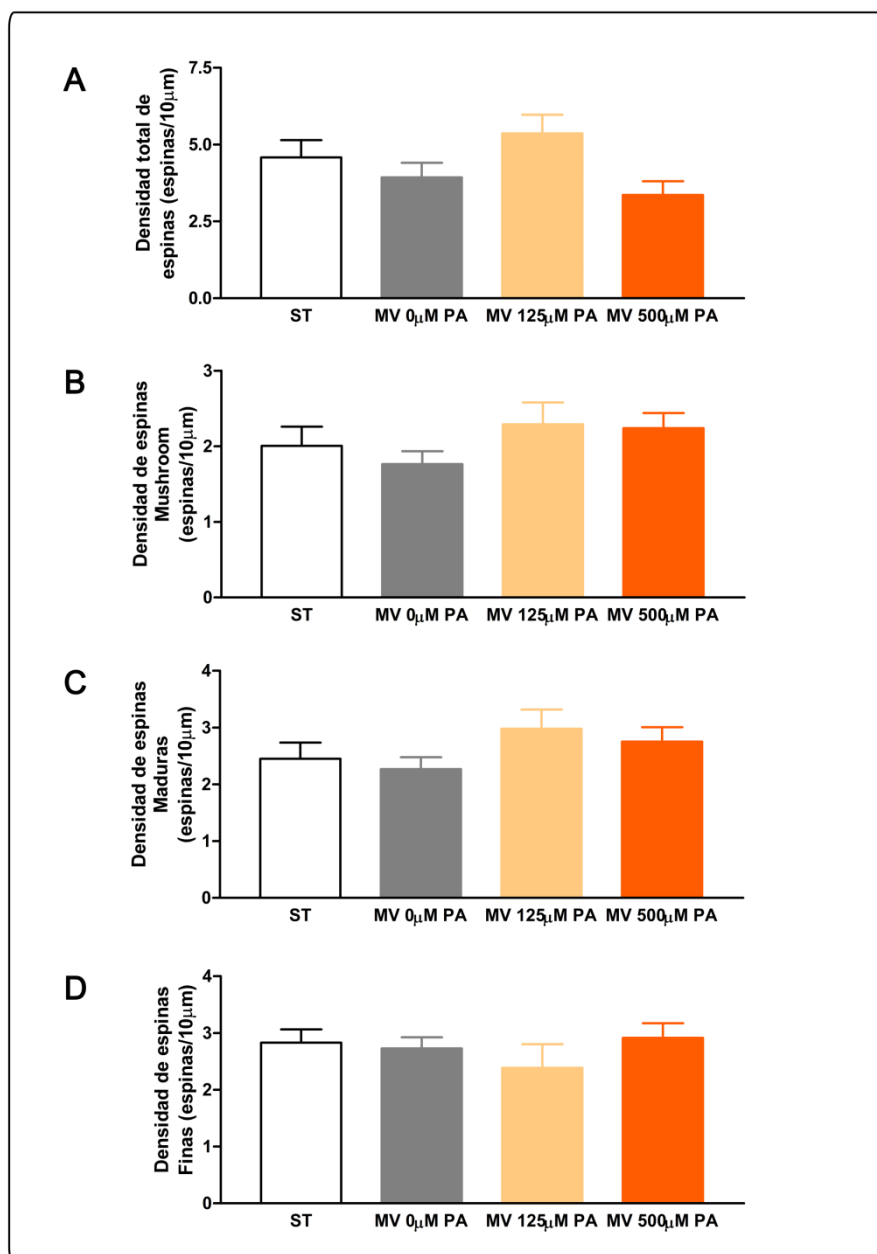


Figura 44. La plasticidad estructural de espinas dendríticas no se ve afectada por la exposición a MVs derivadas de microglía tratada con PA. Los gráficos de barra muestran la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas de neuronas GFP+ sin tratar (ST), o

tratadas con las MVs provenientes de microglía expuesta a 0, 125 o 500 μ MPA. **(A)** Análisis de la densidad total de espinas; **(B)** Análisis de la densidad total de espinas dendríticas de tipo *mushroom*; **(C)** Análisis de la densidad total de espinas dendríticas maduras (*mushroom* + *stubby*) y **(D)** Análisis de la densidad total de espinas dendríticas finas. En todos los casos el análisis estadístico realizado fue ANOVA 1V y los resultados no arrojaron diferencias significativas.

En cambio, cuando analizamos el remodelado de espinas al exponer las neuronas a la fracción correspondiente a las vesículas exosomales, encontramos alteraciones en la morfología de las protrusiones. Como muestra la **Figura 45B**, al igual que antes, no encontramos diferencias significativas en la densidad global de espinas entre los grupos experimentales. Sin embargo, al evaluar la morfología, encontramos que hay diferencias en la densidad de espinas maduras ($p\text{ANOVA} < 0.05$) y finas ($p\text{ANOVA} < 0.01$) al incubar las neuronas hipocampales con los exosomas derivados de la microglía tratada (**Figura 45 D-E**).

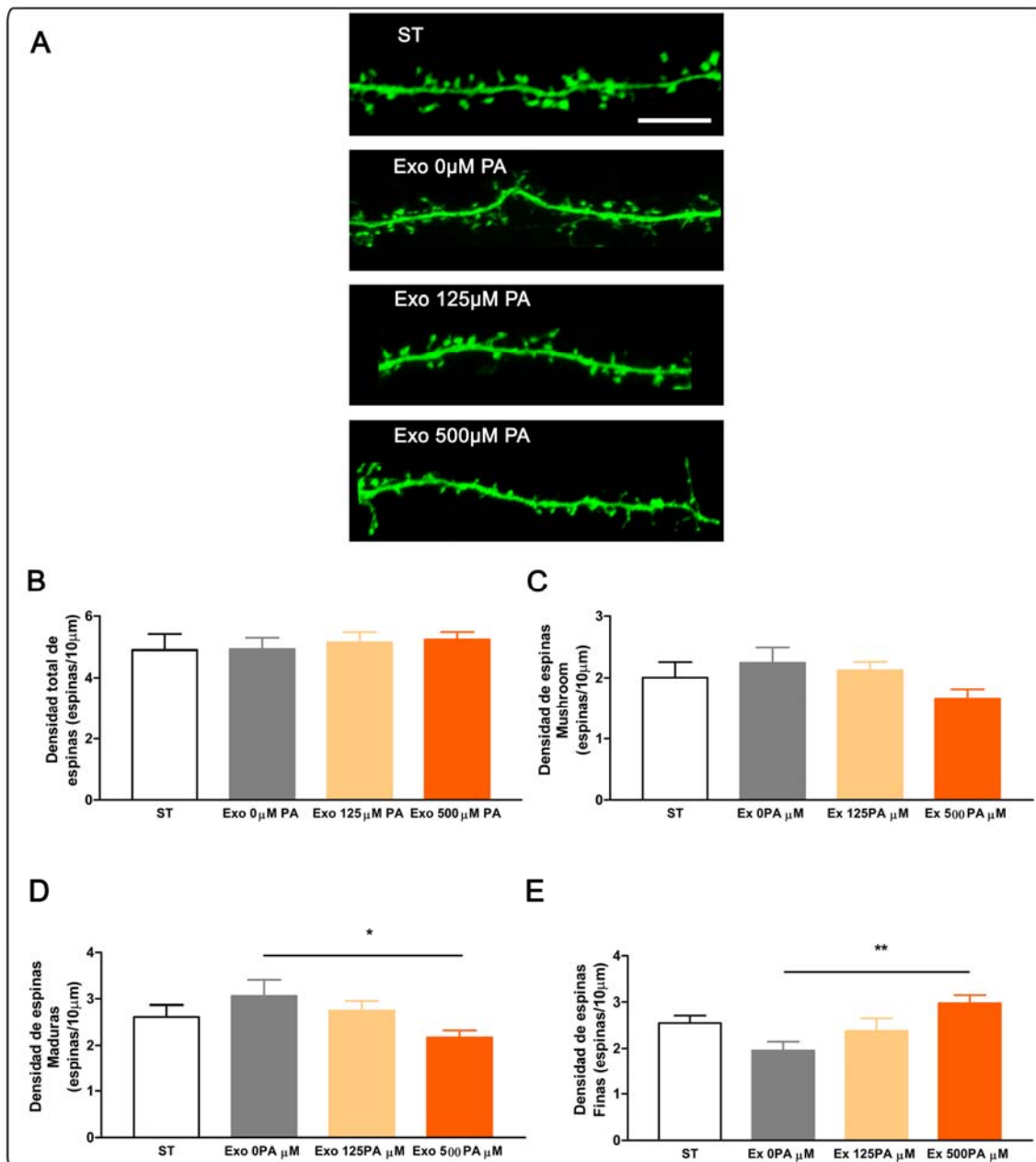


Figura 45. La exposición de neuronas a las vesículas exosomales derivadas de microglía tratada con PA afecta la plasticidad estructural de espinas dendríticas de neuronas hipocampales. (A) Reconstrucción de segmentos dendríticos representativos de cada condición experimental del tratamiento con exosomas. Barra de escala = 10 μ m. Los gráficos de barra muestran la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas de neuronas GFP+ sin tratar (ST), o tratadas con las vesículas exosomales (Ex) provenientes de microglía expuesta a 0, 125 o 500 μ MPA. (B) Análisis de la densidad total de espinas. ANOVA 1V, sin diferencias significativas. (C) Análisis de la densidad total de espinas dendríticas de tipo

mushroom. ANOVA de una vía, sin diferencias significativas. **(D)** Análisis de la densidad total de espinas dendríticas maduras (*mushroom* + *stubby*). ANOVA 1V ($p < 0.01$) y $*p < 0.05$ 500 μM PA vs 0 μM PA, contraste post hoc de Tukey. **(E)** Análisis de la densidad total de espinas dendríticas finas. ANOVA 1V ($p < 0.01$) y $**p < 0.01$ 500 μM PA vs 0 μM PA, contraste post hoc de Tukey.

En particular, como se señala en los respectivos gráficos, las diferencias se observan cuando se tratan las neuronas con los exosomas provenientes de la microglía tratada con PA 500 μM . A partir de estos resultados podemos inferir que algún componente de estas vesículas exosomales, ya sea de su contenido intraluminal como de su membrana, tiene la capacidad de producir alteraciones en la plasticidad neuronal, al menos en términos de la morfología de las espinas dendríticas.

Discusión III

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo podemos concluir que la interacción entre la microglía y las neuronas hipocámpales, en el contexto de un insulto metabólico, es de gran relevancia en relación al microambiente generado y sus consecuencias en la plasticidad estructural de las neuronas.

En concordancia con lo reportado sobre el tratamiento con palmitato en macrófagos asociados a tejidos de la periferia como el hígado (Ganz & Szabo, 2013) y el tejido adiposo (Namgaladze et al., 2014) así como en células de la microglía (Valdearcos et al., 2014; Wang et al., 2012), observamos que la exposición de cultivos microgliales a palmitato se asoció con una respuesta de tipo M1 o pro-inflamatoria. Luego de 24 hs de estimulación, el PA provocó un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como $\text{IL1}\beta$ y una disminución en los niveles de citoquinas anti-

inflamatorias como IL4 en los medios condicionados de los cultivos primarios de microglía. En este sentido, diversos reportes, tanto *in vivo* como *in vitro*, sugieren que niveles elevados de ácidos grasos saturados promueven una respuesta pro-inflamatoria a través de la señalización de los receptores TLR2 y TLR4, actuando como moléculas de daño (DAMPS) (Huang et al., 2012).

Como ha sido expuesto anteriormente, es sabido que en diversos contextos patológicos en general, y en condiciones de exposición a niveles elevados de lípidos en particular, la inflamación y los altos niveles de citoquinas se asocian con daño neuronal y una disrupción en la homeostasis celular que llevan a la disfunción cerebral (Duffy et al., 2015; Jastroch, Morin, Tschop, & Yi, 2014). Si bien la respuesta inflamatoria tiene efectos deletéreos *per se*, podría a su vez comprenderse como una expresión fenotípica de las alteraciones en la función microglial, con una pérdida del rol en los procesos homeostáticos en los que está involucrada, en distintos aspectos de la fisiología de la conectividad neuronal. En este sentido, se conoce que la capacidad de enviar señales de unas células a otras no se limita a los factores solubles sino que el perfil secretor de una célula se complejiza aún más si tenemos en cuenta las señales enviadas a través de vesículas extracelulares y su regulación en diferentes contextos.

Notablemente, uno de los componentes clave en la biogénesis de las VEs son las ceramidas. Las ceramidas son lípidos que juegan un importante papel en la respuesta al estrés y regulan vías asociadas a la apoptosis y al crecimiento y diferenciación celulares. Sus efectos deletéreos estarían mediados por la inducción de insulino-resistencia, por la activación de vías pro-inflamatorias y por la inducción de la apoptosis (Stratford, Hoehn, Liu, & Summers, 2004). En estudios recientes se ha demostrado que la alimentación alta en grasa se asocia a un aumento de ceramidas

séricas y cerebrales (Dube et al., 2011; Hanamatsu et al., 2014) y éstas se asocian a su vez con una producción elevada de vesículas extracelulares (Trajkovic et al., 2008).

En este capítulo, atendiendo a que las VEs derivadas de diversos tipos celulares de la periferia expuestas a una elevada concentración de ácidos grasos saturados tienen un rol en la promoción y propagación del daño asociado al estímulo lipotóxico, exploramos la implicancia de este mecanismo en la interacción microglía- neurona. Los resultados de los experimentos de exposición de neuronas hipocampales maduras de 14 DIV a VEs derivadas de microglía tratada con PA mostraron que los exosomas, pero no las microvesículas, tienen un efecto en la morfología de las espinas dendríticas, promoviendo un balance hacia una mayor densidad de espinas inmaduras o finas, de menor estabilidad, en detrimento de las espinas maduras (de mayor tamaño y estabilidad: tipo I y II) pero sin alterar la densidad global de espinas dendríticas en ningún caso. Esto resulta sumamente interesante por distintas razones. En primer lugar, hasta donde conocemos, este trabajo sería el primero en reportar la liberación de exosomas provenientes de células microgliales tratadas con palmitato como posible mecanismo implicado en la alteración de la plasticidad sináptica de neuronas hipocampales, al menos en términos morfológicos. El hecho de que las alteraciones se hayan encontrado a partir de la exposición a los exosomas y no a las MVs da cuenta de la especificidad de la regulación de la señalización por este mecanismo y exige una profundización de su estudio en cuanto a la maquinaria de biogénesis como a la composición de las vesículas, que se abordará en una etapa futura.

Por otra parte, le otorga una gran relevancia a este mecanismo el hecho de que en este abordaje *in vitro*, de un grado de complejidad simplificado por su naturaleza, donde se han aislado específicamente los componentes de interés, se hayan podido corroborar los mismos efectos que observamos en el modelo *in vivo* de ratones de 21

días de edad a una dieta alta en grasa hasta los 60 días. En las dos aproximaciones se observa un efecto sobre la madurez y el tipo de espinas dendríticas que predomina, asociado al daño lipotóxico. Tanto *in vivo* (ratones HFD y posterior análisis de espinas empleando inyección de Dil) como *in vitro* (efecto de la fracción exosomal del sobrenadante de microglia primaria expuesta a PA sobre cultivo de neuronas GFP+), se constató la predominancia de espinas inmaduras, sin efecto sobre el número total de espinas.

A partir de estos resultados reconocemos, al menos, dos temas importantes e interrelacionados a evaluar con respecto a la acción de los exosomas asociados al contexto de disfunción metabólica y sus consecuencias en la dinámica estructural de espinas dendríticas: el contenido de los exosomas y el modo en que las vesículas ejercen su señalización en las neuronas receptoras. Por un lado, como se discutiera en el capítulo anterior, uno de los elementos fundamentales en la regulación de la estructura y la dinámica de las espinas dendríticas es el citoesqueleto y, por tanto, las moléculas reguladoras de proteínas involucradas en la tasa de polimerización-despolimerización y su estabilidad son posibles *targets* en el fenómeno que observamos. Por ejemplo, todas aquellas moléculas (de naturaleza proteica, lipídica o de ARN) que modulen en algún sentido la funcionalidad de las ABPs (del inglés *actin binding proteins*) como Arp2/2 o cortactina, cofilina, profilina, CamKII β , IRSp53, entre otras (Bellot et al., 2014), se vislumbran como candidatos interesantes. Por otro lado, las características de la membrana plasmática y las alteraciones en su composición cumplen un papel crucial en la interacción con proteínas adaptadoras o moduladoras del citoesqueleto y se puede inferir que esto último, a su vez, puede estar relacionado con el mecanismo por el cual los exosomas pueden ejercer su función, siendo reconocidos por componentes en la membrana y ser internalizados o no (**Figura 46**).

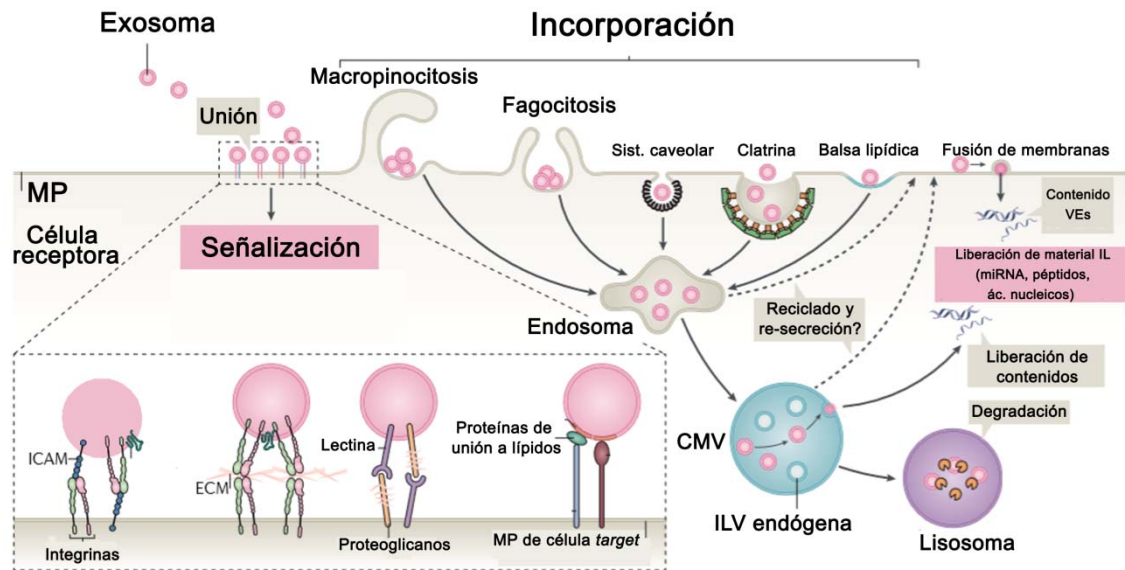


Figura 46. Destino de VEs en célula receptora. Las VEs interactúan con la superficie celular y pueden mantenerse unidas mediante integrinas e iniciar una cascada de señalización. Por otro lado, pueden ser internalizadas por múltiples vías y unirse a CMV en conjunto con las vesículas intraluminales (ILVs) endógenas y por ende a la vía endocítica, que puede llevar a la degradación o liberación intracelular del contenido vesicular. A su vez, las VEs pueden fusionarse a la MP y liberar su contenido al citoplasma. *Modificada de (van Niel et al., 2018).*

Para profundizar sobre los resultados obtenidos en este trabajo es fundamental, en el futuro cercano, poder identificar moléculas en el contenido de los exosomas, como proteínas, lípidos o microARNs (miRNAs) que puedan modular la estructura de las espinas dendríticas a través de la regulación del citoesqueleto de actina o bien mediante mecanismos alternativos.

DISCUSIÓN GENERAL

La conducta alimentaria de los seres humanos está gobernada por diversos factores, desde señales hormonales, neuronales hasta factores psicológicos. A lo largo de la evolución, la regulación del apetito y los cambios en los patrones de alimentación estuvieron sujetos a un ambiente cambiante en relación a la disponibilidad de alimento, el estilo de vida y la tecnología disponible (Luca et al., 2010).

Desde una perspectiva bio-cultural, es importante tener en cuenta que los factores culturales que acompañan la historia evolutiva de nuestra especie han moldeado los patrones de alimentación y éstos, a su vez, tienen consecuencias biológicas. Los cambios en los hábitos de vida nos han llevado a un creciente sedentarismo y al consumo de alimentos industrializados de alto contenido energético y menor contenido nutricional, contribuyendo al escenario actual, donde la alimentación y el estilo de vida son fenómenos clave en la promoción de enfermedades crónicas (Armelagos, 2014). Las alteraciones biológicas adquieren una relevancia aún mayor cuando se tiene en cuenta el nivel de plasticidad de las estructuras potencialmente afectadas y su capacidad de responder en respuesta al ambiente. En este contexto, el período juvenil y la adolescencia representan etapas clave (L. P. Spear, 2013).

Estudiar el impacto que el consumo de una dieta grasa tiene sobre la cognición y la plasticidad sináptica en circuitos neuronales por fuera de los considerados núcleos canónicos en el control metabólico es sumamente relevante.

Recapitulación de resultados

Los resultados *in vivo* e *in vitro* obtenidos en este trabajo de Tesis nos permiten concluir que la disfunción metabólica asociada a una sobrecarga de lípidos tiene un

impacto deletéreo en parámetros relacionados con el desarrollo de patologías neurodegenerativas.

A partir del modelo animal de exposición a la dieta enriquecida en grasas HFD, estudiado en los **Capítulos I y II**, encontramos múltiples alteraciones en el fenotipo conductual de ratones C57BL/6J jóvenes, en asociación con alteraciones gliales y neuronales. Este fenotipo se manifestó en ausencia de obesidad y se vio acompañado por un contexto pro-inflamatorio tanto a nivel periférico como central, en el hipocampo, con una determinada dinámica temporal en el transcurso de la exposición (**Figura 47**).

Luego de 6 semanas de consumo elevado de lípidos a través de la dieta HFD, los ratones de 2 meses de edad presentaron alteraciones en la glucemia y la producción de insulina pancreática, en conjunto con una inflamación sistémica de gran magnitud expresada por los elevados niveles de la citoquina IL1 β en circulación. En este contexto, a nivel del SNC, se encontró una disminuida capacidad neurogénica en la ZSG del giro dentado, además de alteraciones morfológicas relacionadas con la estabilidad y madurez de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1, con una mayor proporción de espinas inmaduras (tipo III) concomitantemente con una disminución de las espinas maduras (tipo I y II). Ambos fenómenos podrían llevar a una disminución de la plasticidad hipocampal en los animales HFD, quienes mostraron un deterioro en el procesamiento de la memoria espacial.

Al continuar con la exposición crónica de la dieta enriquecida en grasas, los ratones HFD mostraron, no sólo un robusto impedimento en el procesamiento de la memoria espacial hipocampo-dependiente, sino en el desarrollo de actividades cotidianas como la elaboración de un nido y en el procesamiento emocional asociado a la ansiedad y al comportamiento de desesperanza o depresión. Este fenotipo conductual se constató en paralelo con fenómenos celulares en el sistema límbico como una disminución de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, una disminución en la señalización

molecular de la insulina en el hipocampo (resistencia a insulina) y mayor activación de la amígdala basolateral. Si bien se detectaron cambios morfológicos asociados a la reactividad de la microglía, no se encontraron aumentados los niveles de citoquinas inflamatorias en el hipocampo, como sí se los detectó a los 2 meses.

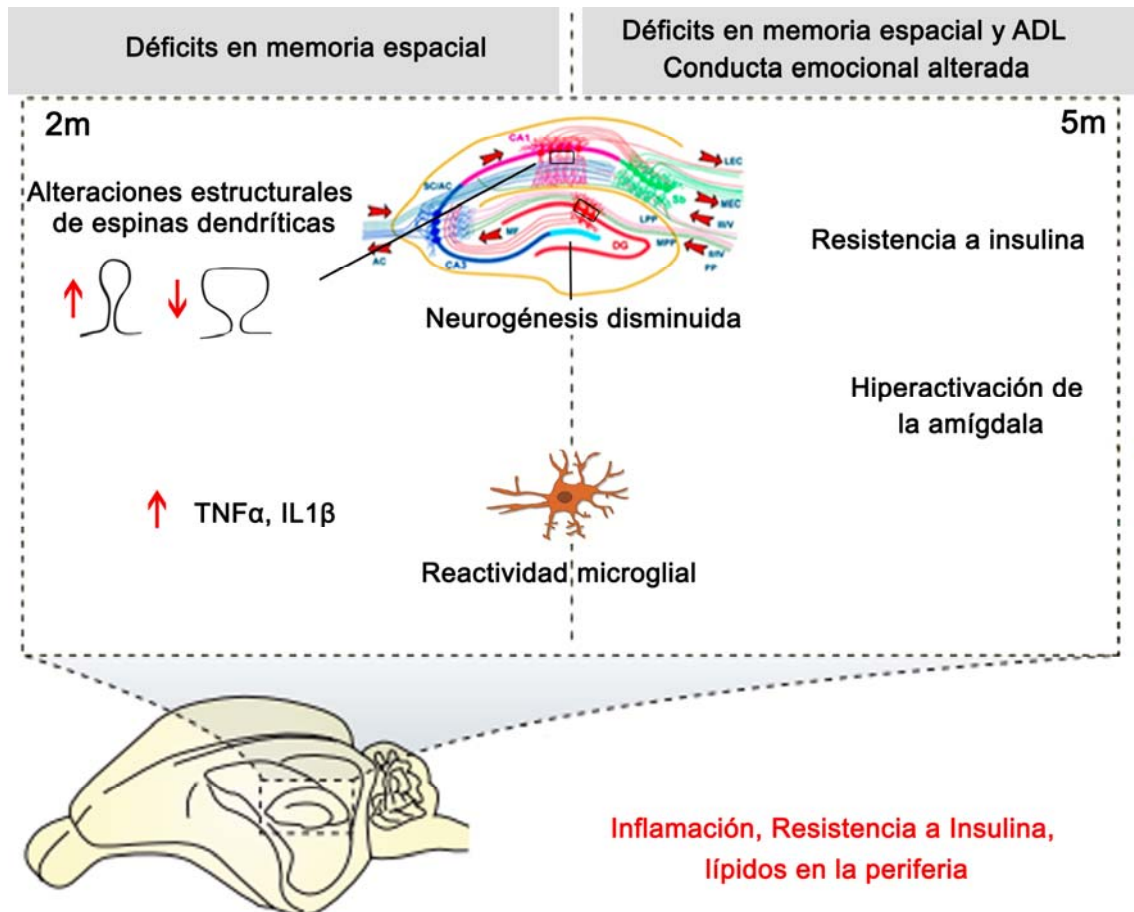


Figura 47. Resumen de resultados del modelo de exposición a la dieta HFD.

Cabe destacar que a nivel de las alteraciones metabólicas inducidas en la periferia, los ratones expuestos a la dieta HFD presentaron dislipidemia, hiperinsulinemia, resistencia a insulina e inflamación hepáticas, pero una vez más, en ausencia de sobrepeso. Sin embargo, tanto la hiperglucemia como la inflamación sistémica

observadas a los 2 meses, no se verificaron luego de la exposición prolongada. A partir de esto podría inferirse que en respuesta a una exposición crónica y prolongada a la dieta hiperlipídica existen mecanismos de compensación, asociados tanto a la respuesta inflamatoria como a la regulación de la glucemia, aunque las alteraciones tanto neuronales como gliales y en el fenotipo conductual en etapas tempranas parecerían mantenerse o bien profundizarse con el tiempo, adquiriendo una relevancia crucial a la hora de analizar las implicancias en el envejecimiento de dichas estructuras y en última instancia, del organismo.

En la búsqueda de posibles mecanismos subyacentes a las alteraciones en la plasticidad neuronal asociados a la exposición a un contexto lipotóxico de disfunción metabólica, en el **Capítulo III** aislamos algunos de los componentes posiblemente involucrados, para estudiarlos en un escenario simplificado *in vitro*.

Como se discutiera a lo largo de las distintas secciones de este trabajo, la inflamación y la resistencia a insulina son dos fenómenos cruciales que se verifican en las patologías metabólicas asociadas a la obesidad y tienen una gran relevancia en la promoción de daño cognitivo asociado al envejecimiento cerebral y a las patologías neurodegenerativas (Cai, 2013; de la Monte & Tong, 2014; O'Brien et al., 2017). Uno de los posibles mediadores del daño asociado a dichos fenómenos es la elevada concentración de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, el cual es uno de los más frecuentes en las dietas de tipo occidental y se ha reportado en diversos estudios que tanto sus niveles en circulación como su transporte al cerebro se ven aumentados en contextos de consumo elevado de grasas y patología metabólicas asociadas (Karmi et al., 2010). A partir de los resultados obtenidos mediante el abordaje del **Capítulo III** podemos inferir que el palmitato sobre las células microgliales induce alteraciones en su funcionamiento y particularmente en su perfil secretor, promoviendo distintos tipos de daño neuronal, potencialmente mediante la

liberación de citoquinas inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ así como otro tipo de señales a través de vesículas extracelulares. En particular, analizamos el efecto de microvesículas y exosomas derivados de cultivos primarios de microglía tratados con distintas concentraciones de palmitato y encontramos que cuando se trataron las células con 500 μM de PA, los exosomas liberados por dichas células provocaron alteraciones estructurales en las espinas dendríticas de neuronas hipocampales, induciendo un aumento de las espinas inmaduras (tipo III) y una disminución de las espinas maduras (tipo I y II) (**Figura 48**). Estos resultados sugieren que la liberación de vesículas exosomales derivadas de microglía en un contexto lipotóxico, sería un mecanismo de gran relevancia en la potencial pérdida de plasticidad neuronal en el hipocampo.

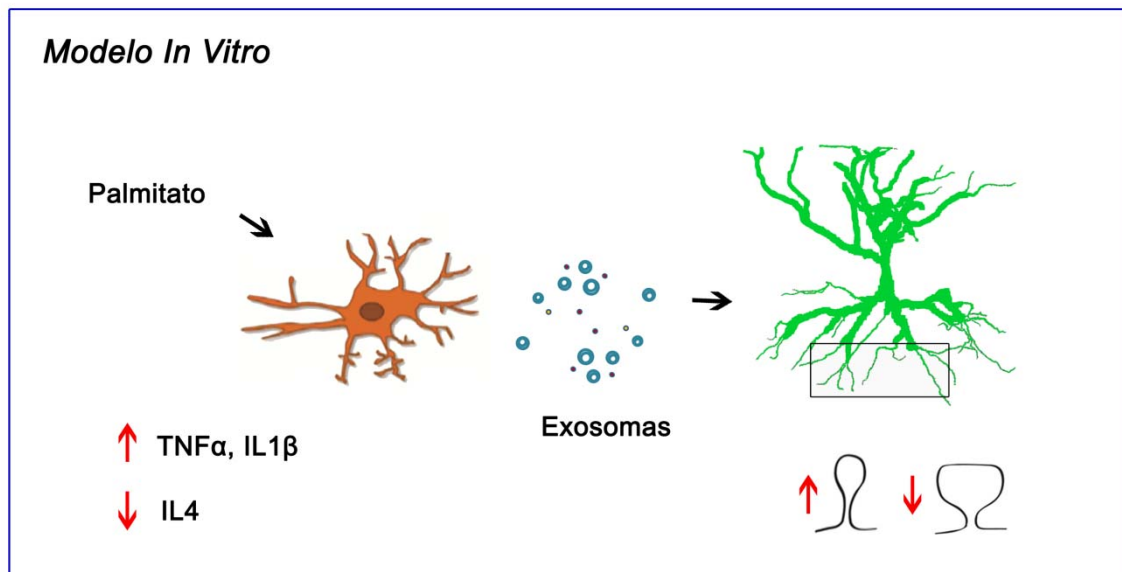


Figura 48. Resumen de resultados de la exposición de células microgliales a PA y su interacción con neuronas hipocámpicas 14 DIV mediante exosomas.

Relevancia de los resultados obtenidos

A partir de un gran caudal de trabajos de investigación en las últimas décadas, tanto epidemiológicos, clínicos como de ciencia básica, se ha establecido que existe una clara asociación bi-direccional entre patologías metabólicas y neurodegenerativas (Alford, Patel, Perakakis, & Mantzoros, 2018; Parimisetty et al., 2016). Tanto las cifras que muestran el aumento de la expectativa de vida con el consiguiente aumento de enfermedades asociadas a la edad, así como la alarmante proporción de personas con sobrepeso, obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (WHO, 2018), representan un cuadro preocupante para la salud pública. En relación a esto último, se agrava aún más si se tiene en cuenta que una gran proporción corresponde a personas jóvenes, incluso niños y adolescentes, con las implicancias que tienen las alteraciones en estructuras cerebrales que se encuentran en plena maduración, provocando cambios y patrones que pueden resultar irreversibles en la vida adulta (Boitard et al., 2012; Borenstein, Copenhaver, & Mortimer, 2006; Puder & Munsch, 2010). Los resultados de exposición juvenil a una dieta enriquecida en grasas en ratones de esta Tesis aportan fuertemente a esta noción.

Por otra parte, un fenómeno importante a tener en cuenta es que la mayoría de los reportes contemplan condiciones establecidas como obesidad o diabetes y, a su vez, los modelos experimentales utilizados son considerablemente severos. El hecho de que en este trabajo las alteraciones encontradas se manifiesten en ausencia de obesidad, e incluso de sobrepeso, pone en evidencia la necesidad de estudiar si este fenómeno se presenta en humanos con características similares y de re-definir eventualmente los parámetros o el umbral con que se determina el segmento poblacional en riesgo. Existiría un daño metabólico de carácter subclínico e indetectable según los métodos actuales de monitoreo en salud pública que, sin embargo, representaría a un gran sector de la población con riesgo de desarrollar

patologías neurológicas, en estrecha relación con el estilo de vida y la conducta alimentaria modernos.

A partir de los resultados de este trabajo, en relación a la patogénesis del fenotipo conductual así como a las alteraciones en distintos tipos celulares del sistema límbico observados en el transcurso de la exposición a la dieta HFD, el impacto de los ácidos grasos sobre la interacción microglía-neurona a través de vesículas exosomales estudiado en el **Capítulo III** podría ser uno de los posibles mecanismos involucrados. Además de generar un microambiente pro-inflamatorio como se ha detectado en el hipocampo de ratones HFD de 2 meses, la estimulación de células microgliales con palmitato ha inducido la liberación de exosomas capaces de producir alteraciones en la plasticidad estructural de neuronas hipocámpales en cultivo, recapitulando los mismos efectos detectados en neuronas piramidales de CA1 en el modelo animal.

Cabe destacar que los cambios en la proporción del tipo de espinas que observamos en los ratones HFD, mayor densidad de espinas inmaduras y menor densidad de espinas maduras, han sido reportados en un modelo de estrés juvenil asociado al estrés social o *bullying* en ratones de 35 días considerados adolescentes (Iniguez et al., 2016). Este fenómeno es sumamente interesante, ya que este tipo de estrés social y particularmente en la ventana temporal juvenil-adolescente, representan un importante riesgo para el desarrollo de patologías psiquiátricas asociadas a la depresión en la adultez (Ttofi, 2015). Llamativamente, los desórdenes psiquiátricos relacionados con el procesamiento emocional y la respuesta al estrés, constituyen a su vez factores promotores de daño asociado a mecanismos comunes con el envejecimiento cerebral (Macht & Reagan, 2017).

Perspectivas

Los resultados que se detallan en esta Tesis demuestran la capacidad de la microglía de comunicarse con la neurona mediante vesículas extracelulares en respuesta al microambiente inflamatorio y de toxicidad que percibe por componentes presentes en las dietas HFD de tipo occidental. No podemos descartar que otros mecanismos participen en esa compleja comunicación ni tampoco que el insulto metabólico provoque una respuesta *per se* actuando en forma directa sobre la membrana neuronal. Es por ello que el fenómeno de interacción entre la microglía y las neuronas a través de VEs merece ser estudiado en profundidad.

Algunos de los fenómenos que sería relevante estudiar para profundizar en el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, son:

- Las señales moleculares que promueven la biogénesis de los distintos tipos de vesículas extracelulares.
- Los componentes de las VEs responsables de las alteraciones neuronales inducidas.
- La modulación del balance entre la liberación de VEs y las vías de degradación asociadas con la maquinaria endocítica.
- La utilización de las VEs o las moléculas que transportan como posibles biomarcadores de la patología asociada al daño neuronal en contextos de patologías metabólicas.

Reflexión final

Al comienzo de este trabajo hemos definido el envejecimiento desde el punto de vista biológico y epidemiológico y su asociación bi-direccional con las patologías metabólicas, haciendo foco en la alteración de la plasticidad cerebral, como complejo fenómeno de adaptación al ambiente y al cambio que acontece. Sin embargo, tanto la concepción del envejecimiento como sus implicancias y su dinámica en la sociedad, se complejizan más aún si lo abordamos desde una postura filosófica, y, en un punto, lo entendemos como una construcción social.

Una de las visiones que mayoritariamente prevalece en la sociedad es una connotación negativa del envejecer, asociándolo al miedo a enfermar, al aislamiento y, en concordancia con esta idea, lo que predomina es el culto a la juventud. En contraposición a esto, la doctrina estoica y sus antiguos admiradores como Cicerón (106 AC- 43 AC) y su “apología” del envejecimiento, reivindicaban los aspectos positivos del envejecimiento, entendiéndolo como una oportunidad y no un problema.

Si desde la ciencia, y como una respuesta a la demanda de la sociedad, el objetivo es procurar juventud y salud eternas, evitar que el envejecimiento ocurra, derrotarlo como una enfermedad que no es, entonces siempre será un fracaso para la biología y la medicina. En lugar de ello, si desde la bioética, y en conjunto como sociedad, lográramos consensuar una perspectiva más humanizada de la vejez, aceptando la finitud de nuestra condición y valorando cada etapa de la vida con sus características, los objetivos de la ciencia podrían direccionar la generación de conocimiento en pos de mejorar la calidad de vida en la vejez en lugar de intentar ofuscadamente “curarla” y simplemente alargar la vida en años. De este modo, y como proponen algunos filósofos y expertos en bioética como Daniel Callahan (Callahan, 1986, 1994), es necesario debatir cómo debe entenderse la medicina para ayudar a los mayores a vivir

mejor, y de manera complementaria, cómo el imaginario social del envejecimiento podría ayudar a la medicina.

Si entendemos el proceso de envejecimiento no sólo desde el punto de vista cronológico, sino teniendo en cuenta la constante interacción con el ambiente y la experiencia, y la particular implicancia de los patrones establecidos en la edad juvenil, desde la ciencia podremos brindar más herramientas para mejorar la calidad de vida y como planteó el padre de la neurobiología, Santiago Ramón y Cajal: “que podamos morir de una vez y no por parcelas”.

En este sentido, nuestro interés a partir de esta Tesis es aportar al conocimiento de los mecanismos involucrados en los efectos del ambiente y el estilo de vida, en particular en relación a los hábitos alimentarios sobre la función cerebral, desde edades tempranas y su impacto potencial sobre el organismo adulto. Nos enfocamos en la etapa juvenil en particular, por ser una ventana de oportunidad fundamental para los fenómenos de plasticidad cerebral y sus consecuencias en la calidad de la función cognitiva en la adultez y en el envejecimiento.

“Todo ser humano, si se lo propone, puede ser escultor de su propio cerebro”
(Santiago Ramón y Cajal).

MATERIALES & MÉTODOS

Animales y dietas

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (Laboratorios Jackson, Bar Harbour, ME), mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, UBA–CONICET; Certificación NIH # A5072-01) bajo condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad (50%), con ciclos de luz/oscuridad de 12hs/12hs (luces encendidas a las 7:00hs am). Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a la Guía NIH para el uso y cuidado de animales de laboratorio y aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Se realizó el mayor esfuerzo por utilizar el mínimo número de ratones y reducir el potencial sufrimiento de los mismos. Ratones macho de 3-4 semanas de edad fueron expuestos o bien a una dieta control (CD) o a una dieta alta en grasas (HFD) hasta los 2 o 5 meses de vida. Ambos tipos de alimento fueron provistos por Gepsa Feeds (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina). Los pellets de la dieta control proveyeron 2.5 Kcal/g de energía y estaban compuestos por un 28.8% de hidratos de carbono, 25.5% de proteínas, 3.6% de grasas, 27.4% de fibras, 8.1% de minerales y humedad del 6.7%. Los pellets de la dieta HFD proveyeron 3.9 Kcal/g de energía, siendo su composición: 22.5% de hidratos de carbono, 22.8% de proteínas, 21.1% de grasas, 23.0% de fibras, 5.6% de minerales y humedad del 5%. Los principales componentes de la grasa correspondieron a ácidos grasos mono-insaturados (44.7%), ácidos grasos saturados (29.8%) y ácidos grasos poli-insaturados (20.9%), entre otros, como fue reportado por Valdivia et al utilizando esta dieta (Valdivia, Patrone, Reynaldo, & Perello, 2014).

Procesamiento del tejido

A menos que se especifique otro procedimiento, los animales fueron rápidamente decapitados para proceder a la extracción de los tejidos. Para el estudio de la

señalización de insulina en hígado e hipocampo, los ratones fueron previamente anestesiados con ketamina (80 mg/Kg Peso corporal, ip; Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/Kg peso corporal, ip; Bayer, Argentina), estimulados durante 10 minutos con insulina (5 UI/Kg, ip; Beta Laboratory, Argentina) y luego decapitados.

Se colectó la sangre troncal, fue centrifugada a 13000 rpm durante 20 min a 4° C y el suero resultante fue conservado a -20° C hasta la determinación de los parámetros metabólicos.

El hígado fue rápidamente extraído; un lóbulo fue congelado en hielo seco y conservado a -80° C hasta su utilización para los estudios de expresión de ARN mensajeros y proteínas, y un segundo lóbulo fue post-fijado 18-24 hs en una solución de paraformaldehído al 4% a 4° C, luego adecuadamente deshidratado en etanol, aclarado en xilol e incluido en parafina para obtener secciones de 10 µm en un micrótomos rotatorio y ser teñidos posteriormente con los colorantes hematoxilina y eosina.

El páncreas también fue rápidamente removido, congelado en hielo seco y guardado a -80° C hasta su procesamiento para la determinación del contenido insulínico.

Luego de la obtención del cerebro, el hemisferio izquierdo fue disecado y el hipocampo congelado en hielo seco y conservado a -80° C hasta su utilización, mientras que el hemisferio derecho fue post-fijado en una solución de paraformaldehído al 4% a 4° C durante 16 h y luego incubado en PBS a 4° C. Se obtuvieron secciones coronales de 60 µm en un micrótomos vibratorio (Vibratome 1000P, USA). Se colocó un total de 6 secciones cada 8 cortes sucesivos, (48 secciones totales), por pocillo de una placa *multiwell* con una solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilen glicol, 50% buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4) a -20°C hasta su utilización, de manera que en cada pocillo se encuentra representado la totalidad del hipocampo. Todos los ensayos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y tinciones fueron realizados en las

secciones en modo suspensión. Para las determinaciones morfométricas se utilizaron 6 secciones cerebrales por animal.

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Origen	Empresa	Concentración	Ensayado por
Anti Iba1	Conejo	Wako	1/1500	IHC
Anti DCX	Cabra	Santa Cruz	1/400	IHC
Anti NeuN	Ratón	Millipore	1/250	IHC
Anti Ki67	Conejo	Novocastra/Leica	1/2000	IHC
Anti c-Fos	Conejo	Santa Cruz	1/3000	IHC
Anti GFAP	Conejo	Sigma	1/400	IF
Anti Akt S473	Conejo	Cell Signaling	1/500	WB
Anti Akt	Cabra	Santa Cruz	1/500	WB
Anti IRS1 S636/639	Conejo	Cell Signaling	1/500	WB
Anti IRS1	Ratón	Santa Cruz	1/500	WB
Anti IgG de ratón biotinilado	Caballo	Vector	1/500	IHC
Anti IgG de conejo biotinilado	Cabra	Vector	1/500	IHC
Anti IgG de cabra biotinilado	Conejo	Vector	1/400	IHC
Anti IgG de conejo alexa 555	Cabra	Invitrogen	1/1000	IF
Anti IgG de ratón HRP	Cabra	Santa Cruz	1/1000	WB
Anti IgG de conejo HRP	Cabra	Santa Cruz	1/1000	WB
Anti IgG de cabra HRP	Burro	Santa Cruz	1/1000	WB

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las distintas técnicas ensayadas. IHC: inmunohistoquímica; IF: inmunofluorescencia; WB: western blot

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica para c-Fos se realizó para evaluar la actividad neuronal en la amígdala. La proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo se estudió mediante la inmunomarcación por Ki67. La capacidad neurogénica en el giro dentado se estudió a partir de la inmunohistoquímica para DCX, *doublecortin*. Para estudiar la densidad y las características morfológicas de las células microgliales se utilizó el marcador Iba1. El marcador de neuronas jóvenes NeuN se utilizó para estimar el volumen del hipocampo.

Los cortes de cerebro de 60 µm fueron debidamente lavados con buffer fosfato salino PBS para remover la solución crioprotectora mencionada en que fueran conservados. Luego se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena utilizando una solución 50:50:1 metanol: PBS: H₂O₂ y posteriormente se llevó a cabo el bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos con suero de cabra o caballo 1% en PBS-Tritón 0.1%. Las secciones fueron incubadas 18-24 hs con los anticuerpos primarios detallados en la **Tabla 4**.

Utilizamos anticuerpos secundarios biotinilados (Vector Laboratories USA, **Tabla 4**), seguido del procesamiento con el kit ABC para la amplificación de la señal (Vector Laboratories) y revelado mediante diaminobenzidina (DAB) 2 mM (Sigma, USA) y peróxido de hidrógeno 0.5 mM en buffer Tris 0.1 M. Los cortes fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con gelatina, luego deshidratados en soluciones de etanol de porcentaje creciente, aclarados en xilol y montados con bálsamo de Canadá.

En todos los casos se utilizaron entre 4 y 5 animales por grupo.

Núcleos c-Fos positivos en la amígdala

El número de núcleos positivos para el marcador c-Fos se evaluó en la amígdala basolateral. Se contaron los núcleos positivos para c-Fos utilizando el objetivo 40x de un microscopio Nikon E200 y la densidad de núcleos (núcleos c-Fos+/mm²) se determinó analizando campos de 63,523.02 µm² en la amígdala basolateral de cada corte de cerebro para obtener un promedio de núcleos c-Fos+/mm².

Capacidad proliferativa: células positivas para Ki67 en la ZSG

La inmunomarcación de Ki67 permitió evaluar la capacidad proliferativa en la ZSG del giro dentado del hipocampo. La cuantificación del número de células Ki67+ se realizó bajo un objetivo 40x de un microscopio Nikon E200. Se analizó toda la extensión rostrocaudal del giro dentado de cada ratón a partir de secciones de 60 µm. Se contaron las células tanto en la hoja superior como inferior de la ZSG y los resultados fueron expresados como el número total de células Ki67+ por hemi-giro dentado. Este número se obtiene luego de calcular el promedio de los cortes analizados por animal, multiplicado por el número total de secciones: 48 cuando se tiene en cuenta el hipocampo total, 18 cuando se tiene en cuenta hipocampo dorsal y 17 en el caso del hipocampo ventral.

Neuronas positivas para DCX en el Giro Dentado

Se realizó la inmunohistoquímica de *doublecortin* (DCX) para estudiar la neurogénesis adulta en el hipocampo. La cuantificación de las células positivas para DCX se realizó bajo un objetivo 40x de un microscopio Nikon E200, como fue previamente reportado por nuestro grupo (Beauquis et al., 2014). Se analizó toda la extensión rostrocaudal del giro dentado de cada ratón a partir de secciones de 60 µm. Se contaron las células

tanto en la hoja superior como inferior de la ZSG y los resultados fueron expresados como el número total de células DCX+ por hemi-giro dentado, luego de obtener el promedio de los cortes analizados por animal, multiplicado por el número total de secciones: 48 cuando se tiene en cuenta el hipocampo total, 18 cuando se tiene en cuenta hipocampo dorsal y 17 en el caso del hipocampo ventral.

Volumen del hipocampo

El volumen del hipocampo fue calculado a partir de la inmunohistoquímica para el marcador neuronal NeuN. Utilizando el software Optimas (Media Cybernetics), se realizó la medición del área a partir de imágenes 4x ensambladas que contuvieran la totalidad de la estructura y se multiplicó por el espesor de la sección (60 μm) y el número de secciones correspondientes al hipocampo.

Densidad de células microgliales

La densidad microglial Iba1+ fue estimada como se reportó anteriormente por nuestro grupo (Pomilio et al., 2016), utilizando cuadros de conteo de $6 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ ubicados al azar en dos subregiones diferentes del hipocampo: *stratum radiatum* y el hilio. Se contó un mínimo de 100 células por animal.

Tamaño del soma microglial

El tamaño del soma Iba1+ fue evaluado como una medida indirecta de la activación microglial, empleando los cortes de cerebro conteniendo hipocampo que se procesaron para la inmunocitoquímica de Iba 1. Se tomaron fotomicrografías de células individuales elegidas al azar en las regiones de *stratum radiatum* e hilio del hipocampo según corresponda. El soma fue delineado a partir de fotomicrografías

debidamente calibradas y se midió su superficie utilizando el software ImageJ. Se midieron al menos 50 células por animal.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia para el marcador astrogial GFAP se realizó para evaluar la densidad y el área ocupada por este tipo celular. La tinción con lectina fluorescente permitió el estudio morfométrico de la vasculatura en el hipocampo.

De la misma manera que para los ensayos de inmunohistoquímica en cortes de cerebro, la técnica se realizó en suspensión. Luego de la remoción de la solución crioprotectora con lavados en PBS, los cortes destinados para la inmunofluorescencia contra GFAP, fueron sometidos al proceso de bloqueo de sitios inespecíficos con una solución de suero de cabra al 3% en PBS- Tritón 0.1%. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-GFAP (**Tabla 4**) durante una noche en la solución de bloqueo conteniendo además, la lectina de *Lycopersicon esculentum* (1/400, Vector) a 4°C. Luego de los lavados correspondientes, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa rojo (**Tabla 4**) y los cortes fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con gelatina y montados utilizando alcohol polivinílico con DABCO (Sigma). Se utilizó un número de 4 - 5 animales por grupo.

Porcentaje de área ocupada por vasos Lectina positivos

La evaluación del área ocupada por vasos se realizó a partir de la inmunofluorescencia de lectina. Se tomaron imágenes por microscopía confocal (Nikon Eclipse E80) de distintos planos cada 0.65 μm a lo largo del eje z de los cortes coronales de cerebro,

tanto en la región del hilio como de *stratum radiatum* del hipocampo. Se promediaron los valores obtenidos en las imágenes correspondientes utilizando la opción de máxima proyección del software ImageJ y se analizaron dichas imágenes promediadas y en escala de grises mediante el programa Optimas. Se estableció un umbral para determinar la señal positiva de lectina y se obtuvo el área positiva en relación a las áreas de interés.

Complejidad vascular

La complejidad vascular se estudió a partir de la misma inmunofluorescencia de lectina, en términos del número de puntos de bifurcación de los vasos en relación al área analizada, hilio o *stratum radiatum*.

Porcentaje de área positiva para GFAP y densidad de células astrogliales

De la misma manera que para evaluar el AIR lectina positiva, a partir de la inmunofluorescencia para GFAP, se tomaron imágenes por microscopía confocal (Nikon Eclipse E80) de distintos planos cada 0.65 μm a lo largo del eje z de los cortes coronales de cerebro, tanto en la región del hilio como de *stratum radiatum* del hipocampo. Se promediaron las imágenes correspondientes utilizando la opción de máxima proyección del software ImageJ y se analizaron dichas imágenes promediadas y en escala de grises mediante el programa Optimas. Se estableció un umbral para determinar la señal positiva de GFAP y se obtuvo el área positiva en relación a las áreas de interés. Para la cuantificación de la densidad de células positivas para el marcador astrogliar GFAP, se utilizaron marcos de conteo en las imágenes previamente obtenidas y como éstas corresponden a la totalidad del espesor del tejido, se tuvo en cuenta el número total de secciones y se expresó en unidad de volumen de cada subregión analizada.

Tinción con el colorante lipofílico Dil (Perclorato de 1, 1'-dioctilo-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina) y análisis de espinas dendríticas

Para este experimento, luego de ser sometidos a la dieta HFD o control hasta los dos meses, 4 ratones de cada grupo fueron profundamente anestesiados con ketamina (80 mg/Kg Peso corporal, ip; Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/Kg peso corporal, ip; Bayer, Argentina) para luego ser sometidos a la perfusión trans-cardíaca con 20 ml de solución fisiológica primero y 20 ml de solución fijadora después (paraformaldehído al 4% en PBS). Los cerebros fueron removidos rápidamente y post- fijados en la misma solución durante 24 hs a 4° C y posteriormente incubados en PBS a la misma temperatura. Luego se utilizó un vibrátomo para obtener secciones coronales de 150 µm de grosor, conteniendo hipocampo fundamentalmente dorsal. Se realizó la tinción de neuronas CA1 de hipocampo dorsal con pequeñas gotas de una solución saturada de Dil (Invitrogen, USA) en aceite de pescado (Pozzo-Miller, Inoue, & Murphy, 1999). Se introdujo el colorante por microinyección utilizando una pipeta de vidrio de *patch clamp* sujeta a un micromanipulador y acoplada a una jeringa para la aplicación de presión positiva. Las secciones fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad por 24 hs. Luego, las secciones fueron post- fijadas en PFA 4% durante 2 hs a temperatura ambiente, lavadas con PBS y fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, CA). Para el análisis de la tinción de dendritas se tomaron imágenes de distintos planos cada 0.1 µm en el eje z (*z-stacks*) utilizando un microscopio confocal FV-300 Olympus con un objetivo 60x de aceite de inmersión (NA 1.42) en el Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de la Universidad de Córdoba. Los *z-stacks* obtenidos fueron deconvolucionados utilizando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, Leica, Holanda) mediante el algoritmo de estimación de máxima verosimilitud a partir de 15 iteraciones. Se analizó la densidad de espinas dendríticas y su

morfología a partir de segmentos dendríticos de dendritas secundarias o terciarias apicales en *stratum radiatum* de neuronas CA1 utilizando el programa ImageJ (NIH, USA). La densidad de espinas totales y de cada categoría morfológica se expresó por cada 10 μm de longitud de segmento dendrítico. Se analizaron 2 cortes de cada uno de los 8 animales, sumando un total aproximado de 1500 μm de longitud dendrítica por grupo experimental.

Parámetros Metabólicos

Todos los parámetros metabólicos fueron determinados luego de 6 horas de ayuno. Se utilizó un mínimo de 4 animales para las determinaciones séricas y de 8 para la glucemia y el contenido pancreático de insulina.

La glucemia fue medida utilizando un glucómetro One Touch Ultra (Johnson&Johnson, USA) en una gota de sangre obtenida de la cola.

Perfil lipídico

Los niveles séricos de triglicéridos y colesterol fueron determinados por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un autoanalizador Selectra-2. Las lipoproteínas HDL fueron aisladas a partir del sobrenadante obtenido luego de la precipitación de lipoproteínas apoB, utilizando ácido fosfotúngstico (40g/L) en presencia de iones magnesio (Warnick, Benderson, & Albers, 1982).

Actividad de la enzima LpPLA₂ (Fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas)

La actividad de fosfolipasa A₂ asociada con lipoproteínas (LpPLA₂) se determinó siguiendo un ensayo radiométrico descrito por Blank y colaboradores (Blank, Hall,

Cress, & Snyder, 1983) con modificaciones mínimas (Muzzio et al., 2007). Brevemente, se separó el acetato radiactivo liberado del sustrato lipídico mediante extracción y posteriormente se midió la radiactividad de la fase acuosa por centelleo líquido usando un analizador de centelleo líquido Packard 210TR (Packard Instruments, Meridian, CT). También se midió la radioactividad del sustrato-buffer. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/ml.h}$. Todas las mediciones se realizaron dentro del mismo ensayo. La precisión dentro de la curva (CV) para la actividad Lp-PLA2 fue del 5,1%.

Contenido insulínico en páncreas

Como fue descripto previamente (Bonaventura et al., 2008), para medir el contenido de insulina, los páncreas fueron pesados y la insulina fue extraída a partir de homogenatos en etanol ácido. Brevemente, el tejido fue homogeneizado en 40 volúmenes de etanol ácido (75% etanol, 20% agua, 5% ácido acético) y la insulina fue extraída luego de una incubación de 18-24 hs a 4° C. Los homogenatos fueron centrifugados 10 minutos a 2000g a 4° C y los sobrenadantes fueron neutralizados con un volumen de 0.85 M de buffer Tris.

Luego de una segunda incubación de 60 minutos a -20 ° C y centrifugación de 30 minutos a 4° C a 3000g, los sobrenadantes fueron mantenidos a -70° C hasta su utilización. La insulina pancreática se midió por el ensayo de RIA usando insulina humana provista por Laboratorios Beta y anticuerpo anti insulina (Sigma, St. Louis, MO). Todas las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo de RIA. La mínima concentración detectada fue de 2 ng/ml y el coeficiente de variación intra-ensayo fue del 6.8%.

Cálculo del índice HOMA

El índice HOMA fue calculado como:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Glucosa} \times \text{insulina}}{405}$$

Cuando la glucemia está expresada en mg/dl y la insulina sérica en mUI/L, luego de 6 horas de ayuno.

Tinción de Hematoxilina- Eosina

Brevemente, las secciones de hígado incluidas en parafina fueron desparafinadas en xilol sobre portaobjetos y luego re-hidratadas mediante soluciones de concentración de etanol decreciente hasta el agua destilada. Luego, las secciones fueron incubadas durante 2 minutos con hematoxilina de Carazzi. Se realizaron lavados con agua corriente y luego se incubaron 1 minuto con eosina. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en soluciones graduadas de etanol, aclaradas en xilol y montadas con bálsamo de Canadá.

Evaluación de citoquinas por ELISA

Los niveles de TNF α e IL1 β fueron medidos tanto en el suero como en homogenatos de hipocampo de ratones luego de 6 o 16 semanas de exposición a la dieta CD o HFD por ELISA. Se utilizó un kit de ELISA Set II BD OptEIA™ para la citoquina TNF α de ratón (número de catálogo: 558534, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) y para la citoquina IL1 β de ratón (mini ABTS Development ELISA kit, número de catálogo: 900-M47, PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron

obtenidos a partir de un espectrofotómetro de placa. Se utilizó un $n = 4$ de muestras por grupo en cada caso.

Western Blot

El tejido congelado de hipocampo e hígado fue homogeneizado en buffer RIPA suplementado (en una relación tejido: buffer de 1:10), utilizando un homogeneizador Polytron. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método estandarizado de Bradford y luego de la lisis con buffer de carga 5x, fueron sembradas en geles de acrilamida 10%, separadas electroforéticamente por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los sitios inespecíficos de las membranas fueron bloqueados con leche descremada en polvo o BSA 5% en buffer TBS con detergente Tween-20 al 0.5% (TTBS). Para evaluar los niveles de las proteínas de interés, las membranas fueron incubadas a 4° C durante 18-24 hs con los anticuerpos primarios detallados en la **Tabla 4**. Luego, las membranas fueron adecuadamente lavadas en soluciones TTBS 0.5% y TBS, incubadas durante una hora con diluciones 1:1000 de los anticuerpos secundarios especie-específicos, conjugados a HRP (**Tabla 4**). La inmunoreactividad fue revelada mediante la reacción con los reactivos ECL (luminol y ácido p-cumárico; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 3 minutos, seguido de la exposición inmediata en el sistema Chemi gel doc G-Box (Syngene, UK). La densidad óptica de las bandas correspondientes a los pesos moleculares específicos de las proteínas de interés fue cuantificada utilizando el plug-in del software ImageJ para análisis de geles. Se comparó la relación proteína fosforilada/proteína total para Akt1 e IRS1 de los grupos experimentales CD y HFD. Se usaron al menos $n=4$ animales para el análisis de expresión de proteínas por *western blot*. Las proporciones pAkt/Akt y pIRS1/IRS1 se calcularon como un promedio del resultado de la cuantificación de la densidad óptica de 2-3 membranas independientes.

RT-qPCR (Reacción de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa)

Gen	Secuencia <i>primer forward</i>	Secuencia <i>primer reverse</i>
	5'- 3'	5'- 3'
TNF α	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC
IL1 β	AACCTGCTGGTGTGTGACG	CAGCACGAGGCTTTTTTGT
IP10	CAGTGAGAATGAGGGCCATAGG	CGGATTCAGACATCTCTGCTCAT
CiclofilinaB	AAGCATACAGGTCCTGGCATCT	CATTCAGTCTTGGCAGTGCAG

Tabla 5. Secuencia de *primers* o cebadores utilizados en RT-qPCR.

El tejido congelado de hipocampo e hígado fue homogeneizado en el reactivo de Trizol (Life Technologies-Invitrogen, CA, USA) con un homogeneizador Polytron o bien con sonicador y el ARN total se extrajo como recomienda el fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la densidad óptica a 260 y 280 nm en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific USA). El ADNc para amplificar por PCR fue sintetizado a partir de 1 μ g de ARN total, usando la enzima transcriptasa reversa MMLV (MMLV High Performance Reverse Transcriptase enzyme, Epicentre, USA) por 60 minutos a 37°C en presencia de random primers. Las secuencias de las sondas de amplificación utilizadas se muestran en la **Tabla 5**. Se utilizó el gen Ciclofilina B como gen de referencia o *housekeeping* basándonos en la regularidad de su expresión a lo largo de las muestras experimentales. Se utilizaron los sistemas de detección ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) o Bio-Rad CFX (Hercules, CA, USA), alternativamente. Se analizó la expresión relativa calculada mediante el método de Pfaffl (Livak & Schmittgen, 2001) según la ecuación detallada más abajo, y

se expresó como el número de veces de aumento con respecto al grupo control. E= eficiencia de los primers para cada gen (blanco o de referencia), calculada a partir de una curva con distintas concentraciones de ADNcopia; y ΔCt calculado como la diferencia entre el Ct promedio del grupo control y el valor promedio de los duplicados para cada muestra, para cada gen correspondiente.

$$Expresión\ relativa = \frac{(E_{blanco})^{\Delta Ct_{blanco}}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct_{referencia}}}$$

La especificidad de la amplificación por PCR y la ausencia de dímeros fueron verificadas por el análisis de las curvas de disociación. Los primers se utilizaron en una concentración final de 0.3 μ M. Se utilizó una dilución 1:5 de ADNc obtenido para cada reacción de amplificación y los protocolos de qPCR fueron optimizados para cada gen utilizando las siguientes condiciones:

- Ciclofilina B = 10 minutos a 95° C seguidos por 40 ciclos a 95° C por 15 segundos y a 60° C por 1 minuto.
- TNF α = 10 minutos a 95° C seguidos por 40 ciclos a 95° C por 30 segundos, a 58° C por 30 segundos y a 72° C por 1 minuto.
- IL1 β = 10 minutos a 95° C seguidos por 40 ciclos a 95° C por 20 segundos, a 60° C por 30 segundos y a 72° C por 1 minuto.
- IP10 = 10 minutos a 95° C seguidos por 40 ciclos a 95° C por 15 segundos y a 60° C por 1 minuto.

Se utilizaron 8 hemi-hipocampos de cada grupo experimental.

Procedimientos de evaluación conductual

Para todas las pruebas de conducta efectuadas, se utilizaron al menos 7 animales de cada grupo experimental.

Test de Construcción de Nido

Para evaluar la capacidad de construir un nido, los ratones fueron alojados individualmente y provistos de material para la construcción del nido que consistió en 16 porciones de papel *tissue* con un área de $5 \times 5 \text{ cm}^2$, dispuestos uno sobre otro en la parte frontal de la jaula. Luego de 24 hs se analizó la construcción del nido de manera cualitativa y cuantitativa. Se cuantificó el papel utilizado, teniendo en cuenta el número de papeles roídos en al menos 1 cm^2 de superficie.

Test de Reconocimiento de una Localización Novedosa

El test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto fue llevado a cabo tal como se encuentra publicado anteriormente (Beauquis et al., 2014), con el fin de evaluar la memoria espacial (Revsin et al., 2009). Los animales CD y HFD de ambos grupos etarios realizaron el ensayo en una caja de plástico negra de $30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$ a la que fueran debidamente habituados durante los 6 días previos al test. Durante el primer día de adaptación, los animales pertenecientes a la misma jaula fueron colocados en la caja durante 10 minutos y durante los 5 días subsiguientes, cada animal fue colocado en la caja individualmente por 5 minutos. El ensayo propiamente dicho consistió en dos fases de exploración de 10 minutos, la fase de adquisición o T1, y la fase de testeo o T2, separadas por un intervalo inter ensayo de 60 minutos, en el cual los animales vuelven a sus respectivas jaulas. En T1, los ratones son expuestos a dos objetos plásticos (moldes de gelatina, precisamente) idénticos en dos esquinas determinadas, contigua una de la otra, mientras que en T2, uno de los objetos es desplazado hacia una nueva localización en la esquina opuesta respecto del objeto no re-localizado. Las fases T1 y T2 fueron grabadas con una cámara de video ubicada siempre en la misma posición para la posterior evaluación de la exploración a partir de los videos. Se consideró como exploración positiva de cada objeto cuando el hocico

del animal estuviera en dirección al objeto y a menos de 1 cm de distancia. Como criterio de inclusión al test, se tuvo en cuenta un mínimo de 20 segundos de exploración en la fase T1 de manera de establecer una correcta habituación a los objetos. El desempeño en el test se obtuvo como el porcentaje del tiempo de exploración del objeto re-localizado con respecto al tiempo total de exploración en la fase T2. Se determinó la validez del ensayo a partir de la evaluación de la exploración aleatoria de los objetos durante la fase de adquisición. El control de locomoción en ambas instancias se realizó a partir del software Any-maze (Stoelting, USA) que permite el rastreo del animal en la plataforma (*tracking*) y evaluar la distancia recorrida.

Test de Exploración en un Laberinto en Y

El dispositivo del laberinto en Y consistió en una plataforma de madera revestida con melamina negra con 3 brazos de 30 cm de largo y dispuestos formando ángulos iguales. Los ratones fueron adecuadamente habituados a la sala de conducta donde realizaron el test. El test consistió en dos fases de 10 minutos (T1= fase de adquisición y T2= fase de testeo), separadas por un intervalo de 4 hs, grabadas con una cámara de video. Durante la fase T1, los animales estaban habilitados a explorar dos de los 3 brazos de la plataforma, mientras que en la fase T2, se les permitió explorar los 3 brazos libremente. Habiendo verificado que en T1 la exploración en ambos brazos no fuera diferente del 50%, se evaluó el comportamiento en T2 como el número de entradas al brazo novedoso durante los primeros 2 minutos. El control de locomoción en ambas instancias se realizó a partir del software Any-maze (Stoelting, USA), que permite el rastreo del animal en la plataforma (*tracking*) y evaluar la distancia recorrida.

Laberinto Elevado en Cruz

El dispositivo del laberinto elevado en cruz consistió de 4 brazos de 30 cm de largo, dos abiertos y dos cerrados por paredes, elevados a 50 cm de altura fabricado en policloruro de vinilo rígido espumado. Luego de 15 minutos de adaptación a la sala de conducta, se ubicó a cada ratón en el cuadrante del centro, mirando hacia uno de los brazos abiertos, y se les permitió explorar el laberinto durante 10 minutos que fueron grabados por una cámara de video. A partir del análisis de los videos obtenidos, se cuantificó el tiempo de exploración y el número de entradas a los brazos abiertos. De la misma manera que para los ensayos anteriores, se realizó el control de locomoción a partir del software Any-maze (Stoelting, USA), para cada grupo.

Test de Suspensión de la Cola

Para llevar a cabo este test, los animales fueron sujetos con cinta adhesiva desde aproximadamente el segundo tercio de la cola, a una plataforma a 50 cm de altura y se grabó su actividad durante 6 minutos. A partir del análisis de los videos obtenidos, se cuantificó el tiempo de inmovilidad con un cronómetro digital.

Test de Campo Abierto

El test de exploración en un campo abierto se llevó a cabo como se publicó anteriormente en el laboratorio (Beauquis et al., 2014) para evaluar la conducta exploratoria. El dispositivo utilizado consistió en una plataforma de madera revestida con melamina blanca de 55 x 55 cm² de área con paredes de 25 cm altura. Los animales fueron colocados individualmente en el centro de la arena y se evaluó su conducta exploratoria durante 5 minutos, a partir de archivos de video. Se determinó una región central de la plataforma digitalmente teniendo en cuenta un área central de

15 x 15 cm². En este trabajo de tesis se muestran las variables distancia total recorrida y distancia recorrida en el centro, evaluadas utilizando el software Any-maze (Stoelting, USA).

Cultivos Celulares

Células pancreáticas

La línea de células pancreáticas INS1E se mantuvo en una atmósfera húmeda a 37° C, 5% CO₂ y 95% aire, en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con suero CALF 10% (Lonza), piruvato de sodio 1 mM (Lonza), β-mercapto-etanol 50 μM, glutamina 2 mM (Lonza), HEPES 10 mM (Lonza), penicilina 100 unidades/mL y estreptomicina 100 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) y se sembraron a una densidad de 400 células/mm².

Microglía

Los cultivos primarios de microglía se obtuvieron por agitación mecánica de cultivos gliales mixtos. Brevemente, se decapitaron crías de ratones C57BL/6J de 1 a 3 días postnatal (P1-3), se obtuvo el cerebro y disecaron corteza e hipocampo. Luego de extraer exhaustivamente las meninges y un primer paso de trituración mecánica, las cortezas e hipocampos fueron sometidas a dos pasos de digestión enzimática en solución de sales de Hank's (Lonza), DNAsa 0.1% (Sigma) y tripsina 0.025% (Lonza) a 37° C durante 15 minutos en agitación. La actividad enzimática fue neutralizada por dilución en medio MEM con sales de Earle (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Euroclone) 20%. El extracto fue filtrado mediante una malla (*Cell Strainer*, Falcon) cuyo diámetro de poro es de 70 μm y luego centrifugado a 800g durante 10 minutos. Las células obtenidas en el pellet fueron resuspendidas en medio completo (MEM, SFB 20%, glucosa 0.6%, penicilina 100 unidades/mL y

estrepomicina 100 mg/mL), sembradas en botellas T-75 y mantenidas en una atmósfera húmeda a 37° C, 5% CO₂ y 95% aire. Para obtener las células microgliales, los cultivos fueron sometidos a agitación orbital a los 10-14 días cuando se hubiera formado la monocapa de astrocitos. Las botellas se agitaron durante 45 minutos a 240 rpm. Los sobrenadantes recuperados fueron centrifugados durante 10 minutos a 800g y las células obtenidas se contaron en cámara de *Neubauer* y se sembraron en placas tratadas previamente con poli-L-ornitina (Sigma) a una densidad aproximada de 700 células/mm² en el medio glial y las condiciones de incubación antes mencionadas.

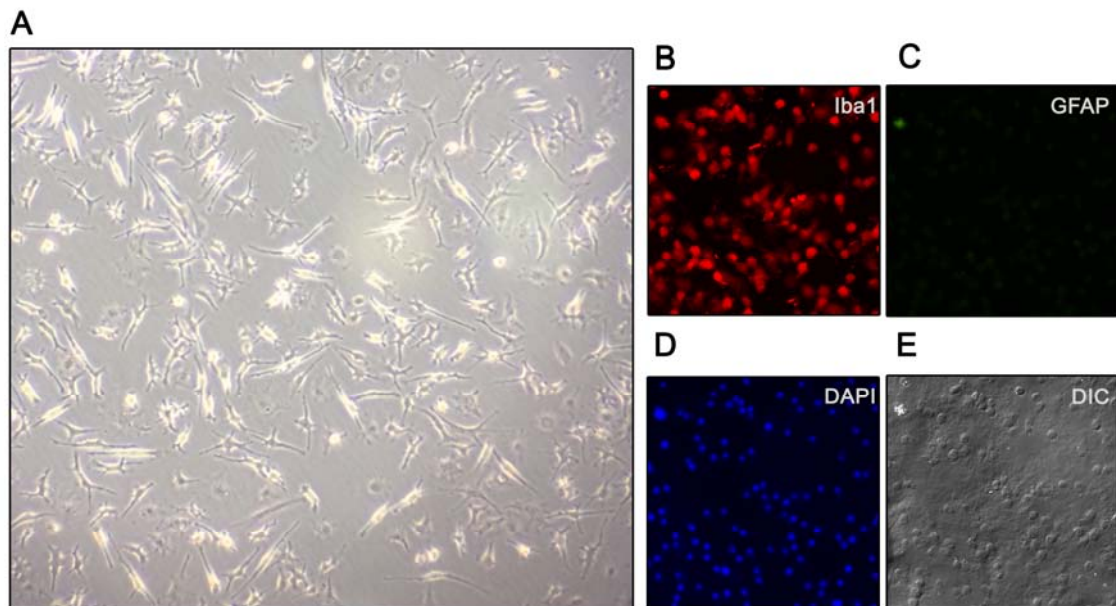


Figura 49. Cultivo primario de células microgliales. (A) Células microgliales vivas en cultivo observadas con objetivo 10x. (B-E) Doble-inmunofluorescencia de células microgliales para los marcadores Iba1 y GFAP. (B) Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia muestra que todas las células son positivas para el marcador microglial Iba1 y la imagen (C) muestra que son negativas para el marcador astroglial GFAP. (D) Tinción de DAPI que muestra los núcleos celulares. (E) Imagen de las células en campo claro.

Neuronas

El cultivo primario de neuronas de hipocampo se preparó a partir de embriones de 18 días (E18) de ratones de C57BL/6. Brevemente, al igual que con el cultivo glial, se extrajo el cerebro y se removieron las meninges. Se disecó el hipocampo y fue disociado enzimáticamente en una solución salina de *Hank's* con tripsina 0.025% durante 15 minutos a 37° C y posterior trituración mecánica con una pipeta p-1000. La reacción fue neutralizada con medio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) suplementado con SFB 10% y luego las células disociadas se contaron en cámara de *Neubauer* y sembradas en cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-L-lisina a una densidad de 400 células/mm². Las células se mantuvieron en medio Neurobasal suplementado con B27 2% (Thermo Fisher Scientific), glutamina 2 mM, glutamato 12,5 µM, penicilina 100 unidades/mL y estreptomicina 100 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) en una atmósfera húmeda a 37° C, 5% CO₂ y 95% aire.

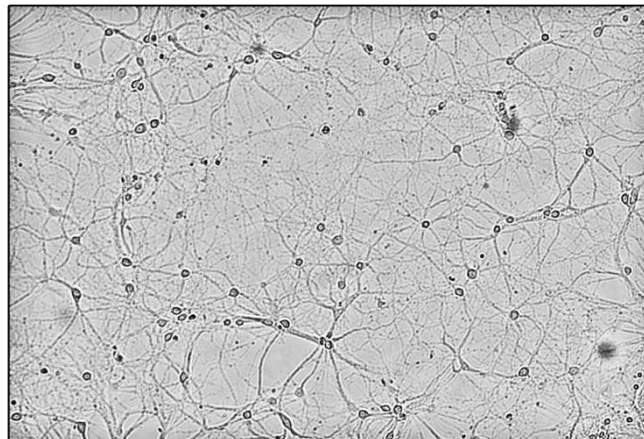


Figura 50. Cultivo de neuronas de hipocampo. Fotografía de neuronas hipocampales vivas en cultivo observadas con objetivo 10x.

Preparación de palmitato

El ácido palmítico (Sigma) se disolvió en una solución de etanol 50% a una concentración de 150 mM, calentando la solución a 60° C. Luego, el PA se acomplejó en una solución de BSA libre de ácidos grasos (Sigma) 10% en una relación 5:1 de palmitato: BSA, incubando la solución a 37° C durante una hora en agitación, de manera tal de que quede un *stock* de palmitato 7.5 mM- BSA 10%. La dilución de trabajo para estimular la microglía se obtuvo diluyendo el *stock* a las concentraciones 0.5 mM y 0.125 mM en el medio glial con 2% suero SFB, al momento de cada experimento.

Ensayo de viabilidad por reducción de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en un compuesto coloreado de color azul (formazán), lo cual permite determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas como una medida de viabilidad celular (Mosmann, 1983). Las células INS1E sembradas en placa de 96 pocillos fueron tratadas con distintas concentraciones de palmitato durante 24 hs, lavadas con solución buffer de Krebs-Ringer-HEPES (KRH) con glucosa 11 mM y luego, las células fueron incubadas con MTT 0.5 mg/ml durante 30 minutos a 37° C. El depósito de formazán fue solubilizado con DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm mediante un espectrofotómetro de placa, por triplicado.

Tinción DAPI/PI para ensayo de viabilidad

Para evaluar el efecto de la exposición del cultivo microglial al palmitato, las células de la microglía fueron sembradas en una placa de 24 pocillos y estimuladas durante 24 hs

con las distintas concentraciones de palmitato y su control con BSA libre de ácidos grasos. Durante los últimos 15 minutos de exposición las células se incubaron con los colorantes fluorescentes DAPI 1/500 y Ioduro de propidio (PI) 1/500 en el medio de cultivo. Se tomaron imágenes de distintos campos con un microscopio de fluorescencia del centro de investigación *Humanitas Research Hospital* en Milán, Italia para analizar el número de células positivas para PI, marcador de células muertas. El resultado se obtuvo a partir de 2 experimentos independientes por duplicado.

Evaluación de citoquinas por ELISA en sobrenadantes

Los niveles de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL4 fueron medidos por ELISA en los medios condicionados de células microgliales tratadas con PA o vehículo. Se emplearon los kits comerciales para la medición de las citoquinas $\text{IL1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL4 de ratón por ELISA (900-K54, 900-K47, 900-K49) siguiendo las especificaciones del fabricante PreproTech. Las determinaciones se realizaron por triplicado a partir de 3-5 experimentos independientes y los resultados fueron obtenidos a partir de un espectrofotómetro de placa. Luego de obtener los valores de las citoquinas utilizando las curvas estándar correspondientes, se normalizaron con respecto a los valores control para comparar experimentos independientes. De esta manera, el valor correspondiente al control es igual a 1 y el análisis estadístico se realizó mediante un test de t de Student para una muestra, con una media teórica de 1.

Purificación de vesículas extracelulares (VEs)

El aislamiento de vesículas extracelulares se realizó a partir del medio condicionado de células microgliales tratadas con distintas concentraciones de PA o vehículo. Se sembraron 2 millones de células en placas de Petri de 60 mm de diámetro previamente tratadas con poli-L-ornitina, utilizando 3 ml de medio con SFB 2%

depletado de VEs por ultracentrifugación durante 18 hs (Shelke, Lasser, Gho, & Lotvall, 2014). La extracción de VEs se realizó por centrifugación diferencial (**Figura 51**), donde todos los pasos de centrifugación y ultracentrifugación fueron a 4° C. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 800g por 5 minutos para descartar *debris* celulares (P1); el sobrenadante obtenido se centrifugó a 4000g por 20 minutos para obtener la fracción vesicular donde sedimentan organelas y cuerpos apoptóticos (P2). Luego, el sobrenadante resultante fue centrifugado a 15000g durante 60 minutos para obtener la fracción correspondiente a microvesículas de 100-1000 nm (P3). Por último, la fracción correspondiente a los exosomas (30-100 nm) se obtuvo ultracentrifugando (Ultracentrífuga Beckman, rotor SWTi55) el sobrenadante a 110000g durante 90 minutos (P4). Los pellets correspondientes a las fracciones P3 y P4 fueron sometidas a un lavado con PBS repitiendo el mismo paso de centrifugación mediante el que fueron obtenidas y luego fueron resuspendidas o bien en PBS para ser utilizados en los ensayos funcionales (estimulación de neuronas en cultivo) y para su observación al microscopio electrónico (TEM), o bien en el buffer de lisis pertinente para análisis de proteínas que se cuantificó por el método colorimétrico de ácido bicinonínico (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, catálogo número 23235).

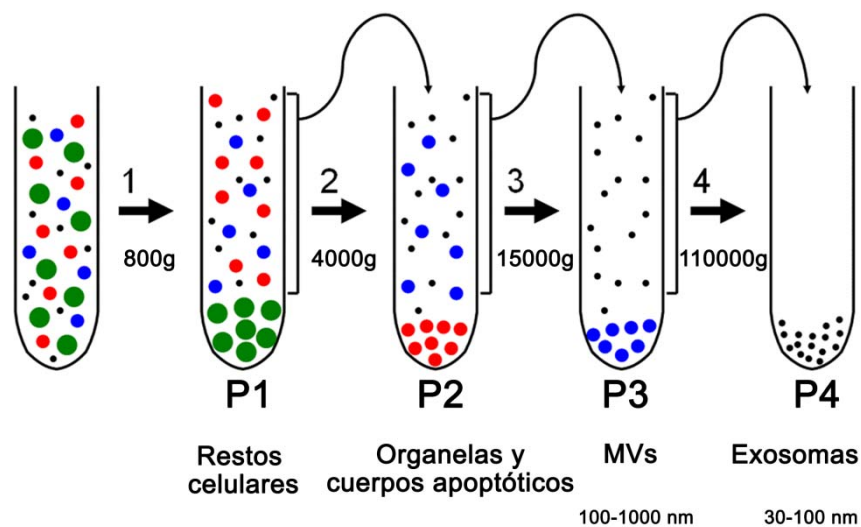


Figura 51. Esquema del protocolo de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de medios condicionados de cultivos microgliales tratados con PA por centrifugación diferencial.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para la evaluación morfológica de las VEs extraídas como se detalló en la sección anterior, las fracciones sedimentadas correspondientes a MVs y exosomas se resuspendieron en PBS y se mantuvieron a 4° C durante un lapso menor a las 24 hs post- extracción hasta ser procesadas para TEM, en el servicio de microscopía del LANAIS-MIE (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica, UBA-CONICET). Brevemente, se tomaron 10 µl de cada suspensión y se los depositó sobre grilla con membrana de LRW hidrofílica, luego se realizó la tinción con Acetato de Uranilo 2% durante 3 minutos, se hicieron lavados con agua bidestilada y se secó a temperatura ambiente hasta ser observadas al TEM (Microscopio Electrónico de transmisión Zeiss EM 109T equipado con cámara digital Gatan ES1000W).

Transfección de neuronas y análisis de espinas

Para realizar el análisis de espinas dendríticas, neuronas hipocampales de ratón de 12 DIV fueron transfectadas con el plásmido pEGFP-C1 con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) en medio Neurobasal sin suplementar. Las neuronas se incubaron con los complejos ADN- Lipofectamina durante 30 minutos a 37° C y luego se transfirieron a su medio original. Luego de 48 hs las neuronas se trataron con las distintas preparaciones de VEs derivadas de microglía tratada con PA o vehículo y luego de 24 hs se fijaron en PFA 4% durante 10 minutos, se realizaron lavados con

PBS y se montaron los cubreobjetos en medio PBS:glicerol. Los preparados fueron observados en el microscopio confocal del servicio de microscopía del centro de investigación *Humanitas Research Hospital* en Milán, Italia. Se realizaron *z-stacks* de porciones del árbol dendrítico de neuronas GFP+, utilizando un objetivo 60x de aceite de inmersión (NA 1.42) cada 0.4 μm en el eje z. Mediante el software ImageJ se realizó la reconstrucción de los *stacks* y se cuantificó la densidad de espinas dendríticas y sus distintas morfologías por segmento dendrítico (10 μm) correspondientes a dendritas secundarias o terciarias, como fue explicado en secciones anteriores. Se analizaron segmentos dendríticos de al menos 15 neuronas por grupo, en dos experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA 1V seguido de comparaciones de Tukey.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media +/- el error estándar de la media. Los diferentes análisis se realizaron a ciegas con respecto a los grupos experimentales. El análisis estadístico se realizó utilizando las siguientes pruebas según corresponda y como se especifica en cada caso: Test de t de Student (para una muestra en comparación con una media teórica o bien comparando dos muestras), ANOVA de una vía (1V) o de dos vías (2V) o bien Test de Chi2 y se realizaron mediante el software de Prism 3.02 (GraphPad Software).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, W., Kusljic, S., & van den Buuse, M. (2008). Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology*, 55(6), 1048-1055. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.035
- Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obes Rev*, 19(2), 269-280. doi: 10.1111/obr.12629
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.*, 124(3), 319-335.
- Altman, J., & Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.*, 126(3), 337-389.
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 27(1-2), 3-18.
- Armelagos, G. J. (2014). Brain evolution, the determinates of food choice, and the omnivore's dilemma. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54(10), 1330-1341. doi: 10.1080/10408398.2011.635817
- Bahrini, I., Song, J. H., Diez, D., & Hanayama, R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep*, 5, 7989. doi: 10.1038/srep07989
- Beauquis, J., Homo-Delarche, F., Giroix, M. H., Ehses, J., Coulaud, J., Roig, P., . . . Saravia, F. (2010). Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. *Exp.Neurol.*, 222(1), 125-134.
- Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., & Saravia, F. (2006). Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur.J Neurosci*, 23(6), 1539-1546.
- Beauquis, J., Saravia, F., Coulaud, J., Roig, P., Dardenne, M., Homo-Delarche, F., & De Nicola, A. (2008). Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Exp.Neurol.*, 210(2), 359-367.
- Beauquis, J., Vinuesa, A., Pomilio, C., Pavia, P., Galvan, V., & Saravia, F. (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 24(3), 257-269.
- Belkina, A. C., & Denis, G. V. (2010). Obesity genes and insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 17(5), 472-477. doi: 10.1097/MED.0b013e32833c5c48
- Bellot, A., Guivernau, B., Tajés, M., Bosch-Morato, M., Valls-Comamala, V., & Munoz, F. J. (2014). The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines. *Brain Res*, 1573, 1-16. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.024
- Biessels, G., Kappelle, A., Bravenboer, B., & Gispen, W. (1994). Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 37, 643-650.
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529-535. doi: 10.1038/nature08983
- Blank, M. L., Hall, M. N., Cress, E. A., & Snyder, F. (1983). Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 113(2), 666-671.

- Blazquez, E., Velazquez, E., Hurtado-Carneiro, V., & Ruiz-Albusac, J. M. (2014). Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 161. doi: 10.3389/fendo.2014.00161
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Laye, S., & Ferreira, G. (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav.Immun.*, 40, 9-17.
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., . . . Ferreira, G. (2012). Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*, 22(11), 2095-2100.
- Boitard, C., Maroun, M., Tantot, F., Cavaroc, A., Sauvant, J., Marchand, A., . . . Ferreira, G. (2015). Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. *J.Neurosci.*, 35(9), 4092-4103.
- Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., . . . De Felice, F. G. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. *J.Clin.Invest*, 122(4), 1339-1353.
- Bonaventura, M. M., Catalano, P. N., Chamson-Reig, A., Arany, E., Hill, D., Bettler, B., . . . Lux-Lantos, V. A. (2008). GABAB receptors and glucose homeostasis: evaluation in GABAB receptor knockout mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 294(1), E157-E167.
- Borenstein, A. R., Copenhaver, C. I., & Mortimer, J. A. (2006). Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.*, 20(1), 63-72.
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(1). doi: 10.1101/cshperspect.a009191
- Bray, G. A., Davidson, M. B., & Drenick, E. J. (1972). Obesity: a serious symptom. *Ann Intern Med*, 77(5), 779-795.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(40), 14515-14520.
- Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., & Morrison, C. D. (2009). Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*, 1792(5), 395-400. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.004
- Buffington, S. A., Huang, W., & Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, 37, 17-38. doi: 10.1146/annurev-neuro-071013-014100
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7(1), 30-40. doi: 10.1038/nrn1809
- Burke, S. N., Wallace, J. L., Hartzell, A. L., Nematollahi, S., Plange, K., & Barnes, C. A. (2011). Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav Neurosci*, 125(6), 836-847. doi: 10.1037/a0026238
- Cai, D. (2013). Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol.Metab*, 24(1), 40-47.
- Calabrese, B., Wilson, M. S., & Halpain, S. (2006). Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*, 21, 38-47. doi: 10.1152/physiol.00042.2005
- Calfa, G., Chapleau, C. A., Campbell, S., Inoue, T., Morse, S. J., Lubin, F. D., & Pozzo-Miller, L. (2012). HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*, 22(7), 1493-1500. doi: 10.1002/hipo.20990
- Calvo-Ochoa, E., Hernandez-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., & Arias, C. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by

- neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34(6), 1001-1008. doi: 10.1038/jcbfm.2014.48
- Calvo-Ochoa, E., Sanchez-Alegria, K., Gomez-Inclan, C., Ferrera, P., & Arias, C. (2017). Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem Int*, 110, 75-83. doi: 10.1016/j.neuint.2017.09.008
- Callahan, D. (1986). Adequate health care and an aging society; are they morally compatible? *Daedalus*, 247-267.
- Callahan, D. (1994). Aging and the goals of medicine. *Hastings Cent Rep*, 24(5), 39-41.
- Camus, M. C., Chapman, M. J., Forgez, P., & Laplaud, P. M. (1983). Distribution and characterization of the serum lipoproteins and apoproteins in the mouse, *Mus musculus*. *J.Lipid Res.*, 24(9), 1210-1228.
- Carnethon, M. R., Loria, C. M., Hill, J. O., Sidney, S., Savage, P. J., Liu, K., & Coronary Artery Risk Development in Young Adults, s. (2004). Risk factors for the metabolic syndrome: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study, 1985-2001. *Diabetes Care*, 27(11), 2707-2715.
- Carvalho, B. M., Guadagnini, D., Tsukumo, D. M. L., Schenka, A. A., Latuf-Filho, P., Vassallo, J., . . . Saad, M. J. A. (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 55(10), 2823-2834. doi: 10.1007/s00125-012-2648-4
- Castanon, N., Luheshi, G., & Laye, S. (2015). Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci.*, 9, 229.
- Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- Chapleau, C. A., Calfa, G. D., Lane, M. C., Albertson, A. J., Larimore, J. L., Kudo, S., . . . Pozzo-Miller, L. (2009). Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis*, 35(2), 219-233. doi: 10.1016/j.nbd.2009.05.001
- Chunchai, T., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2017). The possible factors affecting microglial activation in cases of obesity with cognitive dysfunction. *Metab Brain Dis*. doi: 10.1007/s11011-017-0151-9
- de la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem.Pharmacol.*, 88(4), 548-559.
- Deacon, R. (2012). Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J.Vis.Exp.*(59), e2607.
- Deacon, R. M., Altimiras, F. J., Bazan-Leon, E. A., Pyarasani, R. D., Nachtigall, F. M., Santos, L. S., . . . Cogram, P. (2015). Natural AD-Like Neuropathology in Octodon degus: Impaired Burrowing and Neuroinflammation. *Curr.Alzheimer Res.*, 12(4), 314-322.
- Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*, 80(6), 1948-1957. doi: 10.1128/IAI.06014-11
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 339-350. doi: 10.1038/nrn2822
- Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K., & Zahm, D. S. (1994). Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*, 269(11), 8445-8454.

- Dey, A., Hao, S., Wosiski-Kuhn, M., & Stranahan, A. M. (2017). Glucocorticoid-mediated activation of GSK3 β promotes tau phosphorylation and impairs memory in type 2 diabetes. *Neurobiol Aging*, 57, 75-83. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.010
- Dinareello, C. A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), 935-950. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.043
- Dineley, K. T., Jahrling, J. B., & Denner, L. (2014). Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, 72 Pt A, 92-103.
- Dube, J. J., Amati, F., Toledo, F. G., Stefanovic-Racic, M., Rossi, A., Coen, P., & Goodpaster, B. H. (2011). Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia*, 54(5), 1147-1156. doi: 10.1007/s00125-011-2065-0
- Duffy, C. M., Yuan, C., Wisdorf, L. E., Billington, C. J., Kotz, C. M., Nixon, J. P., & Butterick, T. A. (2015). Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci Lett*, 606, 140-144. doi: 10.1016/j.neulet.2015.08.033
- Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairet, G., Krupova, Z., Henry, C., . . . Le Lay, S. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 6(1), 1305677. doi: 10.1080/20013078.2017.1305677
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci*, 30, 123-152. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328
- Eisinger, B. E., & Zhao, X. (2018). Identifying molecular mediators of environmentally enhanced neurogenesis. *Cell Tissue Res*, 371(1), 7-21. doi: 10.1007/s00441-017-2718-5
- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., . . . Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566-579. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.010
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11), 1313-1317. doi: 10.1038/33305
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25(44), 10074-10086. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Fehm, H. L., Kern, W., & Peters, A. (2006). The selfish brain: competition for energy resources. *Prog. Brain Res.*, 153, 129-140.
- Ferrario, C. R., & Reagan, L. P. (2017). Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology*. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.001
- Filali, M., & Lalonde, R. (2009). Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 1292, 93-99.
- Freeman, L. R., & Granholm, A. C. (2012). Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(4), 643-653. doi: 10.1038/jcbfm.2011.168
- Freeman, L. R., Haley-Zitlin, V., Rosenberger, D. S., & Granholm, A. C. (2014). Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. *Nutr. Neurosci.*, 17(6), 241-251.

- Friedman, B. A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W. J., Lin, H., Huntley, M. A., . . . Hansen, D. V. (2018). Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep*, 22(3), 832-847. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., . . . Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 105(4-5), 423-438. doi: 10.1007/s007020050068
- Fruhbeis, C., Frohlich, D., Kuo, W. P., & Kramer-Albers, E. M. (2013). Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci*, 7, 182. doi: 10.3389/fncel.2013.00182
- Ganz, M., & Szabo, G. (2013). Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int*, 7 Suppl 2, 771-781. doi: 10.1007/s12072-013-9468-6
- Goktas, Z., Moustaid-Moussa, N., Shen, C. L., Boylan, M., Mo, H., & Wang, S. (2013). Effects of bariatric surgery on adipokine-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 69. doi: 10.3389/fendo.2013.00069
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., . . . Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 1106-1115. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.09.004
- Gratuze, M., El Khoury, N. B., Turgeon, A., Julien, C., Marcouiller, F., Morin, F., . . . Planel, E. (2017). Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: Importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 98, 1-8. doi: 10.1016/j.nbd.2016.10.004
- Gray, S. M., Aylor, K. W., & Barrett, E. J. (2017). Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia*, 60(8), 1512-1521. doi: 10.1007/s00125-017-4285-4
- Guarente, L. (2014). Aging research-where do we stand and where are we going? *Cell*, 159(1), 15-19. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.041
- Guillausseau, P. J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Medeau, V., & Kevorkian, J. P. (2008). Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 34 Suppl 2, S43-48. doi: 10.1016/S1262-3636(08)73394-9
- Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci*, 40(4), 237-253. doi: 10.1016/j.tins.2017.02.005
- Gupta, N., Goel, K., Shah, P., & Misra, A. (2012). Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocr.Rev.*, 33(1), 48-70.
- Hanamatsu, H., Ohnishi, S., Sakai, S., Yuyama, K., Mitsutake, S., Takeda, H., . . . Igarashi, Y. (2014). Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. *Nutr Diabetes*, 4, e141. doi: 10.1038/nutd.2014.38
- Hao, S., Dey, A., Yu, X., & Stranahan, A. M. (2016). Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*, 51, 230-239. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.023
- Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272(5656), 827-829.
- Hein, A. M., Stasko, M. R., Matousek, S. B., Scott-McKean, J. J., Maier, S. F., Olschowka, J. A., . . . O'Banion, M. K. (2010). Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain Behav Immun*, 24(2), 243-253. doi: 10.1016/j.bbi.2009.10.002
- Henke, P. G. (1990). Limbic system modulation of stress ulcer development. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 597, 201-206.

- Hirosumi, J., Gurol Tuncman, Lufen Chang, Cem Z. Goergu'n, K. Teoman Uysal, Kazuhisa Maeda, Michael Karin & Go'khan S. Hotamisligil. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420.
- Hirsova, P., Ibrahim, S. H., Krishnan, A., Verma, V. K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., . . . Gores, G. J. (2016). Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology*, 150(4), 956-967. doi: 10.1053/j.gastro.2015.12.037
- Hlushchenko, I., Koskinen, M., & Hotulainen, P. (2016). Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73(9), 435-441. doi: 10.1002/cm.21280
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10(9), 647-658. doi: 10.1038/nrn2699
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C., & Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57(5), 719-729. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.013
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867. doi: 10.1038/nature05485
- Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140(6), 900-917. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Huang, S., Rutkowski, J. M., Snodgrass, R. G., Ono-Moore, K. D., Schneider, D. A., Newman, J. W., . . . Hwang, D. H. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*, 53(9), 2002-2013. doi: 10.1194/jlr.D029546
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844-866. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.008
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.*, 10(11), 1369-1376.
- Iniguez, S. D., Aubry, A., Riggs, L. M., Alipio, J. B., Zanca, R. M., Flores-Ramirez, F. J., . . . Serrano, P. A. (2016). Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiol Stress*, 5, 54-64. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.07.001
- Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., . . . Lie, D. C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 29(25), 7966-7977. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1054-09.2009
- Jalabert, A., Vial, G., Guay, C., Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., Aswad, H., . . . Rome, S. (2016). Exosome-like vesicles released from lipid-induced insulin-resistant muscles modulate gene expression and proliferation of beta recipient cells in mice. *Diabetologia*, 59(5), 1049-1058. doi: 10.1007/s00125-016-3882-y
- James, W. P., & Trayhurn, P. (1976). An integrated view of the metabolic and genetic basis for obesity. *Lancet*, 2(7989), 770-773.
- Jastroch, M., Morin, S., Tschop, M. H., & Yi, C. X. (2014). The hypothalamic neural-glial network and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 28(5), 661-671. doi: 10.1016/j.beem.2014.02.002
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262(19), 9412-9420.

- Joshi, P., Benussi, L., Furlan, R., Ghidoni, R., & Verderio, C. (2015). Extracellular vesicles in Alzheimer's disease: friends or foes? Focus on abeta-vesicle interaction. *Int J Mol Sci*, 16(3), 4800-4813. doi: 10.3390/ijms16034800
- Kapasi, A., & Schneider, J. A. (2016). Vascular contributions to cognitive impairment, clinical Alzheimer's disease, and dementia in older persons. *Biochim Biophys Acta*, 1862(5), 878-886. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.023
- Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Hirvonen, J., Fielding, B. A., Virtanen, K., . . . Nuutila, P. (2010). Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes*, 59(9), 2171-2177. doi: 10.2337/db09-0138
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33(3), 121-129. doi: 10.1016/j.tins.2010.01.001
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*, 282(21), 4067-4079. doi: 10.1111/febs.13412
- Kelly, K. M., Nadon, N. L., Morrison, J. H., Thibault, O., Barnes, C. A., & Blalock, E. M. (2006). The neurobiology of aging. *Epilepsy Res*, 68 Suppl 1, S5-20. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2005.07.015
- Kempermann, G., Kuhn, H., & Gage, F. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-495.
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(9), a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91(2), 461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
- Kido, Y., Nakae, J., & Accili, D. (2001). Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3), 972-979. doi: 10.1210/jcem.86.3.7306
- Kim, K. H., Son, S. M., & Mook-Jung, I. (2013). Contributions of microglia to structural synaptic plasticity. *J Exp Neurosci*, 7, 85-91. doi: 10.4137/JEN.S11269
- King, G. L., Park, K., & Li, Q. (2016). Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes*, 65(6), 1462-1471. doi: 10.2337/db16-0152
- Klempin, F., & Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257(5), 271-280. doi: 10.1007/s00406-007-0731-5
- Kloting, N., & Bluher, M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 15(4), 277-287. doi: 10.1007/s11154-014-9301-0
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., . . . Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*, 5(1), e8809. doi: 10.1371/journal.pone.0008809
- Kohman, R. A., DeYoung, E. K., Bhattacharya, T. K., Peterson, L. N., & Rhodes, J. S. (2012). Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun*, 26(5), 803-810. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.006
- Kong, S. M., Chan, B. K., Park, J. S., Hill, K. J., Aitken, J. B., Cottle, L., . . . Cooper, A. A. (2014). Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes alpha-Synuclein externalization via exosomes. *Hum Mol Genet*, 23(11), 2816-2833. doi: 10.1093/hmg/ddu099
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6), 2027-2033.

- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol. Neurobiol.*, 23(4-5), 727-738.
- Lee, E. B., & Mattson, M. P. (2014). The neuropathology of obesity: insights from human disease. *Acta Neuropathol*, 127(1), 3-28. doi: 10.1007/s00401-013-1190-x
- Lee, H., Lee, S., Cho, I. H., & Lee, S. J. (2013). Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 14(1), 33-42.
- Levy, A. D., Omar, M. H., & Koleske, A. J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front Neuroanat*, 8, 116. doi: 10.3389/fnana.2014.00116
- Levy, E. (2017). Exosomes in the Diseased Brain: First Insights from In vivo Studies. *Front Neurosci*, 11, 142. doi: 10.3389/fnins.2017.00142
- Li, S., Li, H., Yang, D., Yu, X., Irwin, D. M., Niu, G., & Tan, H. (2017). Excessive Autophagy Activation and Increased Apoptosis Are Associated with Palmitic Acid-Induced Cardiomyocyte Insulin Resistance. *J Diabetes Res*, 2017, 2376893. doi: 10.1155/2017/2376893
- Li, Y., Mu, Y., & Gage, F. H. (2009). Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr Top Dev Biol*, 87, 149-174. doi: 10.1016/S0070-2153(09)01205-8
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luca, F., Perry, G. H., & Di Rienzo, A. (2010). Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr*, 30, 291-314. doi: 10.1146/annurev-nutr-080508-141048
- Lucke-Wold, B. P., Logsdon, A. F., Turner, R. C., Rosen, C. L., & Huber, J. D. (2014). Aging, the metabolic syndrome, and ischemic stroke: redefining the approach for studying the blood-brain barrier in a complex neurological disease. *Adv Pharmacol*, 71, 411-449. doi: 10.1016/bs.apha.2014.07.001
- Macht, V. A., & Reagan, L. P. (2017). Chronic stress from adolescence to aging in the prefrontal cortex: A neuroimmune perspective. *Front Neuroendocrinol*. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.12.001
- Maren, S. (2005). Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron*, 47(6), 783-786.
- Marin-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., & Schinder, A. F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*, 335(6073), 1238-1242. doi: 10.1126/science.1214956
- Marin-Burgin, A., & Schinder, A. F. (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav. Brain Res.*, 227(2), 391-399.
- Martino, L., Masini, M., Novelli, M., Beffy, P., Bugliani, M., Marselli, L., . . . De Tata, V. (2012). Palmitate activates autophagy in INS-1E beta-cells and in isolated rat and human pancreatic islets. *PLoS One*, 7(5), e36188. doi: 10.1371/journal.pone.0036188
- Matheson, B. E., & Eichen, D. M. (2018). A Review of Childhood Behavioral Problems and Disorders in the Development of Obesity: Attention Deficit/Hyperactivity Disorder, Autism Spectrum Disorder, and Beyond. *Curr Obes Rep*. doi: 10.1007/s13679-018-0293-z
- May, A. A., Bedel, N. D., Shen, L., Woods, S. C., & Liu, M. (2016). Estrogen and insulin transport through the blood-brain barrier. *Physiol Behav*, 163, 312-321. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.019
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 151(2), 576-585. doi: 10.1210/en.2009-1122

- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(8). doi: 10.1101/cshperspect.a006239
- McKinney, R. A. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J Physiol*, 588(Pt 1), 107-116. doi: 10.1113/jphysiol.2009.178905
- Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav. Immun.*, 42, 10-21.
- Mitanchez, D., & Chavatte-Palmer, P. (2018). Review shows that maternal obesity induces serious adverse neonatal effects and is associated with childhood obesity in their offspring. *Acta Paediatr.* doi: 10.1111/apa.14269
- Moon, M. L., Joesting, J. J., Lawson, M. A., Chiu, G. S., Blevins, N. A., Kwakwa, K. A., & Freund, G. G. (2014). The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. *Metabolism*, 63(9), 1131-1140.
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 18(18), 7535-7542.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 6, 85.
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641
- Muoio, V., Persson, P. B., & Sendeski, M. M. (2014). The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*, 210(4), 790-798. doi: 10.1111/apha.12250
- Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F. J., & Barcia, J. M. (2014). Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2014, 102158.
- Muzzio, M. L., Berg, G., Zago, V., Basilio, F., Sanguinetti, S., Lopez, G., . . . Schreier, L. (2007). Circulating small dense LDL, endothelial injuring factors and fibronectin in healthy postmenopausal women. *Clin. Chim. Acta*, 381(2), 157-163.
- Namgaladze, D., Lips, S., Leiker, T. J., Murphy, R. C., Ekroos, K., Ferreiros, N., . . . Brune, B. (2014). Inhibition of macrophage fatty acid beta-oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *Diabetologia*, 57(5), 1067-1077. doi: 10.1007/s00125-014-3173-4
- Nelson, A. R., Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1862(5), 887-900. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.016
- Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., de Alvaro, C., & Lorenzo, M. (2008). Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*, 57(12), 3211-3221. doi: 10.2337/db07-1062
- Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., Kramer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem*, 114(3), 183-194. doi: 10.1080/13813450802181047
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), 609-622. doi: 10.1016/j.neuron.2005.03.015
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300-316. doi: 10.1002/glia.22930

- O'Brien, P. D., Hinder, L. M., Callaghan, B. C., & Feldman, E. L. (2017). Neurological consequences of obesity. *Lancet Neurol*, 16(6), 465-477. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30084-4
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., . . . Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*, 9(1), 35-51. doi: 10.1016/j.cmet.2008.12.004
- Papazoglou, I. K., Jean, A., Gertler, A., Taouis, M., & Vacher, C. M. (2015). Hippocampal GSK3beta as a Molecular Link Between Obesity and Depression. *Mol.Neurobiol.*, 52(1), 363-374.
- Parimisetty, A., Dorsemans, A. C., Awada, R., Ravanani, P., Diotel, N., & Lefebvre d'Hellencourt, C. (2016). Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J Neuroinflammation*, 13(1), 67. doi: 10.1186/s12974-016-0530-x
- Pascual-Leone, A., Freitas, C., Oberman, L., Horvath, J. C., Halko, M., Eldaief, M., . . . Rotenberg, A. (2011). Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI. *Brain Topogr*, 24(3-4), 302-315. doi: 10.1007/s10548-011-0196-8
- Perez-Cerda, F., Sanchez-Gomez, M. V., & Matute, C. (2015). Pio del Rio Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat*, 9, 92. doi: 10.3389/fnana.2015.00092
- Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2012). Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism*, 61(5), 611-619. doi: 10.1016/j.metabol.2011.10.005
- Peter J.Turnbaugh, R. L., MichaelA.Mahowald,VincentMagrini,ElaineR.Mardis &JeffreyL. Gordon. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444.
- Pierre, W. C., Smith, P. L. P., Londono, I., Chemtob, S., Mallard, C., & Lodygensky, G. A. (2017). Neonatal microglia: The cornerstone of brain fate. *Brain Behav Immun*, 59, 333-345. doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.018
- Pomilio, C., Pavia, P., Gorojod, R. M., Vinuesa, A., Alaimo, A., Galvan, V., . . . Saravia, F. (2016). Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Aβeta internalization. *Hippocampus*, 26(2), 194-210.
- Pozzo-Miller, L. D., Inoue, T., & Murphy, D. D. (1999). Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 81(3), 1404-1411. doi: 10.1152/jn.1999.81.3.1404
- Price, B. R., Norris, C. M., Sompol, P., & Wilcock, D. M. (2017). An emerging role of astrocytes in vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *J Neurochem*. doi: 10.1111/jnc.14273
- Puder, J. J., & Munsch, S. (2010). Psychological correlates of childhood obesity. *Int.J.Obes.(Lond)*, 34 Suppl 2, S37-S43.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*, 19(8), 987-991. doi: 10.1038/nn.4338
- Reilly, J. J., & Wilson, D. (2006). ABC of obesity. Childhood obesity. *BMJ*, 333(7580), 1207-1210. doi: 10.1136/bmj.39048.503750.BE
- Revsin, Y., Rekers, N. V., Louwe, M. C., Saravia, F. E., De Nicola, A. F., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2009). Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(3), 747-758.
- Rosenzweig, E. S., & Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, 69(3), 143-179.

- Russo, I., Barlati, S., & Bosetti, F. (2011). Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. *J.Neurochem.*, 116(6), 947-956.
- Santos, L. E., Beckman, D., & Ferreira, S. T. (2015). Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease. *Brain Behav.Immun.*
- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., & De Nicola, A. (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 480-492.
- Shelke, G. V., Lasser, C., Ghossein, Y. S., & Lotvall, J. (2014). Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles*, 3. doi: 10.3402/jev.v3.24783
- Simopoulos, A. P. (2001). Genetic variants, diet, and physical activity. *J Am Diet Assoc*, 101(3), 302-304. doi: 10.1016/S0002-8223(01)00079-7
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*, 60(9), 502-507. doi: 10.1016/j.biopha.2006.07.080
- Simopoulos, A. P. (2011). Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: evolutionary aspects of diet. *World Rev Nutr Diet*, 102, 10-21. doi: 10.1159/000327785
- Sobesky, J. L., Barrientos, R. M., De May, H. S., Thompson, B. M., Weber, M. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2014). High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 β , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav.Immun.*, 42, 22-32.
- Sofogianni, A., Alkagiet, S., & Tziomalos, K. (2018). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and coronary heart disease. *Curr Pharm Des.* doi: 10.2174/1381612824666180111110550
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., . . . Frisen, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219-1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 24(4), 417-463.
- Spear, L. P. (2013). Adolescent neurodevelopment. *J Adolesc Health*, 52(2 Suppl 2), S7-13. doi: 10.1016/j.jadohealth.2012.05.006
- Spinelli, M., Fusco, S., Mainardi, M., Scala, F., Natale, F., Lapenta, R., . . . Grassi, C. (2017). Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nat Commun*, 8(1), 2009. doi: 10.1038/s41467-017-02221-9
- Stranahan, A. M. (2015). Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience*, 309, 125-139. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.045
- Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., Cutler, R. G., Lee, K., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat.Neurosci.*, 11(3), 309-317.
- Stratford, S., Hoehn, K. L., Liu, F., & Summers, S. A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*, 279(35), 36608-36615. doi: 10.1074/jbc.M406499200
- Tang, S., Wu, W., Tang, W., Ge, Z., Wang, H., Hong, T., . . . Bi, Y. (2017). Suppression of Rho-kinase 1 is responsible for insulin regulation of the AMPK/SREBP-1c pathway in skeletal muscle cells exposed to palmitate. *Acta Diabetol*, 54(7), 635-644. doi: 10.1007/s00592-017-0976-z

- Tanti, A., & Belzung, C. (2013). Hippocampal neurogenesis: a biomarker for depression or antidepressant effects? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell Tissue Res.*, 354(1), 203-219.
- Toda, T., & Gage, F. H. (2017). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* doi: 10.1007/s00441-017-2735-4
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., . . . Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247. doi: 10.1126/science.1153124
- Tran, T. T., Postal, B. G., Demignot, S., Ribeiro, A., Osinski, C., Pais de Barros, J. P., . . . Carriere, V. (2016). Short Term Palmitate Supply Impairs Intestinal Insulin Signaling via Ceramide Production. *J Biol Chem*, 291(31), 16328-16338. doi: 10.1074/jbc.M115.709626
- Tremblay, M. E., Lecours, C., Samson, L., Sanchez-Zafra, V., & Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achucarro and Rio-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat*, 9, 45. doi: 10.3389/fnana.2015.00045
- Trinchero, M. F., Buttner, K. A., Sulkes Cuevas, J. N., Temprana, S. G., Fontanet, P. A., Monzon-Salinas, M. C., . . . Schinder, A. F. (2017). High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Rep*, 21(5), 1129-1139. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.064
- Ttofi, M. M. (2015). Adolescent bullying linked to depression in early adulthood. *BMJ*, 350, h2694. doi: 10.1136/bmj.h2694
- Vadas, O., Burke, J. E., Zhang, X., Berndt, A., & Williams, R. L. (2011). Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci.Signal.*, 4(195), re2.
- Vadodaria, K. C., & Gage, F. H. (2014). SnapShot: adult hippocampal neurogenesis. *Cell*, 156(5), 1114-1114 e1111. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.029
- Valdearcos, M., Robblee, M. M., Benjamin, D. I., Nomura, D. K., Xu, A. W., & Koliwad, S. K. (2014). Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep*, 9(6), 2124-2138. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.018
- Valdivia, S., Patrone, A., Reynaldo, M., & Perello, M. (2014). Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PLoS.One.*, 9(1), e87478.
- Valero, J., Paris, I., & Sierra, A. (2016). Lifestyle Shapes the Dialogue between Environment, Microglia, and Adult Neurogenesis. *ACS Chem Neurosci*, 7(4), 442-453. doi: 10.1021/acchemneuro.6b00009
- Valladolid-Acebes, I., Fole, A., Martin, M., Morales, L., Cano, M. V., Ruiz-Gayo, M., & Del Olmo, N. (2013). Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin? *Neurobiol.Learn.Mem.*, 106, 18-25.
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi: 10.1038/nrm.2017.125
- Velloso, L. A., Folli, F., & Saad, M. J. (2015). TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. *Endocr.Rev.*, 36(3), 245-271.
- Vendruscolo, L. F., Gueye, A. B., Darnaudery, M., Ahmed, S. H., & Cador, M. (2010). Sugar overconsumption during adolescence selectively alters motivation and reward function in adult rats. *PLoS.One.*, 5(2), e9296.
- Verkhratsky, A., Rodriguez, J. J., & Parpura, V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future.Neurol.*, 8(2), 149-158.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci*, 36(4), 209-217. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.007

- Wang, Z., Liu, D., Wang, F., Liu, S., Zhao, S., Ling, E. A., & Hao, A. (2012). Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-kappaB signalling. *Br J Nutr*, 107(2), 229-241. doi: 10.1017/S0007114511002868
- Warnick, G. R., Benderson, J., & Albers, J. J. (1982). Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin.Chem.*, 28(6), 1379-1388.
- Watanabe, Y., Nagai, Y., & Takatsu, K. (2013). Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients*, 5(9), 3757-3778. doi: 10.3390/nu5093757
- Welty, F. K., Alfaddagh, A., & Elajami, T. K. (2016). Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Transl.Res.*, 257-280.
- Wesson, D. W., & Wilson, D. A. (2011). Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice. *Behav.Brain Res.*, 216(1), 408-413.
- WHO. (2009). Global Health Risks.
- WHO. (2015a). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. WHO.
- WHO. (2015b). Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud.
- WHO. (2018). Obesity and overweight. from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19-39.
- Xu, W. L., Atti, A. R., Gatz, M., Pedersen, N. L., Johansson, B., & Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology*, 76(18), 1568-1574.
- Yan, B. C., Jiang, D., Wang, J., Zhang, Y., Zhu, X., Xu, P., . . . Su, P. Q. (2017). Both decreased Akt expression and mTOR phosphorylation are related to decreased neuronal differentiation in the hippocampal alveus of aged mice. *Aging Clin Exp Res*. doi: 10.1007/s40520-017-0833-5
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., & Reshef, R. (2015). Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.*, 38(10), 637-658.
- York, E. M., Bernier, L. P., & MacVicar, B. A. (2017). Microglial modulation of neuronal activity in the healthy brain. *Dev Neurobiol*. doi: 10.1002/dneu.22571
- Young, W. S., 3rd. (1986). Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides*, 8(2), 93-97.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 24, 1071-1089. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1071
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 12(12), 723-738. doi: 10.1038/nrn3114
- Zolezzi, J. M., Bastias-Candia, S., Santos, M. J., & Inestrosa, N. C. (2014). Alzheimer's disease: relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid-beta brain balance and the putative role of PPARs. *Front Aging Neurosci*, 6, 176. doi: 10.3389/fnagi.2014.00176